

· 基础研究 ·

胃复康颗粒对 *Hp* 相关性胃炎模型小鼠
ASC、IL-18、Caspase-1 表达的影响徐洪远¹ 王 伟² 苏传丽³ 谭志康⁴ 宾金秀⁵ 毛莉敏¹ 杨洁净¹ 梁 雪⁶

摘要 **目的** 探讨胃复康颗粒对幽门螺旋杆菌 (*Hp*) 相关性胃炎模型小鼠凋亡相关微粒蛋白 (ASC)、白介素-18 (IL-18)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 表达的影响。**方法** 80 只 BALB/c 小鼠按相同体重均值随机分为对照组、模型组、胃复康颗粒低剂量组、胃复康颗粒高剂量组, 每组 20 只。除对照组外, 采用 *Hp* 菌液灌胃方法制模。胃复康颗粒低、高剂量组分别按 0.6、3 g/d 灌胃给予胃复康颗粒, 对照组、模型组给予等量的生理盐水, 持续给药 8 周。观察小鼠的一般生物学特征; HE 染色观察小鼠胃黏膜组织病理学形态; qRT-PCR 法检测小鼠胃黏膜组织中 *Hp* 生长及代谢相关基因以及 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 表达; ELISA 法检测小鼠血清中细胞毒素相关基因 A (CagA)、细胞空泡毒素 A (VacA) 和炎症标志物水平; Western Blot 法检测胃黏膜组织中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体通路分子蛋白水平。**结果** 对照组小鼠胃黏膜组织结构清晰, 排列整齐, 细胞呈现单柱状, 固有层内腺体密集排列; 模型组小鼠胃黏膜病变严重, 组织呈现炎症细胞浸润、胃黏膜糜烂、胃黏膜坏死、脱落。与对照组比较, 模型组延胡索酸还原酶 A (FrdA)、延胡索酸还原酶 B (FrdB)、乙酰脲利用蛋白 A (HyaA)、三甲胺 N-氧化物还原酶 (TorA)、ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 相对表达, CagA、VacA、CXC 趋化因子配体 1 (CXCL1)、C-反应蛋白 (CRP)、脂多糖 (LPS)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 C3 水平, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)。胃复康颗粒干预后, 与模型组比较, 胃复康颗粒低剂量组黏膜病变情况有所缓解, 胃复康颗粒高剂量组黏膜病变情况得到明显缓解, 且胃复康颗粒高剂量组 *Hp* 根除率明显高于胃复康颗粒低剂量组 ($P<0.01$)。与模型组比较, 胃复康颗粒低、高剂量组中 FrdA、FrdB、HyaA、TorA、ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 相对表达、CagA、VacA、CXCL1、CRP、LPS、IL-6、TNF- α 和 C3 水平, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平降低 ($P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组上述所有指标进一步降低 ($P<0.01$)。**结论** 胃复康颗粒通过 NLRP3 炎性小体通路影响细菌生长代谢相关基因和 *Hp* 毒力因子, 以降低炎症因子和 ASC、IL-18、Caspase-1 表达。

关键词 胃复康颗粒; NLRP3 炎性小体通路; 凋亡相关微粒蛋白; 白介素-18; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1

Effect of Weifukang Granule on the Expression of ASC, IL-18, and Caspase-1 in *Hp*-Associated Gastritis Mice XU Hong-yuan¹, WANG Wei², SU Chuan-li³, TAN Zhi-kang⁴, BIN Jin-xiu⁵, MAO Li-min¹, YANG Jie-jing¹, and LIANG Xue⁶ 1 Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530001); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Guilin People's Hospital, Guangxi (541002); 3 Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001); 4 Department of Gastroenterology, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangxi (545001); 5 The Third Department of Internal Medicine, Hechi Yizhou District Hospital of Traditional Chinese

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (No. 2018GXNSFAA281084)

作者单位: 1 广西中医药大学研究生院 (南宁 530001); 2 桂林市人民医院中医科 (广西 541002); 3 广西中医药大学第一附属医院病理科 (南宁 530001); 4 柳州市中医院消化内科 (广西 545001); 5 河池市宜州区中医医院内三科 (广西 546399); 6 广西中医药大学第一附属医院脾胃二区 (南宁 530001)

通讯作者: 梁 雪, Tel: 0771-5667460, E-mail: lx.514@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221210.221

