

黄连素通过 ROS/ERK1/2 通路抗幽门螺旋杆菌相关性胃炎的实验研究[※]

● 田 华¹ 闫平慧¹ 张锋利²

摘 要 目的:从抗氧化应激、调节 ERK1/2 蛋白表达方面来探讨黄连素抗幽门螺旋杆菌(HP)相关性胃炎胃黏膜损伤、保护胃黏膜的作用机制。方法:建立 HP 相关性胃炎大鼠模型,随机分成正常组、正常+黄连素组、模型组和模型+黄连素组。正常+黄连素组与模型+黄连素组用黄连素配合 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液制成浓度为 100mg/ml 的混悬液,正常组和模型组用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液,四组均按 2ml/(kg·d) 体积灌胃,连续给药 4 周。Wester Blot 法检测 NOX2、NOX4、SOD、iNOS、ERK1/2 的蛋白含量。结果:黄连素能显著降低 HP 相关性胃炎大鼠胃黏膜的 NOX2、NOX4、iNOS、ERK1/2 蛋白含量,增加 SOD 的含量。结论:黄连素可能是通过 ROS/ERK1/2 通路抗 HP 相关性胃炎胃黏膜损伤、保护胃黏膜的。

关键词 黄连素 HP 相关性胃炎 ROS ERK1/2

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是一种能感染人类胃部的革兰阴性微需氧菌,是最常见的传染性病原菌之一^[1],全球有超过 50% 的人群感染,我国的平均感染率高达 56%^[2]。幽门螺旋杆菌相关性胃炎是指与 HP 感染相关的胃黏膜急慢性炎症或萎缩性病变^[3]。目前研究证明,HP 感染后可激发机体发生氧化应激(ROS)反应,生成的超氧化物(Superoxide, O_2^-)、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)等是造成胃黏膜持续性损伤,导致胃炎甚至癌症发生的重要因素^[4-5]。ERK1/2 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中成员之一。它磷酸化后激活,激活的 ERK1/2 介导多种生物学反应^[6-7]。大量研究证明,ROS 是导致 ERK1/2 磷酸化的重要激活剂^[8],而 ERK1/2 激活后又加剧了 ROS 对胃黏膜的损伤,抑制了胃黏膜的修复,引起急慢性胃炎,甚至出现细胞的过度增殖分化^[9]。

黄连素(berberine, $[C_{20}H_{18}NO_4]^+$, 又称小檗碱,

BBR)是从毛茛科植物黄连、黄柏根茎中提取出的一种异喹啉类生物碱。它外观呈黄色的针状结晶或粉末,无臭、味极苦,由于它具有抑制炎症反应、调节脂质代谢、抗氧化应激损伤等多种药理作用而被广泛应用于临床^[10-11]。

该实验建立大鼠 HP 相关性胃炎模型,观察黄连素对 HP 相关性胃炎胃黏膜的保护作用,并从抗氧化应激、调节 ERK1/2 表达方面探讨黄连素抗 HP 相关性胃炎胃黏膜的损伤、保护胃黏膜的作用机制,为黄连素防治 HP 相关性胃炎的临床应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物 成年雄性 SD 大鼠(220~240g)48 只,购自西安交通大学实验动物中心[许可证号:SCXK(陕)2012-003]。实验室饲养温度(20 ± 2)℃,所有动物适应性喂养 1 周。

1.2 药品与试剂 黄连素(B3251 Sigma)、快速尿素酶试验试剂盒(安信生物技术有限公司,批号:141196)、NOX2(sc-5827)、NOX4(sc-21860)、SOD(sc-17767)、ERK1/2(sc-16982)和 iNOS(sc-5302)抗体均购自美国的 Santa Cruz Biotechnology。

1.3 仪器 光学显微镜(尼康 DXM1200F),倒置显

※基金项目 陕西中医药大学自然科学基金(No. 123010114)

• 作者单位 1. 陕西中医药大学(712046); 2. 陕西中医药大学第二附属医院(712000)

显微镜(尼康 TS100),低温恒冷切片机(KD2800),台式高速离心机(GENIUS 16K),脱水机(TP1020),烘片机(ZMN200),石蜡切片染色机(5010 型),微波炉,高压锅,恒温水浴箱,WB 机(Bio-Rad,USA)。

