

连朴饮加味方对多重耐药 Hp 感染诱导人 GES-1 细胞凋亡及炎症抑制的影响

黄超群^{1,2,3,4}, 吕文亮^{5,6*}, 苏成霞^{1,2*}, 许丹⁴, 胡运莲^{1,2}, 毛宁锋^{5,6}, 周姝含^{5,6}, 张新悦⁷, 张洋^{5,6}

(1. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061; 2. 湖北中医药大学附属医院, 湖北 武汉 430061;

3. 中医肝肾研究及应用湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430061; 4. 武汉市中医医院, 湖北 武汉 430014;

5. 湖北中医药大学疫病研究所, 湖北 武汉 430061; 6. 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430061;

7. 武汉中西医结合骨科医院, 武汉体育学院附属医院, 湖北 武汉 430079)

【摘要】目的 探讨连朴饮加味方(以下简称连朴饮方)抑制多重耐药幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染诱导人胃黏膜上皮 GES-1 细胞凋亡及炎症的关系,旨在阐明连朴饮方治疗耐药 Hp 胃炎的作用机制。**方法** 实验分为空白组、模型组、连朴饮组、四联疗法组(阿莫西林+呋喃唑酮+雷贝拉唑+枸橼酸铋钾)、联合疗法组(连朴饮+四联药物),除空白组外,其余各组均体外接种耐药 Hp 建立耐药 Hp 感染模型,干预 24h 后噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖抑制率,Transwell 法测定细胞侵袭,流式细胞术测定细胞周期及细胞凋亡,酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2、Bax、p65、p-p65 蛋白的表达。**结果** 与空白组比较,耐药 Hp 感染可显著抑制 GES-1 细胞增殖,降低细胞侵袭能力,促进细胞凋亡,并将细胞阻滞在 G1 期,同时升高 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 的表达,细胞核内的 p65 荧光强度显著增加,下调 Bcl-2 蛋白、上调 Bax、p-p65 蛋白的表达($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较,连朴饮组和联合疗法组能够促进细胞增殖,提高细胞侵袭能力,抑制细胞凋亡,促进细胞周期生长,并能降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 的表达,降低细胞核内的 p65 荧光强度,上调 Bcl-2 蛋白,下调 Bax、p-p65 蛋白的表达($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 连朴饮加味方能降低多重耐药 Hp 感染引起的细胞凋亡,促进细胞增殖,提高细胞生长的能力、降低炎症反应,可能与调控 NF- κ B 信号通路有关。

【关键词】连朴饮加味方; 幽门螺杆菌; 耐药; 炎症; NF- κ B 信号通道

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.11.08

【中图分类号】R285.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1008-0805(2024)11-2552-07

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)属于慢性感染性、高感染率的致病菌,全球感染率为 50%^[1],Hp 感染被广泛认为与慢性胃炎、消化性溃疡、胃 MALT 淋巴瘤及胃癌的发生紧密相关^[2],是预防胃癌最重要且可控的一项危险因素^[3],在非萎缩胃炎阶段根除 Hp 能缓解临床症状,改善、逆转或消除胃黏膜炎症等病变,降低胃癌发生风险具有重大意义^[4]。国内外现采用铋剂四联、二联疗法取得较好临床疗效,但伴随抗生素疗程延长、剂量增加,单重、多重耐药性呈上升趋势^[5],其聚焦问题在于如何减少耐药、提高 Hp 根除率^[6],因此,探寻新的治疗方法与技术提高 Hp 根除率,成为临床亟待解决的实际瓶颈问题。

中医药具有影响 Hp 黏附和定植、提高根除率、改善胃黏膜病变的优势,且同时有减少不良反应的优势^[7],在 Hp 感染治疗中愈加重视,中药复方作用靶点多、抗菌谱广,少有细菌对其产生耐药^[8]。连朴饮出自清代名医王孟英的《随息居重订霍乱论》,具有调理中焦气机,清热燥湿化浊之效^[9],前期团队针对 Hp 慢性非萎缩性胃炎根除失败患者,开展相关临床研究发现连朴饮加味方联合四联取得较好疗效^[10],但具体机制不详,且对耐药 Hp 胃炎相关研究甚少,另在体外实验中发现连朴饮加减方对克拉霉素耐药 Hp 具有显著抑菌效应,且不会出现球形变耐药现象^[11],本研究将针对耐药 Hp 胃炎,拟建立体外细胞模型,从分子生物学水平阐述连朴

收稿日期:2024-02-20; 修订日期:2024-08-22

基金项目:武汉市卫生健康委员会科研计划资助项目(WZ21A04);武汉市科学技术局曙光计划资助项目(2022020801020584);

湖北省科学技术厅自然科学基金资助项目(2023AFB347);湖北省中医药管理局资助项目(ZY2023F004);

湖北中医药大学“双一流”建设重点类专项科研项目(2023ZZXJB003)

作者简介:黄超群(1986-),女(汉族),湖北宜昌人,湖北省中医院主治医师,博士学位,主要从事中西医结合防治消化系统疾病的研究工作。

* 通讯作者简介:吕文亮(1963-),男(汉族),湖北武穴人,湖北中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事病证结合模式下运用疫病理论防治重大感染性疾病的研究工作。

* 通讯作者简介:苏成霞(1983-),女(汉族),安徽安庆人,湖北省中医院副主任医师,硕士研究生导师,硕士学位,主要从事中西医结合防治消化系统疾病的研究工作。

饮治疗耐药性 Hp 胃炎的可能机制。

1 材料

1.1 细胞株与菌株

GES-1 细胞(购自赛百慷生物公司,批号:iCell-h062),耐药 Hp 菌株由全国幽门螺杆菌湖北分中心样本库提供,通过湖北省中医院伦理委员会审核批准(HBZY2021-C40-01)。

1.2 实验动物

健康 SPF 级 Wistar 大鼠,20 只,6 周龄,体重 180~220g,购于湖北省实验动物研究中心,许可证号:SCXK2020-0018。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心,温度(23 ± 1)℃,湿度 $56\% \pm 2\%$,适应性喂养 7d,动物自由饮水和摄食。本实验经湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.3 药物及试剂

