◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Aug; 31(8): 1034-1052

委陵菜酸调节 Keap-1/Nrf2 和 NLRP3 炎症小体信号通路对乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用及机制研究

周如凤[1,2]，张　颖[1,2]，孟子元[2]，刘　杰[2]，石孟琼[1]，廖　勇[3]，许　杰[4]，李浩然[4]，谈燕清[4]，覃慧林[4]，贾亮亮[5]，游　艳[3]

[1]三峡大学基础医学院&肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室，宜昌 443002，湖北；
[2]三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室 & 药食同源大健康产品开发利用宜昌市重点实验室，宜昌 443002，湖北；
[3]三峡大学附属仁和医院，宜昌 443001，湖北；
[4]三峡大学中医医院 & 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心，宜昌 443002，湖北；
[5]宜昌市中心人民医院 & 三峡大学第一临床医学院，宜昌 443002，湖北

摘要　目的：研究委陵菜酸（TA）对乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用及其机制。**方法**：建立乙醇诱导 GES-1 细胞损伤模型，实验设置对照组、模型组、TA（12.5 μg/mL）组、Nrf2 抑制剂（ML385，10 μmol/L）组和 NLRP3 抑制剂（MCC950，8 μmol/L）组。药物干预组细胞加入相应药物培养 22 h 后，除对照组外，加入 7% 乙醇处理后继续培养细胞 2 h，然后收集上清液和细胞。采用 MTT 检测细胞活力；采用细胞划痕和 Transwell 检测细胞迁移；AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡，免疫荧光检测细胞 MMP 和细胞中 ROS 水平；比色法和 ELISA 检测细胞上清液中 LDH、IL-4、IL-1β、IL-6、IL-10、IL-18、NO、TNF-α 含量；比色法检测细胞中 CAT、GSH、MDA、MPO、SOD、T-AOC 及胞浆和线粒体中 cytochrome C 含量；采用免疫荧光检测 NLRP3、ASC、caspase-1 共定位；电子显微镜观察细胞内超微结构；实时荧光定量 PCR 测定 GES-1 细胞中 Apaf-1、ASC、Bcl-2、Bcl-xl、Bad、Bax、caspase-1、COX-1、COX-2、GCLC、HO-1、iNOS、Keap-1、NEK7、NLRP3、NQO1、Nrf2、PGE2、TXNIP mRNA 表达；Western blot 测定 GES-1 细胞中 Apaf-1、ASC、Bcl-2、Bcl-xl、Bad、Bax、caspase-1、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、PARP-1、cleaved-PARP-1、GCLC、HO-1、Keap-1、NEK7、NLRP3、NQO1、pro-caspase-1、pro-caspase-3、pro-caspase-9、pro-IL-18、pro-IL-1β、总 Nrf2、TXNIP 蛋白表达。**结果**：与模型组比较，TA 可显著促进乙醇诱导的 GES-1 细胞迁移；显著抑制细胞凋亡和 LDH 释放；降低细胞内 ROS 水平，上清液中 IL-1β、IL-6、IL-18、NO、TNF-α 水平，细胞中 MDA、MPO 水平和胞浆中 cytochrome C 含量（P<0.01）；升高 MMP，上清液中 IL-4、IL-10 水平，细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 水平和线粒体中 cytochrome C 含量（P<0.01）；下调乙醇诱导的 GES-1 细胞中 ASC、Apaf-1、Bad、Bax、caspase-1、COX-2、iNOS、Keap-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、Apaf-1、Bad、Bax、caspase-1、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP-1、Keap-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、pro-IL-1β、pro-IL-18、TXNIP 蛋白表达，抑制 GES-1 细胞内 NLRP3、ASC 和 caspase-1 共定位；改善细胞核及核仁结构、减轻线粒体肿胀；上调乙醇诱导的 GES-1 细胞中 COX-1、Bcl-2、Bcl-

2025-09-23 收稿　2025-11-09 修回
湖北省科技厅重点研发项目（2025BCB067）；湖北省科技厅重点研发大健康计划项目（2022BCE017）；湖北省卫生健康委员会中医药重点项目（ZY2023Z015）；湖北省科技厅自然科学基金项目（2025AFB805，2025AFB839，2025AFD301，2025AFD294，2023AFB600，2022CFB357，2022CFB427）；宜昌市医疗卫生研究项目（A22-2-059，A23-1-061）；湖北省卫生健康委员会科研资助项目（WJ2023M153）；湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心开放基金（SXZ202303，SXZ202308，SXZ202311）
周如凤，女，硕士研究生，主要从事中药防治消化系统疾病、皮肤疾病基础研究。
E-mail: 2748894048@qq.com
石孟琼，通信作者，女，高级实验师，主要从事中药药理学研究。
E-mail: shmq0212@126.com
游艳，共同通信作者，女，硕士研究生，主管药师，主要从事中药药理研究。
E-mail: 497091164@qq.com

xl、GCLC、HO-1、NQO1、Nrf2、PGE2 mRNA 和 Bcl-2、Bcl-xl、GCLC、HO-1、NQO1、总 Nrf2、胞核 Nrf2、pro-caspase-3、pro-caspase-9 蛋白表达及 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率（P<0.01）。**结论**：TA 对乙醇所致 GES-1 细胞损伤具有显著的保护作用，其作用机制与激活 Keap-1/Nrf2 通路、减轻氧化应激，抑制 NLRP3 炎症小体通路激活、减轻炎症反应，进而抑制线粒体凋亡通路激活密切相关。

关键词　委陵菜酸；胃细胞损伤；氧化应激；炎症反应；Keap1/Nrf2 信号通路；NLRP3 炎症小体信号通路

中图分类号：R285.5
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)08-1034-19
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.08.004

酒精在引起死亡危险因素中排名第 7，每年造成大量死亡[1]。据统计，全球每年有超过 74 万例与饮酒有关的癌症病例，其中 76.7% 为男性[2]。长期过量饮酒轻则会对胃黏膜造成损伤，重则会引起胃炎、消化性溃疡和癌症等胃肠道疾病[3]。黏膜是抵抗病原体的主要屏障，并确保内部环境的稳定性。胃肠道黏膜作为人体最大的黏膜屏障器官，在生理上起着至关重要的作用。高浓度酒精会直接侵蚀胃黏膜组织[4]，导致胃黏膜细胞脱落、出血和黏液水平降低，从而导致胃黏膜损伤和相关的疾病发生[5]。酒精引起胃损伤病理生理学与酒精产生的炎症介质和活性氧（reactive oxygen species, ROS）有关，它们促进了细胞膜脂质过氧化，导致细胞死亡和上皮损伤[6]。Tamura 和 Yu 等[7-8]研究发现胃黏膜细胞接触到乙醇时会促进丙二醛（malondialdehyde, MDA）、一氧化氮（nitric oxide, NO）生成，抑制超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）等抗氧化剂产生。这种相互作用会放大氧化应激，导致胃黏膜损伤，这一过程同时会伴有急性炎症反应，会加速肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α, TNF-α）、白细胞介素-1β（interleukin-1β, IL-1β）和 IL-6 等促炎因子释放[9-11]。综上所述，饮酒引起胃黏膜损伤与氧化应激和炎症反应紧密关联。

核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor E2 related factor, Nrf2）是调节细胞内氧化还原平衡和细胞氧化应激的关键转录因子[12]。Jensen 等[13]研究发现乙醇处理人胃黏膜上皮细胞（GES-1）可增加细胞中 ROS 含量并诱导氧化应激，抑制 Nrf2 通路、导致细胞损伤。Kelch 样 ECH 相关蛋白 1（Kelch like epichlorohydrin related protein 1, Keap-1）控制 Nrf2 的激活，在无应激条件下对 Nrf2 的核移位产生负面影响。Nrf2 通过促进血红素加氧酶 1（heme oxygenase-1, HO-1）的转录和蛋白质表达来增加下游抗氧化剂的表达。此外，胃黏膜细胞接触到乙醇时不仅会诱发氧化应激，而且会伴有炎症损伤[14]。Ma 和 Arab 等[15-16]研究发现胃黏膜细胞在乙醇刺激下，引起 NOD 样受体蛋白 3（NOD like receptor protein 3, NLRP3）募集凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis related spot like protein, ASC）、半胱氨酸蛋白酶-1 前体（pro-caspase-1），完成 NLRP3 炎症小体组装、激活，诱导 pro-caspase-1 自我剪切活化；活化的 caspase-1 使 pro-IL-1β、pro-IL-18 剪切为活化的 IL-1β、IL-18，IL-1β、IL-18 可刺激胃黏膜细胞，通过自分泌/旁分泌系统分泌多种更多炎症介质、炎症因子造成胃黏膜损伤。由此可见，Keap-1/Nrf2 通路被抑制和 NLRP3 炎症小体通路异常激活与乙醇诱导的胃黏膜细胞损伤密切相关，靶向 Keap-1/Nrf2 和 NLRP3 炎症小体通路可为乙醇诱导的胃损伤提供一种治疗手段。

木瓜 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 是一味传统的祛风湿中药，具有舒筋活络、和胃化湿之功，主要用于湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、消化道损伤等疾病的治疗[17]。我们前期研究发现其重要活性成分木瓜总三萜对吲哚美辛、乙醇诱导的胃黏膜上皮细胞及大鼠和小鼠胃黏膜损伤具有较好的保护作用[18-22]。委陵菜酸（tormentic acid, TA）为木瓜总三萜中一种重要的活性成分[19]，与同属木瓜总三萜的其他成分（齐墩果酸、马斯里酸、白桦脂酸、熊果酸、3-O-乙酰熊果酸、3-O-乙酰坡模酸）比较，它对吲哚美辛、幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）诱导的 GES-1 细胞损伤和大鼠胃黏膜损伤具有更好保护作用，可抑制上皮细胞凋亡、促进其迁移和增殖、加速受损胃黏膜愈合，证实其机制与增强内源性抗氧化系统功能、

抑制氧化应激、炎性反应及 TLR4/NF-κB/NLRP3 炎症小体通路激活，减少炎症介质、炎症因子生成，进而激活 CXCR4/CXCL12/PLC/PKC/Rho A/MLC 通路、抑制线粒体途径介导的凋亡密切相关[23-24]。本研究拟在此基础上，通过乙醇诱导的 GES-1 细胞损伤模型，围绕 Keap-1/Nrf2 和 NLRP3 炎症小体通路探讨 TA 对乙醇损伤 GES-1 细胞的防治作用及其机制，为 TA 防治胃损伤提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 GES-1 细胞（批号 HG-165）购自美国模式生物保藏中心。

