

基于网络药理学和动物实验探讨香砂六君子汤对慢性萎缩性胃炎的影响

袁晓梅^{1,2}, 安耀荣^{1,2*}, 成映霞^{3*}, 段永强^{3,4}, 张廷英^{1,5}, 白敏^{1,5}, 刘梦雅^{1,5},
彭月^{1,6}, 刘自由^{1,6}

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 3. 宁夏医科大学中医院, 宁夏 银川 750004; 4. 宁夏医科大学附属中医院, 宁夏 吴忠 751100; 5. 甘肃省实验动物行业技术中心, 甘肃 兰州 730000; 6. 甘肃中医药大学甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 基于网络药理学预测香砂六君子汤干预慢性萎缩性胃炎的作用机制并进行实验验证。方法 通过TCMSP数据库收集香砂六君子汤活性成分及其对应靶点, 在GeneCards和OMIM数据库中检索慢性萎缩性胃炎相关靶点, 将药物与疾病靶点取交集, 并利用Cytoscape软件构建“成分-靶点-疾病”网络。采用拓扑分析筛选核心靶点, 通过String构建靶点蛋白互作PPI网络图, 运用Metascape网站进行GO功能和KEGG通路富集分析。建立慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 观察香砂六君子汤干预作用, 采用分子生物学技术对KEGG富集到的关键通路相关蛋白进行检测以证实香砂六君子汤有效干预慢性萎缩性胃炎的具体机制。**结果** 共筛选得到香砂六君子汤活性成分163个, 与慢性萎缩性胃炎的交集靶点共98个; KEGG富集结果显示, IL-17通路可能是香砂六君子汤改善慢性萎缩性胃炎的关键分子途径之一。与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜萎缩且腺体排列稀疏紊乱, 黏膜及黏膜下层炎性细胞浸润, 胃黏膜病理评分升高($P<0.05$); CD11b和F4/80阳性细胞浸润增多; 胃黏膜组织MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5水平升高($P<0.05$); IL-17A、IL-17RA、HuR蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较, 香砂六君子汤各剂量组均可改善胃黏膜组织病变情况, 胃黏膜组织CD11b、F4/80、MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5水平和IL-17A、IL-17RA、HuR蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 香砂六君子汤能够下调IL-17A/IL-17RA/HuR通路关键蛋白表达, 抑制胃组织炎症反应的发生, 进而调控胃黏膜炎症微环境, 改善慢性萎缩性胃炎症状。

关键词: 香砂六君子汤; 慢性萎缩性胃炎; 网络药理学; IL-17A/IL-17RA/HuR通路; 炎症反应; 炎症微环境

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)02-0618-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.043

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是以胃黏膜萎缩、固有腺体减少为主要病理表现的消化系统疾病^[1]。胃黏膜组织长期伴随炎症浸润, 反复受损后易增加癌变风险^[2]。调查显示, CAG发病率呈现逐年上升的趋势^[3], 且癌变率极高, 演变多为浅表性胃炎—萎缩性胃炎—肠化生—异型增生—胃癌^[4]。长期的炎症浸润所导致的免疫损伤在“炎癌链”进展中起关键作用, 因此改善炎症微环境和免疫状态可能是预防胃癌发生的重要举措, 但是目前现代医学对于CAG没有有效措施, 而中医药对本病

的治疗具有显著优势^[5]。

香砂六君子汤由人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏、砂仁、木香组成, 出自《古今名医方论》, 全方以四君子汤为基础, 补而不滞, 为健脾和胃经典方剂之一, 临床疗效确切^[6], 但其具体作用机制尚不明确。网络药理学能够从分子水平预测中药与疾病的作用靶点, 预测中药复方的作用机制。本研究借助网络药理学, 探究香砂六君子汤干预CAG的作用靶点及机制, 并通过动物实验对预测机制进行验证。

收稿日期: 2024-05-08

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(81760830, 82060828); 国家中医药管理局重点学科建设项目(国中医药人教函〔2023〕85号); 宁夏医科大学中医院一流学科建设项目资助基金(ZY0019110305)

作者简介: 袁晓梅(1995—), 女, 硕士生, 从事方剂配伍规律及中药防治消化道相关疾病的研究。Tel: 17393101599, E-mail: 1806732328@qq.com

*通信作者: 安耀荣(1968—), 男, 硕士, 教授, 从事方剂配伍规律及复方配伍优化的研究。Tel: 18309312818, E-mail: anyr@gszy.edu.cn

成映霞(1976—), 女, 博士, 教授, 从事医经理论与临床应用的研究。Tel: 18295586036, E-mail: 1289018353@qq.com

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 香砂六君子汤有效成分及靶点信息收集 运用中药系统药理学数据库 (TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)，按照口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 的检索条件^[7] 查询方中所有中药的活性成分及其对应的靶点；通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点进行人类基因名称注释，最终得到香砂六君子汤活性成分及其作用靶点。