连朴饮加味方由黄连 10g,厚朴 10g,半夏 10g,石菖蒲 10g,淡豆豉 10g,芦根 10g,炒栀子 10g,炒白术 10g,煅瓦楞子 20g,甘草 6g 组成,所有中药材均购于湖北省中医院中药房。四联药物组成包括阿莫西林胶囊(珠海联邦制药股份有限公司,国药准字 H20003263);呋喃唑酮片(天津力生制药股份有限公司,国药准字 H12020160);枸橼酸铋钾胶囊(丽珠集团丽珠制药厂,国药准字 H10920098);雷贝拉唑钠肠溶胶囊(珠海润都制药股份有限公司,国药准字 H20110076);噻唑蓝(MTT,MCE 公司,批号 HY-15924);1640 培养基(Procell 公司,批号 PM150110);BHI 培养基(青岛海博公司,批号 HB8478);Transwell(corning 公司,批号 3422);细胞凋亡试剂盒(南京凯基生物公司,批号 KGA108);人白介素 6(IL-6)、人白介素 1β (IL- 1β)、人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、人白介素 8(IL-8)酶联免疫吸附测定试剂盒(伊莱瑞特公司,批号 E-EL-H0102c、E-EL-H0149c、E-EL-H0109c、E-EL-H6008);B 细胞淋巴瘤-2 抗体、bax、p65、p-p65 抗体(Affinity 公司,批号 AF6139、AF0120、AF5006、AF2006);荧光(Cy3)标记羊抗兔 IgG(武汉博士德公司,批号 BA1032)。

1.4 实验仪器

CO₂ 恒温培养箱(bluepard 公司,批号 BPN-150CH);超净工作台(LAYTE 公司,批号 SW-CJ-1FDG);倒置显微镜(Mshot 公司,批号 MF52-N);流式细胞仪(BECKMAN 公司,批号 Cyt-oFLEX);全自动酶标仪(Thermo scientific 公司,批号 Multiskan MK3);电泳仪电源、垂直电泳槽、电转仪(北京六一仪器厂,批号 DYY-7C、DYCZ-24DN、DYCZ-40)。

2 方法

2.1 菌株的分离培养

内镜下观察到患者 Hp 现症感染,予以一次性活检钳取胃黏膜 1 块进行尿素酶试验测定阳性,再在患者胃窦、胃体处各取两块黏膜组织,置入含有生理盐水的无菌 EP 管中。在无菌超净台中,取 1 块胃黏膜组织,用无菌接种环压住组织在固体琼脂培养基中涂抹均匀,37℃ 微需氧(6% O₂,7% CO₂,7% H₂,80% N₂)培养 3d 左右至可见明显菌斑,挑取适量成熟菌落接种到新的培养基中,并进行纯化和增菌,采用 16s 高通量测序鉴定为 Hp 菌株,并通过药敏实验判定为甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星多重耐药。

2.2 含药血清的制备

将 20 只 Wistar 大鼠分为 4 组:空白组、连朴饮组、四联组、连朴饮+四联组,每组各 5 只。空白组给予等剂量生理盐水,连朴饮组以 1g/ml 的药物浓度,按 6.3g/kg 计算动物药物用量;四联组分别按阿莫西林 90mg/kg,雷贝拉唑 1.8mg/kg,呋喃唑酮 9mg/kg,枸橼酸铋钾 54mg/kg;联合组在四联药液基础上加入连朴饮药液,连续给药 7d,末次灌胃后 24h,麻醉大鼠,腹主动脉取血,静置 3h,3000r/min 离心 10min,标注序号,灭活,过滤除菌,-80℃ 保存备用。

2.3 细胞感染模型及干预制备

GES-1 细胞培养在含 100 mg·L⁻¹的青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中。置 37℃,5% CO₂ 的培养箱中生长,待生长至 80%~90% 融合时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。GES-1 细胞分为空白组(15% 空白组血清)、模型组(15% 空白组血清+Hp 感染)、连朴饮组(15% 连朴饮含药血清+Hp 感染)、四联疗法组(15% 四联含药血清+Hp 感染)、联合疗法组(15% 连朴饮含药血清+15% 四联含药血清+Hp 感染)。收集对数生长期的耐药 Hp,3000r/min 离心 10min,去除上清,用无菌的 PBS 清洗菌体沉淀两次,收集菌体,用 1640 培养基重悬菌液,将悬液调整成 OD₆₀₀=1 的母液,96 孔板弃去培养基,除空白组外,其余 4 组分别加入 1640 培养基和菌液继续培养(感染复数 1:100)。感染 24h 后弃去菌液,空白组同时弃去正常 1640 培养基,各组加入 85μl 无血清 1640 培养基和 15μl 对应分组含药血清混匀,继续培养进行后续实验。

2.4 MTT 法测定细胞增殖抑制率

GES-1 细胞以 5×10^3 个/孔接种于细胞培养 96 孔板,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜,共分为 5 组(空白组、模型组、连朴饮组、四联疗法组、联合疗法组),待细胞培养所需时间后,每孔加入 10μl 的 MTT 溶液,37℃ 培养 4h,吸出培养基,加入 150μl 的 DMSO 震荡 10min,酶标仪 OD₅₇₀ 测定各孔吸光值。计算细胞增殖抑制率,抑

制率(%)=(1-实验组/空白组)×100%。

2.5 Transwell 法测定细胞侵袭

将 Matrigel 在 4℃ 提前一天融化,transwell 小室、24 孔培养板和枪头在 -20℃ 过夜预冷,用无血清培养基稀释 Matrigel 至终浓度 1mg/ml。在 24 孔板中加入 4℃ 预冷 800μl 的 10% FBS 1640 培养基(含双抗),并放入 transwell 小室,在 transwell 小室上室底部中央垂直加入 100μl 终浓度为 1mg/ml 的 Matrigel,37℃ 温育 4~5h 使其干成胶状,待 Matrigel 干成胶状后在 transwell 上室分别接入 200μl 各组细胞悬液,37℃,5% CO₂ 培养箱培养,取出 transwell 用 PBS 清洗后用 0.5% 结晶紫染液染色 15min,PBS 洗涤 3 次,随后在显微镜下观察拍照。计算细胞侵袭率,侵袭率(%)=(实验组细胞数/空白组细胞数)×100%。

