

# 茶多酚激活 Nrf2/HO-1 通路减轻阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤的机制研究

付凯<sup>1a</sup>, 王永辉<sup>1a</sup>, 贡洁<sup>2</sup>, 郑栓<sup>1b</sup>, 孔永红<sup>1a\*</sup> (1. 驻马店市中心医院, a. 药学部, b. 肾脏内科, 河南 驻马店 463000; 2. 西安培华学院医学院基础医学系, 西安 710000)

**摘要:**目的 探讨茶多酚(tea polyphenols, TP)对阿司匹林诱导的人胃黏膜上皮细胞 GES-1 损伤的影响及分子机制。方法 采用阿司匹林(19.27 mmol·L<sup>-1</sup>)和不同浓度的茶多酚(50、100、200 μmol·L<sup>-1</sup>)处理 GES-1 细胞 24 h, 将 GES-1 细胞随机分为对照组、阿司匹林组(19.27 mmol·L<sup>-1</sup>)、阿司匹林 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + 茶多酚 50 μmol·L<sup>-1</sup> 组、阿司匹林 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + 茶多酚 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组、阿司匹林 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)检测 GES-1 细胞增殖水平, 采用流式细胞术和 TUNEL 实验检测 GES-1 细胞凋亡水平。采用二氯荧光素双醋酸盐(DCFH-DA)荧光探针检测 GES-1 细胞活性氧(ROS)水平。采用试剂盒检测 GES-1 细胞超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)水平。采用蛋白免疫印迹(Western blot)检测 GES-1 细胞 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素单加氧酶 1(HO-1)蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 阿司匹林组 GES-1 细胞凋亡率、凋亡指数、ROS、MDA 水平、细胞核 Nrf2/细胞质 Nrf2 比值、Bax、HO-1 蛋白表达水平显著增加, 细胞存活率、Bcl-2 蛋白表达水平、SOD、CAT 水平显著降低( $P < 0.05$ ); 与阿司匹林组比较, 阿司匹林 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + 茶多酚(50、100、200 μmol·L<sup>-1</sup>)组 GES-1 细胞凋亡率、凋亡指数、ROS、MDA 水平、Bax 蛋白表达水平显著降低, 细胞存活率、细胞核 Nrf2/细胞质 Nrf2 比值、Bcl-2、HO-1 蛋白表达水平、SOD、CAT 水平显著增加( $P < 0.05$ )。**结论** 茶多酚可减轻阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤, 其机制可能与茶多酚激活 Nrf2/HO-1 抗氧化通路、抑制线粒体通路介导的细胞凋亡有关。

**关键词:** 茶多酚; 核因子 E2 相关因子 2/血红素单加氧酶 1 通路; 阿司匹林; GES-1 细胞; 氧化应激

**doi:**10.11669/cpj.2024.01.006 **中图分类号:**R965 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-2494(2024)01-0045-07

## Mechanism Study of Tea Polyphenols Alleviating Aspirin-induced Injury in GES-1 Cells through Activating Nrf2/HO-1 Pathway

FU Kai<sup>1a</sup>, WANG Yonghui<sup>1a</sup>, YUN Jie<sup>2</sup>, ZHENG Shuan<sup>1b</sup>, KONG Yonghong<sup>1a\*</sup> (1a. Department of Pharmacy, 1b. Department of Nephrology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China; 2. Department of basic medicine, School of medicine, Xi'an Peihua University, Xi'an 710000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of tea polyphenols (TP) on aspirin-induced injury of human gastric epithelial cells GES-1 and its molecular mechanism. **METHODS** GES-1 cells were treated with aspirin (19.27 mmol·L<sup>-1</sup>) and different concentrations of tea polyphenols (50, 100, 200 μmol·L<sup>-1</sup>) for 24 h. GES-1 cells were randomly divided into control group, aspirin group(19.27 mmol·L<sup>-1</sup>), aspirin 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + TP 50 μmol·L<sup>-1</sup> group, aspirin 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + TP 100 μmol·L<sup>-1</sup> group, aspirin 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + TP 200 μmol·L<sup>-1</sup> group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect the survival rate of GES-1 cells. Flow cytometry and TUNEL assay were used to detect apoptosis of GES-1 cells. Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) of GES-1 cells. Corresponding kits were used to detect the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) of GES-1 cells. Western blot was used to detect the expression levels of B-lymphocytoma-2 (Bcl-2), B-lymphocytoma-2-associated X protein (Bax), nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme monooxygenase 1 (HO-1) of GES-1 cells. **RESULTS** Compared with the control group, the apoptosis rate, apoptosis index, ROS, MDA levels, nuclear Nrf2/ cytoplasmic Nrf2 ratio, Bax, and HO-1 protein expression levels of GES-1 cells in 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> aspirin group were significantly increased, while the cell survival rate, Bcl-2 protein expression level, SOD and CAT levels were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> aspirin group, the apoptosis rate, apoptosis index, ROS, MDA levels and Bax protein expression levels in aspirin 19.27 mmol·L<sup>-1</sup> + TP (50, 100, 200 μmol·L<sup>-1</sup>) groups were significantly decreased, while the cell survival rate, nuclear Nrf2/cytoplasmic Nrf2 ratio, Bcl-2, Nrf2, HO-1 protein expression levels, SOD and CAT levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Tea polyphenols can alleviate