2 方法

2.1 造模 48 只大鼠随机分成正常组、正常 + 黄连素组、模型组、模型 + 黄连素组,每组各 12 只。参考文献^[12]对模型组及模型 + 黄连素组大鼠进行造模。造模大鼠禁食 12 小时后以 NaHCO_3 + 消炎痛溶液 0.5ml/只灌胃,接着禁食 6 小时后以 HP 菌液(含量 10^9ml^{-1})1.5ml/只灌胃,再禁食禁水 4h 后常规饲养,隔天一次,连续 10 天,之后继续常规喂养;正常组及正常 + 黄连素组大鼠常规喂养。4 周后,每组随机处死 2 只大鼠,取出鼠胃并沿胃大弯剪开,取一半胃黏膜组织做快速尿素酶实验、黏膜涂片革兰染色,以判断胃窦黏膜 HP 定植情况;取另一半胃黏膜组织,用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后进行病理组织学检查。造模组大鼠胃黏膜均出现不同程度炎性改变,正常组的大鼠胃黏膜切片未见胃炎的病理改变。

2.2 给药 正常 + 黄连素组与模型 + 黄连素组将黄

连素用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液制成浓度为 100mg/ml 的混悬液,正常组和模型组用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液,四组均于每天上午 9 ~ 10 时按 2ml/(kg · d)体积灌胃,连续给药 4 周。

2.3 Wester Blot 检测 取胃组织匀浆后测定蛋白含量,制备 SDS-PAGE 胶,蛋白变性、上样、电泳、转膜、封闭加一抗过夜,TBST 洗膜,二抗封闭,TBST 洗膜,发光。分别测定总 ERK1/2、磷酸化 ERK1/2、NOX2、NOX4、SOD 蛋白的含量。以 β -actin 作为内参,使用 Image J 分析软件,计算每一样本蛋白的相对表达量。

2.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠胃黏膜 NOX2 含量情况 模型组大鼠 NOX2 的含量明显高于正常组及正常 + 黄连素组大鼠($P < 0.05$);模型 + 黄连素组的 NOX2 含量明显低于模型组($P < 0.05$),而与正常组及正常 + 黄连素组之间无统计学差异($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

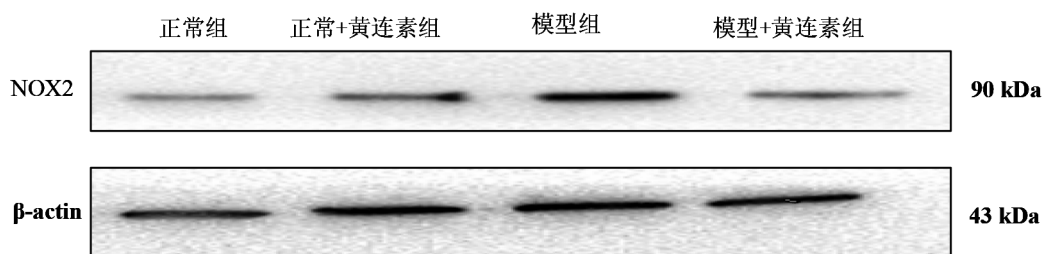


图 1 大鼠胃黏膜 NOX2 含量

3.2 各组大鼠胃黏膜 NOX4 含量情况 模型组大鼠 NOX4 的含量明显高于正常组及正常 + 黄连素组大鼠($P < 0.05$);模型 + 黄连素组 NOX4 含量明显低于模

