·实验研究·

枳术丸调控 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制研究*

窦盈[1,2]，郭辉[1,2]，王智民[2,3]，代丽萍[1,2]，许二平[1,2]

1. 河南中医药大学豫药全产业链研发河南省协同创新中心，河南 郑州 450046；2. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；
3. 中国中医科学院中药研究所，北京 100700

摘要：目的：基于磷脂酰肌醇－3－激酶/蛋白激酶 B/核因子－κB（phosphatidylinositol－3－kinase/protein kinase B/nuclear factor－kappa B，PI3K/AKT/NF－κB）信号通路探讨枳术丸治疗慢性萎缩性胃炎（chronic atrophic gastritis，CAG）的作用机制。方法：在 TCMSP 数据库中检索枳术丸（枳实、白术）的活性成分与作用靶点，借助 GeneCards、OMIM、DisGeNET、DrugBank 数据库查找 CAG 的靶点。采用 Venny 2.1.0 软件获取枳术丸与 CAG 的交集靶点，并上传至 STRING 12.0 数据库，构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，并筛选核心靶点。利用 Metascape 数据库进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。RAW264.7 细胞加入 2 mg·L^{-1} LPS 诱导炎症模型，枳术丸（150、200、300、400 mg·L^{-1}）进行干预，并设置空白组（Control）和模型组（LPS）。采用 Griess 法测定一氧化氮（nitric oxide，NO）含量，ELISA 法检测肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、白细胞介素－6（interleukin－6，IL－6）、IL－1β 含量。将 52 只 SD 大鼠随机分为正常组（CON）、模型组（CAG）、枳术丸低剂量组（ZZW－L，8.1 g·kg^{-1}）及枳术丸高剂量组（ZZW－H，16.2 g·kg^{-1}），每组 8 只。除 CON 组外，其余大鼠采用 MNNG 联合雷尼替丁及饥饱失常法建立 CAG 模型。给药 8 周后，采用 HE 染色观察大鼠胃窦病理形态，ELISA 法检测血清胃蛋白酶原Ⅰ（pepsinogen Ⅰ，PGⅠ）、PGⅡ、PGⅠ/PGⅡ（PGR）、TNF－α、IL－6、IL－1β 水平，Western blot 法检测胃窦 PI3K/AKT/NF－κB 通路相关蛋白表达水平。结果：枳术丸靶点 118 个，CAG 靶点 662 个，两者的交集靶点 48 个。核心靶点包括蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT1）、肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53）、B 细胞淋巴瘤－2（B－cell lymphoma－2，BCL2）等。KEGG 通路包括 PI3K/AKT 信号通路、NF－κB 信号通路等。细胞实验显示，与 Control 组比较，LPS 组细胞 NO 释放量、TNF－α、IL－6、IL－1β 含量增加（$P<0.01$）；与 LPS 组比较，枳术丸组细胞 NO 释放量、TNF－α、IL－6、IL－1β 含量减少（$P<0.05$）。动物实验显示，CON 组大鼠胃窦组织病理形态无明显异常；CAG 组大鼠胃窦黏膜结构紊乱，伴炎症细胞浸润；与 CAG 组比较，ZZW－L、ZZW－H 组大鼠胃窦腺体萎缩、炎症细胞浸润等减轻。与 CON 组比较，CAG 组大鼠血清 PGⅡ、TNF－α、IL－6、IL－1β 水平升高，PGⅠ、PGR 水平降低（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－L、ZZW－H 组大鼠血清 PGⅡ、TNF－α、IL－6、IL－1β 水平降低（$P<0.05$），PGⅠ、PGR 水平升高（$P<0.05$）。与 CON 组比较，CAG 组大鼠胃窦 p－PI3K/PI3K、p－AKT/AKT、p－NF－κB/NF－κB 水平升高（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－H 组大鼠胃窦 p－PI3K/PI3K、p－AKT/AKT、p－NF－κB/NF－κB 水平降低（$P<0.01$）。结论：枳术丸可能通过调控 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路，抑制炎症反应，从而发挥治疗 CAG 的作用。

关键词：枳术丸；慢性萎缩性胃炎；PI3K/AKT/NF－κB 信号通路；网络药理学；炎症反应
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.06.210
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)06－1302－09

Mechanism of Zhizhu Pill Regulating PI3K/AKT/NF－κB Signaling Pathway in Treatment of Chronic Atrophic Gastritis

DOU Ying[1,2]，GUO Hui[1,2]，WANG Zhimin[2,3]，DAI Liping[1,2]，XU Erping[1,2]

*基金项目：河南省科技研发计划联合基金（优势学科培育类）重点项目（222301420023）；2023 年度河南省高校科技创新团队项目（23IRTSTHN028）

1. Henan Collaborative Innovation Center for Research and Development of the Whole Industry Chain of Yuyao, Zhengzhou Henan China 450046; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing China 100700