**基金项目:** 河南省科学技术厅项目资助(20210232536)

**作者简介:** 付凯,男,硕士,主管药师 研究方向:临床药学研究 \* 通讯作者:孔永红,女,主任药师 研究方向:临床药学研究  
Tel:15239606323

aspirin-induced GES-1 cell damage, and the mechanism may be related to the activation of Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and the inhibition of mitochondrial pathway mediated apoptosis.

**KEY WORDS:** tea polyphenol; Nrf2/HO-1 pathway; aspirin; GES-1 cell; oxidative stress

阿司匹林是常用的止痛药和消炎药,其在心血管疾病中应用广泛,然而,阿司匹林会使胃肠道产生严重的不良反应,严重限制了它的应用<sup>[1]</sup>。据报道<sup>[2]</sup>包括阿司匹林在内的非甾体抗炎药引发胃损伤的机制与其诱导胃黏膜上皮细胞脂质过氧化,增加氧化应激水平有关。许多中药都具有抗氧化功能,中药活性成分是目前胃部疾病研究的热点之一。茶多酚是一种从茶叶中提取的类黄酮化合物,它是一种天然的抗氧化剂<sup>[3]</sup>,茶多酚可能通过抗炎、抗氧化、增强胃黏膜保护因子等方式减轻酒精性胃损伤<sup>[4]</sup>。茶多酚对阿司匹林所致胃部疾病的影响目前尚未有文献报道。Nrf2/HO-1 信号通路是重要的抗氧化应激通路,是机体内源性抗氧化系统的核心调控元件<sup>[5]</sup>,Nrf2/HO-1 信号通路的激活可通过降低氧化应激水平减轻阿司匹林引起的胃黏膜上皮细胞 GES-1 的氧化应激损伤<sup>[6]</sup>。

本研究探究茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤的影响及 Nrf2/HO-1 抗氧化通路在其中的作用,为茶多酚在阿司匹林所致胃损伤中的开发利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

人胃黏膜上皮细胞 GES-1 (美国 ATCC 细胞库);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);茶多酚(纯度 $\geq 98\%$ ,中国上海源叶生物科技有限公司);阿司匹林(纯度 99%)、DCFH-DA 荧光探针(美国 Sigma 公司);噻唑蓝(MTT)试剂、TUNEL 染色液、DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);兔抗人 Bcl-2、Bax、Nrf2、HO-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。BD FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);ECLIPSE TS100 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、处理及分组

GES-1 细胞用含

10% 胎牛血清、100 U · mL<sup>-1</sup>青霉素和 100 μg · mL<sup>-1</sup>链霉素的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。取对数期的 GES-1 细胞,按是否用阿司匹林和茶多酚处理随机分为对照组(不用阿司匹林和茶多酚处理)、阿司匹林组(19.27 mmol · L<sup>-1</sup>)、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 50 μmol · L<sup>-1</sup>组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 100 μmol · L<sup>-1</sup>组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol · L<sup>-1</sup>组。各组细胞于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养 24 h。

