



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: TLR4 通过自噬和氧化应激对胃溃疡小鼠炎症反应的调控机制
作者: 杜进璇, 翡罗热·地里夏提, 轩秋云
收稿日期: 2025-09-13
网络首发日期: 2025-10-13
引用格式: 杜进璇, 翡罗热·地里夏提, 轩秋云. TLR4 通过自噬和氧化应激对胃溃疡小鼠炎症反应的调控机制[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251011.1652.008>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

TLR4 通过自噬和氧化应激对胃溃疡小鼠炎症反应的调控机制

杜进璇¹, 翡罗热 地里夏提¹, 轩秋云²

(新疆医科大学第六附属医院 ¹消化内科、²内镜诊治科, 乌鲁木齐 830002)

摘要 **目的** 探讨抑制 Toll 样受体 4 (TLR4) 对自噬和氧化应激的影响以及对胃溃疡小鼠炎症反应的调控作用与机制。**方法** 将 60 只成年雄性昆明小鼠均分为 5 组: 对照组、模型组、模型+TLR4-IN-C34 组、模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组、模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组。除对照组外, 每组均用 40 mg/kg 吡哆美辛灌胃, 治疗组每 3 d 注射 1 次药剂, 各组处理 30 d。颈椎脱臼法处死小鼠, 取胃组织。对胃溃疡进行评分, HE 染色检测病理变化并评分。ELISA 法检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、晚期氧化蛋白产物 (AOPP)、前列腺素 E₂ (PGE₂) 的水平以及胃组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 的水平。Western blot 法检测胃组织中 TLR4、微管相关蛋白 1 轻链 3-I (LC3-I)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II)、自噬相关蛋白 5 (Atg5)、自噬调节蛋白 Beclin-1 (Beclin-1) 和细胞核核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1) 的表达。免疫荧光染色法检测胃组织中 LC3-II 的荧光强度。**结果** 与对照组比, 模型组的溃疡评分、HE 染色评分、TLR4、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平均上调, 而胃组织 LC3-II 荧光强度、PGE₂ 水平、Atg5、Beclin-1 及细胞核 Nrf2、HO-1、NQO1 的水平以及 LC3-II/I 比值均下调 (均 $P < 0.05$)。与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组溃疡评分、HE 染色评分、TLR4、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平均下调, 而胃组织 LC3-II 荧光强度、PGE₂ 水平、Atg5、Beclin-1 及细胞核 Nrf2、HO-1、NQO1 的水平以及 LC3-II/I 比值均上调 (均 $P < 0.05$)。与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组中溃疡评分、HE 染色评分、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平均上调, 而胃组织 LC3-II 荧光强度、PGE₂ 水平、Atg5、Beclin-1 以及 LC3-II/I 比值均下调 (均 $P < 0.05$)。与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的溃疡评分、HE 染色评分、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平均上调, 而 PGE₂ 水平和细胞核 Nrf2、HO-1、NQO1 的水平均下调 (均 $P < 0.05$)。**结论** 抑制 TLR4 通过上调自噬并减少氧化应激改善小鼠胃溃疡症状并抑制炎症反应。

2025-09-13 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (编号: 2023D01C429)

作者简介: 杜进璇, 女, 副主任医师, 通信作者, E-mail: guafu51@sina.com

关键词 Toll 样受体 4; 自噬; 氧化应激; 胃溃疡; 小鼠; 炎症反应

中图分类号 R573.3

文献标志码 A

The regulatory mechanism of TLR4 on the inflammatory response in mice with gastric ulcers through autophagy and oxidative stress

Du Jinxuan¹, Feiluore Dilixiati¹, Xuan Qiuyun²

(¹Dept of Gastroenterology, ²Dept of Endoscopic Diagnosis and Treatment, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002)

Abstract **Objective** To investigate the effects of Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibition on autophagy and oxidative stress, as well as its regulatory role and mechanism in the inflammatory response in a mouse model of gastric ulcer. **Methods** Sixty adult male Kunming mice were equally divided into five groups: control group, model group, model+TLR4-IN-C34 group, model+TLR4-IN-C34+3-MA group, and model+TLR4-IN-C34+H₂O₂ group. Except for the control group, all groups were administered 40 mg/kg indomethacin via gavage. Treatment groups received injections every three days, and all groups were treated for 30 days. Mice were euthanized by cervical dislocation, and gastric tissues were collected. Gastric ulcer scores were assessed, and pathological changes were evaluated via HE staining and scoring. Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), advanced oxidation protein products (AOPP), and prostaglandin E2 (PGE2), as well as gastric tissue levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH), were measured using ELISA. Western blot analysis was performed to detect the expression of TLR4, microtubule-associated protein 1 light chain 3-I (LC3-I), microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II), autophagy-related protein 5 (Atg5), Beclin-1, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) in gastric tissues. Immunofluorescence staining was used to assess LC3-II fluorescence intensity in gastric tissues. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited upregulation of ulcer scores, HE staining scores, TLR4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and AOPP levels, and downregulation of LC3-II fluorescence intensity, PGE2 levels, Atg5, Beclin-1, nuclear Nrf2, HO-1, NQO1 levels, and the LC3-II/I ratio (all $P < 0.05$). Compared with the model group, the model+TLR4-IN-C34 group showed downregulation of ulcer scores, HE staining scores, TLR4,

IL-1 β , IL-6, TNF- α , and AOPP levels, and upregulation of LC3-II fluorescence intensity, PGE2 levels, Atg5, Beclin-1, nuclear Nrf2, HO-1, NQO1 levels, and the LC3-II/I ratio (all $P < 0.05$). Compared with the model+TLR4-IN-C34 group, the model+TLR4-IN-C34+3-MA group exhibited upregulation of ulcer scores, HE staining scores, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and AOPP levels, and downregulation of LC3-II fluorescence intensity, PGE2 levels, Atg5, Beclin-1, and the LC3-II/I ratio (all $P < 0.05$). Compared with the model+TLR4-IN-C34 group, the model+TLR4-IN-C34+H₂O₂ group showed upregulation of ulcer scores, HE staining scores, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and AOPP levels, and downregulation of PGE2 levels and nuclear Nrf2, HO-1, and NQO1 levels (all $P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of TLR4 ameliorates gastric ulcer symptoms and suppresses the inflammatory response in mice by upregulating autophagy and reducing oxidative stress (all $P < 0.05$).