1.1.2 慢性萎缩性胃炎疾病靶点信息收集及韦恩图构建 通过人类基因数据库 (GeneCard, <https://genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM, <https://www.omim.org/>)，以“chronic atrophic gastritis”为检索词，获取 CAG 疾病靶点基因，利用靶点交集平台 (VENN, <http://www.ehbio.com/test/venn/>) 将香砂六君子汤潜在作用靶点与 CAG 疾病靶点进行映射，取交集并制作韦恩图。

1.1.3 “成分-靶点-疾病”网络的构建与分析 将香砂六君子汤的活性成分、“药物-疾病”交集靶点相结合，运用 Cytoscape 3.9.0 软件绘制“药物活性成分-靶点-疾病”网络图，并根据 Degree 值大小分析香砂六君子汤治疗 CAG 的活性成分。

1.1.4 PPI 网络构建 将药物与疾病共同靶点输入蛋白互作数据库 (String, <https://www.string-db.org/cgi>) 中，删除无连接节点，构建蛋白相互作用网络 (PPI)。运用 Cytoscape 3.9.0 软件进行拓扑分析，并根据 Degree 值大小筛选出核心靶点。

1.1.5 GO 和 KEGG 分析 将关键靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 平台进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，获取关键靶点的生物学信息，并分析香砂六君子汤治疗 CAG 的潜在作用通路。

1.2 动物实验

1.2.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只，7 周龄，体质量 100~120 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010]，常规饲养于甘肃中医药大学 SPF 级实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2020-0009]，温度 (23 ± 2) °C，相对湿度 45%~55%。本实验经甘肃中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理批号 2022-557)。

1.2.2 药物与试剂 香砂六君子汤组方 (生晒参、炒白术、茯苓、陈皮、姜半夏、砂仁、木香、炙甘草配比为 10:9:9:9:12:6:6:6) 药材购自甘肃中医药大学附属医院中药房，经甘肃中医药大学生药教研室李越峰教授鉴定为正品。药材加水浸泡 30 min 后，常规煎煮 2 次，每次 40 min，合并 2 次药液，浓缩至生药量 1 g/mL，灭菌后于 4 °C 冰箱保存备用；叶酸 (常州制药厂有限公司，批号 21061111)；盐酸雷尼替丁胶囊 (广东恒健制药有限公司，批号 211005)；1-甲基-3-硝基-1-亚硝基脲 (MNNG) (上海

麦克林生化科技股份有限公司，批号 C12125889)。氨水 (烟台市双双化工有限公司，批号 20210201)；无水乙醇 (天津市北辰区方正试剂厂，批号 20211102)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司，批号 18D17B46)；IL-17A 抗体、IL-17RA 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司，批号 DF6127、DF3602)；HUR 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司，批号 3042S)；IgG 抗体 (美国 ImmunoWay 公司，批号 B0201)；MIP-1β、CCL3、CCL5 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (上海源桔生物科技中心，批号 CK-E30206、CK-E30204)。

1.2.3 仪器 SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；SH-Compact523 型化学发光成像系统 (杭州申花科技有限公司)；酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)；MB-102 型振荡恒温金属浴 (杭州博日科技股份有限公司)。

1.2.4 造模分组及给药 将 100 只 SD 雄性大鼠按照随机数表法分为空白组 (10 只) 和造模组 (90 只)，空白组大鼠使用常规标准饲料喂养，造模组大鼠参照文献 [8-9] 报道，采用 MNNG 复合多因素法建立 CAG 模型：① 100 μg/mL MNNG 溶液自由饮用；② 正常进食 2 d，禁食 1 d；③ 禁食当日灌胃 20% 无水乙醇，2 mL/只；④ 禁食当日停止饮用 MNNG 溶液，改为自由饮用 0.1% 氨水；⑤ 每日灌胃 0.003 g/mL 雷尼替丁溶液。造模第 17 周起，每 2 周随机抽取造模大鼠 2 只并处死，取胃组织进行病理检查，评价 CAG 模型复制是否成功。共造模 21 周，将造模成功的大鼠再按照随机数表法分为模型组、叶酸组和香砂六君子汤高、中、低剂量组，每组 10 只。空白组和模型组灌胃生理盐水；叶酸组灌胃给予 2 mg/kg 叶酸；香砂六君子汤成人 (60 kg) 用药剂量为 67 g，通过人与动物给药剂量折算^[10]，香砂六君子汤高、中、低剂量组分别灌胃给予 12、6、3 g/kg 香砂六君子汤，每天 1 次，连续给药 90 d。

1.2.5 取材 给药结束后，麻醉处死大鼠，取胃组织，沿胃大弯剪开，洗净胃内容物，切取一半组织于 4% 多聚甲醛中固定，用于组织学检查；另一半组织于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.6 HE 染色观察胃黏膜组织病理学改变 取 4% 多聚甲醛固定的各组大鼠胃组织标本，制备石蜡切片，脱蜡后行 HE 染色，于光学显微镜下观察病理变化，并采集图像。参照文献 [11] 方法，通过萎缩情况、炎症情况进行评分，根据严重程度分别计 0、1、2、3 分，见表 1。