Medicine, Guangxi (546399); 6 The Second District of Spleen and Stomach, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530001)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Weifukang Granule (WFKG) on the expression of apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), interleukin-18 (IL-18) and Caspase-1 in *Helicobacter pylori* (Hp)-associated gastritis mice. **Methods** Totally 80 BALB/c mice were randomly divided into the control group, model group, low-dose WFKG group and high-dose WFKG group according to the same body weight, with 20 mice in each group. Except the control group, Hp bacteria liquid was used to make the model by oral gavage. Mice in low-dose group and high-dose WFKG group were respectively administered with WFKG at 0.6 and 3 g · d⁻¹ by gastrogavage. Meanwhile, mice in control and model groups were administered with equal volume normal saline for 8 successive weeks. The general biological characteristics of mice were observed. The histopathological morphology of gastric mucosal in mice was examined by HE staining. The expression of genes related to growth and metabolism of Hp, and the expression of ASC, IL-18 and Caspase-1 mRNA in gastric mucosa of mice were detected by qRT-PCR. The serum levels of cytotoxin-associated gene A (CagA), vacuolar toxin A (VacA) and inflammatory markers were determined by ELISA. The protein expression levels associated with nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome pathway in gastric mucosa were measured by Western Blot. **Results** The structure of gastric mucosa in the control group was intact and orderly, the cells are single columnar and the lamina propria is densely packed with glands. The mice in the model group had severe gastric mucosa lesions with inflammatory cell infiltration, and the gastric mucosal erosion, necrosis and even abscission. Compared with the control group, the relative mRNA expression levels of fumarate reductase A (FrdA), fumarate reductase B (FrdB), acetylurea utilization protein A (HyaA), trimethylamine N-oxide reductase (TorA), ASC, IL-18, and Caspase-1, the levels of CagA, VacA, CXCL1, CRP, LPS, IL-6, TNF- α , and C3, the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and interleukin-1 β (IL-1 β) were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). After the treatment of WFKG, compared with the model group, the mucosal lesions in low-dose WFKG group were alleviated, while the mucosal lesions in high-dose WFKG group were significantly alleviated, and the Hp eradication rate of high-dose WFKG group was significantly higher than that in low-dose WFKG group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the relative expression of FrdA, FrdB, HyaA, TorA, ASC, IL-18, and Caspase-1 mRNA, the levels of CagA, VacA, CXCL1, CRP, LPS, IL-6, TNF- α , and C3, the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β in low-dose and high-dose WFKG groups were significantly decreased ($P < 0.01$). In addition, compared with low-dose WFKG group, all the above indexes in high-dose WFKG group were further reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** WFKG affects genes related to growth and metabolism of bacterial and Hp virulence factors through NLRP3 inflammasome vesicle pathway to reduce the level of inflammatory factors and the expression of ASC, IL-18, and Caspase-1.

KEYWORDS Weifukang Granule; NLRP3 inflammasome pathway; ASC; IL-18; Caspase-1

慢性胃炎是由多种病因引起的胃黏膜慢性炎症或萎缩性病变, 病程较长, 容易反复, 是消化系统常见的疾病^[1]。幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 与消化性溃疡、慢性胃炎、胃淋巴瘤和胃癌等消化系统疾病关系密切^[2]。80% 以上的慢性胃炎患者都存在着 Hp 感染^[3], Hp 感染引起的慢性胃炎称为 Hp 相关性慢性胃炎^[3-5]。根除 Hp 可以消除胃炎活动, 抑制胃黏膜萎缩, 减轻炎性反应, 同时可以防止慢性胃炎癌变的可能, 提高患者生活质量^[5]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3,

NLRP3) 炎性小体是由 NLR 家族蛋白、凋亡相关微粒蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 三个部分组成, NLRP3 是一个蛋白复合体的支架, 而 ASC 为 NLRP3 和 Caspase-1 之间的连接体, 参与 Caspase-1 的活化^[6]。NLRP3 是参与免疫应答的一个庞大的炎症蛋白家族, 与细胞的凋亡、炎症和肿瘤的发展关系密切^[7]。NLRP3 的激活会将无活性的 procaspase-1 转化为有活性的 Caspase-1, 活性 Caspase-1 分子再将白介素 -1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素 -18