**1.2.2 MTT 检测 GES-1 细胞增殖水平** 收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞,加入 100 μL 的 MTT 溶液,孵育 4 h,弃上清后用二甲基亚砷重悬,酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度值,细胞增殖水平用细胞存活率(公式 1)表示。

细胞存活率(%) = 实验组吸光度值/对照组吸光度值 × 100% 公式(1)

**1.2.3 流式细胞术检测 GES-1 细胞凋亡水平** 收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,4 °C、1 000 r · min<sup>-1</sup>离心 10 min, PBS 洗涤,离心收集细胞,加入 500 μL 结合缓冲液,然后加入 5 μL 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (FITC) 与 5 μL PI,充分混匀后在 1 h 内置于流式细胞仪中,应用 Cellaest 软件检测各组细胞凋亡率。

**1.2.4 TUNEL 实验检测 GES-1 细胞凋亡水平** 收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞,添加 4% 多聚甲醛固定 20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,用含有 3% 双氧水的甲醇封闭 10 min, PBS 洗涤,加入 0.1% TritonX-100 冰上通透 10 min, PBS 洗涤,加入 50 μL TUNEL 染色液 37 °C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤,加入 DAPI 染色液避光孵育 15 min, PBS 漂洗,200 倍荧光显微镜下观察拍照,凋亡细胞核呈绿色,随机选择 6 个视野,统计每个视野中凋亡细胞核数与总细胞核数,计算凋亡指数(公式 2)。

凋亡指数(%) = 凋亡细胞核数/总细胞核数 × 100% 公式(2)

**1.2.5 Western blot 检测 GES-1 细胞 Bcl-2、Bax、细胞核 Nrf2、细胞质 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平** 收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞,弃培养液,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。用核蛋白抽提试剂盒获取细胞质与细胞核蛋白。采用 BCA 法检测蛋白

质的浓度, SDS-PAGE 分离蛋白, 分离的蛋白凝胶电转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭, 加一抗稀释液 (Bcl-2、Bax、Nrf2、HO-1 的稀释度均为 1:2 000) 在 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤后室温下孵育二抗稀释液 (1:5 000) 1 h, PBS 洗涤, 滴加电化学发光 (ECL) 工作液, 暗室 X 线胶片曝光, 显影, 定影, 以 GAPDH 为内参, 使用 Image J 图像分析软件测定各条带灰度值。

### 1.2.6 DCFH-DA 法检测 GES-1 细胞内 ROS 水平

收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞, 弃上清, PBS 洗涤, 加入 500  $\mu\text{L}$  DCFH-DA 工作液, 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 用荧光显微镜观察拍照, Image J 软件进行荧光处理计算, 用荧光强度值表示细胞内 ROS 水平。

### 1.2.7 试剂盒检测 SOD、CAT、MDA 水平

收集培养 24 h 后的各组 GES-1 细胞, 超声破碎, 离心, 收集上清液, 按试剂盒说明书测定 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。SOD 采用黄嘌呤氧化酶法, CAT 采用紫外吸收法, MDA 采用硫代巴比妥酸法。

### 1.2.8 统计学方法

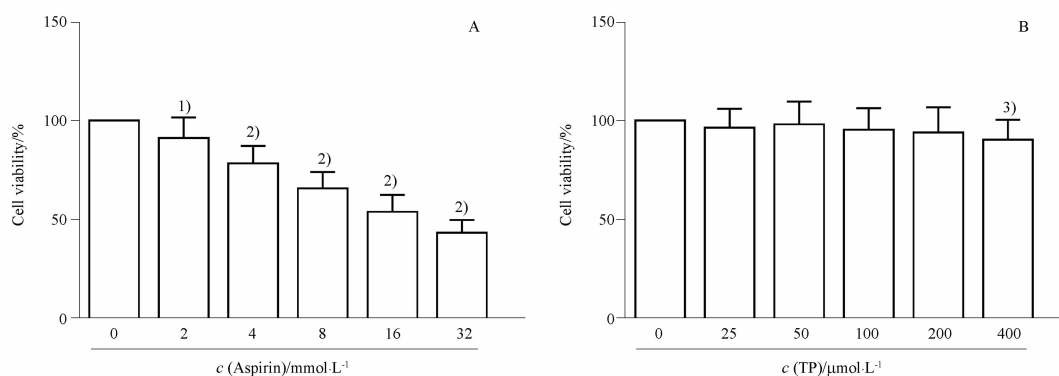
采用 SPSS 26.0 软件分析实

验数据。符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 SNK-q 检验, 多个剂量组与 1 个对照组的比较采用 Dunnett 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度阿司匹林或茶多酚对 GES-1 细胞增殖的影响

