

艳山姜总黄酮改善无水乙醇致胃黏膜细胞损伤的作用及机制^Δ

魏 晴*, 薛 娟, 梁珊珊[#](贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)22-2701-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.03



摘要 目的 探讨艳山姜总黄酮通过微RNA-146a-5p(miR-146a-5p)对无水乙醇诱导的胃黏膜细胞损伤的改善作用及潜在机制。方法 以人胃黏膜细胞GES-1为对象,以无水乙醇诱导建立急性胃溃疡细胞模型,在考察不同质量浓度艳山姜总黄酮对细胞活力影响及筛选作用浓度的基础上,检测细胞中miR-146a-5p的相对表达量,细胞中肿瘤坏死因子受体关联因子6(TRAF6)、核因子κB p65(NF-κB p65)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)蛋白的表达水平,以及细胞上清液中白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6、前列腺素E₂(PGE₂)水平;验证miR-146a-5p与TRAF6的靶向关系,并观察过表达miR-146a-5p、敲减TRAF6对模型细胞上清液中IL-1β、IL-6、PGE₂水平的影响,以及敲减miR-146a-5p对艳山姜总黄酮抗胃溃疡作用的影响。结果 与空白组比较,模型组细胞中miR-146a-5p的相对表达量和上清液中PGE₂水平均显著降低($P<0.01$),细胞中TRAF6、NF-κB p65、TNF-α蛋白的表达水平和上清液中IL-1β、IL-6水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,模型+艳山姜总黄酮(60 mg/L)组细胞中miR-146a-5p的相对表达量和上清液中PGE₂水平均显著升高($P<0.01$),细胞中TRAF6、NF-κB p65、TNF-α蛋白的表达水平和上清液中IL-1β、IL-6水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。miR-146a-5p与TRAF6存在靶向关系且呈负相关;过表达miR-146a-5p或敲减TRAF6后,细胞上清液中IL-1β、IL-6水平均显著降低,PGE₂水平显著升高($P<0.05$)。敲减miR-146a-5p后,艳山姜总黄酮作用下的细胞上清液中IL-1β、IL-6水平和细胞中TRAF6蛋白的表达水平均显著升高,PGE₂水平显著降低($P<0.05$)。结论 艳山姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜细胞损伤有一定的改善作用,其机制可能与上调miR-146a-5p的表达、抑制TRAF6的表达,进而抑制相关炎症因子的分泌有关。

关键词 艳山姜总黄酮;胃黏膜细胞;微RNA-146a-5p;肿瘤坏死因子受体关联因子6;抗胃溃疡作用

Improvement effect and mechanism of total flavonoids from *Alpinia zerumbet* on gastric mucosa injury induced by absolute ethanol

WEI Qing, XUE Juan, LIANG Shanshan (College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the improvement effect and potential mechanism of total flavonoids from *Alpinia zerumbet* on gastric mucosa injury induced by absolute ethanol through microRNA-146a-5p (miR-146a-5p). **METHODS** Using human gastric mucosa GES-1 cells as objects, the acute gastric ulcer model was established by absolute ethanol; based on the investigation of the effects of different concentrations of total flavonoids from *A. zerumbet* on cell activity and the selection of action concentration, the relative expression level of miR-146a-5p in GES-1 cells was detected, the protein expressions of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 (TRAF6), nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65) and TNF-α were detected, and the levels of interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and prostaglandin E₂ (PGE₂) in cell supernatant were determined. The targeting relationship between miR-146a-5p and TRAF6 was verified; the effects of overexpressed miR-146a-5p and TRAF6 knockdown on the levels of IL-1β, IL-6 and PGE₂ in supernatant of model cells as well as the effects of miR-146a-5p knockdown on anti-gastric ulcer effect of total flavonoids from *A. zerumbet* were observed. **RESULTS** Compared with the blank group, the relative expression of miR-146a-5p in cells and the level of PGE₂ in cell supernatant were decreased significantly in the model group ($P<0.01$), while the protein expressions of TRAF6, NF-κB p65 and TNF-α in cells and the levels of IL-1β and IL-6 in cell supernatant were increased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the relative expression of miR-146a-5p in cells and the level of PGE₂ in cell supernatant were increased significantly in model+*A. zerumbet* total flavonoids (60 mg/L) group ($P<0.01$), while the protein expressions of TRAF6, NF-κB p65 and TNF-α in cells and the levels of IL-1β and IL-6 in cell supernatant were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). There was a targeted relationship and a negative correlation between miR-146a-5p and TRAF6. After overexpression of miR-146a-5p or TRAF6

^Δ 基金项目 贵州省科技计划项目(No. 黔科合基础-ZK[2022]一般492; No. 黔科合基础[2020]1Y389); 国家自然科学基金项目(No. 82260767)

* 第一作者 讲师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及作用机制。E-mail: 997845460@qq.com

[#] 通信作者 讲师, 博士。研究方向: 中药材加工及中药炮制机制。E-mail: 3113836821@qq.com

knockdown, the levels of IL-1 β and IL-6 were decreased significantly in cell supernatant, while the level of PGE₂ was increased significantly ($P < 0.05$). After miR-146a-5p knockdown, the levels of IL-1 β and IL-6 in cell supernatant and the protein expression of TRAF6 in cells administered with total flavonoids of *A. zerumbet* were increased significantly, while the level of PGE₂ was decreased significantly ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Total flavonoids of *A. zerumbet* can improve the gastric mucosa injury induced by absolute ethanol. The mechanism may be related to up-regulating the expression of miR-146a-5p, inhibiting the expression of TRAF6, and further inhibiting the secretion of related inflammatory factors.

