

本文引文格式: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.

【论著与临床报道】

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

水寅萍,濮之晨

(皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 研究槲皮素对急性酒精性胃溃疡小鼠的保护作用,并探讨其改善胃溃疡的潜在作用机制。方法 将60只雄性C57BL/6小鼠随机分为正常对照组、模型组、槲皮素低剂量组、槲皮素中剂量组、槲皮素高剂量组和奥美拉唑(OMZ)组。预灌胃给药7d后,模型组和各给药组灌胃90%乙醇溶液建立急性胃溃疡模型。测定各组小鼠胃溃疡损伤指数、溃疡抑制率;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)的含量;HE染色法观察胃溃疡组织病理学变化;Western Blot检测Shh信号通路上Shh和Gli-1蛋白表达情况。结果 与正常对照组相比,模型组小鼠胃组织病理损伤加重;SOD、GSH的活力降低($P < 0.05$),MDA的含量及血清IL-6和TNF- α 的水平升高($P < 0.05$),胃黏膜组织Shh和Gli-1蛋白表达下调($P < 0.05$)。与模型组相比,槲皮素和奥美拉唑组能改善酒精性胃溃疡的病理损伤;提高SOD、GSH的活力($P < 0.05$),降低MDA的含量及血清IL-6和TNF- α 的水平($P < 0.05$),并增加胃黏膜组织Shh和Gli-1蛋白表达($P < 0.01$)。结论 槲皮素对酒精性胃溃疡具有一定的预防保护作用,其机制可能与调控Sonic Hedgehog信号通路抑制炎症反应和氧化应激有关。

关键词:槲皮素;急性酒精性胃溃疡;炎症;氧化应激

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2024)01-0043-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.01.008

Quercetin-mediated regulation of the Sonic Hedgehog signaling pathway and its protective effects in mice with acute alcoholic gastric ulcer

Shui Yinping, Pu Zhichen

(School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effects of quercetin on mice with acute alcoholic gastric ulcers and explore its potential mechanisms in alleviating gastric ulcers. **Methods** Sixty male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, model group, low-dose quercetin group, medium-dose quercetin group, high-dose quercetin group, and omeprazole (OMZ) group. After 7 days of pre-gavage, the model group and each treatment group were given the solution of 90% ethanol to establish acute gastric ulcer models. The study measured gastric ulcer damage indexes and ulcer inhibition rates. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to assess the levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH) in serum. Histopathological changes in gastric ulcer tissues were observed using HE staining, and Western Blot was adopted to analyze the expressions of Shh and Gli-1 proteins in the Shh signaling pathway. **Results** Compared to the normal

第一作者:水寅萍,讲师,研究方向:临床药物治疗,E-mail:shuiyinping1986@126.com

通讯作者:濮之晨,助理研究员,研究方向:临床药物治疗,E-mail:pithies@163.com

control group, the model group exhibited aggravated pathological injuries in gastric tissues. It showed decreased activity of SOD and GSH ($P < 0.05$), increased MDA content, elevated levels of serum IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), and down-regulated expressions of Shh and Gli-1 proteins in gastric mucosa ($P < 0.05$). Compared with the model group, both quercetin and omeprazole groups demonstrated alleviation in pathological injuries associated with alcoholic gastric ulcers, with increased activity of SOD and GSH ($P < 0.05$), decreased MDA content, reduced levels of serum IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), and elevated expressions of Shh and Gli-1 proteins in gastric mucosa ($P < 0.01$). **Conclusion** Quercetin exhibits a preventive protective effect against alcoholic gastric ulcers, and its mechanism may be associated with the regulation of the Sonic Hedgehog signaling pathway to suppress inflammatory responses and oxidative stress.