(interleukin-18, IL-18) 前体转化为有活性的 IL-1 β 和 IL-18 分子, 导致机体发生严重的炎症反应^[8]。细胞毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA)、细胞空泡毒素 A (vacuolar toxin A, VacA) 蛋白为 *Hp* 中的两种毒力因子, 可抑制胃黏膜上皮细胞的自噬并促进胃癌前病变的恶化^[9]。CXC 趋化因子配体 1 (CXC chemokine ligand 1, CXCL1)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和 C3 为常见炎症标志物, 其水平反应着机体炎症的进展。已有研究表明, 胃复康颗粒具有良好的杀灭 *Hp* 作用, 并能有效的改善湿热证^[10]。本研究拟通过观察胃复康颗粒对 *Hp* 相关性胃炎小鼠模型的治疗效果, 通过检测模型小鼠中 *Hp* 毒力因子水平、炎症标志物水平、NLRP3 炎性小体通路分子蛋白及基因表达水平, 探求 NLRP3 炎性小体通路与治疗作用的关系以及对 ASC、IL-18、Caspase-1 表达的影响, 以期慢性胃炎的临床治疗提供新方向。

材料与方法

1 动物 BALB/c 小鼠 80 只, 雌性各半, SPF 级, 8 周龄, 体重 17~25 g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 采用架式笼养喂养, 饲养温度 (32 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (75 $\pm$ 2)%, 质量合格证号: 0017145, 动物许可证号: SCXK (苏) 2011-0003, 本研究经广西中医药大学伦理审批 (No. DW20190511-087)。

2 药物 胃复康颗粒组成: 蒲公英 15 g 紫花地丁 15 g 川黄连 10 g 枳壳 10 g 川厚朴 10 g 白及 15 g 柴胡 6 g 海螵蛸 20 g 浙贝母 12 g 淮山药 10 g 陈皮 10 g 法半夏 10 g 茯苓 10 g 郁金 10 g 白芍 10 g 甘草 10 g。原料药采用广西中医药大学第一附属医院中药免煎颗粒, 实验使用时将中药颗粒混合搅匀, 灭菌包装成袋。

3 主要试剂及仪器 NLRP3 抗体 (批号: SC-10028, 稀释比 1: 1 000), 武汉谷歌生物科技有限公司; Caspase-1 抗体 (批号: ab32517, 稀释比 1: 1 000), 美国 Sigma 公司; 大鼠 IL-1 β (批号: RA20030), Bioswamp 公司; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗 (批号 110509, 稀释比 1: 500), 上海碧云天生物公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 8907) 上海远慕生物公司; Real-Time System 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad); 电泳仪 (美国 Thermo 公司); 高速离心机 (美

国 Sigma 公司); BX60 型光学显微镜) 日本奥林巴斯公司。

4 动物分组及造模方法 BALB/c 小鼠 80 只, 适应性喂养 1 周, 按按相同体重均值分为对照组、模型组、胃复康颗粒低剂量组和胃复康颗粒高剂量组, 每组 20 只。除对照组外, 模型组、胃复康颗粒低剂量组、胃复康颗粒高剂量组参考文献^[11]进行建模处理, 将 SS1 菌株复活后, 接种于含有 10% 脱纤维羊血的布氏琼脂培养基中培养, 放置在厌氧罐中, 条件为 37 $^{\circ}$ C, 10% N₂、5% O₂、85% CO₂ 的环境中, 培养 72 h 后, 采用布氏肉汤洗下 *Hp* 菌液, 备实验使用。各组小鼠采用 5% 碳酸氢钠溶液灌胃, 每只 0.2 mL, 30 min 后采用同体积的 *Hp* 菌液灌胃, 每 48 h 灌胃 1 次, 连续 3 次。对照组采用等量的生理盐水灌胃, 造模时长共计 1 个月。末次灌胃 4 周后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取胃黏膜组织, 一部分采用 4% 的多聚甲醛固定, 进行伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 一部分进行快速尿素酶实验, 判定 *Hp* 定植情况, 两者为阳性造模成功^[11], 因造模剂剂量相对较高, 且小鼠间存在个体差异, 造模期间有 5 只小鼠死亡, 且均在第 3 次灌胃后死亡。造模成功率约为 90%。10 只小鼠行 HE 染色, 另外 10 只小鼠进行快速尿素酶实验。当 HE 染色和快速尿素酶实验均为阴性判定 *Hp* 根除, 计算根除率。

