

委陵菜酸对幽门螺杆菌诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用

贺海波¹, 朱丽金¹, 贺君宇², 江伟杰¹, 王 晓¹, 彭 校¹, 陈烨韬¹, 宋利华¹, 张继红^{3*}, 邹 坤¹

1. 三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 药食同源大健康产品开发利用宜昌市重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学中医临床医学院 脾胃病科, 湖北 宜昌 443002

摘要:目的 探索委陵菜酸对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)诱导人胃黏膜上皮细胞 GES-1 损伤的影响。方法 GES-1 细胞与 Hp 共培养, 给予委陵菜酸和 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptor family 3, NLRP3) 抑制剂 MCC950, 考察各组细胞存活率、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放率、集落形成、凋亡率、线粒体膜电位和活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 变化; 采用 ELISA 法检测各组细胞上清液中单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、角质细胞趋化因子 (keratinocyte chemokines, KC)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-18、IL-4 和 IL-10 水平; 采用试剂盒检测各组细胞谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量; 采用 qRT-PCR 检测各组细胞 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 和 Bad mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组细胞 TLR4/NLRP3/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和线粒体凋亡信号通路相关蛋白表达情况。**结果** 委陵菜酸显著抑制 Hp 诱导的 GES-1 细胞 LDH 释放率 ($P<0.05$ 、 0.01), 促进细胞集落形成 ($P<0.05$ 、 0.01), 抑制细胞凋亡 ($P<0.05$ 、 0.01); 升高细胞线粒体膜电位 ($P<0.01$), 降低 ROS 水平 ($P<0.01$); 降低上清液中 MCP-1、KC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 水平 ($P<0.01$), 升高 IL-4 和 IL-10 水平 ($P<0.01$); 升高细胞 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性 ($P<0.01$), 降低 MDA 含量 ($P<0.01$); 降低细胞 TLR4、MyD88、Bax、Bad mRNA 表达水平 ($P<0.01$), 升高 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 表达水平和 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad ($P<0.01$); 下调细胞 TLR4、MyD88、磷酸化 I κ B 激酶 β (phosphorylated inhibitor kappa B kinase β , p-IKK β)、p-I κ B α 、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-Caspase-1)、Caspase-1、硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP)、pro-IL-1 β 、pro-IL-18、Bax、Bad、细胞色素 C、凋亡酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)、剪切型 Caspase-9 (cleaved Caspase-9)、cleaved Caspase-3 和胞核 p65 蛋白表达水平 ($P<0.01$), 上调 Bcl-2、Bcl-xl、pro-Caspase-9、pro-Caspase-3 和胞质 p65 蛋白表达水平 ($P<0.01$)。**结论** 委陵菜酸对 Hp 诱导的 GES-1 细胞损伤具有明显保护作用, 其作用机制可能与增强内源性抗氧化系统功能、抑制氧化应激、炎症反应及 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路激活, 从而减少线粒体介导的凋亡密切相关。

关键词: 委陵菜酸; GES-1 细胞; 幽门螺杆菌; 炎症反应; NLRP3 炎症小体激活; 线粒体功能

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4892-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.014

Protective effect of tormentic acid on *Helicobacter pylori* induced GES-1 cells injury

HE Hai-bo¹, ZHU Li-jin¹, HE Jun-yu², JIANG Wei-jie¹, WANG Xiao¹, PENG Xiao¹, CHEN Ye-tao¹, SONG Li-hua¹, ZHANG Ji-hong³, ZOU Kun¹

1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang Key Laboratory of Development and Utilization of Health Products with Drug and Food Homology, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

3. Department of Spleen and Stomach, Chinese Medicine Clinical Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

收稿日期: 2021-02-18

基金项目: 湖北省生物酵素工程研究技术研究中心项目 (JS2018-06); 宜昌市科学技术局资助项目 (A18-302-a2, A21-2-044); 三峡大学硕士学位论文培育基金资助项目 (2020SSPY114, 2019SSPY159, 2018SSPY140, 2017YPY086)

作者简介: 贺海波 (1972—), 男, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究。E-mail: hjy219@126.com

*通信作者: 张继红 (1967—), 主任医师, 从事消化系统基础与临床研究。E-mail: 13872605766@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of tormentic acid on *Helicobacter pylori* (Hp)-induced human gastric mucosal epithelial cells GES-1 injury. **Methods** GES-1 cells were co-cultured with Hp, and then given tormentic acid and NOD-like receptor family 3 (NLRP3) inhibitor MCC950. Cell survival rate, lactate dehydrogenase (LDH) release rate, colony formation, apoptosis rate, mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) were investigated; Levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), keratinocyte chemokines (KC), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-18, IL-4 and IL-10 in supernatant of GES-1 cells were detected by ELISA; Glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) levels were detected by kits; mRNA expressions of toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bax* and *Bad* were detected by qRT-PCR; The related protein expressions of TLR4/NLRP3/nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitochondrial apoptosis signal pathways were detected by Western blotting. **Results** Tormentic acid significantly inhibited the release rate of LDH induced by Hp ($P < 0.05, 0.01$), promoted cells colony formation ($P < 0.05, 0.01$), inhibited cell apoptosis ($P < 0.05, 0.01$), increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), decreased ROS level ($P < 0.01$), reduced levels of MCP-1, KC, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18 in supernatant ($P < 0.01$), increased levels of IL-4 and IL-10 in supernatant ($P < 0.01$). Tormentic acid significantly increased activities of GSH-Px, SOD and CAT ($P < 0.01$), reduced MDA level ($P < 0.01$). Tormentic acid significantly reduced *TLR4*, *MyD88*, *Bax* and *Bad* mRNA expressions ($P < 0.01$), increased *Bcl-2*, *Bcl-xl* mRNA expressions and *Bcl-2/Bax*, *Bcl-xl/Bad* ($P < 0.01$). Tormentic acid significantly down-regulated TLR4, MyD88, phosphorylated I κ B kinase β (p-IKK β), p-I κ B α , NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), pro-Caspase-1, Caspase-1, thioredoxin-interacting protein (TXNIP), pro-IL-1 β , pro-IL-18, Bax, Bad, cytochrome C, apoptotic protein activating factor-1 (Apaf-1), cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3 and nuclear p65 protein expressions ($P < 0.01$), and up-regulated Bcl-2, Bcl-xl, pro-Caspase-9, pro-Caspase-3 and cytoplasmic p65 protein expressions ($P < 0.01$). **Conclusion** Tormentic acid has a notable protective effect on Hp-injured GES-1 cells, and its mechanism might be closely related to enhancing the function of endogenous antioxidant system, inhibiting the oxidative stress, inflammatory response, and inflammatory activation of TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway, thereby reducing mitochondrial mediated apoptosis.