Key words: quercetin; acute alcoholic gastric ulcer; inflammation; oxidative stress

根据世界卫生组织 2022 年关于酒精与健康的报告,全球每年有 400 多万人死于酒精滥用,同时这个数字还在每年持续上升^[1]。过量饮酒是导致胃溃疡、胃出血、酒精性肝炎和肝硬化等酒精相关疾病的主要原因^[2]。酒精作为一种有机溶剂,对胃黏膜具有很强的腐蚀性,能迅速破坏胃表面的黏膜层和黏膜细胞,影响胃黏膜健康代谢的生理环境^[3]。然而目前酒精引起胃黏膜损伤的机制尚未完全阐明。有研究表明,酒精诱导的胃黏膜损伤过程伴随着活性氧(ROS)的产生,可导致胃组织损伤、抗氧化能力下降,进而导致炎症加重^[4]。因此,一些抗氧化因子如谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT),促炎因子如 TNF- α 和 IL-6,胃黏膜防御因子如 PGE2 和 NO 均在调节酒精性胃黏膜病变中发挥重要作用^[5]。一些研究侧重于使用具有抗氧化和抗炎活性的药物来减轻酒精性胃黏膜损伤。然而这些药物大多有副作用,如关节疼痛、心跳改变、造血功能改变、女性乳房发育不良、阳痿和全身碱中毒^[6]。因此越来越多的研究正致力于利用天然产物开发副作用更小的药物。

Sonic hedgehog(Shh)信号通路是干细胞自我更新的经典信号通路,参与了干细胞的增殖和分化以及胚胎的发育过程^[7]。既往研究发现,组织器官在损伤修复过程中会重新激活胚胎时期控制组织器官发生、发育的信号通路。通过这些信号通路的活化,诱导细胞增殖填补缺失的细胞组织并恢复其功能^[8]。酒精性胃溃疡便是能够迅速破坏胃表面的黏膜层和黏膜细胞,因此是否可以寻找药物通过调控 Sonic hedgehog 信号通路治疗酒精性胃溃疡是本次的研究方向。槲皮素是一种黄酮类化合物,具有显著的抗氧化、抗病毒、抗癌和抗炎活性^[9]。槲皮素已被证明可以减少 LPS 诱导的肺上皮细胞氧化和炎症反应^[10]。本次研究将评估槲皮素对急性酒精性胃溃疡小鼠的保护作用,并阐明其潜在的作用机制,为临床治疗酒精性胃溃疡提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 C57BL/6 小鼠 60 只均购自安徽中医药大学动物实验中心[动物生产许可证号:SYXK(Wan)2022-4788],体质量 20~30 g 左右。饲养环境:室温 25 °C,相对湿度 50%~60%,饲料由安徽中医药大学实验动物中心提供,动物可自由饮水摄食。本动物实验均遵循动物实验伦理要求。

1.2 药物与试剂 槲皮素购自成都普菲德生物技术有限公司;奥美拉唑购自大连美仑生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;TNF- α 、IL-6 等炎症因子和抗氧化因子如 GSH、SOD、CAT 等检测试剂盒购自 Elabscience 公司;GAPDH 一抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自上海碧云天生物科技有限公司;Shh 和 Gli-1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 实验仪器 多功能酶标仪(德国 Leica 公司);凝胶成像系统(上海勤翔科技有限公司);电泳设备(美国 Beckma 公司);生物组织脱水机、包埋机、石蜡切片机(上海贺默仪器科技有限公司);电子分析天平(深圳市奥斯微光学仪器有限公司);麻醉机(上海勤翔科技有限公司);SC-2546 低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司);倒置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 酒精性胃溃疡小鼠模型构建和实验分组 小鼠适应性饲养 1 周后,将 60 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、槲皮素低剂量组(25 mg/kg)、槲皮素中剂量组(50 mg/kg)、槲皮素高剂量组(100 mg/kg),奥美拉唑组(3 mg/kg),每组 10 只,槲皮素治疗组每天灌胃给药 1 次,连续灌胃两周。给药结束后模型组和治疗组小鼠以 10 mL/kg 灌胃体积分数为 90%的乙醇溶液,构建酒精性胃溃疡小鼠模型。给药完成后,将小鼠断头处死,无菌操作取出胃组织,然后将胃组织放置于液氮罐中保存备用。

