

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250208.006

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250208.1418.012>

基于网络药理学和实验验证探究牛耳枫-辣蓼抗胃黏膜损伤作用及机制

支芸芸¹, 田莹¹, 凌乙文¹, 牛海艳²✉, 任守忠¹✉

(1. 海南医科大学药学院, 海南海口 571199; 2. 海南医科大学第一附属医院病理科暨海南医科大学基础医学与生命科学学院病理教研室, 海南海口 570102)

[摘要] **目的:** 探究牛耳枫-辣蓼(*Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper*, DCPH)对胃黏膜损伤的保护作用及机制。**方法:** 网络药理学获取DCPH干预胃黏膜损伤的活性成分及主要靶点, 构建PPI网络, 进行GO和KEGG富集分析筛选可能涉及的生物过程和信号通路。利用乙醇刺激GES-1细胞构建胃黏膜损伤的体外模型, 通过检测细胞活力、活性氧(ROS)含量、TNF- α 和IL-1 β 表达、线粒体膜电位水平以及TLR4和NF- κ B蛋白表达, 验证DCPH对胃黏膜损伤的保护作用及机制。**结果:** 通过网络药理学筛选出DCPH干预胃黏膜损伤的潜在活性成分44种, 核心靶点TNF、BCL2、EGFR、TLR4等29个, 涉及PI3K-Akt、HIF-1、NF- κ B和ROS等多个生物过程和信号通路。体外实验结果显示, 与正常组相比, 乙醇能明显抑制GES-1细胞活力($P<0.001$)、提高ROS含量($P<0.001$)、诱导炎症因子TNF- α 和IL-1 β mRNA表达($P<0.001$), 明显降低细胞内线粒体膜电位, 并明显上调TLR4和NF- κ B蛋白表达($P<0.01$)。与模型组比较, DCPH明显提高乙醇诱导的GES-1细胞活力($P<0.05$), 改善细胞形态, 同时降低细胞内ROS水平($P<0.05$)、抑制TNF- α 和IL-1 β 表达($P<0.05$)、恢复线粒体膜电位水平, 明显抑制TLR4和NF- κ B蛋白表达($P<0.05$)。**结论:** DCPH通过下调TLR4/NF- κ B信号通路表达, 降低细胞ROS含量和抑制炎症因子表达, 恢复细胞线粒体膜电位水平, 减轻GES-1细胞损伤, 从而发挥抗胃黏膜损伤作用。

[关键词] 牛耳枫-辣蓼; 胃黏膜损伤; GES-1细胞; 网络药理学; TLR4/NF- κ B

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)24-1841-10

Exploring the protective effects and mechanisms of *Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper* on gastric mucosal injury based on network pharmacology and experimental verification

ZHI Yunyun¹, TIAN Ying¹, LING Yiwen¹, NIU Haiyan²✉, REN Shouzhong¹✉

(1. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University and Department of Pathology, School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82260920, 82474456); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (S202411810030)

[Author]: ZHI Yunyun, E-mail: zhiyunyun123@163.com; TIAN Ying, E-mail: 1436734367@qq.com.

[Correspondence to]: REN Shouzhong, Professor, Ph.D., E-mail: hy0207054@muh.edu.cn; NIU Haiyan, Professor, Ph.D., E-mail: hy0206065@muh.edu.cn.

Received: 2024-10-21 Revised: 2025-01-17

JHMu, 2025;31(24):1841-1850

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects and mechanisms of *Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper* (DCPH) on gastric mucosal injury. **Methods:** The active components and main targets of DCPH in the intervention of gastric mu-

[基金项目] 国家自然科学基金(82260920, 82474456); 大学生创新创业训练计划项目(S202411810030)

[作者简介] 支芸芸, E-mail: zhiyunyun123@163.com; 田莹, E-mail: tianying6678@qq.com。

[通讯作者] 任守忠, 教授, 博士, E-mail: hy0207054@muh.edu.cn; 牛海艳, 教授, 博士, E-mail: hy0206065@muh.edu.cn。

[收稿日期] 2024-10-21 **[修回日期]** 2025-01-17 **网络出版时间:** 2025-02-08 14:26:18

cosal injury were obtained from network pharmacology, PPI network was constructed, and GO and KEGG enrichment analysis were carried out to screen possible biological processes and signaling pathways. The model of gastric mucosal injury *in vitro* was established by stimulating GES-1 cells with ethanol, and the protective effects and mechanism of DCPH on GES-1 cells were verified by detecting cell viability, reactive oxygen species (ROS) content, *TNF- α* and *IL-1 β* expression, mitochondrial membrane potential level, and TLR4 and NF- κ B protein expressions. **Results:** Through network pharmacology, 44 potential active components of DCPH in the intervention of gastric ulcer/gastritis were screened out, including 29 core targets such as TNF, BCL2, EGFR and TLR4, which involved many biological processes and signaling pathways, such as PI3K-Akt, HIF-1, NF- κ B and ROS. The *in vitro* experimental results showed that compared to the normal group, ethanol could significantly inhibit the activity of GES-1 cells ($P<0.001$), increase the ROS content ($P<0.001$), induce the expression of inflammatory factors *TNF- α* and *IL-1 β* mRNA ($P<0.001$), significantly reduce the intracellular mitochondrial membrane potential, and significantly up-regulate TLR4 and NF- κ B protein expressions. Compared to the model group, DCPH significantly increased the vitality of GES-1 cells induced by ethanol ($P<0.05$), improved the cell morphology, decreased the intracellular ROS level ($P<0.05$), inhibited the expressions of *TNF- α* and *IL-1 β* ($P<0.05$), restored the mitochondrial membrane potential level, and significantly inhibited the expressions of TLR4 and NF- κ B proteins ($P<0.05$). **Conclusion:** DCPH alleviates the damage of GES-1 cells and plays an anti-gastric mucosal injury role by down-regulating the expression of TLR4/NF- κ B signaling pathway, reducing the ROS content, inhibiting the expression of inflammatory factors, and restoring the level of mitochondrial membrane potential.

