

止痛顺气胶囊对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 JAK/STAT 信号通路的影响[△]

孙玉霞^{1*}, 梁波², 文黛薇¹, 黄贤元³(1.梧州市中医医院内科, 广西梧州 543000; 2.梧州市中医医院药剂科, 广西梧州 543000; 3.梧州市中医医院科教科, 广西梧州 543000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1309-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.05

摘要 目的:研究止痛顺气胶囊对慢性萎缩性胃炎(CAG)模型大鼠酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)信号通路的影响,为阐明其改善CAG的作用机制提供参考。方法:将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组[维酶素,0.09 g/(kg·d)]和止痛顺气胶囊低、中、高剂量组[0.75、1.5、3 g/(kg·d)],每组10只。除空白组外,其余各组大鼠均采用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍自由饮用联合饥饿失常的方法复制CAG模型。造模结束后,各给药组大鼠灌胃相应药物,空白组和模型组大鼠灌胃等体积水,连续给药28 d。给药结束后,采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6水平,采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠的胃黏膜组织病理学变化,分别采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法和Western blotting法检测大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、细胞因子信号传导抑制因子(SOCS-3)、c-Myc的mRNA及其蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠胃黏膜可见排列稀疏不整齐的腺体,以及着色深染的细胞核;血清中IL-1 β 、IL-6水平以及胃黏膜组织中JAK1、STAT3、c-Myc mRNA及其蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),胃黏膜组织中SOCS-3 mRNA及其蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠胃黏膜腺体排列较整齐,染色较深的核细胞数较少;止痛顺气胶囊低剂量组大鼠血清中IL-6水平和胃黏膜组织中c-Myc mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$),SOCS-3蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);止痛顺气胶囊中剂量组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平和胃黏膜组织中JAK1、STAT3、c-Myc mRNA表达水平以及胃黏膜组织中JAK1蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),胃黏膜组织中SOCS-3 mRNA及其蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);阳性对照组和止痛顺气胶囊高剂量组大鼠上述指标水平均显著改善($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,止痛顺气胶囊高剂量组胃黏膜组织中STAT3 mRNA及其蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论:止痛顺气胶囊对CAG模型大鼠具有一定的改善作用;其机制可能与下调JAK1、STAT3、c-Myc mRNA及其蛋白表达,上调SOCS-3 mRNA及其蛋白表达有关。

关键词 止痛顺气胶囊;慢性萎缩性胃炎;胃黏膜;酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子信号通路;大鼠

Effects of Zhitong Shunqi Capsule on JAK/STAT Signaling Pathway of Chronic Atrophic Gastritis Model Rats

SUN Yuxia¹, LIANG Bo², WEN Daiwei¹, HUANG Xianyuan³(1.Dept. of Internal Medicine, Wuzhou Hospital of Traditional Chinese, Guangxi Wuzhou 543000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Wuzhou Hospital of Traditional Chinese, Guangxi Wuzhou 543000, China; 3.Dept. of Science and Education, Wuzhou Hospital of Traditional Chinese, Guangxi Wuzhou 543000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Zhitong shunqi capsule on JAK/STAT signaling pathway of chronic atrophic gastritis (CAG) model rats, and to provide reference for clarifying its mechanism of improving CAG. METHODS: Totally 60 SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group [vitacoenzyme, 0.09 g/(kg·d)], Zhitong shunqi capsule low-dose, medium-dose and high-dose groups [0.75, 1.5, 3 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for blank group, other groups were given N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine freely drinking combined with abnormal ingestion method to induce CAG model. After end of modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, blank group and model group were given constant volume of water intragastrically, for consecutive 28 d. After end of medication, ELISA method was used to determine the serum levels of IL-1 β and IL-6; the gastric mucosa tissue pathologic change was observed by HE staining; mRNA and protein expressions of JAK1, STAT3, SOCS-3 and c-Myc in gastric mucosa tissue were detected by real-time PCR and Western blotting assay. RESULTS: Compared with blank group, the sparse and irregular glands with deep staining cell nucleus could be seen in the gastric mucosa of rats in model group; serum levels of IL-1 β and IL-6, mRNA and protein expressions of JAK1, STAT3 and c-Myc in gastric mucosa tissue were increased significantly ($P < 0.05$), while mRNA and protein expression of SOCS-3 in gastric mucosa tissue were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, glandular arrangement of gastric mucosa was more orderly and the number of heavy stained cells was less in administration groups; serum level of IL-6 and mRNA expression of c-Myc in gastric mucosa of rats was decreased significantly in