1.4.2 各组小鼠胃溃疡损伤指数、溃疡抑制率测定 造模结束后取出各组小鼠胃组织使用多聚甲醛固定液

进行固定,并将其拍照记录,观察胃黏膜损伤情况,用直尺测量损伤条带的长度和宽度。按照 Guth 评分标准测定损伤指数。评分标准:糜烂出血点,一点记为1分;胃黏膜损伤长度(L)<1 mm 记1分;1 mm≤L<2 mm,2分;2 mm≤L<3 mm,3分;3 mm≤L<4 mm,4分;L≥4 mm,分段评分。胃黏膜损伤宽度(W)在1 mm≤W<2 mm,1分;W≥2 mm,2分,整个胃的总分作为溃疡指数。胃黏膜损伤指数(UI)=出血点分数+糜烂长度分数+糜烂宽度分数×2。溃疡抑制率(%)=(模型组溃疡指数-给药组溃疡指数)/模型组溃疡指数×100%。

1.4.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测相关炎症和氧化应激相关指标 将1.4.2中各组的小鼠胃组织准确称其质量,使用眼科手术剪快速剪碎组织块,按比例加入预冷的PBS,随后将剪碎的组织放置于组织匀浆器充分匀浆,3000 r/min 离心 15 min,离心结束后取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行 IL-6、TNF-α、SOD、GSH、MDA 水平检测。

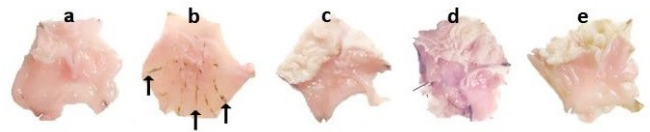
1.4.4 HE 染色观察各组小鼠胃溃疡组织病理学变化 组织固定包埋后石蜡切片,将切片进行烘干、脱蜡及水化,结束后切片置于苏木精染液 10 min,流水冲洗 10 min 至组织蓝化,再浸入伊红染液 30 s,流水冲洗切片 3 min 后于显微镜下观察染色效果。将染色后的切片于无水乙醇 I、II 各脱水 10 min,二甲苯 I、II 中各透明 10 min;封片:将封片液滴在组织上并盖上盖玻片,于 60 °C 烘干后使用倒置荧光显微镜进行观察拍照。

1.4.5 Western Blot 检测相关蛋白表达 用 BCA 蛋白质测定试剂盒检测总蛋白质的浓度。电泳通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,并在 200 mA 恒流下,将蛋白质转移至 PVDF 膜。将膜在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中于室温封闭 1 h 左右。将膜与 Shh 和 Gli-1 抗体在 4 °C 孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,在室温下与山羊抗兔 IgG 一起孵育 1 h。GAPDH 用作内参。最后,用化学发光成像系统成像,并通过 ImageJ 测定蛋白条带的灰度值。

1.5 统计学方法 所有统计分析时使用 GraphPad Prism 10.0 软件。所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析(ANOVA)和 *t* 检验用于分析和比较所有结果。*P*<0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对酒精性胃溃疡小鼠溃疡的影响 与正常对照组相比,模型组小鼠胃组织出血性病变明显,溃疡严重;与模型组相比,槲皮素治疗组小鼠溃疡病变明显缓解。见图 1。



注:a 为对照组;b 为模型组;c、d、e 为槲皮素低、中、高剂量组。

图 1

2.2 小鼠胃溃疡损伤指数、溃疡抑制率检测 与正常对照组相比,模型组小鼠胃溃疡指数明显升高;与模型组相比,槲皮素治疗组小鼠胃溃疡指数降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),溃疡抑制率升高,见表 1。

表 1 各组小鼠胃溃疡指数及溃疡抑制率比较

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	溃疡指数/分	溃疡抑制率/%
正常对照组	10	—	—	—
模型组	10	—	26.36±2.69	—
槲皮素低剂量组	10	25	15.61±0.72 ^a	40.76
槲皮素中剂量组	10	50	8.62±2.87 ^a	67.29
槲皮素高剂量组	10	100	6.90±2.02 ^a	73.82
奥美拉唑组	10	3	5.06±0.58 ^a	80.80