Abstract: Objective: Based on phosphatidylinositol 3 - kinase/protein kinase B/nuclear factor - κB (phosphatidylinositol - 3 - kinase/protein kinase B/nuclear factor kappa - B, PI3K/AKT/NF - κB) Exploring the mechanism of action of Zhizhu Pill in treating chronic atrophic gastritis (CAG) through signal pathway analysis. Method: Retrieve the active ingredients and targets of Zhizhu Pill (Zhishi, Baizhu) from the TCMSP database, and use GeneCards, OMIM, DisGeNET, and DrugBank databases to search for CAG targets. Using Venny 2.1.0 software, the intersection targets of Zhizhu Wan and CAG were obtained and uploaded to STRING 12.0 database to construct a protein - protein interaction (PPI) network and screen for core targets. Perform Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis using Metascape database. RAW264.7 cells were treated with 2 mg · L^{-1} LPS to induce an inflammatory model. Zhizhu Pill (150, 200, 300, 400 mg · L^{-1}) was used for intervention, and blank group (Control) and model group (LPS) were set up. The Griess method was used to determine the content of nitric oxide (NO), and the ELISA method was used to detect the content of tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 6 (IL - 6), and IL - 1 β. 52 SD rats were randomly divided into a normal group (CON), a model group (CAG), a low - dose Zhizhu Wan group (ZZW - L, 8.1 g · kg^{-1}), and a high - dose Zhizhu Pill group (ZZW - H, 16.2 g · kg^{-1}), with 8 rats in each group. Except for the CON group, all other rats were used to establish CAG models by combining MNNG with ranitidine and hunger and satiety disorders. After 8 weeks of administration, HE staining was used to observe the pathological morphology of the rat antrum. ELISA was used to detect the levels of serum pepsinogen Ⅰ (PG Ⅰ), pepsinogen Ⅱ (PG Ⅱ), PG Ⅰ/PG Ⅱ (PGR), TNF - α, IL - 6, and IL - 1β. Western blot was used to detect the expression levels of PI3K/AKT/NF - κB pathway related proteins in the antrum. Result: There are 118 targets of Zhizhu Pill, 662 targets of CAG, and 48 intersecting targets of the two. The core targets include protein kinase B (AKT1), tumor protein 53 (TP53), B - cell lymphoma - 2 (BCL2), etc. The KEGG pathway includes PI3K/AKT signaling pathway, NF - κ B signaling pathway, etc. Cell experiments showed that compared with the Control group, the LPS group increased the release of NO, TNF - α, IL - 6, and IL - 1β levels in cells ($P < 0.01$); Compared with the LPS group, the Zhi Zhu Wan group showed a decrease in cellular NO release, TNF - α, IL - 6, and IL - 1 β levels ($P < 0.05$). Animal experiments showed that there were no significant abnormalities in the pathological morphology of the gastric antrum tissue in CON group rats; The gastric antral mucosal structure of rats in the CAG group was disrupted, accompanied by infiltration of inflammatory cells; Compared with the CAG group, the ZZW - L and ZZW - H groups showed reduced atrophy of gastric antral glands and infiltration of inflammatory cells in rats. Compared with the CON group, the serum levels of PG Ⅱ, TNF - α, IL - 6, and IL - 1β increased in the CAG group, while the levels of PG Ⅰ and PGR decreased ($P < 0.01$); Compared with the CAG group, the levels of serum PG Ⅱ, TNF - α, IL - 6, and IL - 1β in the ZZW - L and ZZW - H groups of rats decreased ($P < 0.05$), while the levels of PG Ⅰ and PGR increased ($P < 0.05$). Compared with the CON group, the levels of p - PI3K/PI3K, p - AKT/AKT, and p - NF - κB/NF - κB in the gastric antrum of rats in the CAG group increased ($P < 0.01$); Compared with the CAG group, the levels of p - PI3K/PI3K, p - AKT/AKT, and p - NF - κB/NF - κB in the gastric antrum of rats in the ZZW - H group were reduced ($P < 0.05$). Conclusion: Zhizhu Pill may exert therapeutic effects on CAG by regulating the PI3K/AKT/NF - κB signaling pathway, inhibiting inflammatory responses.

Key words: Zhizhu Pill; chronic atrophic gastritis; PI3K/AKT/NF - κB signaling pathway; network pharmacology; inflammatory reaction

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)临床表现为上腹部隐痛、胀满、嗳气、食欲不振、消瘦等,归属于中医"痞满"范畴[1]。中医认为,CAG 的病机以脾胃虚弱为本,兼夹气滞、血瘀、湿热等病理因素,治疗需遵循顾护脾胃、益气健脾的原则[2-3]。

枳术丸(ZZW)为李东垣《内外伤辨惑论》卷下引张洁古方,具有治痞、消食、强胃的功效,可行气健脾益胃[4],是治疗痞满的常用方。枳术丸功效与 CAG 的中医病机相契合,临床上枳术丸加减治疗 CAG 的疗效显著[5-8]。药理学研究表明,枳术丸可通过降低炎症因子水平、保护胃黏膜从而发挥治疗胃溃疡、胃轻瘫等消化系统疾病的作用[9-12]。基于此,本研究采用网络药理学联合体内外实验探究枳术丸治疗 CAG 的作用机制。

1　材料

1.1　动物与细胞　52 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 160 ~ 190 g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(浙)2019 - 0001。动物

饲养在温度(22 ± 1) ℃,湿度 50% ~60%,12 h/12 h 明/暗交替的环境。动物实验方案经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准,批准编号:IACUC - 202305009。

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2　药物与试剂　枳实、白术(河南百缘康医药销售有限公司,批号:221101、C153230401);N - 甲基 - N′ - 硝基 - N - 亚硝基胍(MNNG,纯度 >95%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:K21171191);脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)、青链霉素混合液(美国 Sigma 公司,货号:L2880、P1400);胎牛血清、DMEM 高糖培养基(Biological Industries 公司,批号:1919555、2035129);盐酸雷尼替丁胶囊(广东恒健制药有限公司,批号:H44021173);大鼠血清胃蛋白酶原Ⅰ(pepsinogen Ⅰ,PGⅠ)、PGⅡ ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号:202307、202311);肿瘤坏死因子 - α(tumor necrosis factor - α,TNF - α)、白细胞介素 - 6(interleukin - 6,IL - 6)、IL - 1β ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:UX0764BD0898、UX05RZDN7459、UX04RJ4X3546);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、噻唑蓝、胰蛋白酶 - EDTA 消化液(北京索莱宝科技有限公司,货号:PC0020、530R0514、20230407);β - actin、磷脂酰肌醇 - 3 - 激酶(phosphatidylinositol - 3 - kinase,PI3K)、p - PI3K、蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)、p - AKT、核因子 - κB(nuclear factor - kappa B,NF - κB)、p - NF - κB 抗体(Cell Signaling Technology 公司,货号:4970S、4249S、17366S、9272S、4060S、8242、3033);增强化学发光法(ECL)Plus 超敏发光液(莫纳生物科技有限公司,批号:150730);一管化一步法基因组 DNA 去除与逆转录试剂盒(赛维尔生物科技有限公司,批号:MPC2307021)。