Key words: tormentic acid; GES-1 cells; *Helicobacter pylori*; inflammatory response; NLRP3 inflammasome activation; mitochondrial function

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种能够持续定植在胃内并引起胃黏膜炎性反应的微需氧革兰阴性杆菌。目前, 世界范围内 Hp 的人群感染率已超过 50%^[1]。Hp 感染与胃溃疡、胃炎和胃癌等许多疾病的发生发展有关, 成功根除 Hp 可有效缓解胃症状, 并降低溃疡复发率和胃癌发生率^[2]。目前临床上用于清除 Hp 感染常用的方法有三联疗法和四联疗法, 由于其耐药性和 Hp 感染流行病学变化, 以及腹泻和胃肠道异常反应等不良反应发生率高、依从性差, 长期使用多种抗生素可导致肠道菌群紊乱等诸多不足, 导致治愈率大幅降低^[3]。

定植于胃黏膜上皮中的 Hp 释放毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA)、空泡毒素 A (Vac lating cytotoxin A, VacA) 和尿素酶等毒性因子诱导促炎因子释放及氧化损伤, 而促炎因子通过激活中性粒细胞, 诱导活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 大量产生, 促进硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 与 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptor family 3, NLRP3) 结合并激活 NLRP3 炎症小体, 导致半胱

氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 活化, 将白细胞介素-1 β 前体 (interleukin-1 β precursor, pro-IL-1 β) 和 pro-IL-18 剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18 形式, 介导炎性反应^[2]。Huang 等^[4]发现 IL-1 β 分泌过多与胃癌的发生发展密切相关。因此, 抑制 ROS 产生和 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 活化有利于 Hp 感染和 Hp 相关性胃炎的治疗。

木瓜为贴梗海棠 *Chaenomeles speciose* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 性味酸、温, 归肝、脾经, 具有舒筋活络、和胃化湿的功效, 用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、暑湿吐泻、转筋挛痛、脚气水肿等症^[5]。本课题组前期研究发现, 木瓜的重要活性成分木瓜三萜对脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 及佐剂性关节炎大鼠具有较好的抗炎活性, 可有效抑制消化道炎症损伤和炎症细胞浸润^[6-9]。委陵菜酸为木瓜三萜中一种重要的活性成分^[8], 可显著降低脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6 和 IL-8 水平, 抑制甲基-苯基-吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 诱导的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 内 ROS 大量生成和细胞凋亡, 与抑

制免疫炎症反应、炎症因子分泌和调控线粒体凋亡通路有关^[9-11]。本研究拟在此基础上,通过 Hp 诱导人胃黏膜上皮细胞 GES-1 损伤,围绕炎症反应、NLRP3 炎症小体激活和线粒体功能来研究委陵菜酸对 Hp 诱导的 GES-1 细胞损伤的影响及机制,为其临床治疗 Hp 相关疾病提供依据。

1 材料

1.1 细胞

GES-1 细胞由南华大学顾洪峰教授惠赠; Hp NCTC11637 菌株由湖南中医药大学基础医学院病原免疫学教研室伍参荣教授馈赠。

1.2 药品与试剂

委陵菜酸(图 1)由本课题组从长阳土家族自治县资丘产皱皮木瓜 *C. speciosa* (Sweet) Nakai 中分离,并采用紫外、红外、质谱、核磁共振等波谱学方法对其结构进行鉴定,其质量分数为 98.15%^[9]; RPMI 1640 培养基、二甲基亚砜(DMSO)、胎牛血清、MTT、Hoechst 33258、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、DCFH-DA 探针(批号分别为 C22400500BT、D8371、SA190501、T8877、808365、0MYL03、S0033)购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)试剂盒(批号 CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司; NLRP3 抑制剂 MCC950(批号 5381200001)购自英国 Tocris 公司; ROS(批号 1275755)购自美国 Invitrogen 公司; 考马斯亮蓝蛋白质定量试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号分别为 A045-2、A004、A007-1、A001-1、A005、A003-1、A007-1)购自南京建成生物工程研究所; 单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、角质细胞趋化因子(keratinocyte chemokines, KC)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis

factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-18、IL-4、IL-10 ELISA 试剂盒(批号分别为 DKW12-1050-096、DKW12-22310-096、DKW12-2720-096、DKW12-1060-096、DKW12-2050-096、DKW12-3140-096、DKW12-1080-096、DKW12-2100-096)购自深圳市达科为生物技术股份有限公司; Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、B 淋巴细胞瘤 2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-xl、Bcl-2 相关 X 蛋白基因(Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bad、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物、Trizol(批号 12183555)、DEPC 水(批号 18080044)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Prime Script TM RT reagent Kit、Taq DNA 聚合酶(批号分别为 600320、603270)购自宝生物工程(大连)有限公司; IkB 激酶 β (inhibitor kappa B kinase β , IKK β)、磷酸化 IKK β (p-IKK β)、IkB α 、p-IkB α 、p65、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、Caspase-1 前体(pro-Caspase-1)、剪切型 Caspase-1(cleaved Caspase-1)、TXNIP、Bcl-2、Bcl-xl、Bax、Bad、细胞色素 C(cytochrome C)、凋亡酶激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)、pro-Caspase-9、cleaved Caspase-9、pro-Caspase-3、cleaved Caspase-3、 β -actin 抗体(批号分别为 sc-1623、sc-0215、sc-7453、sc6721、sc478、sc0321、sc539、sc3291、sc0542、sc0570、sc492、sc356、sc194、sc365、c-sc13560、sc7846、sc7885、sc7654、sc7739、sc7541、sc-1616)购自美国 Santa Cruz 公司; HRP 标记的 IgG 抗体(批号 ab73400)购自英国 Abcam 公司; 胞质蛋白提取试剂盒、胞核蛋白提取试剂盒、ECL 发光试剂盒(批号分别为 P0028、P0019、P0215)购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

ME204E 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); VORTEX-6 型高速旋涡混合器(美国奥然公司); 5427R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); HVA-110 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司); MCO175 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); ECLIPSE TS100TS100-F 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); BX63 型荧光显微镜(日本 Olympus

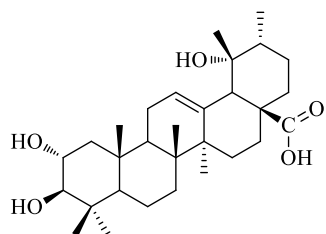


图 1 委陵菜酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of tormentic acid

公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);M200 PRO型酶联免疫检测仪(瑞士Tecan公司);NanoDrop One C型微量核酸蛋白浓度测定仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Eco48型qRT-PCR仪(英国Illumina公司);DYY-16D型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞及细菌培养

GES-1细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的RPMI 1640培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。Hp菌株用含10%卵黄和胎牛血清、可溶性淀粉、两性霉素、磺胺增效剂、万古霉素的布氏菌选择性培养基,于37℃、10% CO₂、5% O₂、85% N₂培养箱中培养。

2.2 委陵菜酸对Hp诱导GES-1细胞存活率的影响

GES-1细胞以1×10⁵/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁生长至80%融合。委陵菜酸溶于DMSO配制成质量浓度为10 mg/mL的溶液,以培养基稀释成所需浓度,经0.22 μm滤膜滤过除菌。设置对照组、模型组和委陵菜酸(1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0、50.000 0 μg/mL)组,模型组和各给药组在感染复数(multiplicity of infection, MOI)为100的条件下与Hp共培养2 h,各给药组再加入相应药物,对照组和模型组加入不含药物的培养基,培养24 h。加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),于培养箱中孵育4 h,吸去培养基,加入150 μL DMSO,振荡10 min,采用酶标仪测定490 nm处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 委陵菜酸对Hp诱导GES-1细胞LDH释放率的影响