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与模型组相比,a:*P*<0.001。

2.3 小鼠胃组织相关炎症因子测定结果 与正常对照组相比,模型组小鼠炎症因子 IL-6、TNF-α 水平升高(*P*<0.001);与模型组相比,槲皮素治疗组小鼠炎症因子 IL-6、TNF-α 水平降低,差异有统计学意义(*P*<0.001),见表 2。

表 2 各组小鼠胃组织相关炎症因子水平比较

单位:mmol/L

组别	<i>n</i>	IL-6	TNF-α
正常对照组	10	70.13±7.47	30.65±3.49
模型组	10	200.03±1.59 ^a	162.22±2.69 ^a
槲皮素低剂量组	10	149.94±1.56 ^b	133.97±2.85 ^b
槲皮素中剂量组	10	124.28±2.04 ^b	111.37±2.25 ^b
槲皮素高剂量组	10	99.12±2.49 ^b	80.54±2.48 ^b
奥美拉唑组	10	102.28±1.22 ^b	96.72±3.31 ^b

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与正常对照组相比,a:*P*<0.001,与模型组相比,b:*P*<0.001。

2.4 小鼠胃组织氧化应激指标测定 与正常对照组相比,模型对照组小鼠胃组织的 SOD、GSH 含量均降低,MDA 含量升高(*P*<0.001);与模型组相比,槲皮素中剂量组、槲皮素高剂量组小鼠胃组织的 SOD、GSH 含量均升高,MDA 含量降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

表 3 各组小鼠胃组织相关氧化应激水平比较

组别	<i>n</i>	SOD/(U · L ⁻¹)	GSH/(nmol · mL ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)
正常对照组	10	131.39 ± 17.53	127.89 ± 42.55	2.21 ± 0.20
模型组	10	86.45 ± 9.63 ^a	26.04 ± 9.59 ^a	19.59 ± 3.98 ^a
槲皮素低剂量组	10	101.20 ± 9.90 ^b	52.97 ± 16.33 ^c	18.53 ± 2.31 ^b
槲皮素中剂量组	10	105.40 ± 20.53 ^b	67.71 ± 17.17 ^c	13.73 ± 3.16 ^b
槲皮素高剂量组	10	113.58 ± 12.96 ^c	95.32 ± 3.81 ^c	13.18 ± 7.46 ^b
奥美拉唑组	10	106.40 ± 3.38 ^c	90.62 ± 5.99 ^c	14.17 ± 1.93 ^b

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与正常对照组相比,a: $P < 0.001$,与模型对照组相比,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.001$ 。

2.5 HE 染色法观察胃溃疡组织病理学变化 与正常对照组相比,模型组小鼠胃组织黏膜层受损严重,出现明显的局部出血和炎症细胞浸润;与模型组相比,槲皮素各剂量组小鼠胃组织黏膜下层水肿有所缓解,局部出血和炎症细胞浸润也有所好转,见图 2。

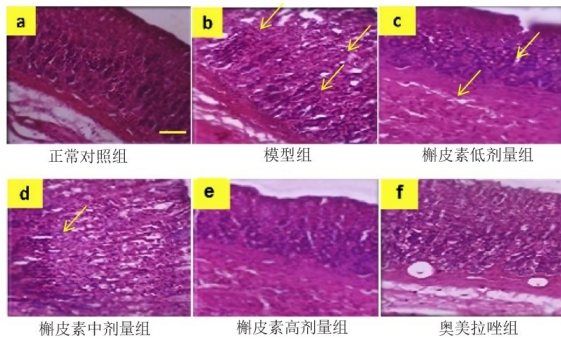
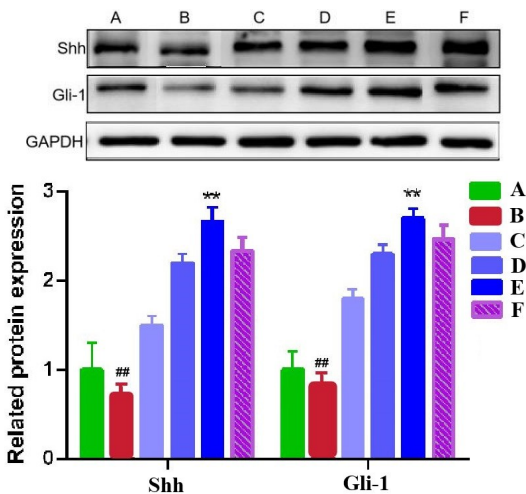