[Key words] *Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper*; Gastric mucosal injury; GES-1; Network pharmacology; TLR4/NF- κ B

胃黏膜损伤是指患者在严重创伤、危重疾病等应激状态下或乙醇、药物等理化因素直接刺激下,胃黏膜发生程度不一的以糜烂、浅表处溃疡和出血为标志的病理变化,严重者可导致消化道穿孔,致使全身情况进一步恶化,是急慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等疾病的主要病理环节^[1],因此,保护和改善胃黏膜损伤已经成为临床上治疗各型胃炎和胃溃疡疾病的基本手段。

牛耳枫(*Daphniphyllum calycinum* Benth.)和辣蓼(*Polygonum hydropiper* L.)为海南黎族传统药用植物,具有多种生物学功效。二者配伍制成的中成药枫蓼肠胃康具有抗炎、止泻和抗溃疡等药理作用,临床上常用于治疗急慢性胃炎、胃溃疡和以腹泻为主的肠易激综合征等^[2-4]。但其作用机制尚未阐明。

人胃黏膜上皮细胞(human gastric mucosal epithelial cells, GES-1)是常见的用于评估胃黏膜损伤的细胞系。研究表明,乙醇通过刺激 GES-1 细胞炎症反应、胃组织氧化应激以及凋亡而诱发胃黏膜损伤^[5,6],中药能通过多靶点、多途径保护胃黏膜,疗效好且安全性高^[7]。因此,本研究拟利用网络药理学预测牛耳枫-辣蓼(*Daphniphyllum calycinum*-*Polygonum hydropiper*, DCPH)改善胃黏膜损伤的活性成分及分子机制,通过乙醇刺激 GES-1 细胞构建胃黏膜损伤的体外模型,探究 DCPH 抗胃黏膜损伤的具体作用机制,以期为 DCPH 的开发研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DCPH 来自海南海口制药厂有限公司(批号:02230617)、CCK-8 试剂盒和 DAPI 染色液(Biosharp 公司,货号 BS350A、BL105A);活性氧(ROS)试剂盒和 JC-1 检测试剂盒(Beyotime 公司,货号 S0033S、C2006)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海翌圣,货号 40302ES50)、抗体 TLR4、NF- κ B 和 GAPDH (Proteintech, 货号 19811-1-AP、10745-1-AP、10494-1-AP)。

多功能酶标仪(BIO-TEK, 型号 SynergyHTX);倒置荧光显微镜(OLYMPUS, 型号 IX51+DP80);荧光定量 PCR 仪(赛默飞,型号 QuantStudioTM 6 Flex)等。GES-1 细胞株购于普诺赛有限公司,细胞货号:CL-0563。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析和分子对接

1.2.1.1 获取 DCPH 活性成分、靶点和疾病靶点 利用 Web of Science、PubMed 和 CNKI 收集牛耳枫和辣蓼的化学成分,借助 SwissADME 对成分进行筛选,选择在“Pharmacokinetics”中的“GI absorption”为“High”以及在“Druglikeness”中显示两个“YES”的成分^[8]。利用 SwissTargetPrediction 预测有效成分的全部靶点。

由于胃炎和胃溃疡是不同程度胃黏膜损伤的疾病表现,因此选择“gastric ulcer”和“gastritis”作为检索词,通过 OMIM、TTD、GeneCards、DrugBank 数据库分别检索胃溃疡和胃炎疾病的潜在靶点,然

后合并靶点并去重。

1.2.1.2 收集共同靶点和构建PPI网络 利用Venny2.1.0绘制“DCPH-胃黏膜损伤”韦恩图取交集,得到共同靶点。通过STRING在线分析获取PPI网络,并用Cytoscape3.7.2软件可视化和分析PPI网络拓扑参数。选择高于Closeness Centrality、Betweenness Centrality和Degree Centrality 3者中位数的作为核心靶点。

1.2.1.3 GO和KEGG富集分析 利用DAVID数据库对共同靶点进行GO和KEGG通路富集分析^[9]。使用微生信在线平台对可能性较大的条目进行可视化分析。

1.2.2 细胞培养与分组

1.2.2.1 细胞培养及给药 GES-1采用含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI-1640培养基、并置于5% CO₂、37℃恒温培养箱中进行培养,在细胞达到90%时传代。

选择对数生长期的细胞,调整细胞密度为1×10⁴个/mL,以每孔100 μL接种到96孔板中培养。24 h后加入不同剂量DCPH(终浓度为0、1.25、2.5、5、10、20 mg/mL),每组设3个复孔,继续培养12、24和48 h后利用CCK-8试剂盒测定细胞活力。

1.2.2.2 乙醇诱导GES-1细胞损伤模型的建立 接种对数期生长的GES-1细胞到96孔板中培养,每24 h换新鲜培养基,48 h后,加入含不同浓度乙醇(0%、5%、6%、7%、8%、9%、10%)的培养基,继续培养3.5 h后测定细胞活力。

1.2.2.3 DCPH对乙醇诱导GES-1细胞损伤活力的影响 选取对数生长期的GES-1细胞接种到96孔板中,分正常(Control)组、模型(Model)组及DCPH低(2.5 mg/mL)、中(5 mg/mL)、高(10 mg/mL)剂量组(24 h后加入低、中、高剂量的DCPH处理细胞,继续培养24 h),除正常组外,其余各组加入含8%乙醇的培养基继续孵育3.5 h,通过CCK-8测定细胞活力。

1.2.3 DCPH对乙醇诱导GES-1细胞中ROS水平的影响

取生长状态良好的GES-1细胞,调整细胞密度为2.5×10⁵个/mL接种于6孔板中。按“1.2.2.3”项设置分组并进行处理。培养结束后弃去培养液,PBS轻轻冲洗细胞2次。然后将DCFH-DA荧光探针用无血清培养基稀释至浓度为10 mmol/L,每孔加入1 mL,放置在37℃培养箱中避光孵育20 min,用无血清细胞培养液洗涤细胞2次。最后在倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.4 DCPH对乙醇诱导GES-1细胞中IL-1β、TNF-α mRNA表达的影响

取出处理完毕的各组细胞,弃去旧培养液,PBS清洗2次。使用TRNzol试剂提取总RNA,检测各组RNA的质量和浓度。然后将RNA逆转录为cDNA,使用荧光定量PCR仪进行扩增,扩增条件:95℃ 2 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,循环40。β-actin作为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法测定基因的相对表达水平。引物序列见表1。

