

甘草次酸抑制胃溃疡大鼠胃黏膜细胞的凋亡

孙俊波¹, 赵 璐^{2,3*}, 史素琴⁴, 寇振媛¹, 刘爱娟³, 付婷婷³

(1. 河南省中医院, 河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医药大学中医学博士后流动站, 河南 郑州 450046; 3. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450008; 4. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 分析甘草次酸对幽门螺杆菌感染胃溃疡大鼠的影响, 并探讨其作用机理。**方法** 采用乙酸处理后幽门螺杆菌感染法制备胃溃疡大鼠模型, 检测不同剂量甘草次酸处理后大鼠溃疡指数以及胃酸、胃蛋白酶活性。同时检测甘草次酸对大鼠胃黏膜组织及体外胃黏膜上皮细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 (BCL2) 和天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 表达、糖原合成酶激酶-3 (GSK3 β) 活性及细胞凋亡水平的影响。**结果** 甘草次酸可降低大鼠的溃疡指数以及胃液中胃酸、胃蛋白酶活性。甘草次酸处理后, 大鼠胃黏膜组织及体外胃黏膜上皮细胞中凋亡抑制因子 BCL2 的表达显著增高, 而凋亡因子 Caspase-3 的表达量、激酶 GSK3 β 活性及细胞凋亡水平则明显下降。GSK3 β 激活剂 LY294002 作用于细胞后, BCL2 水平下调, Caspase-3 表达增多, 细胞凋亡水平上升。**结论** 甘草次酸可通过调控 GSK3 β 激酶活性, 抑制胃黏膜上皮细胞的凋亡, 进而促进幽门螺杆菌感染胃溃疡的愈合。

关键词: 甘草次酸; 幽门螺杆菌; 胃溃疡; 细胞凋亡; GSK3 β

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0462-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.004

Glycyrrhetic acid inhibits the apoptosis of gastric mucosa cells in gastric ulcer rats

SUN Jun-bo¹, ZHAO Lu^{2,3*}, SHI Su-qin⁴, KOU Zhen-yuan¹, LIU Ai-juan³, FU Ting-ting³

(1. Henan Provincial Hospital of TCM, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 2. Post-doctoral Station of TCM of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 4. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of glycyrrhetic acid on the gastric ulcer rats infected by *Helicobacter pylori* (Hp) and its action mechanism. **METHODS** Gastric ulcer rat models were induced by acetic acid stress and then followed by Hp infection. After treatment with low and high doses of glycyrrhetic acid, the ulcer index, gastric acid and proteinase activities in gastric ulcer rats were analyzed. The effects of glycyrrhetic acid on the expressions of BCL2 and Caspase-3, the GSK3 β activity in gastric mucosa and gastric epithelial cells, and the cell apoptosis level were then detected. **RESULTS** Glycyrrhetic acid reduced the ulcer index, gastric acid and proteinase activities in rats. Besides, the expression of BCL2 was significantly up-regulated by glycyrrhetic acid in gastric mucosa and gastric epithelial cells, whereas the expression of Caspase-3, level of cell apoptosis, and GSK3 β activity were significantly reduced. After the treatment with GSK3 β activator LY294002, the level of BCL2 was down-regulated, Caspase-3 expression was increased, and the level of cell apoptosis was enhanced. **CONCLUSION** Glycyrrhetic acid promotes the healing of gastric ulcer infected by Hp via regulating GSK3 β activity and inhibiting apoptosis of gastric epithelial cells.