表 1 胃组织病变评分标准

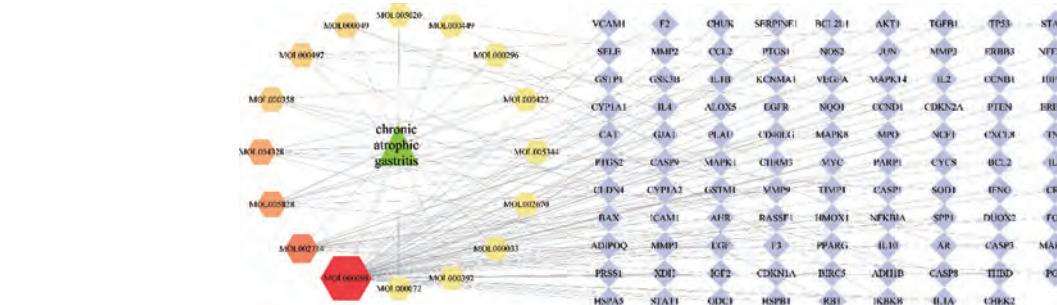
病理指标	评分/分	病理描述
萎缩	0	无
	1	少量壁细胞丢失，主细胞壁细胞分界清晰
	2	中度腺体萎缩，固有腺体数减少超过 1/3，少于 2/3
	3	重度腺体萎缩，固有腺体数减少超过 2/3 甚至消失
炎症	0	无
	1	轻度炎症细胞浸润，累及固有层上 1/3
	2	中度炎症细胞浸润，累及整个固有层甚至呈灶性分布
	3	弥漫性炎症细胞浸润，累及黏膜层、黏膜下层

1.2.7 免疫荧光染色 (IF) 分析胃黏膜组织 CD11b、F4/80 表达 将胃黏膜组织冰冻切片, PBS 洗去包埋剂, 用山羊血清 37 ℃ 封闭 2 h, 加入 CD11b 抗体 (1 : 500) 4 ℃ 孵育过夜, 洗膜后加荧光素标记二抗, 室温避光孵育 30 min, 洗膜后封片, 于 4 ℃ 避光保存; F4/80 操作同上。最后于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.8 ELISA 法检测胃黏膜组织 MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5 水平 取各组大鼠胃黏膜组织, 匀浆后取上清液, 严格按照试剂盒说明书步骤操作, 检测大鼠胃黏膜组织 MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5 水平。

1.2.9 Western blot 法检测大鼠胃黏膜组织 IL-17A、IL-17RA、HuR 蛋白表达 取 0.1 g 胃组织, 加入裂解液 (PMSF+RIPA) 后匀浆, 离心取上清, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 加入 5×上样缓冲液制备蛋白上样样本。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白, 电转至 PVDF 膜上, 使用封闭液 (TBST+脱脂奶粉) 摆床常温封闭 2 h, 洗膜后分别加入稀释的一抗 IL-17A (1 : 500)、IL-17RA (1 : 500)、HuR (1 : 1 000), 室温摇床孵育 3 h, 洗膜后加入稀释的二抗 (1 : 5 000), 室温摇床孵育 1 h, 洗膜后 ECL 法显色, 通过 ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.2.10 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较先进行方差齐性检验, 方差齐者采用 LSD-t 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验。不符合正态分布的数据采用中位数 [$M (Q_{25}, Q_{75})$] 表示, 采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。



注: 四边形为疾病靶点, 六边形为药物有效成分。

图 2 香砂六君子汤治疗 CAG 的“成分-靶点-疾病”网络

2.1.4 香砂六君子汤活性成分治疗 CAG 的 PPI 网络分析 通过 String 数据库, 导入 98 个交集靶点, 获得靶点蛋白互作关系, 构建潜在靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络, 见图 3。运用 Cytoscape 3.9.0 软件, 选择 “network analyzer”, 得到网络拓扑学参数, 根据 Degree 值筛选前 10 位的核心靶点, 筛出 PPI 中关键靶点, 排名前 5 位的靶点分别为 TP53、AKT1、STAT3、TNF、IL-6, 提示这些靶点可能是香砂六君子汤治疗 CAG 的潜在关键靶点。

2.1.5 香砂六君子汤活性成分治疗 CAG 交集靶点的富集分析 将 98 个共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 将各类 GO 功能条目 (前 10 条) 绘制为生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 三合一图, 见

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 香砂六君子汤有效成分及靶点筛选 通过 TCMSP 数据库检索, 按照 OB $\geq 30\%$ 且 DL ≥ 0.18 的条件检索, 共得到香砂六君子汤中有效活性成分 165 个, 对应靶点 1 492 个, 去重后得到有效成分 117 个, 靶点 261 个。

2.1.2 香砂六君子汤与 CAG 交集靶点构建 将 GeneCards、OMIM 数据库中的检索结果去重后得到的 934 个 CAG 相关疾病靶点与香砂六君子汤有效成分作用靶点取交集, 共得到 98 个交集靶点, 韦恩图见图 1。