1.3　仪器　Powerpac Universal 型电泳仪(美国 Bio - Rad 公司);OS - 03U 型恒温摇床(苏州捷美电子有限公司);Miulab ES - 60E 型低温摇床(杭州米欧仪器有限公司);SpectraMax iD5 酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];JXCL - 3K 三维冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Fresco 21 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司);Tanon 5200 Multi 全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命有限公司);IMS - 50 全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司);LightCycler® 96 荧光定量 PCR 仪(Roche)。

2　方法

2.1　网络药理学研究方法

2.1.1　枳术丸活性成分及作用靶点筛选　在 TCMSP 数据库(https://tcmsp - e.com/tcmsp.php)中检索枳实、白术的活性成分与作用靶点,根据口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%、类药性(drug - likeness,DL)≥0.18 进行筛选。另外,查阅相关文献补充未预测到的靶点,并在 UniProt 数据库(https://www.uniprot.org)中规范靶点名称。

2.1.2　CAG 疾病靶点筛选　在 GeneCards 数据库(https://www.genecards.org)、OMIM 数据库(https://www.omim.org)、DisGeNET 数据库(https://www.disgenet.org)及 DrugBank 数据库(https://go.drugbank.com)中查找和筛选 CAG 相关靶点,合并 4 个数据库所得数据并进行去重,最后在 Uniprot 数据库中规范靶点名称。

2.1.3　枳术丸治疗 CAG 的核心靶点筛选　采用 Venny 2.1.0 软件分析枳术丸与 CAG 的交集靶点,并绘制韦恩图。将交集靶点上传至 STRING 12.0(https://cn.string - db.org)中,以构建蛋白质 - 蛋白质相互作用(protein - protein interaction,PPI)网络,设置最小相互作用阈值为 0.4。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.7.1 软件,计算各靶点 degree 值并进行排序,将 degree 值排名前 10 位的靶点作为枳术丸治疗 CAG 的核心靶点。

2.1.4　基因本体(Gene Ontology,GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析　将交集靶点导入 Metascape 数据库(https://www.metascape.org)进行 GO 和 KEGG 富集分析,并将结果导入微生信平台进行可视化分析。其中,GO 分析包括生物过程(biological process,BP)、细胞成分(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)。

2.2　药物制备　枳术丸由枳实 30 g,白术 60 g 组成,原方加 5 倍量水浸泡 40 min,加热回流提取 2 次,每次 1 h,过滤并将 2 次滤液合并,蒸发浓缩成质量浓度为 1.62 g · mL^{-1} 的药液,密封冷藏备用[13-17]。

2.3　枳术丸体外抗炎作用研究

2.3.1　MMT 法检测细胞活力　RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 5% CO_2、37 ℃ 条件下培养。待细胞生长至 80% ~90% 密度

时，使用胰蛋白酶－EDTA 消化传代，完全培养基重悬，接种于细胞培养瓶或培养板，选择对数生长期细胞进行实验。将状态良好的 RAW264.7 细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 96 孔板培养 24 h，分为给药孔和正常孔，设置 6 个复孔。给药孔中加入含枳术丸质量浓度分别为 75、150、300、400、600 mg·L^{-1}的培养液。采用 MTT 法检测，于 490 nm 处测定光密度值（A），计算细胞存活率。

细胞存活率 =（A 给药孔 － A 空白孔）/（A 正常孔 － A 空白孔）×100%

2.3.2　ELISA 法检测细胞炎症因子含量　取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板培养 24 h，设置空白组（Control）、模型组（LPS）及枳术丸组。其中，LPS 组、枳术丸组加入 2 mg·L^{-1} LPS，枳术丸组再加入含枳术丸质量浓度分别为 150、200、300、400 mg·L^{-1}的培养液，Control 组加入等体积完全培养基，培养 24 h 后，收集各孔细胞上清液。采用 Griess 法测定细胞中一氧化氮（nitric oxide，NO）释放量，ELISA 法检测细胞中 TNF－α、IL－6、IL－1β 含量。

2.4　枳术丸治疗 CAG 大鼠的作用机制研究

2.4.1　动物分组、造模及给药　将 52 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后，随机分为正常组（CON）、模型组（CAG）、枳术丸低剂量组（ZZW－L）及枳术丸高剂量组（ZZW－H）。正常组大鼠自由饮水进食，其余大鼠采用多因素诱导法制备 CAG 模型[18]。具体方法如下：170 mg·L^{-1} MNNG 溶液供大鼠自由饮用；含 0.3 g·kg^{-1}雷尼替丁的特殊饲料供大鼠食用；结合饥饱失常，即隔天禁食 24 h，禁食日给予同浓度 MNNG 溶液（10 mL·kg^{-1}）灌胃。模型成功判定依据：从 12 周开始随机抽取 CON 组和 CAG 组大鼠各 3 只，每 4 周随机抽取 1 次，HE 染色检测胃窦组织病理改变；于第 16 周时，模型组大鼠胃窦组织均出现胃黏膜上皮细胞脱落、固有腺体萎缩，提示造模成功。第 17 周开始给药，按照人与大鼠体表面积换算给药剂量[19]，ZZW－L 组大鼠灌胃剂量为 8.1 g·kg^{-1}，ZZW－H 组大鼠灌胃剂量为 16.2 g·kg^{-1}，模型组和正常组大鼠均给予生理盐水（10 mL·kg^{-1}）灌胃，每日 1 次，连续 8 周。