图 2 HE 染色检测不同处理组小鼠胃组织的病理变化($\times 200$)

2.6 Western Blot 检测相关蛋白表达结果 与正常对照组相比,模型组 Shh 和 Gli-1 蛋白表达下调;与模型组相比,槲皮素治疗组 Shh 和 Gli-1 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。



注:A为正常对照组;B为模型组;C、D、E为槲皮素低、中、高剂量组;F为奥美拉唑组。与对照组相比,## $P < 0.01$;与模型组相比,** $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠胃组织 Shh 和 Gli-1 蛋白表达水平比较

3 讨论

胃溃疡是上消化道最常见的严重慢性疾病之一。它是一种局部深部的坏死病变,影响整个黏膜厚度和黏膜肌层。随着时间的推移,发病率越来越高,范围越来越广,对人类生命和健康构成严重威胁^[11]。酒精是葡萄酒和其他酒精饮料的主要成分之一,它可以很容易地进入人体,从而损害胃。大量饮酒可引起急性胃糜烂性出血,长期饮酒可引起胃功能障碍,当胃直接暴露于高浓度酒精时,对胃黏膜上皮有直接的刺激和毒性作用。这将影响胃黏膜的微循环,引起上皮破裂,最终引起胃溃疡^[12]。一般认为,酒精性胃溃疡的发生是由于黏膜防御机制与胃腔表面损伤因子之间的不平衡所致^[13]。酸抑制剂和抗生素通常用于治疗胃溃疡。然而,随着抗胃溃疡药物对人体副作用的加剧、人体耐药性的增加,以及胃溃疡的高复发率,目前迫切需要寻找更加安全、有效的替代疗法。

据以往的研究显示,溃疡表现出典型的组织学改变,表现为黏膜厚度减少,表面上皮细胞糜烂、黏膜下水肿、炎症细胞浸润和肌肉层变薄^[14]。在本研究中,发现酒精刺激后小鼠胃黏膜损伤明显,当黏膜破损时会导致黏膜防御功能受损,使黏膜通透性增加,胃酸侵入黏膜屏障引起炎症。炎症刺激后,IL-6 和 TNF- α 在损伤部位被诱导,并在胃中引起有害作用,导致过量活性氧的产生。过量的活性氧会引起脂质过氧化,表现为 MDA 升高,进而导致表面上皮细胞膜完整性降低,从而引起胃溃疡。而当在溃疡诱导前分别给予不同剂量的槲皮素预处理可降低酒精诱导小鼠胃溃疡的溃疡指数。本课题组通过后续实验评价了槲皮素对酒精性胃溃疡小鼠的保护作用,发现槲皮素具有显著的抗氧化和抗炎作用。实验结果表明槲皮素预处理后小鼠胃组织炎症因子 IL-6、TNF- α 水平降低,氧化应激相关指标 SOD、GSH 含量均升高,MDA 含量降低。因此本研究认为槲皮素对酒精性胃溃疡的改善作用是通过增强抗氧化和细胞保护防御、减轻炎症反应介导的,这一结果证实槲皮素对酒精性胃溃疡具有显著的治疗潜力。