1.2 实验药物 TA（Fig.1A）（批号 110756-202409），纯度为 98.16%±1.52%，购自中国食品药品检定研究院。

1.3 主要试剂 无水乙醇（批号 20240624）购自国药集团化学试剂有限公司；二甲基亚砜（DMSO）和 MTT（批号分别为 6120541、320168）购自美国 Sigma 公司；RPMI 1640 培养基、胎牛血清、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential, MMP）（JC-1）、ROS 检测试剂盒（DCFH-DA）（批号分别为 621035、10569-157B、T7526、S0019）购自美国 Gibco 公司；Nrf2 抑制剂（ML385）、NLRP3 抑制剂（MCC950）（批号分别为 S8790、541892S）购自美国 Selleck 公司；Annexin V-FITC/PI 试剂盒（CA1020）购自上海康朗生物科技有限公司；过氧化氢酶（catalase, CAT）、细胞色素 C（cytochrome C）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）、髓过氧化物酶（myeloperoxidase, MPO）、NO、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、总抗氧化能力（total antioxidant capacity, T-AOC）试剂盒（批号分别为 20241109、20241127、20241116、20241205、20241124、20241029、20241113、20241109、20241126、20241123）购自南京建成生物工程研究所；环氧合酶-1（cyclooxygenase-1, COX-1）、COX-2、IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18、前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2）、TNF-α（批号分别为 20241025、20240921、20241016、20240918、20241009、20241023、20240926、20241013、20241017）试剂盒购自深圳达科为生物技术公司；凋亡酶激活因子-1（apoptotic protease activator factor-1, Apaf-1）、ASC、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）、B 淋巴细胞瘤-xl（B-cell lymphoma-xl, Bcl-xl）、Bcl-2 关联死亡启动子（Bcl-2 associated death promoter, Bad）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 related X protein, Bax）、caspase-1、COX-1、COX-2、iNOS、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基（glutamate cysteine ligase catalytic subunit, GCLC）、HO-1、Keap-1、细胞有丝分裂相关酶（mitotic associated enzyme, NEK7）、NLRP3、NAD（P）H:醌氧化还原酶（phosphoamide adenine dinucleotide quinone oxidoreductase 1, NQO1）、Nrf2、PGE2、硫氧还蛋白互作蛋白（thioredoxin interacting protein, TXNIP）、GADPH 引物（批号分别为 A0241013、A0241012、A0241015、A0241014、A0241021、A0241024、A0241023、A0241025、A0241016、A0241019、A0241023、A0241009、A0241007、A0241011、A0241027、A0241003、A0241020、A0241005、A0241008、A0241029），DEPC 水、TRIzol（批号分别为 20241023、12236874）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；*Taq* DNA 聚合酶、Prime Script™ RT reagent kit（批号分别为 603524、602637）购自日本 TaKaRa 公司；Apaf-1、ASC、Bcl-2、Bcl-xl、Bax、Bad、caspase-1、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP、GCLC、HO-1、Keap-1、NEK7、NLRP3、NQO1、nuclear Nrf2、PARP、pro-caspase-1、pro-caspase-3、pro-caspase-9、pro-IL-18、pro-IL-1β、total Nrf2、TXNIP、β-actin、GADPH（批号分别为 sc-16457、sc-3460S、sc-32154、sc-2745S、sc-20351、sc-2531S、sc-23694、sc-31629、sc-3065S、sc-24192、sc-10632、sc-4619S、sc-2067S、1675S、sc-0654S、sc-3615S、sc-3671S、sc-52173、sc-1958S、sc-25173、sc-30814、sc-9621S、sc-47230、sc-4023S、sc-26414、sc-4368S、sc-2542S）购自美国 CST 公司；DyLight™ 550、DyLight™ 488、DyLight™ 405 荧光二抗（批号分别为 240156S、2405693S、2405318S）购自美国 Thermo Fisher 公司；抗荧光淬灭剂（批号 20240519）购自北京索莱宝科技有限公司；HRP 标记 IgG 抗体（批号 ab35416）购自英

国 Abcam 公司；蛋白提取和 ECL 发光试剂盒（批号分别为 P0251、P0362）购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.4　仪器　VORTEX-6 型涡旋仪购自美国 Aoran 公司；MA54 型电子天平购自梅特勒托利多科技（中国）有限公司；5427R 型高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司；MCO-18AIC 型 CO_2 培养箱购自日本 Sanyo 公司；HVA-110 型高压灭菌锅购自日本 Hirayama 公司；SW-CJ-2FD 型超净工作台购自苏州净化设备有限公司；Infinite 200PRO 型酶标仪购自瑞士 Tecan 公司；FACSCanto™ Ⅱ型流式细胞仪购自美国 BD 公司；MA200 型倒置显微镜购自日本 Nikon 公司；OLS3100 型激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司；HT7800/HT7700 透射电子显微镜购自 Hitachi 公司；Nano Drop One 型核酸测定仪购自美国 Thermo 公司；CFX Opus 96 型实时定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司；DYCZ-24A/B 型转膜电泳槽、DYCZ-20G 型电泳仪、DYCZ-40S 型垂直电泳槽购自北京六一生物科技有限公司；Tanon MINI Space2000 型凝胶成像分析系统购自上海天能生命科学有限公司。

1.5　实验方法

1.5.1　*细胞培养*　GES-1 细胞置于有含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中，在培养箱（37℃，5% CO_2）中培养。隔天换 1 次培养液，待细胞长至对数生长期时，用胰酶消化细胞，制成悬液后，接种于培养板中用于后续实验。

1.5.2　*MTT 法检测细胞活性*　将 GES-1 细胞（1 × 10^5 个/孔）分别接种于 96 孔板中培养 24 h 后，用 TA（1.562 5、3.125、6.250、12.5、25、50、100 μg/mL）处理后继续 24 和 48 h，取出、每孔加入 20 μL MTT 溶液，然后放入培养箱继续培养 4 h 后用 200 μL 移液枪吸尽培养液，每孔加入 150 μL DMSO，于微孔振荡器上以 500 r/min 速度振荡 5 min，在 490 nm 波长处测定吸光度（*A*），细胞存活率 = $A_{实验组}/A_{对照组}$ × 100%，实验重复 5 次。

1.5.3　*乙醇诱导 GES-1 细胞损伤模型建立*　按照文献介绍的方法[25]将 GES-1 细胞（1 × 10^5 个/孔）分别接种于 96 孔板中培养 24 h 后，加入 5.0%、6.0%、7.0%、8.0% 和 9.0% 的乙醇（终浓度），继续培养 2 h 后，取出，按照“1.5.2”方法测定细胞活力。

1.5.4　*MTT 法检测乙醇诱导 GES-1 细胞损伤活性*　将 GES-1 细胞（1×10^5 个/孔）分别接种于 96 孔板中培养 24 h 后，用 TA（1.562 5、3.125、6.250、12.5、25、50 μg/mL）处理后继续 22 h，然后除对照组外，加入 7% 乙醇处理后再继续培养细胞 2 h 后，取出，按照“1.5.2”方法测定细胞活力。

1.5.5　*细胞划痕和 Transwell 实验*　将 GES-1 细胞（1 × 10^5 个细胞/孔）接种在 24 孔板中培养 24 h，随机分为对照组、模型组、TA（3.125、6.250、12.500 μg/mL）组。然后使用 200 μL 枪头尖端在每个培养板上刮取融合的细胞单层，制成划痕，并在划痕区域的孔上做好标记。用 PBS 冲洗去除漂浮细胞后，药物干预组加入相应浓度的 TA 处理细胞，培养 22 h 后，除对照组外，加入 7% 乙醇处理后继续培养细胞 2 h，分别在划痕后 0、24 h，置于倒置显微镜下固定视野拍摄照片，用 Image J 软件计算细胞迁移率。

将 GES-1 细胞（3×10^5 个/孔）分别接种于 24 孔板中培养 24 h，按照“划痕实验”方法进行细胞分组和处理，然后收集细胞，用无血清培养基将细胞浓度调节至 2×10^5 个/mL 单细胞悬液。将 Transwell 下室加入 800 μL 培养基中，上室加入 150 μL 细胞悬浮液，培养 24 h，取出 Transwell 室，用 PBS 洗涤，4% 多聚甲醛固定小室底部细胞 20 min，用 0.1% 结晶紫染料染色 15 min，经 PBS 清洗后，用 PBS 湿润的棉签擦除上室底部膜表面细胞，取下 Transwell 膜，放置在载玻片上，加入中性树胶密封，然后用显微镜，从中间和周围随机选取 5 个视野拍照，用 Image J 软件计数，测定通过 Transwell 膜细胞数，计算迁移率。

1.5.6　*AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡*　将 GES-1 细胞按 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中培养 24 h，然后随机分为对照组、模型组、TA（12.5 μg/mL）组、ML385（10 μmol/L）组和 MCC950（8 μmol/L）组[26-27]。药物干预组加入相应药物处理细胞，培养 22 h 后，除对照组外，加入 7% 乙醇处理后继续培养细胞 2 h，然后收集细胞，按照 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒说明书介绍的方法用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5.7　*免疫荧光法检测细胞 MMP 和细胞中 ROS 水平*　将 GES-1 细胞按 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中培养 24 h，按照“1.5.6”方法进

行细胞分组和处理，然后收集细胞，按照 JC-1 和 DCFH-DA 检测试剂盒介绍方法检测各组细胞的 MMP 和 ROS 变化[28]。

1.5.8 细胞上清液中 LDH 含量分析 GES-1 细胞的分组和处理同“1.5.6”，干预完成后吸取上清液，按照试剂盒说明书介绍的方法检测各组细胞 LDH 释放率。

1.5.9 ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子含量 按照“1.5.6”的方法进行 GES-1 细胞分组和处理，吸取上清液，按照试剂盒说明书介绍方法检测 IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18、NO、TNF-α 含量。

1.5.10 比色法检测细胞中氧化应激指标含量 GES-1 细胞的分组和处理同“1.5.6”，干预完成后收集细胞，经超声破碎仪破碎后细胞离心，收集上清液，按试剂盒说明书介绍方法测定 CAT、GSH、MPO、SOD、T-AOC 活性和 MDA 含量。

1.5.11 NLRP3 炎症小体共定位分析 按照“1.5.6”的方法进行细胞分组和处理，然后用 PBS 洗涤、4% 多聚甲醛固定、0.3% Triton X-100 处理后，加入 PBST 配制混合一抗（1:60 稀释）4 ℃ 过夜孵育，次日经 TBST 洗涤后用荧光二抗（1:5 000 稀释）室温孵育 1 h。结束后用 PBS 洗，全程避光，最后加入 NucSpot® Live 650 nuclear stain 染色液浸染细胞核 10 min，弃去染液，用滤纸稍稍吸干水分后立即滴加抗荧光淬灭剂封片，置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.5.12 电镜观察细胞内超微结构 按照“1.5.6”的方法进行细胞分组和处理，干预完成后收集细胞，用电镜固定液 4℃ 固定 24 h 后，再转入 1% 锇酸溶液固定细胞 2 h。洗涤后，用 1% 醋酸铀溶液处理 30 min。使用无菌去离子水清洗，在连续梯度的乙醇中进行彻底脱水 3 次后进行渗透和包埋。使用高精度超薄切片机进行切割，使用醋酸铀和枸橼酸铅染色后在透射电镜下观察并拍照。

1.5.13 线粒体 Cytochrome C 释放分析 GES-1 细胞的分组和处理同“1.5.6”，干预完成后收集细胞，使用线粒体分离试剂盒分离 GES-1 细胞线粒体。根据 Sun 等[29]介绍的方法检测 GES-1 细胞中胞浆和线粒体中 cytochrome C 水平。

1.5.14 实时荧光定量 PCR 法检测 GES-1 细胞中 Keap1/Nrf2、NLRP3 炎症小体和线粒体凋亡通路相关基因、细胞因子的 mRNA 表达 将 GES-1 细胞按 3×10^5 个/孔接种于 12 孔板中，按照“1.5.6”的方法进行细胞分组和处理，干预完成后收集细胞，然后按照 TRIzol 试剂盒介绍方法提取 GES-1 细胞总 RNA，用 PrimeScript RT 将其反转录为 cDNA 后，用 SYBR 荧光染料、高效 PCR 酶在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增，以 GAPDH 作为内参，扩增的结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示，具体引物序列详见 Tab.1[19]。

1.5.15 Western blot 检测 GES-1 细胞中 Keap1/Nrf2、NLRP3 炎症小体和线粒体凋亡通路相关基因的蛋白表达 将 GES-1 细胞按 3×10^5 个/孔接种于 12 孔板中，按照“1.5.6”的方法进行细胞分组和处理，干预完成后去培养基，用预冷的 PBS 轻柔漂洗 2 次，严格按照胞浆/胞核蛋白提取说明，分别提取 GES-1 中胞浆/胞核蛋白，采用 BCA 法对肝匀浆上清中的总蛋白浓度进行定量。取 5×SDS 上样缓冲液和 40 μg 蛋白上清（体积比 1:4）混匀并高温变性后，进行蛋白 SDS-PAGE 电泳并将分离后的蛋白电转至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭膜 1.5 h，加入一抗（Bcl-xl，1:600；Apaf-1、ASC、Bcl-2、Bax、Bad、cleaved-PARP、GCLC、HO-1、Keap-1、NQO1、nuclear Nrf2、PARP 和 total Nrf2，1:800；caspase-1，cleaved-caspase-3，cleaved-caspase-9，NEK7，NLRP3，pro-caspase-1、pro-caspase-3、pro-caspase-9、pro-IL-18、pro-IL-1β、TXNIP、β-actin、GAPDH 和 Lamin B1，1:1 000）4℃ 孵育过夜，次日室温复温 30 min 后，加入 HRP 标记的二抗（1:5 000），室温孵育 1 h。再用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。最后，按 1:1 比例混合 ECL 化学发光试剂 A 液与 B 液，均匀滴加至膜上，使用化学发光成像系统采集图像[18-19,30]。采用 Image J 软件对目标条带的灰度值进行分析，以 GAPDH 或作为内参计算目标蛋白的相对表达量。