[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660779);广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(No.Z20170940);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(No.GZZJ13-21)

*副主任医师,硕士。研究方向:脾胃病的中医药治疗与干预。电话:0774-2026133。E-mail:877538326@qq.com

Zhitong shunqi capsule low-dose group ($P<0.05$), while the protein expression of SOCS-3 was increased significantly ($P<0.05$); serum levels of IL-1 β and IL-6, mRNA expressions of JAK1, STAT3 and c-Myc in gastric mucosa tissue, protein expression of JAK1 were decreased significantly in Zhitong shunqi capsule medium-dose group ($P<0.05$), while mRNA and protein expression of SOCS-3 was increased significantly in gastric mucosa tissue ($P<0.05$); above indexes were improved significantly in positive control group and Zhitong shunqi capsule high-dose group ($P<0.05$). Compared with positive control group, mRNA and protein expression of STAT3 in gastric mucosa tissue were decreased significantly in Zhitong shunqi capsule high-dose group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Zhitong shunqi capsule can improve CAG model rat to certain extent, the mechanism of which may be associated with the down-regulation of mRNA and protein of JAK1, STAT3 and c-Myc, and up-regulation of mRNA and protein of SOCS-3.

KEYWORDS Zhitong shunqi capsule; Chronic atrophic gastritis; Gastric mucosa; JAK/STAT signaling pathway; Rat

慢性萎缩性胃炎(Chronic atrophic gastritis, CAG)是以胃黏膜萎缩和肠上皮化生为特征的慢性胃炎^[1]。CAG起病隐匿、病程较长,临床表现为腹胀、腹痛、嗝气等消化不良症状^[2-3]。部分患者的胃腺萎缩可以改善或逆转,胃黏膜上皮的轻度异型增生可逆转,但重度的胃黏膜上皮增生则易转变为胃癌^[4]。现代医学对CAG的治疗常存在症状反复、部分患者不适症状难以有效改善等问题^[5]。酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)是消化系统炎症疾病的重要通路之一,参与早期胃癌的发展进程^[6]。因此,抑制JAK/STAT通路可能会降低CAG转变为胃癌的可能性。

中医药治疗CAG除了可以明显改善患者临床症状,还可一定程度上逆转其发展和癌变,具有独特的优势^[7]。中医理论和壮医理论均认为脾胃是气机升降枢纽,气机不畅则脾胃失和,会引发消化系统疾病。壮医民间验方止痛顺气方在消化系统疾病治疗的临床实践中取得了较好的疗效^[8]。止痛顺气胶囊是在止痛顺气方的基础上,根据中医理论和壮医理论进行组方、研发而成的治疗消化道疾病的民族药制剂。其主要由藿香、佩兰、陈皮、丁香、大腹皮、山药、肉桂、甘草和黄柏等9味药组成,具有温中和胃、理气止痛的功效,适用于邪滞中焦所致的恶心、呕吐、胃痛、腹痛、胃胀等^[9],但是其作用机制不甚明确。因此,本研究通过考察止痛顺气胶囊对CAG模型大鼠JAK/STAT信号传导通路的影响,探讨该制剂改善CAG的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

XSP-C204型光学显微镜(上海徕卡仪器有限公司);JS-Power300型电泳仪(上海培清科技有限公司);AX-II型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);PIDRed 96型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪、3K15型低温高速离心机、MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);UVmini-1240型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);TP-214型电子分析天平(美国Denver公司)。

1.2 药品与试剂

止痛顺气胶囊(广西梧州三鹤药业有限公司,批号:20190211,规格:0.3 g);*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG,日本东京化成工业株式会社,批号:TCI-