型组($P < 0.05$),而与正常组及正常 + 黄连素组之间无统计学差异($P > 0.05$)。见图 2、表 1。

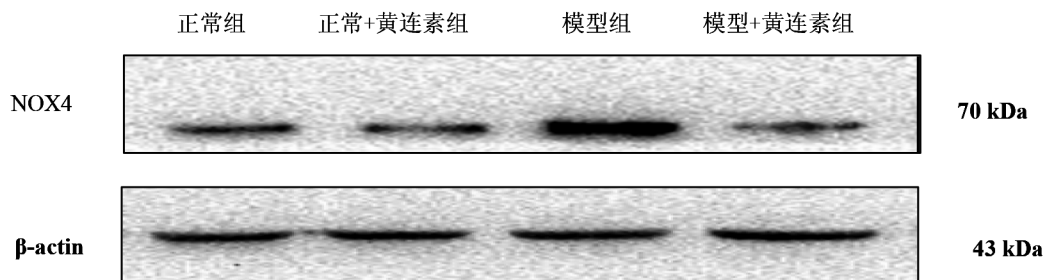


图 2 大鼠胃黏膜 NOX4 含量

3.3 各组大鼠胃黏膜 iNOS 含量情况 模型组大鼠 iNOS 的含量明显高于正常组及正常 + 黄连素组大鼠 ($P < 0.05$); 模型 + 黄连素组的 iNOS 含量明显低于

模型组 ($P < 0.05$), 而与正常组及正常 + 黄连素组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 3、表 1。

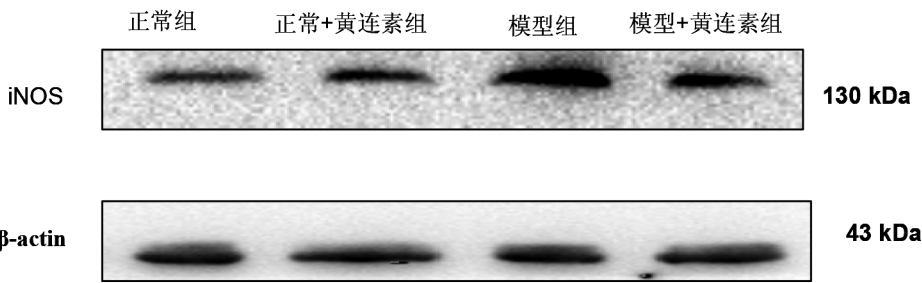


图 3 大鼠胃黏膜 iNOS 含量

3.4 各组大鼠胃黏膜 SOD 含量情况 模型组大鼠 SOD 的含量明显低于正常组及正常 + 黄连素组大鼠 ($P < 0.05$); 模型 + 黄连素组的 SOD 含量明显高于模

型组 ($P < 0.05$), 而与正常组及正常 + 黄连素组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 4、表 1。

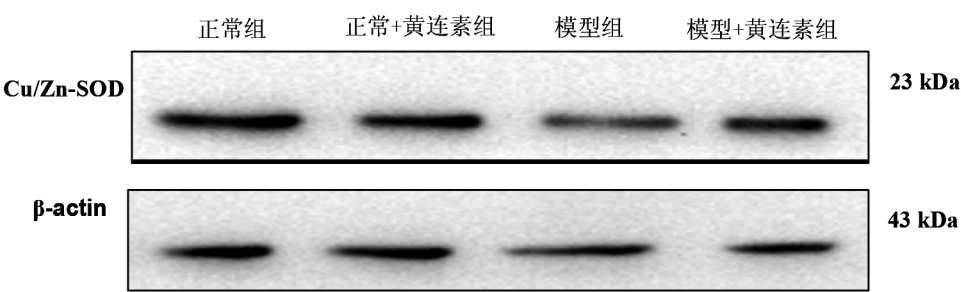


图 4 大鼠胃黏膜 SOD 含量

3.5 各组大鼠胃黏膜的磷酸化 ERK1/2 含量及总 ERK1/2 含量情况 模型组大鼠磷酸化 ERK1/2 的含量明显高于正常组及正常 + 黄连素组大鼠 ($P < 0.05$); 模型 + 黄连素组的磷酸化 ERK1/2 含量明显低

于模型组 ($P < 0.05$), 而与正常组及正常 + 黄连素组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。各组间总 ERK1/2 的含量没有统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 5、表 1。