1.5.16 统计学处理 实验结果用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据分析在 GraphPad Prism 9.0 软件上进行；组间比较用 student's *t*-test，多组间比较用单因素方差分析；$P<0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法筛选合适浓度 TA 和作用时间 为了评价 TA 和乙醇对 GES-1 细胞增殖的影响，选择 0、1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/mL

Tab.1 Primer sequences

Gene	F:(5′-3′)	R:(5′-3′)
Keap-1	AGCGTGGAGAGAGATATGAGCC	ATCATCCGCCACTCATTCCT
Nrf2	GGCTACGTTTCAGTCACTT	AGCTCCTCCCAAACTTGCTC
GCLC	TGGCAATGCAGTGGTGGAT	AACACACCTTCCTTCCCATTGA
HO-1	TGGCAGCTGTCTCAAACCTC	TGCCGTTAAACACCTCCCTC
NQO1	CAGTGGTTTGGAGTCCCTGC	CAGTGGTTTGGAGTCCCTGCA
TXNIP	CAGCAGTGCAAACAGACTTCGG	CTGAGGAAGCTCAAAGCCGAAC
NEK7	ATGGAGGAGCCCGAGAAGAG	CTCCTGCTCCAGCTTCTTCC
NLRP3	GCACTGTGTTTGGAGTGGGTTTCA	CCCGACAGTGGATATAGAACAGA
ASC	TGGATGCTCTGTACGGGAAG	CCAGGCTGGTGTGAAACTGAA
Caspase-1	TTTCCGCAAGGTTCGATTTTCA	GGCATCTGCGCTCTACCATC
COX-1	CTATCACTGGATCCGTTCAT	AAAGTTCCTACCCCCACCAAT
COX-2	CAAATCCTTGCTGTTCCCACCCAT	GCACTGTGTTTGGAGTGGGTTTCA
iNOS	GCAATGGGCAGACTCTGAAG	CGATGTCATGAGCAAAGGCA
PGE2	CTCCTTGCCTTTCACGATTT	ACAACAGAGGACTGAACGCAT
Bcl-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
Bcl-xl	TCCTTGTCTACGCTTTCCACG	GGTCGCATTGTGGCCTTT
Bax	ATGGGCTGGACATTGGAC	GGGACATCAGTCGCTTCAG
Bad	CCAGAGTTTGAGCCGAGTGAG	GATGATGCTTGCCGGAGCC
Apaf-1	AGGACACAGACGGTGGAAAC	ATCGCACTGACCAGCTTCTT
GAPDH	AACGGCACAGTCAAGGCTGA	ACG CCAGTAGACTCCACGACAT

的 TA 分别测试细胞活力。Fig.1B 结果表明，与 Control 组比较，用 TA（1.562 5 ~ 25 μg/mL）处理 24 和 48 h 对 GES-1 细胞增殖活性具有显著促进作用（P<0.05 或 P<0.01），而 TA（50 ~ 100 μg/mL）显著降低了 GES-1 细胞的增殖活性（P<0.01）。Fig.1C 显示，与 Control 组比较，用乙醇（5% ~ 10%）处理 2 h 对 GES-1 细胞增殖活性具有显著抑制作用（P<0.05 或 P<0.01），经计算 IC_{50} 为 7.92%。根据我们当前的实验结果和 Chen 等[4]的研究报道，我们选择与约 60% 细胞存活率相对应的 7.0% 乙醇浓度作为后续乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的最佳造模浓度。用 7.0% 乙醇诱导 GES-1 细胞损伤，选择 0、1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL 的 TA 分别测试细胞活力。Fig.1D 结果表明，与 Model 组比较，用 TA（1.562 5 ~ 12.5 μg/mL）处理 24 和 48 h 对 GES-1 细胞增殖活性具有显著促进作用（P<0.05 或 P<0.01），而 TA（25 ~ 50 μg/mL）显著降低了 7.0% 乙醇损伤 GES-1 细胞的增殖活性（P<0.01）。根据当前实验结果，选择 TA≤12.5 μg/mL、作用细胞 24 h 用于后续实验研究。

2.2 TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞迁移能力的影响 细胞迁移是损伤修复、免疫、感染和癌症转移的重要环节。为了评估 TA 对 GES-1 细胞迁移能力的影响，我们进行了细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验。结果表明，乙醇诱导的 GES-1 细胞迁移面积和迁移细胞数量、迁移指数明显低于 Control 组（P<0.01）；与 Model 组比较，TA（3.125、6.25 和 12.5 μg/mL）处理可显著增加迁移细胞的面积和迁移细胞的数量、迁移指数（P<0.05 或 P<0.01），见 Fig.2。

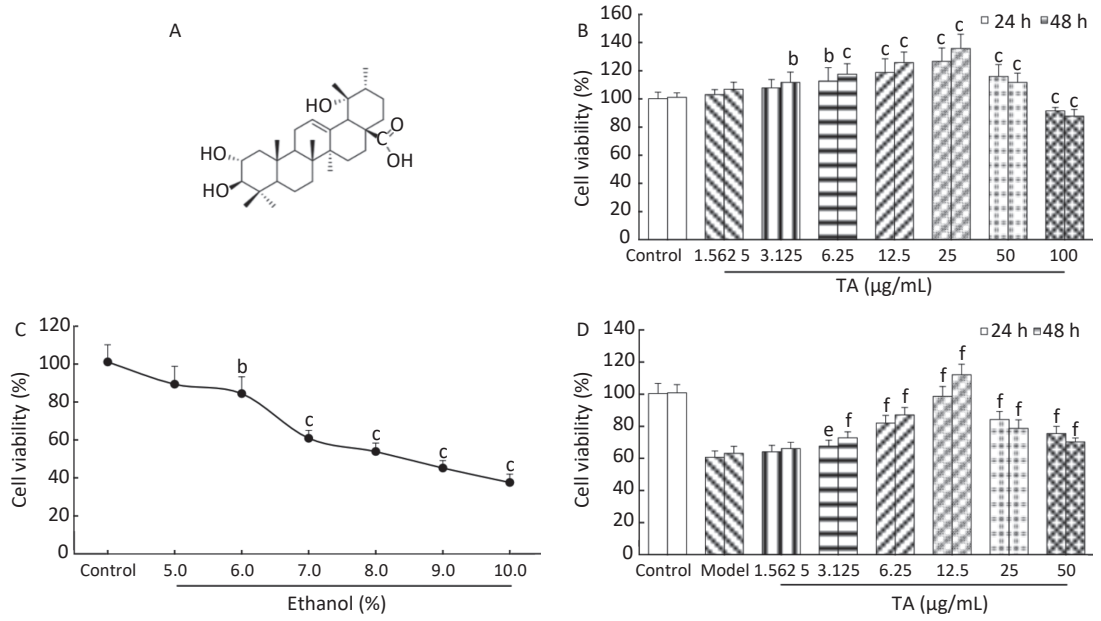


Fig.1 TA's chemical structure and effects of different concentrations of TA and alcohol on the viabilities of GES-1 cells ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: TA's chemical structure; B: effect of TA on the viability of GES-1 cells; C: effect of ethanol on the cell viability of GES-1 cells; D: effect of ethanol on the cell viability of GES-1 cells induced by alcohol; ^{b}P<0.05, ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model group.

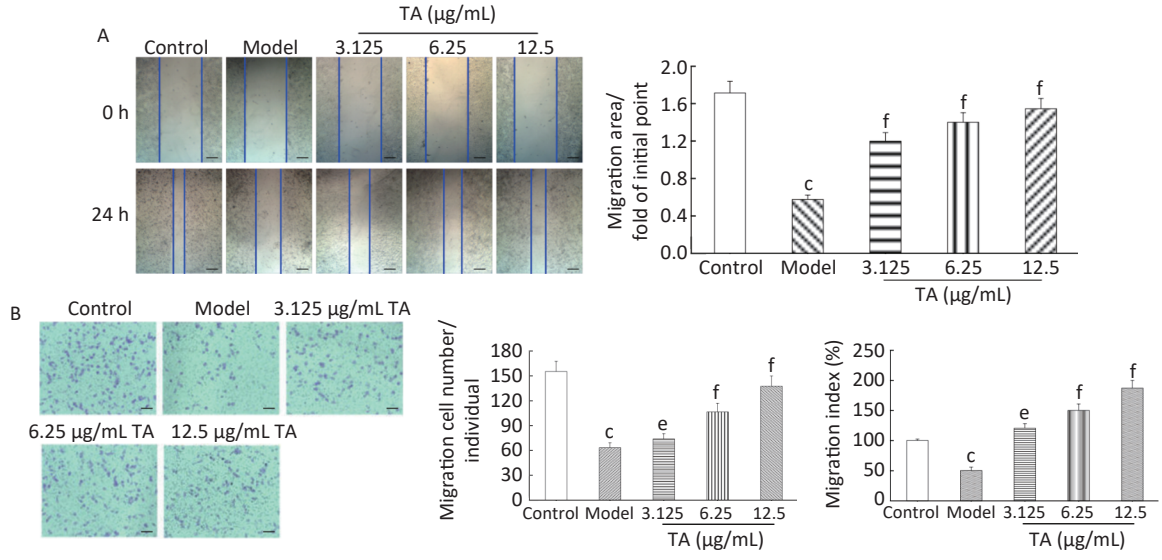


Fig.2 Effect of TA on migration ability of GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: cell scratch assay for detecting cell migration (scale bar=50 μm); B: transwell assay for detecting cell migration (scale bar=100 μm); ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model group.

2.3 TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞凋亡的影响 与 Control 组比较，Model 组 GES-1 细胞凋亡凋亡率明显升高（P<0.01）；与 Model 组比较，TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞凋亡率显著降低，ML385 组 GES-1 细胞凋亡率显著升高（P<0.01），见 Fig.3。

2.4 TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞内 ROS 水平和 MMP 的影响 与 Control 组比较，Model 组 GES-1 细胞内 ROS 水平显著升高、MMP 明显降低（P<0.01）；与 Model 组比较，TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞内 ROS 水平显著降低、MMP 明显升高（P<0.01），ML385 组 GES-1 细胞内 ROS 水平显著升高、MMP 明显降低（P<0.01），见 Fig.4。

2.5 TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞上清液和细胞中细胞因子的影响 与 Control 组比较，乙醇诱导

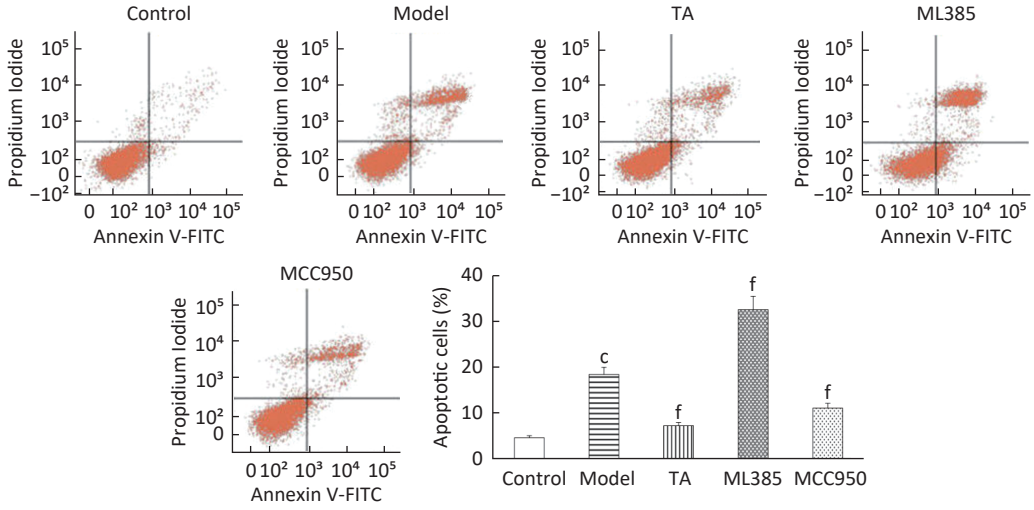


Fig.3　Effect of TA on apoptosis of GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group.