按“2.2”项下方法处理细胞和分组,吸取上清液,按试剂盒说明书检测各组细胞LDH释放率。

2.4 委陵菜酸对Hp诱导GES-1细胞集落形成的影响

GES-1细胞以3×10²/孔接种于6孔板中,待细胞贴壁生长至80%融合。设置对照组、模型组和委陵菜酸(3.125、6.250、12.500 μg/mL)组,模型组和各给药组在MOI=100条件下与Hp共培养2 h,各给药组再加入相应药物,对照组和模型组加入不含药物的培养基,培养14 d,每3天更换1次培养基。以PBS冲洗2次,用0.1%结晶紫染色15 min, PBS冲洗2次除去残留染料后,于显微镜下计数菌

落数,计算克隆形成率^[9]。

$$\text{克隆形成率} = \text{克隆形成数} / \text{接种数}$$

2.5 委陵菜酸对Hp诱导GES-1细胞凋亡的影响

GES-1细胞以1×10⁵/孔接种于96孔板,设置对照组、模型组和委陵菜酸(3.125、6.250、12.500 μg/mL)组,按“2.2”项下方法进行处理,以PBS冲洗2次,加入Hoechst 33258染料于37℃染色10 min,以PBS冲洗2次去除残余染料后,于显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.6 委陵菜酸和NLRP3抑制剂MCC950对Hp诱导GES-1细胞凋亡的影响

GES-1细胞以1×10⁵/孔接种于96孔板,设置对照组、模型组、委陵菜酸(12.5 μg/mL)组和MCC950(8 μmol/L)组,按“2.2”项下方法进行处理,收集细胞,用预冷的PBS冲洗,按Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书进行染色,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

2.7 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞线粒体膜电位的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,收集细胞,按试剂盒说明书测定各组细胞线粒体膜电位^[9]。

2.8 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞ROS水平的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,弃去上清, PBS洗涤1次,加入DCFH-DA探针(10 μmol/L),于培养箱中孵育30 min, PBS洗涤3次,收集细胞,采用荧光酶标仪检测各组细胞内ROS水平。

2.9 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞上清液中MCP-1、KC、TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-18、IL-4和IL-10水平的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,收集上清液,按试剂盒说明书测定各组细胞上清液中MCP-1、KC、TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-18、IL-4和IL-10水平。

2.10 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞GSH-Px、SOD、CAT活性和MDA含量的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,收集细胞,超声破碎后离心,收集上清,按试剂盒说明书测定各组细胞GSH-Px、SOD、CAT活性和MDA含量。

2.11 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞TLR4、MyD88、Bcl-2、Bcl-xl、Bax和Bad mRNA表达的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,收集细胞,

按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')
TLR4	F: GAGGATGATGCCAGGATGATGTC R: GCCAAGTCTCCACGCAGG
MyD88	F: TCTCTCCAGGTGCCCATCA R: GGCGAGTCCAGAACCAAGAT
Bcl-2	F: CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
Bcl-xl	F: TCCTTGCTACGCTTTCCACG R: GGTTCGATTGTGGCCTTT
Bax	F: ATGGGCTGGACATTGGAC R: GGGACATCAGTCGCTTCAG
Bad	F: CCAGAGTTTGAGCCGAGTGAG R: CATGATGCTTGCCGGAGCC
GAPDH	F: CCACATCGCTCAGACACCAT R: GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT

2.12 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 TLR4/NLRP3/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)和线粒体凋亡信号通路相关蛋白表达的影响

按“2.6”项下方法进行分组和处理,按照总蛋白、胞质和胞核蛋白提取试剂盒说明书分别提取各组细胞总蛋白、胞质和胞核蛋白,经核酸测定仪测定蛋白含量后,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶封闭,分别加入 TLR4、MyD88、IKK β 、p-IKK β 、I κ B α 、p-I κ B α 、p65、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、TXNIP、Bcl-2、Bcl-xl、Bax、Bad、cytochrome C、Apaf-1、pro-Caspase-9、cleaved Caspase-9、pro-Caspase-3、cleaved Caspase-3 和 β -actin 抗体,孵育过夜;加入 HRP 标记的 IgG 抗体孵育,加入 ECL 发光液显影^[9,12]。

2.13 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 6.01 软件进行统计分析,组间比较用 T 检验,多组间比较用单因素方差分析。

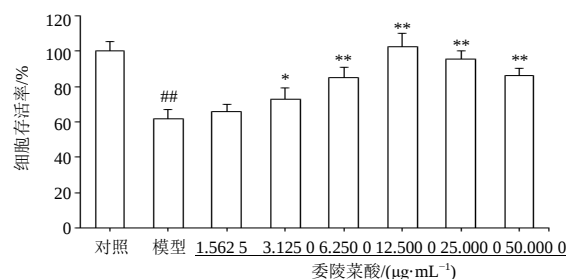
3 结果

3.1 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞存活率的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,委陵菜酸 (3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0、50.000 0 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.2 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞 LDH 释放率的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞 LDH



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as belows

图 2 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of tormentic acid on survival rate of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

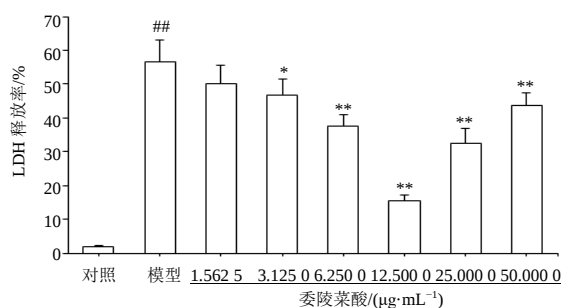


图 3 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞 LDH 释放率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Effect of tormentic acid on LDH release rate of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

释放率显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,委陵菜酸 (3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0、50.000 0 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞 LDH 释放率显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),尤其以 12.500 0 $\mu\text{g/mL}$ 委陵菜酸最为明显,因此以委陵菜酸的适宜质量浓度 $\leq 12.5 \mu\text{g/mL}$ 进行后续研究。

3.3 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞集落形成的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组细胞克隆形成率明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组细胞克隆形成率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.4 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞凋亡的影响

如图 5 所示,对照组细胞形态均一完整,呈现弱蓝色荧光,染色质分布均匀;模型组可见较多强蓝色荧光染色细胞,可观察到典型的凋亡小体,染色质浓缩,核碎裂成大小不等的圆形小体;各给药组细胞核的浓缩和碎裂明显减少,正常形态的细胞