收稿日期: 2016-06-03
作者简介: 孙俊波 (1973—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事消化系统、代谢性疾病研究。Tel: (0371) 60908899, E-mail: junbosun@163.com

* **通信作者:** 赵 璐 (1974—), 女, 博士, 副主任医师, 从事内分泌代谢病研究。Tel: (0371) 60908899, E-mail: fangjiezhengzhou@163.com

KEY WORDS: glycyrrhetic acid; *Helicobacter pylori*; gastric ulcer; cell apoptosis; GSK3 β

胃溃疡 (gastric ulcer, GU) 属于消化性溃疡的一种, 是一类常见的慢性胃肠道疾病, 具有较高的复发性^[1], 其致病因素多与病毒、微生物感染、炎症反应的加剧以及胃酸、胃蛋白酶的异常分泌等有关, 其中幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是临床胃溃疡患者发病的主要诱因之一^[2]。近年来, 医药工作者利用中医药手段治疗胃溃疡及其他幽门螺杆菌感染相关的胃肠道疾病, 取得了广泛的成果^[3]。然而, 受中药制剂的成分复杂性所限, 其活性机制尚不清楚。

中药甘草对于胃溃疡的治愈具有显著疗效, 其主要成分之一甘草次酸是一种三萜类化合物^[4]。研究表明, 甘草次酸具有抗肿瘤、抗炎症、抗病毒感染等多种作用^[5]。本实验以幽门螺杆菌感染的乙酸性胃溃疡大鼠模型为对象, 分析了甘草次酸对幽门螺杆菌感染大鼠溃疡愈合指数及胃酸、胃蛋白酶含有量的影响, 并以幽门螺杆菌共培养的胃黏膜上皮细胞为体外模型, 分析其对胃黏膜细胞功能的调控机制, 为解析甘草的药理机制提供依据。

1 材料

1.1 实验动物与细胞 50 只雄性 SD 大鼠 (体重 280 ~ 320 g) 购买自河南中医药大学实验动物中心 [生产许可证号 SYXK (豫) 2015-0005]。胃黏膜上皮细胞 Ges-1 由河南中医药大学中心实验室保存。

1.2 试剂 西咪替丁片 (山东方明药业集团股份有限公司, 国药准字 H37022632, 批号 1201091); 甘草次酸 (Sigma, 批号 E0180500); 磷酸化 GSK3 β (Tyr216) (批号 bs-0023R)、总 GSK3 β (批号 bs-0023M)、BCL2 (批号 bs-20351R)、Caspase-3 (批号 bs-0081R)、 β -Actin 一抗 (批号 bs-0061R)、羊抗鼠二抗 (HRP, 批号 bs-0368Gs) (北京博奥森生物技术有限公司); MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号 C0009); LY294002 (北京百奥莱博科技有限公司, 批号 1524114)。

2 方法

2.1 甘草次酸对胃溃疡大鼠的影响

2.1.1 胃溃疡大鼠模型制备与处理 采用乙酸处理后幽门螺杆菌感染法制备胃溃疡大鼠模型, 具体参照张俊杰等^[6]方法。大鼠经 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 沿腹中线剪开约 2 cm 长开口, 将胃

轻轻移出, 用注射器将 0.05 mL 冰醋酸注射至浆膜层与胃壁肌层间。完毕后, 将胃轻轻送回至腹腔内, 消毒、缝合腹腔壁, 继续饲养。乙酸处理 7 d 后, 经口腔缓慢灌注 2 mL Hp 菌液 (参照张强^[7]的方法), 7 d 后第 2 次感染, 共 4 次。

模型大鼠随机分为模型组 (Cont), 甘草次酸高 (GA-H)、低剂量组 (GA-L)、西咪替丁组 (CT), 每组 8 只, 同时设未处理的大鼠为正常组 (NT)。甘草次酸与西咪替丁制成生理盐水悬液, 按不同剂量 (甘草次酸高、低剂量组 1.0、8.0 mg/kg 体质量, 西咪替丁 5.0 mg/kg 体质量) 尾静脉注射, 模型组与正常组分别注射等体积生理盐水, 每天注射 1 次, 共 7 d。各组大鼠于末次给药后, 禁食不禁水 24 h, 断头处死。

2.1.2 溃疡指数测定 大鼠溃疡指数测定参照韩丽^[8]方法。大鼠处死后, 开腹取胃, 收集胃液用于胃酸及胃蛋白酶测定。沿胃大弯剪开铺展, 观察并测量胃溃疡最大长径和最大横径, 两者乘积即为溃疡指数 (mm²)。