KEYWORDS total flavonoids of *Alpinia zerumbet*; gastric mucosa cell; microRNA-146a-5p; TNF receptor-associated factor 6; anti-gastric ulcer effect

艳山姜是姜科植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith 的干燥根及根茎,是贵州特色苗药,能温中燥湿、行气止痛,可用于心腹冷痛、胸腹胀满、消化不良、呕吐腹泻等症^[1]。本课题组前期研究表明,艳山姜可通过抑制氧化应激和炎症反应而减轻胃黏膜损伤,对无水乙醇和阿司匹林诱导的小鼠急性胃溃疡均有明显的改善作用^[2],但关于其药效物质基础和分子机制尚不明确。有研究指出,黄酮类成分是艳山姜中的主要成分,其中二氢-5,6-脱氢香豆素、5,6-脱氢卡因均具有抗实验性溃疡的作用,二氢-5,6-去氢醉椒素、5,6-去氢醉椒素均能拮抗实验性胃溃疡和十二指肠溃疡,山柰酚可通过调控白三烯 C4 和前列腺素 E 的表达而发挥抗溃疡作用^[3-4]。由此推测,黄酮类成分可能是艳山姜抗溃疡的有效成分。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是内源性的小非编码 RNA (长度为 17~25 个核苷酸), 可通过直接与靶基因的 3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 结合来负向调控该靶基因的表达, 从而参与多种生理过程^[5-6]。研究指出, miRNA-146a-5p (miR-146a-5p) 过表达可降低核因子 κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 蛋白及 mRNA 的表达水平, 同时还能减少炎症因子 [肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)] 的分泌, 并可负向调控应激性胃溃疡的炎症反应, 从而发挥抗胃溃疡作用^[7]; 进一步研究表明, miR-146a-5p 可通过预测靶蛋白肿瘤坏死因子受体关联因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 而进一步影响 NF- κ B 的下游通路, 抑制人肝星状细胞中相关细胞因子的信号转导, 对炎症反应具有重要的调节作用^[8]。基于艳山姜的传统功效、miRNA 的研究进展和本课题组的前期探索, 本研究拟以人胃黏膜细胞为对象, 以无水乙醇诱导建立急性胃溃疡模型, 通过检测细胞中 miR-146a-5p 与胃溃疡、炎症相关指标的表达/含量, 探讨艳山姜总黄酮能否通过调控 miR-146a-5p 来发挥抗胃溃疡作用, 为艳山姜及其活性成分的开发及利用提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 CFX96 型定量实时聚合酶链式反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪、Trans-Blot Turbo™ 型 Western 转膜仪、DDY-10 型电泳仪、Gel Doc XR 型凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司), D180 型 CO₂ 恒温培养箱 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司), SMZ645 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司), YT-MB96A 全自动多功能酶标仪 (山东云唐智能科技有限公司) 等。

1.2 主要药品与试剂

艳山姜药材采自贵州省罗甸县, 经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为姜科植物艳山姜 *A. zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith 的干燥根及根茎, 标本存放于贵州中医药大学药学院产地加工与炮制实验室 (标本号 GY20221005001)。

兔源 TRAF6、NF- κ B p65、TNF- α 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号分别为 CL647-66498、10745-1-AP、17590-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 过表达 miR-146a-5p (miR-146a-5p mimic) 及其阴性对照 (mimic NC)、敲减 miR-146a-5p (miR-146a-5p inhibitor) 及其阴性对照 (inhibitor NC)、敲减 TRAF6 (TRAF6 siRNA) 及其阴性对照 (NC siRNA)、含 TRAF6 野生型 (TRAF6 WT) 或突变型 (TRAF6 MUT) 的 3'-UTR 片段均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 腺病毒表达载体 pacAd5 CMV-GFP (批号 VECT10037) 购自北京华越洋生物科技有限公司; 荧光素酶 pmirGLO 载体 (批号 GN1439) 购自上海盖宁生物科技有限公司; Lipofectamine 3000 转染试剂 (批号 MAN0009872) 购自美国 Sigma 公司; 正常兔 IgG 单克隆抗体 (货号 10010322-1) 购自深圳艾美捷科技有限公司; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 (批号分别为 CW0581M、CW2569M) 均购自康为世纪生物科技股份有限公司; IL-1 β 、IL-6、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (货号分别为 A220819、A220815、A220806) 均购自武汉华联科生