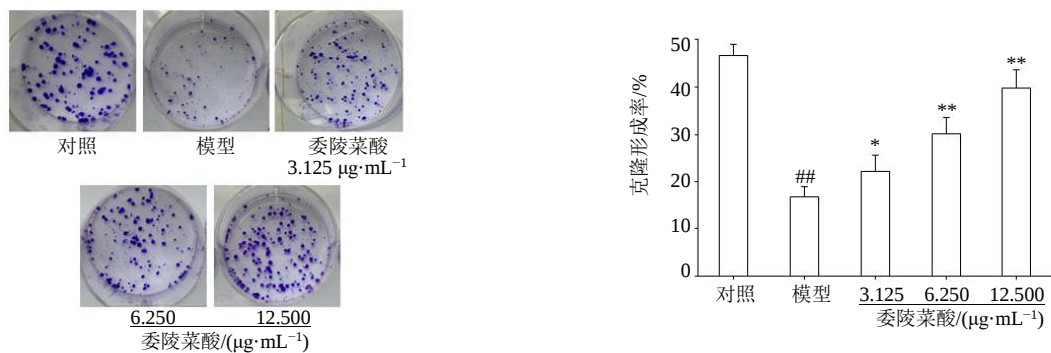
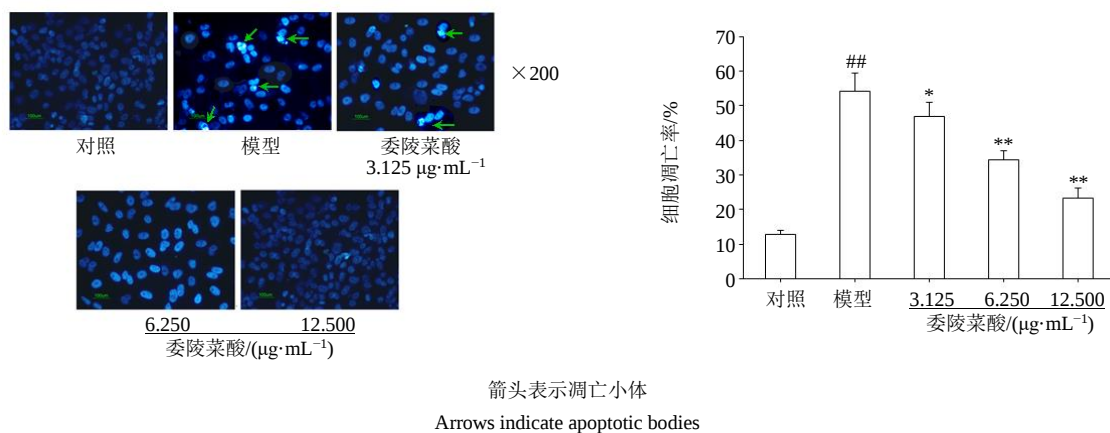


图 4 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of tormentic acid on colony formation of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



箭头表示凋亡小体
Arrows indicate apoptotic bodies

图 5 委陵菜酸对 Hp 诱导 GES-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of tormentic acid on apoptosis of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

较多见。与对照组比较,模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 委陵菜酸和 NLRP3 抑制剂 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞凋亡的影响

NLRP3 炎性小体的活化是 Hp 感染引起促炎因子产生增加的重要机制之一,靶向 NLRP3 炎性小体可能是抗 Hp 感染和治疗 Hp 相关胃炎的策略^[13]。如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞凋亡率显

著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞线粒体膜电位和 ROS 水平的影响

线粒体是细胞凋亡调控的中心,线粒体活力减弱引起线粒体膜去极化,线粒体膜电位降低,触发线粒体介导的一系列凋亡过程^[7]。细胞内 ROS 大量生成会导致线粒体膜脂质过氧化损伤,线粒体膜电

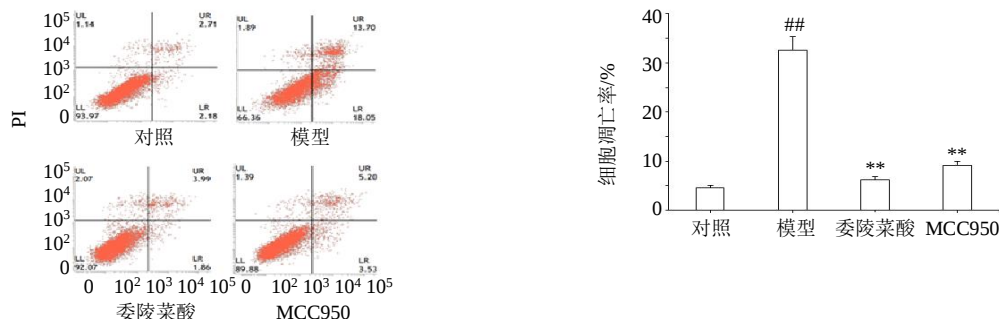


图 6 委陵菜酸和 NLRP3 抑制剂 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of tormentic acid and NLRP3 inhibitor MCC950 on apoptosis of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

位降低^[8]。因此, ROS 大量生成及由此引起的线粒体膜电位下降是线粒体调控凋亡过程中最早期的特异性改变。如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞线粒体膜电位显著降低 ($P<0.01$), ROS 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5

$\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞线粒体膜电位显著升高 ($P<0.01$), ROS 水平显著降低 ($P<0.01$)。表明委陵菜酸可以有效抑制 Hp 诱导的 GES-1 细胞 ROS 生成及线粒体膜脂质过氧化反应, 从而恢复线粒体膜正常的电位水平。

表 2 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞线粒体膜电位和 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of tormentic acid and MCC950 on mitochondrial membrane potential and ROS level of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	线粒体膜电位/%	ROS/RFU
对照	—	21.65 $\pm$ 1.93	25 639.8 $\pm$ 3 060.5
模型	—	4.14 $\pm$ 0.53 ^{##}	97 912.5 $\pm$ 4 643.7 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	19.72 $\pm$ 1.56 ^{**}	38 511.6 $\pm$ 3 152.4 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	18.26 $\pm$ 1.24 ^{**}	41 706.1 $\pm$ 3 421.3 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下表同

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below tables

3.7 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞上清液中 MCP-1、KC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、IL-4 和 IL-10 水平的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中趋化因子 (MCP-1、KC) 和促炎因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18) 水平显著升高 ($P<0.01$), 抗炎因子 (IL-4、IL-10) 水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞上清液中趋化因子 (MCP-1、KC) 和促炎因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、

IL-18) 水平显著降低 ($P<0.01$), 抗炎因子 (IL-4、IL-10) 水平显著升高 ($P<0.01$)。

3.8 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 GSH-Px、SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性明显降低 ($P<0.01$), MDA 含量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性明显升高 ($P<0.01$), MDA 含量显著降低 ($P<0.01$)。

表 3 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞上清液中 MCP-1、KC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、IL-4 和 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of tormentic acid and MCC950 on levels of MCP-1, KC, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4 and IL-10 in supernatant of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	MCP-1/(ng·mL ⁻¹)	KC/(ng·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(ng·mL ⁻¹)
对照	—	12.46 $\pm$ 0.99	2.19 $\pm$ 0.29	7.65 $\pm$ 0.52	5.65 $\pm$ 0.64
模型	—	35.79 $\pm$ 2.84 ^{##}	5.81 $\pm$ 0.77 ^{##}	16.76 $\pm$ 0.95 ^{##}	14.34 $\pm$ 0.96 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	18.14 $\pm$ 0.83 ^{**}	3.64 $\pm$ 0.59 ^{**}	10.32 $\pm$ 0.66 ^{**}	7.87 $\pm$ 0.837 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	20.07 $\pm$ 1.02 ^{**}	3.98 $\pm$ 0.63 ^{**}	12.13 $\pm$ 0.79 ^{**}	9.77 $\pm$ 0.90 ^{**}
组别	剂量	IL-6/(ng·mL ⁻¹)	IL-18/(ng·mL ⁻¹)	IL-4/(ng·mL ⁻¹)	IL-10/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	1.87 $\pm$ 0.15	17.80 $\pm$ 1.53	54.25 $\pm$ 5.87	86.54 $\pm$ 7.63
模型	—	5.71 $\pm$ 0.56 ^{##}	60.63 $\pm$ 5.64 ^{##}	23.74 $\pm$ 1.87 ^{##}	35.87 $\pm$ 2.60 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.45 $\pm$ 0.30 ^{**}	23.35 $\pm$ 3.26 ^{**}	47.36 $\pm$ 3.53 ^{**}	70.02 $\pm$ 5.41 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.52 $\pm$ 0.38 ^{**}	41.23 $\pm$ 3.35 ^{**}	43.89 $\pm$ 2.56 ^{**}	62.56 $\pm$ 7.82 ^{**}