2.6 流式细胞术测定细胞周期及细胞凋亡

用胰酶消化收集细胞,1200 r/min 离心 5min,去上清,PBS 重悬润洗 2 次,100μl 的 PBS 重悬细胞,缓慢加入 700μl 预冷的 80% 乙醇,使乙醇终浓度为 70%,4℃ 固定 4h 以上,1500r/min 离心 5min,预冷 PBS 润洗 2 次,200μl 的 PBS 重悬细胞,加入 10μl RNase (1mg/ml),37℃ 孵育 30min,最后加入 10μl 的 PI (400μg/ml),4℃ 避光染色 30min,于流式细胞仪检测细胞周期。

按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行,加入 500μl Binding Buffer,重悬细胞,然后加入 5μl AnnexinV-FITC 混匀后加入 5μl 的 PI 混匀,室温避光反应 5~15min(同时设阴性对照,即正常细胞不加 AnnexinV-FITC 和 PI),于流式细胞仪上机检测细胞凋亡。

2.7 ELISA 检测细胞炎症因子水平

参照相关 ELISA 试剂盒说明,测定细胞炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 的表达水平。

2.8 免疫荧光法检测 p65 蛋白荧光表达

在培养板中将细胞玻片用 PBS 浸洗 3min×3 次,用 4% 的多聚甲醛固定爬片 15min,PBS 浸洗 3min×3 次,0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20min,滴加正常山羊血清,室温封闭 30min,滴加稀释好的一抗,4℃ 孵育过夜,然后加荧光二抗,37℃ 孵育 1h,PBS 浸洗 3min×3 次,滴加 DAPI 避光孵育 5min,对本标本进行染核,PBS 浸洗 5min×4 次,封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白 Bcl-2、Bax、p65、p-p65 的表达水平

提取细胞蛋白后进行蛋白的浓度测定,将提取的蛋白上清与上样缓冲液按照 4:1 混合,放入沸水中变性 10min。制备凝胶,上样后于电泳仪上电泳分离、转模,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 浸泡 PVDF 膜,封闭 2 h 后加入一抗稀释液 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,稀释相

应的 HRP 标记二抗,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,37℃ 摇床孵育 2h。TBST 洗膜,ECL 试剂反应后,X 光胶片压片依次显影、定影、冲洗胶片,用 BandScan 分析胶片灰度值。

2.10 统计学分析

本研究数据以 $\bar{x} \pm s$ 值表示,数据分析使用 Graph-Pad Prism 8.0 软件,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较,结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞增殖的影响

与空白组比较,耐药 Hp 感染模型组的细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,连朴饮组、四联组、联合组的细胞增殖抑制率均降低($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

表 1 连朴饮含药血清对多重耐药
Hp 感染 GES-1 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖抑制率	%
空白组	-	
模型组	29.28 ± 3.17 ^a	
连朴饮组	18.37 ± 3.81 ^b	
四联疗法组	14.97 ± 2.19 ^b	
联合疗法组	11.30 ± 3.30 ^b	

与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

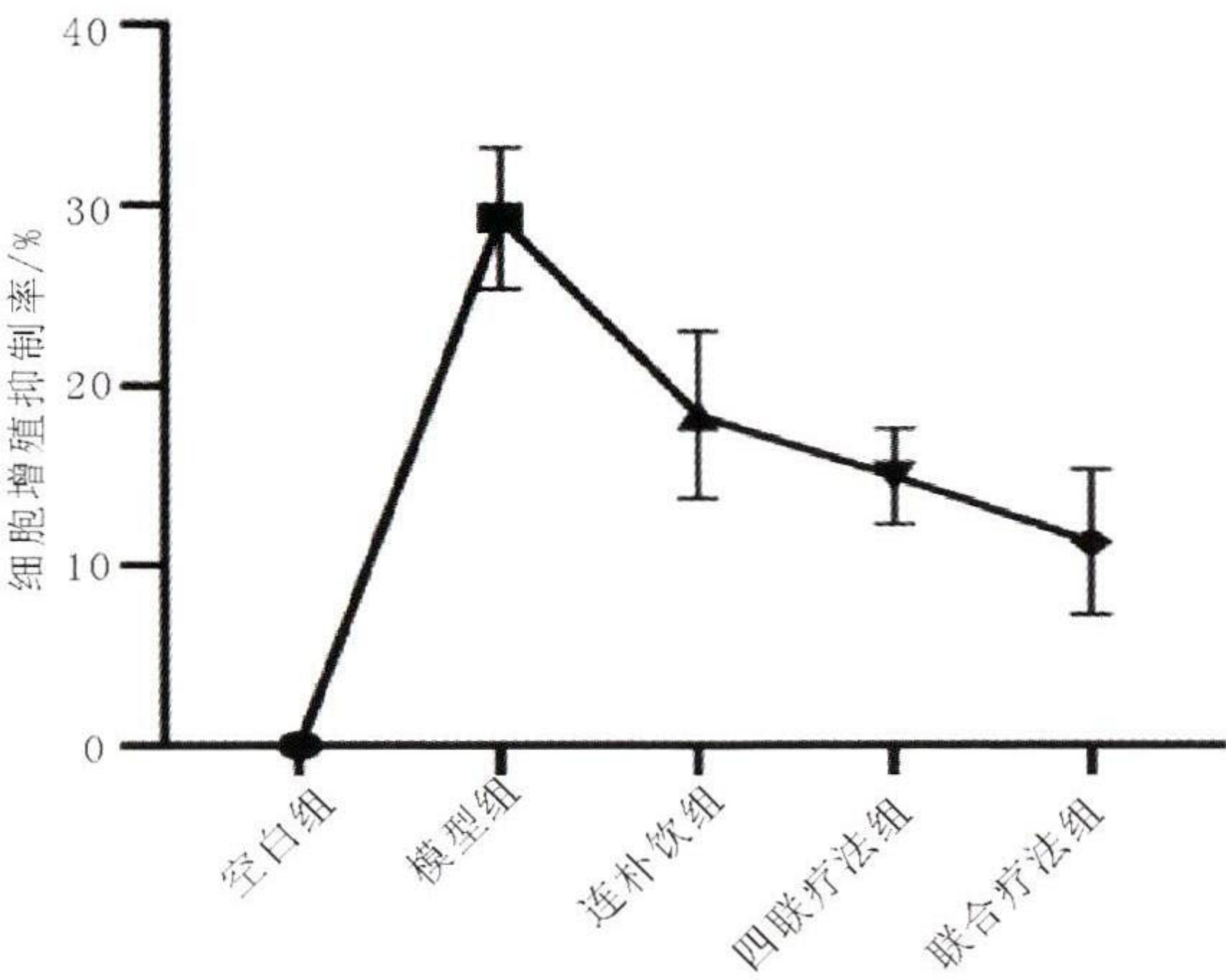


图 1 各组细胞增殖抑制率

3.2 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞侵袭的影响

与空白组比较,模型组细胞侵袭数显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,连朴饮组、四联组、联合组的细胞侵袭数均有显著的增加($P < 0.05$)。见表 2,图 2。