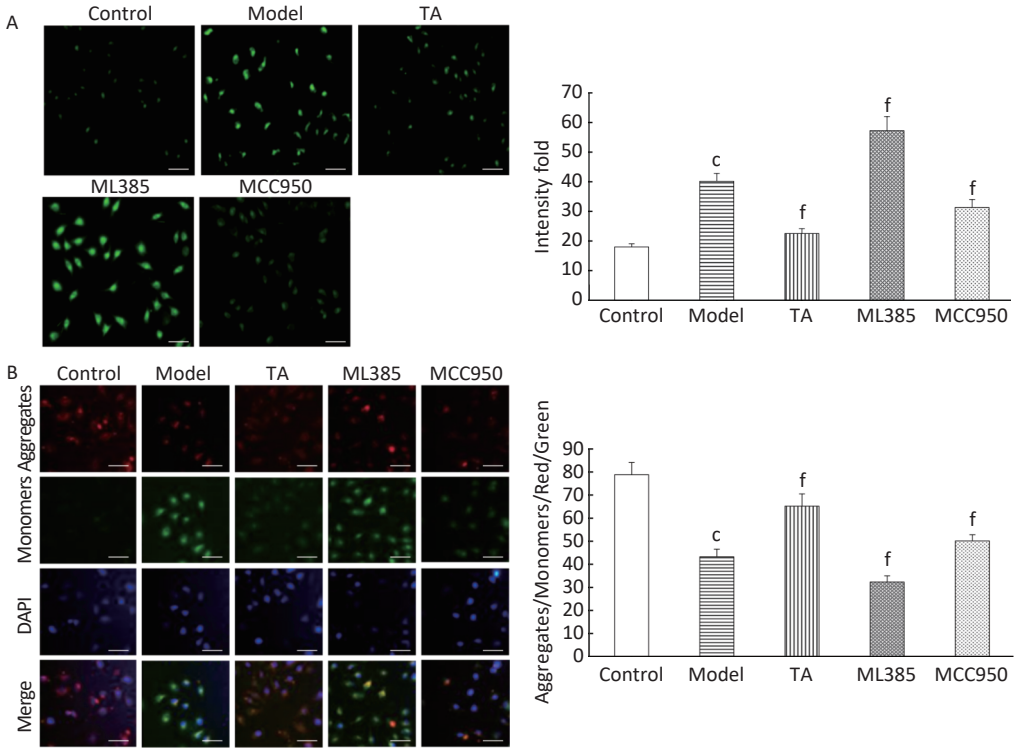


Fig.4　Effects of TA on ROS level and MMP of GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: ROS levels (scale bar=100 μm); B:MMP (scale bar=100 μm); ^{c}P<0.01, compared with the control group; ^{f}P<0.01, compared with the model group.

的 GES-1 细胞上清液中 IL-1β、IL-6、IL-18、NO、TNF-α 含量以及细胞中 COX-2、iNOS mRNA 表达显著升高，上清液中 IL-4、IL-10 水平以及细胞中 COX-1、PGE2 mRNA 表达显著降低（P<0.01）。与 Model 组比较，除 COX-1、PGE2 外，TA 和 MCC950 干预可以显著逆转上述异常变化（P<0.01）；ML385 可显著恶化上述变化（P<0.01）。与 Model 组比较，ML385 和 MCC950 干预显著降低乙醇诱导的 GES-1 细胞中 COX-1、PGE2 mRNA 表达（P<0.01），而 TA 干预则显著明显增加 COX-1、PGE2 mRNA 的表达（P<0.01），见 Fig.5。

2.6　TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞中 LDH 和氧化应激指标的影响　与 Control 组比较，乙醇诱导的 GES-1 细胞 LDH 释放率、细胞中 MDA、MPO 含量明显升高，细胞中 GSH、SOD、CAT 活性和 T-AOC 水平显著降低（P<0.01）。与 Model 组比较，

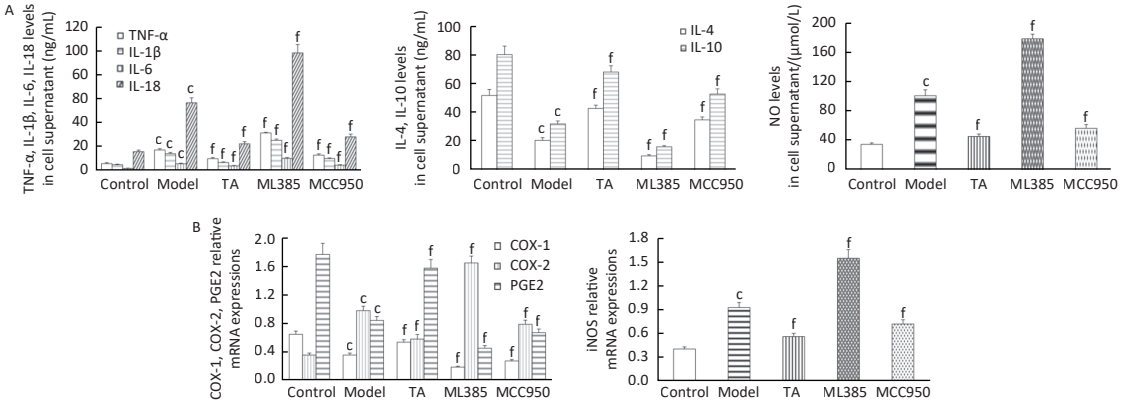


Fig.5　Effect of TA on cytokine levels of the supernatant of GES-1 cells and GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: cytokine levels in cell supernatant; B: mRNA expressions of cytokines in cells; ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group.

TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞 LDH 释放率、细胞中 MDA、MPO 含量明显降低，细胞中 GSH、SOD、CAT 活性和 T-AOC 水平显著升高（P<0.05 或 P<0.01）；ML385 组 GES-1 细胞 LDH 释放率、细胞中 MDA、MPO 含量明显升高，细胞中 GSH、SOD、CAT 活性和 T-AOC 水平显著降低（P<0.01），见 Fig.6。

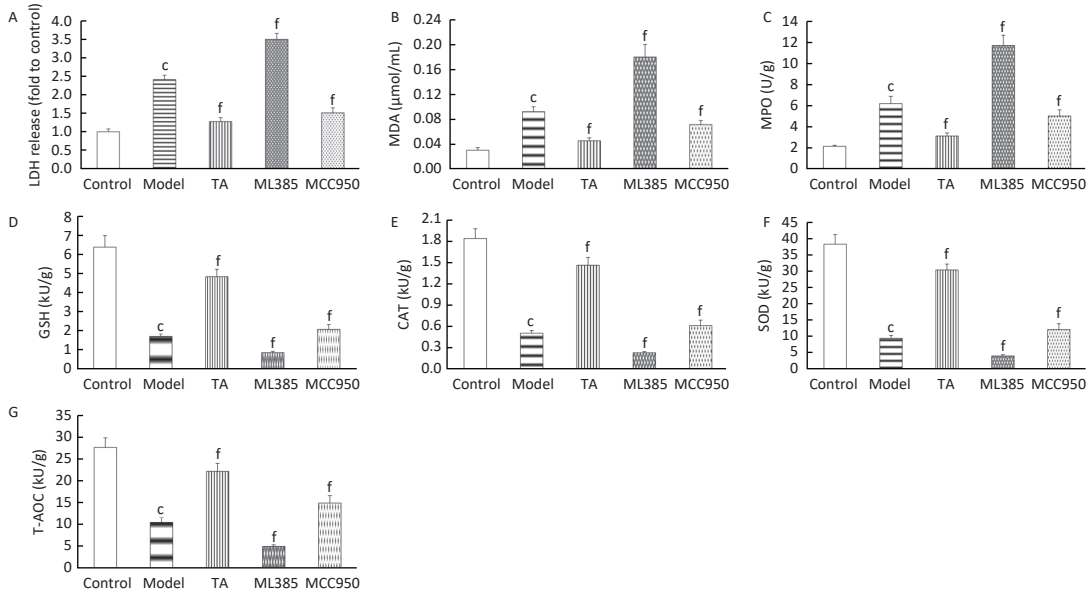


Fig.6　Effects of TA on LDH level and oxidative stress index of GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: LDH release; B: MDA levels; C-G: endogenous antioxidant enzyme activity; ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group.

2.7　TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞的影响　NLRP3 炎症小体异常激活或长期处于激活状态时，会导致炎症因子的持续释放和炎症水平过高，引发多种疾病，而促进 NLRP3 炎症小体组装是激活 NLRP3 炎症小体的前提[31]。与 Control 组相比，Model 组中 NLRP3、ASC、caspase-1 荧光强度明显增加，3 种荧光出现了高度重合，表明 GES-1 细胞在乙醇诱导下促进了 NLRP3 炎症小体共定位；与 Model 组比较，TA 和 MCC950 干预可显著降低 NLRP3、ASC、caspase-1 荧光强度，3 种荧光重合率明显降低；而 ML385 干预显著增加 NLRP3、ASC、caspase-1 荧光强度，3 种荧光重合率明显升高。表明 TA 可抑制乙醇诱导 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位，见 Fig.7。

2.8　TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞超微结构的影响　Control 组细胞整体状况良好，线粒体丰富、嵴结构完整，微绒毛完整、细胞核及核仁较大，细胞膜完整；Model 组线粒体肿胀、细胞内出现空泡、微绒毛少量丢失、细胞膜破损；TA 和 MCC950 组细胞表面有较多短小、纤细的微绒毛，

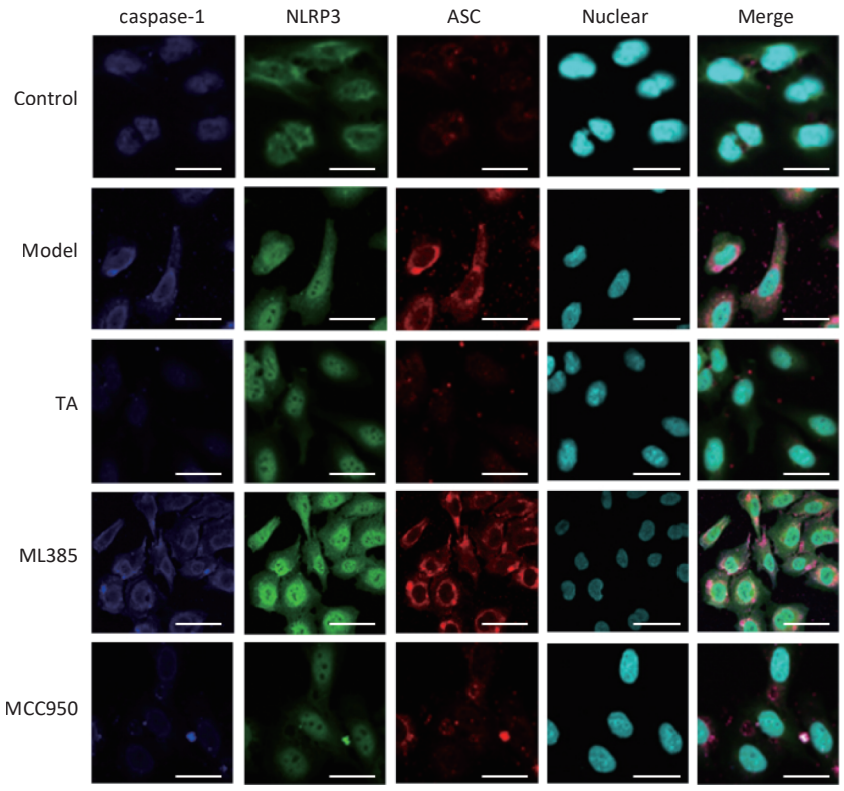


Fig.7　Effect of TA on co localization of NLRP3 inflammasome in GES-1 cells induced by alcohol (scale bar=200 μm)