5 给药方法 按人平均体重为 60 kg, 胃复康颗粒总剂量为 203 g/d, 人每天药量为 3.4 g/kg, 小鼠相对人的系数为 9.01, 故每只小鼠 (按每只 20 g 计算) 用药量为 0.6 g/d (低剂量)^[12]; 按每只灌药量 0.4 mL 标准执行, 故小鼠 (高剂量) 灌药浓度为 3 g/d。造模成功后第 2 天, 对照组外, 模型组分别灌等量的生理盐水, 每次 0.4 mL, 每天 1 次, 共 8 周。胃复康颗粒低剂量组给予小鼠胃复康颗粒灌胃, 配药浓度为 1.5 g/mL, 每次 0.4 mL (含药量 0.6 g), 每天 1 次, 共 8 周。胃复康颗粒高剂量给予小鼠胃复康颗粒灌胃, 配药浓度为 3 g/mL, 每次 0.4 mL (含药量 1.5 g), 每天 1 次, 共 8 周。

6 检测指标及方法

6.1 小鼠的一般生物学特征观察 观察小鼠的活动状态、精神状态以及毛发情况, 是否正常饮食, 粪便是否正常。

6.2 *Hp* 定植情况 取感染小鼠胃组织的 5 μ m 石蜡切片, 采用瑞-姬氏法染色法处理, 400 倍显微镜下观察总样本, 确定是否 *Hp* 感染, 感染多少, 分级为 0, 未发现 *Hp* 感染; 分级为轻度 (+), 标本全长 <1/3,

见少数 *Hp* 感染; 分级为中度 (++) , 超过标本全长 1/3 到 2/3 , 可见 *Hp* 感染; 分级为重度 (+++) , 标本的全长基本分布, *Hp* 成堆存在。样本量为 10。

6.3 HE 染色 取各组小鼠的胃黏膜组织, 置 4 % 的多聚甲醛固定, 酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片 4 μm 后进行 HE 染色, 显微镜下观察小鼠胃黏膜组织的病理学变化。样本量为 10。

6.4 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 检测小鼠胃黏膜组织中 *Hp* 生长及代谢相关基因以及 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 的表达 提取 RNA, 取各组小鼠的胃黏膜组织放在液氮中研磨成粉状, 加入 Trizol 裂解液进行裂解, 转移到离心管, 加入氯仿, 常温静止, 混匀, 离心处理, 离心半径为 11 cm, 12 000 r/min 离心 20 min, 添加 75% 的乙醇洗涤、干燥, 在采用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度, 按照 qRT-PCR 试剂盒检测延胡索酸还原酶 A (fumarate reductase A, FrdA)、延胡索酸还原酶 B (fumarate reductase B, FrdB)、乙酰脲利用蛋白 A (acetylurea utilization protein A, HyuA)、三甲胺 N-氧化物还原酶 (trimethylamine N-oxide reductase, TorA)、ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 的水平, 具体引物序列见表 1, 反应体系为 20 μL , 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环, 用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算组织中 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 水平。样本量为 6。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5' -3')	产物大小 (bp)
ASC	上游引物: GACAGTGCAACTGCGAGAAG	106
	下游引物: CGACTCCAGATAGTAGCTGACAA	
IL-18	上游引物: GACTCTTGCCTCAACTTCAAGG	169
	下游引物: CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA	
Caspase-1	上游引物: ACAAGGCACGGGACCTATG	237
	下游引物: TCCAGTCAGTCCTGGAAATG	
FrdA	上游引物: CCACGCCCATTGTAACCTC	130
	下游引物: TCTTTCATACGCTGTCTCGTCT	
FrdB	上游引物: GATCAATAGATCTACGATCATTTACATT	109
	下游引物: CTAGGAGACCAGCAAGTAAATGTAA	
HyuA	上游引物: TGGTCTAAAGATCACCAGTAGCC	152
	下游引物: CCATTCTCTTAGGGCCAGGGATTTCATCG	
TorA	上游引物: GAGCCCATCAGCCTGAGTC	197
	下游引物: AAACCAGACACGGCGTTTAGG	
β -actin	上游引物: GGCTGTATTCCCTCCATCG	154
	下游引物: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

6.5 ELISA 检测小鼠血清中毒力因子 CagA 与 VacA 和炎症标志物 给药 2 周后摘眼球取血, 进行血清分离, 采用 ELISA 试剂盒检测 CagA、VacA、CXCL1、CRP、LPS、IL-6、TNF- α 和 C3 水平, 严格按照试剂盒的使用说明进行严格操作。样本量为 6。

6.6 Western Blot 检测胃黏膜组织中 NLRP3 炎性小体通路分子蛋白 取各组小鼠的胃黏膜组织, 剪成小块称重, 加入 100 μL RIPA 裂解液匀浆至无块状, 然后进行离心处理, 在采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 电泳, 转膜, 室温封闭 1 h 后, TBST 洗膜, 分别加入 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β , 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入 HRP 标记的二抗, 室温下孵育 1 h, 最后采用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂, β -actin 作内参, 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达。样本量为 6。