2.4.2　大鼠一般状态观察　观察并记录大鼠的体质量、精神状态、毛发及粪便。

2.4.3　大鼠胃黏膜形态观察　胃黏膜形态是评价 CAG 的指标之一[20]。大鼠处死后，剖腹取全胃，将胃体沿胃大弯剪开，用生理盐水清洗胃内容物后平铺，采用相机进行拍照。

2.4.4　HE 染色检测大鼠胃窦组织病理形态　取大鼠胃窦组织，在 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。石蜡包埋后连续切片，将切片进行 HE 染色，置于光学显微镜下进行病理组织学观察。

2.4.5　ELISA 法检测大鼠血清 PGⅠ、PGⅡ、PGR、TNF－α、IL－1β、IL－6 水平　大鼠禁食 12 h 后，腹腔注射麻醉，腹主动脉取血，静置 1 h 后离心取血清。采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 PGⅠ、PGⅡ、PGⅠ/PGⅡ（PGR）、TNF－α、IL－1β、IL－6 水平，实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.4.6　Western blot 法检测胃窦 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路相关蛋白表达水平　取 0.1 g 胃窦组织，加入裂解液后进行匀浆，4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 20 min，取上清液并加入上样缓冲液，涡旋后放置于金属浴仪器中 100 ℃变性 10 min。使用 BCA 蛋白测定试剂盒确定蛋白浓度，取 50 μg 蛋白通过 8% SDS－PAGE 凝胶电泳分离，转至 PVDF 膜，5% BSA 溶液封闭后，加入一抗（PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT、NF－κB、p－NF－κB、β－actin）4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，二抗室温孵育 1 h。再次洗膜后，ECL 进行可视化检测，使用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.5　统计学方法　使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，*Tukey* 检验进行多重比较；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　网络研究学研究结果

3.1.1　枳术丸治疗 CAG 的作用靶点　枳术丸活性成分 20 个，其中白术 4 个、枳实 16 个。枳术丸作用靶点 118 个，CAG 靶点 662 个，两者的交集靶点 48 个，见图 3。

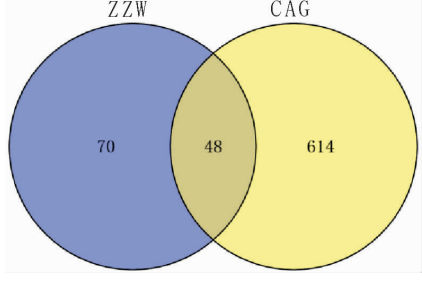


图 1　枳术丸与 CAG 交集靶点韦恩图

3.1.2　枳术丸治疗 CAG 的核心靶点　将 48 个交集靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络，见图 2。degree 值排名前 10 位的核心靶点包括蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT1）、肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53）、B 细胞淋巴瘤－2（B－cell lymphoma－2，BCL2）、JUN、基质金属蛋白酶－9（matrix metalloproteinase－9，MMP9）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、胱天蛋白酶 3（Caspase－3，CASP3）、白细胞介素－6（interleukin－6，IL－6）、环氧合酶 2（prostaglandin－endoperoxide synthase 2，PTGS2）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR），见表 1。

表 1　degree 值排名前 10 位的核心靶点

序号	核心靶点	degree 值
1	AKT1	44
2	TP53	43
3	BCL2	43
4	JUN	42
5	MMP9	42
6	TNF	42
7	CASP3	41
8	IL－6	41
9	PTGS2	40
10	EGFR	40

3.1.3　GO 与 KEGG 富集分析　GO 富集条目中 BP 主要包括程序性细胞死亡的正调控、激素应答、磷代谢过程的正调节等；CC 主要包括细胞外基质、囊腔、转录调节复合物等；MF 主要包括激酶结合、细胞因子活性、激酶调节因子活性等，见图 3。KEGG 通路主要包括 PI3K/AKT 信号通路、NF－κB 信号通路等，见图 4。前 10 位核心靶点中，AKT1、TP53、BCL2、IL－6、EGFR 均富集在 PI3K/AKT 通路上，BCL2、TNF、PTGS2 均富集在 NF－κB 通路上。因此，后续研究关注 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路。

