

本文引用: 周赛男, 刘 琴, 周 姝, 韩运宗, 陈思清, 符 佳. 黄芪建中汤对脾胃虚寒证胃溃疡大鼠胃黏膜保护作用的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 1978-1985.

## 黄芪建中汤对脾胃虚寒证胃溃疡大鼠胃黏膜保护作用的机制研究

周赛男<sup>1</sup>, 刘 琴<sup>2</sup>, 周 姝<sup>2</sup>, 韩运宗<sup>2</sup>, 陈思清<sup>2</sup>, 符 佳<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

**[摘要]** **目的** 基于动物实验研究黄芪建中汤对脾胃虚寒证胃溃疡的治疗作用及抗黏膜损伤机制。**方法** 将大鼠随机分为正常组、模型组、西药组及中药组, 每组 15 只。除正常组外, 另 3 组均应用耗气破气法+饥饱失常法+冰醋酸法复制脾胃虚寒证胃溃疡模型。中药组、西药组各予黄芪建中汤(6.8 g/kg)、奥美拉唑(4.2 mg/kg)灌胃, 另两组则灌以等体积蒸馏水。给药 20 d 后计算胃溃疡指数; HE 染色观察胃组织形态; ELISA 法检测血清白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )水平; RT-PCR 检测胃组织肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、细胞间质上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)、磷脂酰肌醇 3-激酶(hosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) mRNA 表达水平; Western blot 法检测 PI3K、磷酸化 AKT (phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、EGFR 蛋白表达; 免疫组织化学检测胃组织 HGF、c-Met 的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组胃溃疡指数增高( $P<0.05$ ), 胃组织溃疡损伤明显, 血清 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平增高(均  $P<0.05$ ), 胃 p-AKT、AKT、EGFR 蛋白及 mRNA 表达下降(均  $P<0.05$ ); 与模型组比较, 中药组胃溃疡指数、炎症因子水平(均  $P<0.05$ )显著降低, 胃黏膜受损程度改善( $P<0.05$ ), 胃 HGF、c-Met、PI3K、p-AKT、EGFR 蛋白及 mRNA 表达水平上调(均  $P<0.05$ )。**结论** 黄芪建中汤对胃溃疡有良好的治疗作用, 其机制可能与激活 HGF/c-Met、PI3K/AKT 通路以增强胃黏膜的防御机制和减轻炎症反应有关。

**[关键词]** 黄芪建中汤; 胃溃疡; 肝细胞生长因子/细胞间质上皮转换因子信号通路; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 表皮生长因子受体; 炎症; 大鼠

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.007

## Mechanism of action of Huangqi Jianzhong Decoction in protecting gastric mucosa of gastric ulcer rats with deficiency cold of the spleen and stomach pattern

ZHOU Sainan<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>2</sup>, ZHOU Shu<sup>2</sup>, HAN Yunzong<sup>2</sup>, CHEN Siqing<sup>2</sup>, FU Jia<sup>1\*</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To study the therapeutic effects of Huangqi Jianzhong Decoction on gastric ulcer with deficiency cold of the spleen and stomach pattern, as well as its mechanism of anti-mucosal damage based on animal experiments. **Methods** Rats were randomly assigned into normal, model, western medicine, and Chinese medicine groups, with 15 rats in each group. Except for the normal group, the other three groups were induced to replicate the gastric ulcer model of

[收稿日期] 2023-03-22

[基金项目] 湖南省自然科学基金科卫联合项目(2022JJ70031); 湖南省中医药科研计划重点项目(2021203); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2018ZYX13); 湖南中医药大学中医学世界一流培育学科(2023)。

[第一作者] 周赛男, 女, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病。

[通信作者]\* 符 佳, 硕士, 主治医师, E-mail: 253526775@qq.com。

deficiency cold of the spleen and stomach pattern by gas consumption and gas breaking, hunger-satiety disorder, and glacial acetic acid. Huangqi Jianzhong Decoction (6.8 g/kg) and omeprazole (4.2 mg/kg) were given to Chinese medicine and Western medicine groups by gavage respectively, while the other two groups were given an equal volume of distilled water. The gastric ulcer index was calculated after 20 d of administration. HE staining was used to observe the morphology of gastric tissues. The levels of interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in serum were measured by ELISA. RT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of hepatocyte growth factor (HGF), cellular-mesenchymal epithelial transition factor (C-Met), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric tissues. Western blot was used to measure the protein expressions of PI3K, phosphorylated protein kinase B (p-AKT), and EGFR. The expression levels of HGF and c-Met in gastric tissues were measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with normal group, the gastric ulcer index in model group increased ( $P<0.05$ ), the gastric ulcer was obviously damaged, the serum levels of IL-18, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  increased (all  $P<0.05$ ), and the protein and mRNA expressions of p-AKT, AKT, and EGFR in gastric tissues decreased (all  $P<0.05$ ). Compared with model group, the gastric ulcer index and inflammatory factors in Chinese medicine group significantly decreased (all  $P<0.05$ ), the damage degree of gastric mucosa was alleviated ( $P<0.05$ ), and the mRNA expressions of HGF, c-Met, PI3K, p-AKT, and EGFR in gastric tissues increased (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Huangqi Jianzhong Decoction has good therapeutic effects on gastric ulcer, and its mechanism may be related to the activation of the HGF/c-Met and PI3K/AKT pathways, which in turn enhances the defense mechanism of gastric mucosa and reducing inflammatory.