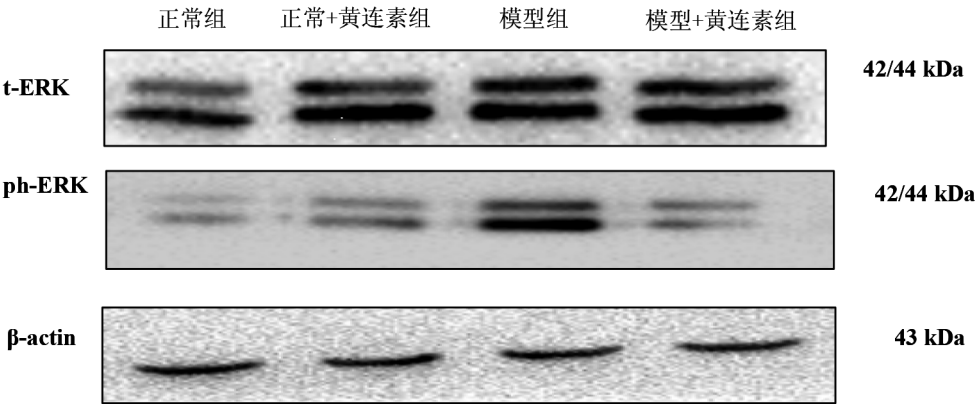


图 5 大鼠胃黏膜 t-ERK、ph-ERK 含量

表1 各组大鼠胃黏膜 NOX2、NOX4、iNOS、SOD、t-ERK、ph-ERK 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

胃黏膜蛋白表达 (灰度对比)	正常组 (n = 10)	正常 + 黄连素组 (n = 10)	模型组 (n = 10)	模型 + 黄连素组 (n = 10)
NOX2	42.12 ± 2.16 *	51.63 ± 2.45 *	96.32 ± 4.21 [△]	63.33 ± 4.27 *
NOX4	49.84 ± 1.98 *	40.56 ± 2.89 *	91.26 ± 3.98 [△]	58.89 ± 3.52 *
iNOS	46.62 ± 1.32 *	48.23 ± 1.55 *	88.35 ± 3.55 [△]	65.54 ± 3.03 *
SOD	82.53 ± 3.11 *	85.19 ± 4.01 *	42.90 ± 3.26 [△]	75.17 ± 3.61 *
t-ERK	85.18 ± 3.33	78.66 ± 3.67	92.36 ± 3.87	89.25 ± 3.99
Ph-ERK	38.52 ± 1.56 *	45.35 ± 2.21 *	85.12 ± 2.95 [△]	48.93 ± 2.57 *

注:与正常组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

幽门螺杆菌是最常见的传染性病原菌之一,在我国的感染率呈逐年上升的趋势^[2]。HP在胃黏膜上皮细胞表面和胃粘液底层定植,导致胃黏膜细胞发生变性、坏死并伴有炎症细胞浸润,引起急性胃黏膜炎症,并发展为慢性胃炎;甚至出现胃黏膜的萎缩、化生,最终导致腺癌形成^[13]。研究表明,在HP引起的胃黏膜损伤中,氧化应激起了十分重要的作用,感染HP的胃黏膜ROS明显增加^[14]。首先,氧自由基通过与细胞膜内不饱和脂肪酸的结合,形成了大量的脂质过氧化物,损害细胞内线粒体和溶酶体,引发胃黏膜血流障碍,导致胃黏膜损伤。其次,氧自由基也可与相关氨基酸中的巯基结合使酶失活,从而破坏上皮间质透明质酸酶和胶原纤维网而进一步损害胃黏膜^[9]。超氧化物歧化酶和NAD(P)H氧化酶是常用的反映氧化应激反应的指标。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物体内氧自由基清除的首要防线,它可降低氧化应激对细胞膜脂的损害并且修复受损细胞。因此,常用于考察清除氧自由基能力和胃黏膜保护作用^[14]。NAD(P)H氧化酶则是一个多亚基的氧化还原酶,它的激活是组织内活性氧簇产生的重要原因之一,其结构中比较重要的有膜成分细胞色素 gp91phox(NOX-2)和存在于细胞质中水溶性蛋白 p47phox(NOX-4)。当HP进入机体后被中性粒细胞迅速吞噬,形成吞噬体,通过NAD(P)H氧化酶系统,增加过氧化物(Superoxide, $O_2^{\cdot-}$)、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)等产物致使胃黏膜进一步受损^[15]。

在氧化应激的作用下过多产生的NO,它的生成依赖于—氧化氮合酶,其中诱导型NO合酶(iNOS)