表 4 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 GSH-Px、SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of tormentic acid and MCC950 on activities of GSH-Px, SOD, CAT and MDA content of GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	GSH-Px/(kU·g ⁻¹)	SOD/(kU·g ⁻¹)	CAT/(kU·g ⁻¹)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	6.385 $\pm$ 0.697	38.963 $\pm$ 2.421	1.405 $\pm$ 0.121	0.025 $\pm$ 0.001
模型	—	1.677 $\pm$ 0.264 ^{##}	9.868 $\pm$ 0.650 ^{##}	0.237 $\pm$ 0.025 ^{##}	0.081 $\pm$ 0.005 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.216 $\pm$ 0.502 ^{**}	30.362 $\pm$ 2.204 ^{**}	1.019 $\pm$ 0.091 ^{**}	0.039 $\pm$ 0.002 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.780 $\pm$ 0.427 ^{**}	25.918 $\pm$ 1.187 ^{**}	0.871 $\pm$ 0.066 ^{**}	0.049 $\pm$ 0.003 ^{**}

3.9 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 TLR4、MyD88、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 和 Bad mRNA 表达的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组细胞 TLR4、MyD88、Bax、Bad mRNA 表达水平显著升高 ($P <$

0.01), Bcl-2、Bcl-xl mRNA 表达水平显著降低 ($P <$ 0.01); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞 TLR4、MyD88、Bax、Bad mRNA 表达水平显著降低 ($P <$ 0.01), Bcl-2、Bcl-xl mRNA 表达水平显著升高 ($P <$ 0.01)。

表 5 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 TLR4、MyD88、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 和 Bad mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 5 Effect of tormentic acid and MCC950 on TLR4, MyD88, Bcl-2, Bcl-xl, Bax and Bad mRNA expressions in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	mRNA 相对表达量			
		TLR4	MyD88	Bcl-2	Bcl-xl
对照	—	0.545 $\pm$ 0.053	0.632 $\pm$ 0.057	1.363 $\pm$ 0.136	1.251 $\pm$ 0.116
模型	—	1.729 $\pm$ 0.167 ^{##}	1.588 $\pm$ 0.116 ^{##}	0.267 $\pm$ 0.031 ^{##}	0.196 $\pm$ 0.021 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.786 $\pm$ 0.071 ^{**}	0.816 $\pm$ 0.097 ^{**}	1.071 $\pm$ 0.103 ^{**}	0.918 $\pm$ 0.084 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.148 $\pm$ 0.123 ^{**}	1.265 $\pm$ 0.100 ^{**}	0.723 $\pm$ 0.078 ^{**}	0.625 $\pm$ 0.063 ^{**}

组别	剂量	mRNA 相对表达量		Bcl-2/Bax	Bcl-xl/Bad
		Bax	Bad		
对照	—	0.181 $\pm$ 0.020	0.174 $\pm$ 0.019	7.642 $\pm$ 1.209	7.228 $\pm$ 0.194
模型	—	1.115 $\pm$ 0.122 ^{##}	1.018 $\pm$ 0.121 ^{##}	0.243 $\pm$ 0.045 ^{##}	0.195 $\pm$ 0.033 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.396 $\pm$ 0.039 ^{**}	0.306 $\pm$ 0.043 ^{**}	2.737 $\pm$ 0.164 ^{**}	3.020 $\pm$ 0.186 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.561 $\pm$ 0.062 ^{**}	0.425 $\pm$ 0.047 ^{**}	1.305 $\pm$ 0.121 ^{**}	1.478 $\pm$ 0.159 ^{**}

3.10 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响

如图 7 和表 6~8 所示,与对照组比较,模型组细胞 TLR4、MyD88、p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 p65 蛋白表达水平均显著升高 ($P <$ 0.01), 胞质 p65 蛋白表达水平显著降低 ($P <$ 0.01); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞 TLR4、MyD88、p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、

TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P <$ 0.01), 胞质 p65 蛋白表达水平显著升高 ($P <$ 0.01)。

3.11 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞线粒体凋亡信号通路相关蛋白表达的影响

如图 8 和表 9、10 所示,与对照组比较,模型组细胞 Bax、Bad、cytochrome C、Apaf-1、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P <$ 0.01), Bcl-2、Bcl-xl、pro-Caspase-9、pro-Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P <$ 0.01); 与模型组比较, 委陵菜酸 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和 MCC950

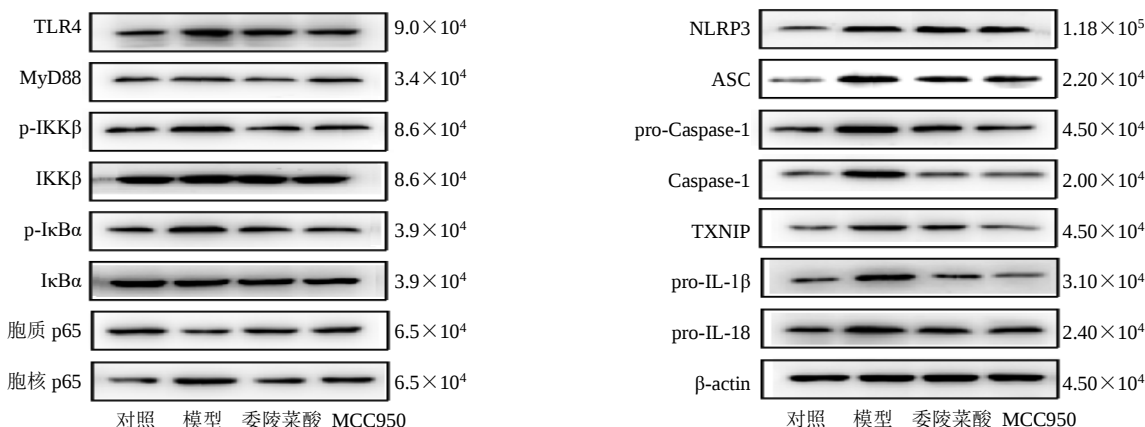


图 7 委陵菜酸和 MCC950 对 Hp 诱导 GES-1 细胞 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of tormentic acid and MCC950 on related protein expressions of TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway in GES-1 cells induced by Hp