[**Keywords**] Huangqi Jianzhong Decoction; gastric ulcer; hepatocyte growth factor/cellular-mesenchymal epithelial transition factor signaling pathway; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; epidermal growth factor receptor; inflammation; rat

胃溃疡(gastric ulcer, GU)是常见的胃肠道疾病之一,每年影响全球超过1万人口,其严重则可能引起胃出血、胃穿孔,甚至也有产生癌变的倾向<sup>[1]</sup>。近年,由于生活水平的提高以及饮食习惯的改变, GU的发病趋于年轻化,并且发病率有所上升。尽管目前现代医学治疗GU的手段能在一定程度上缓解胃黏膜损伤的状况,但仍有复发率高、不良反应明显的局限性<sup>[2]</sup>。

黄芪建中汤是记载于《金匱要略》的经典方剂,其基于GU脾胃虚寒之病机和“脾主卫”的理论组方,临床治疗GU效果满意<sup>[3-4]</sup>。研究发现,黄芪建中汤有抗炎和促进胃黏膜修复与愈合的作用<sup>[5-6]</sup>,然而其具体机制有待进一步研究。

GU发病机制尚未完全明了,胃黏膜防御机制和攻击机制的失衡是诱导其发病的关键<sup>[7]</sup>。研究表明<sup>[8-10]</sup>,HGF/c-Met通路在胃上皮细胞广泛分布,是介导PI3K/AKT信号途径的起始点;HGF与c-Met受体结合后,c-Met自身的酪氨酸发生磷酸化,进而激活PI3K/AKT信号通路中的关键分子,进而调节细胞增殖、分化、迁移及有丝分裂等多个过程,发挥修复黏膜损伤、调节免疫的功能。研究证实<sup>[11]</sup>,白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、白细胞介素-1 $\beta$

(interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )均为促炎因子,其释放过多可产生炎症反应,诱发或加重GU。本研究旨在通过检测GU模型大鼠血清炎症因子及胃组织中HGF、c-Met、PI3K、AKT、EGFR等的表达,探讨黄芪建中汤治疗GU的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

7周龄Wistar大鼠60只,均为雄性,体质量190~210 g。实验动物购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004]。分笼饲养于湖南中医药大学动物实验中心(清洁级),温度为24~26℃且湿度维持在50%~70%,明暗各12 h/d,喂普通的饲料,自由饮水。本研究由湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(ZYFY20190120)。

### 1.2 药物及制备

奥美拉唑肠溶片(阿斯利康制药有限公司,批号:02002750)。黄芪建中汤(饴糖30 g、大枣6枚、生姜9 g、炙甘草6 g、桂枝9 g、芍药18 g、黄芪22 g);小承气汤(大黄12 g、厚朴6 g、枳实9 g),全部中药均来自湖南中医药大学第一附属医院。药物经湖

南中医药大学第一附属医院龙红萍副研究员进行鉴定,均符合《中华人民共和国药典》要求。中药汤液制备法:将上述药材使用蒸馏水浸泡 30 min 后,再煎煮 2 次,混合后趁热过滤,最后对药液进行浓缩(每 1 mL 药液含 1 g 生药),低温存放。

### 1.3 主要试剂

HGF 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab134152); c-Met 抗体、ERK1/2 抗体(美国 affinity 公司,批号:25869-1-AP); TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 CSB-E11987r、CSB-E08055r、CSB-E04640r); PI3K 抗体(美国 CST 公司,批号:4249); p-AKT 抗体、AKT 抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 66444-1-Ig、10176-2-AP); EGFR 抗体(英国 abcam 公司,批号:ab52894); 琼脂糖(西班牙 BLOWEST 公司,批号:111860)。

### 1.4 主要仪器

光学显微镜(Motic 仪器公司,型号:B10T); 酶标仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:MB-530); 水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一公司,型号:DY CP-31DN); 精密 pH 计(中国雷磁公司,型号:PHS-3C); 切片刀(莱卡公司,型号:M199); 电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500)。