表1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

Gene	Primer-F (5'-3')	Primer-R (5'-3')
β-actin	CCTGGCACCCAGCACAAT	GGGCCGGAAGCTCGTCATAC
IL-1β	CGATCACTGAACTGCACGCTC	ACAAAGGACATGGAGAACACCACTT
TNF-α	GGCGTGGAGCTGAGAGATAA	GTGTGGGTGAGGAGCACAT

1.2.5 DCPH对乙醇诱导GES-1细胞线粒体膜电位的影响

在24孔板中放置细胞爬片,将GES-1细胞以合适密度接种至24孔板中,设置分组进行处理。培养结束后弃去培养液,PBS清洗2次。通过JC-1法检测细胞线粒体膜电位水平,每孔加入1 mL JC-1染色工作液,37℃孵育30 min。用PBS洗涤细胞2次,加入DAPI染色液,室温孵育5 min后,PBS洗涤2次。取出细胞爬片,用抗荧光淬灭封片剂封片,于共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 Western blot检测TLR和NF-κB蛋白表达

细胞分组处理后,弃去旧培养液,PBS清洗2次,收集各组细胞,加入RIPA细胞裂解液,冰上裂解10 min。4℃、12 000 r/min离心15 min,取上清。BCA法对总蛋白进行定量。通过SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,转膜后将PVDF膜放入5%脱脂牛奶中,室温封闭2 h。加入一抗,4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗,室温孵育2 h。洗膜3次后,滴加ECL显影液,在化学发光分析仪中显影,用Image J软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,所有数据以至少 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 共同靶点与活性成分的收集

共筛选出 DCPH 潜在活性成分 44 种,对应靶点 507 个,胃黏膜损伤相关靶点共 1 048 个,取交集得到“DCPH-胃黏膜损伤”共同靶点 90 个(图 1),通过分析数据得到 DCPH 干预胃黏膜损伤的主要成分为:黄芩苷、芹菜素、木犀草素、山奈酚、香叶木素、槲皮素、异鼠李素、calyciphylline Q、daphniyunnine A 和 Caldaphnidine E。“DCPH 成分-共同靶点”网络图,见图 2。

2.2 核心靶点的筛选

共获取核心靶点 29 个,排名前 10 个分别为:TNF、BCL2、EGFR、MMP9、PTGS2、TLR4、MAPK3、CCND1、ERBB2 及 IL2,见图 3。

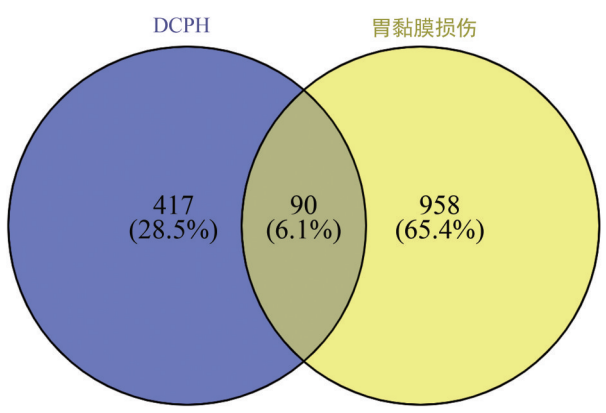


图 1 DCPH-胃黏膜损伤的共同靶点韦恩图

Fig 1 Venn diagram of the common targets of DCPH composition-gastric ulcer and gastritis diseases

2.3 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 生物功能富集分析结果中 BP 共 435 个、CC 共 51 个、MF 共 97 个,根据 Count 值排序,各自选取前 10 项,分析表明,磷酸化、炎症应答、凋亡过程和血管生成等生物过程参与了 DCPH 改善胃黏膜损伤,见图 4。KEGG 通路富集结果表明,共有 119 条