表6 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞TLR4/MyD88通路和IKK复合物相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 6 Effect of tormentic acid and MCC950 on TLR4/MyD88 pathway and IKK complex related protein expressions in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	蛋白相对表达量			
		TLR4	MyD88	p-IKK β	IKK β
对照	—	0.212 $\pm$ 0.023	0.169 $\pm$ 0.018	0.267 $\pm$ 0.031	0.958 $\pm$ 0.090
模型	—	0.516 $\pm$ 0.039 ^{##}	0.553 $\pm$ 0.052 ^{##}	0.619 $\pm$ 0.052 ^{##}	0.949 $\pm$ 0.075
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.337 $\pm$ 0.035 ^{**}	0.220 $\pm$ 0.021 ^{**}	0.384 $\pm$ 0.026 ^{**}	0.958 $\pm$ 0.097
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.318 $\pm$ 0.024 ^{**}	0.241 $\pm$ 0.032 ^{**}	0.437 $\pm$ 0.043 ^{**}	0.944 $\pm$ 0.061

组别	剂量	蛋白相对表达量		p-IKK β /IKK β	p-I κ B α /I κ B α
		p-I κ B α	I κ B α		
对照	—	0.230 $\pm$ 0.036	0.794 $\pm$ 0.042	0.279 $\pm$ 0.013	0.289 $\pm$ 0.030
模型	—	0.482 $\pm$ 0.060 ^{##}	0.806 $\pm$ 0.061	0.656 $\pm$ 0.082 ^{##}	0.596 $\pm$ 0.027 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.265 $\pm$ 0.033 ^{**}	0.783 $\pm$ 0.053	0.405 $\pm$ 0.057 ^{**}	0.338 $\pm$ 0.019 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.293 $\pm$ 0.031 ^{**}	0.771 $\pm$ 0.058	0.467 $\pm$ 0.074 ^{**}	0.379 $\pm$ 0.013 ^{**}

表7 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞NF- κ B/NLRP3炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 7 Effect of tormentic acid and MCC950 on related protein expressions of NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	蛋白相对表达量				
		胞核 p65	胞质 p65	NLRP3	ASC	pro-Caspase-1
对照	—	0.192 $\pm$ 0.018	0.630 $\pm$ 0.036	0.156 $\pm$ 0.019	0.175 $\pm$ 0.011	0.265 $\pm$ 0.027
模型	—	0.668 $\pm$ 0.075 ^{##}	0.187 $\pm$ 0.021 ^{##}	0.543 $\pm$ 0.076 ^{##}	0.749 $\pm$ 0.063 ^{##}	1.077 $\pm$ 0.089 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.286 $\pm$ 0.023 ^{**}	0.514 $\pm$ 0.033 ^{**}	0.397 $\pm$ 0.043 ^{**}	0.402 $\pm$ 0.052 ^{**}	0.325 $\pm$ 0.027 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.414 $\pm$ 0.047 ^{**}	0.396 $\pm$ 0.045 ^{**}	0.311 $\pm$ 0.036 ^{**}	0.454 $\pm$ 0.048 ^{**}	0.351 $\pm$ 0.048 ^{**}

表8 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞炎症因子蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 8 Effect of tormentic acid and MCC950 on protein expressions of inflammatory factors in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	蛋白相对表达量			
		Caspase-1	TXNIP	pro-IL-1 β	pro-IL-18
对照	—	0.157 $\pm$ 0.032	0.147 $\pm$ 0.014	0.179 $\pm$ 0.019	0.195 $\pm$ 0.014
模型	—	0.865 $\pm$ 0.073 ^{##}	0.496 $\pm$ 0.035 ^{##}	0.844 $\pm$ 0.089 ^{##}	0.906 $\pm$ 0.079 ^{##}
委陵菜酸	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.182 $\pm$ 0.016 ^{**}	0.173 $\pm$ 0.019 ^{**}	0.203 $\pm$ 0.025 ^{**}	0.316 $\pm$ 0.045 ^{**}
MCC950	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.320 $\pm$ 0.021 ^{**}	0.216 $\pm$ 0.022 ^{**}	0.231 $\pm$ 0.031 ^{**}	0.502 $\pm$ 0.054 ^{**}

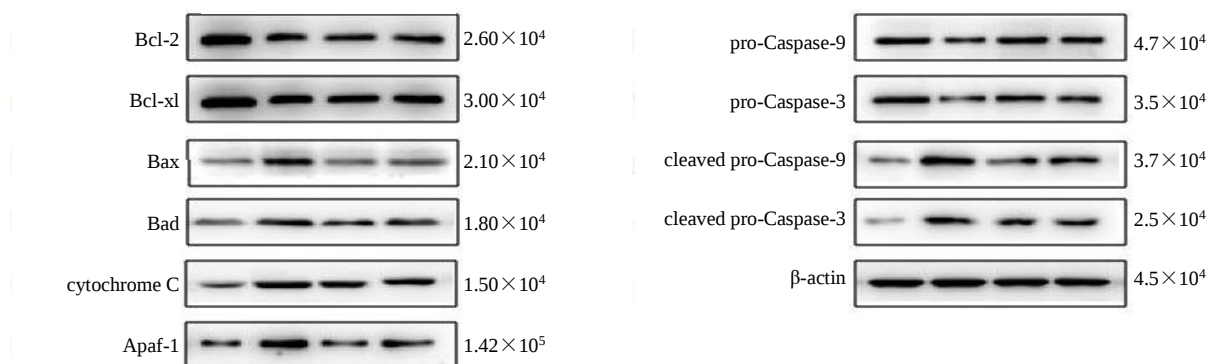


图8 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞线粒体凋亡信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of tormentic acid and MCC950 on related protein expressions of mitochondrial apoptosis signaling pathway in GES-1 cells induced by Hp

表9 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞Bcl-2家族相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 9 Effect of tormentic acid and MCC950 on Bcl-2 family related protein expressions in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	蛋白相对表达量				Bcl-2/Bax	Bcl-xl/Bad
		Bcl-2	Bcl-xl	Bax	Bad		
对照	—	1.178±0.116	1.319±0.127	0.196±0.019	0.186±0.016	6.012±0.116	7.081±0.134
模型	—	0.279±0.030 ^{##}	0.320±0.043 ^{##}	0.498±0.047 ^{##}	0.510±0.049 ^{##}	0.560±0.012 ^{##}	0.627±0.026 ^{##}
委陵菜酸	12.5 μg·mL ⁻¹	0.6311±0.073 ^{**}	0.857±0.091 ^{**}	0.257±0.034 ^{**}	0.247±0.036 ^{**}	2.464±0.049 ^{**}	3.482±0.157 ^{**}
MCC950	8 μmol·L ⁻¹	0.577±0.052 ^{**}	0.657±0.052 ^{**}	0.350±0.037 ^{**}	0.336±0.032 ^{**}	1.648±0.042 ^{**}	1.959±0.031 ^{**}

表10 委陵菜酸和MCC950对Hp诱导GES-1细胞Caspase家族相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 10 Effect of tormentic acid and MCC950 on Caspase family related protein expressions in GES-1 cells induced by Hp ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	蛋白相对表达量					
		cytochrome C	Apaf-1	pro-Caspase-9	pro-Caspase-3	cleaved Caspase-9	cleaved Caspase-3
对照	—	0.169±0.015	0.140±0.017	0.993±0.087	1.001±0.115	0.146±0.019	0.093±0.012
模型	—	0.567±0.052 ^{##}	0.404±0.026 ^{##}	0.217±0.021 ^{##}	0.225±0.024 ^{##}	0.743±0.054 ^{##}	0.325±0.026 ^{##}
委陵菜酸	12.5 μg·mL ⁻¹	0.293±0.030 ^{**}	0.189±0.015 ^{**}	0.729±0.069 ^{**}	0.600±0.046 ^{**}	0.316±0.034 ^{**}	0.247±0.021 ^{**}
MCC950	8 μmol·L ⁻¹	0.401±0.039 ^{**}	0.339±0.028 ^{**}	0.528±0.061 ^{**}	0.510±0.057 ^{**}	0.588±0.056 ^{**}	0.262±0.015 ^{**}