用不同浓度的阿司匹林或茶多酚处理 GES-1 细胞 24 h, MTT 检测显示, 随着阿司匹林浓度的增加, GES-1 细胞存活率逐渐降低, 且呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ), 阿司匹林对 GES-1 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $(19.27 \pm 1.86) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。浓度在  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以下的茶多酚对 GES-1 细胞存活率没有显著影响 ( $P > 0.05$ ), 为便于研究茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤的影响, 后续实验中阿司匹林浓度选取  $IC_{50}$  的浓度  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 茶多酚浓度选取对 GES-1 细胞没有细胞毒作用的 50、100、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 见图 1。



与 0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  阿司匹林比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  茶多酚比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , vs 0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  aspirin; <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , vs 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  tea polyphenols.

图 1 不同浓度阿司匹林(A)或茶多酚(B)对 GES-1 细胞增殖的影响。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of different concentrations of aspirin (A) or tea polyphenols (B) on proliferation of GES-1 cells.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

### 2.2 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞增殖的影响

MTT 实验检测显示, 与对照组比较, 阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 GES-1 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较, 阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 茶多酚  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 茶多酚  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 茶多酚  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 GES-1 细胞存活率显著增加

( $P < 0.05$ ), 见图 2。

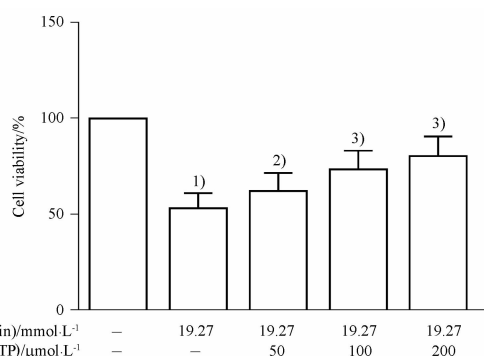
### 2.3 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞凋亡的影响

流式细胞术与 TUNEL 实验检测显示, 与对照组比较, 阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 GES-1 细胞凋亡率和凋亡指数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 与阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较, 阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 茶多酚  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 茶多酚  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、阿司

匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol · L<sup>-1</sup> 组 GES-1 细胞凋亡率和凋亡指数显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

#### 2.4 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Western blot 检测显示, 与对照组比较, 阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组 GES-1 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组比较, 阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 50 μmol · L<sup>-1</sup> 组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 100 μmol · L<sup>-1</sup> 组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol · L<sup>-1</sup> 组 GES-1 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著增加, Bax 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