## 2 方法

### 2.1 分组

将实验大鼠随机分成正常组、模型组、中药组和西药组。每组 15 只。

### 2.2 造模

据参考文献[12]复制模型,对大鼠适应性喂养 7 d 后,先以小承气汤隔日灌胃 1 次,灌胃当天不喂食,次日不限饮食,共 10 d。于第 11 日时,禁食但允许自由饮水 24 h 后,用耗气破气法+饥饱失常法+冰醋酸法建立 GU 大鼠模型,即将大鼠用戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉处理后固定在鼠板上,在无菌操作下,从左肋下纵行切开腹壁,轻拉出全胃,把一根塑料管(直径约 6 mm)垂直放在胃前壁浆膜面与窦体交汇处,倒入冰醋酸灼烧胃 1 min,使用适量生理盐水轻轻擦拭后,还纳胃至腹腔,缝合伤口,同时涂红霉素软膏抗感染。造模成功的标准<sup>[13]</sup>:胃黏膜损伤指数升高、胃黏膜绒毛间有明显的出血发生,伴有黏液

细胞严重脱落。

### 2.3 给药

中药组灌以黄芪建中汤 10 mL/(kg·d),即 6.8 g/(kg·d),剂量根据人类剂量 33 g/d 以及人和大鼠体表面积换算;西药组灌以奥美拉唑 10 mL/(kg·d),即 4.2 mg/(kg·d),剂量根据人类 40 mg/d 以及人和大鼠体表面积换算。另外两组则灌以等体积蒸馏水。用 10 mL/kg 的体积喂各组大鼠,1 次/d,共持续药物干预 20 d。

### 2.4 标本采集

结束药物干预后,每组大鼠禁食但准许饮水 24 h。首先麻醉各组大鼠,从腹主动脉收集到血以后,逐层剪开腹腔,取胃剪开,去除内容物后将其清洗干净,胃组织一半采取多聚甲醛固定,另一半直接存放到-80 °C 冰箱。

### 2.5 指标检测

2.5.1 一般状态观察及体质量变化 观察各组大鼠的活动度、精神状态、粪便状况等一般状态,同时记录大鼠体质量的生长情况。

2.5.2 胃溃疡指数(ulcer index, UI)的计算 应用 10 倍放大镜观察记录溃疡灶的大小,同时采取 Guth<sup>[14]</sup>标准以计算胃 UI。具体算法:(1)黏膜出现斑点或者糜烂,1 分;(2)黏膜糜烂长度<1 mm,1 分;(3)黏膜损伤长度达 1-2 mm,3 分;(4)黏膜损伤长度达 2-3 mm,4 分;(5)损伤长度>4 mm,5 分。损伤的宽度>2 mm,总评分加倍。由两人同时完成评估,UI 取二人计算结果的平均值。

2.5.3 HE 染色检测胃组织病理变化 胃组织通过脱水、石蜡包埋、切成大小约 4  $\mu$ m 的切片,再采用 HE 染色常规方法规范进行,在显微镜下观察。

2.5.4 ELISA 检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平 将收集到的腹主动脉血放在室温下待其凝固,再以 3 500 r/min 离心 20 min,离心半径为 5.5 cm,获得上清液,对应 ELISA 试剂盒说明书仔细操作检测炎症介质的含量。

2.5.5 免疫组织化学检测胃组织 HGF、c-Met 蛋白表达水平 取各组的胃组织,经石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡、脱水,再进行热修复抗原,然后漂洗 3 次后封闭。先滴加稀释后的一抗(HGF、c-Met 抗体稀释比例均为 1:50),4 °C 条件下处理过夜。冲洗 3 次

后加入二抗(100  $\mu\text{L}$ 左右)。经DAB显色后,将细胞核复染苏木素、返蓝、脱水,再封片处理,采取显微镜收集图像并分析。

**2.5.6 RT-PCR 检测胃组织 HGF、c-Met、PI3K 和 EGFR 的 mRNA 表达水平** 取每组约 0.02 g 的胃组织,采用 Trizol 提取出总 RNA,再用逆转录试剂盒合成产物 cDNA。扩增条件:预变性:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;循环反应:95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,循环 40 次;熔解曲线:95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  60 s,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。根据  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目标 mRNA 的相对表达量。引物序列(由上海生工合成)见表 1。

表 1 引物序列表

引物	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
$\beta$ -actin	正向 ACATCCGTAAGACCTCTATGCC	223
	反向 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
c-Met	正向 GTCTACATTGATGTCCTGGGAG	200
	反向 TGCACTCCAGAGGCATTTCC	
HGF	正向 TAGCGATTGGGCTGAGTCTT	130
	反向 GCCGGGCTGAAAGAATCAAAG	
PI3K	正向 AGCCACAGATGCACTTAACCC	128
	反向 CTGCTGTCCCCACTTTACTGA	
AKT	正向 GTCACCTCTGAGACCGACACC	115
	反向 GCCTCCGTTCACTGTCCAC	
EGFR	正向 AATGCATCCAGTCCATCCA	228
	反向 TCTTTGGCCCATAGGTACACT	

**2.5.7 Western blot 检测胃组织 PI3K、p-AKT、EGFR 的蛋白表达水平** 取适量胃组织,向其中加入 RIPA 裂解液并反复研磨至组织溶解,离心后获取上清液。SDS-PAGE 变性电泳将蛋白按分子量大小分开,完成蛋白转膜,再采取封闭液把膜封闭。然后滴加稀释后的一抗(PI3K、AKT、p-AKT、EGFR、 $\beta$ -actin 分别以 1:1 000、1:1 000、1:15 000、1:2 000、1:5 000 稀释),孵育过后进行封闭,孵育二抗之后再次进行显色。经化学发光成像系统收集图像,借助 Quantity one 软件算出灰度值。

## 2.6 统计学分析

本研究的全部数据的分析均应用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料采取“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。符合正态性分布和方差齐性,多组间的比较则采用单因素方差分析,若符合正态性分布但不符合方差齐性,则选用 LSD 法,若不符合正态性分布和方差齐性,则采用秩和检

验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 黄芪建中汤对模型大鼠一般情况及体质量增长情况的影响

正常组大鼠的精神状态和活动程度从造模到取材前情况均良好,毛发正常,粪便成形,同时体质量进行性增加;与正常组比,模型组大鼠精神状态较差,反应不灵敏,毛发稀疏且萎黄,粪便不成形,体质量增长率明显降低( $P<0.05$ );与模型组比,中药组和西药组精神欠佳、毛发稀疏、稀便、反应迟钝等情况均改善,体质量增长速度也有所加快( $P<0.05$ );两组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组大鼠体质量变化情况( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	干预前	第 10 天	第 17 天	第 24 天	取材当天
正常组	263.90 $\pm$ 6.22	307.57 $\pm$ 11.45	359.70 $\pm$ 9.00	399.70 $\pm$ 5.45	442.17 $\pm$ 8.64
模型组	262.97 $\pm$ 6.64	264.47 $\pm$ 5.03*	274.03 $\pm$ 3.45*	292.73 $\pm$ 5.71*	304.83 $\pm$ 13.90*
中药组	263.67 $\pm$ 3.84	266.33 $\pm$ 2.06	284.97 $\pm$ 4.05	309.17 $\pm$ 7.44	339.50 $\pm$ 9.40 <sup>#</sup>
西药组	264.10 $\pm$ 6.17	265.40 $\pm$ 4.85	291.53 $\pm$ 6.54	315.50 $\pm$ 6.18	340.77 $\pm$ 6.60 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

### 3.2 黄芪建中汤对模型大鼠 UI 的影响

相比正常组,模型组大鼠的 UI 明显升高( $P<0.05$ );中药组 UI 较模型组下降( $P<0.05$ )。详见表 3。

表 3 黄芪建中汤对模型大鼠 UI 的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	UI
正常组	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	7.27 $\pm$ 1.03*
中药组	3.87 $\pm$ 1.10 <sup>#</sup>
西药组	3.63 $\pm$ 1.36 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

### 3.3 各组大鼠胃组织形态的观察

正常组大鼠胃黏膜上皮组织的形态完整,单层柱状细胞相互之间排列规整,没有出血或脱落;与正常组比,模型组大鼠胃黏膜绒毛间有明显的出血发生,伴有黏液细胞严重脱皮。与模型组相比,中药组和西药组的黏膜损伤程度均有明显的改善;中药组与西药组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 1。

### 3.4 黄芪建中汤对模型大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 含量的影响

与正常组比较,模型组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  显著升高( $P<0.05$ );与模型组比,中药组与西药组



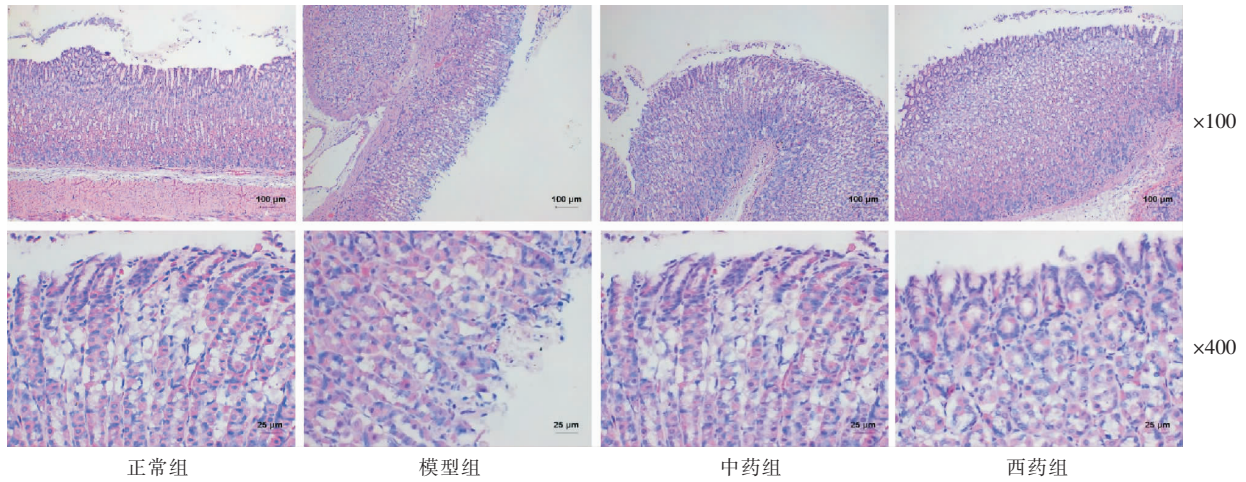


图 1 各组大鼠胃组织形态(HE 染色)

TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  显著下降 ( $P < 0.05$ ); 中药组与西药组比较差异无统计学意义。详见表 4。

表 4 黄芪建中汤对模型大鼠血清炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL,  $n=3$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
正常组	7.46 $\pm$ 0.59	38.57 $\pm$ 3.24	215.78 $\pm$ 8.30
模型组	29.04 $\pm$ 2.77*	90.40 $\pm$ 5.18*	1 045.45 $\pm$ 55.09*
西药组	13.29 $\pm$ 2.14 <sup>#</sup>	53.10 $\pm$ 3.52 <sup>#</sup>	433.88 $\pm$ 21.13 <sup>#</sup>
中药组	19.10 $\pm$ 1.46 <sup>#</sup>	72.84 $\pm$ 3.81 <sup>#</sup>	582.73 $\pm$ 22.80 <sup>#</sup>

注: 与正常组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.5 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织中 HGF、c-Met 的蛋白表达水平的影响

与正常组比较, 模型组胃 HGF 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 中药组和西药组的 HGF 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 中药组与西药组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 各组间 c-Met 水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。详见表 5 和图 2—3。

表 5 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织中 HGF、c-Met 的蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	HGF	c-Met
正常组	0.032 $\pm$ 0.002	0.039 $\pm$ 0.001
模型组	0.047 $\pm$ 0.002*	0.043 $\pm$ 0.002
西药组	0.071 $\pm$ 0.002 <sup>#</sup>	0.050 $\pm$ 0.007
中药组	0.062 $\pm$ 0.003 <sup>#</sup>	0.043 $\pm$ 0.002

注: 与正常组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.6 黄芪建中汤对模型大鼠 HGF、c-Met、PI3K、AKT 和 EGFR 的 mRNA 表达水平的影响

与正常组比较, 模型组胃 HGF、c-Met mRNA 表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ ), PI3K、EGFR mRNA 表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 中药组和西药组胃 HGF、c-Met、PI3K 和 EGFR mRNA 表达水平均上升 ( $P < 0.05$ ), 且中药组与西药组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 各组间 AKT mRNA 水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。详见表 6。

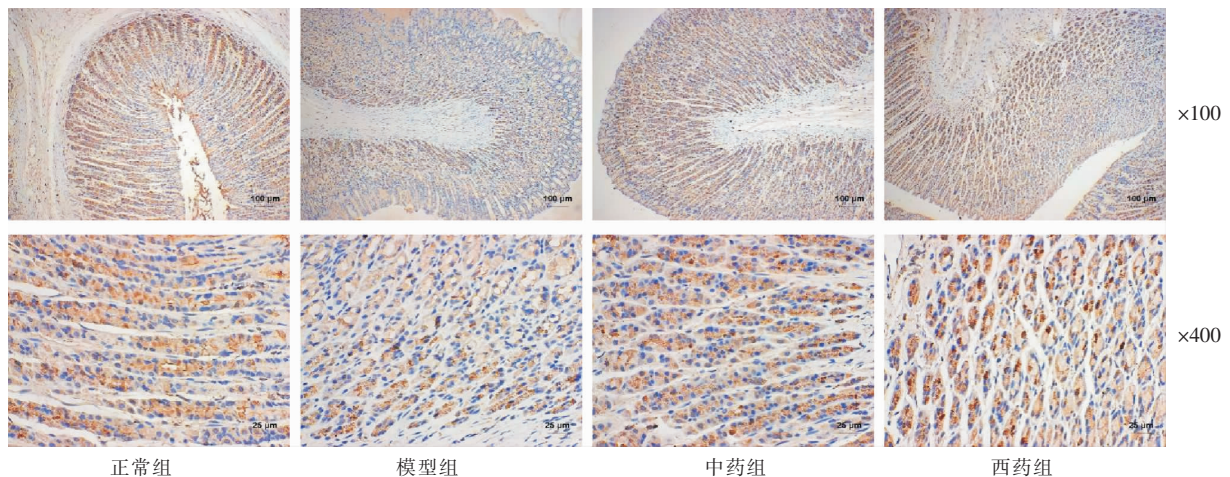


图 2 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织 HGF 表达的影响(免疫组织化学)



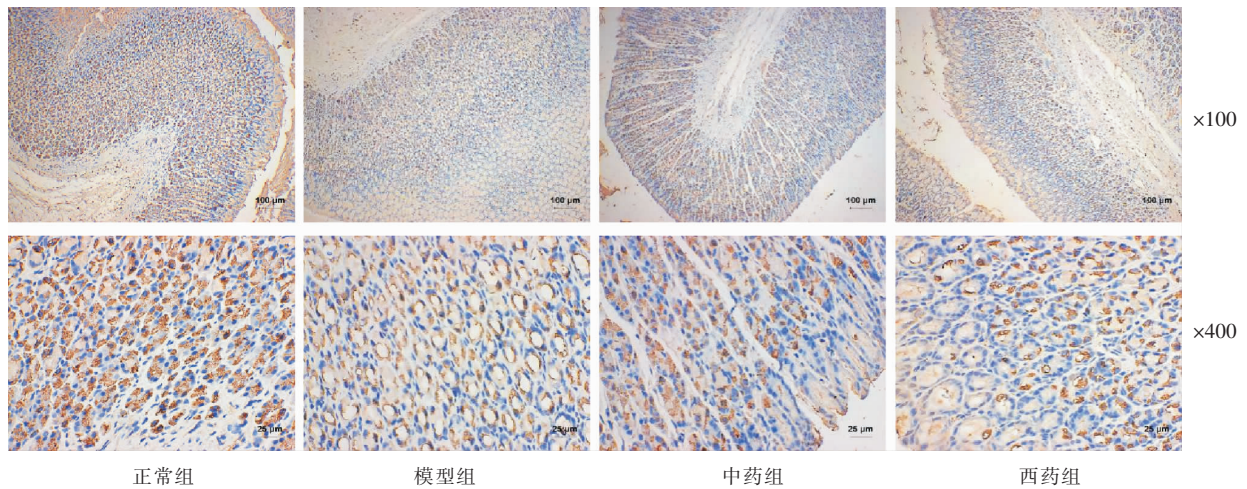


图3 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织 c-Met 表达的影响(免疫组织化学)

表6 黄芪建中汤对模型大鼠 HGF、c-Met、PI3K、AKT 及 EGFR 的 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	HGF	c-Met	PI3K	AKT	EGFR
正常组	0.33±0.05	0.26±0.03	3.80±0.17	3.24±0.43	1.02±0.03
模型组	0.72±0.04*	0.49±0.06*	0.97±0.03*	3.09±0.45	0.31±0.00*
西药组	0.99±0.03 <sup>#</sup>	0.97±0.04 <sup>#</sup>	1.97±0.15 <sup>#</sup>	3.21±0.19	0.82±0.04 <sup>#</sup>
中药组	0.86±0.01 <sup>#</sup>	0.72±0.02 <sup>#</sup>	2.20±0.42 <sup>#</sup>	3.32±0.33	0.65±0.04 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

### 3.7 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织 PI3K、p-AKT 和 EGFR 蛋白表达水平的影响

与正常组比,模型组胃 PI3K、p-AKT 和 EGFR 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ );与模型组比,中药组和西药组胃 PI3K、p-AKT 和 EGFR 蛋白表达明显上升( $P<0.05$ );中药组与西药组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 7、图 4。

表7 黄芪建中汤对模型大鼠胃组织 PI3K、p-AKT 和 EGFR 蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	PI3K/ $\beta$ -actin	p-AKT/ $\beta$ -actin	EGFR/ $\beta$ -actin
正常组	0.63±0.04	0.61±0.04	0.47±0.02
模型组	0.23±0.02*	0.20±0.02*	0.18±0.03*
黄芪建中汤组	0.50±0.05 <sup>#</sup>	0.49±0.04 <sup>#</sup>	0.28±0.02 <sup>#</sup>
奥美拉唑组	0.48±0.04 <sup>#</sup>	0.44±0.04 <sup>#</sup>	0.32±0.02 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