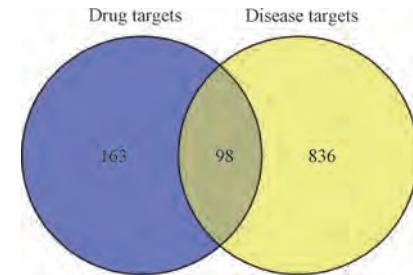


图 1 香砂六君子汤治疗 CAG 的潜在作用靶点

2.1.3 香砂六君子汤“成分-靶点-疾病”网络分析 运用 Cytoscape 3.9.0 软件, 根据 Degree 值 (基因的连接数量) 构建“药物有效成分-疾病靶点网络”, 见图 2。筛选出前 5 位 Degree 最高的核心成分分别是槲皮素 quercetin (54 个)、黄芩素 baicalein (16 个)、川陈皮素 nobiletin (8 个)、柚皮素 naringratin (7 个)、 β -谷甾醇 beta-sitosterol (4 个)。

图 4。共得到 KEGG 通路 203 条, 将富集得到的前 20 条 KEGG 通路绘制成柱状图, 见图 5。图 4 显示, BP 主要涉及活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应等; CC 主要涉及囊泡腔、膜筏、膜微域、膜区域等; MF 主要涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体配体活性、信号受体激活剂活性等。图 5 显示, 香砂六君子汤治疗 CAG 的信号通路主要富集在脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。

