

基于 HDAC6/NF- κ B 信号通路探讨莪术提取物治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制[△]

方永乐*,李芸,於瑶瑶(淮南东方医院集团总院中医科,安徽淮南 232000)

中图分类号 R932;R965 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)10-1217-04
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.10.013



摘要 目的:探讨莪术提取物治疗慢性萎缩性胃炎(CAG)的作用机制。方法:选取成年雄性 C57BL6/J 小鼠,通过 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍构建 CAG 小鼠模型,采用莪术提取物对模型小鼠灌胃处理。采用定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)、蛋白质印迹法检测组蛋白去乙酰化酶 6(HDAC6)表达;采用苏木精-伊红染色观察胃组织病理学变化;采用酶联免疫吸附试验检测胃泌素 17(G-17)、白细胞介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的含量;采用蛋白质印迹法检测核因子 κ B(NF- κ B)信号通路关键蛋白 p65 的磷酸化及乙酰化,NF- κ B 抑制因子 α (I κ B α)的磷酸化;采用免疫共沉淀检测 HDAC6 与 p65 的结合。结果:CAG 小鼠胃组织中 HDAC6 呈低表达,HDAC6 可与 p65 特异性结合。CAG 小鼠胃组织细胞形态及排列紊乱,G-17、IL-8 和 TNF- α 含量升高,p65 蛋白磷酸化、乙酰化增加,I κ B α 磷酸化减少;而莪术提取物处理后,HDAC6 的表达显著上调,小鼠胃组织细胞形态恢复、结构排列完整,G-17、IL-8 和 TNF- α 含量降低,p65 蛋白磷酸化、乙酰化减少,I κ B α 磷酸化增加。结论:莪术提取物可能通过上调 HDAC6 促进 p65 的去乙酰化,从而抑制 NF- κ B 信号通路激活,最终改善 CAG。

关键词 慢性萎缩性胃炎;莪术提取物;组蛋白去乙酰化酶 6;核因子 κ B;乙酰化;磷酸化

Mechanism of *Curcumae Rhizoma* Extract in the Treatment of Chronic Atrophic Gastritis Based on HDAC6/NF- κ B Signaling Pathway[△]

FANG Yongle, LI Yun, YU Yaoyao (Dept. of Traditional Chinese Medicine, Huainan East Hospital Group, Anhui Huainan 232000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the mechanism of *Curcumae rhizoma* extract in the treatment of chronic atrophic gastritis (CAG). **METHODS:** Mature male C57BL6/J mice were extracted to construct CAG mice model with 1-methyl-3-nitro-1-nitroguanidine, and the mice model were administrated with *Curcumae rhizoma* extract by gavage. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect histone deacetylase 6(HDAC6) expression. Hematoxylin-Eosin staining was used to observe histopathologic changes in the gastric tissues. Levels of gastrin 17 (G-17), interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Phosphorylation and acetylation of p65, a key protein in the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway, and phosphorylation of NF- κ B inhibitory factor α (I κ B α) were detected by Western blotting. The combination of HDAC6 and p65 was detected by co-immunoprecipitation. **RESULTS:** HDAC6 was lowly expressed in the gastric tissues of CAG mice, and HDAC6 could bind specifically to p65. The morphology and arrangement of gastric cells in CAG mice were disordered, the levels of G-17, IL-8, TNF- α , the phosphorylation and acetylation of p65 protein increased, and the phosphorylation of I κ B α decreased. After treatment of *Curcumae rhizoma* extract, the expression of HDAC6 was significantly up-regulated, the morphology and the morphology and structure of the cells in the mouse stomach tissue were restored and arranged in a complete manner, the levels of G-17, IL-8, TNF- α , the phosphorylation and acetylation of p65 protein decreased, and the phosphorylation of I κ B α increased. **CONCLUSIONS:** *Curcumae rhizoma* extract may promote the deacetylation of p65 through up-regulating HDAC6 expression, thereby inhibiting NF- κ B signaling pathway activation and ultimately improving CAG.