3.3 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞周期的影响

与空白组比较,模型组 S 期和 G2 期细胞比例

显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, G1 期连朴饮组、四联组、联合组细胞比例均低于模型组 ($P < 0.01$); S 期连朴饮组、四联组细胞比例显著高于模型组 ($P < 0.01, P < 0.05$); G2 期连朴饮组细胞比例显著高于模型组 ($P < 0.01$), 四联组和联合组细胞比例高于模型组, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3, 图 3。

表 2 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 诱导 GES-1 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	侵袭细胞数
空白组	151.00 ± 5.10
模型组	54.33 ± 6.80 ^a
连朴饮组	76.33 ± 0.94 ^b
四联疗法组	94.67 ± 1.25 ^b
联合疗法组	110 ± 4.55 ^b

与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

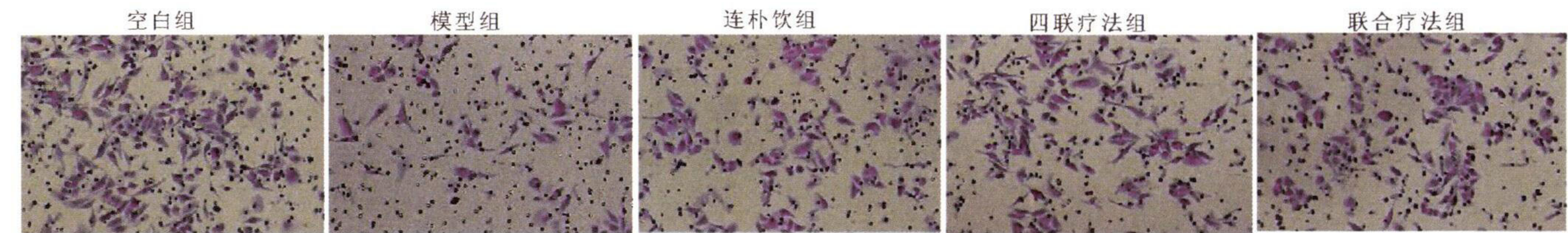


图 2 连朴饮对耐药 Hp 感染 GES-1 细胞侵袭的影响

3.4 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞凋亡的影响

与空白组比较, 模型组细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 连朴饮组、四联疗法组、联合疗法组细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4, 图 4。

3.5 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞炎症因子水平的影响

与空白组比较, 模型组细胞中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 连朴饮组、四联疗法组、联合疗法组中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 水平均有不同程度的下降 ($P < 0.01, P < 0.05$), 其中联合疗法组有显著下降 ($P < 0.01$)。见表 5。