M0536-5g,纯度: $>95\%$);山羊抗鼠JAK1一抗(批号:sc-1806)、山羊抗鼠STAT3一抗(批号:sc-14031)、山羊抗鼠细胞因子信号传导抑制因子(SOCS-3)一抗(批号:sc-1925)、山羊抗鼠c-Myc一抗(批号:sc-15042)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号:sc-3065)均购自美国Santa Cruz公司;山羊抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:MA5-15824);实时荧光定量-PCR试剂盒(批号:CSB-E08324r)、化学发光试剂盒(批号:CSB-E08453r)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶试剂盒(批号:CSB-E09971r)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:CSB-E09256r)均购自广州晶欣生物科技有限公司;重组人白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(广州英韦创津生物科技有限公司,批号:SDFGT1693、SDF-GT1782);苏木精、伊红染液(武汉谷歌生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 动物

SPF级健康成年SD大鼠60只,雄性,体质量180~220 g,由广州中医药大学实验动物中心提供[动物使用许可证号:SYXK(粤)2018-00371]。大鼠均采用架式分笼喂养,每笼5只,饲养环境明暗周期为12 h/12 h、温度为(20 \pm 1) $^{\circ}$ C、湿度为45%~60%。实验研究全过程严格遵循科技部《关于善待实验动物的指导性意见》中对动物处理的有关规定。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组[维酶素,0.09 g/(kg \cdot d)]^[10]和止痛顺气胶囊低、中、高剂量组[0.75、1.5、3 g/(kg \cdot d)],分别为临床等效剂量的1、2、4倍剂量,每组10只。除空白组外,其余各组大鼠均按照文献方法^[10]进行造模:将MNNG制备成1 g/L的水溶液(4 $^{\circ}$ C避光保存),临用时稀释至100 μ g/mL,供造模大鼠自由饮用(为了避光和防止大鼠啃咬,需在装置瓶表面添加一层锡纸和塑料罩),每24 h更换1次溶液,每次更换时均记录饮用量。同时,制造大鼠饥饱失常状态:饱食1 d,禁食1 d,交替进行。在以上条件下连续造模56 d。造模结束后,各给药组大鼠灌胃相应药液,空白组和模型组大鼠灌胃等体积水,连续给药28 d。

2.2 大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平检测

末次给药后2 h,以10%水合氯醛腹腔内注射麻醉大鼠后,于腹主动脉取血。血样在3 000 r/min条件下离心10 min,收集血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,对血清中IL-1 β 、IL-6的水平进行检测。

2.3 大鼠胃黏膜组织病理学观察

取血后迅速剖腹取出大鼠的全胃,沿胃大弯部剪开,暴露胃腔,用生理盐水对胃腔进行清洗,然后沿胃小弯取出前后胃窦部胃黏膜处大小约5 mm \times 10 mm的组织。取其中一部分胃黏膜组织,用10%中性甲醛固定,进行常规脱水、包埋和切片(4 μ m)后,行苏木精-伊红(HE)染色,采用光学显微镜观察大鼠胃黏膜组织病理学变化。

2.4 大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc mRNA表达水平检测

采用实时荧光定量-PCR法。取大鼠胃黏膜组织适量,剪碎、研磨、冰上裂解,使用Trizol法提取总RNA,用紫外分析仪验证RNA浓度和纯度。然后将mRNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系:SYBR荧光染料10 μ L,上、下游引物各2 μ L,cDNA模板4 μ L,无核酸酶水2 μ L。引物序列:GAPDH上游为5'-TTCATGGCCATCAGGATG-3',下游为5'-TAGGC-TAGCTTAAGCCTT-3',扩增片段长度为421 bp;JAK1上游为5'-CCATGCCTTACTTGATCA-3',下游为5'-CCTACGTCGAGGTTTCAG-3',扩增片段长度为162 bp;STAT3上游为5'-CTCGGACTAACGATACGT-3',下游为5'-GATCACTTGCCATCAGTA-3',扩增片段长度为251 bp;SOCS-3上游为5'-GCTACTGGCCTACCC-CTG-3',下游为5'-TTCAGCTCATGGGCATCC-3',扩增片段长度为252 bp;c-Myc上游为5'-GCCTCAATC-GTCCCATCG-3',下游为5'-CCGCTACCCAATCGAT-TC-3',扩增片段长度为342 bp。扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的表达水平。