2.2 动物实验验证

2.2.1 香砂六君子汤对 CAG 大鼠一般生存状况的影响 空白组大鼠反应灵敏, 被毛柔顺光滑; 与空白组比较,

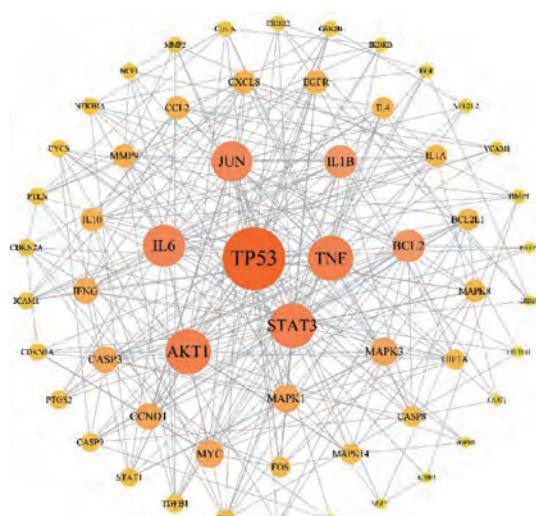


图3 香砂六君子汤治疗CAG的PPI网络

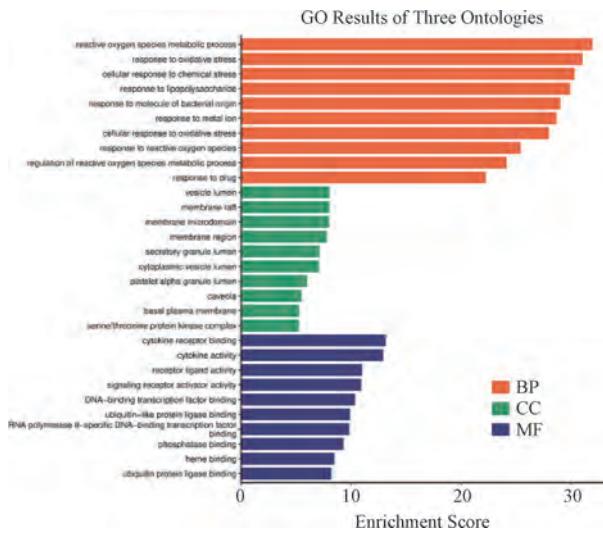


图4 香砂六君子汤治疗CAG靶点GO富集分析

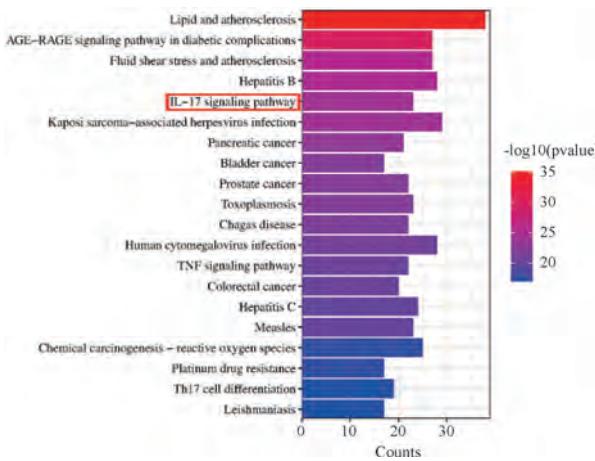


图5 香砂六君子汤治疗CAG靶点KEGG富集分析

模型组大鼠随着造模时间的延长，出现少食、倦卧、被毛稀疏无光泽等症状；与模型组比较，叶酸组和香砂六君子汤各剂量组大鼠一般生存状况均有不同程度改善。如表2

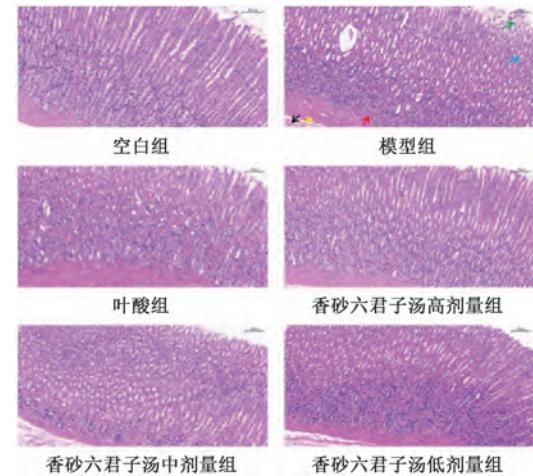
所示，与空白组比较，模型组大鼠体质量降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，香砂六君子汤各剂量组大鼠体质量升高 ($P<0.05$)；与叶酸组比较，香砂六君子汤高、中剂量组大鼠体质量升高 ($P<0.05$)。

表2 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	体质量/g
空白组	547.38±58.72
模型组	425.01±43.85 [△]
叶酸组	452.31±46.49
香砂六君子汤高剂量组	519.06±46.67 [#]
香砂六君子汤中剂量组	499.44±57.00 ^{*#}
香砂六君子汤低剂量组	472.37±54.62 [*]

注：与空白组比较，[△] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与叶酸组比较，[#] $P<0.05$ 。

2.2.2 香砂六君子汤对CAG大鼠胃黏膜组织病理学的影响 如图6所示，空白组大鼠胃黏膜上皮细胞腺体排列整齐，大小及形状较一致，黏膜固有层未见炎性细胞，无充血、水肿；模型组大鼠胃黏膜明显变薄，腺体排列稀疏而紊乱，存在散在出血点，部分腺体增生性囊状扩张，黏膜上层细胞脱落，胃小凹结构破坏，黏膜及黏膜下层炎性细胞浸润，黏膜肌层可见水肿；香砂六君子汤高剂量组大鼠胃黏膜轻度变薄，腺体排列较为整齐，大小及形状较一致，炎性细胞浸润不明显；香砂六君子汤中剂量组大鼠胃黏膜轻度变薄，腺体排列稀疏，排列较规整，黏膜固有层腺体萎缩，结缔组织可见少量炎性细胞浸润，偶见散在杯状细胞；香砂六君子汤低剂量组大鼠胃黏膜轻度变薄，腺体排列稀疏而稍显紊乱，黏膜肌层可见水肿，少量炎性细胞浸润；叶酸组大鼠胃黏膜较薄，腺体数量减少，排列稍显紊乱，腺体增生性扩张，黏膜肌层可见水肿，少量炎性细胞浸润。与空白组比较，模型组胃黏膜病理评分升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，香砂六君子汤高、中剂量组胃黏膜病理评分降低 ($P<0.05$)，见表3。



注：绿色箭头为胃黏膜上皮细胞脱落位置，红色箭头为胃黏膜固有层腺体萎缩位置，黑色箭头为炎症细胞浸润位置，黄色箭头为黏膜下层水肿位置，蓝色箭头为出血点位置。

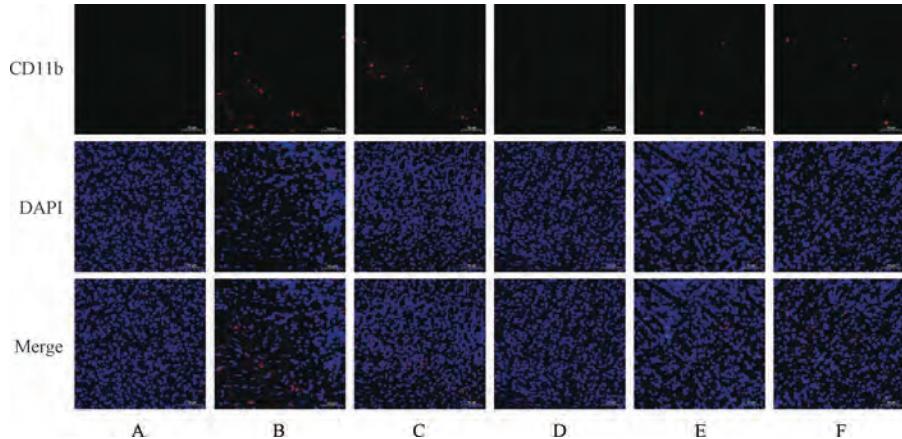
图6 各组大鼠胃黏膜组织病理学变化 (HE染色, ×200)

表3 各组大鼠胃黏膜病理评分比较 [分, $M (Q_{25}, Q_{75})$]