2.1.3 胃酸与胃蛋白酶测定 胃液离心后收集上清, 参照韩丽^[8]方法, 采用酸碱滴定法测定胃液上清中游离酸及总酸度 (mmol/L), 采用分光光度法测定胃蛋白酶活性 (U/mL)。

2.2 甘草次酸对胃黏膜上皮细胞凋亡的影响

2.2.1 细胞培养与处理 幽门螺杆菌培养液按 100 : 1 感染复数与胃黏膜上皮细胞 Ges-1 共培养, 12 h 后更换新鲜培养基, 分别加入高、低剂量 (75、25 ng/mL) 甘草次酸, 培养 24 h 后, 检测细胞凋亡及相关因子表达情况。同时, 以未受甘草次酸处理的共培养细胞为模型组作为对照。添加 LY294002 (终浓度 25 μ mol/L) 至 75 ng/mL 甘草次酸处理 24 h 后的细胞中, 培养 12 h, 检测细胞凋亡及相关因子表达情况。

2.2.2 Western blot 检测 取处理后大鼠胃黏膜组织或细胞, SDS 裂解法提取总蛋白, 煮沸后, 取 80 μ g 上样进行 SDS-PAGE 电泳并转膜。经 3% 脱脂奶粉封闭后, 一抗 (1 : 2 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 加入二抗 HRP 室温孵育 1 h, ECL 显色曝光, 灰度分析条带值。

2.2.3 细胞凋亡检测 处理后的细胞于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后, 调整细胞密度 (1×10^6 /mL), 加入 Annexin V-FITC (终质量浓度 0.5 μ g/mL) 和 PI

(终质量浓度 0.6 μg/mL) 双染色, 进行流式细胞仪分析。

2.3 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 数据分析采用 SPSS 12.0 统计软件进行, 组间比较采用 *t* 检验 (两组) 法或单因素方差分析 one-way ANOVA 法 (多组) 进行, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草次酸对幽门螺杆菌感染胃溃疡大鼠溃疡指数的影响 与模型组相比, 甘草次酸高、低剂量组及西咪替丁阳性对照组大鼠的溃疡指数均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。高、低剂量甘草次酸组间差异明显, 高剂量甘草次酸组大鼠溃疡指数更低, 且镜下溃疡组织较平坦, 溃疡灶周边及表面有新生肉芽组织形成。结果见表 1。

表 1 甘草次酸对胃溃疡大鼠溃疡指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Tab. 1 Effect of glycyrrhetic acid on the ulcer index in GU rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	溃疡指数/mm ²
正常组	—	—
模型组	—	12.68 ± 2.84
甘草次酸低剂量组	1.0	9.84 ± 2.39 *
甘草次酸高剂量组	8.0	5.98 ± 1.05 **
西咪替丁组	5.0	3.22 ± 1.13 ***

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与甘草次酸低剂量组比较, # $P < 0.05$

表 2 甘草次酸对胃溃疡大鼠胃酸及胃蛋白酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 2 Effects of glycyrrhetic acid on the gastric acid and proteinase activities in GU rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	游离酸/(mmol·L ⁻¹)	总酸/(mmol·L ⁻¹)	胃蛋白酶活力/(U·mL ⁻¹)
正常组	—	58.26 ± 13.38 *	125.56 ± 9.87 *	155.28 ± 35.67 **
模型组	—	93.35 ± 21.98	142.19 ± 11.31	289.97 ± 23.31
甘草次酸低剂量组	1.0	85.11 ± 6.55	138.98 ± 19.29	220.57 ± 14.68 *
甘草次酸高剂量组	8.0	77.26 ± 6.13 *	130.33 ± 9.13 *	187.89 ± 21.35 **
西咪替丁组	5.0	79.86 ± 11.17 *	128.56 ± 10.25 *	167.47 ± 9.88 **

