

# 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<sup>1</sup>, 翡罗热·地里夏提<sup>1</sup>, 轩秋云<sup>2</sup>

(新疆医科大学第六附属医院<sup>1</sup>消化内科、<sup>2</sup>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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。除对照组外,每组均用40 mg/kg 吡啶美辛灌胃,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 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、晚期氧化蛋白产物(AOPP)、前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)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)、LC3-II、自噬相关蛋白5(Atg5)、自噬调节蛋白Beclin-1(Beclin-1)和细胞核因子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 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平均上调,而胃组织LC3-II荧光强度、PGE<sub>2</sub>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 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平均下调,而胃组织LC3-II荧光强度、PGE<sub>2</sub>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 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平均上调,而胃组织LC3-II荧光强度、PGE<sub>2</sub>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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组的溃疡评分、HE染色评分、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平均上调,而PGE<sub>2</sub>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。

**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** R 573.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2026)01-0030-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.006

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<sup>[1-2]</sup>。其发病涉及幽门螺杆菌感染、非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)使用(全球约43%人群规律用药,30%出现胃肠道并发症<sup>[1-2]</sup>)、胃酸异常及黏膜保护机制受损等多因素相互作用<sup>[1]</sup>。NSAIDs(如吡啶美辛)通过刺激胃酸分泌和抑制前列腺素E<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)合成双重机制损伤胃黏膜<sup>[3]</sup>,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<sup>[4]</sup>,亟需开发新疗法。研究<sup>[5-6]</sup>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。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。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)<sup>[7-8]</sup>,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。该研究通过吡啶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 $\pm$ 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

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

com

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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(microtubule-associated protein 1 light chain 3, 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吲哚(diaminidine phenyl indole, DAPI)均购自英国Abcam公司;白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ , IL-6, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor Alpha, TNF- $\alpha$ ),高级氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP),PGE<sub>2</sub>,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;吲哚美辛购自美国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吲哚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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(模型诱导基础上用20 mg/kg的TLR4-IN-C34联合12.5 mg/kg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 °C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、PGE<sub>2</sub>和炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ )。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 °C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  $\mu$ 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  $\mu$ g),95 °C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 °C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ImageJ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%脱脂奶粉中室温封闭1 h,Nrf2(1:500)、HO-1(1:500)、NQO1(1:800)、Lamin B1(1:5 000)的一抗在4 °C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ImageJ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 °C

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。 $P < 0.05$  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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、1B。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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组的 HE 染色评分增高,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见图 1C、1D。