KEYWORDS Chronic atrophic gastritis; *Curcumae rhizoma* extract; Histone deacetylase 6; Nuclear factor κ B; Acetylation; Phosphorylation

△ 基金项目:安徽省卫生厅医药科研计划项目(No. 13167KJ20200122)

* 主治医师。研究方向:中医内科。E-mail:yongle-0554@126.com

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是胃癌癌前的重要特征,表现为正常的胃腺发生结构性病变,同时伴有肠上皮化生^[1-2]。研究表明,胃炎患者的炎症反应持续发生,包括免疫反应与炎症途径的持续激活^[3-4]。随着对CAG发病机制的研究不断深入,其治疗手段受到日益关注,因为除了根除幽门螺杆菌、抑酸和非甾体抗炎等手段外,目前尚无更有效的CAG治疗方法。

莪术是我国四川省最著名的药材之一^[5]。基于莪术促进血液循环和减轻疼痛的特性,其根茎经常被用于临床相关疾病的治疗^[6]。莪术提取物主要成分为姜黄素、去甲氧基姜黄素等,二者在结构上含有2个苯基甲氧基,具有抑制巨噬细胞中纳米颗粒诱导的白细胞介素(IL)1 β 和caspase-1裂解的功能,同时具有较为突出的抗氧化活性能力^[7]。此外,还有研究发现,莪术提取物姜黄素、去甲氧基姜黄素等具有抗炎和抗增殖作用^[8]。有研究认为,CAG的发生是由于感染幽门螺杆菌、胆汁反流、长期饮酒等,导致胃黏膜细胞增殖和凋亡的动态平衡被破坏,引起胃黏膜局部炎症^[9]。笔者认为,莪术提取物的抗炎作用可能会对CAG起到预防作用。因此,本研究将通过组蛋白去乙酰化酶6(HDAC6)/核因子 κ B(NF- κ B)信号轴探讨莪术提取物对CAG的治疗作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:本研究中所用成年雄性C57BL6/J小鼠(18~22 g,4~6周)均购自北京Sibeife动物饲养中心,许可号为SCXK-(京)2019-0010。

1.1.2 仪器:PCR Master mix II(上海惠凌生物技术有限公司);ECL发光底物(美国Millipore公司)。

1.1.3 药品与试剂:酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(英国Abcam公司,货号为20231020);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,批号为20230305);SuperScript IV逆转录酶(美国Thermo Fisher公司,批号为20230212);RIPA缓冲液(上海希格玛高技术有限公司,批号为20221124);BCA蛋白试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号为20230206);低盐裂解缓冲液(LSB,50 mmol/L HEPES、pH=7.5,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1.5 mmol/L MgCl₂,10% glycerol,1% Triton X-100)(上海钦诚生物科技有限公司,批号为20230211)。二抗免疫球蛋白G(1:2 000, ab6721, 批号为20230112),一抗HDAC6(1:1 000, ab239362, 批号为20230214)、人磷酸化核转录因子p65(p65, 1:1 000, ab16502, 批号为20230122)、乙酰化-p65(Ac-p65, 1:1 000, ab19870, 批号为20221215)、NF- κ B抑制因子 α (I κ B α , 1:1 000, ab32518, 批号为20230203)、 β -肌动蛋白(β -actin, 1:1 000, ab8227, 批号为20221122), HDAC6(1:1 000, ab239362, 批号为20221125)、p65(1:1 000, ab16502, 批号为20230211)均购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 动物处理:对小鼠的实验处置符合动物伦理学标准。

小鼠被饲养于SPF级动物房,温度恒定为18~22℃,湿度保持在50%~60%,采用12 h光照形成昼夜交替,可以自由获取食物和水。将动物随机分成三组,包括Control组、CAG组和ATR组。Control组小鼠自由饮水和进食,其余各组给予1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(MNNG)170 μ g/mL灌胃处理及自由饮水结合不规律饮食(1日全喂,1日禁食,如此反复),MNNG隔日灌胃,共处理10周。CAG模型建立后,ATR组小鼠灌胃给予莪术提取物治疗4周(1 mL/100 g,1日1次)。最后1次给药后,腹腔过量注射1%戊巴比妥钠(800 mg/kg)安乐死三组小鼠,采集其血样和胃组织。

1.2.2 组织病理学检查:将胃组织样品固定并保存于10%中性福尔马林溶液中。然后,样品分别在乙醇和二甲苯中脱水。脱水后,将组织样本包埋在石蜡中。通过切片机对包埋的组织进行5 μ m厚的连续切片,并用苏木精-伊红(HE)染色。胃黏膜损伤的组织病理学通过光学显微镜照相确定,并在显微镜下成像进行分析。

1.2.3 ELISA检测:使用ELISA试剂盒检测各组小鼠血清中胃泌素17(G-17)、IL-8和TNF- α 含量。使用试剂盒中裂解缓冲液重悬细胞,于4℃离心(3 000 r/min,离心半径10 cm)15 min,取上清液,保存于-70℃。根据样品和标准品在450 nm的吸光度测定浓度。