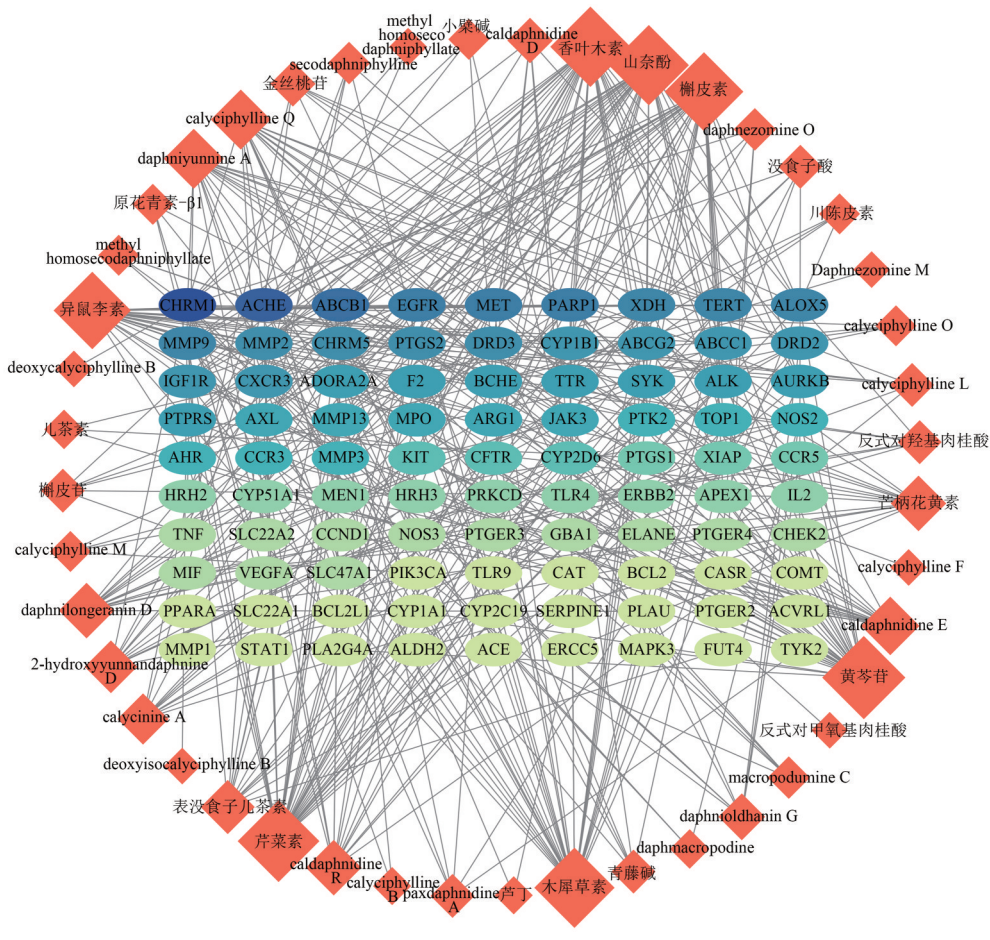


图 2 DCPH 成分-共同靶点网络图

Fig 2 Network diagram of DCPH component-common targets

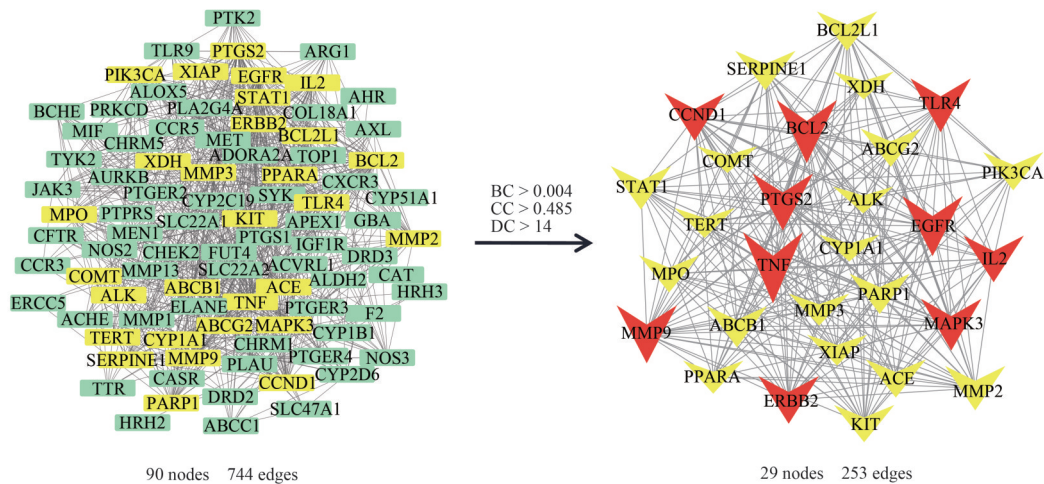


图3 核心靶点网络图

Fig 3 Network diagram of core targets

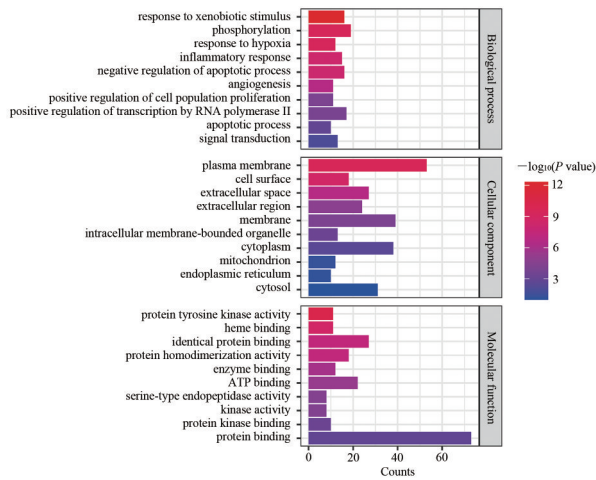


图4 共同靶点GO富集分析条形图

Fig 4 Bar graph of GO enrichment analysis of common targets

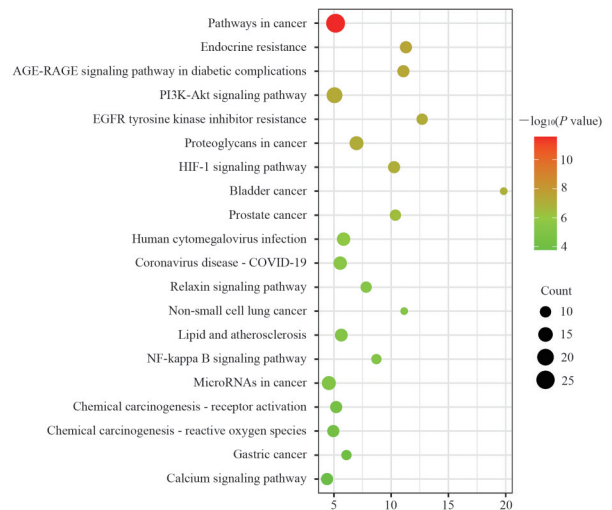


图5 共同靶点KEGG富集分析气泡图

Fig 5 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis of common targets

通路参与,根据 P 值排序,选择前20条通路绘制KEGG气泡图,见图5,包括PI3K-Akt、HIF-1、NF- κ B和ROS等信号通路($P < 0.0001$)。

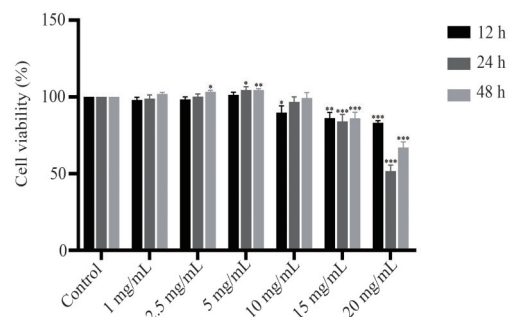
2.4 DCPH对GES-1细胞活力的影响

2.4.1 DCPH对正常GES-1细胞活力的影响 与正常组相比,1、2.5、5和10 mg/mL剂量的DCPH作用细胞24 h和48 h后,细胞活力未受到抑制。与12 h和48 h相比,24 h条件下细胞活力稳定,且时间适中。当高于10 mg/mL时,细胞活力均明显降低($P < 0.01$),产生细胞毒性。故后续实验选择2.5、5和10 mg/mL作为DCPH给药剂量,干预时间为24 h。见图6。