被证明在被诱导激活后可产生大量NO,并与过氧阴离子反应形成过氧化亚硝酸盐,引起和加重消化道黏膜的损伤^[16]。MAPK信号通路是调控HP相关性胃炎发生的重要通路,ERK作为MAPK下游主要通路,是将细胞外信号转导到细胞内部的重要物质,可在氧化应激、炎症等多种因素下被激活,活化后移位至细胞核,促进多种核内转录因子磷酸化,从而调控基因表达,促进细胞增殖分化。已有研究证明,ERK通路活性增高不仅可促进胃黏膜细胞的增殖,而且该通路的激活对于胃黏膜的修复也具有重要意义^[8-9]。HP定植胃黏膜后,胃黏膜ROS明显增加。首先,氧自由基通过与细胞膜内不饱和脂肪酸的结合,形成了大量的脂质过氧化物,引发胃黏膜血流障碍,导致胃黏膜损伤。其次它也激活了ERK通路,将细胞外信号转导到细胞内部,促进多种核内转录因子磷酸化,从而调控基因表达,这又加剧了ROS对胃黏膜的损伤,抑制了胃黏膜的修复,引起急慢性胃炎,甚至出现细胞的过度增殖分化。

目前,临床上HP相关性胃炎的一线治疗方案存在毒副作用明显、疗效不稳定、易复发、病人依从性差、费用高等问题,其中,抗生素的广泛使用,不但引起胃肠道菌群失调及功能紊乱等不良反应,而且致使HP的耐药问题日趋严重^[17]。黄连素由于其具有抗炎、抗氧化、降糖、调脂、降压、神经保护等多种药理作用而备受关注。本试验结果表明,黄连素能够明显减少HP相关胃炎大鼠的NOX2、NOX4、iNOS和ph-ERK1/2的表达,提高SOD的表达,从而抑制HP引起的氧化应激对胃黏膜的损伤,这为其作为该疾病的防治药物提供了新的理论和实验依据。

(下转第60页)

可见皮肤与内脏有密切的关系。上述患者长期背部寒冷的主要病机：外为邪客肌表，卫阳不固，营卫失调，阴阳失衡；内为脾胃肾阳气虚弱，无以鼓动阳气外御寒邪。《素问·生气通天论》云：“凡阴阳之要，阳密乃固，两者不和，若春无秋，若冬无夏，因而和之，乃为圣度。”^[4]《类经》云：“人身不过表里，表里不过阴阳，阴阳即营卫，营卫即血气。”^[5]其治疗总是“谨察阴阳所在而调之，以平为期”。治当调营卫，平阴阳，和气血，补脾肾。方选桂枝汤加味。《金匱心典》云：“桂枝汤，外证得之，为解肌和营卫；内证得之，为化气调阴阳。”^[6]方中桂枝为君，温通卫阳，祛风散寒；芍药为臣，滋阴和营，补营阴之弱，桂枝守外，芍药济内，方中桂枝与芍药不必拘泥于等量，或偏卫、或偏营，可随证加减^[7]。其特征：一为调和营卫，二

为调和阴阳，三为调理脾胃^[5]，章虚谷云：“此方立法，从脾胃以达荣卫，周行一身融表里，调阴阳和气血。”^[5]营卫和，则表里、气血、阴阳皆和。佐以黄芪健脾补中、升阳举陷、益气固表，亦含玉屏风散和黄芪建中汤之意；麻黄辛温散寒，与桂枝相须为用，麻黄得桂枝，“一发卫分之郁，一透营卫之邪”，共奏发汗解表，宣通肺卫，畅达营阴之功，使寒邪从汗而出^[5]；白术甘温，补脾益气，振奋中阳；防风辛温发散，祛邪而不伤正，固表而不留邪，与黄芪、白术共奏益卫固表之功；熟地甘温，“生精血、补五脏内伤不足，通血脉，……，黑须发”^[8]；黄精甘平，健脾、润肺、益肾，“补诸虚……填精髓”；茯苓甘平，健脾补中；陈皮辛行温通，健脾和中；鹿角霜甘温，补肾阳，益精血，乃血肉有情之品，温肾阳而