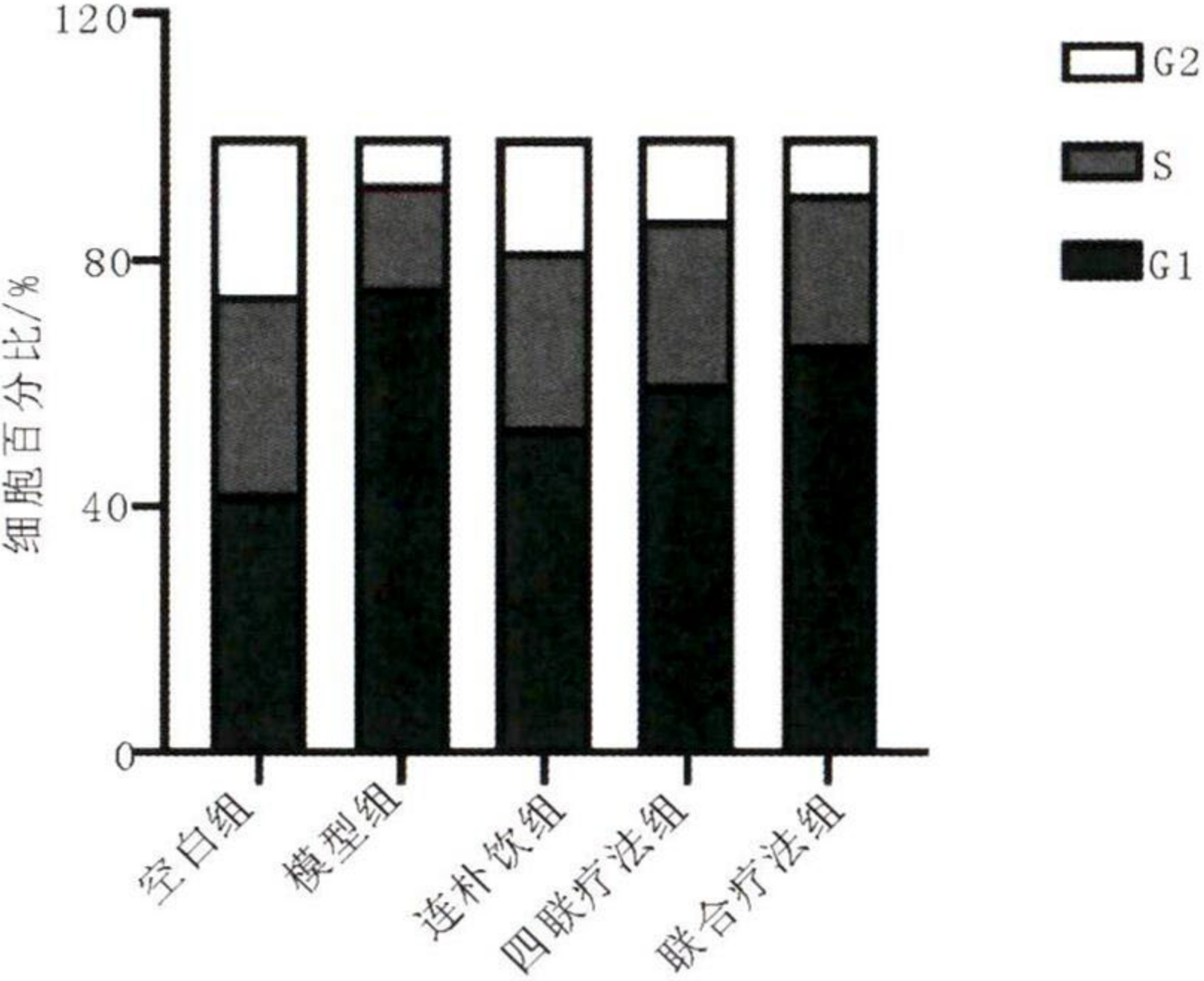


图 3 连朴饮对耐药 Hp 感染 GES-1 细胞周期的影响

表 3 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 诱导 GES-1 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$) %

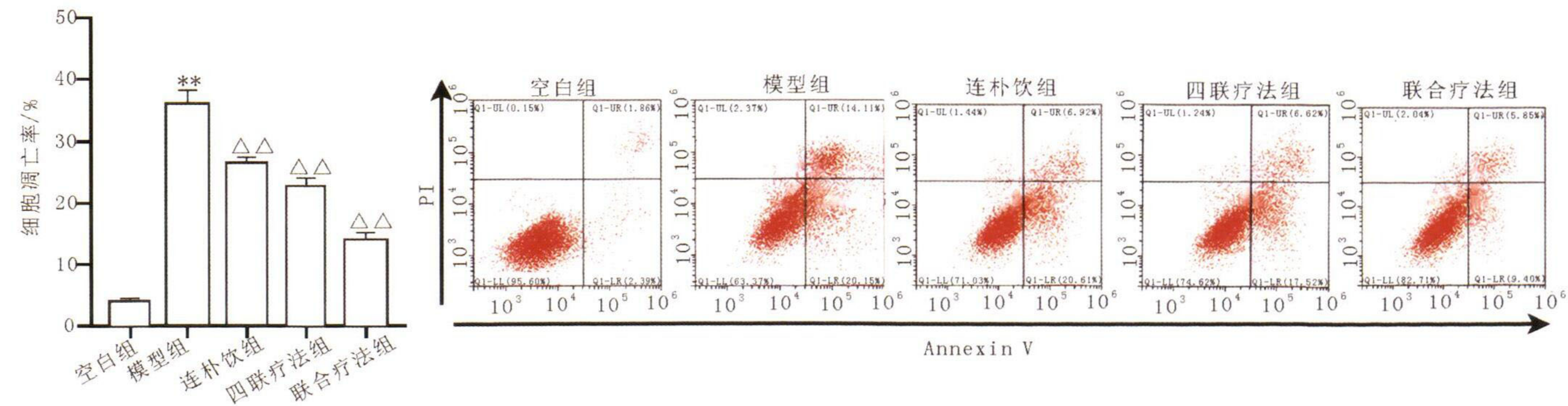
组别	G1 期	S 期	G2 期
空白组	41.90 ± 1.59	32.58 ± 3.94	25.51 ± 2.35
模型组	75.58 ± 2.00 ^a	16.89 ± 2.05 ^a	7.52 ± 0.19 ^a
连朴饮组	52.76 ± 1.58 ^b	28.73 ± 2.54 ^b	18.51 ± 0.99 ^b
四联疗法组	59.79 ± 1.54 ^b	26.87 ± 2.04 ^c	13.35 ± 3.40
联合疗法组	66.25 ± 1.83 ^b	24.59 ± 1.95	9.16 ± 0.20

与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.05$

表 4 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 诱导 GES-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	凋亡率
空白组	4.23 ± 0.22
模型组	36.32 ± 1.56 ^a
连朴饮组	26.57 ± 0.75 ^b
四联疗法组	22.79 ± 1.04 ^b
联合疗法组	13.94 ± 1.06 ^b

与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$



与空白组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$

图 4 连朴饮对耐药 Hp 感染 GES-1 细胞凋亡的影响

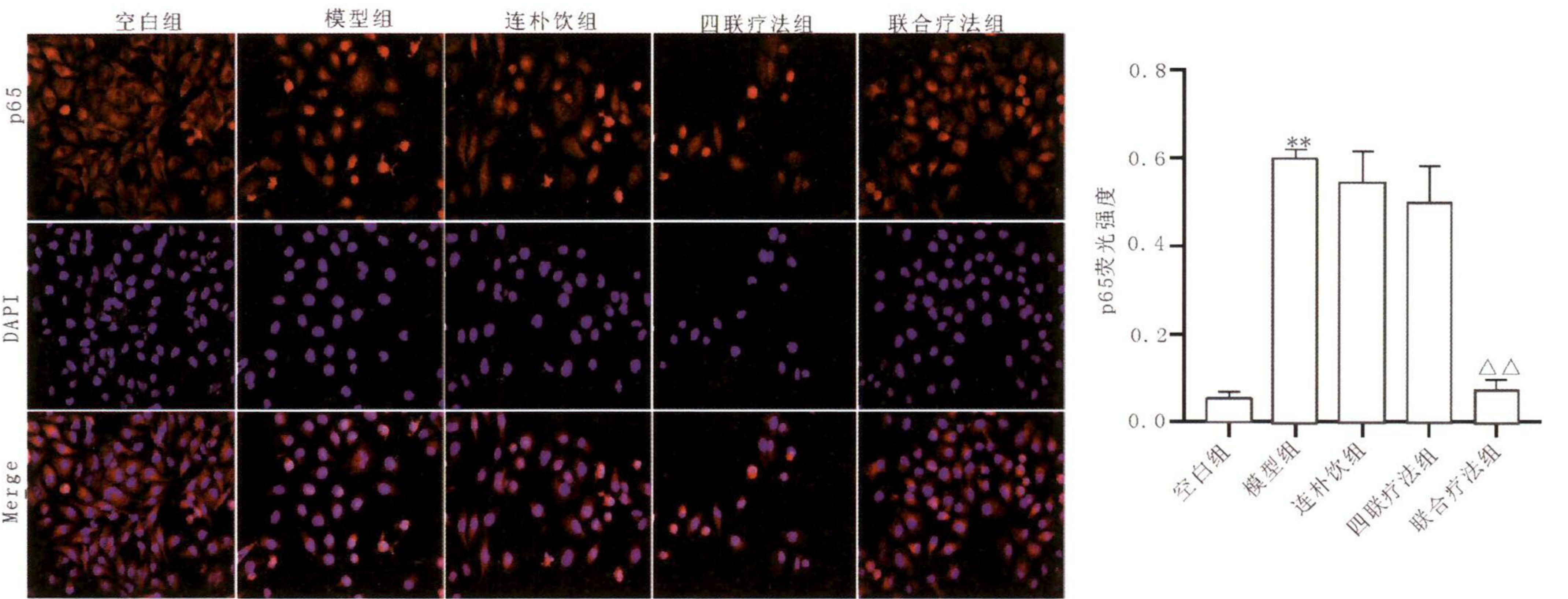
表 5 各组 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 的表达水平($\bar{x} \pm s$) pg · ml⁻¹