7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布的采用独立的 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD-*T* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠的一般生物学特征 对照组的小鼠活动正常、反应灵敏, 毛发紧密光泽, 饮水和饮食正常, 粪便正常, 未出现死亡; 模型组小鼠活动较慢, 反应迟钝, 毛发色泽枯槁, 稀疏并容易脱落, 精神萎靡, 饮水和饮食明显减少, 体温下降, 便溏; 胃复康颗粒低、高剂量组上述症状逐渐好转, 尤其是胃复康颗粒高剂量组的小鼠上述症状改善最为明显。

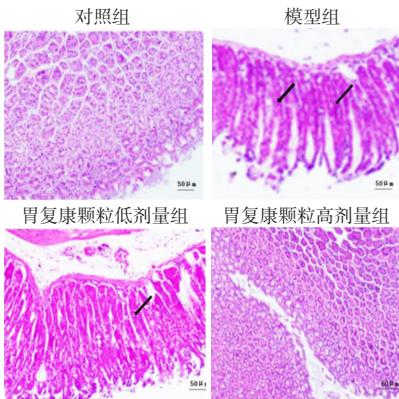
2 *Hp* 定植和造模成功模情况 对照组 *Hp* 定植为 0, 模型组 *Hp* 定植 (3.00 ± 0.00), 胃复康颗粒低剂量组 *Hp* 定植 (2.68 ± 0.05), 胃复康颗粒高剂量组 *Hp* 定植 (1.19 ± 0.21)。建模期间 5 只小鼠死亡, 其余小鼠进行快速尿素酶实验, 验证为阳性, 判定造模成功。

3 各组小鼠 *Hp* 根除率比较 (表 2) 胃复康颗粒低剂量组的快速尿素酶试验检测 6 只为阴性, 病理染色 5 只为阴性, 综合后 *Hp* 根除率为 50%; 胃复康颗粒高剂量组快速尿素酶试验检测 9 只为阴性, 病理染色 8 只为阴性, 综合后 *Hp* 根除率为 80%。胃复康颗粒高剂量组 *Hp* 根除率明显高于胃复康颗粒低剂量组 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠 Hp 根除率

组别	n	快速尿素酶试验 阴性数	病理染色 阴性数	HP 根除率 (%)
对照	10	0/10	0/10	0
模型	10	0/10	0/10	0
胃复康颗粒低剂量	10	6/10	5/10	50
胃复康颗粒高剂量	10	9/10	8/10	80

4 各组小鼠胃黏膜组织病理学情况 (图 1) 对照组小鼠胃黏膜组织结构清晰, 排列整齐, 细胞呈现单柱状, 固有层内腺体密集排列; 模型组小鼠胃黏膜病变严重, 组织呈现炎症细胞浸润、胃黏膜糜烂、胃黏液坏死、脱落; 胃复康颗粒低剂量组较模型组比较有些缓解, 胃复康颗粒高剂量组明显缓解了上述症状。



注: 黑色箭头表示明显病变处

图 1 各组小鼠胃黏膜组织病理学比较 (HE, ×200)

5 各组 Hp 生长及代谢相关基因表达比较 (表 3) 与对照组比较, 模型组中的 FrdA、FrdB、HyuA 和 TorA mRNA 相对表达明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 胃复康颗粒低、高剂量组 FrdA、FrdB、HyuA

和 TorA mRNA 相对表达降低 ($P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组 FrdA、FrdB、HyuA 和 TorA mRNA 相对表达降低 ($P<0.01$)。

6 各组小鼠血清中 Hp 毒力因子 CagA 和 VacA 表达比较 (表 4) 与对照组比较, 模型组中的 CagA 和 VacA 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 胃复康颗粒低、高剂量组中的 CagA 和 VacA 水平降低 ($P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组中的 CagA 和 VacA 水平降低 ($P<0.01$)。

表 4 各组小鼠 Hp 毒力因子 CagA 和 VacA 表达水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CagA	VacA
对照	6	5.00 ± 0.03	5.00 ± 0.02
模型	6	15.03 ± 0.08*	14.20 ± 0.08*
胃复康颗粒低剂量	6	12.69 ± 0.06 [△]	9.42 ± 0.06 [△]
胃复康颗粒高剂量	6	7.56 ± 0.04 ^{△▲}	7.43 ± 0.05 ^{△▲}