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

幽门螺杆菌感染引起的胃黏膜细胞加剧凋亡是幽门螺杆菌阳性胃溃疡发生的主要病理基础之一^[9]。甘草次酸是甘草中主要的三萜化合物之一^[10], 可以调控 Akt/FOXO3a/Bim、ROS/MAPKs、Wnt/β-catenin 等相关信号通路的作用, 进而调节人乳腺癌细胞、垂体腺瘤细胞及白血病细胞等多种肿瘤细胞的凋亡活性^[11-13]。然而, 关于甘草次酸是否对非肿瘤组织细胞的凋亡具有调控作用的报道较少。本实验证实了甘草次酸能有效抑制幽门螺杆菌感染后胃黏膜上皮细胞的凋亡, 表明甘草及甘草

3.2 甘草次酸对胃溃疡大鼠胃酸及胃蛋白酶活性的影响 胃溃疡模型大鼠的胃酸及胃蛋白酶活性显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 低剂量甘草次酸能降低胃液游离酸及总酸度, 但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 而高剂量甘草次酸及西咪替丁均能显著降低胃液游离酸及总酸度 ($P < 0.05$), 见表 2。同时, 高、低剂量甘草次酸组中, 胃液胃蛋白酶活性均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

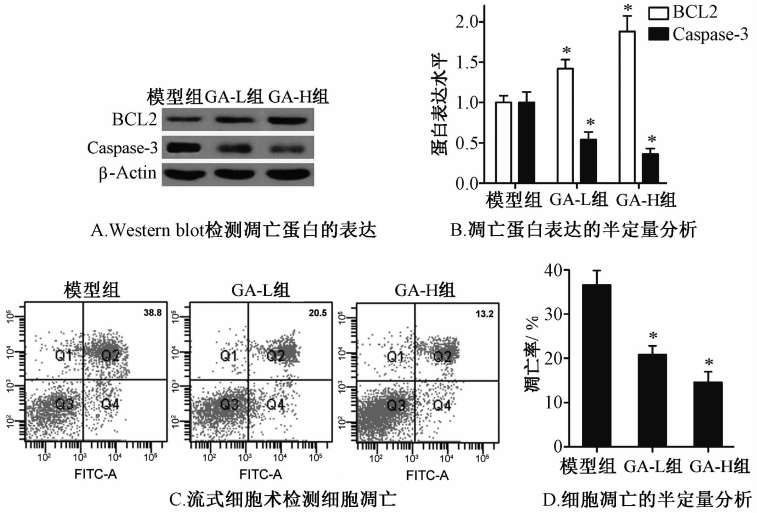
3.3 甘草次酸对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的影响 高、低剂量甘草次酸作用于胃溃疡大鼠后, 大鼠胃黏膜中凋亡抑制因子 BCL2 的表达水平较模型组显著增高 ($P < 0.05$), 而凋亡因子 Caspase-3 的表达量则明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1。同时, 甘草次酸能显著减少体外幽门螺杆菌感染胃黏膜上皮细胞 Ges-1 引起的细胞凋亡 ($P < 0.05$)。

3.4 甘草次酸通过调控 GSK3β 活性抑制胃黏膜上皮细胞的凋亡 75 ng/mL 甘草次酸处理胃黏膜上皮细胞 24 h 后, 细胞中 GSK3β (Tyr216) 的磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 激酶活性下降; 同时细胞中 BCL2 的表达水平显著增高, Caspase-3 的表达量明显下降 ($P < 0.05$), 见图 2。利用 25 μmol/L GSK3β 激活剂 LY294002 作用于细胞后, 甘草次酸的作用受到抑制, 细胞内 BCL2 水平下调、Caspase-3 表达增多, 细胞凋亡水平上升 (图 2)。

次酸对胃溃疡的治愈作用可能与胃黏膜细胞凋亡的抑制有关。

此外, 本研究分别对不同剂量甘草次酸的作用进行了分析。因药物进入体内后存在吸收、分布、代谢和排泄规律上的差异, 其血药浓度随时间变化也不尽相同, 因而常需对体内外实验所需药物浓度进行分别确定。本研究体内外实验中所涉及到的药物浓度同样由查阅文献结合药物毒性预实验所得, 二者虽无直接相关性, 但可为相关的药代动力学研究提供剂量参考。