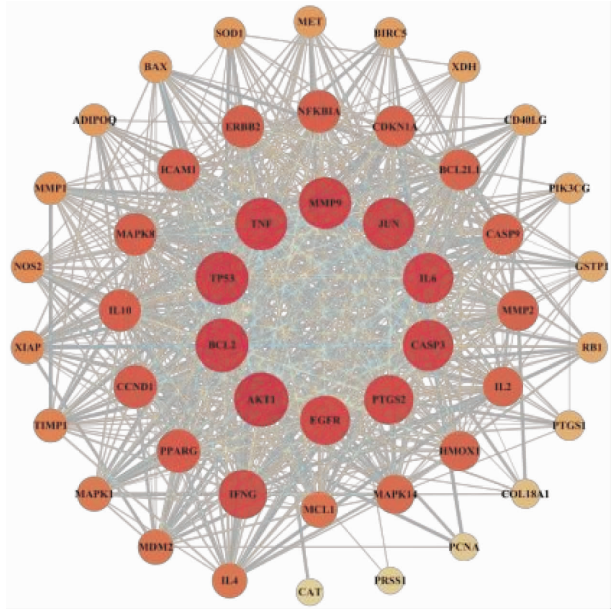


图 2　交集靶点 PPI 网络图

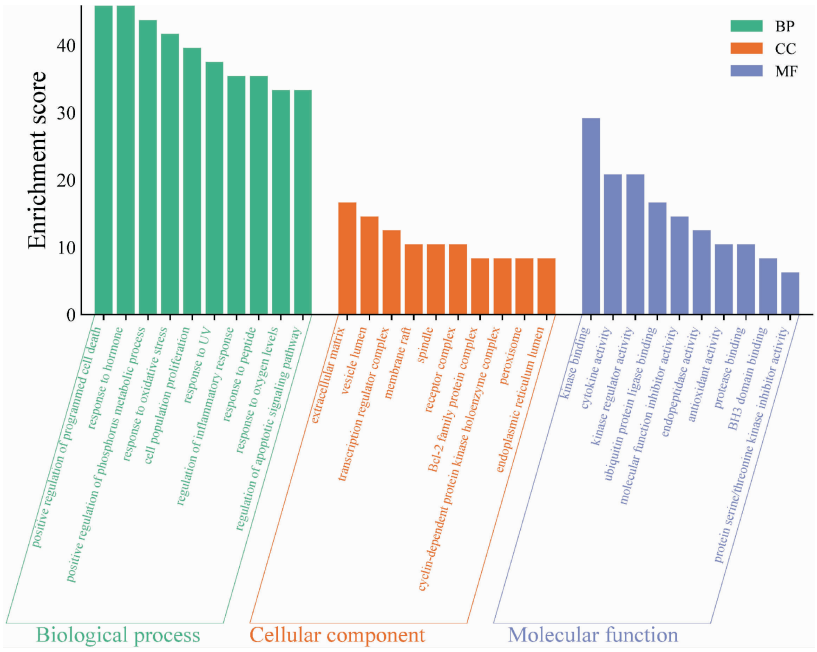


图 3　GO 功能分析条形图

3.2　枳术丸体外抗炎作用

3.2.1　各组细胞活力　MTT 检测显示，枳术丸质量浓度为 75、150、300、400、600 mg·L^{-1}时，细胞存活率均大于 90%，提示上述浓度对 RAW264.7 细胞无毒性，见表 2。

3.2.2　各组细胞 NO 释放量　Griess 检测显示，与

Control 组比较，LPS 组细胞 NO 释放量增加（$P<0.01$）；与 LPS 组比较，枳术丸组细胞 NO 释放量减少（$P<0.01$），见表 3。后续实验选用 150、300 mg·L^{-1}作为枳术丸干预浓度。

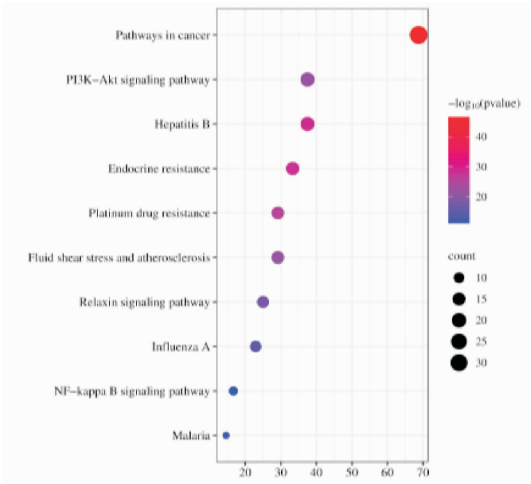


图 4　KEGG 富集分析气泡图

3.2.3　各组细胞炎症因子含量　ELISA 检测显示，与 Control 组比较，LPS 组细胞 TNF－α、IL－6、IL－1β 含量增加（$P<0.01$）；与 LPS 组比较，枳术丸组细胞 TNF－α、IL－6、IL－1β 含量减少（$P<0.05$），见表 4。

表 2　不同质量浓度枳术丸干预后细胞活力比较　（$\bar{x}\pm s$）

质量浓度（ρ/mg·L^{-1}）	n	细胞存活率/%
0	6	100
75	6	123.27±7.21
150	6	123.30±5.57
300	6	122.49±8.84
400	6	121.93±7.11
600	6	121.17±10.04

表 3　各组细胞 NO 释放量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	NO 释放量（ρ/mg·L^{-1}）
Control 组	6	5.46±0.35
LPS 组	6	11.85±0.44$^{\#\#}$
150 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	8.30±0.25**
200 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	8.06±0.27**
300 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	6.94±0.61**
400 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	6.38±0.24**

注：与 Control 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 LPS 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

表 4　各组细胞上清液中 TNF－α、IL－6、IL－1β 含量比较　（$\bar{x}\pm s$，ng·L^{-1}）

组别	n	TNF－α	IL－6	IL－1β
Control 组	6	1 318.85±47.65	204.73±8.48	55.38±5.18
LPS 组	6	8 579.58±37.43$^{\#\#}$	1 304.99±20.92$^{\#\#}$	171.67±15.70$^{\#\#}$
150 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	6 945.27±254.50*	1 110.83±26.31*	130.45±4.18*
300 mg·L^{-1} ZZW＋LPS 组	6	4 609.43±260.18**	854.82±42.40**	93.94±4.57**

注：与 Control 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 LPS 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

3.3　枳术丸治疗 CAG 大鼠的作用机制

3.3.1　各组大鼠的一般状态　CON 组大鼠精神状况良好，毛色亮白，体型肥硕，活动敏捷。CAG 组大鼠精神状态较差，易怒，易应激，毛色暗淡易脱落，体型较瘦，便溏，活动较少。ZZW－L 组和 ZZW－H 组大鼠精神状态、便溏情况较 CAG 组改善。

造模结束后，与 CON 组比较，其余 3 组大鼠体质量降低（$P<0.01$）。灌胃结束后，与 CON 组比较，CAG 组大鼠体质量降低（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－L 组和 ZZW－H 组大鼠体质量升高（$P<0.01$），见表 5。

3.3.2　各组大鼠胃黏膜形态　CON 组大鼠胃黏膜呈肉红色，可见粗大皱襞；CAG 组大鼠胃黏膜皱襞较 CON 组减少且较细，胃壁变薄；ZZW－L 组和 ZZW－H 组大鼠胃黏膜皱襞和胃壁厚度较 CAG 组增加，见图 5。