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-8
空白组	23.79 ± 3.94	26.93 ± 2.90	44.70 ± 6.94	26.33 ± 2.43
模型组	123.81 ± 10.58 ^a	73.24 ± 5.57 ^a	103.07 ± 9.32 ^a	74.23 ± 5.60 ^a
连朴饮组	88.16 ± 10.37 ^b	52.29 ± 6.63 ^b	81.82 ± 2.49 ^c	57.76 ± 6.44 ^c
四联疗法组	71.27 ± 5.78 ^b	45.62 ± 4.32 ^b	79.81 ± 7.87 ^c	51.18 ± 6.13 ^b
联合疗法组	53.38 ± 6.49 ^b	37.33 ± 3.42 ^b	61.50 ± 7.52 ^b	38.74 ± 3.74 ^b

与空白组比较,^a*P* < 0.01;与模型组比较,^b*P* < 0.01;与模型组比较,^c*P* < 0.05

3.6 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞 p65 蛋白免疫荧光表达的水平

与空白组比较,模型组细胞核内的 p65 荧光强度显著增加(*P* < 0.01),与模型组比较,连朴饮组、四联疗法组、联合疗法组的 p65 由核外转移至核内的数量均有减少的趋势,其中联合疗法组减少的更明显(*P* < 0.01)。



与空白组比较,***P* < 0.01;与模型组比较,△△*P* < 0.01

图 5 各组 p65 蛋白的荧光表达(400 ×)

3.7 连朴饮含药血清对多重耐药 Hp 感染 GES-1 细胞 Bax、Bcl-2、p65、p-p65 蛋白的表达水平

与空白组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达显著下降(*P* < 0.01),Bax、p-p65 蛋白表达显著上升(*P* < 0.01);与模型组比较,连朴饮组 Bcl-2 蛋白表达上升(*P* < 0.05),四联疗法组和联合疗法组 Bcl-2 蛋白表达上升(*P* < 0.01);连朴饮组 Bax 蛋白表达下降(*P* < 0.05),四联疗法组和联合疗法组 Bax 蛋白表达均下降(*P* < 0.01);三组治疗组的 p-p65 蛋白表达均有下降(*P* < 0.01);p65 各组间无统计学差异(*P* > 0.05)。见表 6,图 6。

表 6 各组细胞蛋白 Bax、Bcl-2、p65、p-p65 的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	p65/GAPDH	p-p65/GAPDH
空白组	0.83 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.11 ± 0.01
模型组	0.26 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.08 ^a	0.80 ± 0.06	0.74 ± 0.02 ^a
连朴饮组	0.46 ± 0.05 ^c	0.67 ± 0.07 ^c	0.78 ± 0.05	0.57 ± 0.04 ^b
四联疗法组	0.55 ± 0.05 ^b	0.48 ± 0.07 ^b	0.78 ± 0.04	0.41 ± 0.05 ^b
联合疗法组	0.75 ± 0.08 ^b	0.27 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.02	0.26 ± 0.03 ^b