2.4.2 乙醇诱导GES-1细胞损伤模型的构建 与正常组相比,GES-1细胞活力随乙醇浓度的升高而降低($P < 0.05$),考虑细胞存活率对实验结果的影

响,故采用8%作为乙醇造模浓度。见图7。

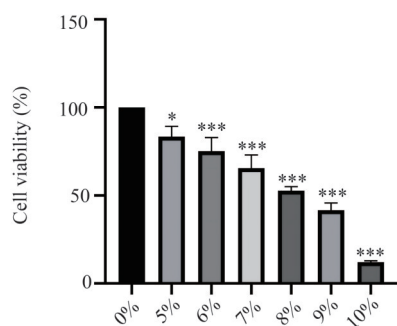
2.4.3 DCPH对乙醇诱导GES-1细胞活力的影响



与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图6 DCPH对正常GES-1细胞活力的影响

Fig 6 Effect of DCPH on the viability of normal GES-1 cells

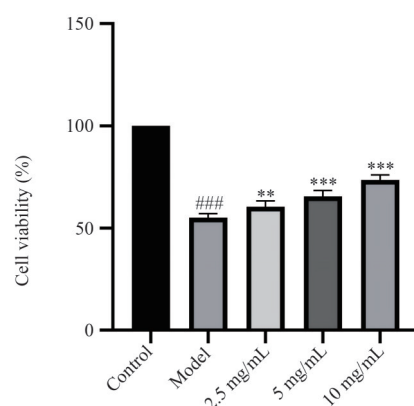


与正常组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图7 不同浓度乙醇对细胞活力的影响

Fig 7 Effect of different concentrations of ethanol on cell viability

及形态学变化 与正常组相比,模型组明显降低细胞活性($P<0.001$)。使用2.5、5和10 mg/mL剂量DCPH预处理后,明显升高乙醇诱导的细胞活力($P<0.01$),且具浓度依赖性。见图8。通过显微镜观察细胞形态发现,正常组GES-1细胞为扁平不规则多角形,呈上皮细胞样,细胞间紧密相连,贴壁牢



与正常组比较, ### $P<0.001$;与模型组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图8 DCPH提高乙醇诱导的GES-1细胞活力

Fig 8 DCPH increases the viability of GES-1 cells induced by ethanol

固;模型组细胞形态改变,体积缩小,细胞间隙增大、连接减少,贴壁能力降低,部分细胞脱落、漂浮;DCPH干预组细胞形态恢复,体积增大,细胞间间隙减少、连接增多,细胞基本贴壁。见图9。

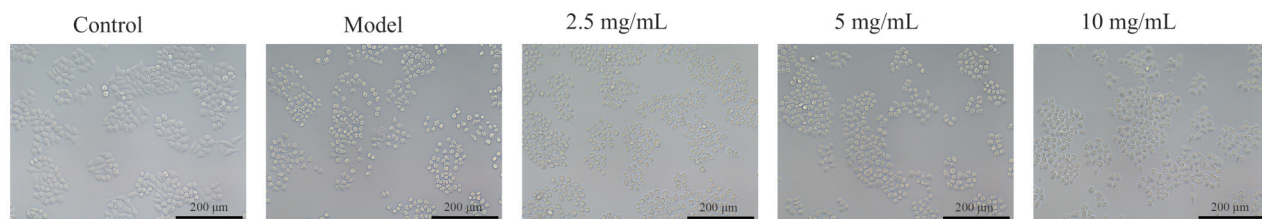


图9 DCPH改善乙醇刺激GES-1细胞形态变化

Fig 9 DCPH improves morphological changes of GES-1 cells stimulated by ethanol

2.5 DCPH对细胞内ROS水平的影响

正常组细胞中几乎没有检测到ROS荧光信号。经过乙醇处理的模型组产生大量ROS绿色荧光信

号,荧光强度明显增强($P<0.001$)。与模型组相比,不同浓度DCPH组的绿色荧光强度明显减弱,差异具有统计学意义($P<0.001$)。见图10、11。

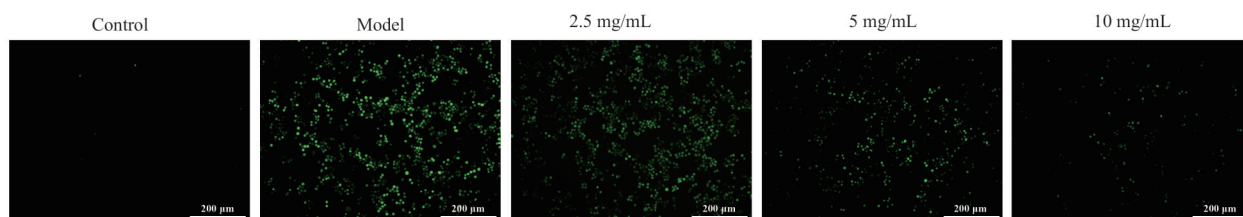


图10 DCPH对细胞内ROS水平的影响

Fig 10 Effect of DCPH on intracellular ROS level

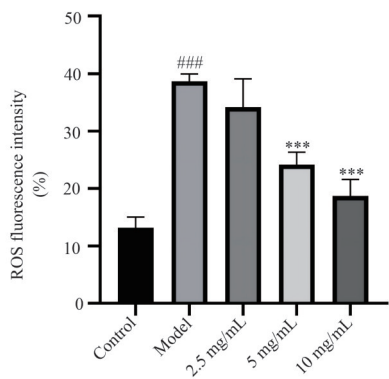
2.6 DCPH对乙醇损伤GES-1细胞内TNF- α 和IL-1 β 表达的影响