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与胃复康颗粒低剂量组比较, [▲] $P<0.01$

7 各组 CXCL1、CRP、LPS、1L-6、TNF- α 和 C3 表达比较 (表 5) 模型组 CXCL1、CRP、LPS、1L-6、TNF- α 和 C3 水平明显高于对照组 (均 $P<0.01$); 与模型组比较, 胃复康颗粒低、高剂量组 CXCL1、CRP、LPS、1L-6、TNF- α 和 C3 水平降低 (均 $P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组中的 CXCL1、CRP、LPS、1L-6、TNF- α 和 C3 水平降低 ($P<0.01$)。

8 各组小鼠胃黏膜组织中 NLRP3 炎性小体通路分子蛋白表达比较 (图 2, 表 6) 与对照组比较, 模型组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 胃复康颗粒低、高剂量

表 3 各组 Hp 生长及代谢相关基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FrdA mRNA 相对表达量	FrdB mRNA 相对表达量	HyuA mRNA 相对表达量	TorA mRNA 相对表达量
对照	6	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06
模型	6	1.89 ± 0.07*	2.74 ± 0.07*	2.51 ± 0.14*	2.22 ± 0.10*
胃复康颗粒低剂量	6	1.66 ± 0.06 [△]	2.88 ± 0.08 [△]	1.82 ± 0.05 [△]	1.70 ± 0.08 [△]
胃复康颗粒高剂量	6	1.23 ± 0.04 ^{△▲}	1.39 ± 0.06 ^{△▲}	1.32 ± 0.04 ^{△▲}	1.21 ± 0.03 ^{△▲}

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与胃复康颗粒低剂量组比较, [▲] $P<0.01$

表 5 各组 CXCL1、CRP、LPS、1L-6、TNF- α 和 C3 表达比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CXCL1	CRP	LPS	1L-6	TNF- α	C3
对照	6	134.46 ± 8.35	174.83 ± 6.75	500.46 ± 9.26	50.47 ± 7.86	146.26 ± 10.75	132.26 ± 5.85
模型	6	243.25 ± 10.65*	438.74 ± 12.93*	1 000.35 ± 14.74*	145.24 ± 14.35*	242.23 ± 15.75*	210.84 ± 13.34*
胃复康颗粒低剂量	6	196.28 ± 12.85	308.34 ± 8.84 [△]	786.24 ± 10.65 [△]	112.24 ± 12.96 [△]	197.23 ± 21.65 [△]	184.26 ± 16.44 [△]
胃复康颗粒高剂量	6	145.35 ± 9.75 ^{△▲}	200.54 ± 6.86 ^{△▲}	587.65 ± 14.23 ^{△▲}	78.54 ± 10.75 ^{△▲}	154.86 ± 20.32 ^{△▲}	150.59 ± 12.65 ^{△▲}

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与胃复康颗粒低剂量组比较, [▲] $P<0.01$

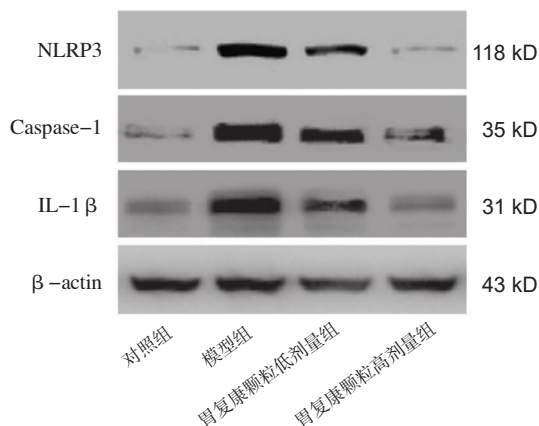


图2 各组小鼠胃黏膜组织中 NLRP3 炎性小体通路分子蛋白印迹表达

组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白降低 ($P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白降低 ($P<0.01$)。

9 各组小鼠胃黏膜组织中 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 表达比较 (表 7) 与对照组比较, 模型组 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 胃复康颗粒低剂量组、高剂量组中 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 降低 ($P<0.01$); 与胃复康颗粒低剂量组比较, 胃复康颗粒高剂量组中 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 降低 ($P<0.01$)。

讨 论

慢性胃炎是临床上常见的胃肠功能疾病, 目前全球超过 50% 的慢性胃炎患者都是由 *Hp* 感染造成的^[13-15]。*Hp* 在毒力因子的帮助下, 损害胃黏膜和腺体, 最终导致腺体萎缩、炎症反应, 引起基因突变或者癌变^[16]。胃复康颗粒是由名老中医周德丽教授的五味清胆方加减易汤剂为颗粒剂所得, 由蒲公英、紫