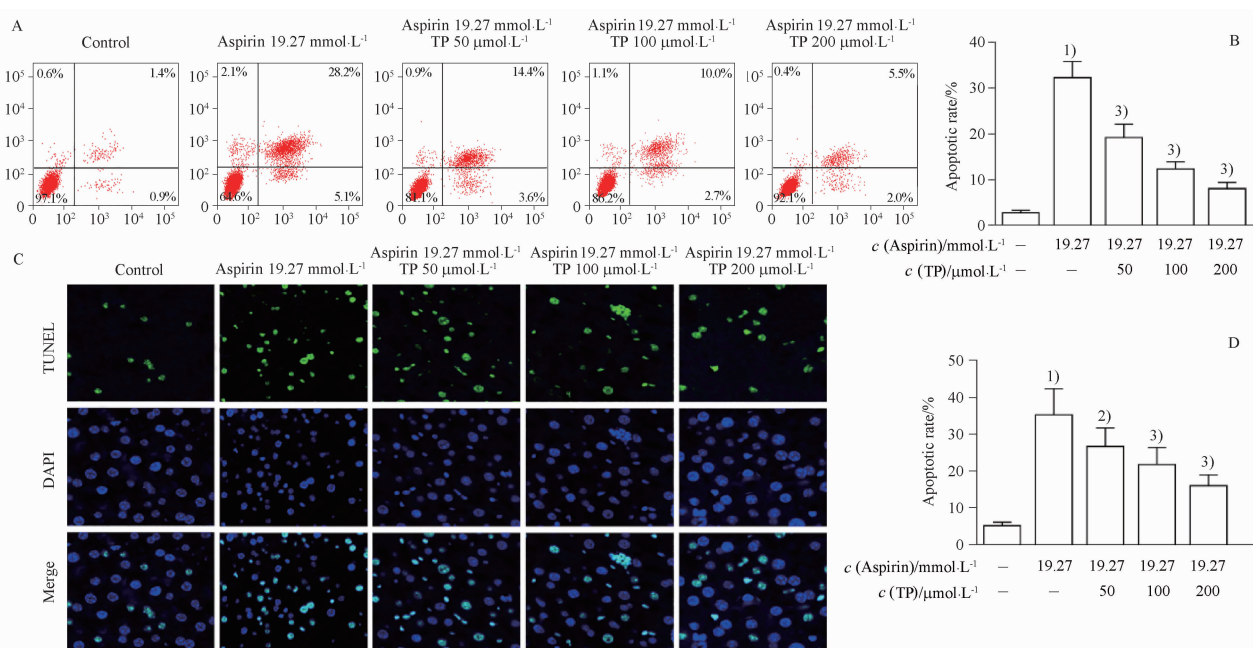


与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ , vs aspirin 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> group.

图 2 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞增殖的影响.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Effect of tea polyphenols on the proliferation of GES-1 cells induced by aspirin.  $n = 9, \bar{x} \pm s$



与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ , vs aspirin 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> group.

图 3 流式细胞仪(A,B)和 TUNEL 实验(C,D)检测茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞凋亡的影响.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of tea polyphenols on apoptosis of GES-1 cells induced by aspirin detected by flow cytometry (A,B) and TUNEL assay (C,D).  $n = 9, \bar{x} \pm s$

#### 2.5 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞氧化应激水平的影响

DCFH-DA 荧光探针检测显示, 与对照组比较, 阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组 GES-1 细胞 ROS、MDA 水平显著增加, SOD、CAT 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> 组比较, 阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 50 μmol · L<sup>-1</sup> 组、

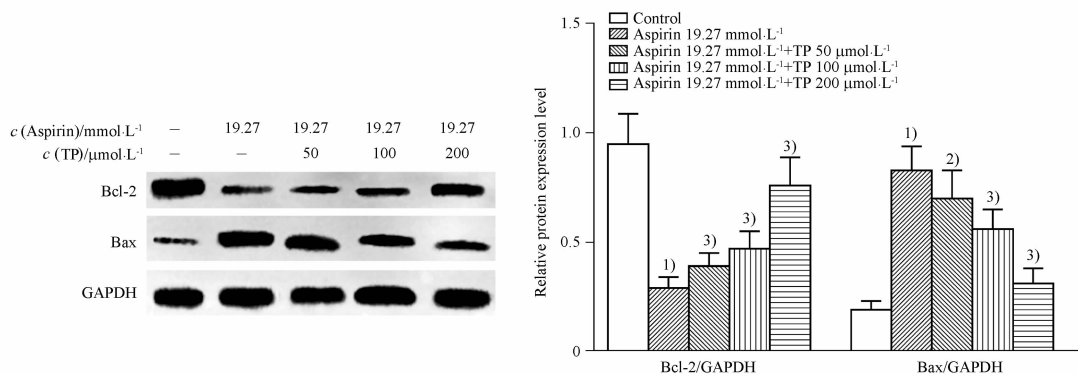
阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 100 μmol · L<sup>-1</sup> 组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol · L<sup>-1</sup> 组 GES-1 细胞 ROS、MDA 水平显著降低, SOD、CAT 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

#### 2.6 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Nrf2/HO-1 信号通路的影响

Western blot 检测显示, 与对照组比较, 阿司匹林

19.27 mmol · L<sup>-1</sup>组 GES-1 细胞细胞核 Nrf2/细胞质 Nrf2 比值和 HO-1 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup>组比较, 阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 50 μmol · L<sup>-1</sup>组、阿司

匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 100 μmol · L<sup>-1</sup>组、阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> + 茶多酚 200 μmol · L<sup>-1</sup>组 GES-1 细胞细胞核 Nrf2/细胞质 Nrf2 比值和 HO-1 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