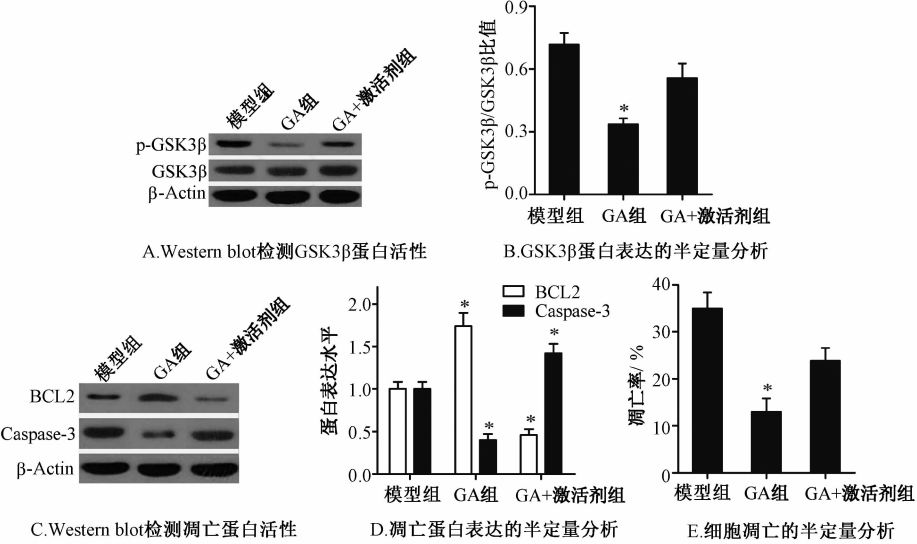
机体内细胞凋亡的发生受各种凋亡信号通路的



注：与模型组比较，* $P < 0.05$

图 1 甘草次酸对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of glycyrrhetic acid on the cell apoptosis of gastric mucosa in GU rats



注：与模型组比较，* $P < 0.05$

图 2 甘草次酸通过调控 GSK3β 活性抑制胃黏膜上皮细胞的凋亡

Fig. 2 Involvement of glycyrrhetic acid in the regulation of GSK3β activity to inhibit apoptosis of gastric epithelial cells

调节。GSK3β 是一种保守性的丝氨酸/苏氨酸激酶，其 Tyr216 残基磷酸化后活性被激活，Ser9 残基磷酸化后活性则被抑制，活化的 GSK3β 可作用于下游的 Bcl-2 及 Caspase-3 分子，调控细胞的凋亡过程^[14-15]。有研究报道，某些人工合成的三萜类化合物能够调节 GSK3β 活性，进而影响细胞增殖、凋亡等过程^[16]。本实验发现，甘草次酸能下调幽门螺杆菌感染后胃黏膜中 GSK3β (Tyr216) 的磷酸化水平，降低激酶活性，并上调 BCL2、抑制 Caspase-3 的表达。推测甘草次酸对胃黏膜细胞

凋亡的抑制作用可能与 GSK3β 相关的细胞凋亡途径有关。

本研究以幽门螺杆菌感染的乙酸性胃溃疡大鼠模型为对象，证实了甘草次酸对于幽门螺杆菌感染引起的胃溃疡病症的愈合具有促进作用，这一过程与甘草次酸对 GSK3β 激酶活性的调节及胃黏膜上皮细胞凋亡的抑制有关，可为解析中药甘草及甘草次酸的药理机制提供了依据。

参考文献：

[1] Miyamoto M, Haruma K. Gastric ulcer and duodenal ulcer[J].

Nihon Rinsho, 2013, 71(8): 1418-1423.

[2] Shirasaka D. *Helicobacter pylori* VacA and gastric ulcer[J]. *Inter J Hematol*, 2006, 84(4): 316-318.

[3] 虎喜成, 田文荣, 刘敬霞, 等. 中医药治疗胃溃疡的临床研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 208-210.

[4] 刘海燕, 刘禹宏, 齐增艳. 中药甘草中提取物的分析研究[J]. 中外医学研究, 2014, 12(32): 162-164.