花地丁、太子参、黄连、白花蛇舌草、枳实等组分组成, 能够使肝胆疏清、脾胃得健运、胃气和平、缓解疼痛, 胃病得以康复^[17]。胃复康颗粒的加减方可治疗多种消化系统疾病。本研究建立 *Hp* 相关性胃炎小鼠模型, 以探讨胃复康颗粒通过 NLRP3 炎性小体对小鼠胃肠黏膜组织中 ASC、IL-18、Caspase-1 表达的影响。本研究中对对照组小鼠活动正常、反应灵敏, 毛发紧密光泽, 饮水和饮食正常, 粪便正常, 未出现死亡, 而模型组的小鼠活动较慢, 反应迟钝, 毛发色泽枯槁, 稀疏并容易脱落, 精神萎靡, 饮水和饮食明显减少, 体温下降, 便溏; 胃复康颗粒低剂量组和高剂量组干预治疗后, 上述症状逐渐好转, 炎症细胞浸润减轻, 胃黏膜细胞排列整齐, 尤其是高剂量组的小鼠改善最为明显, 且低剂量组的 *Hp* 根除率为 50%, 高剂量组的 *Hp* 根除率为 80%。

NLRP3 炎性小体由 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 三部分组成, 是一种可以调节炎症反应的胞内受体^[18, 19]。NLRP3 通过生成有生物活性的 Caspase-1 促进 IL-1 β 和 IL-18 成熟与分泌, 从而参与机体固有的免疫应答的调节^[20]。本研究结果显示胃复康颗粒低、高剂量组中 *Hp* 生长及代谢相关基因 *FrdA*、*FrdB*、*HyaA* 和 *TorA* 以及 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 显著降低, 且胃复康颗粒高剂量组中的 *Hp* 生长及代谢上述相关基因降低最为显著。此外, 与模型组相比, 胃复康颗粒低剂量组、高剂量组中的 *CagA*、*VacA* 以及 *CXCL1*、*CRP*、*LPS*、*IL-6*、*TNF- α* 和 *C3* 水平显著降低, 且高剂量组中上述指标降低最为明显。Western Blot 检测胃黏膜组织中 NLRP3 炎性小体通路分子蛋白的结果显示, 与模型组比较, 胃复康颗粒低剂量组、高剂量组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白显著降低, 且高

表6 各组小鼠胃黏膜组织中 NLRP3 炎性小体通路分子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 蛋白相对表达量	Caspase-1 蛋白相对表达量	IL-1 β mRNA 相对表达量
对照	6	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.08
模型	6	8.57 $\pm$ 1.23*	13.64 $\pm$ 2.31*	11.24 $\pm$ 1.91*
胃复康颗粒低剂量	6	5.24 $\pm$ 0.76 $^{\Delta}$	7.35 $\pm$ 1.62 $^{\Delta}$	4.55 $\pm$ 0.72 $^{\Delta}$
胃复康颗粒高剂量	6	1.24 $\pm$ 0.12 $^{\Delta\Delta}$	3.64 $\pm$ 0.74 $^{\Delta\Delta}$	1.56 $\pm$ 0.21 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与胃复康颗粒低剂量组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

表7 各组小鼠胃黏膜组织中 ASC、IL-18、Caspase-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ASC mRNA 相对表达量	IL-18 mRNA 相对表达量	Caspase-1 mRNA 相对表达量
对照	6	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.05
模型	6	2.96 $\pm$ 0.09*	4.00 $\pm$ 0.12*	3.72 $\pm$ 0.11*
胃复康颗粒低剂量	6	1.78 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$	2.32 $\pm$ 0.09 $^{\Delta}$	2.14 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$
胃复康颗粒高剂量	6	1.12 $\pm$ 0.06 $^{\Delta\Delta}$	1.23 $\pm$ 0.05 $^{\Delta\Delta}$	1.74 $\pm$ 0.13 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与胃复康颗粒低剂量组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

剂量组中的 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白降低最为明显,提示高剂量的胃复康颗粒能够较好降低 *Hp* 毒力因子水平和炎症标志物水平,对 *Hp*VG 胃炎小鼠的治疗起到重要作用。相关研究结果表明,胃复康颗粒可能是通过下调血清 CagA、Hp-NAP、VacA 浓度,从而以降低 *Hp* 的毒力效应,减轻炎症反应^[21],与本研究类似。