细胞核及核仁结构完好、染色质均匀、线粒体肿胀减轻；ML385 组细胞胞质浓缩、微绒毛丢失、线粒体内外膜及嵴融合、细胞核大有内陷，染色质固缩，见 Fig.8A。与 Control 组比较，乙醇诱导的 GES-1 细胞线粒体面积减小、线粒体纵横比下降，线粒体数量增加（P<0.01）。与 Model 组比较，TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞线粒体面积增加、线粒体纵横比上升，线粒体数量降低（P<0.01）；ML385 组 GES-1 细胞线粒体面积减小、线粒体纵横比下降，线粒体数量增加（P<0.01），见 Fig.8B-D。

2.9　TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞中 Keap-1/Nrf2 通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达影响

与 Control 组比较，乙醇诱导的 GES-1 细胞中 Keap-1 mRNA 和蛋白表达明显升高，细胞中 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达明显降低（P<0.01）。与 Model 组比较，TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞中 Keap-1 mRNA 和蛋白表达明显降低；细胞中 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达明显升高（P<0.05 或 P<0.01）；ML385 组 GES-1 细胞中 Keap-1 mRNA 表达和蛋白表达明显升高，细胞中 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1、蛋白表达明显降低（P<0.01）。上述结果表明，TA 可通过激活 Keap-1/Nrf2 通路来改善氧化应激，抑制乙醇诱导的 GES-1 细胞损伤，见 Fig.9。

2.10　TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达影响

与 Control 组比较，乙醇诱导的 GES-1 细胞中 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、TXNIP、pro-IL-1β、pro-IL-18 蛋白表达明显升高（P<0.01）。与 Model 组比较，TA 组和 MCC950 组 GES-1 细胞中 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、TXNIP、pro-IL-1β、pro-IL-18 蛋白表达显著降低（P<0.01）；ML385 组 GES-1 细胞中 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、TXNIP、pro-IL-1β、pro-IL-18 蛋白表达明显升高（P<0.01）。上述结果表明，TA 可通过降低 NLRP3 炎症小体通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达，进而抑制乙醇诱

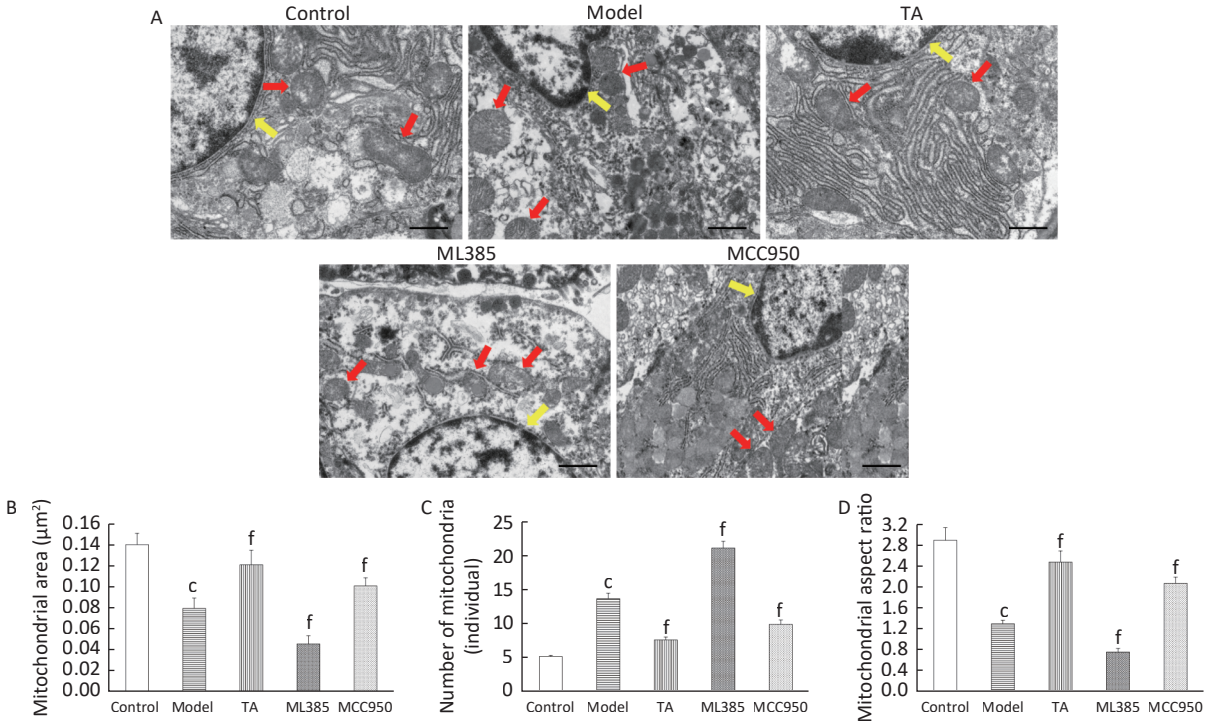


Fig.8 Effect of TA on the ultrastructure in GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: mitochondrial ultrastructure of GES-1 cells under electron microscopy; B: quantitative comparison of mitochondrial area; C: comparison of mitochondrial count, with each count defined within the size range of 4 μm × 4 μm; D: comparison of mitochondrial aspect ratio, i.e. the ratio of mitochondrial long axis to short axis; The red arrow points to the mitochondria, and the yellow arrow points to the nucleus, scale bar=2 μm; ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group.

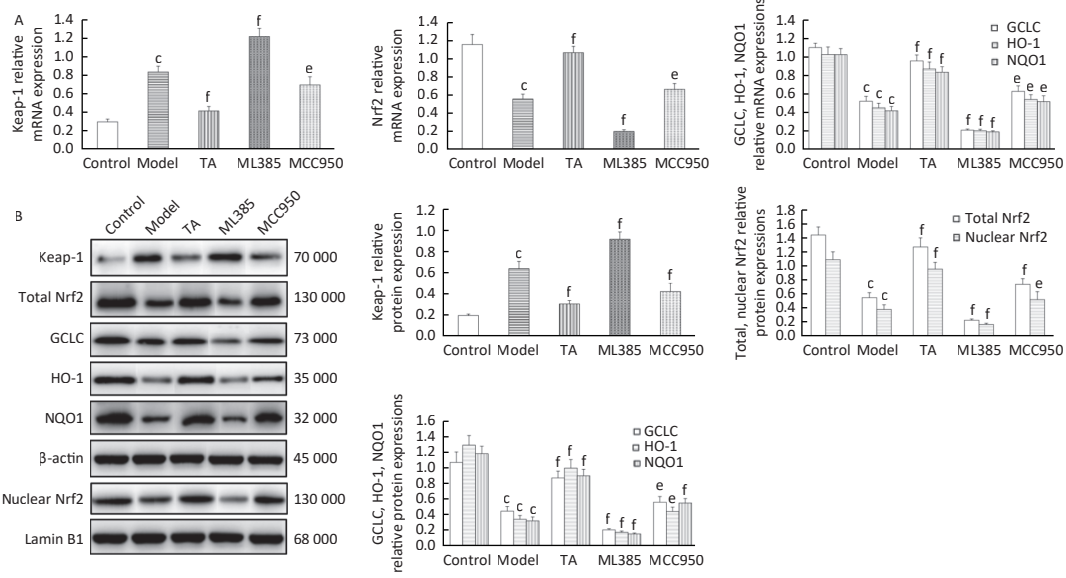


Fig.9 Effects of TA on the relative gene mRNA and protein expressions Keap1/Nrf2 pathway in GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: relative gene mRNA expressions of Keap-1/Nrf2 pathway; B: relative gene protein expressions of Keap-1/Nrf2 pathway; ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model group.

导的 GES-1 细胞分泌细胞因子，见 Fig.10。

2.11 TA 对乙醇诱导的 GES-1 细胞中线粒体凋亡通路相关基因 mRNA 和蛋白表达的影响 与 Control 组比较，乙醇诱导的 GES-1 细胞中 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达及 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率明显降低，细胞中 Bad、Bax、Apaf-1 mRNA 和蛋白表达显著升高（P<0.01）；线粒体中 cytochrome C 含量和细胞中 pro-caspase-3、pro-caspase-9 蛋白

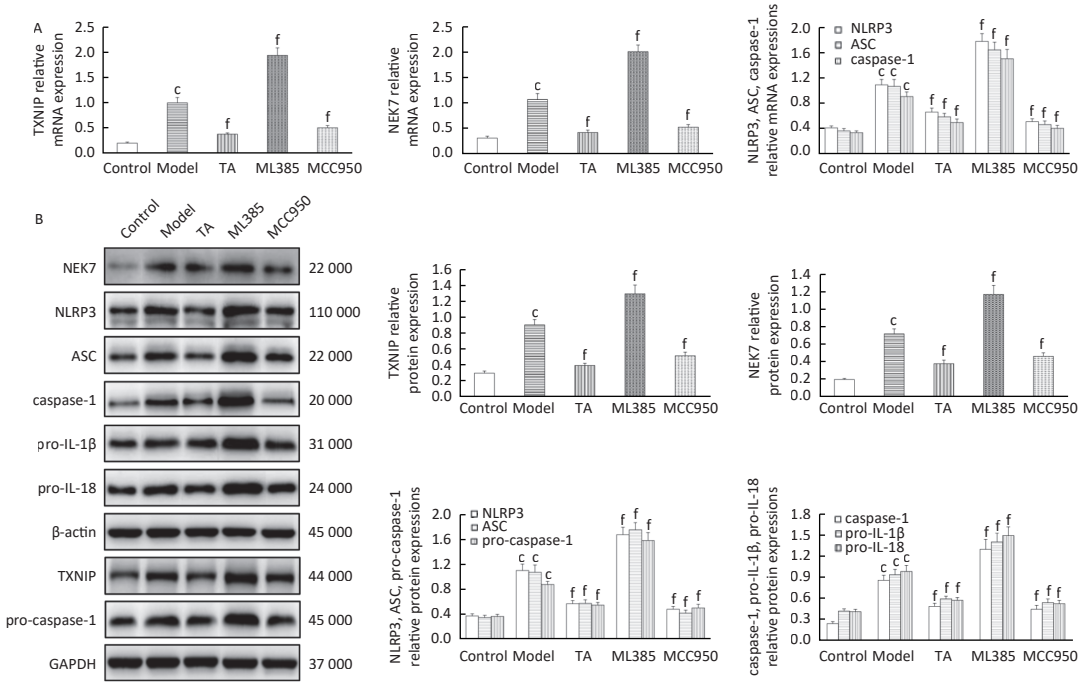


Fig.10　Effects of TA on the relative gene mRNA and protein expressions NLRP3 inflammasome pathway in GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: relative gene mRNA expressions of NLRP3 inflammasome pathway; B: relative gene protein expressions of NLRP3 inflammasome pathway; ^{c}P<0.01, compared with the control group; ^{f}P<0.01, compared with the model group.