(8 μmol/L)组细胞Bax、Bad、cytochrome C、Apaf-1、cleaved Caspase-9和cleaved Caspase-3蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$), Bcl-2、Bcl-xl、pro-Caspase-9、pro-Caspase-3蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。

4 讨论

陶弘景《名医别录》记载:“木瓜主湿痹邪气,霍乱大吐下,转筋不止”,可用于治湿浊中焦之腹痛吐泻转筋。土家族民间有食用木瓜防治胃肠炎、腰酸腿痛、风湿和类风湿关节炎传统。本课题组根据古代本草中的叙述及土家族民间用药习惯,筛选出了具有良好的胃肠道保护功效和促进受损胃肠道黏膜愈合作用的活性成分木瓜三萜^[14],且证实其具有良好的抗炎、抗氧化活性^[6-7],同时还兼有较好的保护胃肠黏膜、促进受损胃肠道修复作用^[8-9,15-18]。委陵菜酸是从木瓜三萜中一种重要成分,具有良好的抗氧化、抗消化道炎症反应等活性^[9-11]。目前委陵菜酸对Hp诱导的GES-1细胞损伤的影响尚不清楚,本研究通过建立Hp诱导的GES-1细胞损伤模型,探究委陵菜酸对Hp诱导的GES-1细胞的保护作用,在此基础上探寻其可能的作用机制。

定植于胃黏膜上皮中的Hp释放CagA、VacA和尿素酶等毒性因子,它们一方面刺激宿主上皮细胞中还原型辅酶II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶产生内源性应激因子攻击胃黏膜上皮细胞膜,引发脂质过氧化,脂过氧化产物MDA增加,破坏细胞膜完整性,导致LDH从细胞内漏出^[19-20];另一方面,这些毒性因子还可以影响宿主上皮细胞骨架重排,激活

NF-κB通路,促进趋化因子(MCP-1、KC)和促炎因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)表达和释放,进而引起胃黏膜损伤和胃上皮细胞凋亡^[20-22]。本研究发现,与对照组比较,模型组细胞ROS、MDA水平和LDH释放率明显升高,上清液中MCP-1、KC、TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-18水平显著升高,SOD、CAT、GSH-Px活性和上清液中IL-4、IL-10水平显著降低,表明Hp诱导的GES-1细胞损伤导致了氧化应激和炎症反应的发生,委陵菜酸能够抑制Hp诱导的GES-1细胞氧化应激和炎症反应。

Hp触发的炎症反应在Hp相关胃炎病理进程中起着重要作用^[22-23]。当Hp感染胃上皮细胞后,释放的CagA、VacA、尿素酶和ROS等毒性因子被上皮细胞膜上的模式识别受体TLR4识别,促进MyD88募集和TLR4/MyD88复合体形成,通过信号级联,促进p65的活化,进而启动趋化因子、炎症因子的基因转录,促进MCP-1、KC、IL-6、TNF-α等分泌及pro-IL-18、pro-IL-1β和NLRP3产生,导致炎症反应信号传递和级联放大,参与Hp感染、胃溃疡、Hp相关胃炎等病理过程^[22,24]。此外,CagA、VacA、尿素酶和ROS等毒性因子进入胃黏膜上皮细胞后,一方面可促进硫氧还蛋白/TXNIP复合物解离,通过促进ASC和pro-Caspase-1募集,完成NLRP3炎症小体的组装;另一方面可直接引起溶酶体破裂和/或线粒体损伤,导致组织蛋白酶B和/或线粒体内容物(ROS、DNA)释放,激活NLRP3炎症小体,诱导pro-Caspase-1自我剪切和Caspase-1释放,完成pro-IL-1β、pro-IL-18剪切,使IL-1β、

IL-18 释放, 继而刺激上皮细胞, 通过自分泌/旁分泌产生更多的趋化因子和炎症因子, 加重 Hp 感染^[24-25]。由此可见, TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路的激活是导致 Hp 感染胃黏膜上皮细胞后产生炎症反应的关键所在, 靶向此通路可有效遏制 Hp 感染后胃黏膜损伤的病理进程。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18、胞核 p65 蛋白表达水平显著升高, 委陵菜酸干预后可有效逆转上述异常改变, 表明委陵菜酸可通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路炎性激活, 进而抑制趋化因子、炎症因子的生成, 从而发挥对 Hp 损伤的 GES-1 细胞的保护作用。由于 Hp 感染能够诱导多种细胞因子的产生, 促使中性粒细胞、淋巴细胞、单核巨噬细胞等免疫细胞浸润于胃黏膜, 最终导致 Hp 相关胃十二指肠疾病的发生^[26]。在众多细胞因子中, IL-1 β 是目前已知的关键因子之一, IL-1 β 作为强有力的促炎因子, 在 Hp 感染、胃溃疡、胃黏膜炎性反应以及胃癌的发生中发挥重要的作用, 并且在 Hp 感染患者中 IL-1 β 的水平与胃癌发生的风险密切相关。IL-1 β 的产生主要依赖于 NLRP3 炎症小体的形成及活化, 活化后的 pro-Caspase-1 自身裂解形成有活性的 Caspase-1, 最终导致 IL-1 β 等炎症因子的产生^[27]。因此, NLRP3 炎症小体的活化可能是 Hp 感染引起 IL-1 β 水平增加、胃黏膜损伤、慢性萎缩性胃炎等病理过程以及系列疾病的机制之一。结合本研究中 NLRP3 抑制剂 MCC950 结果, 发现委陵菜酸的细胞保护作用可能与抑制 NLRP3 炎症小体组装和活化有关。通过检测细胞中活化的 Caspase-1 和 IL-1 β 、IL-18 的水平, 证实了委陵菜酸抑制 NLRP3 炎症小体活化的假说。

临床试验和动物实验表明, 在 Hp 致胃黏膜病变中, 细胞凋亡引起的胃黏膜上皮细胞丢失明显, 是 Hp 感染相关性胃炎的必然原因^[28-29]。在这个过程中, Bcl-2 和 Caspase 家族起着重要作用, 促凋亡蛋白 (Bax、Bad) 通过破坏线粒体膜的完整性进而诱导细胞凋亡, 引起线粒体膜电位降低和线粒体膜内外生化变化, 使 cytochrome C 从线粒体释放到细胞质中, 促进 Apaf-1 与 cytochrome C、Apaf-1 和 pro-caspase-9 组装成凋亡小体, 进而激活 Caspase-3, 触发细胞凋亡; 抗凋亡蛋白 (Bcl-2、Bcl-xl) 能够抑制这一过程^[30]。本研究结果显示, Hp 损伤的