物科技有限公司;MTT试剂(货号SR0051)购自南京都莱生物技术有限公司;ECL化学发光试剂盒(批号P0018S)购自上海碧云天生物技术有限公司;青-链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化液、蛋白裂解液、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号D0010)均购自北京索莱宝科技有限公司;RPMI-1640培养液、胎牛血清均购自美国HyClone公司。

1.3 细胞

人胃黏膜细胞GES-1(货号BFN60807461)购自美国ATCC细胞库。

2 方法

2.1 艳山姜总黄酮的制备

取艳山姜药材,粉碎,取粗粉100 g,用95%乙醇1 000 mL加热回流提取2 h×3次;合并提取液,过滤,浓缩,制得浸膏(浸膏得率18.69%)。取上述浸膏,用适量水溶解,再加入适量乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯萃取液,浓缩,制得总黄酮浸膏[总黄酮浸膏得率2.28%,纯度42.61%(以芦丁计)],再用水溶解,制成质量浓度为30 mg/mL(按生药量计)的艳山姜总黄酮溶液,备用。

2.2 艳山姜总黄酮对细胞活力影响的考察及作用浓度的筛选

2.2.1 对细胞活力影响的考察

将正常GES-1细胞接种于96孔板中并分为空白组和艳山姜总黄酮不同质量浓度组(24、48、60、80、120 mg/L,质量浓度按前期预实验结果设置),每组设6个复孔。空白组加入RPMI-1640培养液(含青-链霉素双抗和10%胎牛血清)20 μ L,其余各组分别加入含不同质量浓度艳山姜总黄酮的RPMI-1640培养液20 μ L;培养24 h后,每孔加入MTT溶液20 μ L^[9];孵育4 h后,吸弃培养液,加入二甲基亚砜150 μ L,振荡15 min后,使用酶标仪在490 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值并按下式计算各组细胞活力:细胞活力=实验组OD值/空白组OD值×100%。

2.2.2 作用浓度的筛选

将正常GES-1细胞接种于96孔板中并分为空白组、模型组和模型+艳山姜总黄酮不同质量浓度组(24、48、60、80、120 mg/L,质量浓度按前期预实验结果设置),每组设6个复孔。空白组和模型组加入RPMI-1640培养液(含青-链霉素双抗和10%胎牛血清)20 μ L;各药物组加入含不同质量浓度艳山姜总黄酮的RPMI-1640培养液20 μ L;培养12 h后,模型组和各药物组分别加入无水乙醇7 μ L以建立急性胃溃疡细胞模型,空白组加入RPMI-1640培养液(含青-链霉素双抗和10%胎牛血清)7 μ L;培养12 h后,每孔加入MTT溶液20 μ L,按“2.2.1”项下方法检测各组细胞活力,以确定后续实验中艳山姜总黄酮的最适作用浓度。

2.3 细胞中miR-146a-5p表达水平的检测

采用qRT-PCR法进行检测。将正常GES-1细胞接种于96孔板中并分为空白组、模型组和模型+艳山姜总黄酮组(质量浓度按“2.2.2”项下结果设置),每组设6个复孔。按“2.2.2”项下方法培养、处理后,收集各组细胞,提取总RNA并使用逆转录试剂盒处理得到cDNA。以所得cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系(20 μ L)包括:cDNA模板1 μ L,上、下游引物各0.5 μ L,水8 μ L,2×Mix 10 μ L。miR-146a-5p的上游引物为5'-AGAAC-TGAATTCCATGGGTT-3',下游引物为5'-GACAGAG-ATATCCCAGCTGAAGAA-3',产物长度为397 bp;U6的上游引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',产物长度为94 bp。反应条件如下:95℃预变性5 min;95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,进行35个循环;72℃再延伸5 min。以U6为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-146a-5p的相对表达量,结果以空白组为参照进行归一化处理。

2.4 细胞中NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。收集“2.3”项下空白组、模型组、模型+艳山姜总黄酮组细胞,以RIPA裂解液裂解、提取细胞中的总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度后,于100℃下加热5 min变性;取变性蛋白适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜,以5%脱脂奶粉室温封闭1 h;加入GAPDH、NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 一抗(稀释比例分别为1:20 000、1:1 000、1:2 000、1:2 000),于4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:1 000),于室温下孵育1 h;用ECL试剂显影后,使用凝胶成像仪检测并使用Image-Pro Plus 6软件进行分析,以目的蛋白灰度值与内参蛋白(GAPDH)灰度值的比值作为目的蛋白的表达水平,结果以空白组为参照进行归一化处理。

2.5 细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂水平的检测

采用ELISA法进行检测。收集“2.3”项下空白组、模型组、模型+艳山姜总黄酮组细胞上清液,参照相应试剂盒说明书方法,使用酶标仪检测各组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂水平。