3.3.3　各组大鼠胃窦病理形态　HE 染色显示，CON 组大鼠胃窦组织结构清晰，黏膜上皮无明显异常，腺体排列整齐，黏膜下层结缔组织细密，未见炎症细胞浸润、腺体萎缩。CAG 组大鼠胃窦黏膜结构紊乱，腺体排列杂乱，黏膜上皮脱落，出现炎症细胞浸润。与 CAG 组比较，ZZW－L、ZZW－H 组大鼠胃窦腺体萎缩、炎症细胞浸润等减轻，见图 6。

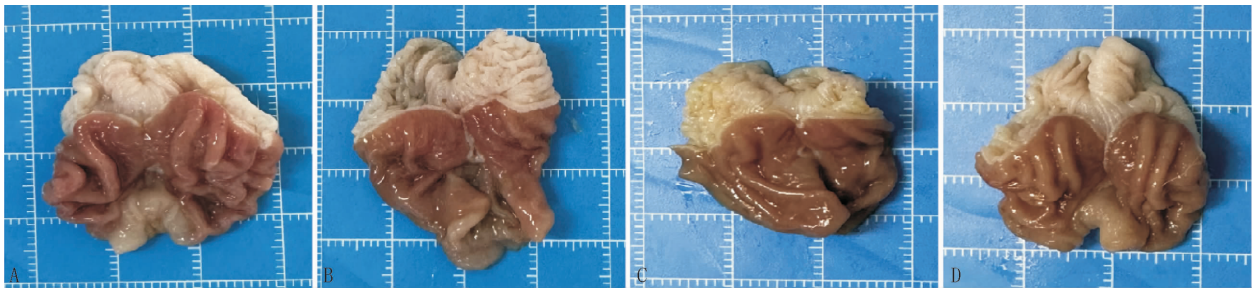
表 5　各组大鼠体质量变化　（$\bar{x}\pm s$，g）

组别	n	造模结束后	灌胃结束后
CON 组	8	376.50±14.36	407.88±14.19
CAG 组	8	277.63±12.85$^{\#\#}$	299.00±6.97$^{\#\#}$
ZZW－L 组	8	268.63±8.16$^{\#\#}$	323.13±12.86**
ZZW－H 组	8	284.75±16.10$^{\#\#}$	349.00±11.71**

注：与 CON 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 CAG 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

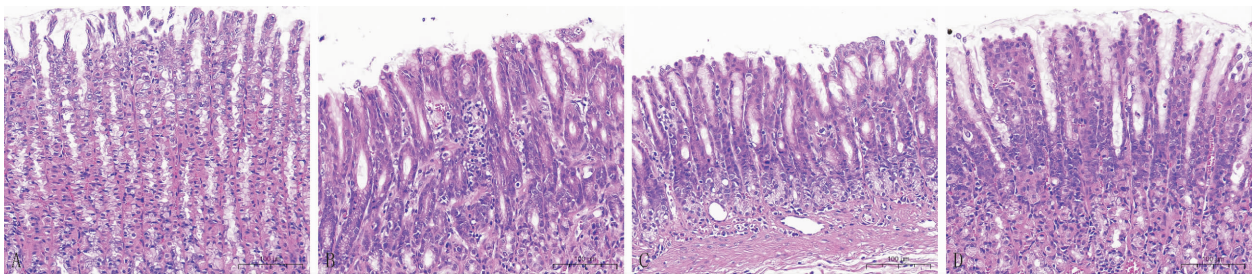
3.3.4　各组大鼠血清 PGⅠ、PGⅡ、PGR 水平　与 CON 组比较，CAG 组大鼠血清 PGⅡ水平升高，PGⅠ、PGR 水平降低（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，

ZZW－L、ZZW－H 组大鼠血清 PGⅡ水平降低，PGⅠ、PGR 水平升高（$P<0.05$），见表 6。



注：A. CON 组；B. CAG 组；C. ZZW－L 组；D. ZZW－H 组。

图 5　各组大鼠胃黏膜形态图



注：A. CON 组；B. CAG 组；C. ZZW－L 组；D. ZZW－H 组。

图 6　各组大鼠胃窦组织病理染色图（HE，×100）

表 6　各组大鼠血清 PGⅠ、PGⅡ、PGR 水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	PGⅠ（ρ/ng·L^{-1}）	PGⅡ（ρ/ng·L^{-1}）	PGR
CON 组	8	106.14±6.92	34.79±4.25	3.08±0.32
CAG 组	8	87.16±5.68$^{\#\#}$	45.57±2.25$^{\#\#}$	1.92±0.16$^{\#\#}$
ZZW－L 组	8	97.00±6.53*	40.91±2.73*	2.38±0.27**
ZZW－H 组	8	103.65±8.47**	38.92±3.99**	2.68±0.23**

注：与 CON 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 CAG 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

3.3.5　各组大鼠血清 TNF－α、IL－6、IL－1β 水平　与 CON 组比较，CAG 组大鼠血清 TNF－α、IL－6、IL－1β 水平升高（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－L、ZZW－H 组大鼠血清 TNF－α、IL－6、IL－1β 水平降低（$P<0.05$），见表 7。

表 7　各组大鼠血清 TNF－α、IL－6、IL－1β 水平比较　（$\bar{x}\pm s$，ng·L^{-1}）

组别	n	TNF－α	IL－6	IL－1β
CON 组	8	435.95±54.85	57.21±12.09	131.32±13.99
CAG 组	8	870.66±45.63$^{\#\#}$	108.13±10.28$^{\#\#}$	216.06±17.48$^{\#\#}$
ZZW－L 组	8	761.61±69.13*	89.32±11.57*	185.00±23.89*
ZZW－H 组	8	672.15±98.24**	73.37±12.93**	155.11±15.79**

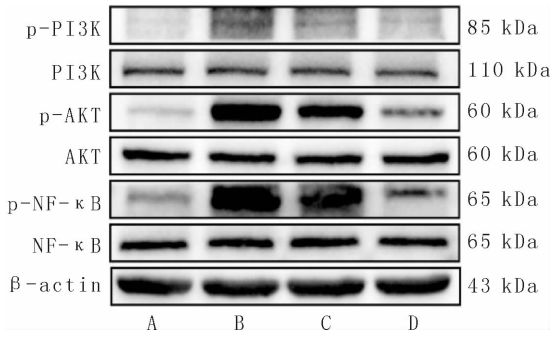
注：与 CON 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 CAG 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