Key words Toll-like receptor 4; autophagy; oxidative stress; stomach ulcers; mice; inflammatory response

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2023D01C429)

Corresponding author Du Jinxuan, E-mail: guafu51@sina.com

胃溃疡 (gastric ulcer, GU) 是一种病程长、难治且高复发的消化道疾病, 典型症状包括胃痛、腹胀、厌食、反酸和呕吐, 可能进展为胃出血、穿孔甚至胃癌^[1-2]。其发病涉及幽门螺杆菌感染、NSAIDs 使用 (全球约 43% 人群规律用药, 30% 出现胃肠道并发症^[1-2])、胃酸异常及黏膜保护机制受损等多因素相互作用^[1]。非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) (如吲哚美辛) 通过刺激胃酸分泌和抑制前列腺素 E2 (Prostaglandin E2) 合成双重机制损伤胃黏膜^[3], 而主流药物质子泵抑制剂 (如奥美拉唑) 因头痛、腹泻等副作用受限^[4], 亟需开发新疗法。研究表明 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在胃溃疡病理中起核心作用: 其激活促进促炎因子释放, 并加剧氧化应激^[5-6]。高良姜总黄酮的胃黏膜保护作用证实抑制 TLR4 可作为新靶点^[5-6]。同时, TLR4 通过 mTOR 通路抑制自噬进程 (该机制失衡会加重胃溃疡损伤^[7-8]), 提示 TLR4 抑制可能通过调控自噬-氧化应激轴为治疗提供新策略。本研究通过吲哚美辛诱导小鼠胃溃疡模型, 系统探究 TLR4 抑制对胃黏膜自噬、氧化应激及炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

60 只成年雄性昆明小鼠[7~8 周龄, (20±10) g, SPF 级]购自新疆医科大学实验动物中心。TLR4 特异性抑制剂 TLR4-IN-C34 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自上海 Aladdin 公司; 过氧化氢(H₂O₂)购自美国 Merck 公司; 兔抗-TLR4、兔抗-核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2), 兔抗-血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1, HO-1), 兔抗-NAD(P)H:醌氧化还原酶 1[NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1], 兔抗-微管相关蛋白轻链 3-I(microtubule-associated protein 1 light chain 3-I, LC3-I), LC3-II, 兔抗-自噬相关蛋白 5(autophagy related 5, Atg5), 兔抗-Beclin-1, 兔抗-Lamin B1, 兔抗-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的一抗抗体以及羊抗兔 IgG 二抗抗体以及 Cy3 荧光二抗和二脒基苯基吡啶(diaminidine phenyl indole, DAPI)均购自英国 Abcam 公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 Beta, IL-1 β), IL-6, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor Alpha, TNF- α), 高级氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP), 前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2), 丙二醛(malondialdehyde, MDA), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 谷胱甘肽(Glutathione, GSH)检测试剂盒, 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒, 蛋白质定量试剂盒(bicinchoninic acid protein assay kit, BCA), 细胞核蛋白提取试剂盒, 含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司; 吡啶美辛购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物管理与分组

60 只昆明种雄性小鼠饲养于标准环境[(23±2) °C, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 湿度 40%~65%], 自由摄取饮水和标准鼠粮。经过 1 周的适应后, 小鼠随机分为 5 组, 包括: 对照组(等体积生理盐水灌胃)、模型组(40 mg/kg 吡啶美辛灌胃诱导胃溃疡模型)、模型+TLR4-IN-C34 组(模型诱导基础上用 20 mg/kg 的 TLR4 抑制剂 TLR4-IN-C34 灌胃治疗)、模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组(模型诱导基础上用 20 mg/kg 的 TLR4-IN-C34 联合 100 mg/kg 自噬抑制剂 3-MA 灌胃治疗)、模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组(模型诱导基础上用 20 mg/kg 的 TLR4-IN-C34 联合 12.5 mg/kg H₂O₂灌胃治疗), 每组 12 只, 每 3 d 注射 1 次, 各组处理 30 d 后所有小鼠禁食 24 h。每只小鼠用异氟醚(2%)麻醉, 通过眼球摘除法采集新鲜血液, 取血清存于 4 °C 用于生化指标检测。用颈椎脱臼法处死动物, 沿大弯切开胃组织, 用生理盐水洗净, 观察并拍摄照片, 对胃溃疡进行评分。随后, 将部分胃组织用 4%多聚甲醛固定以

进行组织病理学、免疫荧光评估。其余胃组织储存于-80℃以供进一步分析。本研究中的所有动物操作均经新疆医科大学第六附属医院伦理委员会的审核（批号：202311421）。

1.2.2 血清和胃组织生化指标的评估

使用相应的 ELISA 试剂盒测量血清 AOPP、PGE2 和炎症因子（IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ）。制备胃组织匀浆，取胃组织（0.1 g）与 0.9 mL NaCl 溶液（0.9%）混合，使用超声细胞破碎仪匀浆。然后，每个匀浆样品在 4℃下 9 000 r/min 离心 6 min，根据相应试剂盒说明测定上清液中的 SOD、GSH、MDA 水平。