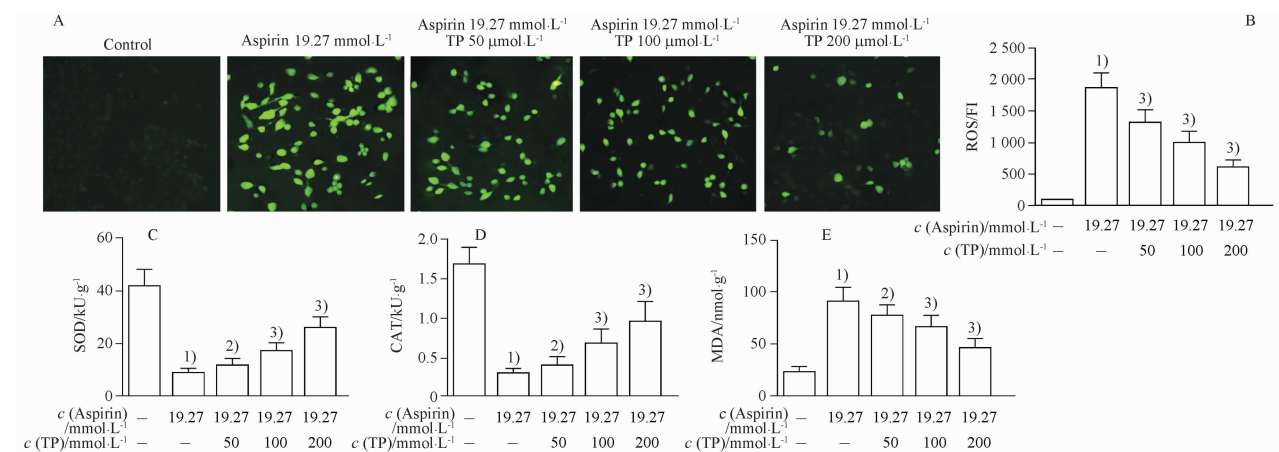


与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup>组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs aspirin 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> group.

图 4 Western blot 检测茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effect of tea polyphenols on Bcl-2 and Bax protein expression of GES-1 cells induced by aspirin detected by Western blot.  $n = 9, \bar{x} \pm s$



A - DCFH-DA 荧光探针检测各组 GES-1 细胞 ROS 水平 ( $\times 200$ ); B - A 的统计结果; C - SOD 水平; D - CAT 水平; E - MDA 水平; 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与阿司匹林 19.27 mmol · L<sup>-1</sup>组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - DCFH-DA Fluorescent probe was used to detect ROS level of GES-1 cells in each group ( $\times 200$ ); B - statistical results of A; C - SOD levels; D - CAT levels; E - MDA levels; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs aspirin 19.27 mmol · L<sup>-1</sup> group.

图 5 茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞氧化应激水平的影响。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Effect of tea polyphenols on the level of oxidative stress of GES-1 cells induced by aspirin.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

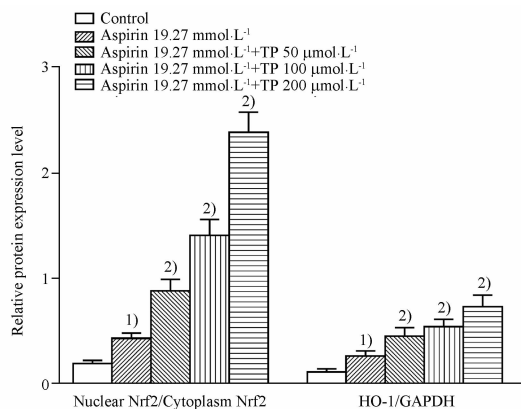
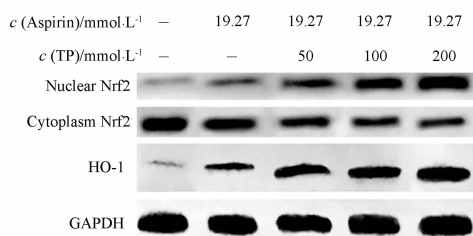
茶多酚在多种胃损伤疾病中发挥保护作用, 如有研究表明茶多酚可通过抗炎、抗氧化及抑制胃酸分泌等方式保护胃黏膜, 改善小鼠酒精性胃损伤<sup>[4,7]</sup>。茶多酚可通过调节胃酸环境、改善炎症减轻幽门螺杆菌感染所致胃部损伤<sup>[8]</sup>。但目前缺少茶多酚对阿司匹林所致胃损伤的影响方面的研究。