2.6 miR-146a-5p与TRAF6靶向关系的验证

2.6.1 双荧光素酶报告基因实验

本课题组前期采用Targetscan预测软件,设置物种为“human”,依据“context score”进行miR-146a-5p靶点筛选(评分越低则靶向的可能性越大),结果显示,miR-146a-5p能够与TRAF6的3'-UTR结合,提示两者存在靶向关系。为进一步确认两者关系,本研究采用双荧光素酶报告基因实验进行验证:将含有预测结合位点

TRAF6 WT或TRAF6 MUT的3'-UTR片段分别克隆于荧光素酶 pmirGLO 载体上,经DNA测序验证后,利用Lipofectamine 3000转染试剂分别将TRAF6 WT和miR-146a-5p mimic、TRAF6 WT和mimic NC、TRAF6 MUT和miR-146a-5p mimic、TRAF6 MUT和mimic NC共转染至正常GES-1细胞中(每组设3个复孔);24 h后取出,使用多功能酶标仪检测各组细胞的荧光素酶活性。

2.6.2 RNA结合蛋白免疫沉淀实验

将正常GES-1细胞接种于6孔板中并分为不加抗体的input组(作背景参考)、与正常兔IgG抗体共孵育的阴性对照组和与TRAF6抗体共孵育的anti-TRAF6组,每组设3个复孔。收集细胞,使用RNA结合蛋白免疫沉淀裂解缓冲液裂解;取裂解物100 μ L,与含磁珠的缓冲液混合后,与正常兔IgG抗体或TRAF6抗体(稀释比例均为1:200)一起孵育;蛋白经蛋白酶K缓冲液消化后,使用Trizol试剂盒分离上述抗体结合的RNA,采用qRT-PCR法测定miR-146a-5p的表达水平(具体操作和结果处理同“2.3”项)。若TRAF6抗体结合的miR-146a-5p的表达高于阴性对照,则说明miR-146a-5p与TRAF6有特异性结合。

2.6.3 Western blot实验

将正常GES-1细胞接种于6孔板中并分为mimic NC组、miR-146a-5p mimic组、inhibitor NC组和miR-146a-5p inhibitor组,每组设6个复孔。利用Lipofectamine 3000转染试剂分别转染mimic NC、miR-146a-5p mimic、inhibitor NC、miR-146a-5p inhibitor;24 h后,收集各组细胞,采用Western blot法检测TRAF6蛋白的表达水平(具体操作和结果处理同“2.4”项)。

2.7 过表达miR-146a-5p或敲减TRAF6对模型细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂影响的检测

为进一步确认miR-146a-5p能否通过TRAF6调控胃溃疡的发生,本研究借助过表达miR-146a-5p或敲减靶点TRAF6蛋白的方式,观察急性胃溃疡模型细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂的变化情况。取正常GES-1细胞,消化后接种于6孔板中,培养24 h;将细胞分为模型组、模型+mimic NC组、模型+miR-146a-5p mimic组(过表达miR-146a-5p实验),以及空白组、空白+NC siRNA组、空白+TRAF6 siRNA组和模型组、模型+NC siRNA组、模型+TRAF6 siRNA组(敲减TRAF6实验),每组设6个复孔。除模型组/空白组外,其余各组分别利用Lipofectamine 3000转染试剂转染mimic NC、miR-146a-5p mimic、NC siRNA、TRAF6 siRNA;24 h后,除空白组、空白+NC siRNA组、空白+TRAF6 siRNA组外的其余各组

细胞均加入无水乙醇70 μ L以建立急性胃溃疡细胞模型。培养12 h后,收集各组细胞,采用Western blot法检测各组细胞中TRAF6蛋白的表达水平(空白组、空白+NC siRNA组、空白+TRAF6 siRNA组,具体操作和结果处理同“2.4”项)以验证TRAF6的敲减情况。再采用ELISA法检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂水平(模型组、模型+mimic NC组、模型+miR-146a-5p mimic组和模型组、模型+NC siRNA组、模型+TRAF6 siRNA组,具体操作同“2.5”项)。

2.8 敲减miR-146a-5p对艳山姜总黄酮抗胃溃疡作用的影响

本研究进一步通过敲减miR-146a-5p的方式,观察转染miR-146a-5p inhibitor能否逆转艳山姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜细胞损伤的改善作用。取正常GES-1细胞,消化后接种于6孔板中,培养24 h;将细胞分为模型+艳山姜总黄酮组、模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC组、模型+艳山姜总黄酮+miR-146a-5p inhibitor组,每组设6个复孔。除模型+艳山姜总黄酮组外,其余各组分别利用Lipofectamine 3000转染试剂转染inhibitor NC和miR-146a-5p inhibitor;24 h后,各组细胞均用含艳山姜总黄酮(质量浓度按“2.2.2”项下结果设置)的RPMI-1640培养液200 μ L;培养12 h后,各组细胞均加入无水乙醇70 μ L以建立急性胃溃疡细胞模型。培养12 h后,收集各组细胞,采用Western blot法检测各组细胞中TRAF6蛋白的表达水平(具体操作和结果处理同“2.4”项),采用ELISA法检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、PGE₂水平(具体操作同“2.5”项)。