[5] 董方圆, 王杰军. 甘草次酸及其衍生物的抗炎机制[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(2): 195-197.

[6] 张俊杰, 周庚生, 顾伟忠, 等. 芩连合剂对幽门螺杆菌感染性胃溃疡大鼠氧自由基参数的影响[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 157-158.

[7] 张 强. 间质干细胞受幽门螺杆菌影响对胃上皮细胞作用及机制[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.

[8] 韩 丽. 正红树提取物抗大鼠实验性胃溃疡作用及抗菌活性研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2006.

[9] GÜCİN Z, ÇAKMAK T, Bayyurt N, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and relationship with gastric epithelial cell proliferation and apoptosis [J]. *Turkish J Med Sci*, 2013, 43 (5): 739-746.

[10] 王立英, 刘雨萌, 金元宝, 等. 甘草次酸对谷氨酸所致PC12细胞损伤的保护作用及其机理[J]. 华西药杂志, 2013, 28(4): 353-356.

[11] 吴晓玲, 庄佩佩, 郝嘉楠, 等. 18 β -甘草次酸通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对 U937 细胞凋亡的调控机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(19): 1710-1715.

[12] Wang D, Wong H K, Feng Y B, *et al.* 18 β -Glycyrrhetic acid induces apoptosis in pituitary adenoma cells via ROS/MAPKs-mediated pathway [J]. *J Neuro oncolo*, 2014, 116 (2): 221-230.

[13] Gunjan S, Susanta K, Shreyasi P, *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *J Cellr Physiol*, 2012, 227(5): 1923-1931.

[14] Gao C, Liu Y, Jiang Y, *et al.* Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3 β pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model[J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(3): 261-269.

[15] Chou C H, Chou A K, Lin C C, *et al.* GSK3 β regulates Bcl2L12 and Bcl2L12A anti-apoptosis signaling in glioblastoma and is inhibited by LiCl [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11 (3): 532-542.

[16] To C, Guglielmo J M D. Abstract 1548: The effects of synthetic triterpenoids on GSK3 β and focal adhesions[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 1548-1548.

五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤的影响

赵海霞, 黄威峰, 宋来新, 刘 静, 彭 奔, 张长城*
(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: **目的** 探讨五子衍宗方(枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子)对环磷酰胺致成年雄性小鼠睾丸细胞DNA损伤的影响。**方法** 将50只成年雄性Balb/C小鼠中40只腹腔注射环磷酰胺后随机均分为模型对照组(生理盐水)以及五子衍宗方低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg), 10只另设正常对照组(生理盐水), 乙醚麻醉小鼠后颈椎脱臼处死。检测小鼠精子数量、精子活率及精子畸形率, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)法检测血清中8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含有量, 单细胞凝胶电泳技术检测睾丸细胞DNA损伤程度, Western blot检测睾丸组织中磷酸化的肿瘤抑制蛋白53(p-P53)、 γ 位磷酸化的组蛋白(γ -H2AX)蛋白表达。**结果** 相较于模型对照组, 五子衍宗方各组可显著升高小鼠精子数量、精子活率, 显著降低精子畸形率、血清8-OHdG水平, 显著降低睾丸组织中p-P53与 γ -H2AX蛋白表达。**结论** 五子衍宗方能通过下调p-P53、 γ -H2AX蛋白表达来显著减轻环磷酰胺致小鼠睾丸细胞DNA损伤。

关键词: 五子衍宗方; 环磷酰胺; 8-OHdG; DNA损伤; γ -H2AX

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0466-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.005

Effects of Wuzi Yanzong Prescription on cyclophosphamide-induced DNA damage of testis cells in mice

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573931, 81373881, 81503334); 三峡大学人才科研启动基金(KJ2014B067)

作者简介: 赵海霞(1986—), 女, 博士, 讲师, 从事中药药理研究。E-mail: zhaohaixia.mm@163.com

* **通信作者:** 张长城(1973—), 男, 博士, 教授, 从事中药药理研究。E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn