

半夏泻心汤对 Hp 感染胃黏膜上皮细胞相关炎性因子的影响

尚丛珊 魏 琪 王星雨 田 茂
(西安培华学院 陕西省西安市 710025)

摘要: 目的 探讨半夏泻心汤对幽门螺杆菌感染胃黏膜上皮细胞炎性因子的影响。方法 在胃黏膜上皮细胞培养液中分别加入半夏泻心汤石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液,并设置对照组和调零组,进行细胞毒性实验;将胃黏膜细胞分为正常组、Hp 感染组、半夏泻心汤治疗组(石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液),治疗组给药浓度为 4 u g/ml,正常组和 Hp 感染组分别给予等量的 RPMI-1640 完全培养基,于 5% CO₂ 培养箱内,37℃ 条件培养 24h,收集培养液,离心取上清液,采用 ELISA 试剂盒检测各组培养液中 TNF- a、IL-6、IL-17 和 IL-8 的含量。结果 乙酸乙酯和正丁醇萃取液能够促进胃黏膜上皮细胞增殖,无细胞毒性作用,当石油醚萃取液浓度增大时可抑制胃黏膜细胞增殖;当 Hp 感染胃黏膜细胞时会导致炎性因子表达增多,而半夏泻心汤石油醚萃取液和乙酸乙酯萃取液能够降低胃黏膜细胞炎性因子的释放。结论 半夏泻心汤乙酸乙酯萃取液既能促进胃黏膜细胞增殖,保护胃黏膜,又可以抑制 Hp 感染胃黏膜细胞炎性因子的产生,可有效减轻 Hp 感染引起的炎症症状。

关键词: 半夏泻心汤; 幽门螺杆菌; 胃黏膜细胞; 炎性因子

慢性胃炎分为慢性浅表性和慢性萎缩性胃炎,是由多种因素引起的胃黏膜慢性炎症,炎性细胞长期浸润,降低胃黏膜的防御和修复能力,而出现非特异性消化不良现象,常表现为食欲减退、腹胀、腹痛、嗝气、打嗝、反酸等症状。目前,幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)感染被公认为是引起慢性胃炎的罪魁祸首。该菌为革兰氏阴性微需氧菌,生长于人体胃和十二指肠内,可损害胃黏膜组织,导致胃黏膜上皮细胞增生,引起慢性胃炎,甚至诱发癌变。我国 Hp 感染率超过 50%,其中慢性活动性胃炎患者高达 80%~95%^[12]。《第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》中明确提出一经感染幽门螺杆菌,不管有无临床症状,均应接受 Hp 根除治疗。目前,临床治疗以铋剂四联疗法为主,但具有疗程长、易耐药、花费高、副作用大且根除率不稳定,易再次感染等缺点^[1]。

中医认为慢性胃炎属于“胃脘痛”、“胃痞”,多由中焦气机阻滞,脾胃升降失常所致,临床多为脾胃湿热型^[4]。由半夏、黄芩、黄连、干姜、大枣、人参、甘草等组成的半夏泻心汤出自汉代张仲景的《伤寒杂病论》,该方剂具有通顺腑气、消痞散结、寒热平调、和胃降逆的功效,可使胃气渐复,常用于治疗各种脾胃疾病,特别是 Hp 感染引起的胃炎,且具有副作用小、成本低、药效全面持久、不易耐药等优势。本研究旨在研究半夏泻心汤对 Hp 感染性胃黏膜细胞损伤的干预情况及相关炎性因子的影响。

1. 材料

1.1 细胞及细菌 人胃黏膜上皮细胞(GES-1 细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;幽门螺杆菌(Hp)菌株购自北纳创联生物技术研究院。

1.2 药物 半夏 10 g、黄芩 10 g、黄连 6 g、党参 6 g、干姜 6 g、大枣 6 g、人参 6 g、枳壳 10 g、莪术 10 g、白术 10 g、炙甘草 6 g,均购自北京同仁堂大药房。根据实验室前期方法制备石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取液,用 DMSO 分别配成 100mg/ml, -20℃ 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器 幽门螺杆菌 RPMI-1640 培养基、CCK-8 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、紫外分光光度计、全自动酶标仪、RT-qPCR 仪、倒置荧光显微镜、超净工作台、CO₂ 培养箱等均由实验中心病原生物学实验室提供。

2. 方法

2.1 人胃黏膜上皮细胞培养 将冻存的 GES-1 细胞复苏后接种于含有 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中,置于 CO₂ 培养箱中

37℃ 恒温培养至瓶底单层胃黏膜细胞达 80%~100% 时,轻轻吹下细胞进行传代培养,当传至 2~3 代时,选择对数期细胞做进一步实验研究。

2.2 幽门螺杆菌(Hp)的培养取 Hp 标准菌株于 85% N₂、10% CO₂、5% O₂ 的微需氧环境中,37℃ 培养 48h,加入生理盐水,制成菌液备用^[5]。

2.3 半夏泻心汤不同萃取液对 GES-1 细胞毒性的研究 参照文献[6]方法,选择对数期 GES-1 细胞,将细胞浓度调整为 6 × 10⁵/ml,取干净 96 孔板,每孔内加入 GES-1 细胞液 100 u l,然后分别加入半夏泻心汤不同萃取液,使药物终浓度为 20、40、80、160 u g/ml,并设置对照组、调零组,3 组重复,于 5% CO₂ 培养箱内,37℃ 培养 24h。加入 10 u l MTT 溶液,孵育 4h 后吸走培养基加入 DMSO 150 u l,利用酶标仪测定 490nm 处 OD 值,重复 3 次。观察细胞存活情况,细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 调零组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零组 OD 值) × 100%。

2.4 Hp 感染 GES-1 细胞胃炎模型制备及给药 参照文献[7]方法制作 Hp 感染 GES-1 细胞胃炎模型,将处于对数期的 GES-1 细胞浓度调整为 1 × 10⁵ 个/ml,接种于 12 孔板,每孔接种量为 1ml,待贴壁后更换培养液,除对照组外,其余每孔加入适量 Hp 菌悬液,5% CO₂ 培养箱内,37℃ 培养 12h,获得 Hp 感染 GES-1 细胞模型。根据要求,将实验对象分为 GES-1 细胞正常组、Hp 感染 GES-1 细胞组、半夏泻心汤治疗组(石油醚萃取组、乙酸乙酯萃取组、正丁醇萃取组),根据文献治疗组给药浓度均为 4 u g/ml,正常组和 Hp 感染组给予等量 RPMI-1640 完全培养基。5% CO₂ 培养箱内,37℃ 培养 24h。培养结束后,将培养液收集至离心管内进行离心,转速 3000r/min,时间 20min,留上清液做进一步检查,重复 3 次。

2.5 炎性因子检测采用 ELISA 试剂盒检测各组培养液中 TNF- a、IL-17、IL-6 和 IL-8 的含量。根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,每组实验设置 3 个重复孔。

2.6 统计学方法 采用统计软件 SPSS22.0 做统计学处理分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1 半夏泻心汤对 GES-1 细胞的毒性 实验结果显示,在不同药物浓度范围内,乙酸乙酯和正丁醇萃取液能够促进胃黏膜上皮细胞增殖,无细胞毒性作用,但是随着给药浓度增大,石油醚萃取液可抑制胃黏膜细胞增殖。

3.2 半夏泻心汤不同萃取液对 Hp 感染 GES-1 细胞炎症因子的影响 ELISA 结果显示, Hp 感染 GES-1 细胞释放的 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-17 均高于空白组。与 Hp 感染组相比, 半夏泻心汤的石油醚萃取液和乙酸乙酯萃取液均能减少胃粘膜细胞炎症因子的释放。根据细胞毒性实验结果, 半夏泻心汤乙酸乙酯萃取液既能促进胃粘膜细胞增殖又可以抑制 Hp 感染 GES-1 细胞炎症因子的产生, 可做进一步研究。

4 讨论

慢性胃炎是在临床中发病率高且不被重视的消化系统类疾病, 多表现为胃粘膜炎症损伤, 诱发因素多种多样, 严重者会引起胃部癌变。Hp 最早是美国学者 Marshall 于 1983 年在慢性胃炎患者胃黏膜组织中发现, 随着医学的不断发展, Hp 感染越来越受到人们的重视, 也逐渐认识到 Hp 感染是导致慢性胃炎、胃溃疡的主要病因^[8]。Hp 通过“口-口、粪-口”途径传播, 引起炎症反应, 临床通常采用四联疗法, 选用阿莫西林、雷贝拉唑、克拉霉素等药物进行抗菌治疗, 控制病情, 保护胃黏膜。西药治疗常会出现治疗时间长、容易出现耐药性且 Hp 难以彻底根除、易再次感染的现象。随着近年来关于 Hp 致病机制的深入研究, 发现炎症反应是由细菌及其代谢产物引起的, 而细胞因子是关键介质, 可以促进细胞生长、合成及增殖, 直接参与炎症并影响炎症反应过程^[9]。因此探究 Hp 感染胃粘膜细胞炎症因子水平以及药物对炎症因子的影响可用于临床治疗效果的研究。

炎症反应中 TNF- α 是由吞噬细胞和 T 细胞分泌的一种非糖蛋白, 可降低肿瘤细胞活性, 参与免疫调节, 还可刺激巨噬细胞和单核细胞前体的分化, 继而激活中性粒细胞; 同时, TNF- α 还可促进 IL-1、IL-6 等细胞因子的合成和分泌^[10]。当机体感染 Hp 后, TNF- α 与 IL-1 等因子还可形成循环, 在趋化因子的参与下建立复杂的细胞因子网络, 促进胃黏膜炎症反应, 加剧黏膜损伤, 促使 TNF- α 的表达水平进一步升高。程晓娜等研究发现 Hp 阳性的消化性溃疡患者 TNF- α 的表达水平明显高于阴性患者。IL-17 可以促进中性粒细胞的生长发育, 同时还可刺激巨噬细胞和上皮细胞合成并分泌 IL-6、TNF- α 等炎症因子。同时, IL-17 还可通过补体 C3 进行调控炎症反应。Hp 感染可促进胃黏膜细胞分泌 IL-17, 作为重要介质, IL-17 又可促进炎症反应。IL-8 属于趋化因子家族, 可趋化中性粒细胞在感染部位黏附和浸润, 引起局部炎症^[11]。通过全基因组分析显示胃黏膜上皮细胞感染 Hp 后, IL-8 的表达被上调, 参与调控炎症反应, 郭颖媛也研究发现, 机体感染幽门螺旋杆菌后, 胃黏膜上皮细胞中 IL-8 的表达显著升高^[12]。

张海涛等对慢性胃炎患者 Hp 阳性率的研究中发现在胃黏膜活动性炎症患者中 Hp 阳性率高达 90% 以上, 说明慢性胃炎与 Hp 感染密切相关, 而中性粒细胞反应又是引起胃黏膜损伤的主要机制。TNF- α 和 IL-17 均参与了中性粒细胞反应, 并激活该细胞, 有研究也表明血清 TNF- α 和 IL-17 与 Hp 感染性胃溃疡患者炎症活动呈正相关。可能是因为 IL-17 刺激免疫细胞, 使 IL-8、IL-6 和 TNF- α 水平升高, 导致胃黏膜损伤, 同时 IL-6 又反作用于 T 细胞, 进一步促进 IL-17 的分泌, 加重炎症反应^[13]。孙长庆等研究也发现根治 Hp 可使 TNF- α 等炎症因子水平显著下降。本研究结果也显示与正常 GES-1 细胞相比, Hp 感染后, 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-17、IL-6 和 IL-8 的表达量明显增高, 与多项研究结果相符, 进一步表明 Hp 感染引起的慢性胃炎与 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-17 等炎症因子密切相关。

传统中医遵循辨证的治疗原则, 关于慢性胃炎的治疗, 已经取得一定效果。出自张仲景《伤寒论》的半夏泻心汤温寒并用, 辛开苦降, 攻补兼施, 方中半夏可消痞散结, 干姜、黄芩、黄连可散寒, 党参、大枣可补益脾胃气虚, 再以甘草调和诸药^[14]。全方有调升降、理虚实、和阴阳的功效, 是和解消痞的良方, 能有效缓解 Hp 感染性胃炎患者食欲不振、脘腹胀满、嗝气打嗝等不适症状。

综上所述, Hp 感染性胃粘膜炎症反应与 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-17 等因子呈正相关, 且这些炎症因子在炎症反应中起重要作用。而半夏泻心汤能够有效减少 Hp 感染性胃粘膜细胞释放 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-17 等炎症因子, 进一步证明该剂的治疗机制, 为进一步研究做好铺垫。但受时间和条件的限制, 本此研究仅停留在宏观水平, 需进一步从分子水平解释半夏泻心汤的治疗机制。

参考文献:

[1] 易庆军, 杨宇, 胡煜等. 下调 miR-32 对幽门螺杆菌诱导的肠上皮细胞凋亡及 TAK1-p38 通路的影响 [J]. 河北医学, 2021, (43): 2899-2903.

[2] 王艳红, 庞训雷, 沈桂芳, 李莉, 费素娟. 不同年龄幽门螺杆菌感染人群血清胃功能相关指标和外周血炎症细胞检测结果分析 [J]. 检验医学, 2021, 36(10): 1055-1059.

[3] [4] 李菊芳, 陈小芳, 徐惠明, 陈娟. 半夏泻心汤合连朴饮加减对慢性胃炎患者幽门螺杆菌根除率与胃蛋白酶原水平的影响 [J]. 现代医学与健康研究(中医中药), 2022, 6(4): 101-105.

[5] [12] 郭颖媛, 冯强, 杨运霞等. 黄连素对感染幽门螺杆菌小鼠胃粘膜上皮细胞损伤的影响 [J]. 世界中医药, 2021, 16(18): 2702-2705.

[6] [7] [11] 马小青, 杨敏, 涂仪军, 尤朋涛, 刘丹, 高良姜抗幽门螺杆菌相关性胃炎有效部位的筛选及对 NF- κ B 信号通路的抑制作用 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3838-3842.

[8] [9] [10] 刘婷莉, 郭元彪, 邓艺等. Hp 感染性胃溃疡患者炎症活动度与血清 TNF- α 、IL-17 表达水平的相关性 [J]. 热带医学杂志, 2021, (21)9: 1154-1157.

[13] 李慧臻, 王天麟, 马佳乐等. 基于 Foxp3/ROR γ t 免疫失衡探讨半夏泻心汤对幽门螺杆菌相关性胃炎小鼠免疫微环境的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2574-2578.

[14] 张亚峰, 冯秉涛, 郭丽. 半夏泻心汤加减辅助治疗根除幽门螺杆菌失败的慢性胃炎(寒热错杂型)患者的效果及其对血清胃蛋白酶原水平的影响 [J]. 辽宁医学杂志, 2022, 36(1): 47-50.

作者简介: 尚丛珊, 1988 年 2 月, 女, 汉, 河南灵宝, 西安培华学院, 副教授, 研究生, 微生物学。

魏琪, 1990 年 12 月, 女, 汉, 陕西甘泉, 西安培华学院, 讲师, 研究生, 微生物学。

王星雨, 2001 年 4 月, 女, 汉, 安徽省五河县, 西安培华学院, 本科在读, 护理学。

田茂, 2001 年 9 月, 男, 汉, 山西省芮城县, 西安培华学院, 本科在读, 护理学。

基金课题(须有编号):

2021 年校级科研《半夏泻心汤对 Hp 感染胃粘膜上皮细胞炎症因子、miR-32 表达和 TAK1-p38/NF- κ B 信号通路的影响》, 编号: PHKT2125;

2022 年大学生创新创业训练项目《半夏泻心汤对 Hp 感染小鼠胃粘膜上皮细胞及炎症因子的影响》, 编号: PHDC2022073。