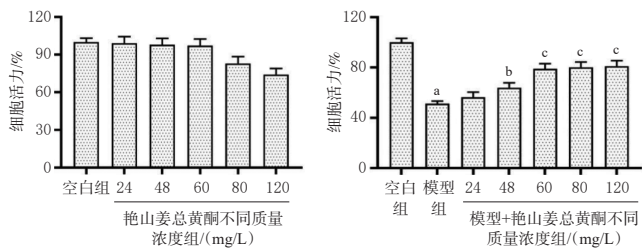
2.9 统计学方法

采用SPSS 21.0软件和GraphPad Prism 8软件对数据进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 艳山姜总黄酮对细胞活力的影响及作用浓度筛选结果

随着艳山姜总黄酮质量浓度的升高,各药物组细胞活力均较空白组逐渐降低,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见图1A。与空白组比较,模型组细胞活力显著降低($P<0.01$);与模型组比较,模型+艳山姜总黄酮48、60、80、120 mg/L组细胞活力均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图1B。因此,选取对细胞无明显毒性但能改善无水乙醇所致损伤的60 mg/L作为后续实验艳山姜总黄酮的作用浓度。

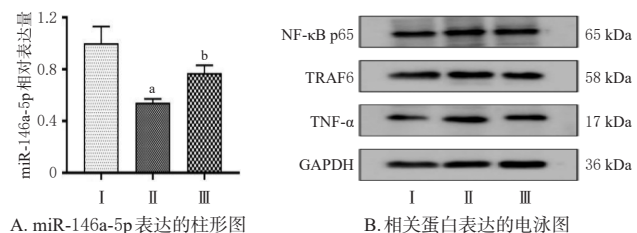


A. 艳山姜总黄酮对细胞活力的影响 B. 艳山姜总黄酮作用浓度的筛选
a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

图1 艳山姜总黄酮对细胞活力的影响及作用浓度筛选的结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

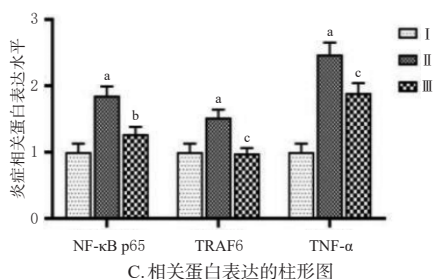
3.2 艳山姜总黄酮对模型细胞中 miR-146a-5p、炎症相关蛋白表达和上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响

与空白组比较,模型组细胞中 miR-146a-5p 的相对表达量和上清液中 PGE₂ 水平均显著降低($P < 0.01$),细胞中 NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 蛋白的表达水平和上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,模型+艳山姜总黄酮组细胞中 miR-146a-5p 的相对表达量和上清液中 PGE₂ 水平均显著升高($P < 0.01$),细胞中 NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 蛋白的表达水平和上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图2、表1。



A. miR-146a-5p 表达的柱形图

B. 相关蛋白表达的电泳图



C. 相关蛋白表达的柱形图

I: 空白组; II: 模型组; III: 模型+艳山姜总黄酮组; a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图2 艳山姜总黄酮对模型细胞中 miR-146a-5p 和 NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

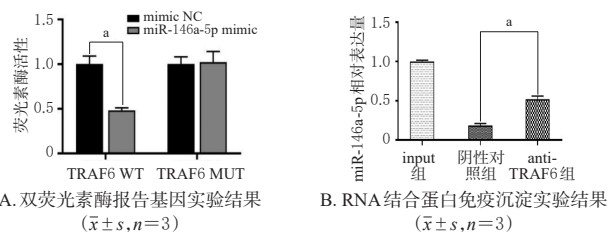
表1 艳山姜总黄酮对模型细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IL-1 β /(ng/mL)	IL-6/(ng/mL)	PGE ₂ /(ng/mL)
空白组	3.17 ± 0.12	5.95 ± 0.35	6.86 ± 0.38
模型组	18.32 ± 1.13 ^a	18.11 ± 1.22 ^a	3.14 ± 0.19 ^a
模型+艳山姜总黄酮组	8.25 ± 0.32 ^b	8.68 ± 0.92 ^b	4.53 ± 0.23 ^b