1.2.4 定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR):使用TRIzol试剂从小鼠胃组织中提取总RNA,然后使用SuperScript IV逆转录酶将其反转录成cDNA。qRT-PCR采用Taqman通用PCR Master mix II进行,以GAPDH作为内参,相对表达量通过2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法计算^[10]。引物见表1。

表1 PCR引物序列

名称	序列(5'-3')
HDAC6	F:ATGATGCCTCCCTGGCTCTGGC
	R:GTTCTCCTCAGGTCGAAGTTGGC
GAPDH	F:ATGCTGCCCTTACCCCGGGGT
	R:TACTCTTTGAGGCCATGTAG

1.2.5 蛋白质印迹法:使用 β -actin作为内源性标准化,通过蛋白质印迹法检测组织中各蛋白的表达水平。用RIPA缓冲液和全蛋白酶抑制剂混合物处理组织匀浆,根据BCA蛋白试剂盒说明书对蛋白含量进行定量。以10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白质,转移至PVDF膜上。4℃下与一抗孵育过夜,然后室温(25℃)下与二抗免疫球蛋白G(1:2 000, ab6721)孵育1 h,使用ECL发光底物观察信号。使用的一抗有HDAC6(1:1 000, ab239362)、p65(1:1 000, ab16502)、Ac-p65(1:1 000, ab19870)、I κ B α (1:1 000, ab32518)、 β -actin(1:1 000, ab8227)。

1.2.6 免疫共沉淀:为了进行免疫沉淀,收集组织并用低盐裂解缓冲液加蛋白酶抑制剂在冰上裂解30 min。将细胞裂解物与抗体加蛋白A/G珠子一起孵育过夜。然后用LSB洗涤珠子5次,用2 \times SEMS加载缓冲液洗脱,通过免疫印迹检测并与相应的抗体孵育以进一步分析。使用的抗体有HDAC6(1:1 000, ab239362)、p65(1:1 000, ab16502)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行分析。经 Kolmogorov-Smirnov 检验数据呈正态分布,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析或 two-way ANOVA 多因素方差分析,ANOVA 分析后的两两比较采用 Tukey's multiple comparisons test。 P 为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 莪术提取物对 G-17、IL-8、TNF- α 、HDAC6 以及胃组织细胞排列与形态的影响

HE 染色结果显示,与 Control 组相比,CAG 组小鼠胃组织细胞排列紊乱,形态不规则且伴有一定程度萎缩,见图 1(A)。血清检测结果显示,与 Control 组相比,CAG 组小鼠 G-17、IL-8 和 TNF- α 含量均显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1(B)。qRT-PCR、蛋白质印迹法检测结果显示,与 Control 组比较,CAG 组 HDAC6 的表达显著下调,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1(C)——图 1(D)。但莪术提取物处理后,上述变化均显著改善。与 CAG 组比较,ATR 组小鼠胃组织细胞形态恢复,结构排列完整;G-17、IL-8 和 TNF- α 含量显著下调;HDAC6 的表达显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

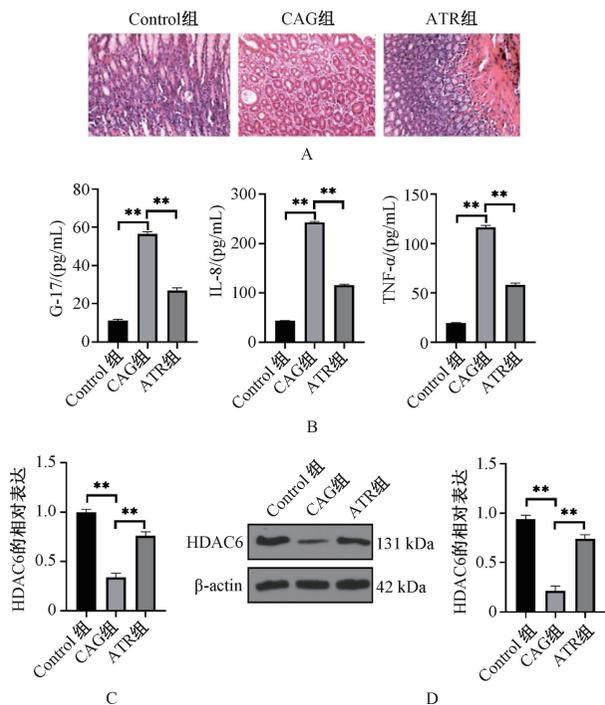


图 1 莪术提取物对 G-17、IL-8、TNF- α 、HDAC6 以及胃组织细胞排列与形态的影响

2.2 莪术提取物对 NF- κ B 信号通路的影响

与 Control 组比较,CAG 组小鼠 p65 蛋白磷酸化(p-p65)增加,而 I κ B α 蛋白磷酸化(p-I κ B α)减少;与 CAG 组比较,ATR 组小鼠 p-p65 减少,而 p-I κ B α 增加,上述差异均有统计学意义