表达明显降低，胞浆中 cytochrome C 含量和细胞中 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP-1 蛋白表达显著升高（P<0.01）。与 Model 组比较，用 TA 和 MCC950 干预后，GES-1 细胞中 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达及 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率明显升高，细胞中 Bad、Bax、Apaf-1 mRNA 和蛋白表达显著降低（P<0.01）；线粒体中 cytochrome C 含量和细胞中 pro-caspase-3、pro-caspase-9 蛋白表达明显升高，胞浆中 cytochrome C 含量和细胞中 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP-1 蛋白表达显著降低（P<0.01）。与 Model 组比较，ML385 干预后，细胞中 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达及 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率明显降低，Bad、Bax、Apaf-1 mRNA 和蛋白表达显著升高（P<0.01）；线粒体中 cytochrome C 含量和细胞中 pro-caspase-3、pro-caspase-9 蛋白表达明显降低，胞浆中 cytochrome C 含量和细胞中 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP-1 蛋白表达显著升高（P<0.01）。上述结果表明，TA 可通过抑制线粒体凋亡通路来发挥对乙醇诱导的 GES-1 细胞的保护作用，见 Fig.11。

3　讨论

我们前期研究发现木瓜总三萜对吲哚美辛、乙醇诱导的胃黏膜上皮细胞及大鼠和小鼠胃黏膜损伤具有较好的保护作用[18-22]；临床试验也证实其对消化道损伤也具有较好治疗作用[32-34]。TA 为木瓜总三萜中一种重要活性成分，我们在动物和细胞水平证实其对胃黏膜损伤具有较好保护作用，但其确切的作用机制有待深入研究。在实验中，我们发现 TA 对乙醇所致 GES-1 细胞损伤具有较好的保护作用，可促进乙醇诱导的 GES-1 细胞迁移；显著抑制细胞凋亡和 LDH 释放；降低细胞内 ROS 水平，上清液中 COX-2、IL-1β、IL-6、IL-18、iNOS、NO、TNF-α 水平，细胞中 MDA、MPO 水平和胞浆中 cytochrome C 含量；升高 MMP，上清液中 COX-1、IL-4、IL-10、PGE2 水平，细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 水平和线粒体中 cytochrome C 含量；下调乙醇诱导的 GES-1 细胞中 ASC、Apaf-1、Bad、Bax、caspase-1、COX-2、iNOS、Keap-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、Apaf-1、Bad、Bax、caspase-1、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、cleaved-PARP-1、Keap-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、pro-IL-1β、pro-IL-18、TXNIP 蛋白表

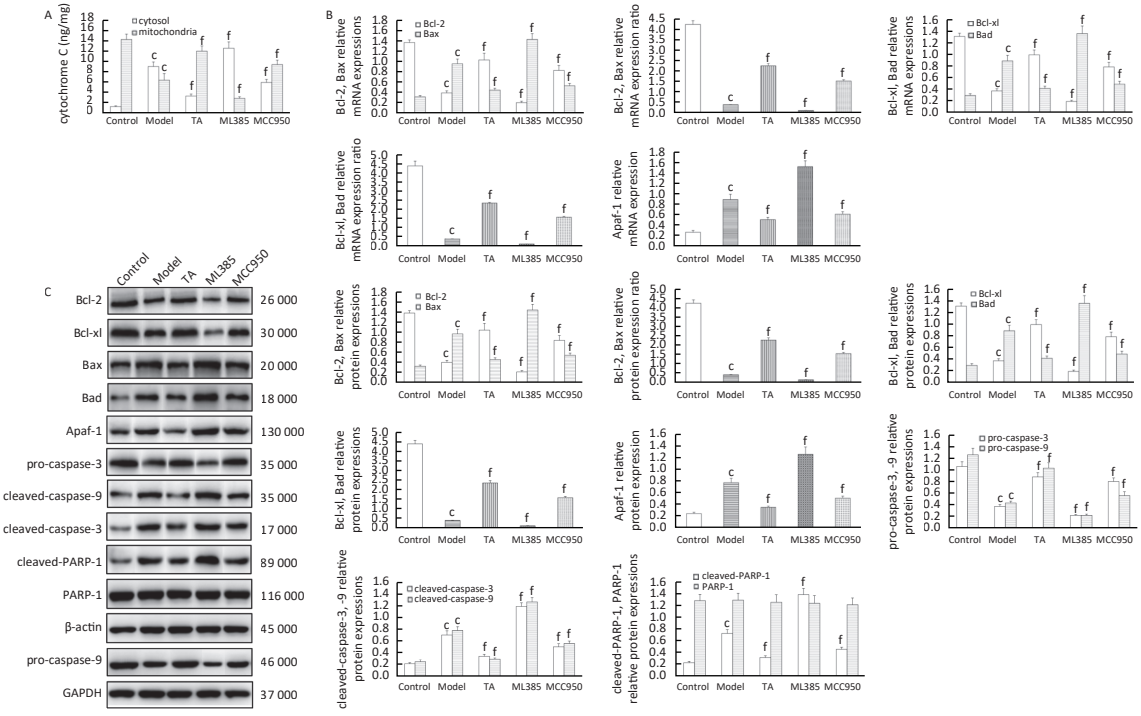


Fig.11 Effects of TA on the relative gene mRNA and protein expressions of mitochondria-dependent apoptotic pathway in GES-1 cells induced by alcohol ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: cytochrome C content in cytosol and mitochondria; B: relative gene mRNA expressions of mitochondria-dependent apoptotic pathway; C: relative gene protein expressions of mitochondria-dependent apoptotic pathway; ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group.

达，抑制 GES-1 细胞内 NLRP3、ASC 和 caaspase-1 共定位，改善细胞核及核仁结构、减轻线粒体肿胀；上调乙醇诱导的 GES-1 细胞中 COX-1、Bcl-2、Bcl-xl、GCLC、HO-1、NQO1、Nrf2、PGE2 mRNA 和 Bcl-2、Bcl-xl、GCLC、HO-1、NQO1、总 Nrf2、胞核 Nrf2、pro-caspase-3、pro-caspase-9 蛋白表达及 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率。

乙醇诱导氧化应激致胃黏膜损伤的发展过程中，ROS 起着至关重要的作用[4,35]，而与 ROS 相关的线粒体功能障碍是导致其损伤的关键因素之一[36]。JC-1 荧光染色、透射电镜观察和 cytochrome C 检测结果显示，GES-1 细胞由于乙醇诱导，导致 ROS 大量生成，引起了线粒体损伤、MMP 降低，cytochrome C 从线粒体流向胞浆增加。此外，ROS 和内源性抗氧化酶系统之间不平衡促进了氧化应激的发生[37]。在实验中，我们发现乙醇诱导的 GES-1 细胞中 SOD、GSH、CAT 和 T-AOC 水平显著降低，MPO、MDA 含量明显升高，这些与 GES-1 细胞损伤标志物 LDH 释放率和细胞凋亡增加、迁移能力降低相一致；用 TA 和 MCC950 干预后可显著抑制乙醇诱导的细胞凋亡、促进细胞迁移，升高 MMP，恢复细胞中 SOD、GSH、CAT 和 T-AOC 水平，降低 ROS、MPO、MDA 含量；相反，ML385 干预可以恶化这一过程。上述结果揭示了 TA 对乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用与增强内源性抗氧化系统功能、清除大量生成的 ROS，从而保护 GES-1 细胞免受氧化应激损伤有关。

越来越多的证据表明 Keap-1/Nrf2 信号通路在细胞防御氧化应激中起着至关重要的作用，是细胞内氧化还原稳态的核心调节因子，调控着 ROS 的产生[38-40]。在正常情况下，Keap1 结合 Nrf2 并将其锚定在细胞质中，并通过泛素-蛋白酶体途径促进 Nrf2 的降解[4,41]。在氧化应激情况下，ROS 的持续产生促进了 Nrf2 与 Keap-1 解离，通过 Nrf2 上 Neh1 结构域的核移位信号在细胞核中积累；进入细胞核后，活化的 Nrf2 会触发 HO-1 和下游 NQO1、GCLC 等抗氧化蛋白酶的产生[42]。因此，Keap1/Nrf2 信号通路在抑制氧化应激，保护细胞免受氧化应激损伤起着重要作用。本研究表明，TA 和 MCC950 干预可降低乙醇诱导的 GES-1 细胞中 Keap-1 mRNA 和蛋白表达，增加了 Nrf2、

GCLC、HO-1、NQO1 mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达；而 ML385 干预则恶化了上述基因的 mRNA 和蛋白表达。上述实验结果表明 TA 可通过激活 Keap-1/Nrf2 通路相关基因的表达、减轻氧化应激来发挥对乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用。

炎症作为对潜在危害的生物反应在胃黏膜防御机制中起着关键作用[43]。乙醇促进炎症反应，导致炎性细胞因子积聚[4]。近年来，学者们研究发现 NLRP3 炎症小体在许多疾病中起着关键作用，是炎症反应和氧化应激之间的桥梁[44-45]。正常情况下，NLRP3 炎症小体处于活性抑制状态；当机体或细胞受到病原菌及其产物等病原相关分子模式（pathogen associated molecular patterns, PAMPs）和 ROS、应激、损伤等危险相关分子模式（dangerous related molecular patterns, DAMPs）刺激后，PAMPs 和 DAMPs 一方面与细胞膜上的受体结合，通过信号级联促进 COX-2、IL-1β, IL-6、iNOS、PGE2、TNF-α 等细胞因子异常分泌。另一方面它们进入细胞内被胞浆中 NLRP3 识别，引起 NLRP3 与 TXNIP 解离，促进 NLRP3 募集 pro-caspase-1、ASC, 完成 NLRP3 炎症小体的组装；进入胞质中 PAMPs 和 DAMPs 还可引起溶酶体破裂、线粒体损伤，导致组织蛋白酶 B、线粒体 DNA 和 ROS 释放，促进 NEK7 与 NLRP3 炎症小体结合，激活 NLRP3 炎症小体，诱导 pro-caspase-1 自我剪切活化，活化的 caspase-1 使 pro-IL-1β、pro-IL-18 剪切为活化的 IL-1β、IL-18，活化的 IL-1β、IL-18 刺激胃黏膜上皮细胞，通过自分泌/旁分泌系统分泌多种更多炎症介质、炎症因子促进胃黏膜损伤的发生发展[4,46]。Xie 等[47]发现在胃溃疡患者胃黏膜组织中可见 ASC、pro-caspase-1 和 NLRP3 表达升高，与胃黏膜损伤和 IL-1β、IL-6、TNF-α 正相关。由此可见，NLRP3 炎症小体通路激活在炎症信号转导及胃黏膜损伤发病机制中发挥着重要作用。本研究发现乙醇诱导的 GES-1 细胞上清液中 COX-2、IL-1β、IL-6、IL-18、iNOS、NO、TNF-α 含量明显升高，COX-1、IL-4、IL-10、PGE2 含量显著降低；分子生物学研究进一步证实乙醇诱导的 GES-1 细胞中 COX-2、iNOS、ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、TXNIP mRNA 和 ASC、caspase-1、NEK7、NLRP3、pro-caspase-1、TXNIP、pro-IL-1β、pro-IL-18 蛋白表达明显升高，COX-1、PGE2 mRNA 表达显著降低；乙醇诱导的 GES-1 细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 共定位增加。用 TA 和 MCC950 干预后，除 COX-1、COX-1、PGE2 水平和 mRNA 表达外，上述 NLRP3 通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达被明显遏制，NLRP3、ASC、caspase-1 共定位被有效抑制；而用 ML385 干预则恶化了上述基因的 mRNA 和蛋白表达，GES-1 细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 共定位进一步增加。Albalawi 等[48]研究发现奥美拉唑纳米混悬剂对乙醇诱导的大鼠胃损伤具有显著的保护作用，可显著降低胃黏膜组织中 NADPH、ROS、MDA 和 NO 水平，降低 SOD 活性。证实 Nrf2 信号通路是细胞内氧化还原稳态的核心调节因子，调控着 ROS 的产生。在实验中，我们发现乙醇损伤的 GES-1 细胞用 Nrf2 抑制剂 ML385 干预后加重氧化应激，NLRP3 通路被进一步激活；这与 ML385 促进乙醇损伤的 GES-1 细胞大量生成 ROS, 进而激活 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 形成拥有活性的 NLRP3 炎症小体，促进炎症因子生成相一致。这证实 Keap-1/Nrf2 与 NLRP3 通路之间存在交叉调控关系。有趣的是，与 ML385 和 MCC950 相比，TA 可以升高乙醇诱导的细胞上清液中 COX-1、PGE2 水平及细胞中 mRNA 表达，而 ML385 和 MCC950 则是降低 COX-1、PGE2 水平和 mRNA 表达。这与前期研究发现 TA 具有抗炎功效[24]同时兼具良好的消化道损伤保护作用相一致[23]。上述实验结果表明 TA 可通过抑制 NLRP3 炎症小体激活和其通路相关基因的表达、减轻炎症反应来发挥对乙醇诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用；同时研究证实 TA 拥有 NSAIDs 所不具备的抗炎的同时兼具良好消化道损伤保护作用及现有胃黏膜保护剂仅具有单一的胃黏膜保护作用的独特优势，显示了其良好的临床应用潜力，有望成为防治胃黏膜损伤的新型候选药物。

临床试验和动物实验表明，在乙醇引起胃黏膜损伤中，细胞凋亡引起的胃黏膜上皮细胞丢失明显，是引起酒精性胃溃疡的重要原因[49-50]。在此疾病的进程中，Bcl-2 和 caspase 家族扮演着重要角色，Bax、Bad 等促凋亡蛋白通过破坏线粒体