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

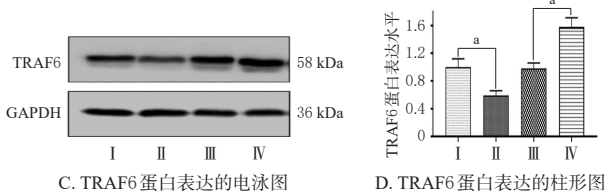
3.3 miR-146a-5p 与 TRAF6 靶向关系的验证结果

双荧光素酶报告基因实验结果(图3A)显示,转染 TRAF6 WT 后,共转染 miR-146a-5p mimic 细胞的荧光素酶活性显著低于共转染 mimic NC 细胞($P < 0.01$);而转染 TRAF6 MUT 后,共转染 miR-146a-5p mimic 细胞的荧光素酶活性与共转染 mimic NC 细胞比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。RNA 结合蛋白免疫沉淀实验结果(图3B)显示,与阴性对照比较,miR-146a-5p 在 TRAF6 抗体上的表达显著升高($P < 0.01$)。进一步的 Western blot 实验结果(图3C、3D)显示,与 mimic NC 组比较,转染 miR-146a-5p mimic 后,细胞中 TRAF6 蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$);与 inhibitor NC 组比较,转染 miR-146a-5p inhibitor 后,细胞中 TRAF6 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$)。



A. 双荧光素酶报告基因实验结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

B. RNA 结合蛋白免疫沉淀实验结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)



C. TRAF6 蛋白表达的电泳图

D. TRAF6 蛋白表达的柱形图($\bar{x} \pm s, n = 6$)

I: mimic NC 组; II: miR-146a-5p mimic 组; III: inhibitor NC 组; IV: miR-146a-5p inhibitor 组; a: 组间比较, $P < 0.01$ 。

图3 miR-146a-5p 与 TRAF6 靶向关系的验证结果

3.4 过表达 miR-146a-5p 或敲减 TRAF6 对模型细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响

3.4.1 过表达 miR-146a-5p 实验

与模型组或模型+mimic NC 组比较,模型+miR-146a-5p mimic 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低($P < 0.05$),PGE₂ 水平显著升高($P < 0.05$),结果见表2。

表2 过表达 miR-146a-5p 对模型细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

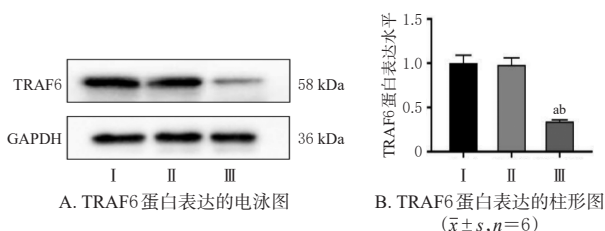
组别	IL-1 β /(ng/mL)	IL-6/(ng/mL)	PGE ₂ /(ng/mL)
模型组	3.20 ± 0.12	6.03 ± 0.38	5.92 ± 0.28
模型+mimic NC 组	3.02 ± 0.11	5.89 ± 0.32	5.74 ± 0.27
模型+miR-146a-5p mimic 组	2.17 ± 0.09 ^b	4.64 ± 0.18 ^b	6.93 ± 0.32 ^b

a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与模型+mimic NC 组比较, $P < 0.05$ 。

3.4.2 敲减 TRAF6 实验

转染 TRAF6 siRNA 后,细胞中 TRAF6 蛋白的表达水平显著低于空白组细胞和转染 NC siRNA 的细胞($P < 0.05$),表明敲减 TRAF6 蛋白的 GES-1 细胞构建成功(图4)。与模型组或模型+NC siRNA 组比较,模型+TRAF6

siRNA 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$), PGE₂ 水平显著升高 ($P < 0.05$), 说明 TRAF6 蛋白能够激活下游通路, 刺激无水乙醇诱导的 GES-1 细胞分泌炎症因子(表 3)。



I: 空白组; II: 空白+NC siRNA组; III: 空白+TRAF6 siRNA组;
a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与空白+NC siRNA组比较, $P < 0.05$ 。

图4 敲减 TRAF6 蛋白的 GES-1 细胞构建验证结果

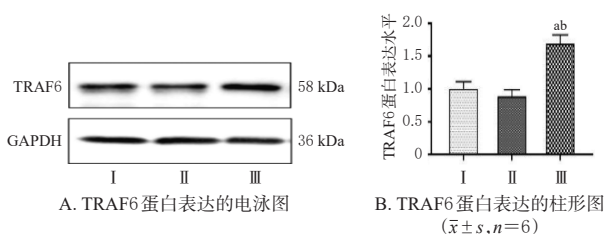
表3 敲减 TRAF6 对细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	IL-1 β /(ng/mL)	IL-6/(ng/mL)	PGE ₂ /(ng/mL)
模型组	3.17 ± 0.12	5.95 ± 0.35	5.86 ± 0.28
模型+NC siRNA组	3.14 ± 0.11	5.91 ± 0.34	5.80 ± 0.27
模型+TRAF6 siRNA组	2.05 ± 0.08 ^a	3.17 ± 0.17 ^a	6.84 ± 0.29 ^b

a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与模型+NC siRNA组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 敲减 miR-146a-5p 对模型细胞中 TRAF6 蛋白表达及上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响