与正常组相比,乙醇刺激诱导GES-1细胞内TNF- α 和IL-1 β mRNA表达增加($P<0.001$)。与模型组相比,DCPH明显降低TNF- α 和IL-1 β 的

mRNA表达($P<0.05$)。见图12A、B。

2.7 DCPH对乙醇损伤GES-1细胞线粒体膜电位的影响

与正常组相比,模型组的绿色荧光较强,红色荧光减弱,表明乙醇导致GES-1细胞线粒体膜电位

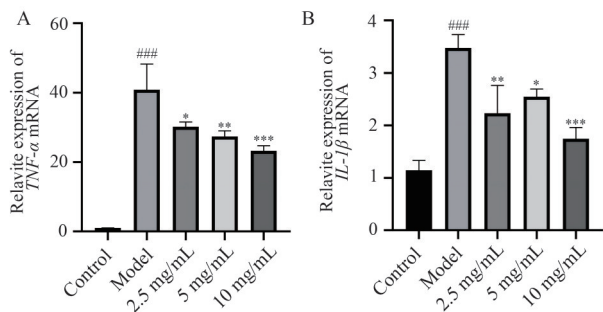


与正常组比较, ^{###} $P<0.001$;与模型组比较, ^{***} $P<0.001$

图 11 ROS 荧光强度

Fig 11 ROS fluorescence intensity

明显降低。与模型组相比,DCPH 低、中、高剂量组绿色荧光减弱,红色荧光增强,表明细胞内线粒体



A: 炎症因子 $TNF-\alpha$ mRNA 表达; B: 炎症因子 $IL-1\beta$ mRNA 表达;与正常组比较, ^{###} $P<0.001$;与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$

图 12 DCPH 对炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig 12 Effect of DCPH on the expression of inflammatory factors mRNA