3.3.6　各组大鼠胃窦 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路相关蛋白表达水平　与 CON 组比较，CAG 组大鼠胃窦 p－PI3K/PI3K、p－AKT/AKT、p－NF－κB/NF－κB 水平升高（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－H 组大鼠胃窦 p－PI3K/PI3K、p－AKT/AKT、p－NF－κB/NF－κB 水平降低（$P<0.01$）；与 CAG 组比较，ZZW－L 组大鼠胃窦 p－PI3K/PI3K、p－AKT/AKT 水平降低（$P<0.05$），见图 7、表 8。

表 8　各组大鼠胃窦 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路相关蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	p－PI3K/PI3K	p－AKT/AKT	p－NF－κB/NF－κB
CON 组	3	0.38±0.08	0.32±0.10	0.39±0.03
CAG 组	3	1.13±0.23$^{\#\#}$	1.04±0.06$^{\#\#}$	1.02±0.13$^{\#\#}$
ZZW－L 组	3	0.66±0.14*	0.84±0.02*	0.80±0.14
ZZW－H 组	3	0.45±0.10**	0.45±0.09**	0.39±0.16**

注：与 CON 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 CAG 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。



注：A. CON 组；B. CAG 组；C. ZZW－L 组；D. ZZW－H 组。

图 7　各组大鼠胃窦 PI3K/AKT/NF－κB 信号通路相关蛋白条带图

4　讨论

CAG 是慢性胃炎的一种特殊类型，具有胃黏膜腺体萎缩、黏膜变薄的典型特征[21]，早期干预 CAG 发展是胃癌二级预防的关键措施之一[22-23]。中医药治疗 CAG 具有安全性高、不良反应少等优势[24-25]。本研究基于 CAG 本虚标实的基本病机，以经典方剂枳术丸为研究对象，其配伍遵循“补消兼施”原则，有补而不滞、消不伤正之功。方中白术为补气健脾要药，枳实是破气除痞要药；二药配伍运用，白术以守为要，枳实以走为主，白术倍于枳实，补大于消，枳实助白术补而不滞，白术助枳实消不伤正，两药相互为用，以达健脾强胃、消食行气、消痞除满之功。研究显示，白术内酯Ⅰ有抗炎活性，能调节 CAG 大鼠炎症因子并保护胃黏膜[26-27]。白术提取物 Ac-EE 可通过调控 AKT/NF-κB 信号通路改善胃炎[28]。新橙皮苷可改善胃损伤，用于治疗胃炎[29]。橙皮苷能改善胃动力，促进胃蠕动[30]。

MNNG 联合雷尼替丁及饥饱失常多因素造模方法是目前公认的 CAG 造模方式[31]。《慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017)》指出，病理检查及胃蛋白酶原检测是临床诊断 CAG 的关键指标[1]。本研究发现，CAG 大鼠出现胃黏膜结构紊乱、上皮脱落、腺体减少等病理变化，伴 PGⅠ水平下降，PGⅡ水平上升。PGⅠ主要由胃体产生，其水平下降反映胃黏膜萎缩；PGⅡ主要由胃窦、胃底、十二指肠近端和十二指肠腺产生，其水平升高与胃底腺管萎缩相关[32-33]。枳术丸干预后，胃黏膜结构整齐，腺体增多，伴 PGⅠ水平上升，PGⅡ水平下降。由此提示，枳术丸可发挥对 CAG 大鼠的治疗作用。

网络药理学研究提示，枳术丸治疗 CAG 的作用机制可能与 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路相关。研究显示，PI3K/AKT 信号通路与胃黏膜腺体萎缩密切相关[34]；NF-κB 是该通路的下游信号分子，参与胃黏膜中炎症因子的激活[35]。PI3K 可将 PIP2 磷酸化为 PIP3，进而激活 PDK1，导致 AKT 蛋白苏氨酸 308 位点(T308)磷酸化，部分活化 AKT[36]，进一步激活 NF-κB。持续激活的 NF-κB 可促进 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子分泌，引发炎症反应[37]，刺激胃黏膜，导致胃黏膜损伤，促使 CAG 的发生。本研究通过建立体外炎症模型，验证了枳术丸可降低炎症介质 NO、TNF-α、IL-6 及 IL-1β 水平；动物实验同样显示，枳术丸可降低 CAG 大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平。同时，枳术丸可显著降低胃窦组织 PI3K、AKT、NF-κB 蛋白磷酸化水平，表明枳术丸治疗 CAG 的作用机制与 PI3K/AKT/NF-κB 通路有关。

综上，枳术丸可能通过调控 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路，抑制炎症反应，从而发挥治疗 CAG 的作用。