根据文献报道组织器官在损伤修复过程中会重新

激活胚胎时期控制组织器官生长发育的相关信号通路。Shh 信号通路是胚胎时期重要的信号通路之一,因此 Shh 信号通路参与了机体的损伤和修复过程。研究表明 Shh 信号通路的上调可以促进多种组织损伤后修复,如结肠、骨骼肌、皮肤等组织^[15]。在本研究中,实验结果显示槲皮素预处理后小鼠胃组织 Shh 和 Gli-1 蛋白表达上调,且呈浓度依赖性。

综上所述,本研究表明槲皮素对酒精性胃溃疡小鼠具有一定的预防保护作用,其机制可能与调控 Sonic Hedgehog 信号通路抑制炎症反应和氧化应激有关。

参考文献:

- [1] BRYAZKA D,GRISWOLD M G,REITSMA M B,et al. Alcohol and health-Authors' reply[J]. *Lancet*,2022,400(10365):1766.
- [2] SURMA S,WIECEK A. Alcohol and health. Is regular drinking of small doses of alcohol really good for your health? [J]. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*,2022,7:e49-e59.
- [3] 庞霄君. 康复新液联合雷贝拉唑对酒精性胃粘膜损伤所致胃炎急性发作的临床观察[J]. *中国高等医学教育*,2020(8):142-143.
- [4] 刺晓琴,刘一志,张立超,等. 谷糠多酚对酒精性胃黏膜损伤的保护作用[J]. *食品科学*,2022,43(13):64-71.
- [5] 宋庆增. 柴胡宁心饮对急性酒精中毒大鼠胃损伤防治作用的研究[D]. 南宁:广西中医药大学,2020.
- [6] 廖文勇,李慕云,董肖,等. 葛花、枳椇子及其配伍对小鼠急性酒精性胃黏膜损伤的保护作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*,2023,29(10):39-47.
- [7] ZHANG C J,EZEM N,MACKINNON S,et al. Embryonic ethanol but not cannabinoid exposure affects zebrafish cardiac development via agrin and sonic hedgehog interaction[J]. *Cells*,2023,12(9):1327.
- [8] CHEN Q R,GAO H H,YAO J L,et al. Target/apptamer binding-induced inhibition of enzyme activity for amplified electrochemical detection of Sonic Hedgehog protein[J]. *Sens Actuat B Chem*,2023,385:133702.
- [9] 朱素华,张曼,徐圣秋. 槲皮素对糖尿病视网膜病变小鼠氧化应激损伤和炎症反应的影响[J]. *药学与临床研究*,2023,31(1):48-52.
- [10] 门翔,党强,周小果,等. 槲皮素对基于 TGF-β1/P38 MAPK/NF-κB 信号通路抗博来霉素致小鼠肺纤维化的作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*,2023,39(2):43-47.
- [11] 杨丽敏,周霖,王肖辉. 调和益胃颗粒对乙醇诱导小鼠胃溃疡的保护作用及其机制[J]. *河南大学学报(医学版)*,2022,41(6):412-415,422.
- [12] 薛红洋,张智,包瑞敏,等. 猴头菇益生菌发酵对小鼠酒精性胃溃疡的保护作用[J]. *现代食品科技*,2023,39(2):135-144.
- [13] YE H Y,SHANG Z Z,ZHANG F Y,et al. Dendrobium huoshanense stem polysaccharide ameliorates alcohol-induced gastric ulcer in rats through Nrf2-mediated strengthening of gastric mucosal barrier[J]. *Int J Biol Macromol*,2023,236:124001.
- [14] AKMAL M N,ABDEL A I,NUR AZLINA M F,et al. Piper sarmentosum Roxb. methanolic extract prevents stress-induced gastric ulcer by modulating oxidative stress and inflammation[J]. *Front Pharmacol*,2023,13:971443.
- [15] HE Y N,WANG J,JIANG X Y,et al. Effects of an inhibitor of the SHH signaling pathway on endometrial cells of patients with endometriosis[J]. *BMC Mol Cell Biol*,2022,23(1):37.

收稿日期:2023-07-31;修回日期:2023-11-09