内膜和外膜的完整性，引起 MMP 降低和内外膜通透性增加，导致 cytochrome C 等物质从线粒体释放到胞浆中，促进 Apaf-1 和 pro-caspase-9 募集，并将 cytochrome C、Apaf-1 和 pro-caspase-9 组装成凋亡小体，然后激活 caspase-3，引起胃黏膜上皮细胞凋亡；而 Bcl-2、Bcl-xl 等抗凋亡蛋白能够抑制这一过程[18-19]。在实验中，我们发现乙醇损伤的 GES-1 细胞 MMP 降低、细胞中 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 和蛋白表达、Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率及线粒体中 cytochrome C 水平明显降低，Bad、Bax mRNA 和蛋白表达及胞浆中 cytochrome C 水平明显升高；TA 和 MCC950 干预可逆转异常的 MMP 和 Bcl-2、Bcl-xl、Bad、Bax mRNA 和蛋白表达、Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bad 比率及线粒体、胞浆中 cytochrome C 含量；而用 ML385 干预则恶化了上述基因的 mRNA 和蛋白表达及胞浆和线粒体中 cytochrome C 变化。此结果与其对细胞凋亡、细胞迁移的改善结果和透射电镜的观察结果相一致，本研究表明 TA 可恢复乙醇损伤的 GES-1 细胞线粒体功能。caspase 家族是存在于胞浆中的蛋白酶，它在细胞凋亡的调控中也发挥重要作用[51-52]。细胞在正常状态下，胞浆中由 Apaf-1、cytochrome C 和 pro-caspase-9 组装成的凋亡小体较少，当 PAMPs 和 DAMPs 进入胞浆中，导致线粒体损伤、线粒体 DNA 和 ROS 释放，胞浆中 cytochrome C 大量生成，促进凋亡小体组装，然后依次将 pro-caspase-9、pro-caspase-3 剪切成 cleaved-caspase-9、cleaved-caspase-3，从而引起细胞凋亡[15,18]。因此，caspase-9 和 caspase-3 被认为是细胞凋亡的“执行官”。本实验发现乙醇诱导的 GES-1 细胞中 pro-caspase-3 和 pro-caspase-9 的蛋白表达明显降低，Apaf-1、cleaved-caspase-3 和 cleaved-caspase-9 的蛋白表达明显升高；TA 和 MCC950 干预可明显逆转上述蛋白的表达水平，而 ML385 干预则恶化了上述基因的 mRNA 和蛋白表达。上述研究结果表明，TA 对乙醇损伤的 GES-1 细胞保护作用与抑制线粒体介导细胞凋亡有关。

此外，PARP-1 是 PARP 家族和 DNA 损伤传感器中的主要功能基因。当胃黏膜上皮细胞 DNA 受损时，PARP-1 可迅速被激活，同受损的细胞 DNA 结合，通过螺旋、交叉等构象和催化将其分解为 ADP 和烟酰胺，进而形成聚-ADP 核糖复合物来修复受损的 DNA。然而，过度激活的 PARP-1 会耗尽内源 ATP 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，导致能量消耗和胃黏膜上皮细胞死亡[19]。由此可见，PARP-1 在 DNA 转录、修复和染色质调节中起着重要调节作用；同时，PARP-1 还在线粒体到核穿梭机制中扮演着重要角色，它通过凋亡诱导因子（apoptosis inducing factor，AIF）触发 caspase 依赖的细胞凋亡。AIF 是一种具有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶活性的保守促凋亡黄素蛋白。通常，它作为线粒体氧化还原酶参与电子传递；在调节细胞凋亡时，它作为一种主要的效应蛋白，可以直接介导 caspase 之外的凋亡途径[53]。过量盐酸、大量生成的 ROS 等 PAMPs 和 DAMPs 进入胞质中导致 PARP-1 激活，以应 DNA 损伤，触发线粒体释放 AIF，进而促进 PARP-1 依赖性凋亡或细胞死亡[51,54]。在实验中，我们发现在乙醇诱导的 GES-1 细胞中，cleaved-PARP-1 蛋白表达明显升高；TA 和 MCC950 干预可显著降低其表达，ML385 干预则升高了其表达，但 PARP-1 在各组之间没有明显差异。此结果与其对细胞凋亡、迁移的改善和透射电镜的观察结果相一致。

综上所述，TA 对乙醇所致 GES-1 细胞损伤具有显著的保护作用，可减轻乙醇引起的氧化应激和炎症反应，其作用机制与激活 Keap-1/Nrf2 通路、减轻氧化应激，抑制 NLRP3 炎症小体通路激活、减轻炎症反应，进而抑制线粒体凋亡信号通路激活密切相关（Fig.12）。尽管本研究在体外实验中取得了积极结果，仍需注意其局限性。首先，TA 的胃黏膜损伤保护作用尚未在体内模型中进行验证，以更加深入地明确 TA 对醇所致胃黏膜损伤的保护作用及机制。其次，Keap-1/Nrf2、NLRP3 炎症小体通路激活的细胞内调控非常复杂，尽管本研究展示了 TA 对 Keap-1/Nrf2 信号通路的激活作用、NLRP3 炎症小体信号通路的抑制作用，但其他可能参与的信号通路（如 PI3K/AKT、NF-κB）和分子机制尚未得到全面探讨。总体而言，本研究为 TA 的胃黏膜损伤保护作用机制提供了重要线索，未来的深入研究将有助于推动其临床应用。

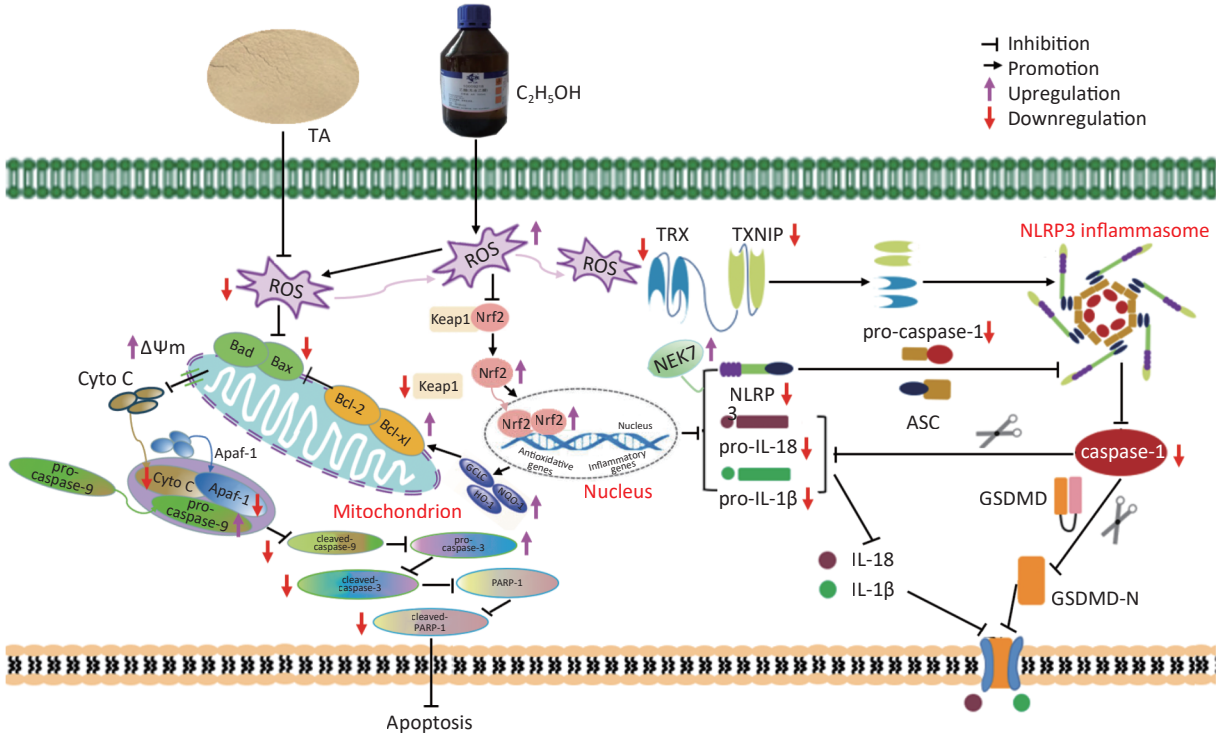


Fig.12 The mechanism of TA regulating Keap-1/Nrf2 and NLRP3 inflammasome signaling pathways in protecting against ethanol induced GES-1 cell damage

参考文献

[1] Mehta G, Sheron N. No safe level of alcohol consumption-implications for global health [J]. J Hepatol, 2019, 70(4): 587-589.

[2] Rumgay H, Shield K, Charvat H, et al. Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study [J]. Lancet Oncol, 2021, 22(8): 1071-1080.

[3] Chang Y, Tian Y, Zhou D, et al. Gentiopicroside ameliorates ethanol-induced gastritis via regulating MMP-10 and pERK1/2 signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90(1): 107213.

[4] Chen Y, Zhao YM, Lu H, et al. Protective effect of short-chain fructo-oligosaccharides from chicory on alcohol-induced injury in GES-1 cells via Keap1/Nrf2 and NLRP3 inflammasome signaling pathways [J]. Front Nutr, 2024, 11(5): 1374579.

[5] Pereira Junior LC, Nascimento FG, Oliveira S, et al. Protective effect against gastric mucosa injury of a sulfated agaran from Acanthophora spicifera [J]. Carbohydr Polym, 2021, 261(6): 117829.

[6] Amirshahrokhi K, Khalili AR. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34(5): 183-188.

[7] Tamura M, Matsui H, Kaneko T, et al. Alcohol is an oxidative stressor for gastric epithelial cells: detection of superoxide in living cells [J]. J Clin Biochem Nutr, 2013, 53(2): 75-80.

[8] Yu C, Mei XT, Zheng YP, et al. Gastroprotective effect of taurine zinc solid dispersions against absolute ethanol-induced gastric lesions is mediated by enhancement of antioxidant activity and endogenous PGE2 production and attenuation of NO production [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740(10): 329-336.

[9] Amirshahrokhi K, Khalili AR. The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide [J]. Chem Biol Interact, 2015, 225(1): 63-69.

[10] Li WF, Hao DJ, Fan T, et al. Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice [J]. Chem Biol Interact, 2014, 208(2): 18-27.

[11] Watanabe T, Higuchi K, Hamaguchi M, et al. Monocyte chemotactic protein-1 regulates leukocyte recruitment during gastric ulcer recurrence induced by tumor necrosis factor-alpha [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287(4): G919-G928.

[12] Liu S, Yan W, Hu YB, et al. Shikonin alleviates endothelial cell injury induced by ox-LDL via AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021(12): 5881321.

[13] Jensen JS, Fan X, Guidot DM. Alcohol causes alveolar epithelial oxidative stress by inhibiting the nuclear fac-

tor (erythroid-derived 2)-like 2-antioxidant response element signaling pathway [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(4): 511-517.

[14] Alzokaky AAM, Abdelkader EM, EL-Dessouki AM, et al. C-phycocyanin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: Role of HMGB1/NLRP3/NF-κB pathway [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2020, 127(4): 265-277.

[15] Ma CC, Zhang L, Huang QD, et al. Canolol alleviates ethanol-induced gastric ulcer by inhibiting p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 pathway [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(15): 9103-9111.

[16] Arab HH, Eid AH, EL-Sheikh AAK, et al. Irbesartan repurposing for the amelioration of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats: role of inflammation, apoptosis, and autophagy [J]. Life Sci, 2022, 308(12): 120939.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 64.

[18] He HB, Feng ML, Xu HY, et al. Total triterpenoids from the fruits of Chaenomeles speciosa exerted gastroprotective activities on indomethacin-induced gastric damage via modulating microRNA-423-5p-mediated TFF/NAG-1 and apoptotic pathways [J]. Food Funct, 2020, 11(1): 662-679.

[19] Zhang YY, Xu HY, He HB, et al. Total triterpenes from the fruits of Chaenomeles speciosa (Sweet) Nakai protects against indomethacin-induced gastric mucosal injury: involvement of TFF1-mediated EGF/EGFR and apoptotic pathways [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(3): 409-423.