GES-1 细胞线粒体膜电位降低, 细胞 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达水平降低, Bax、Bad mRNA 和蛋白表达水平升高, cytochrome C 蛋白表达水平升高; 委陵菜酸能够升高 GES-1 细胞线粒体膜电位, 上调细胞 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达水平, 降低 Bax、Bad mRNA 和蛋白表达水平, 表明委陵菜酸对 Hp 致 GES-1 细胞受损的线粒体功能具有较好的恢复作用。

Caspase 在细胞凋亡信号通路的调控中起着重要作用。正常状态下, 由 cytochrome C、Apaf-1 和 pro-Caspase-9 组成的中间复合物凋亡小体相对较少; 当细胞受到凋亡刺激 (如 ROS、趋化因子、促炎因子等) 时, 可导致线粒体功能紊乱, cytochrome C 大量生成, 并从线粒体进入胞质, 促进凋亡小体形成, 然后依次将 pro-Caspase-9、pro-Caspase-3 切割成 cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3, 进而诱导细胞凋亡^[31]。因此, Caspase-9 和 Caspase-3 被认为是凋亡过程的另一个主要细胞病理学标志。本研究结果显示, Hp 损伤的 GES-1 细胞 pro-Caspase-9、pro-Caspase-3 蛋白表达水平显著降低, Apaf-1、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高; 委陵菜酸明显改善 Apaf-1 和 Caspase 家族蛋白表达水平, 提示委陵菜酸对 Hp 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用与调控线粒体介导的凋亡通路有关。

综上所述, 委陵菜酸对 Hp 诱导的 GES-1 细胞损伤有显著的保护作用, 其作用机制可能与增强内源性抗氧化系统功能、抑制氧化应激、炎症反应及 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路激活, 从而减少线粒体途径介导的凋亡密切相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Marshall B J, Warren J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. *Lancet*, 1984, 1(8390): 1311-1315.
- [2] O'Connor A, Lamarque D, Gisbert J P, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2017 [J]. *Helicobacter*, 2017, 22: e12410.
- [3] Lian D W, Xu Y F, Ren W K, et al. Unraveling the novel protective effect of patchouli alcohol against *Helicobacter pylori*-induced gastritis: Insights into the molecular mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1347.
- [4] Huang F Y, Chan A O, Lo R C, et al. Characterization of interleukin-1 β in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and DNA methylation in interleukin-1

- receptor type 1 knockout (IL-1R1^{-/-}) mice [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(12): 2760-2770.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 62-63.
- [6] 王海燕, 覃慧林, 张永峰, 等. 木瓜三萜对佐剂性关节炎大鼠关节滑膜组织中 Akt, NF- κ B 和促炎因子的表达影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 141-146.
- [7] 石孟琼, 覃慧林, 张永峰, 等. 木瓜三萜对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞炎症模型细胞因子的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 76-80.
- [8] Zhang Y Y, Xu H Y, He H B, *et al.* Total triterpenes from the fruits of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai protects against indomethacin-induced gastric mucosal injury: Involvement of TFF1-mediated EGF/EGFR and apoptotic pathways [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(3): 409-423.
- [9] He H B, Feng M L, Xu H Y, *et al.* Total triterpenoids from the fruits of *Chaenomeles speciosa* exerted gastroprotective activities on indomethacin-induced gastric damage via modulating microRNA-423-5p-mediated TFF/NAG-1 and apoptotic pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 662-679.
- [10] An H J, Kim I T, Park H J, *et al.* Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ B pathway in RAW264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 504-510.
- [11] Lin X, Zhang S, Huang R, *et al.* Protective effect of tormentic acid from *Potentilla chinensis* against lipopolysaccharide/D-galactosamine induced fulminant hepatic failure in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2): 365-372.
- [12] 卢超, 石孟琼, 张媛媛, 等. 芪苈参黄益心方通过减轻炎症反应、溶酶体功能和抑制 NLRP3 炎症小体激活来发挥对心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1833-1843.
- [13] Pachathundikandi S K, Blaser N, Bruns H, *et al.* *Helicobacter pylori* avoids the critical activation of NLRP3 inflammasome-mediated production of oncogenic mature IL-1 β in human immune cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): E803.
- [14] 汪鋈植, 闫喜明, 田华咏, 等. 以土家医三元论为指导的反选法在新药研究中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2189-2192.
- [15] 贺海波, 李小琴, 李小妹, 等. 木瓜总三萜和奥美拉唑联用对吡哆美辛诱导大鼠胃溃疡的治疗作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2338-2347.
- [16] 熊兴军, 李小妹, 何毓敏, 等. 木瓜总三萜对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠 PPAR γ /SIRT1/NF- κ Bp65 信号通路及黏膜屏障的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4295-4304.
- [17] 李小妹, 贺君宇, 李爽, 等. 木瓜总三萜对非甾体抗炎药诱导大鼠小肠损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 55-60.
- [18] Wang Y L, Sun G Y, Zhang Y, *et al.* Tormentic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3559-3564.
- [19] Paniagua G L, Monroy E, Rodríguez R, *et al.* Frequency of VacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2009, 8: 14.
- [20] Lian D W, Xu Y F, Ren W K, *et al.* Unraveling the novel protective effect of patchouli alcohol against *Helicobacter pylori*-induced gastritis: Insights into the molecular mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1347.
- [21] Weidner N, Mutsaers A J, Woods J P, *et al.* Plasma 25-hydroxyvitamin D and the inflammatory response in canine cancer [J]. *Vet Comp Oncol*, 2021, 19(2): 232-241.
- [22] Yang T, Wang R L, Liu H H, *et al.* Berberine regulates macrophage polarization through IL-4-STAT6 signaling pathway in *Helicobacter pylori*-induced chronic atrophic gastritis [J]. *Life Sci*, 2021, 266: 118903.
- [23] 吴娜, 万治平, 韩玲, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠 NLRP3/caspase-1 细胞焦亡通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1191-1196.
- [24] Higashimori A, Watanabe T, Nadatani Y, *et al.* Role of nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome in stress-induced gastric injury [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 36(3): 740-750.
- [25] Pachathundikandi S K, Blaser N, Backert S. Mechanisms of inflammasome signaling, microRNA induction and resolution of inflammation by *Helicobacter pylori* [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2019, 421: 267-302.
- [26] Blaser N, Backert S, Pachathundikandi S K. Immune cell signaling by *Helicobacter pylori*: Impact on gastric pathology [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1149: 77-106.
- [27] Kameoka S, Kameyama T, Hayashi T, *et al.* *Helicobacter pylori* induces IL-1 β protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells [J]. *Biomed Res*, 2016, 37(1): 21-27.
- [28] Siriviriyakul P, Werawatganon D, Phetmoo N, *et al.* Genistein attenuated gastric inflammation and apoptosis in *Helicobacter pylori*-induced gastropathy in rats [J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 410.
- [29] Pachathundikandi S K, Blaser N, Backert S. Mechanisms of inflammasome signaling, microRNA induction and resolution of inflammation by *Helicobacter pylori* [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2019, 421: 267-302.
- [30] Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, *et al.* *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 2(4): 250-263.
- [31] Posselt G, Wiesauer M, Chichirau B E, *et al.* *Helicobacter pylori*-controlled c-Abl localization promotes cell migration and limits apoptosis [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 10.

[责任编辑 李亚楠]