2.5 大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc蛋白表达水平检测

采用Western blotting法。取大鼠胃黏膜组织适量,加入裂解液充分裂解后,在4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法进行蛋白定量。取30 μ g蛋白,在100 V电压下进行SDS-PAGE电泳,然后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上;将膜在4 $^{\circ}$ C条件下用5%脱脂奶粉封闭过夜,然后用PBST洗膜3次,每次10 min;加入JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc和GAPDH一抗(1:1 000),在4 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜,再次用TBST洗膜3次,每次10 min;加入二抗(1:5 000),37 $^{\circ}$ C下反应1 h,PBST洗膜3次,每次10 min;用化学发光试剂显影,采用Biodoc-IT型凝胶成像系统分析各成像蛋白条带的

灰度值,以目标蛋白条带与内参GAPDH蛋白条带的灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法

实验数据采用SPSS 23.0软件进行统计分析。首先对数据进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平测定结果

与空白组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和止痛顺气胶囊中、高剂量组大鼠血清中IL-1 β 水平和各给药组大鼠血清中IL-6水平均显著降低($P < 0.05$);与阳性对照组比较,止痛顺气胶囊各剂量组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平测定结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, ng/mL)

Tab 1 Serum levels of IL-1 β and IL-6 of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, ng/mL)

组别	IL-1 β	IL-6
空白组	21.71 \pm 8.46	20.53 \pm 9.64
模型组	38.63 \pm 10.44 [*]	46.45 \pm 12.72 [*]
阳性对照组	24.14 \pm 6.68 [#]	25.94 \pm 8.44 [#]
止痛顺气胶囊低剂量组	32.92 \pm 6.53	31.86 \pm 10.42 [#]
止痛顺气胶囊中剂量组	28.89 \pm 7.35 [#]	30.14 \pm 10.71 [#]
止痛顺气胶囊高剂量组	23.93 \pm 9.64 [#]	26.89 \pm 5.36 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note:vs. blank group,* $P < 0.05$;vs. model group,[#] $P < 0.05$

3.2 大鼠胃黏膜组织的病理学观察结果

空白组大鼠胃黏膜结构正常,可见排列紧密整齐的腺体,组织柔软呈淡粉色,有光泽。模型组大鼠胃黏膜萎缩,胃黏膜层变薄,可见排列稀疏不整齐的腺体,以及着色深染的细胞核。与模型组比较,阳性对照组和止痛顺气胶囊各剂量组大鼠的胃黏膜病理情况都有明显的改善;其中,以阳性对照组和止痛顺气胶囊高剂量组改善较为明显,胃黏膜组织中可见排列较整齐的黏膜腺体,染色较深的单个核细胞数量较少。各组大鼠胃黏膜组织的病理学显微图见图1。

3.3 大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc mRNA表达水平测定结果

与空白组比较,模型组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、c-Myc mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$),SOCS-3 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和止痛顺气胶囊中、高剂量组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3 mRNA表达水平均显著降低,SOCS-3 mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$);各给药组大鼠胃黏膜组织中c-Myc mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,止痛顺气胶囊