1.2.3 HE 染色对胃组织的病理学评估

HE 染色用于胃组织的组织病理学评估。胃组织用 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，然后切成 5 μ m 的切片。随后，每个切片脱蜡，染色，使用奥林巴斯 IX83 显微镜在 200 倍放大倍率下观察，并对每个胃组织的病理损伤进行评分。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

利用蛋白提取试剂提取胃组织中的总蛋白和细胞核蛋白。用 BCA 蛋白测定试剂测定总蛋白浓度与细胞核蛋白的浓度。每个样品取等量蛋白（20 μ g），95℃煮沸 7 min。检测胃组织总蛋白中目标蛋白的表达，用 12%~15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离总蛋白。电泳后，蛋白转移到 PVDF 膜上，10%脱脂干牛奶中室温封闭 1 h，TLR4（1:800）、LC3-I（1:500）、LC3-II（1:500）、Atg5（1:800）、Beclin-1（1:400）、GAPDH（1:10 000）的一抗在 4℃下孵育过夜。与相应的二抗（1:2 000）在室温下孵育 2 h。使用增强型 ECL 试剂盒对印迹条带进行显色处理，以 GAPDH 为内参蛋白，使用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析。另外，检测胃组织细胞核蛋白中目标蛋白的表达，用 12%~15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离细胞核蛋白。电泳后，蛋白转移到 PVDF 膜上，10%脱脂干牛奶中室温封闭 1 h，Nrf2（1:500）、HO-1（1:500）、NQO1（1:800）、Lamin B1（1:5 000）的一抗在 4℃下孵育过夜。在 TBST（含 0.1% Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液）中洗涤 3 次（每次 5 min）后，与相应的二抗在室温下孵育 2 h。使用增强型 ECL 试剂盒对印迹条带进行显色处理。以 Lamin B1 为内参蛋白，使用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析。

1.2.5 免疫荧光分析胃组织中 LC3-II 的荧光强度

通过免疫荧光染色测定胃组织中 LC3-II 蛋白的荧光强度以直观地观察胃组织中的自噬水平。胃组织切片用 BSA 溶液（5%）封闭 30 min，并在 4℃下与 LC3-II 一抗孵育过夜。随后，胃组织切片用 PBS 洗涤 3 次，并与结合 Cy3 染料的抗兔 IgG 二抗结合，细胞核用 DAPI 染色。最后，所有切片使用奥林巴斯 IX83 显微镜在 200 倍放大倍率下观察。

1.3 统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验。用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验各组数据的差异显著性, 随后进行 LSD-*t* 事后检验以确定组间的两两差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 TLR4 对各组小鼠胃组织病理的影响

对照组胃黏膜正常、光滑且无损伤, 而模型组有许多明显的出血点。与模型组相比, 模型+TLR4-IN-C34 组胃黏膜损伤明显改善, 而与模型+TLR4-IN-C34 组比较, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的胃黏膜损伤的改善效果较弱。与对照组比, 模型组溃疡指数明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组溃疡指数明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外, 与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的溃疡指数明显增高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 1A、B。HE 组织病理学检查结果表明, 在对照组中, 黏膜正常, 腺体结构有序, 而在模型组中, 胃黏膜和腺体结构严重受损, 胃黏膜细胞大量缺失。TLR4-IN-C34 组能明显保护黏膜结构, 防止为胃黏膜损伤以及胃黏膜细胞丢失。与 TLR4-IN-C34 组比, TLR4-IN-C34+3-MA 组和 TLR4-IN-C34+H₂O₂组显示 TLR4-IN-C34 对胃黏膜的保护作用被削弱。与对照组比, 模型组的 HE 染色评分明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组的 HE 染色评分明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外, 与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的 HE 染色评分增高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 1C、D。

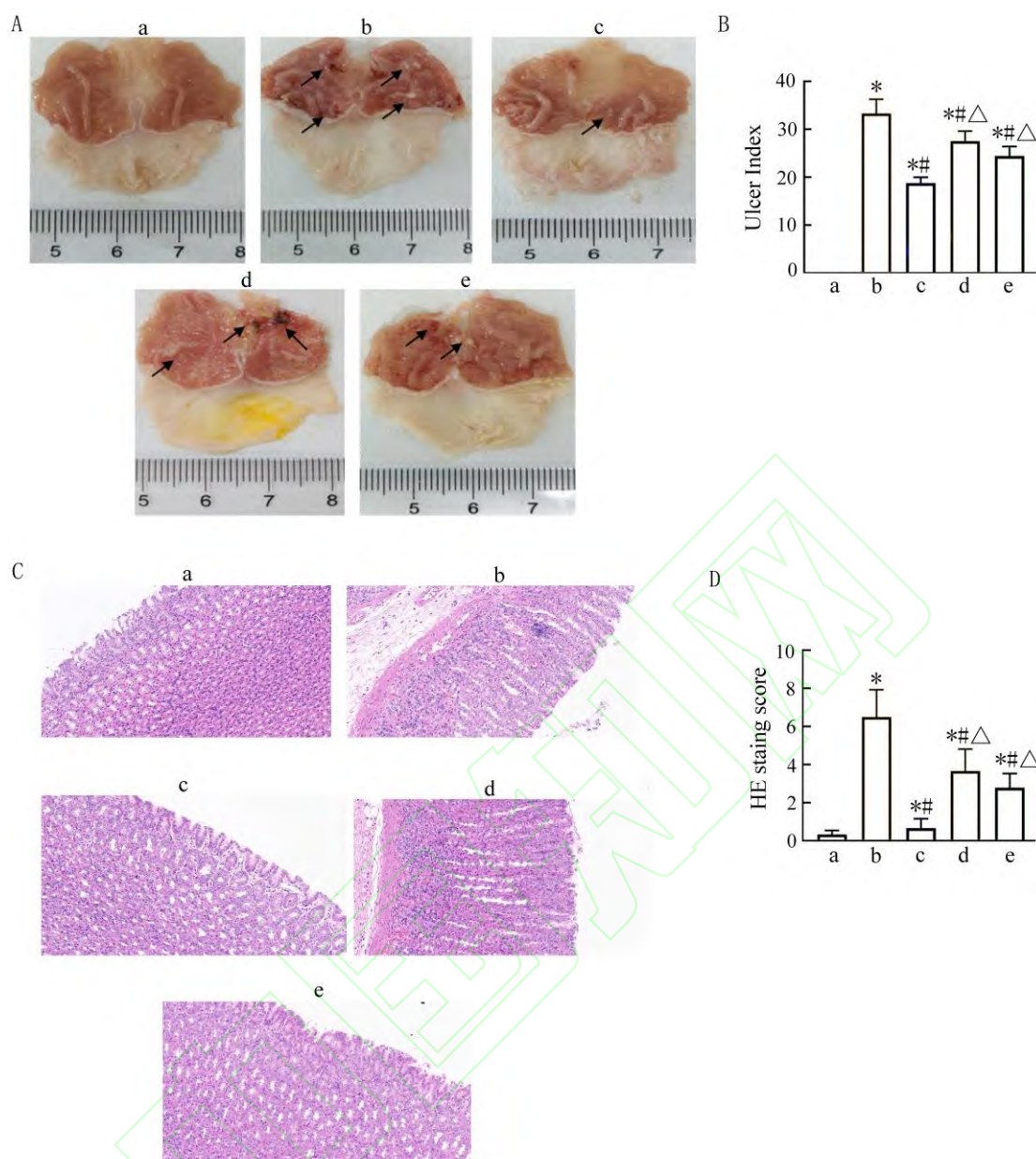


图 1 抑制 TLR4 对各组小鼠胃组织病理的影响

Fig.1 The effects of inhibiting TLR4 on the gastric tissue pathology of mice in each group

A: The appearance and morphology of gastric tissues in each group; black arrows: ulcerated tissue areas; B: Ulcer index; C: HE staining of gastric tissue $\times 200$; D: HE staining score; a: Control group; b: Model group; c: Model+TLR4-IN-C34 group; d: Model+TLR4-IN-C34+3-MA group; e: Model+TLR4-IN-C34 +H₂O₂ group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; $\Delta P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

2.2 抑制 TLR4 对各组小鼠血清生化指标的影响

各组间 TLR4 的蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($F=603.452$, $P=0.000$)。与对照组比, 模型组 TLR4 蛋白相对水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而与模型组比,

模型+TLR4-IN-C34 组、模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组、模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组 TLR4 蛋白相对水平都降低，差异有统计学意义（均 $P<0.05$ ）。而与模型+TLR4-IN-C34 组比，模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组蛋白相对水平的变化均无统计学意义（均 $P<0.05$ ）。见图 2。

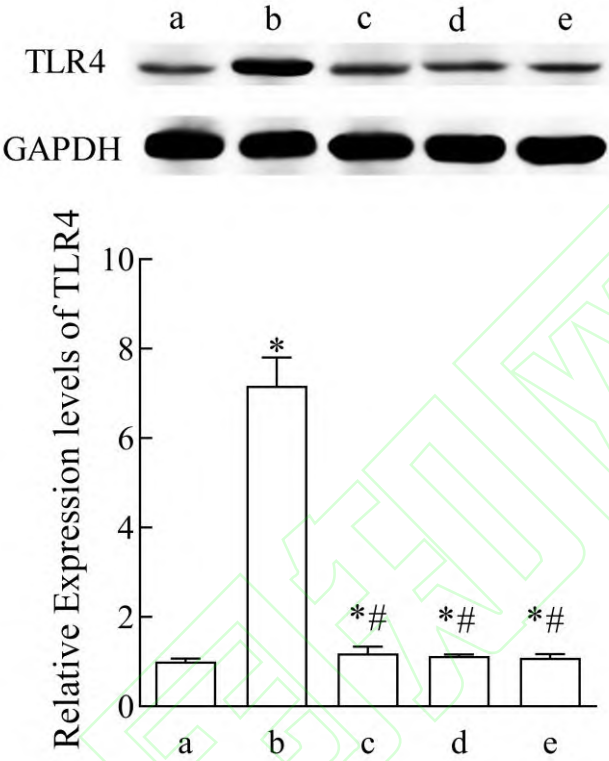


图 2 各组胃组织中 TLR4 蛋白的 Western blot 条带

Fig. 2 Western blot bands of TLR4 protein in gastric tissues of each group

a: Control group; b: Model group; c: Model+TLR4-IN-C34 group; d: Model+TLR4-IN-C34+3-MA group; e: Model+TLR4-IN-C34+H₂O₂ group; * $P<0.05$ vs Control group; # $P<0.05$ vs Model group.