组别	萎缩	炎症
空白组	0(0,0)	0(0,0)
模型组	3.00(2.00,3.00) [△]	2.50(2.00,3.00) [△]
叶酸组	1.00(1.00,1.25)	1.50(1.00,2.00)
香砂六君子汤高剂量组	0.50(0,1.00)*	1.00(0,1.00)*
香砂六君子汤中剂量组	1.00(0,1.00)*	1.00(1.00,2.00)
香砂六君子汤低剂量组	1.00(1.00,2.00)	1.50(1.00,2.00)

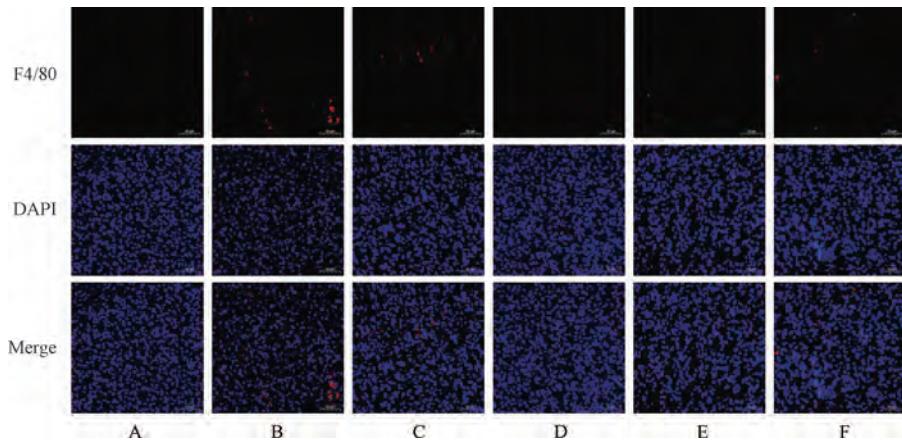
注: 与空白组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$; 与叶酸组比较, # $P<0.05$ 。

2.2.3 香砂六君子汤对 CAG 大鼠胃黏膜组织 CD11b、F4/80阳性细胞数的影响 如图 7~8、表 4 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织中性粒细胞表面黏附分子 CD11b (红色荧光) 和巨噬细胞标志物 F4/80 (红色荧光) 阳性表达增多 ($P<0.05$) ; 与模型组比较, 香砂六君子汤各剂量组大鼠胃黏膜组织 CD11b、F4/80 阳性荧光表达强度降低 ($P<0.05$) ; 与叶酸组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组大鼠胃黏膜组织 CD11b 阳性荧光表达和高剂量组 F4/80 阳性荧光表达强度降低 ($P<0.05$), 提示香砂六君子汤能够减少 CAG 大鼠胃黏膜组织中的炎性细胞浸润, 以高剂量组效果最明显。



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为叶酸组, D~F 为香砂六君子汤高、中、低剂量组。

图7 各组大鼠胃黏膜组织 CD11b 染色



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为叶酸组, D~F 为香砂六君子汤高、中、低剂量组。

图8 各组大鼠胃黏膜组织 F4/80 染色

表4 各大鼠胃黏膜组织 CD11b、F4/80 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	CD11b	F4/80
空白组	45.77±6.51	58.75±8.91
模型组	186.41±22.25 [△]	206.56±21.46 [△]
叶酸组	164.55±22.35	159.44±25.36*
香砂六君子汤高剂量组	64.99±12.90*#	83.94±11.65*#
香砂六君子汤中剂量组	116.75±13.33*#	154.13±28.97*
香砂六君子汤低剂量组	135.37±19.83*	165.27±17.57*

注: 与空白组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$; 与叶酸组比较, # $P<0.05$ 。

2.2.4 香砂六君子汤对 CAG 大鼠胃黏膜组织 MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5 水平的影响 如表 5 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织 MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5 水平升高 ($P<0.05$) ; 与模型组比较, 叶酸组和香砂六君子汤各剂量组大鼠胃黏膜组织 MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5 水平降低 ($P<0.05$) ; 与叶酸组比较, 香砂六君子汤高剂量组大鼠胃黏膜组织 CCL-5 水平降低 ($P<0.05$) 。

2.2.5 香砂六君子汤对 CAG 大鼠胃黏膜组织 IL-17A、IL-17RA、HuR 蛋白表达的影响 如图 9、表 6 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织 IL-17A、IL-17RA、HuR 蛋

表5 各组大鼠胃黏膜组织MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	MIP-1 β	CCL-3	CCL-5
空白组	3 585. 87±523. 60	278. 52±50. 73	290. 88±43. 75
模型组	5 142. 49±647. 41 Δ	441. 76±52. 11 Δ	422. 61±46. 85 Δ
叶酸组	4 450. 47±535. 08 $*$	376. 98±59. 65 $*$	363. 00±39. 31 $*$
香砂六君子汤高剂量组	3 975. 89±500. 73 $*$	317. 94±48. 96 $*$	308. 74±50. 28 $*\#$
香砂六君子汤中剂量组	4 181. 25±612. 13 $*$	353. 84±60. 77 $*$	331. 40±46. 85 $*$
香砂六君子汤低剂量组	4 478. 08±496. 14 $*$	373. 31±49. 08 $*$	357. 50±41. 25 $*$