参考文献：

[1]李军祥，陈誩，吕宾，等. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017 年)[J]. 中国中西医结合消化杂志，2018，26(2)：121-131.
[2]毛阿芳，叶振昊，黄俊敏，等. 黄穗平教授补土论治慢性萎缩性胃炎经验[J]. 中国中西医结合消化杂志，2019，27(2)：150-152.
[3]严湖，单兆伟，龚长志，等. 单兆伟诊疗慢性萎缩性胃炎特色举要[J]. 辽宁中医杂志，2017，44(12)：2507-2508.
[4]李东垣. 内外伤辨惑论[M]. 2 版. 北京：中国医药科技出版社，2019：51.
[5]陈莹莹. 王灿晖教授辨治慢性萎缩性胃炎经验的数据挖掘研究[D]. 南京：南京中医药大学，2017.
[6]范天田，王恒苍，马凤岐，等. 陈永灿治疗慢性萎缩性胃炎用药特色挖掘研究[J]. 中华中医药学刊，2020，38(9)：245-248.
[7]王冠华，严志林，汪悦，等. 王少华教授治疗慢性萎缩性胃炎经验简介[J]. 新中医，2011，43(6)：155-156.
[8]徐伟超，赵润元，李佃贵，等. 国医大师李佃贵诊治慢性萎缩性胃炎临床经验的数据挖掘[J]. 中华中医药杂志，2019，34(9)：4350-4353.
[9]WEN Y，ZHAN Y，TANG S Y，et al. Zhizhu decoction alleviates intestinal barrier damage via regulating SIRT1/FoxO1 signaling pathway in slow transit constipation model mice[J]. Chin J Integr Med，2023，29(9)：809-817.
[10]孙琳林. 枳术丸抗实验性胃溃疡的药效及其作用机理研究[D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2006.
[11]徐小平. 枳术丸的药效学研究[J]. 陕西中医学院学报，2000，23(2)：43-44.
[12]郑威，臧彬如，于颖琦，等. 枳术丸化学成分及治疗消化系统疾病的研究进展[J]. 中成药，2022，44(9)：2916-2923.
[13]李晓玲，张声生，杨成，等. 枳术丸对功能性消化不良大鼠胃平滑肌收缩反应及胃促生长素受体蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2016，36(2)：210-215.
[14]滕广飞，刘富林，夏旭婷，等. 枳术丸水煎液及其拆方含药血清对大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(19)：120-126.
[15]宋子颛，刘富林，张宇娟，等. 基于 16S rDNA 测序分析枳术丸水煎液对慢传输型便秘脾虚证模型小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志，2023，35(4)：414-419.

[16]夏旭婷,王婷,刘富林,等. 枳术丸汤剂含药血清对大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖及 PLC－γ 信号通路的影响[J]. 中医杂志,2021,62(21):1923－1929.
[17]施敏,刘富林,涂琴蓉,等. 枳术丸汤剂含药血清对大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 中成药,2022,44(4):1267－1271.
[18]留甜甜,宋亚刚,田硕,等. 基于中西医临床病症特点的慢性萎缩性胃炎动物模型分析[J]. 中国中药杂志,2021,46(4):777－781.
[19]李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:562.
[20]TONG Y L,LIU L P,WANG R L,et al. Berberine attenuates chronic atrophic gastritis induced by MNNG and its potential mechanism[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 644638.
[21]SHAH S C,PIAZUELO M B,KUIPERS E J,et al. AGA clinical practice update on the diagnosis and management of atrophic gastritis: expert review[J]. Gastroenterology, 2021,161(4):1325－1332.
[22]MONTINARO A,WALCZAK H. Sterile inflammation fuels gastric cancer[J]. Immunity,2018,48(3):481－483.
[23]SONG J H,KIM S G,JIN E H,et al. Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy[J]. Gut Liver,2017,11(5):612－619.
[24]LAHNER E,CONTI L,ANNIBALE B,et al. Current perspectives in atrophic gastritis[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2020,22(8):38.
[25]CHENG H C,YANG Y J,YANG H B,et al. Evolution of the Correa's cascade steps: a long－term endoscopic surveillance among non－ulcer dyspepsia and gastric ulcer after H. pylori eradication[J]. J Formos Med Assoc,2023, 122(5):400－410.
[26]李多,杜三军,于永强. 白术内酯Ⅰ对慢性萎缩性胃炎大鼠相关炎性因子的影响[J]. 解放军医药杂志,2016,28(8):10－14.
[27]李多,于永强,高会斌,等. 白术内酯Ⅰ对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜保护作用[J]. 河北中医药学报,2016,31(3):5－8.
[28]HOSSEN M J,CHOU J Y,LI S M,et al. An ethanol extract of the rhizome of Atractylodes chinensis exerts anti－gastritis activities and inhibits Akt/NF－κB signaling[J]. J Ethnopharmacol,2019,228:18－25.
[29]LEE J H,LEE S H,KIM Y S,et al. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of Poncirus trifoliata on potential gastric disease[J]. Phytother Res,2009,23(12):1748－1753.
[30]JIA Q L,LI L,WANG X X,et al. Hesperidin promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp1－mediated ICC mitophagy[J]. Front Pharmacol, 2022,13:945624.
[31]葛君玺,秦格,谢逸轩,等. 基于数据挖掘的慢性萎缩性胃炎动物模型应用分析[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(6):818－823.
[32]曹勤,冉志华,萧树东. 血清胃蛋白酶原、胃泌素－17 和幽门螺杆菌 IgG 抗体筛查萎缩性胃炎和胃癌[J]. 胃肠病学,2006,11(7):388－394.
[33]陈智周,范振符. 胃蛋白酶原Ⅰ、Ⅱ在早期胃癌普查中的意义[J]. 中华肿瘤杂志,2002,24(1):5－7.
[34]周泽华,梁琨,崔波,等. 中药干预幽门螺杆菌阴性慢性萎缩性胃炎相关信号通路研究进展[J]. 中华中医药学刊,2024,42(5):82－88,279－280.
[35]XIE D,WU C,WANG D,et al. Wei－fu－Chun tablet halted gastric intestinal metaplasia and dysplasia associated with inflammation by regulating the NF－κB pathway[J]. J Ethnopharmacol,2024,318(Pt B):117020.
[36]GU Y J,JIN S D,WANG F,et al. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(4): 471－475.
[37]LIU T,ZHANG L Y,JOO D,et al. NF－κB signaling in inflammation[J]. Signal Transduct Target Ther, 2017, 2: 17023.

收稿日期:2025－01－05
作者简介:窦盈(1998－),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事仲景方药配伍规律及作用机制研究。
通信作者:许二平(1962－),男,河南郑州人,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事仲景方药配伍规律及作用机制研究。E－mail:xuerping0371@163.com

编辑:刘凯歌