与对照组比，模型组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平升高，而 PGE2 含量下降，差异有统计学意义（均 $P<0.05$ ）；与模型组比，模型+TLR4-IN-C34 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平显著降低，而 PGE2 含量显著升高，差异有统计学意义（均 $P<0.05$ ）；与模型+TLR4-IN-C34 组比，模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP 水平显著升高，而 PGE2 含量显著下降，差异有统计学意义（均 $P<0.05$ ）。见表 1。

表 1 各组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、AOPP、PGE2 的水平（ $\bar{x} \pm s$, $n=12$ ）

Tab. 1 Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , AOPP and PGE2 in the serum of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Groups	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	AOPP (μ mol/mL)	PGE2 (ng/mL)
Control group	31.52 $\pm$ 4.23	62.44 $\pm$ 6.21	23.02 $\pm$ 2.25	49.22 $\pm$ 6.32	251.23 $\pm$ 18.11
Model group	52.11 $\pm$ 7.19*	115.01 $\pm$ 9.39*	121.88 $\pm$ 10.20*	72.66 $\pm$ 9.22*	102.56 $\pm$ 8.23*
Model+TLR4-IN-C3	37.01 $\pm$ 4.33**	73.23 $\pm$ 6.45**	64.91 $\pm$ 7.37**	56.33 $\pm$ 4.27**	230.98 $\pm$ 19.09**
4 group					
Model+TLR4-IN-C3	46.98 $\pm$ 0.12** Δ	104.56 $\pm$ 9.31** Δ	102.77 $\pm$ 6.20** Δ	67.08 $\pm$ 7.45** Δ	154.12 $\pm$ 0.38** Δ
4+3-MA group					
Model+TLR4-IN-C3	43.77 $\pm$ 0.28** Δ	100.25 $\pm$ 7.08** Δ	96.33 $\pm$ 7.18** Δ	62.18 $\pm$ 6.42** Δ	149.77 $\pm$ 11.36**
4+H ₂ O ₂ group					Δ
F value	15.384	28.737	55.912	5.238	63.487
P value	0.000	0.000	0.00	0.002	0.000

* $P < 0.05$ vs Control group; ** $P < 0.05$ vs Model group; $\Delta P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

2.3 抑制 TLR4 对各组胃组织生化指标的影响

与对照组比, 模型组的 MDA 水平升高, 而 SOD、GSH 水平降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组的 MDA 水平降低, 而 SOD、GSH 水平升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组的 MDA 水平升高, 而 SOD、GSH 水平降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组胃组织中 MDA、SOD、GSH 的相对水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 2 Relative levels of MDA, SOD and GSH in gastric tissues of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Groups	MDA	SOD	GSH
Control group	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10
Model group	3.55 $\pm$ 0.25*	0.25 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.06*
Model+TLR4-IN-C34 group	1.82 $\pm$ 0.26**	0.83 $\pm$ 0.09**	0.86 $\pm$ 0.05**
Model+TLR4-IN-C34+3-MA group	1.79 $\pm$ 0.18**	0.81 $\pm$ 0.10**	0.83 $\pm$ 0.09**
Model+TLR4-IN-C34+H ₂ O ₂ group	2.73 $\pm$ 0.31** Δ	0.33 $\pm$ 0.05** Δ	0.28 $\pm$ 0.03** Δ
F value	48.927	61.473	72.385

<i>P</i> value	0.000	0.000	0.000
----------------	-------	-------	-------

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; $\Delta P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

2.4 抑制 TLR4 对各组胃组织氧化应激的影响

各组间 HO-1、NQO1、Nrf2 的表达水平差异均有统计学意义 ($F=56.291$ 、 39.482 、 75.635 ; 均 $P=0.000$)。与对照组比,模型组中细胞核 HO-1、NQO1、Nrf2 的表达水平降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型组比,模型+TLR4-IN-C34 组细胞核 HO-1、NQO1、Nrf2 的表达水平升高,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型+TLR4-IN-C34 组比,模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组和模型+TLR4-IN-C34+H₂O₂组细胞核 HO-1、NQO1、Nrf2 的表达水平降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。见图 3。