注: 与空白组比较, $\Delta P<0.05$; 与模型组比较, $* P<0.05$; 与叶酸组比较, $\# P<0.05$ 。

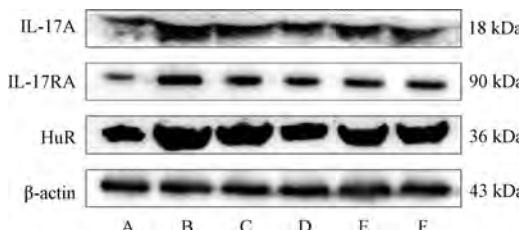
白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 香砂六君子汤各剂量组大鼠胃黏膜组织 IL-17A、IL-17RA、HuR 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与叶酸组比较, 香砂六君子汤高、中剂量

组大鼠胃黏膜组织 IL-17A、HuR 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 香砂六君子汤高剂量组 IL-17RA 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

表6 各组大鼠胃黏膜组织IL-17A、IL-17RA、HuR蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	IL-17A/ β -actin	IL-17RA/ β -actin	HuR/ β -actin
空白组	0.51±0.09	0.31±0.08	0.49±0.09
模型组	1.18±0.12 Δ	1.06±0.18 Δ	1.19±0.13 Δ
叶酸组	0.99±0.15	0.65±0.07 $*$	0.97±0.16 $*$
香砂六君子汤高剂量组	0.62±0.06 $*\#$	0.46±0.09 $*\#$	0.65±0.07 $*\#$
香砂六君子汤中剂量组	0.73±0.10 $*\#$	0.50±0.10 $*$	0.71±0.10 $*\#$
香砂六君子汤低剂量组	0.89±0.16 $*$	0.67±0.06 $*$	0.83±0.10 $*$

注: 与空白组比较, $\Delta P<0.05$; 与模型组比较, $* P<0.05$; 与叶酸组比较, $\# P<0.05$ 。



注: A为空白组, B为模型组, C为叶酸组, D~F为香砂六君子汤高、中、低剂量组。

图9 各组大鼠胃黏膜组织IL-17A、IL-17RA、HuR蛋白条带图

3 讨论

本研究利用网络药理学对香砂六君子汤治疗CAG的作用机制进行信息挖掘, 通过“药物有效成分-疾病靶点”网络筛选得到排名前五的核心药物成分, 其中槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用, 能够发挥胃黏膜修复作用^[12-13]; 黄芩素亦有抗炎、抗氧化等作用, 可通过降低炎性因子(如IL-6、TNF- α)水平, 下调活性氧水平, 改善氧化应激^[14], 此外, 有研究证实, 黄芩素对乙醇诱导的胃损伤具有保护作用^[15]; 川陈皮素、柚皮素均具有抗炎、抗肿瘤、抗血栓形成等作用^[16-17]; β -谷甾醇也可发挥抗炎作用, 可以降低炎性因子的过表达, 同时减少C反应蛋白的分泌^[18-19]。PPI网络分析显示, 香砂六君子汤可能通过TP53、AKT1、STAT3、TNF、IL-6等靶点发挥作用, 表明香砂六君子汤干预CAG的过程是一个复杂的连锁反应过程。同时GO分析结果表示, 香砂六君子汤可能通过抗炎、调控氧化应激等发挥治疗作用; KEGG富集涉及的通路有AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路等。IL-17信号通路作为经典的炎症通路之一, 与促炎症趋化因子、中性粒细

胞聚集密切相关, 在机体免疫和自身免疫性疾病中发挥重要作用^[20]。本研究发现, 香砂六君子汤干预能够减少CAG大鼠胃黏膜组织中性粒细胞表面黏附分子CD11b和巨噬细胞标志物F4/80阳性细胞浸润, 且相关研究已经证实IL-17通路与CAG密切相关^[21-22], 表明本研究对分子水平网络调控机制的预测具有一定准确性。基于以上分析结果, 最终选取IL-17A/IL-17RA/HuR通路进行动物实验验证。

研究发现, IL-17A(又称IL-17)主要由免疫细胞分泌, 与机体免疫、组织修复、炎症和癌症的进展密切相关^[23]。IL-17A是IL-17家族的促炎细胞因子, 可诱导多种促炎细胞因子和趋化因子的释放而引起炎症, 如MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5等。IL-17受体(IL-17R)由5个亚基组成(IL-17RA~IL-17RE), 其中IL-17RA是IL-17R家族中常见的亚基, 在多种组织和细胞中广泛表达, 有研究证实, 针向调控IL-17RA可以阻断IL-17介导的促炎途径^[24]。HuR是一种RNA结合蛋白, 属于免疫细胞中基因表达的后调节因子, 其在所有组织中普遍表达^[25]。在IL-17信号通路的传导过程中, HuR与IL-17靶mRNA结合, 以延长其半衰期, 促进IL-17的产生, 同时增加IL-17靶mRNA的表达^[26], 增加其促炎功能, 炎性细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞的大量浸润从而进一步造成组织损伤, 影响组织正常功能。本研究结果与之前的研究大致相同。本实验采用临床常用西药叶酸作为阳性药对照, 发现叶酸组在一定程度上能够干预CAG的进展, 但效果不及香砂六君子汤高剂量组, 提示香砂六君子汤治疗CAG更具优势。本研究结果显示, 香砂六君子汤干预后能够降低MNNG诱导的CAG大鼠胃黏膜组织中趋化因子MIP-1 β 、CCL-3、CCL-5水平, 并且IL-17A、IL-17RA、HuR蛋白表达下调, 提示香砂六君子汤改善CAG炎症反应的机制可能与下调IL-17A、IL-17RA、