与空白组比较,^a*P* < 0.01;与模型组比较,^b*P* < 0.01;与模型组比较,^c*P* < 0.05

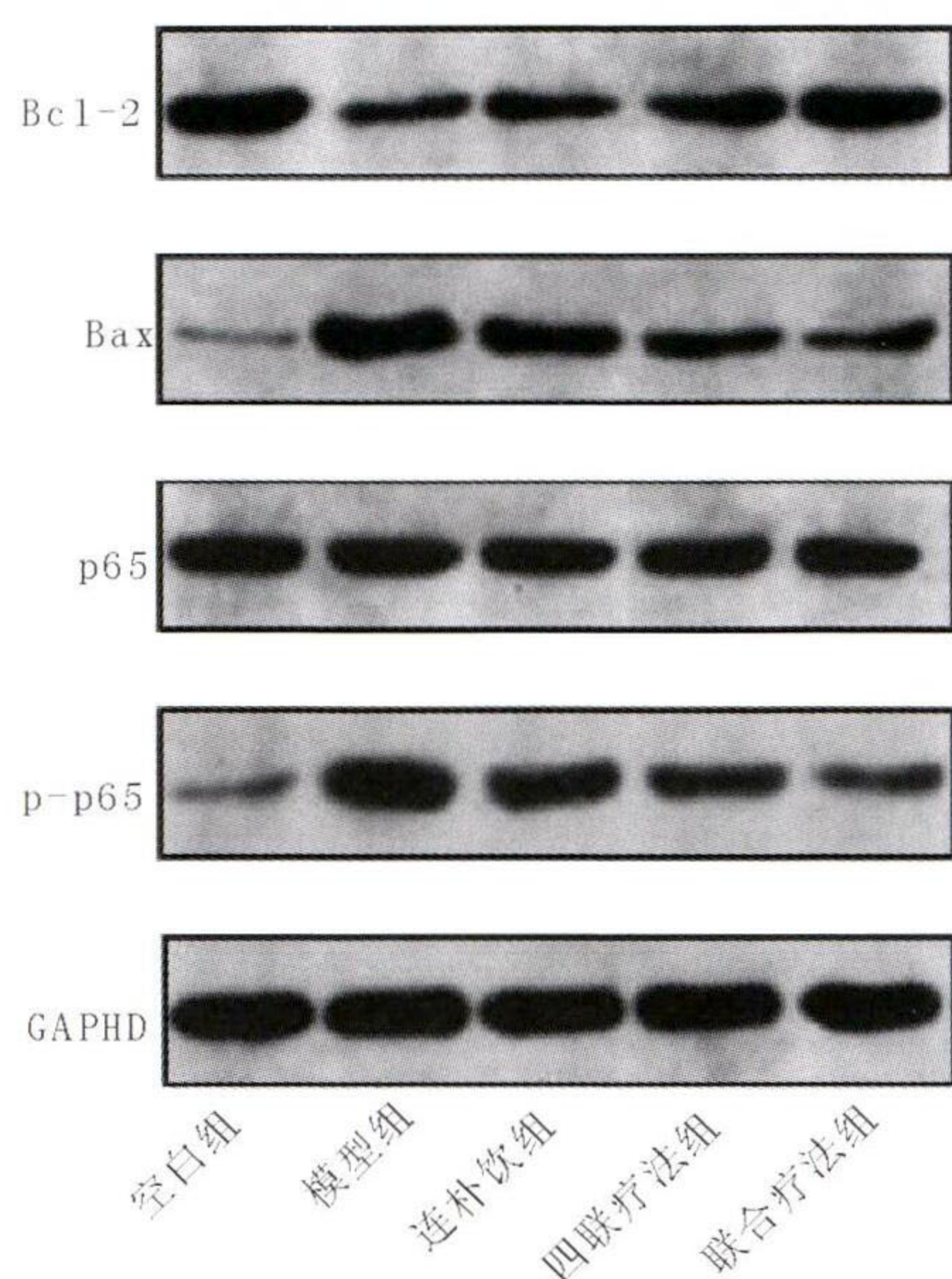


图6 各组细胞蛋白 Bax, Bcl-2, p65, p-p65 的表达水平

4 讨论

全球抗生素耐药率呈显著增长,多数地区 Hp 对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的原发性和继发耐药性的合并患病率均大于 15%^[12]。在国内,甲硝唑耐药率超过 60%,克拉霉素、左氧氟沙星耐药率均超过 30%,阿莫西林、呋喃唑酮、四环素仍保持较低耐药水平^[13,14]。针对难治性 Hp 感染,抗生素双重及多重的耐药发生率更高^[15],是目前 Hp 根除失败的主要原因,中医药作为新路径之一,研究发现,黄连、厚朴、蒲公英等单药的药理成分对多种致病菌均有抑杀作用,同时还具有抗炎、增强细胞吞噬的能力^[16~18]。此外,中药复方可有效抑制 Hp 繁殖和活性,可能与调控 NF- κ B p65、TGF- β /Smad 等信号通路相关,以减轻炎症反应,调节免疫微环境发挥胃粘膜保护作用^[19]。

Hp 为外来之邪,临床表现以脾胃为中心,交相染异,病程长,符合脾胃湿热证特点,将其归属中医学“胃病”等范畴^[20]。Hp 慢性感染改变胃内环境,扰乱胃粘膜上皮细胞的增殖、凋亡和细胞周期,最终诱发胃炎、消化性溃疡、胃癌等发生^[21],前期我们对 16549 例 Hp 感染患者进行中医证型分析,脾胃湿热证为首要证型^[22],连朴饮具有辛开苦降,升清降浊作用,并重视调畅气机,恢复机体平衡,且从湿热并重,郁阻中焦这一基本病机出发被广泛应用。

本研究发现,耐药 Hp 感染后将 GES-1 细胞阻滞在 G1 期,使细胞无法进入 S 期合成 DNA,从而抑制 GES-1 细胞增殖和细胞侵袭,同时耐药 Hp 感染后也进一步诱导了 GES-1 细胞凋亡,连朴饮干预后发现,与模型组相比,G1 期细胞显著降低,S 期细胞显著升高,表明连朴饮可以有效调控耐药 Hp 感染的 GES-1

细胞周期,同时连朴饮组能够改善并促进感染后的 GES-1 细胞侵袭生长能力,有效降低细胞增殖抑制率和凋亡率,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,并下调促凋亡蛋白 Bax 的表达,且与单用四联疗法组相比较,联合使用连朴饮的作用效果更强,说明连朴饮可能通过降低耐药 Hp 感染引起的细胞增殖抑制和凋亡,以增强细胞生长的能力。

本实验结果表明,与空白组相比,耐药 Hp 感染后 GES-1 细胞内炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 均升高,而连朴饮组及联合疗法组经干预后均显著抑制以上炎症因子的表达水平。细胞因子诱导急性期反应以保护机体免受刺激、损伤和感染,这一反应始于细胞内或不同细胞释放促炎细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IFN- γ 和 TNF- α 等^[23]。IL-1 β 是胃肠道免疫炎症反应中的强效促炎性细胞因子,有极强的抑酸作用,处于高水平状态会导致 Hp 大量扩散,长期抑酸也会导致胃黏膜萎缩出现癌变^[24]。TNF- α 能够促进炎症反应的发生和维持,刺激其他细胞产生炎症介质,如 IL-1 β 和 IL-6,此外研究也发现 TNF- α 的表达与胃癌发生发展密切相关^[25,26]。IL-6 作为炎症和免疫的重要介质,它可通过激活胃癌细胞 JAK2/STAT3 途径来增强癌细胞的迁移能力^[27]。IL-8 主要由单核巨噬细胞、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1 等细胞因子刺激而产生,是 Hp 相关性胃炎发生、发展中的一个重要调节因子^[28],以上研究结果,表明连朴饮对多重耐药 Hp 感染的 GES-1 细胞具有明显的炎症抑制作用。