本研究发现, 茶多酚可显著促进阿司匹林诱导的 GES-1 细胞增殖并抑制细胞凋亡, 表明茶多酚可减轻阿司匹林引起的胃黏膜上皮细胞损伤。Bax、Bcl-2 是调控细胞凋亡的线粒体通路的重要成员<sup>[9]</sup>, 本研究中茶多酚可显著降低阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Bax 蛋白表达水平, 增加 Bcl-2 蛋白表达水平, 表明线粒体通路参与了茶多酚对阿司匹林诱导的

GES-1 细胞凋亡的调控。

氧化应激是指机体自由基生成增加或清除能力降低引起自由基在体内过度积累导致氧化损伤的过程,ROS 是诱发氧化应激的高反应活性物质<sup>[10-11]</sup>。SOD、CAT 是机体重要的抗氧化酶,MDA 是脂质过氧化终产物,SOD、CAT、MDA 还参与胃损伤的病理过程<sup>[12]</sup>。本研究发现,茶多酚可显著降低阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 MDA 与 ROS 水平,并提高 SOD、CAT 水平,表明茶多酚

可降低阿司匹林诱导的 GES-1 细胞氧化应激水平。氧化应激是引起细胞凋亡、炎症反应的重要因素,也是胃损伤的重要机制之一,并参与药物对阿司匹林所致胃损伤的治疗过程,如卡维地洛减轻阿司匹林致大鼠胃损伤的机制与其抗氧化作用有关<sup>[13]</sup>。螺旋藻通过减轻氧化应激和炎症反应改善阿司匹林诱导的胃溃疡<sup>[14]</sup>。因而推测茶多酚减轻阿司匹林所致胃损伤的机制可能与其降低氧化应激水平有关。



与对照组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与阿司匹林  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , vs aspirin  $19.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  group.

图6 Western blot 检测茶多酚对阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Nrf2/HO-1 信号通路的影响。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effect of tea polyphenols on Nrf2/HO-1 signaling pathway of GES-1 cells induced by aspirin detected by Western blot.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Nrf2/HO-1 信号通路是机体抵御氧化应激的重要通路,在正常细胞中 Nrf2 主要存在于细胞质中处于非活性状态,受到外来刺激后 Nrf2 转运至细胞核中与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,促进下游多种抗氧化酶和 II 相解毒酶基因的表达,进而增强细胞的抗氧化能力,HO-1 是最易被 Nrf2 激活的抗氧化酶<sup>[15-16]</sup>。本研究显示,阿司匹林显著增加 GES-1 细胞核 Nrf2/细胞质 Nrf2 比值和 HO-1 蛋白表达,表明 Nrf2/HO-1 抗氧化通路被阿司匹林激活。文献研究发现阿司匹林对胃黏膜组织或细胞 Nrf2/HO-1 通路的影响具有争议,如有文献<sup>[1,6]</sup>表明阿司匹林会增加胃黏膜组织或 GES-1 细胞 Nrf2 的表达,与本研究结果一致,但也有文献<sup>[17]</sup>表明短时间阿司匹林处理会使胃黏膜上皮细胞 CRL-1739 中 Nrf2 的表达增加,长时间处理则会使 Nrf2 的表达降低,还有文献<sup>[18]</sup>表明阿司匹林会降低小鼠胃黏膜组织 Nrf2 的表达。这可能与细胞株、剂量、体内与体外实验等因素的差异有关。本研究中 GES-1 细胞 Nrf2/

HO-1 抗氧化通路的激活可能是细胞为降低阿司匹林所致氧化应激的自我保护机制。本研究还发现,茶多酚可进一步激活阿司匹林诱导的 GES-1 细胞 Nrf2/HO-1 通路,推测茶多酚在本研究中的抗氧化作用与此有关。