HuR 表达有关。

综上所述，本研究通过网络药理学和实验验证，对复方香砂六君子汤治疗 CAG 的机制进行了分子水平的系统分析与验证，阐明香砂六君子汤可以改善 CAG 炎症反应，为临床及实验应用提供参考依据。

利益冲突：本文不存在任何利益冲突。

参考文献：

- [1] Rusak E, Chobot A, Krzywicka A, et al. Anti-parietal cell antibodies—diagnostic significance[J]. *Adv Med Sci*, 2016, 61(2): 175-179.
- [2] 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，中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组，等. 中国胃黏膜癌前状态和癌前病变的处理策略专家共识（2020 年）[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(11): 731-741.
- [3] 刘京运, 金世禄. 慢性萎缩性胃炎患病率与年龄的关系及发病的影响因素[J]. 川北医学院学报, 2017, 32(1): 152-154.
- [4] 姜宁, 黄宣, 范一宏, 等. 中西医结合治疗胃癌前病变疗效的系统评价[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 149-154.
- [5] 田同德, 杨峰, 唐静雯, 等. 慢性炎性反应与胃癌前病变关系及中医对策探讨[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(2): 359-363.
- [6] 刘佳. 中和医派思想指导下香砂六君子汤治疗慢性萎缩性胃炎临床研究[J]. 光明中医, 2023, 38(13): 2450-2453.
- [7] 马璐, 田国祥, 耿辉, 等. 中药系统药理数据库 TCMSP 及其分析应用简介[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(12): 1413-1416.
- [8] 易晋宇, 殷静, 石海莲, 等. 慢性萎缩性胃炎动物模型制备研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(1): 210-214.
- [9] 林玲, 韩涛, 陆璐, 等. 慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变动物模型的总结应用与评述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 220-227.
- [10] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 335.
- [11] 王梦蕾, 吴一峰, 瞿建亮, 等. 摩罗丹大蜜丸对慢性萎缩性胃炎大鼠的影响[J]. 中成药, 2024, 46(5): 1476-1482.
- [12] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.
- [13] 耿威, 仇慧颖, 李林, 等. 槲皮素对胃癌细胞增殖及侵袭的调控作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 34-36.
- [14] 徐俊涛, 王莹, 马飞, 等. 黄芩素通过抑制 NF-κB 通路对小鼠烧伤愈合的促进作用[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2496-2503.
- [15] Ribeiro A R, Nascimento valençā J D, da Silva Santos J, et al. The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice: protective pathways and anti-secretory mechanisms [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 260: 33-41.
- [16] 杨雪竹, 张浩, 崔西玉, 等. 川陈皮素抑制胃癌 SGC-7901 细胞侵袭能力的机制探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(18): 3099-3104.
- [17] 薛敏, 张浩, 朱玉凤, 等. 柚皮素-7-O-乙酸酯和柚皮素-7-O-丙酸酯的制备及抗血小板聚集活性[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1273-1278.
- [18] Liao P C, Lai M H, Hsu K P, et al. Identification of β-sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41): 10748-10759.
- [19] 姚凤, 周清燕, 熊瑛, 等. β-谷甾醇对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 55-61.
- [20] Trindade P, Loiola E C, Gasparotto J, et al. Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes[J]. *Glia*, 2020, 68(7): 1396-1409.
- [21] 李慧臻, 王天麟, 马佳乐, 等. 半夏泻心汤对 Hp 阳性慢性萎缩性胃炎小鼠趋化因子 CXCL9、CXCL10 及炎性因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2316-2320.
- [22] 王强, 张晓鹏, 周语平, 等. 香砂六君子汤对萎缩性胃炎大鼠 IL-6、IL-17 及 ERK1/2 基因蛋白表达的影响[J]. 西部中医药, 2020, 33(7): 16-19.
- [23] Li X, Bechara R, Zhao J, et al. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease[J]. *Nat Immunol*, 2019, 12(20): 1594-1602.
- [24] McGeechey M J, Cua D J, Gaffen S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 892-906.
- [25] Turner M, Díaz-Muñoz M D. RNA-binding proteins control gene expression and cell fate in the immune system[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(2): 120-129.
- [26] Kafasla P, Skliris A, Kontoyiannis D L. Post-transcriptional coordination of immunological responses by RNA-binding proteins[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(6): 492-502.