NF- κ B 信号通路广泛参与机体的感染、免疫及细胞增殖和凋亡进程^[29],当细胞受到外界刺激,如病原体感染、细胞因子刺激时,IKK 复合物被激活,导致 I κ B 蛋白的磷酸化和降解,从而释放 NF- κ B 二聚体(p50/p65),进入细胞核并结合 DNA 以调节基因转录^[30]。p65 还被发现参与癌细胞的增殖、转移和耐药性等过程,对 p65 的过度激活可能导致异常的细胞生长和炎症反应,从而促进癌症的发展^[31]。本研究发现,耐药 Hp 感染后细胞核内的 p65 荧光强度显著增加,连朴饮组及联合疗法组内 p65 由核外转移至核内的数量均有减少的趋势,但连朴饮组没有统计学差异,因此进一步验证发现连朴饮组和联合组均能显著抑制 p-p65 蛋白的表达。上述结果也表明连朴饮对多重耐药 Hp 感染的 GES-1 细胞凋亡及炎症抑制作用可能与抑制 NF- κ B 信号通路相关。

综上所述,连朴饮能降低多重耐药 Hp 感染引起的细胞凋亡,促进细胞增殖,并能提高细胞侵袭生长的能力、降低炎症反应,可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路来发挥作用机制。此外,四联疗法基础上联合使用连朴饮能够增强其作用效果,这也为临床防治多重耐药 Hp 感染提供新的中西医结合治疗思路。本研究还存

在不足,仅对单条通路进行体外验证,中药是具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,后续还需完善体内实验以进一步阐明连朴饮对耐药 Hp 相关胃炎的作用机制,另连朴饮组方药物较多,剂量较大,高倍剂量煎煮浓缩后过于黏稠,导致灌胃难以进行,故而选择单一剂量进行实验,后续还需对组方提纯进行优化以完善药物的量效关系。

参考文献:

[1] Mentis A, Lehours P, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Helicobacter, 2015, 20(11):1.

[2] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis[J]. Gut, 2015, 64(9):1353.

[3] 国家消化系疾病临床医学研究中心(上海), 国家消化道早癌防治中心联盟(GECA), 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组, 等. 中国幽门螺杆菌根除与胃癌防控的专家共识意见(2019年, 上海)[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(5):310.

[4] Shichijo S, Hirata Y. Characteristics and predictors of gastric cancer after Helicobacter pylori eradication[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(20):2163.

[5] Liu C, Wang Y, Shi J, et al. The status and progress of first-line treatment against Helicobacter pylori infection: a review[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2021, 14:1756284821989177.

[6] 胡伏莲. 幽门螺杆菌研究聚焦和进展[J]. 胃肠病学, 2015, 20(12):705.

[7] 张学智, 魏玮, 蓝宇. 成人幽门螺杆菌引起的胃炎中西医协作诊疗专家共识(2020, 北京)[J]. 中医杂志, 2020, 61(22):2016.

[8] 张军文, 奚娜, 秦晓娟. 多重耐药菌性肺部感染中医证候证型研究[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(15):1860.

[9] 盛增秀. 王孟英医学全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999:186.

[10] 黄超群, 吕文亮, 高清华, 等. 连朴饮加味方联合四联补救治疗幽门螺杆菌感染的疗效及肠道微生态分析[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(6):1407.

[11] 丁辛. 连朴饮加减方治疗克拉霉素耐药幽门螺杆菌相关性胃炎的研究[D]. 湖北中医药大学博士学位论文, 2021.

[12] Kumar S, Mehrotra T, Talukdar D, et al. Region-specific genomic signatures of multidrug-resistant Helicobacter pylori isolated from East and South India[J]. Gene, 2022, 847:146857.

[13] 陆红, 刘文忠. 努力提高幽门螺杆菌根除率[J]. 胃肠病学, 2020, 25(5):266.

[14] 杜丽梦, 呼圣娟. 幽门螺杆菌抗生素耐药影响因素的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(19):61.

[15] Kuo CJ, Lee CH, Chang ML, et al. Multidrug resistance: The clinical dilemma of refractory Helicobacter pylori infection[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2021, 54(6):1184.

[16] Chen C, Yu Z, Li Y, et al. Effects of berberine in the gastrointestinal tract - a review of actions and therapeutic implications[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(5):1053.

[17] Hu Q, Peng Z, Li L, et al. The Efficacy of Berberine-Containing Quadruple Therapy on Helicobacter Pylori Eradication in China: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials[J]. Front Pharmacol, 2020, 10:1694.

[18] 谢沈阳, 杨晓源, 丁章贵, 等. 蒲公英的化学成份及其药理作用[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1):141.

[19] 覃俊媛, 彭成, 孙晨, 等. 中药抗幽门螺杆菌感染的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5):710.

[20] 余绍源, 刘茂才, 罗云坚. 中西医结合内科学[M]. 北京: 科学出版社, 2003:239.

[21] Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, et al. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(36):12767.

[22] 黄超群, 吕文亮, 周姝含, 等. 16549例脾胃病科患者幽门螺杆菌感染现状及中医证型相关分析[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(5):1155.

[23] Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(15):e2004433.

[24] Hong JB, Zuo W, Wang AJ, et al. Helicobacter pylori Infection Synergistic with IL-1 β Gene Polymorphisms Potentially Contributes to the Carcinogenesis of Gastric Cancer[J]. Int J Med Sci, 2016, 13(4):298.

[25] Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances[J]. Inflamm Res, 2013, 62(7):641.

[26] Suganuma M, Watanabe T, Sueoka E, et al. Role of TNF- α -Inducing Protein Secreted by Helicobacter pylori as a Tumor Promoter in Gastric Cancer and Emerging Preventive Strategies[J]. Toxins (Basel), 2021, 13(3):181.

[27] Wu X, Tao P, Zhou Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(13):20741.

[28] 郝婷婷, 马晓鹏, 温彦丽, 等. 幽门螺杆菌感染慢性胃炎患者血清 TNF- α 、IL-8 和 VEGF 水平及其与胃炎严重程度相关性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(7):769.

[29] Mitchell JP, Carmody RJ. NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335:41.

[30] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation[J]. J Inflamm Res, 2018, 11:407.

[31] Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, et al. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: A focus on epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Physiol, 2022, 237(7):2770.

(责任编辑:王诗涵)