**2.2 抑制 TLR4 对各组小鼠血清生化指标的影**

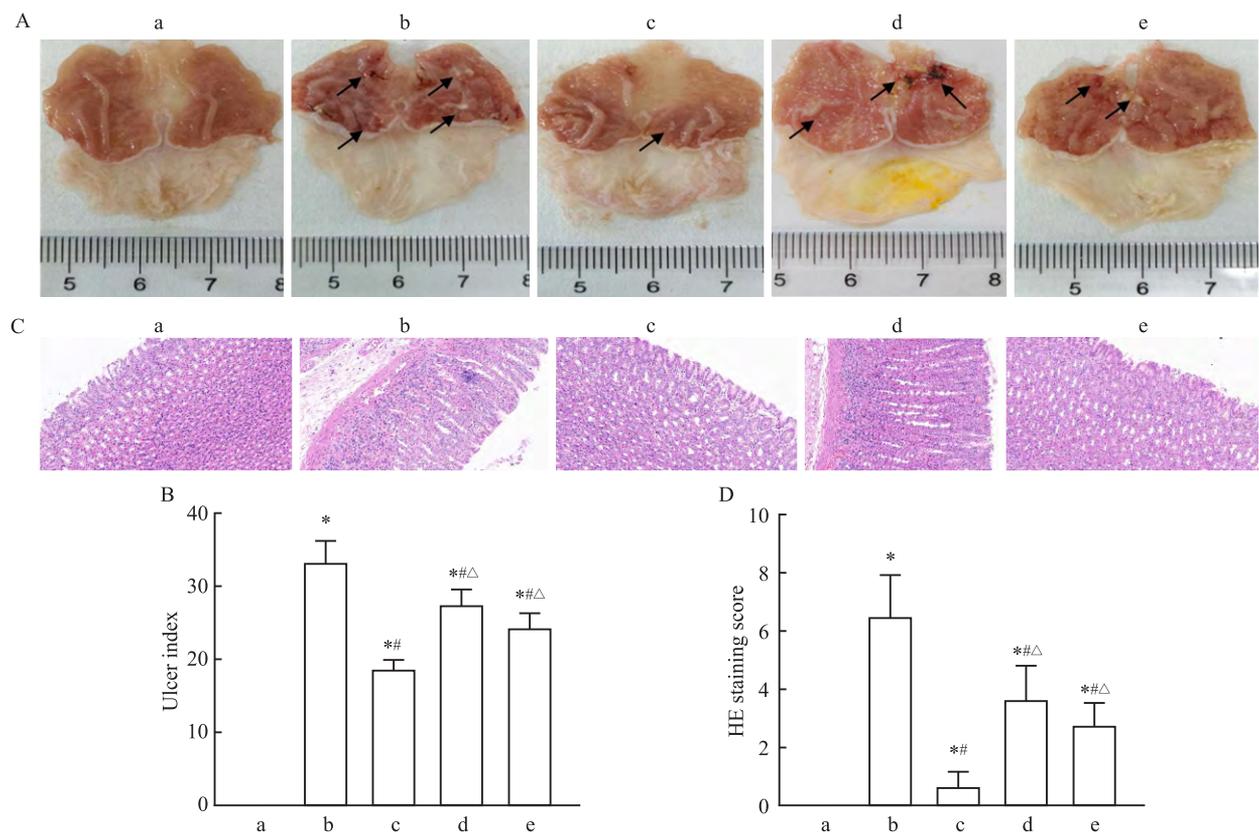


图 1 抑制 TLR4 对各组小鼠胃组织病理的影响

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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; \* $P < 0.05$  vs Control group; \*\* $P < 0.05$  vs Model group; Δ $P < 0.05$  vs Model+TLR4-IN-C34 group.

响 各组间TLR4的蛋白表达水平差异均有统计学意义( $F=603.452, P<0.001$ )。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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组蛋白相对水平的变化均无统计学意义。见图2。

与对照组比,模型组的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、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 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平降低,而PGE2含量升高,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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、AOPP水平明显升高,而PGE2含量明显下降,差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )。见表1。

**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 $P<$

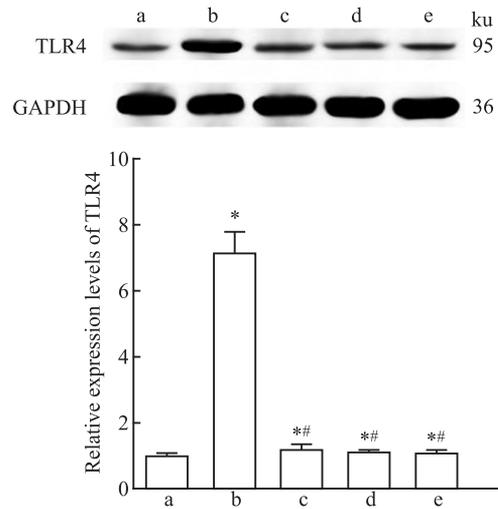


图2 各组胃组织中TLR4蛋白的Western blot结果  
Fig. 2 Western blot results of TLR4 protein in gastric tissues of each group

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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; \* $P < 0.05$  vs Control group; \*\* $P < 0.05$  vs Model group.

0.05);与模型+TLR4-IN-C34组比,模型+TLR4-IN-C34+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。

**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

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

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

Group	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	AOPP ( $\mu$ mol/mL)	PGE2 (ng/mL)
Control	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	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-C34	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**
Model+TLR4-IN-C34+3-MA	46.98 $\pm$ 0.12** $\Delta$	104.56 $\pm$ 9.31** $\Delta$	102.77 $\pm$ 6.20** $\Delta$	67.08 $\pm$ 7.45** $\Delta$	154.12 $\pm$ 0.38** $\Delta$
Model+TLR4-IN-C34+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43.77 $\pm$ 0.28** $\Delta$	100.25 $\pm$ 7.08** $\Delta$	96.33 $\pm$ 7.18** $\Delta$	62.18 $\pm$ 6.42** $\Delta$	149.77 $\pm$ 11.36** $\Delta$
F value	15.384	28.737	55.912	5.238	63.487
P value	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001

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

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 ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Group	MDA	SOD	GSH
Control	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10
Model	3.55 $\pm$ 0.25*	0.25 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.06*
Model+TLR4-IN-C34	1.82 $\pm$ 0.26**	0.83 $\pm$ 0.09**	0.86 $\pm$ 0.05**
Model+TLR4-IN-C34+3-MA	1.79 $\pm$ 0.18**	0.81 $\pm$ 0.10**	0.83 $\pm$ 0.09**
Model+TLR4-IN-C34+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.73 $\pm$ 0.31** $\Delta$	0.33 $\pm$ 0.05** $\Delta$	0.28 $\pm$ 0.03** $\Delta$
F value	48.927	61.473	72.385
P value	<0.001	<0.001	<0.001

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

学意义 ( $F=56.291, 39.482, 75.635$ ; 均  $P<0.001$ )。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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