不辛热，兼有收敛止血之功；甘草甘平，走卫而温，入营而滋，调和诸药。诸药共奏补脾肾，益精血，调营卫，平阴阳之功。阴阳和，则表里皆和。药中病机，多年沉痾，药到病除。

参考文献

- [1] 姚乃礼. 中医症状鉴别诊断学[M]. 北京：人民卫生出版，2004，263.
- [2] 李 珊，聂 晶，刘英锋. 背冷验病案 2 则[J]. 江西中医药，2016，47(3)：56-57.
- [3] 南京中医学院主编. 针灸学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1979，6.
- [4] 北京中医学院主编. 内经选读[M]. 上海：上海科学技术出版社，1978：10.
- [5] 陈 明，张印生. 伤寒名医验案精选[M]. 北京：学苑出版社，1998：2-3.
- [6] 吴天敏，范柳芳. 张喜奎运用桂枝汤验案举隅[J]. 中医药通报，2016，15(5)：62-63.
- [7] 张晓琳，罗拟睿，王基容，等. 桂枝汤之认识[J]. 亚太传统医药，2017，13(6)：84-85.
- [8] 高学敏. 中药学[M]. 北京：中国中医药出版社，2002.

(上接第 69 页)

参考文献

- [1] Graham DY. Helicobacter pylori Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits [J]. Gastroenterology, 2015, 148(4)：719-731.
- [2] Kusters J G, van Vliet A H, Kuipers E J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3)：449-490.
- [3] Salama NR, Hartung ML, Mueller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(6)：385-399.
- [4] Kuehler T C, Fryklund J, Bergman N - k, et al. Structure - activity relationship of omeprazole and analogs as Helicobacter pylori urease inhibitors [J]. Journal of medicinal chemistry, 1995, 38(25)：451-480.
- [5] 赖小平，苏子仁，陈建南，等. 广藿香醇在制备抗幽门螺杆菌的药物中的应用[P]. 中国，ZL 201110249038.9. 2013-01-28.
- [6] Lin Y W, Lee L M, Lee W J, et al. Melatonin inhibits MMP-9 transactivation and renal cell carcinoma metastasis by suppressing Akt - MAPKs pathway and NF - κ B DNA - binding activity [J]. Pineal Res, 2016, 60(3)：277.
- [7] Martinez - Salgado, C., Fuentes - Calvo, I., Garcia - Cenador, B., Santos, E. and Lopez - Novoa, J. M. Involvement of H - and N - Ras isoforms in transforming growth factor - β 1 - induced proliferation and in collagen and fibronectin synthesis [J]. Exp. Cell Res. 2006, 312：2093-2106.
- [8] Liu S, Mizu H, Yamauchi H. Photoinflammatory responses to UV - irradiated ketoprofen mediated by the induction of ROS generation, enhancement of cyclooxygenase - 2 expression, and regulation of multiple signaling pathways

- [J]. Free radical biology & medicine 2010, 48：772-800.
- [9] 蔡泳峰，连大卫，苏 锐，等. 氧化应激与幽门螺杆菌感染相关性胃炎 [J]. 现代生物医学进展 2016, 16(27)：5397-5399.
- [10] 王洪建，王维新，张翠莲，黄连素的药理作用和临床应用进展 [J]. 社会医学杂志，2006, 4(4)：36-38.
- [11] 郭丽坤，王志荣，岑 戎. 黄连素治疗幽门螺杆菌感染的临床研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志，2013, 23(3)：149-151.
- [12] 姚希贤，姚金锋. “疗胃煎剂”胃黏膜保护作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合脾胃杂志，2000, 8(3)：330-333.
- [13] 张 爽，刘海峰，张成岗. 应激性胃黏膜损伤发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志，2009, 17(17)：1697-1701.
- [14] Lu T C, Liao J C, Huang T H, et al. Analgesic and Anti - Inflammatory Activities of the Methanol Extract from Pogostemon cablin [J]. Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2011, Article ID 671741, 9 pages.
- [15] Nam HJ, Park YY, Yoon G, et al. Co - treatment with hepatocyte growth factor and TGF - β 1 enhances migration of HaCaT cells through NADPH oxidase - dependent ROS generation. Experimental [J]. Molecular Medicine 2010, 42：270-279.
- [16] Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, et al. Association of Helicobacter pylori and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis [J]. Journal of Immunology research, 2014, 18：762-766.
- [17] 张万伤. 中西医结合提高幽门螺杆菌根除率的探讨 [J]. 医学与哲学，2012, 33(5B)：12-13.