($P < 0.01$),见图 2。

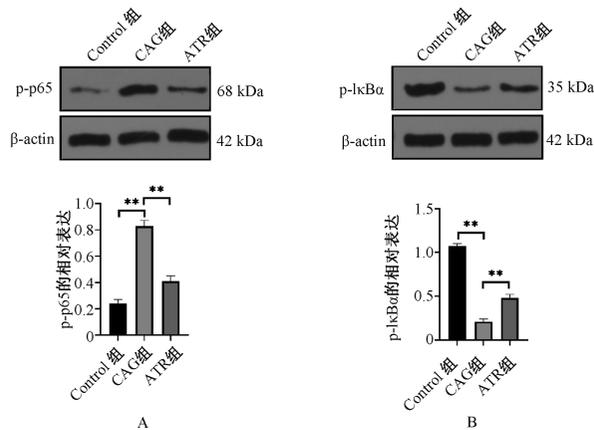


图 2 莪术提取物对 NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响

2.3 HDAC6 结合 P65 促使其去乙酰化

由于上述实验结果提示莪术提取物可能影响 HDAC6 的表达、NF- κ B 信号通路的激活,p65 的乙酰化与 NF- κ B 信号通路激活有着密切的关系^[11],而 HDAC6 为组蛋白去乙酰化酶家族中的一员,故推测莪术改善 CAG 的机制可能是通过 HDAC6 对 p65 的去乙酰化来实现的。因此,本研究进行了免疫共沉淀以检测 HDAC6 是否与 p65 蛋白发生了相互作用,结果显示,HDAC6 蛋白与 p65 蛋白发生了特异性结合,见图 3(A);同时通过蛋白质印迹法检测了乙酰化 p65(Ac-p65)蛋白的表达,发现 CAG 组小鼠较 Control 组上调了 Ac-p65 的表达,而 ATR 组则较 CAG 组降低了 Ac-p65 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 3(B)。

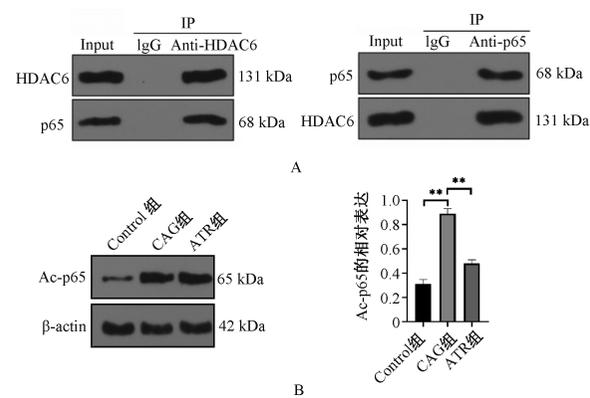


图 3 HDAC6 结合 p65 促使其去乙酰化

3 讨论

CAG 及其伴生的肠上皮化生已被确定为胃癌发生的独立危险因素^[12]。在瑞典的一项对 405 172 例患者的研究中,CAG 患者的胃癌患病率为无 CAG 患者的 4.5 倍^[13]。上述发现表明,包括 CAG 在内的胃癌癌前状态与胃癌的发病密切相关。Sydney system 和 OLGA/OLGIM 分级被认为代表了诊断恶

性肿瘤风险阶段的“金标准”^[14]。幽门螺杆菌感染、肠化生、高龄、饮酒、恶性贫血和中重度 CAG 被认为是 CAG 发展为胃癌的高危因素^[15-16]。一项研究结果表明,我国 CAG 患病率很高,且随我国人口老龄化进程加深而呈升高趋势^[17]。因此,探寻 CAG 的治疗手段显得尤为重要。

已经有研究探明了莪术提取物的大量潜在分子靶标,包括转录因子、生长因子、蛋白激酶和其他酶等^[18-19]。本研究结果表明,莪术提取物可以改善 CAG 小鼠胃组织紊乱的形态与排列,同时上调被降低的 HDAC6 的表达,同时血清标志物 G-17 与炎症因子 IL-8、TNF- α 含量均得到了改善,表明莪术提取物具有改善 CAG 的潜力。