膜电位逐渐升高。见图 13。

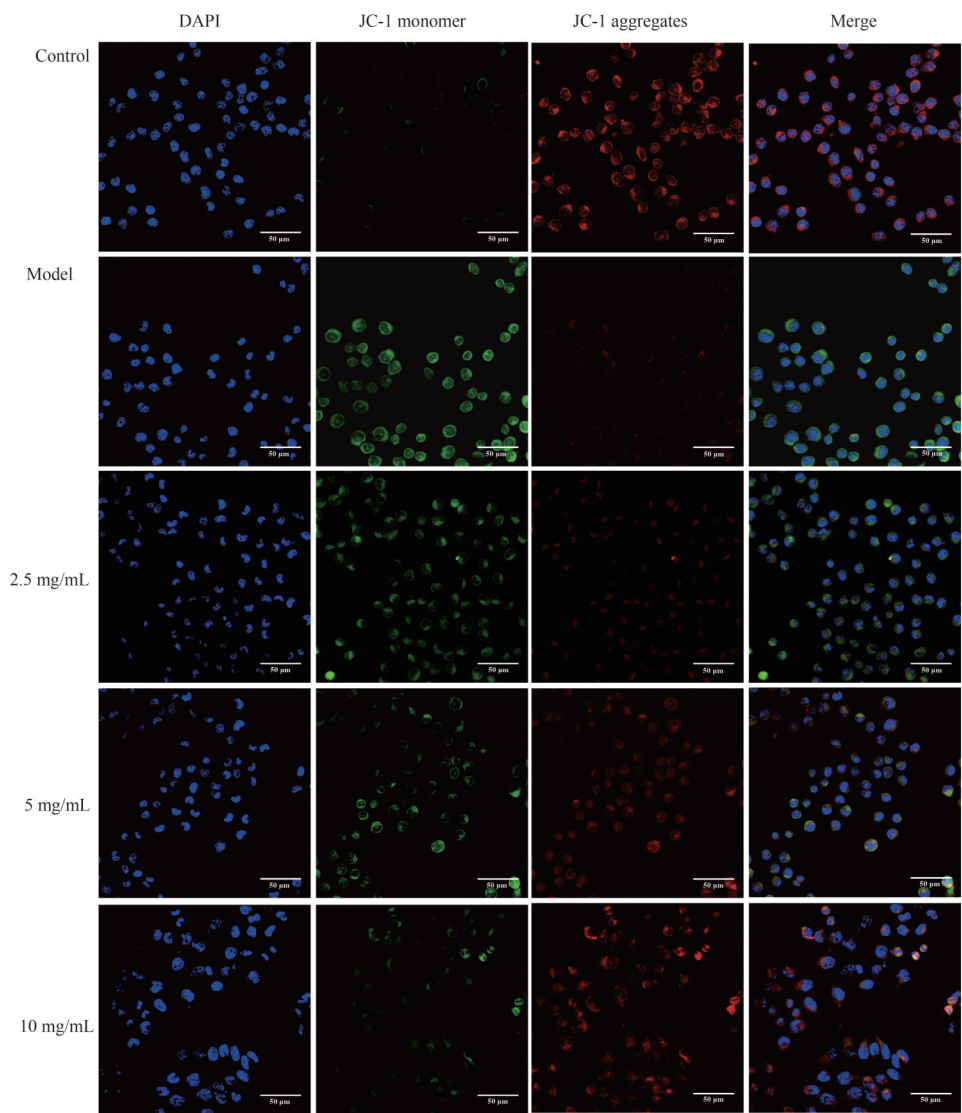


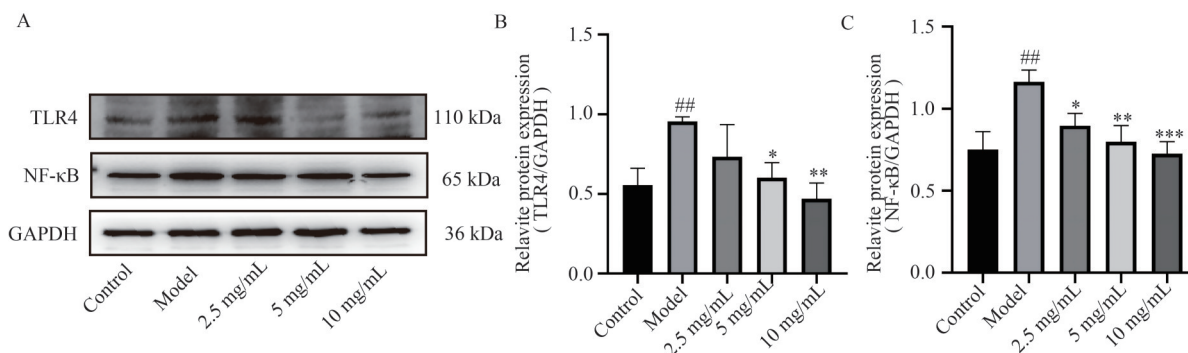
图 13 DCPH 对细胞线粒体膜电位的影响

Fig 13 Effect of DCPH on Mitochondrial Membrane Potential

2.8 DCPH对TLR4、NF- κ B蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与正常组相比,模型组细胞内TLR4和NF- κ B蛋白表达明显升高($P <$

0.01)。相较于模型组,DCPH干预组的TLR4和NF- κ B蛋白含量明显降低($P < 0.05$)。见图14A~C。



与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$

图14 DCPH对TLR4、NF- κ B蛋白表达的影响

Fig 14 Effect of DCPH on the expressions of TLR4 and NF- κ B proteins

3 讨论

牛耳枫和辣蓼是海南黎族的传统植物药材。研究表明,牛耳枫或辣蓼提取物对胃肠疾病有显著疗效,具有潜在的药用价值。牛耳枫提取物通过提高SOD、GSH、GSH-Px活力并抑制MDA表达减轻氧化应激,同时抑制TNF- α 表达降低炎症反应来发挥抗急性胃溃疡的作用^[10]。结果表明,辣蓼提取物能改善乙醇诱导的GES-1细胞损伤,通过抗氧化和抗炎途径减轻乙醇导致的大鼠胃黏膜损伤^[11]。

胃黏膜损伤是一个广义的概念,是胃炎和胃溃疡疾病常见的一种病理变化^[12]。本研究通过网络药理学方法探究DCPH干预胃黏膜损伤的主要成分、作用靶点以及机制通路。基于“DCPH成分-共同靶点”网络图的构建和分析,筛选出DCPH干预胃黏膜损伤的黄酮类成分包括黄芩苷、芹菜素、木犀草素、山奈酚、香叶木素、槲皮素和异鼠李素等,主要与抑制细胞凋亡、抗炎和抗氧化作用相关^[13-17]。

PPI网络分析结果显示,DCPH发挥抗胃黏膜损伤的核心靶点主要有TNF、BCL2、EGFR、MMP9、PTGS2、TLR4、MAPK3等。研究表明,通过调控这些核心靶基因能改善细胞炎症反应、氧化应激、减少细胞凋亡和焦亡等,从而减轻胃黏膜损伤,治疗胃炎和胃溃疡^[18-20]。GO和KEGG富集分析结果显示,DCPH可能通过磷酸化、炎症应答、凋亡过程和血管生成等途径参与改善胃黏膜损伤过程中,可能存在的机制通路包括PI3K-Akt、HIF-1、NF- κ B和ROS等。研究表明,DCPH的主要活性成分槲皮素能够改善线粒体功能和黏膜屏障,通过调

节PI3K/AKT信号通路抑制炎症,减轻GES-1细胞的氧化应激损伤^[21]。辣蓼总黄酮通过PI3K/Akt和Keap1/Nrf2途径上调抗氧化基因表达,发挥胃黏膜保护作用^[22]。TLR4/NF- κ B通路是经典的炎症信号通路,参与调控炎症因子的产生与释放。槲皮素也能通过抗氧化、抗炎及抗凋亡特性治疗乙醇诱导的大鼠胃溃疡,可能与调控TLR4/NF- κ B信号通路有关^[23]。

乙醇对胃黏膜的损伤机制已被广泛研究,可通过诱导各种炎症和氧化应激细胞因子的合成和分泌而引起胃黏膜损伤^[24-26]。已有研究表明,乙醇诱导的胃黏膜损伤可能是由于乙醇代谢过程中ROS的过量产生,导致细胞氧化应激,从而引发炎症反应^[27]。在本研究中,利用8%乙醇刺激导致GES-1细胞活力明显降低,ROS水平明显升高,促炎因子TNF- α 和IL-1 β 表达明显升高,线粒体膜电位下降。DCPH干预能逆转乙醇导致的GES-1细胞损伤。DCPH明显增强GES-1细胞活力,改善细胞形态,清除细胞内过量产生的ROS,降低TNF- α 、IL-1 β 的表达,抑制细胞氧化应激及炎症反应,改善线粒体形态及线粒体外膜通透性,从而明显升高细胞线粒体膜电位,有效缓解细胞损伤。TLR4在组织损伤信号转导中起着关键作用,能够诱导ROS的产生,进一步激活NF- κ B,最终放大炎症反应^[28]。Western blot实验结果表明,DCPH明显降低细胞内TLR4、NF- κ B蛋白表达,表明DCPH通过抑制乙醇诱导的TLR4/NF- κ B通路激活发挥胃黏膜的保护作用。

综上所述,本研究采用网络药理学方法初步预测DCPH防治胃黏膜损伤的主要活性成分和核心靶点,通过体外实验进一步探究DCPH改善胃黏膜损伤的作用及机制。初步表明DCPH通过下调TLR4/NF- κ B信号通路表达,降低细胞ROS含量和抑制炎症因子表达,恢复细胞线粒体膜电位水平,减轻GES-1细胞损伤,从而发挥抗胃黏膜损伤作用。丰富了中医药防治胃黏膜损伤的理论基础,为进一步研究DCPH干预胃黏膜损伤的作用机制提供了体外实验依据。

作者贡献度说明:

支芸芸:设计、进行实验并撰写论文;田莹:分析数据;凌乙文:修改论文格式;牛海艳、任守忠:提供实验思路、修改并审核文章。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 来慧丽,陈侠,温李滔,等. 中医药治疗乙醇诱导急性胃黏膜损伤研究进展[J]. 光明中医, 2023, 38(14): 2849-2852.
Lai HL, Chen X, Wen LT, et al. Research status of traditional Chinese medicine in the treatment of ethanol induced acute gastric mucosal injury [J]. Guangming J Chin Med, 2023, 38(14): 2849-2852.
- 2 李燕君. 枫蓼肠胃康胶囊联合常规三联治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生的效果[J]. 中国医学创新, 2020, 17(19): 149.
Li YJ. Effect of Fengliao Changweikang capsule combined with routine triple therapy on chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia [J]. Med Innovation China, 2020, 17(19): 149.
- 3 李苗苗,赵晖,张乐,等. 枫蓼肠胃康制剂治疗急性胃肠炎有效性及安全性的系统评价与Meta分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(7): 1951-1961.
Li MM, Zhao H, Zhang L, et al. Systematic review and meta-analysis of efficacy and safety of Fengliao Changweikang prescription in treatment of acute gastroenteritis [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(7): 1951-1961.
- 4 Chen W, Peng X, Yu J, et al. FengLiao affects gut microbiota and the expression level of Na⁺/H⁺ exchangers, aquaporins and acute phase proteins in mice with castor oil-induced diarrhea [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0236511.
- 5 Dejbani P, Eslami F, Rahimi N, et al. Involvement of nitric oxide pathway in the anti-inflammatory effect of modafinil on indomethacin-, stress-, and ethanol-induced gastric mucosal injury in rat [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 887: 173579.
- 6 Yu L, Li R, Liu W, et al. Protective effects of wheat peptides against ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: Vasodilation and anti-inflammation [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2355.
- 7 孙晶晶,刘洁. 常用保护胃黏膜中药的作用机制研究进展[J]. 中国民间疗法, 2023, 31(19): 114-118.
Sun JJ, Liu J. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine for protecting gastric mucosa [J]. China's Naturopathy, 2023, 31(19): 114-118.
- 8 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.
- 9 Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1): W216-W221.
- 10 谢亚萍,李冬玉,肖琪,等. 牛耳枫提取物对无水乙醇致大鼠胃溃疡的保护作用[J]. 中医药信息, 2023, 40(3): 55-61.
Xie YP, Li DY, Xiao Q, et al. Protective effect of D. calycinum extract on ethanol-induced gastric ulcer [J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(3): 55-61.
- 11 Ren S, Chen B, Ma Z, et al. Polygonum hydropiper extract attenuates ethanol-induced gastric damage through antioxidant and anti-inflammatory pathways [J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(8): e10841.
- 12 伍沛君,聶沁馨,贺亚丽,等. 基于网络药理学和动物验证探究佛手对胃黏膜损伤的保护作用[J]. 中成药, 2024, 46(9): 3141-3149.
Wu PJ, Nie QX, He YL, et al. Study on the protective effect of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle on gastric mucosal injury based on network pharmacology and animal validation [J]. Chin Tradit Patent Med, 2024, 46(09): 3141-3149.
- 13 Alamri ZZ. Apigenin attenuates indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Emphasis on antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and TGF- β 1 enhancing activities [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2024, 397(11): 8803-8814.
- 14 Zhang N, Chen P, Liang X, et al. Luteolin targets the AGE-RAGE signaling to mitigate inflammation and ferroptosis in chronic atrophic gastritis [J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(13): 10918-10930.
- 15 孙丽明,张博瀚,冯柯儒,等. 基于UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS/MS和网络药理学的木香五味散入血成分改善胃溃疡的作用机制研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2024, 46(4): 359-364.

- Sun LM, Zhang BH, Feng KR, et al. Study on the mechanism of Radix Aucklandiae Wuwei powder in improving gastric ulcer based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS/MS and network pharmacology[J]. J Inner Mongolia Med Univ, 2024, 46(4): 359-364.
- 16 胡意隆. 山奈醇提取物对乙醇诱导小鼠急性胃溃疡的保护作用研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2023.
Hu YL. Protective effect of kaempferol alcohol extract on ethanol-induced acute gastric ulcer in mice[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2023.
 - 17 水寅萍, 濮之晨. 槲皮素调控 Sonic Hedgehog 信号通路对急性酒精性胃溃疡小鼠的保护作用[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(1): 43-47.
Shui YP, Pu ZC. Quercetin-mediated regulation of the Sonic Hedgehog signaling pathway and its protective effects in mice with acute alcoholic gastric ulcer[J]. J Youjiang Med Univ Nationalities, 2024, 46(1): 43-47.
 - 18 Zhang H, Liu H. Mechanism of Weiwei gGranules in the treatment of chronic active *Helicobacter pylori* gastritis with atrophy based on the TLR4/NF- κ B/COX-2 inflammatory signaling pathway [J]. Histol Histopathol, 2024, 39(6): 761-769.
 - 19 Huang Y, Chen S, Yao Y, et al. Ovotransferrin inhibits TNF- α induced inflammatory response in gastric epithelial cells via MAPK and NF- κ B pathway [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(33): 12474-12486.
 - 20 李姿墨, 韩倩, 原素梅, 等. 牡荆素鼠李糖苷通过 EGFR 抑制酒精引起的胃上皮细胞焦亡[J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(5): 568-579.
Li ZM, Han Q, Yuan SM, et al. Pectin rhamnoside inhibits alcohol-induced gastric epithelial cell pyroptosis through EGFR[J]. J Shanxi Med Univ, 2024, 55(5): 568-579.
 - 21 Yao X, Mei Y, Mao W. Quercetin improves mitochondrial function and inflammation in H₂O₂-induced oxidative stress damage in the gastric mucosal epithelial cell by regulating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 1386078.
 - 22 Chen B, Huang X, Zhu F, et al. Integrating network pharmacology and experimental verification to study the mechanism of *Polygonum hydropiper* total flavonoids against stress-induced gastric mucosal damage[J]. Heliyon, 2024, 10(19): e38629.
 - 23 Shams SGE, Eissa RG. Amelioration of ethanol-induced gastric ulcer in rats by quercetin: Implication of Nrf2/HO1 and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways [J]. Heliyon, 2022, 8(10): e11159.
 - 24 Duan Z, Yu S, Wang S, et al. Protective effects of piperine on ethanol-induced gastric mucosa injury by oxidative stress inhibition[J]. Nutrients, 2022, 14(22): 4744.
 - 25 Huang L, Wu W, Huang L, et al. Antarctic krill (*Euphausia superba*) oil modulatory effects on ethanol-induced acute injury of the gastric mucosa in rats[J]. Front Nutr, 2022, 9: 1003627.
 - 26 Zheng Z, Sun N, Mao C, et al. Val-Leu-Leu-Tyr (VL-LY) alleviates ethanol-induced gastric mucosal cell impairment by improving mitochondrial fission[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(48): 18722-18734.
 - 27 Wang H, Wang Y, Liu Y, et al. Study on the structural features of eight *Dendrobium* polysaccharides and their protective effects on gastric mucosa[J]. Foods, 2024, 13(18): 3011.
 - 28 Ma Y, Tang T, Sheng L, et al. Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 1925-1934.

[本文编辑] 朱金月