综上所述,茶多酚可减轻阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤,其机制可能与茶多酚激活 Nrf2/HO-1 抗氧化通路、抑制线粒体通路介导的细胞凋亡有关。本研究在细胞层面对茶多酚在阿司匹林所致胃损伤方面的研究进行了初步探索,下一步将进行动物实验,为茶多酚在阿司匹林所致胃损伤中的开发利用提供参考。

## REFERENCES

- [1] MAGIEROWSKI M, MAGIEROWSKA K, HUBALEWSKA-MAZGAJ M, *et al.* Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114:235-250.
- [2] NAGANO Y, MATSUI H, TAMURA M, *et al.* NSAIDs and a-

- cidic environment induce gastric mucosal cellular mitochondrial dysfunction[J]. *Digestion*, 2012, 85(2):131-135.
- [ 3 ] FU J, LIN T, CHEN A L, *et al.* Protective effect of tea polyphenols on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in intestinal epithelial cells of goose embryo[J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 2020, 51(4):61-69.
- [ 4 ] ZHOU X R, ZHAO X, LONG X Y, *et al.* Comparison of antioxidative effects of polyphenols from raw puer tea *in vitro* and their protective effects on alcoholic gastric injury in mice [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2019, 40(12):300-308.
- [ 5 ] LI S X, XIAO X L, YI L, *et al.* Geniposide protects against oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Chin J Comp Med*(中国比较医学杂志), 2021, 31(4):55-62.
- [ 6 ] DUAN Z T, ZHANG Z Y, WU H L, *et al.* Protective effects and its mechanism of rebamipide on aspirin-induced injury in human gastric mucosal epithelium cells[J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 2014, 34(7):453-457.
- [ 7 ] ZHAO X, SUN P, LI G, *et al.* Polyphenols in Kuding tea help prevent HCl/ethanol-induced gastric injury in mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(3):1713-1725.
- [ 8 ] DENG G, WU Y, SONG Z, *et al.* Tea polyphenol liposomes overcome gastric mucus to treat helicobacter pylori infection and enhance the intestinal microenvironment[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(11):13001-13012.
- [ 9 ] ZHOU W M, LIN Y F, ZHANG Z, *et al.* Effect of Bushen Zhuangdu recipe on mitochondrial apoptotic pathway in degenerative intervertebral disc cells in rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(19):25-31.
- [ 10 ] GAO T, WANG Z X, CHEN Z M, *et al.* Oxidative stress and autophagy mediated by reactive oxygen species[J]. *China Anim Husb Vet Med*(中国畜牧兽医), 2018, 45(3):656-662.
- [ 11 ] GUO Q Q, WANG S S, ZHANG S S, *et al.* ATM-CHK2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress [J/OL]. *EMBO J*, 2020, 39(10): e103111 [2022-9-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32187724>.
- [ 12 ] MU J F, ZHAO X, LONG X Y, *et al.* Preventive effect of small-leaf kudingcha polyphenol extract on hydrochloric acid /ethanol gastric injury in mice [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2019, 40(15):276-283, 291.
- [ 13 ] AHMED I, ELKABLAWEY M A, EL-AGAMY D S, *et al.* Carvedilol safeguards against aspirin-induced gastric damage in rats: [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(9):1257-1267.
- [ 14 ] Mahmoud Y I, Abd El-Ghffar E A. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:314-321.
- [ 15 ] HU J L, SHANG J, HOU Z J, *et al.* Effect of Wenshen Xingnao decoction on Nrf2-ARE signaling pathway in brain tissue of vascular dementia rats [J]. *Sci Technol Eng* (科学技术与工程), 2020, 20(9):3533-3539.
- [ 16 ] HE S R, YU H H, YANG Z, *et al.* Anti-oxidation mechanism of andrographolide on HaCaT cells via Nrf2/ARE pathway [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2019, 54(10):777-782.
- [ 17 ] CHEN Y W, LI W G, YAO W Y, *et al.* The contribution of NRF2/HO-1 pathway in aspirin-induced gastric epithelial cell injury [J]. *J Int Med Concepts Pract* (内科理论与实践), 2019, 14(4):247-252.
- [ 18 ] CHEN J, ZHANG J, CHEN T, *et al.* Xiaojianzhong decoction attenuates gastric mucosal injury by activating the p62/Keap1/Nrf2 signaling pathway to inhibit ferroptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155:113631. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113631.

(收稿日期:2022-10-14)