与模型+艳山姜总黄酮组或模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC 组比较, 模型+艳山姜总黄酮+miR-146a-5p inhibitor 组细胞中 TRAF6 蛋白的表达水平和上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$), PGE₂ 水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 5、表 4。



I: 模型+艳山姜总黄酮组; II: 模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC 组; III: 模型+艳山姜总黄酮+miR-146a-5p inhibitor 组; a: 与模型+艳山姜总黄酮组比较, $P < 0.05$; b: 与模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图5 敲减 miR-146a-5p 对模型细胞中 TRAF6 蛋白表达的影响

表4 敲减 miR-146a-5p 对模型细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	IL-1 β /(ng/mL)	IL-6/(ng/mL)	PGE ₂ /(ng/mL)
模型+艳山姜总黄酮组	2.28 ± 0.09	5.01 ± 0.29	6.28 ± 0.34
模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC 组	2.31 ± 0.10	4.89 ± 0.27	5.89 ± 0.30
模型+艳山姜总黄酮+miR-146a-5p inhibitor 组	3.68 ± 0.28 ^a	6.24 ± 0.38 ^a	3.47 ± 0.19 ^b

a: 与模型+艳山姜总黄酮组比较, $P < 0.05$; b: 与模型+艳山姜总黄酮+inhibitor NC 组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

作为贵州特色苗药, 艳山姜常被用于治疗胃溃疡。现代研究表明, 黄酮类成分是艳山姜的主要成分, 包括芦丁、槲皮素和山柰酚等; 同时, 黄酮类成分也是艳山姜的药效成分, 具有降压、利尿和抗溃疡的活性^[10]。因此, 本研究以艳山姜总黄酮为干预成分, 以人 GES-1 细胞为对象, 评价艳山姜总黄酮对无水乙醇致急性胃溃疡模型细胞的改善作用。结果表明, 艳山姜总黄酮能通过抑制细胞中 NF- κ B p65、TRAF6、TNF- α 蛋白的表达和下游炎症因子 IL-1 β 、IL-6 的分泌, 从而发挥对胃黏膜细胞损伤的改善作用。

miRNA 由内源基因编码, 对多种生物学行为具有重要的调节作用, 可广泛参与多种基因表达和 RNA 沉默的调控^[11-12]。综合既往文献和现代研究进展, 本研究选择了与胃溃疡相关的 miR-146a-5p 进行研究, 结果表明, 在无水乙醇诱导的急性胃溃疡模型细胞中, miR-146a-5p 的相对表达量显著降低, 而模型+艳山姜总黄酮组细胞中 miR-146a-5p 的相对表达量显著升高。

为进一步探索 miR-146a-5p 对胃溃疡的调控作用, 本研究通过 qRT-PCR、Western blot、细胞转染等实验对 miR-146a-5p 的靶点和调控机制进行了探讨。双荧光素酶报告基因、RNA 结合蛋白免疫沉淀实验和针对 TRAF6 蛋白的 Western blot 实验结果均证实了 miR-146a-5p 与 TRAF6 蛋白之间存在靶向关系, 且 miR-146a-5p 能够负向调控 TRAF6 蛋白的表达。本研究经进一步过表达 miR-146a-5p 或敲减 TRAF6 后发现, 无水乙醇致急性胃溃疡模型细胞上清液中与炎症相关的 IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低, 而与胃溃疡相关的 PGE₂ 水平显著升高, 说明过表达 miR-146a-5p 或敲减 TRAF6 均能抑制下游炎症因子的释放, 从而发挥抗胃溃疡作用。

为进一步探索 TRAF6 对下游通路的影响, 本研究通过 Western blot 法对 TRAF6 下游的 NF- κ B p65 和 TNF- α 蛋白表达情况进行检测, 结果显示, 在无水乙醇诱导的急性胃溃疡模型细胞中, 艳山姜总黄酮能显著提高上述蛋白的表达。TRAF6、NF- κ B p65、TNF- α 均为 NF- κ B 信号通路上的关键蛋白, 而 NF- κ B 通路能够调控胃黏膜上皮细胞炎症反应的发生^[13-15]。研究指出, 在生长因子等活性物质的刺激下, 胃溃疡患者的胃黏膜上皮细胞通透性增加, 可使有毒物质和病原微生物穿过胃壁, 从而激活 TRAF6; TRAF6 可进一步激活下游核因子 κ B 抑制因子 B (inhibitory subunit of NF- κ B, I κ B), 使细胞质中原本与 I κ B 蛋白相结合的 NF- κ B 从复合体中释放出来, 并迁移到细胞核中; 细胞核中的 NF- κ B 可触发其他促炎细胞因子 (如 IL-1 β 和 TNF- α) 的转录和释放, 从而促进溃疡的发展^[16-18]。本研究结果还表明, 艳山姜总黄酮可上调无水乙醇致急性胃溃疡模型细胞中 miR-146a-5p 的表