综上所述,胃复康颗粒通过 NLRP3 炎性小体通路影响细菌生长代谢相关基因和 *Hp* 毒力因子,以降低炎症因子和 ASC、IL-18、Caspase-1 表达,为临床中 *Hp* 相关性胃炎治疗提供了一定的实验基础。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Assa A, Borrelli O, Broekaert I, et al. Helicobacter pylori-negative chronic gastritis in children: a systematic review[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2022, 74 (5): 956-967.
- [2] Farsimadan M, Heravi FS, Emamvirdizadeh A, et al. Evaluation of helicobacter pylori genotypes in obese patients with gastric ulcer, duodenal ulcer, and gastric cancer: an observational study[J]. Dig Dis, 2022, 40 (3): 355-361.
- [3] Munari F, Fassan M, Capitani N, et al. Cytokine BAFF released by helicobacter pylori-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis[J]. J Immunol, 2014, 193 (11): 5584-5594.
- [4] Cheek YY, Lee CQ, Cheong HC, et al. An overview of helicobacter pylori survival tactics in the hostile human stomach environment[J]. Microorganisms, 2021, 9 (12): 2502.
- [5] 汪楠,王垂杰,李玉峰. 中药联合“四联疗法”治疗 *Hp* 阳性慢性胃炎疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37 (4): 406-409.
- [6] Li L, Mu Z, Liu P, et al. Mdivi-1 alleviates atopic dermatitis through the inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. Exp Dermatol, 2021, 30 (12): 1734-1744.
- [7] Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118 (2): 372-385.
- [8] Billingham LK, Stoolman JS, Vasan K, et al. Mitochondrial electron transport chain is necessary for NLRP3 inflammasome activation[J]. Nat Immunol, 2022, 3 (5): 692-704.
- [9] 张家祥,王文霸,闫曙光,等. CagA 和 VacA 抑制胃黏膜上皮细胞的自噬并促进胃癌前病变的恶化[J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47 (7): 942-951.
- [10] 梁雪,黄祖美,王鹏,等. 胃复康颗粒对 *Hp* VG 湿热证患者胃黏膜 p38MAPK 及 ATF2 蛋白表达的影响[J]. 西部中医药, 2019, 32 (5): 4-8.
- [11] 连大卫,扶丽君,许艺飞,等. 幽门螺杆菌感染小鼠慢性胃炎模型的建立及评价[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27 (7): 6-12.
- [12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069-1072.
- [13] 马志红,牛丽颖,崔利剑,等. 胃舒胶囊治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21 (3): 41.
- [14] 黄勇,张晓青,金忠芹,等. 慢性胃炎组织病理特征和 *Hp* 感染与炎症程度的关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17 (14): 2707-2710.
- [15] 陈薛霖,侯运萌,周芳,等. 慢性胃炎患者幽门螺杆菌感染的影响因素及对胃蛋白酶原和胃内菌群的影响[J]. 中国卫生工程学, 2022, 21 (5): 857-859.
- [16] 徐秀梅,胡珂,周城林. 胡珂自拟胃复康方加减治疗慢性萎缩性胃炎 50 例[J]. 江西中医药, 2015, 7 (7): 47-49.
- [17] Chen XZ, Schöttker B, Castro FA, et al. Association of helicobacter pylori infection and chronic atrophic gastritis with risk of colonic, pancreatic and gastric cancer: a ten-year follow-up of the ESTHER cohort study[J]. Oncotarget, 2016, 7 (13): 17182-17193.
- [18] 肖玲巧,张艳,王超,等. 幽门螺杆菌 Tip α 蛋白激活 NLRP3 炎性小体诱导 THP-1 细胞分泌[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33 (12): 1071-1076.
- [19] 张鹏飞,于春泽,于建云,等. NLRP3 炎性小体在中枢神经系统疾病中的作用研究进展[J]. 中国临床解剖学杂志, 2022, 40 (1): 113-116.
- [20] 陈梦娜,李善高. *Hp* 感染根除治疗前后慢性胃炎胃黏膜组织中 miR-22 和 NLRP3 炎症小体表达水平变化[J]. 浙江临床医学, 2020, 22 (5): 624-627.
- [21] 梁雪,宾金秀,黄祖美,等. 胃复康颗粒对 *Hp* 相关性疣状胃炎湿热证患者 CagA、Hp-NAP、VacA 的影响[J]. 广西中医药, 2017, 6 (40): 21-23.

(收稿: 2021-10-11 在线: 2023-01-09)

责任编辑: 白 霞