HDAC6 作为组蛋白去乙酰化酶,可通过影响 p65 的去乙酰化来影响 NF- κ B 信号通路,如在尼古丁诱导的巨噬细胞凋亡中^[20]、在视网膜色素上皮细胞等^[21]。本研究在 CAG 小鼠中通过免疫共沉淀、蛋白质印迹法观察到了 HDAC6 与 p65 蛋白的结合。NF- κ B 信号通路为经典的炎症信号通路,推测莪术提取物的改善作用可能通过 NF- κ B 途径,故本研究通过蛋白质印迹法检测了 NF- κ B 信号通路的相关蛋白 p65 与 I κ B α 的磷酸化,结果表明,莪术提取物可能抑制 NF- κ B 信号通路而改善 CAG。

综上所述,莪术提取物可能通过上调 HDAC6 的表达,促进 p65 蛋白的去乙酰化进而抑制 NF- κ B 的激活,最终改善 CAG。未来将进一步探寻 HDAC6 的上游调控机制,以期完善相关的分子调控机制,为临床治疗 CAG 提供切实可行的理论依据。

参考文献

- [1] CORREA P. Chronic gastritis: a clinico-pathological classification [J]. *Am J Gastroenterol*, 1988, 83(5): 504-509.
- [2] PARK Y H, KIM N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer[J]. *J Cancer Prev*, 2015, 20(1): 25-40.
- [3] PIAZUELO M B, CAMARGO M C, MERA R M, et al. Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(9): 1360-1369.
- [4] KIM S H, LEE S H, CHOI Y L, et al. Extensive alteration in the expression profiles of TGFB pathway signaling components and TP53 is observed along the gastric dysplasia-carcinoma sequence [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(12): 1439-1452.
- [5] YANG F Q, LI S P, CHEN Y, et al. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of *Curcuma* rhizomes by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3/4): 552-558.
- [6] SASAKI Y, GOTO H, TOHDA C, et al. Effects of curcuma drugs on vasomotion in isolated rat aorta[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(8): 1135-1143.
- [7] 唐思丽,王声,孙明娜,等. 莪术活性成分的分选鉴定及活性

- 研究[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(3): 354-357.
- [8] SANDUR S K, PANDEY M K, SUNG B, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8): 1765-1773.
- [9] ROSANIA R, VARBANOVA M, WEX T, et al. Regulation of apoptosis is impaired in atrophic gastritis associated with gastric cancer[J]. *BMC Gastroenterol*, 2017, 17(1): 84.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta}Delta C(T) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] CHAWLA M, ROY P, BASAK S. Role of the NF- κ B system in context-specific tuning of the inflammatory gene response[J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 68: 21-27.
- [12] PARK Y M, KIM J H, BAIK S J, et al. Clinical risk assessment for gastric cancer in asymptomatic population after a health check-up: an individualized consideration of the risk factors [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(44): e5351.
- [13] SONG H, EKHEDEEN I G, ZHENG Z, et al. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk western population [J]. *BMJ*, 2015, 351: h3867.
- [14] LAHNER E, CONTI L, ANNIBALE B, et al. Current perspectives in atrophic gastritis[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2020, 22(8): 38.
- [15] 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.
- [16] VANNELLA L, LAHNER E, ANNIBALE B. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: a critical reappraisal[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(12): 1279-1285.
- [17] 房静远,杜奕奇,刘文忠,等. 中国慢性胃炎诊治指南(2022年,上海)[J]. *胃肠病学*, 2023, 28(3): 149-180.
- [18] ZHOU H Y, BEEVERS C S, HUANG S L. The targets of curcumin[J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(3): 332-347.
- [19] DAO T T, SEHGAL P, TUNG T T, et al. Demethoxycurcumin is a potent inhibitor of P-type ATPases from diverse kingdoms of life [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163260.
- [20] XU S, CHEN H W, NI H E, et al. Targeting HDAC6 attenuates nicotine-induced macrophage pyroptosis via NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2021, 317: 1-9.
- [21] YANG Q S, LI S Z, ZHOU Z X, et al. HDAC6 inhibitor Cay10603 inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in retinal pigment epithelial cells via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(2): 169-177.

(收稿日期:2024-01-09 修回日期:2024-04-07)

欢迎订阅《中国医院用药评价与分析》杂志!