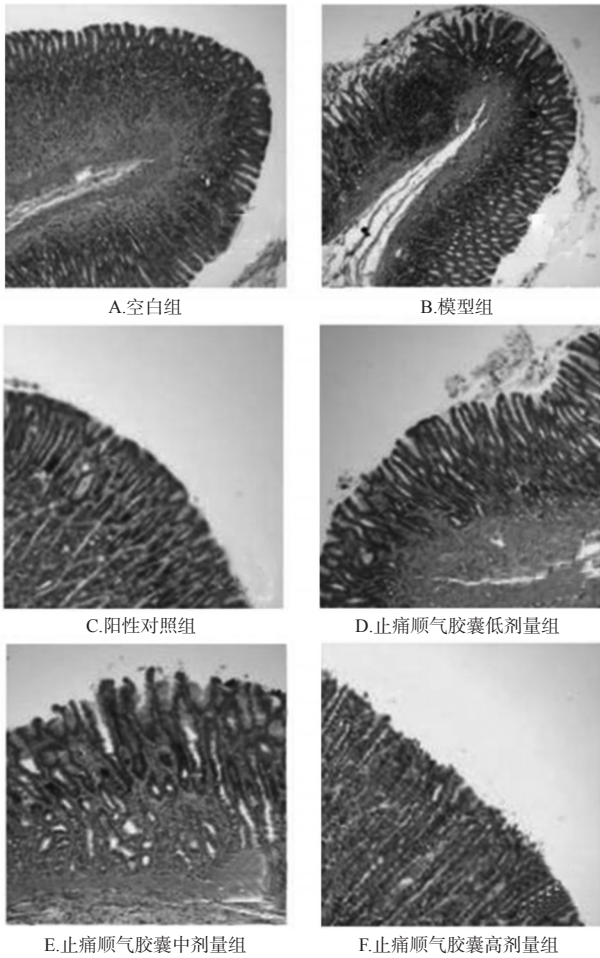


图1 各组大鼠黏膜组织的病理学显微图(HE染色, ×100)

Fig 1 Histopathology micrograms of gastric mucosa tissue of rats in each group (HE staining, ×100)

高剂量组大鼠胃黏膜组织中STAT3 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc mRNA表达水平测定结果见表2。

表2 各组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 mRNA expressions of JAK1, STAT3, SOCS-3 and c-Myc in gastric mucosa tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	JAK1	STAT3	SOCS-3	c-Myc
空白组	0.48 ± 0.20	0.67 ± 0.28	2.88 ± 0.63	0.56 ± 0.26
模型组	2.97 ± 0.33 [*]	2.33 ± 0.32 [*]	0.54 ± 0.09 [*]	2.68 ± 0.24 [*]
阳性对照组	1.13 ± 0.36 [#]	1.32 ± 0.31 [#]	1.88 ± 0.56 [#]	1.02 ± 0.13 [#]
止痛顺气胶囊低剂量组	2.69 ± 0.07	2.04 ± 0.08	0.86 ± 0.23	1.87 ± 0.21 [#]
止痛顺气胶囊中剂量组	1.64 ± 0.77 [#]	1.85 ± 0.43 [#]	1.34 ± 0.26 [#]	1.56 ± 0.19 [#]
止痛顺气胶囊高剂量组	1.08 ± 0.34 [#]	0.93 ± 0.37 ^{#Δ}	1.98 ± 0.43 [#]	0.98 ± 0.12 [#]

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与阳性对照组比较, Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$; vs. positive control group, Δ $P < 0.05$

3.4 大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc蛋白表达水平测定结果

与空白组比较,模型组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、c-Myc蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),SOCS-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和止痛顺气胶囊高剂量组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、c-Myc蛋白表达水平以及止痛顺气胶囊中剂量组大鼠胃黏膜组织中JAK1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$);各给药组大鼠胃黏膜组织中SOCS-3蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,止痛顺气胶囊高剂量组大鼠胃黏膜组织中SOCS-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc蛋白表达的电泳图见图2,蛋白表达水平测定结果见表3。

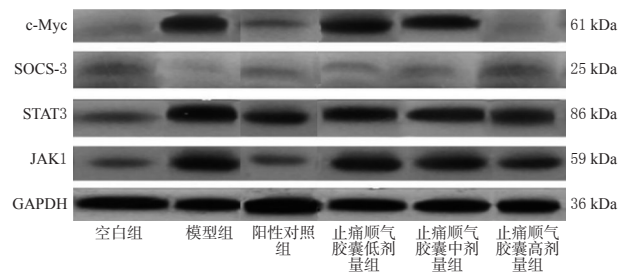


图2 各组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expressions of JAK1, STAT3, SOCS-3 and c-Myc in gastric mucosa tissue of rats in each group