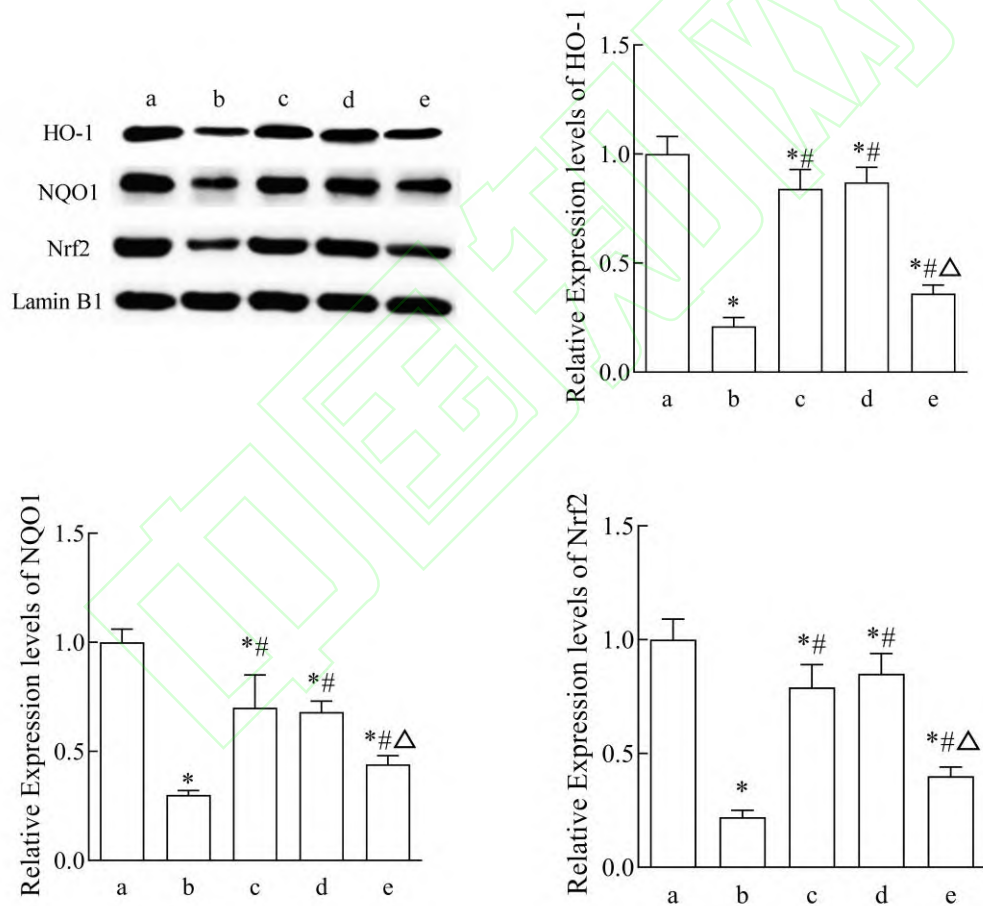


图 3 各组细胞核中 HO-1、NQO1、Nrf2 蛋白相对表达水平

Fig.3 Relative expression levels of HO-1, NQO1 and Nrf2 proteins in the nuclei of each group

a: Control group; b: Model group; c: Model+TLR4-IN-C34 group; d: Model+TLR4-IN-C34+3-MA group; e: Model+TLR4-IN-C34 +H₂O₂ group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; $\Delta P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

2.5 抑制 TLR4 对各组胃组织自噬以及这是相关蛋白表达的影响

各组间 LC3-II 荧光强度及 LC3-II/I、Atg5、Beclin-1 的表达水平差异均有统计学意义 ($F=209.366$ 、 158.739 、 35.288 、 47.625 ; 均 $P=0.000$)。与对照组比, 模型组中相对 LC3-II 荧光强度降低, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组相对 LC3-II 荧光强度升高, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组相对 LC3-II 荧光强度降低, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。见图 4。与对照组比, 模型组中 LC3-II/I 以及 Atg5、Beclin-1 的表达水平降低, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型组比, 模型+TLR4-IN-C34 组 LC3-II/I 以及 Atg5、Beclin-1 的表达水平显著升高, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与模型+TLR4-IN-C34 组比, 模型+TLR4-IN-C34+3-MA 组 LC3-II/I 以及 Atg5、Beclin-1 的表达水平的表达水平显著降低, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。见图 5。

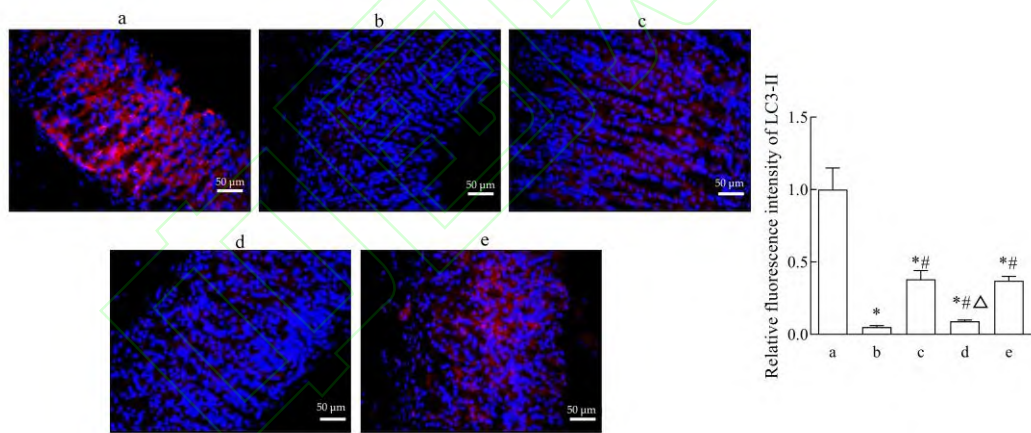


图 4 各组胃组织中 LC3-II 的荧光强度的比较 ×200

Fig. 4 Comparison of the fluorescence intensity of LC3-II in gastric tissues of each group

×200

Blue: DAPI; Red: LC3-II; a: Control group; b: Model group; c: Model+TLR4-IN-C34 group; d: Model+TLR4-IN-C34+3-MA group; e: Model+TLR4-IN-C34 +H₂O₂ group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; $\Delta P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