**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  $P<0.001$ )。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 ( $P<0.05$ );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 ( $P<0.05$ );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 ( $P<0.05$ )。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降低,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ )。见图 5。

### 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<sup>[9]</sup>。研究<sup>[9]</sup>表明,TLR4 通过 MyD88/NF- $\kappa$ B 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<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>,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 预防和缓解吡啶美辛诱导的胃溃疡以及炎症反应的原因之一。

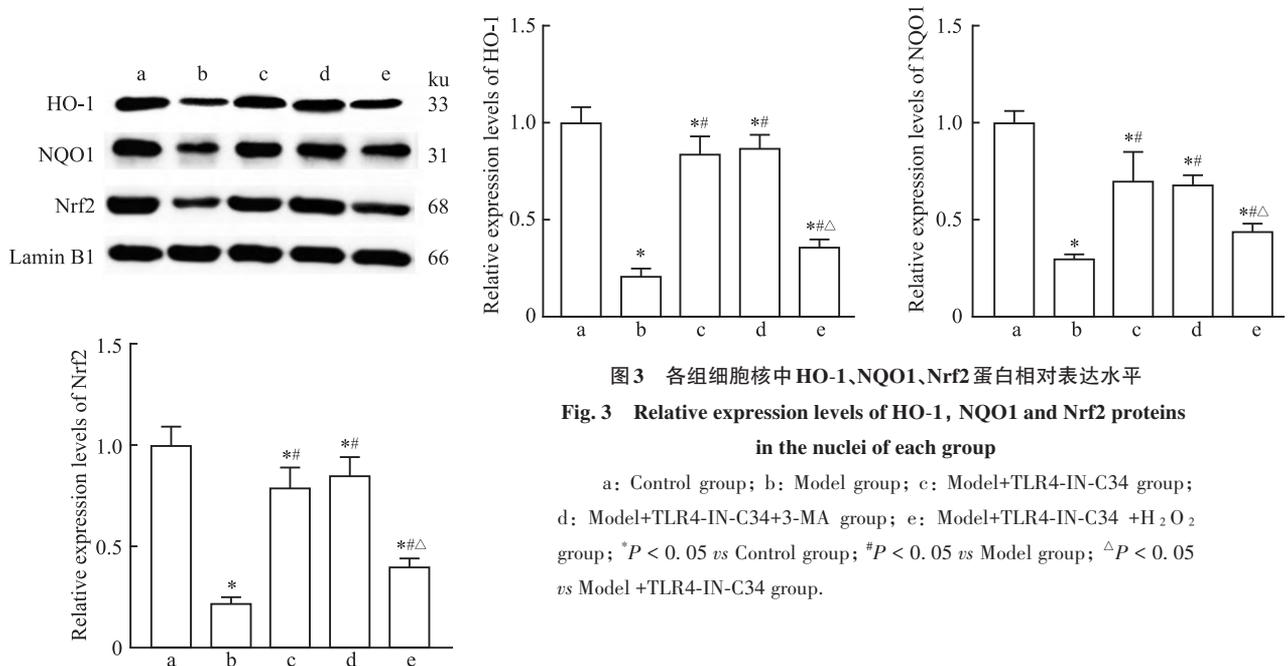


图3 各组细胞核中HO-1、NQO1、Nrf2蛋白相对表达水平

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 +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; \* $P < 0.05$  vs Control group; # $P < 0.05$  vs Model group; Δ $P < 0.05$  vs Model +TLR4-IN-C34 group.