达;敲减 miR-146a-5p 可逆转艳山姜总黄酮对急性胃溃疡模型细胞的改善作用,增加 IL-1 β 、IL-6 的分泌,提示艳山姜总黄酮可通过上调 miR-146a-5p 而抑制 TRAF6 的表达,进一步抑制下游炎症因子的分泌,从而发挥抗胃溃疡作用。

综上所述,艳山姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜细胞损伤有一定的改善作用,其机制可能与上调 miR-146a-5p 的表达、抑制 TRAF6 蛋白的表达,进而抑制相关炎症因子的分泌有关。本研究结果为艳山姜总黄酮促进 miR-146a-5p 表达、参与调控胃溃疡的研究提供了新的证据,对进一步挖掘胃溃疡的治疗方法具有重要意义。

参考文献

[1] 魏晴,李玮,柴桂芳. 苗族药艳山姜的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(11):206-216.
WEI Q, LI W, CHAI G F. Research progress on Miao medicine of *Alpinia zerumbet*[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulac, 2020, 26(11):206-216.

[2] 魏晴,梁珊珊,熊瑞,等. 艳山姜提取物对急性胃溃疡模型小鼠的保护作用研究[J]. 中国药房,2020,31(18):2190-2195.
WEI Q, LIANG S S, XIONG R, et al. Study on the protective effect of *Alpinia zerumbet* extract on acute gastric ulcer model mice[J]. China Pharm, 2020, 31(18):2190-2195.

[3] HSU S Y. Effects of the constituents of *Alpinia speciosa* rhizome on experimental ulcers[J]. Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi, 1987, 86(1):58-64.

[4] MPALANTINOS M A, DE MOURA R S, PARENTE J P, et al. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*[J]. Phytother Res, 1998, 12(6):442-444.

[5] CHAKRABORTY S, YADAV S K, SAHA B, et al. A bis-resorcinol resveratrol congener prevents indomethacin-induced gastric ulceration by inhibiting TNF- α as well as NF- κ B and JNK pathways[J]. Free Radic Res, 2019, 53(6):596-610.

[6] 余永豪. 胃癌中 miR-146a 和 LIN52 表达及其与化疗敏感性和预后的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(13):2274-2279.
YU Y H. Expressions of miR-146a and LIN52 in gastric cancer and their relationships with chemosensitivity and prognosis[J]. J Mod Oncol, 2020, 28(13):2274-2279.

[7] 尹斌. miR-146a 在应激性溃疡中调控作用的研究[D]. 太原:山西医科大学,2018.
YIN B. Study on the regulatory role of miR-146a in stress ulcer[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.

[8] YU X, LU J F, GAO M Q, et al. MiR-146a-5p promotes dental stem cells osteo/odontogenic differentiation

through NF-kappa B signaling pathway by targeting TRAF ϵ [J]. Chin J Dent Res, 2022, 25(4):269-275.

[9] LIN K W, WANG Y, GONG J W, et al. Protective effects of total flavonoids from *Alpinia officinarum* rhizoma against ethanol-induced gastric ulcer *in vivo* and *in vitro* [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1):854-862.

[10] ZHOU D, YANG Q, TIAN T, et al. Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 126:110075.

[11] HUA T, YANG M, SONG H H, et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF ϵ axis[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1):324.

[12] CHU T S, XU X, RUAN Z M, et al. MiR-146a contributes to atherosclerotic plaque stability by regulating the expression of TRAF ϵ and IRAK-1[J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(6):4205-4216.

[13] LI Y L, TAN S L, SHEN Y Y, et al. MiR-146a-5p negatively regulates the IL-1 β -stimulated inflammatory response via downregulation of the IRAK1/TRAF ϵ signaling pathway in human intestinal epithelial cells[J]. Exp Ther Med, 2022, 24(4):615.

[14] ASLANI M R, SHARGHI A, BOSKABADY M H, et al. Altered gene expression levels of IL-17/TRAF6/MAPK/USP25 axis and pro-inflammatory cytokine levels in lung tissue of obese ovalbumin-sensitized rats[J]. Life Sci, 2022, 296:120425.

[15] WEN L B, SUN W, XIA D Y, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes LPS-induced microglia inflammation through TRAF6/NF- κ B pathway[J]. Neuroreport, 2022, 33(6):243-251.

[16] AZIZ R S, SIDDIQUA A, SHAHZAD M, et al. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 110:554-560.

[17] BAE J Y, PARK W S, KIM H J, et al. Protective effect of carotenoid extract from orange-fleshed sweet potato on gastric ulcer in mice by inhibition of NO, IL-6 and PGE $_2$ production[J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(12):1320.

[18] FU S, CHEN J M, ZHANG C, et al. Gastroprotective effects of *Periplaneta americana* L. extract against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing apoptosis-related pathways[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:798421.

(收稿日期:2023-04-06 修回日期:2023-08-27)

(编辑:张元媛)