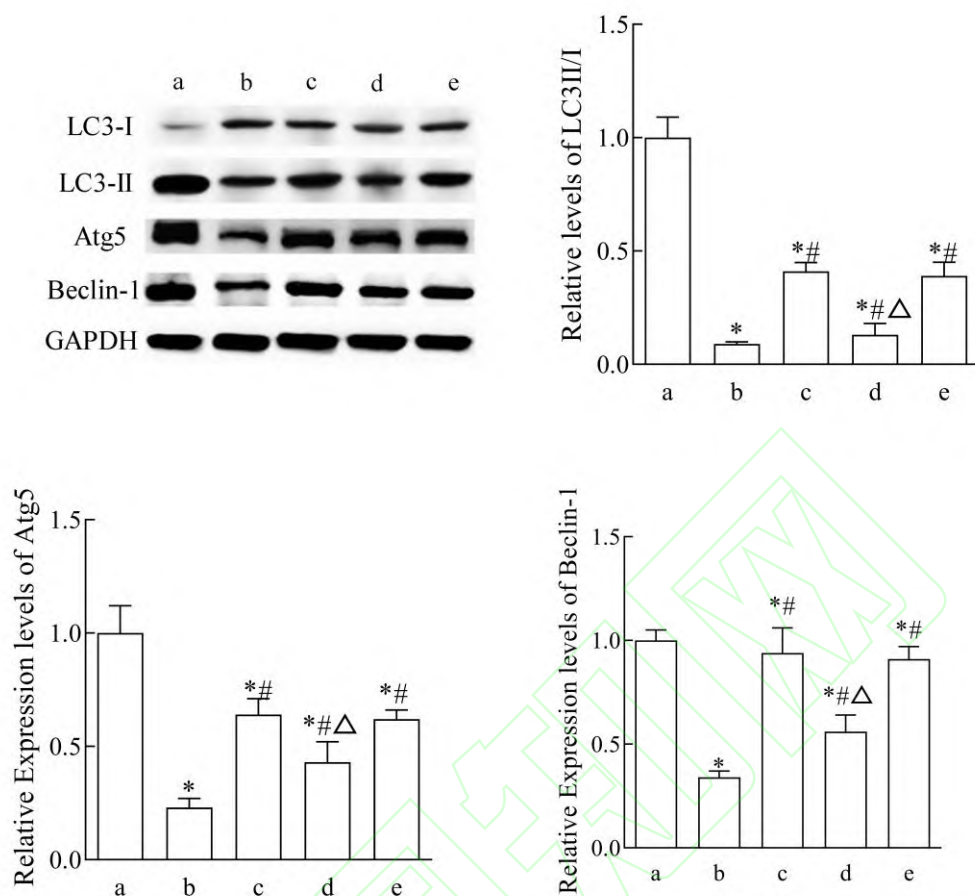


图5 各组 LC3-II/I 比值以及 Atg5、Beclin-1 的蛋白相对表达水平

Fig.5 LC3-II/I ratio and relative protein expression levels of Atg5 and Beclin-1 of each group

a: Control group; b: Model group; c: Model+TLR4-IN-C34 group; d: Model+TLR4-IN-C34+3-MA group; e: Model+TLR4-IN-C34 +H₂O₂ group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; Δ $P < 0.05$ vs Model +TLR4-IN-C34 group.

3 讨论

TLR4 是一种高度保守的先天免疫受体,参与机体稳态调节^[9]。研究^[9]表明,TLR4 通过 MyD88/NF-κB 等下游通路参与溃疡性结肠炎进展,使用 TLR4 特异性抑制剂 TLR4-IN-C34 治疗可部分改善肠道生态并显著抑制 TLR4 表达,减轻炎症细胞浸润,增强结肠抗氧化活性与屏障功能^[10]。本研究在吡啶美辛诱导的小鼠胃溃疡模型中得到类似结果:TLR4-IN-C34 抑制 TLR4 后,胃组织炎症与炎性细胞浸润减少,氧化应激下降,抗氧化活性上升,胃黏膜屏障恢复,自噬水平及相关蛋白表达增加,提示抑制 TLR4 可通过上调自噬并降低氧化应激改善胃溃疡。

本研究中,在吡啶美辛诱导下,小鼠的胃黏膜受到严重损伤,其原因可能是吡啶美辛显著降低了胃黏膜保护因子 PGE2 的产生^[11],本研究的模型组也观察到 PGE2 水平显著下降。同时,由于吡啶美辛的弱有机酸结构,当它进入胃黏膜细胞时,会产生大量氢离子,从而增加胃蛋白酶活性,导致胃溃疡加重。当小鼠接受治疗后,即利用 TLR4-IN-C34 抑制 TLR4 的表达后,显著改善了吡啶美辛对 PGE2 的负面影响,从而改善胃黏膜炎症反应和炎症损伤并抑制胃溃疡的形成。提示恢复 PGE2 水平可能是 TLR4-IN-C34 有效预防和缓解吡啶美辛诱导的胃溃疡以及炎症反应的部分原因。

氧化应激在吡啶美辛致溃疡中发挥重要作用:吡啶美辛诱导 ROS 过量生成,耗竭 SOD、GSH 等抗氧化因子,增加 MDA、AOPP 等氧化产物,反映组织损伤^[12]。本实验中模型组 SOD 与 GSH 下降,MDA 与 AOPP 上升,TLR4 抑制可逆转这些变化,表明抑制 TLR4 能降低吡啶美辛引起的氧化应激。关于 Nrf2 通路,Nrf2 通常与 Keap1 结合并被激活进入细胞核,促进 HO-1、NQO1 表达以调控氧化应激;已报道激活 Nrf2 能保护大鼠胃溃疡^[13]。本研究观察到抑制 TLR4 后细胞核 Nrf2 水平及 HO-1、NQO1 表达下降;且在抑制 TLR4 条件下再次用 H₂O₂ 诱导氧化应激,会削弱 TLR4 抑制的保护作用并加重炎症,提示 TLR4 抑制通过影响氧化应激相关通路参与保护。

细胞自噬通过降解受损细胞器与错误折叠蛋白维持细胞稳态,在胃溃疡的发生与愈合中具有重要作用^[7]。增强自噬可减轻氧化应激与炎症、促进修复^[14]。吡啶美辛可显著抑制模型中的自噬水平^[7],而 TLR4 被证明可抑制胶质细胞及胃癌细胞中的自噬^[8]。本研究证实模型组 LC3-II/I、Atg5、Beclin-1 等自噬指标下降,TLR4 抑制后这些指标显著上调。在 TLR4 抑制的基础上给予特异性自噬抑制剂 3-MA^[15]可抑制自噬并逆转 TLR4 抑制带来的保护,胃溃疡加重且炎症增加,支持 TLR4 抑制通过促进自噬发挥保护作用。