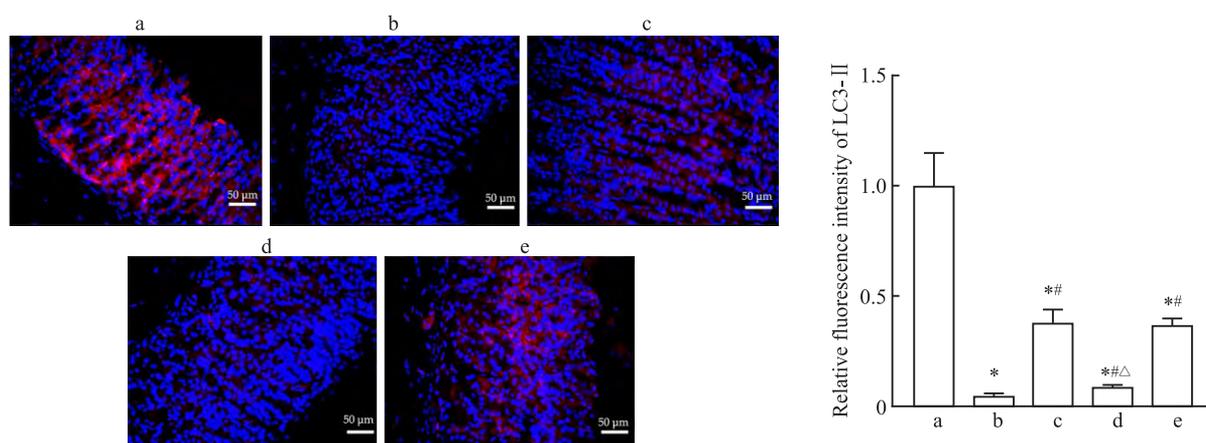


图4 各组胃组织中LC3-II的荧光强度的比较 ×200

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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; \**P* < 0.05 vs Control group; #*P* < 0.05 vs Model group; Δ*P* < 0.05 vs Model +TLR4-IN-C34 group.

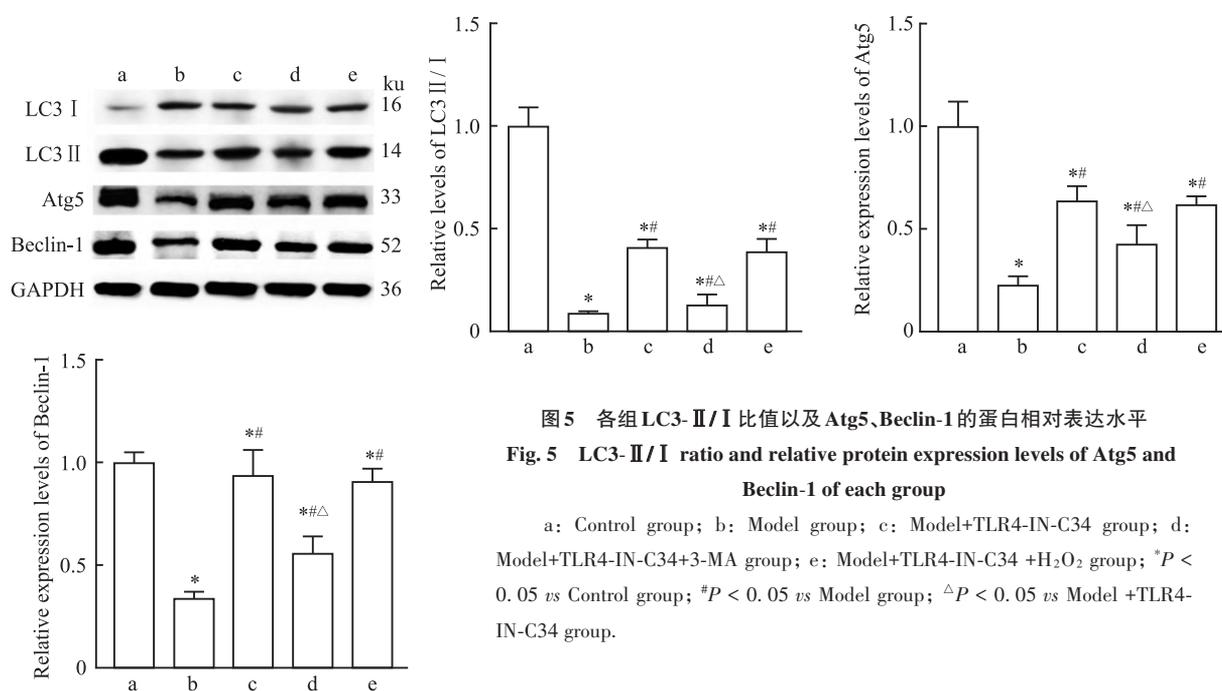


图5 各组LC3-II/I比值以及Atg5、Beclin-1的蛋白相对表达水平

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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; \**P* < 0.05 vs Control group; #*P* < 0.05 vs Model group; Δ*P* < 0.05 vs Model +TLR4-IN-C34 group.

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<sup>[12]</sup>。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<sup>[13]</sup>。本研究观察到抑制 TLR4 后细胞核 Nrf2 水平及 HO-1、NQO1 表达上升; 且在抑制 TLR4 条件下再次用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>[7]</sup>。增强自噬可减轻氧化应激与炎症、促进修复<sup>[14]</sup>。吡啶美辛可显著抑制模型中的自噬水平<sup>[7]</sup>, 而 TLR4 被证明可抑制胶质细胞及胃癌细胞中的自噬<sup>[8]</sup>。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<sup>[15]</sup> 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;②TLR4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的表达能够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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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, Aratici 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- $\kappa$ 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.

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

Du Jinxuan<sup>1</sup>, Feiluore Dilixiati<sup>1</sup>, Xuan Qiuyun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, <sup>2</sup>Department 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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 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), 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group showed upregulation of ulcer scores, HE staining scores, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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.

**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