[20] 贺海波, 李小琴, 李小妹, 等. 木瓜总三萜和奥美拉唑联用对吲哚美辛诱导大鼠胃溃疡的治疗作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2338-2347.

[21] 贺海波, 张永峰, 李小妹, 等. 木瓜三萜对吲哚美辛致胃黏膜损伤小鼠胃酸分泌及胃黏膜屏障的影响 [J]. 生物资源, 2017, 39(3): 211-216.

[22] 覃慧林, 张永峰, 贺海波, 等. 木瓜三萜抗吲哚美辛诱导 RGM-1 细胞凋亡的作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(12): 1347-1353.

[23] He JY, Li J, Zhang YY, et al. Tormentic acid, a triterpenoid isolated from the fruits of Chaenomeles speciose, protected indomethacin-induced gastric mucosal lesion via modulating miR-139 and the CXCR4/CXCL12/PLC/PKC/Rho a/MLC pathway [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 1343-1363.

[24] 贺海波, 朱丽金, 贺君宇, 等. 委陵菜酸对幽门螺杆菌诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4892-4903.

[25] Duan ZW, Yu SS, Wang SP, et al. Protective effects of piperine on ethanol-induced gastric mucosa injury by oxidative stress inhibition [J]. Nutrients, 2022, 14(22): 4744.

[26] Liu XM, Ma YM, Luo LJ, et al. Dihydroquercetin suppresses cigarette smoke induced ferroptosis in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease by activating Nrf2-mediated pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 96(2): 153894.

[27] Lin NH, Song X, Chen B, et al. Leptin is upregulated in epididymitis and promotes apoptosis and IL-1β production in epididymal epithelial cells by activating the NLRP3 inflammasome [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88(11): 106901.

[28] 赵芳卿, 杨雯雯, 殷玉杰, 等. 丹酚酸 A 激活 AMPK 及 SIRT1 减轻棕榈酸诱导的肝细胞脂毒性 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(3): 241-249.

[29] Sun WH, Liu F, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(2): 164-169.

[30] 贺君宇, 覃诗颖, 郑婧琪, 等. 木瓜总三萜和吲哚美辛联用对弗氏完全佐剂诱导大鼠类风湿性关节炎的治疗作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(8): 42-50.

[31] Fu JN, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41(4): 301-316.

[32] 贺海波, 张永峰, 李小妹, 等. 木瓜三萜片与奥美拉唑胶囊联用治疗非甾体抗炎药致上消化道出血临床研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 209-212.

[33] 贺海波, 李小妹, 李小琴, 等. 木瓜三萜与瑞巴派特联用治疗非甾体抗炎药致小肠损伤临床研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 172-176.

[34] 张继红, 李小妹, 石孟琼, 等. 木瓜三萜联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎临床疗效、炎症因子及肠黏膜屏障保护因子的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(10): 1165-1173.

[35] Pan JS, He SZ, Xu HZ, et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(38): 5857-5867.

[36] Miao ZF, Sun J X, Huang XZ, et al. Metaplastic regeneration in the mouse stomach requires a reactive oxygen species pathway [J]. Dev Cell, 2024, 59(9): 1175-1191.

[37] Korbut E, Brzozowski T, Magierowski M. Carbon monoxide being hydrogen sulfide and nitric oxide molecular sibling, as endogenous and exogenous modulator of oxidative stress and antioxidative mechanisms in the digestive system [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020(4): 5083876.

[38] Pu XN, Lu C, Yang X, et al. Unveiling the hepatoprotective mechanisms of Desmodium heterocarpon (L.) DC: Novel flavonoid identification and Keap1/Nrf2 pathway activation [J]. Phytomedicine, 2025, 136(1): 156323.
[39] 焦蓓蓓, 栗田, 周蓓蓓, 等. 右归丸经 Serpina3k 调控 Keap1/Nrf2 信号通路抑制氧化应激诱发的颗粒细胞损伤 [J]. 中国中药杂志, 202, 50(4): 1111-1120.
[40] Shi Y, Sun Y, Sun XP, et al. Up-regulation of HO-1 by Nrf2 activation protects against palmitic acid-induced ROS increase in human neuroblastoma BE(2)-M17 cells [J]. Nutr Res, 2018, 52(4): 80-86.
[41] Zhu JY, Wang HH, Chen F, et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 99(10): 544-556.
[42] Wang SL, Huang J, Chen YT, et al. Qifu-yin activates the Keap1/Nrf2/ARE signaling and ameliorates synaptic injury and oxidative stress in APP/PS1 mice [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 333(10): 118497.
[43] Li MQ, Lv RZ, Xu XM, et al. Tricholoma matsutake-derived peptides show gastroprotective effects against ethanol-induced acute gastric injury [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(49): 1498514994.
[44] Haneklaus M, O'neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation [J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 53-62.
[45] Hughes MM, O'neill LA. Metabolic regulation of NLRP3 [J]. Immunol Rev, 2018, 281(1): 88-98.
[46] Liang HS, Liang YY, Wu LP, et al. Pretreatment with Citrus reticulata 'Chachi' polysaccharide alleviates alcohol-induced gastric ulcer by inhibiting NLRP3/ASC/caspase-1 and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Nutrients, 2025, 17(13): 2062.
[47] Xie J, Fan L, Xiong LY, et al. Rabeprazole inhibits inflammatory reaction by inhibition of cell pyroptosis in gastric epithelial cells [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2021, 22(1): 44.
[48] Albalawi M, Khateeb S. Enhanced therapeutic efficacy of omeprazole nanosuspension in ethanol-induced gastric ulcer: a focus on oxidative stress and inflammatory pathways [J]. Biomolecules, 2025, 15(6): 902.
[49] Hauge T, Persson J, Sjölund K. et al. Neuropeptides in the duodenal mucosa of chronic alcoholic heavy drinkers [J]. Alcohol Alcohol, 2001, 36(3): 213-218.
[50] Luo B, Cai MG, Huang HY, et al. A pectic polysaccharide from wax gourd peel improves ethanol-induced gastric ulcer injury in mice via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 316(Pt 2): 144755.
[51] 石孟琼, 贺君宇, 王晓, 等. 木瓜总三萜对幽门螺杆菌诱导小鼠胃炎的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18): 4782-4792.
[52] He HB, Li XM, Yu HL, et al. Gastroprotective effect of araloside A on ethanol- and aspirin-induced gastric ulcer in mice: involvement of H^+/K^+-ATPase and mitochondrial-mediated signaling pathway [J]. J Nat Med, 2019, 73(2): 339-352.
[53] Zhang H, Hu YK, Wang H, et al. Cytoplasmic upregulation of Cyto c and AIF serve as biomarkers of mechanical asphyxia death [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 4568-4583.
[54] 贺海波, 吴勉, 许杰, 等. 基于 Drp1/HK1/NLRP3 和线粒体凋亡信号通路研究香草酸改善异丙肾上腺素致小鼠心脏纤维化的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(8): 2193-2208.

Tormentic acid protects alcohol induced GES-1 cells via regulating Keap-1/Nrf2 and NLRP3 inflammasome signaling pathways

ZHOU Rufeng[1,2], ZHANG Ying[1,2], MENG Ziyuan[2], LIU Jie[2], SHI Mengqiong[1], LIAO Yong[3], XU Jie[4], LI Haoran[4], TAN Yanqing[4], QIN Huilin[4], JIA Liangliang[5], YOU Yan[3]

[1] Basic Medical College of China Three Gorges University & Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Yichang 443002, Hubei, China; [2] Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang Laboratory of Development and Utilization of Health Products with Drug and Food Homology, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China; [3] Renhe Hospital Affiliated to China Three Gorges University, Yichang 443001, Hubei, China; [4] Traditional Chinese Medicine Hospital & Hubei Clinical Research Center for Functional Digestive Diseases of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China; [5] Yichang Central People's Hospital & The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

ABSTRACT **AIM**: To investigate the protective effect and mechanisms of tormentic acid (TA) on GES-1 cells induced by alcohol. **METHODS**: The GES-1 cell injury model induced alcohol was established. The GES-1 cells were divided into control group, model group, TA (12.5 μg/mL) group, Nrf2 inhibitor group (ML385, 10 μmol/L) group and NLRP3 inhibitor (MCC950, 8 μmol/L) group. After adding the corresponding drugs to the drug intervention group cells and culturing them for 22 hours, cells were treated with 7% alcohol except for the control group and cultured for another 2 hours, and then the cell supernatant and cells were collected, respectively. MTT assay was used to test cell viability; Cell scratch and Transwell were utilized to detect cell migration; AnnexinV FITC/PI double staining was used to test cell apoptosis; Immunofluorescences were used to detect MMP and ROS level in alcohol induced GES-1 cells; Colorimetric and ELISA methods were used to test the levels of LDH, IL-4, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-18, NO and TNF-α in the GES-1 cell supernatants; Colorimetric method was utilized to detect the levels of CAT, GSH, MDA, MPO, SOD, T-AOC in alcohol induced GES-1 cells, and cytochrome C in the cytosol and mitochondria of GES-1 cells; Immunofluorescence was utilized to detect the co-localization of NLRP3, ASC and caspase-1; The changes in intracellular ultrastructure were observed under an electron microscope; Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of Apaf-1, ASC, Bcl-2, Bcl-xl, Bad, Bax, caspase-1, COX-1, COX-2, GCLC, HO-1, iNOS, Keap-1, NEK7, NLRP3, NQO1, Nrf2, PGE2 and TXNIP in alcohol induced GES-1 cells; Western blot was utilized to test the protein expression levels of Apaf-1, ASC, Bcl-2, Bcl-xl, Bad, Bax, caspase-1, cleaved-caspase-3, cleaved-caspase-9, PARP-1, cleaved-PARP-1, GCLC, HO-1, Keap-1, NEK7, NLRP3, NQO1, nuclear Nrf2, pro-caspase-1, pro-caspase-3, pro-caspase-9, pro-IL-18, pro-IL-1β, total Nrf2 and TXNIP in GES-1 cells. **RESULTS**: Compared with the model group, TA prominently promote alcohol induced GES-1 cell migration, depressed cell apoptosis and LDH release, substantially reduced intracellular ROS level, IL-1β, IL-6, IL-18, NO, TNF-α levels in the GES-1 cell supernatants, MDA, MPO levels in alcohol induced GES-1 cells and cytochrome C content in cytosol (P<0.01), substantially elevated mitochondrial membrane potential, IL-4, IL-10 levels in the GES-1 cell supernatants, CAT, GSH, SOD, T-AOC levels in alcohol induced GES-1 cells and cytochrome C content in the mitochondria (P<0.01). It dramatically down-regulated the ASC, Apaf-1, Bad, Bax, caspase-1, COX-2, iNOS, Keap-1, NEK7, NLRP3, TXNIP mRNA and ASC, Apaf-1, Bad, Bax, caspase-1, cleaved-caspase-3, cleaved-caspase-9, cleaved-PARP-1, Keap-1, NEK7, NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL-1β, pro-IL-18, TXNIP protein expressions in alcohol induced GES-1 cells, restrained co-localization of NLRP3, ASC and caspase-1 in alcohol induced GES-1 cells; The structure of the nucleus and nucleolus was intact, chromatin was uniform, and mitochondrial swelling was reduced; TA up-regulated the COX-1, Bcl-2, Bcl-xl, GCLC, HO-1, NQO1, Nrf2, PGE2 mRNA and Bcl-2, Bcl-xl, GCLC, HO-1, NQO1, total Nrf2, nuclear Nrf2, pro-caspase-3, pro-caspase-9 protein expressions and Bcl-2/Bax, Bcl-xl/Bad ratios in the alcohol induced GES-1 cells (P<0.01). **CONCLUSION**: TA has a significant protective effect on alcohol damaged GES-1 cells, and its mechanism is closely related to activating the Keap-1/Nrf2 pathway, reducing oxidative stress, inhibiting the activation of the NLRP3 inflammasome pathway, alleviating inflammatory response, and thereby suppressing the activation of the mitochondrial apoptosis pathway.

KEYWORDS tormentic acid; gastric cell damage; oxidative stress; inflammatory response; Keap1/Nrf2 signaling pathway; NLRP3 inflammasome signaling pathway