本研究存在一定局限性。① 模型和样本量的局限性:样本量较小且模型诱导单一,吡啶美辛诱导的小鼠胃溃疡模型在一定程度上能模拟人类胃溃疡的病理过程,但与人类疾病仍存在一定差异,结果的外推性可能有限,未来仍需要扩大样本量并建立多种不同类型的胃溃疡模型进行验证;② TLR4 抑制剂局限性:研究中主要使用 TLR4-IN-C34 作为 TLR4 抑制剂,未探讨其他 TLR4 抑制剂的效果,可能影响结果的普适性,未来仍需要讨论其他 TLR4 抑制剂对胃溃疡的治疗效果;③ 机制研究不足:虽然研究探讨了 TLR4 抑制对自噬和氧化应激的影响,但具体的自噬相关分子机制和信号通路仍需进一步深入研究。

综上所述, TLR4 在吡啶美辛诱导下表达上调, TLR4-IN-C34 抑制 TLR4 的表达从而减轻胃组织的炎症损伤和氧化应激反应, 并上调自噬水平, 增强胃组织的抗氧化活性, 重建胃黏膜屏障。提示 TLR4 可能是治疗胃溃疡的一个潜在靶点, 抑制 TLR4 可以通过促进细胞自噬和减少氧化应激, 显著改善胃溃疡的症状。

参考文献

- [1] Masoudpour H, Wassef J, Saladziute S, et al. Surgical therapy of gastric ulcer disease[J]. Surg Clin North Am, 2025, 105(1): 173-86. doi:10.1016/j.suc.2024.06.013.
- [2] Gong H, Zhao N, Zhu C, et al. Treatment of gastric ulcer, traditional Chinese medicine may be a better choice[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117793. doi:10.1016/j.jep.2024.117793.
- [3] AlKreathy H M, Alghamdi M K, Esmat A. Tetramethylpyrazine ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer in rats: impact on oxidative, inflammatory, and angiogenic machineries[J]. Saudi Pharm J, 2020, 28(8): 916-26. doi:10.1016/j.jsps.2020.06.012.
- [4] da Luz B B, Maria-Ferreira D, Dallazen J L, et al. Effectiveness of the polyphenols-rich *Sedum dendroideum* infusion on gastric ulcer healing in rats: roles of protective endogenous factors and antioxidant and anti-inflammatory mechanisms[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114260. doi:10.1016/j.jep.2021.114260.
- [5] 乔亚琴, 沈海涛, 董 萍, 等. TLR4 调节炎症反应和自噬影响对乙酰氨基酚肝损伤后的肝细胞再生 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(10): 1689-95. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.001.
- [5] Qiao Y Q, Shen H T, Dong P, et al. TLR4 affects hepatocyte regeneration after acetaminophen-induced injury by modulating inflammatory response and autophagy[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(10): 1689-95. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.001.
- [6] Lin K, Deng T, Qu H, et al. Gastric protective effect of *Alpinia officinarum* flavonoids: mediating TLR4/NF- κ B and TRPV1 signalling pathways and gastric mucosal healing[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 50-60. doi:10.1080/13880209.2022.2152058.
- [7] Balaha M F, Almalki Z S, Alahmari A K, et al. AMPK/mTOR-driven autophagy & Nrf2/HO-1 cascade modulation by amentoflavone ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113200. doi:10.1016/j.biopha.2022.113200.

- [8] Zhang Q, Dan J, Meng S, et al. TLR4 inhibited autophagy by modulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Gastric cancer cell lines[J]. *Gene*, 2023, 876: 147520. doi:10.1016/j.gene.2023.147520.
- [9] Abdelsalam H M, Helal M G, Abu-Elsaad N M. TLR4-IN-C34 protects against acute kidney injury *via* modulating TLR4/MyD88/NF- κ B axis, MAPK, and apoptosis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(11): 1334-40. doi:10.22038/IJBMS.2022.67168.14727.
- [10] Chen Y, Li D, Sun L, et al. Pharmacological inhibition of toll-like receptor 4 with TLR4-IN-C34 modulates the intestinal flora homeostasis and the MyD88/NF- κ B axis in ulcerative colitis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 934: 175294. doi:10.1016/j.ejphar.2022.175294.
- [11] Zhao Z, Wei G, Wang L, et al. Pretreatment with Dan-Shen-Yin granules alleviates ethanol-induced gastric mucosal damage in rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis *via* Akt/Nrf2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155866. doi:10.1016/j.phymed.2024.155866.
- [12] Ermis A, Aritici Colak G, Acikel-Elmas M, et al. Ferulic acid treats gastric ulcer *via* suppressing oxidative stress and inflammation[J]. *Life*, 2023, 13(2): 388. doi:10.3390/life13020388.
- [13] El Badawy S A, Ogaly H A, Abd-Elsalam R M, et al. Benzyl isothiocyanates modulate inflammation, oxidative stress, and apoptosis *via* Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways on indomethacin-induced gastric injury in rats[J]. *Food Funct*, 2021, 12(13): 6001-13. doi:10.1039/d1fo00645b.
- [14] Ahmed M A E, Mohanad M, Ahmed A A E, et al. Mechanistic insights into the protective effects of chlorogenic acid against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: modulation of the cross talk between autophagy and apoptosis signaling[J]. *Life Sci*, 2021, 275: 119370. doi:10.1016/j.lfs.2021.119370.
- [15] Jiang H, Xie Y, Lu J, et al. Pristimerin suppresses AIM2 inflammasome by modulating AIM2-PYCARD/ASC stability *via* selective autophagy to alleviate tendinopathy[J]. *Autophagy*, 2024, 20(1): 76-93. doi:10.1080/15548627.2023.2249392.