表3 各组大鼠胃黏膜组织中JAK1、STAT3、SOCS-3、c-Myc蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Protein expressions of JAK1, STAT3, SOCS-3 and c-Myc in gastric mucosa tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	JAK1/GAPDH	STAT3/GAPDH	SOCS-3/GAPDH	c-Myc/GAPDH
空白组	0.173 ± 0.04	0.181 ± 0.05	0.894 ± 0.02	0.231 ± 0.03
模型组	0.810 ± 0.06 [*]	0.897 ± 0.09 [*]	0.035 ± 0.01 [*]	0.759 ± 0.05 [*]
阳性对照组	0.203 ± 0.04 [#]	0.423 ± 0.05 [#]	0.648 ± 0.09 [#]	0.274 ± 0.08 [#]
止痛顺气胶囊低剂量组	0.781 ± 0.07	0.783 ± 0.08	0.128 ± 0.02 [#]	0.695 ± 0.06
止痛顺气胶囊中剂量组	0.422 ± 0.05 [#]	0.694 ± 0.07	0.484 ± 0.05 [#]	0.435 ± 0.07
止痛顺气胶囊高剂量组	0.212 ± 0.03 [#]	0.288 ± 0.04 ^{#Δ}	0.659 ± 0.04 [#]	0.283 ± 0.09 [#]

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与阳性对照组比较, Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$; vs. positive control group, Δ $P < 0.05$

4 讨论

维酶素片是一种保护胃黏膜的药物,是临床用于防治萎缩性胃炎癌前病变的常用药,故本研究以其为阳性对照。临床实践中,当慢性胃炎的患者出现湿热阻胃证时,多使用藿香、佩兰、陈皮等芳香化湿类中药进行治疗。有研究表明,藿香、佩兰、陈皮、丁香均能提高胃黏

膜血流量,调节胃肠道运动,对胃黏膜有一定保护作用^[11-13];山药中的多糖能够有效促进实验性大鼠胃溃疡的愈合,对胃黏膜有一定的保护作用^[14];肉桂有效成分桂皮醛能够改善大鼠一般状况及胃黏膜损伤^[15];而黄柏、甘草能调整胃肠运动,具有抗溃疡、抗菌、抗炎、调节免疫功能^[16]。以上研究提示,止痛顺气胶囊具有保护胃黏膜组织、抑制炎症反应、调节机体免疫的功效。在本研究中,经HE染色后发现,灌胃止痛顺气胶囊后的CAG模型大鼠胃黏膜病变减轻,CAG症状得到明显改善。

IL-1 β 是由T细胞亚群Th1细胞分泌的一种促进炎症反应的细胞因子^[17]。在生理条件下,IL-1 β 具有调控多种胃上皮细胞的功能,是目前已知的最强的胃酸分泌抑制因子^[18]。此外,IL-1 β 也能促进白细胞黏附分子表达和趋化中性粒细胞等炎症细胞在胃肠道病变部位的分泌聚集,与胃黏膜的炎症程度呈正相关^[19]。IL-6是一种具有多种功能的生物活性多肽物质,在慢性炎症反应的持续发展中具有关键作用,例如其可诱导中性粒细胞为主的炎症细胞在局部聚集,引起粒细胞呼吸爆发,生成活性氧,造成组织炎症,与中性粒细胞分泌的细胞因子共同参与胃黏膜炎症损伤过程^[20]。本研究结果显示,止痛顺气胶囊可以显著降低CAG模型大鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平,表明该制剂可能通过调节IL-1 β 、IL-6的表达,从而减少胃黏膜的炎症损伤,发挥保护胃黏膜的作用。

JAK/STAT信号通路是已知的3条炎症信号传导通路之一,在消化系统炎症中发挥着重要作用^[21]。JAK属于非受体型的酪氨酸蛋白激酶,可与其直接底物STAT偶联并激活STAT,STAT被激活后可直接转入细胞核内并与DNA相结合,从而调节特定基因的表达^[17]。c-Myc是一种癌基因,目前研究表明,c-Myc蛋白表达水平越高,预示胃癌的恶性程度越高、浸润和转移能力越强^[22]。此外,慢性萎缩性胃炎常表现出STAT3的高表达,当外界因素刺激机体导致JAK过度激活,可引起STAT3过度活化,导致c-Myc为首的基因表达调节紊乱,相关蛋白表达增多,细胞的正常代谢机制失常,为癌细胞的产生发展创造了机会,甚至可能转变为胃肠道肿瘤^[23]。黏膜SOCS是STAT的靶基因,活化后的STAT可直接激活SOCS,激活后的SOCS与磷酸化的JAK和细胞因子受体相结合,使其失去活性,从而抑制该信号通路,产生经典的负反馈调节^[17]。SOCS-3为SOCS家族中与JAK/STAT信号通路关系最为密切的一种。本研究结果显示,止痛顺气胶囊可以显著上调CAG模型大鼠胃黏膜组织中SOCS-3 mRNA及其蛋白的表达,显著下调JAK1、STAT3、c-Myc mRNA及其蛋白的表达,尤其以高剂量止痛顺气胶囊的作用最为明显。根据本实验结果及现有理论推测,止痛顺气胶囊可能通过提高SOCS-3表达,抑制JAK/STAT信号通路中JAKs的异常激活,减