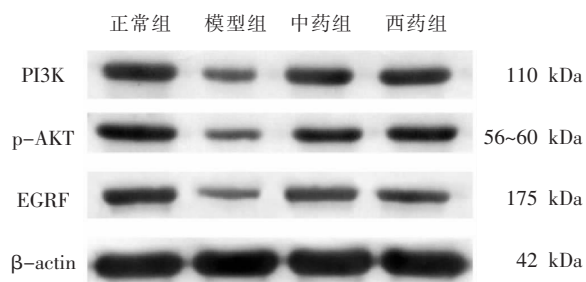


图4 各组大鼠 PI3K、p-AKT 及 EGFR 的蛋白表达

## 4 讨论

GU 是一种以胃黏膜深度坏死性缺损为主要病理表现的消化疾病。确切的发病机制不明,可能与幽门螺杆菌感染、胃酸分泌过多、黏膜修复功能下降、非甾体抗炎药等造成黏膜损伤有关<sup>[15]</sup>。目前,西医主要治疗药物有抗酸药、质子泵抑制剂、胃黏膜保护剂等,但都存在不良反应等缺陷。近年研究中,中医药治疗 GU 优势显著<sup>[16]</sup>。中医学认为 GU 属于“胃脘痛”“痞满”等疾病范畴,脾胃虚寒证为其常见证型之一。寒邪侵犯胃脘致气血失养、阳气受损,不荣则痛。黄芪建中汤具有温脾暖胃、补中益气及止痛的功效,可针对脾胃虚寒之病机改善胃部痛证。方中黄芪补气升阳,饴糖健脾,共为君药;桂枝驱风寒,白芍止痛,共为臣药;生姜温中散寒,大枣补血,同为佐药;炙甘草解中焦脾胃之痛,调和诸药,为使药。现代药理学研究证实<sup>[17-18]</sup>,黄芪、甘草具有保护胃黏膜的作用,桂枝、芍药具有抑制胃酸分泌的作用。本实验中 GU 模型大鼠在给予黄芪建中汤灌胃之后,其一般状态好转,体质量增长速度加快,UI 降低,胃组织病理改变改善,表明黄芪建中汤对 GU 大鼠胃黏膜损伤具有一定的修复作用。

最新研究表明<sup>[19]</sup>,胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡失衡在 GU 的发生发展中起关键作用。正常状态下,胃黏膜上皮细胞的凋亡与增殖保持平衡。而炎性介质、胃酸、幽门螺杆菌感染等各类刺激因素均可加速细胞凋亡,损害增殖和凋亡的平衡,进而引起胃黏膜损伤、GU 发生<sup>[20]</sup>。HGF/c-Met、PI3K/AKT 信号途径被抑制是诱发 GU 发病的两条重要信号通路<sup>[21]</sup>。HGF 属于一种多效能的生长因子,其与受体 c-Met 结合后,能激活 PI3K/AKT 通路促进上皮细胞增殖、迁移、再上皮化和胃腺重建<sup>[22]</sup>。PI3K 属于一种脂质激酶,其激活后能磷酸化 AKT,使其具有活性,且动物实验表明,激活 PI3K/AKT 途径能发挥促进胃上皮细胞增殖、抑制凋亡的作用<sup>[23-24]</sup>。EGFR 是一种跨膜糖蛋白,可与 EGF 结合构成二聚体,发挥减少胃酸分泌、促进胃溃疡愈合、修复黏膜损伤的生物功能<sup>[25]</sup>。本实验结果也显示,模型组大鼠胃组织 HGF、c-Met mRNA 及 HGF 蛋白表达显著升高,PI3K mRNA 及 PI3K、p-AKT、EGFR 蛋白表达水平显著降低;而经黄芪建中汤干预后 HGF、c-Met、PI3K mRNA 及 HGF、PI3K、p-AKT、EGFR 蛋白表达水平显著高于模型组;但各组分 c-Met 蛋白表达水平差异无统计学意义。以上表明黄芪建中汤对 GU 胃上皮细胞增殖有明显的促进作用。修复 GU 黏膜损伤。

炎症亦是 GU 发病机制中的关键因素,且多种炎症细胞因子参与其中<sup>[26]</sup>。正常情况下,巨噬细胞应答炎症信号处在较低水平。研究发现<sup>[27-29]</sup>,在有害因素刺激下,巨噬细胞功能发生改变,分泌促炎因子 TNF- $\alpha$ ;TNF- $\alpha$  可进一步促进 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等其他促炎因子的产生,直接引起胃黏膜损伤,亦可促进中性粒细胞聚集在炎症部位,从而分解连接蛋白、破坏黏膜屏障,诱发或加重 GU。本次研究发现,经黄芪建中汤灌胃给药后,GU 大鼠血清中 IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量显著降低,提示黄芪建中汤能有效抑制 GU 大鼠炎症反应。

综上所述,黄芪建中汤能有效改善 GU 大鼠胃黏膜损伤,其机制可能与激活 HGF/c-Met、PI3K/AKT 信号途径以促进胃上皮细胞增殖及减轻炎症反应有关。本研究为临床防治 GU 提供新的思路与靶点,但黄芪建中汤治疗 GU 的分子机制仍需进一步探索。