少信号通路底物STATs的活化,使细胞中c-Myc等基因表达和代谢过程趋于正常,从而保护胃黏膜组织,抑制胃肠道肿瘤发生。

综上所述,止痛顺气胶囊对CAG模型大鼠具有一定的改善作用,其机制可能与下调胃黏膜组织中JAK、STAT、c-Myc mRNA及其蛋白表达,上调SOCS-3 mRNA及其蛋白表达有关,但其更多的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘德培.中华医学百科全书:临床医学:消化病学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2015:215.
- [2] 石永强,赵向阳,王小平,等.双歧杆菌三联活菌胶囊辅助治疗伴有焦虑抑郁的幽门螺杆菌阳性慢性萎缩性胃炎的临床观察[J].中国药房,2017,28(17):2380-2383.
- [3] 唐旭东,李振华,李保双,等.慢性胃炎诊疗指南[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(10):123-125.
- [4] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:354-357.
- [5] 程传奇,王晓素.中医药治疗慢性萎缩性胃炎的研究进展[J].当代医学,2019,25(32):190-192.
- [6] 傅军,傅玉春,张晓云,等. JAK2/STAT3信号通路对胃癌血管生成的影响[J].蚌埠医学院学报,2019,44(6):701-704.
- [7] 韦维,汪波,万文雅,等.安胃汤干预慢性萎缩性胃炎大鼠JAK/STAT信号传导通路的作用机制[J].中医药导报,2017,23(15):22-26.
- [8] 黄琰.从气机升降谈推化法在脾胃病中的应用[J].河南中医,2019,39(11):1638-1642.
- [9] 梁坚,梁艺坚,曹耘,等.止痛顺气胶囊的薄层色谱鉴别[J].中国药业,2014,23(1):21-22.
- [10] 王四旺,施新猷,黄传贵.中药药效研究与评价[M].西安:陕西科学技术出版社,2001:315-317.
- [11] TANZEEM MU, ASGHAR S, KHALID SH, et al. Clove oil based co-surfactant free microemulsion of flurbiprofen: improved solubility with ameliorated drug-induced gastritis[J]. Pak J Pharm Sci, 2019, 32(6):2787-2793.
- [12] 王瑞萍.藿香、陈皮协同调节胃肠动力及其药用最佳比研究[D].天津:天津医科大学,2011.
- [13] 吕文纲,王鹏程.佩兰化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中国中医药科技,2015,22(3):117-118.
- [14] 罗鼎天,陆其明,杨志宏,等.怀山药多糖对大鼠胃溃疡的疗效及胃组织碱性成纤维因子及其受体水平的影响[J].中华中医药学刊,2015,33(3):712-714.
- [15] 康欣欣.肉桂治疗冷刺激诱导寒证的温阳作用机制研究[D].上海:上海中医药大学,2015.
- [16] 许晓蓓,王威,李瑞根,等.中医药治疗胃黏膜损伤研究概况[J].实用中医内科杂志,2017,31(2):79-82.
- [17] 王坤.穴位埋线对慢性萎缩性胃炎大鼠JAK/STAT转导系统的影响[D].广州:广州中医药大学,2018.
- [18] 周刚,刘利民,孙学科,等.白细胞介素-1基因多态性与疾

HPLC-一测多评法结合色差原理分析不同生长年限北苍术药材的质量^Δ

孙金*,翁丽丽,肖春萍#,姜雨昕,宿莹,刘战,吴晓燕(长春中医药大学药学院,长春 130117)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1314-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.06

摘要 目的:建立同时测定北苍术中白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术素、苍术酮含量的方法,并结合色差原理评价不同生长年限北苍术药材的质量。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定,色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长分别为208 nm(白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇)、340 nm(苍术素)和220 nm(苍术酮),进样量为15 μ L。以苍术素为内参物,采用一测多评法建立白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术酮的相对校正因子,并计算不同生长年限北苍术药材中各成分的含量;同时,采用外标法测定上述成分含量,并与一测多评法结果进行比较。基于色差原理对不同生长年限北苍术药材粉末进行颜色测定,采用Pearson相关分析法对苍术药材中上述4种成分含量与其颜色进行相关性分析。结果:白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术素、苍术酮的分离度均大于1.5,检测质量浓度线性范围分别为1.01~10.10、3.30~33.00、4.40~44.00、5.34~53.40 μ g/mL,精密性、重复性、稳定性试验的RSD均小于2%,平均加样回收率为101.34%~104.67%(RSD<1.5%, $n=6$);以苍术素为内参物,白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术酮的平均校正因子分别为3.896 7、5.928 2、9.727 9,RSD分别为0.35%、2.89%、0.36%($n=6$)。采用一测多评法与外标法测得的24批北苍术药材中3种成分(除苍术素外)含量的相对偏差在0.03%~1.45%之间,表明2种方法测定结果一致,且各成分含量随药材生长年限的增加而升高。北苍术药材中白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术素、苍术酮与其颜色亮度(L^*)、色差值(E^*ab)呈显著负相关($P<0.01$),与红绿色度(a^*)、黄蓝色度(b^*)呈显著正相关($P<0.01$)。结论:HPLC-一测多评法可用于北苍术药材中白术内酯Ⅱ、 β -桉叶醇、苍术素、苍术酮的含量测定;药材生长年限越长,各成分含量越高;药材颜色与各成分含量显著相关,且颜色偏暗黄棕色的北苍术药材的有效成分含量较高。

关键词 北苍术;高效液相色谱法;一测多评法;色差原理;含量测定;质量评价

Quality Analysis of *Atractylodes chinensis* with Different Growth Years by HPLC-QAMS Combined with Color Difference Principle

SUN Jin, WENG Lili, XIAO Chunping, JIANG Yuxin, SU Ying, LIU Zhan, WU Xiaoyan (School of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To simultaneously determine the contents of atractylenolide II, β -eudesmol, atractyloxin and atractylone in *Atractylodes chinensis*, and to evaluate the quality of *A. chinensis* with different growth years combined with color difference principle. METHODS: HPLC method was adopted. The determination performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min; the detection wavelengths were set as 208 nm (atractylenolide II, β -eudesmol), 340 nm (atractyloxin) and 220 nm (atractylone); the sample size was 15 μ L. Using atractyloxin as reference, QAMS was adopted to establish relative correction factors (RCFs) of

- 病[J].细胞与分子免疫学杂志,2007,23(2):190-192.
- [19] 乔文,李娜,李长顺,等. IL-1 β 与人慢性胃炎的相关性研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(1):47-48.
- [20] 巩子汉,王强,段永强,等.白及多糖对胃溃疡模型大鼠胃

- 组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 JNK、p38 MAPK 基因蛋白表达水平的影响[J].中药药理与临床,2019,35(4):90-95.
- [21] ZHANG X, DARNELL JE. Functional importance of STAT3 tetramerization in activation of the 2-macroglobulin gene[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36):33576-33581.
- [22] 黄国全,黎晖,张才全,等. CDC4 及 c-Myc 在胃癌中的表达及临床意义[J].中国癌症杂志,2015,25(12):21-27.
- [23] KHANDAKER AZS, TURKSON J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors[J]. *Cell Res*, 2008, 18(2):254-267.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81803649);吉林省科技发展计划项目(No.20191102035YY);吉林省中医药科技项目(No.2017001);吉林省卫生与健康青年科技骨干培养计划项目(No.2018Q042);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(No.JJ-KH20190477KJ)

* 硕士研究生。研究方向:中药品质评价与资源开发。电话:0431-81672193。E-mail:1451820853@qq.com

通信作者:讲师,博士。研究方向:中药资源、栽培理论和技术。电话:0431-81672193。E-mail:btxnw@163.com

(收稿日期:2020-01-15 修回日期:2020-04-13)

(编辑:林静)