## 参考文献

- [1] XIE L, GUO Y L, CHEN Y R, et al. A potential drug combination of omeprazole and patchouli alcohol significantly normalizes oxidative stress and inflammatory responses against gastric ulcer in ethanol-induced rat model[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 85: 106660.
- [2] 宋厚盼, 陈小娟, 曾梅艳, 等. 理中汤调控 Raf/MEK/ERK 信号通路抗大鼠胃溃疡的效应与机制[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(9): 1291-1298.
- [3] 魏敏, 陈思洁, 李成艳. 脐灸联合黄芪建中汤对脾胃虚寒型胃脘痛患者临床疗效及机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(12): 1499-1503.
- [4] 赵志勇. 黄芪建中汤治疗脾胃虚寒型胃溃疡的效果分析[J]. *中国实用医药*, 2023, 18(5): 137-139.
- [5] 李博宽, 李金田, 李娟, 等. 黄芪建中汤加减治疗脾胃虚寒型胃溃疡有效性与安全性的系统评价与 Meta 分析[J]. *中医杂志*, 2020, 61(20): 1794-1802.
- [6] 仇婧玥, 陈小娟, 曾梅艳, 等. 黄芪建中汤下调 TLR-2、p-NF- $\kappa$ B 表达治疗消化性溃疡的效应及机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(3): 477-488.
- [7] RAY A, GULATI K, HENKE P. Stress gastric ulcers and cytoprotective strategies: Perspectives and trends[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2020, 26(25): 2982-2990.
- [8] 周臻, 李嘉俊. 龙须藤多甲氧基总黄酮对大鼠酒精性胃溃疡的预防作用及机制[J]. *中药材*, 2020, 43(6): 1478-1481.
- [9] GRAHAM D Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(18): 5191-5204.
- [10] 黄晓宇. 从四君子汤促进脾虚胃溃疡愈合探索《内经》“脾主卫”机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [11] MOHAMED N E. Effect of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* on the biochemical changes induced by cadmium chloride in rats[J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, 190(1): 87-94.
- [12] 陈小野, 吕爱平, 苏祖训, 等. 大鼠醋酸性胃溃疡和脾虚证证病结合模型的病理研究[J]. *中医杂志*, 1991, 32(2): 45-48.
- [13] 黄晓宇. 从四君子汤促进脾虚胃溃疡愈合探索《内经》“脾主卫”机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [14] GUTH P H, AURES D, PAULSEN G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat[J]. *Gastroenterology*, 1979, 76(1): 88-93.
- [15] 喻斌, 曾孟晖, 徐寅, 等. 肝胃百合汤对慢性应激与幽门螺杆菌双重损伤因素模型小鼠胃黏膜组织 HSP70、NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(9): 1073-

- 1078.
- [16] 谭艳, 喻嵘, 周聪, 等. 《古今名医临证金鉴·胃痛痞满》胃脘痛用药规律挖掘[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1582-1586, 1600.
- [17] 范琢玉, 王悦, 李雨轩, 等. 黄芪建中汤化学成分和药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(2): 139-142.
- [18] 杨素青, 沈成英, 周莉华, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨甘草治疗异位性皮炎的作用机制[J]. 安徽医药, 2023, 27(8): 1531-1539.
- [19] TARNAWSKI A S, AHLUWALIA A. The critical role of growth factors in gastric ulcer healing: The cellular and molecular mechanisms and potential clinical implications[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1964.
- [20] MATSUOKA K, NISHIUMI S, YOSHIDA M, et al. Effects of *Helicobacter pylori* on the glutathione-related pathway in gastric epithelial cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 526(4): 1118-1124.
- [21] 袁翠林, 汪湘, 潘建锋. 清肠汤联合心身同治法对热盛血瘀型溃疡性结肠炎HGF/c-MET表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(2): 247-250.
- [22] 郭利培, 刘洁, 张文青, 等. 吴茱萸碱调控PI3K/AKT信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(4): 612-618.
- [23] ARAB H H, SALAMA S A, EID A H, et al. Targeting MAPKs, NF- $\kappa$ B, and PI3K/AKT pathways by methyl palmitate ameliorates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(12): 22424-22438.
- [24] WANG J, WU H, PENG Y X, et al. Hypoxia adipose stem cell-derived exosomes promote high-quality healing of diabetic wound involves activation of PI3K/Akt pathways[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 202.
- [25] MA S B, WU Q, ZHAO Z L, et al. Mechanisms of *Dendrobium officinale* polysaccharides in repairing gastric mucosal injuries based on mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 71-82.
- [26] LIN K W, DENG T, QU H J, et al. Gastric protective effect of *Alpinia officinarum* flavonoids: Mediating TLR4/NF- $\kappa$ B and TRPV1 signalling pathways and gastric mucosal healing [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2023, 61(1): 50-60.
- [27] DONOHOE F, WILKINSON M, BAXTER E, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and obesity-related cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1241.
- [28] MOHAMED N E. Effect of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* on the biochemical changes induced by cadmium chloride in rats[J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, 190(1): 87-94.
- [29] YI L J, LU Y, YU S, et al. Formononetin inhibits inflammation and promotes gastric mucosal angiogenesis in gastric ulcer rats through regulating NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 2022, 42(1): 16-22.

(本文编辑 苏维)