

酱香型白酒寡肽抗 Hp 感染胃黏膜上皮细胞炎性损伤的作用

关祉成, 马燕飞, 林沛纯, 曾传玲, 刘杰, 刘晓宇*

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所 广东深圳 518060)

摘要 目的:探讨酱香型白酒中寡肽类成分(JOPs)缓解由幽门螺杆菌(Hp)感染导致的胃黏膜上皮细胞炎性损伤的活性及其分子机制。方法:分离酱香型白酒中 JOPs 并鉴定其氨基酸序列。以 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞(GES-1)构建炎性损伤模型。用 CCK 8 法检测 JOPs 对 GES-1 细胞活力的影响;ELISA 法检测 JOP-1 对 Hp 感染的 GES-1 细胞炎性因子分泌的影响;Western blotting 检测 JOP-1 对 Hp 感染的 GES-1 细胞 NF- κ B 信号通路及环加氧酶-2(COX-2)、一氧化氮合成酶(iNOS)蛋白表达的影响。结果:寡肽 JOP-1(Phe-Trp-His-Gly)能够显著提高 GES-1 细胞活力,抑制 Hp 感染导致的 GES-1 细胞活力降低;JOP-1 能够显著抑制 Hp 感染导致的 GES-1 细胞炎性因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、PGE2 及 NO)过量分泌;同时,JOP-1 能够抑制 Hp 感染导致的 GES-1 细胞 NF- κ B 信号通路激活,抑制 COX-2、iNOS 蛋白过表达。结论:酱香型白酒中寡肽类成分能够缓解 Hp 感染导致的胃黏膜上皮细胞炎性损伤,可通过调控 NF- κ B 信号通路抑制炎性因子过量分泌和炎症相关合成酶的表达,发挥保护活性。

关键词 酱香型白酒;活性寡肽;幽门螺杆菌;NF- κ B

文章编号 1009-7848(2024)09-0122-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.012

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种有害微生物,主要定植于胃部和十二指肠,被 Hp 感染后易诱发胃炎和胃溃疡^[1-2]。研究显示,15%~20%的慢性胃炎可能发展为胃溃疡,而超过 1%的胃溃疡有发展成为胃癌的风险。预防和治疗 Hp 感染引起的慢性胃炎和胃溃疡具有重要的研究意义。目前临床上治疗 Hp 感染的主流方案仍为多种抗生素联合治疗,由于耐药性和药物副作用导致 Hp 的治疗效果不佳^[3],因此开发一种新的用于治疗 Hp 感染的药物是目前亟待解决的问题。

白酒是由谷物经发酵等工序获得的天然复合物。在中医范畴,白酒具有活血通脉、消除疲劳、健脾胃的功效^[4]。现代研究表明,白酒中含有多种抗炎物质,如有机酸、酚类及萜类化合物等^[5]。广泛存在于自然界的寡肽类化合物却鲜有从白酒中分离获得,其活性的报道较少。

寡肽作为一种重要的活性小分子具有优良的抗炎功能,如 IQW(Ile-Gln-Trp)和 IRW(Ile-Arg-Trp)可以抑制腹泻炎症^[6],线粒体靶向肽 SS-31 对于气道炎症和神经炎症均具有突出的疗效^[7-8]。人类对于寡肽的摄入主要通过食物获取,而针对寡

肽对胃黏膜的功能研究鲜有报道。

本试验通过构建 Hp 感染的人胃黏膜上皮细胞(human gastric mucosal epithelial cells, GES-1)建立体外炎性损伤模型,评价从酱香型白酒中分离获得的活性寡肽类化合物的保护活性,分析其发挥保护活性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酱香型白酒,贵州茅台集团。Hp 菌株,呈现出单极、多鞭毛、末端钝圆、螺旋形弯曲的特征(美国 ATCC 细胞库,批号 700835);来源于胎儿正常胃黏膜上皮细胞(GES-1),细胞基本保留了正常的细胞骨架结构,同时黏蛋白反应阳性(中国科学院上海细胞生物研究所);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),杭州四季青生物技术有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 8(interleukin 8, IL-18)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、一氧化氮(nitric oxide, NO)炎性细胞因子检测试剂盒,四正柏生物科技有限公司;细胞裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、Trizol 试剂,碧云天生物技术研究所;人核因子 KB 抑制蛋白激酶亚

收稿日期:2023-09-21

第一作者:关祉成,女,本科生

通信作者:刘晓宇 E-mail: lxy0901@szu.edu.cn

基 β (human inhibitor of KB kinase beta, IKK β)、磷酸化人核因子 KB 抑制蛋白激酶亚基 β (phosphorylated human inhibitor of KB kinase beta, p-IKK β)、核因子抑制蛋白 (inhibitor kappa B alpha, I κ B α)、磷酸化核因子抑制蛋白 (phosphorylated inhibitor kappa B alpha, p-I κ B α)、NF- κ B p65 (RelA)、环加氧酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体, 赛信通(上海)生物试剂有限公司; 本研究使用的其它试剂均为分析纯或标准品, 阿拉丁试剂有限公司。

INCO2108 型细胞培养箱, 德国美墨尔特 (Mettler) 有限公司; SW-CJ-IC 型超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; SCIEX500R Q-TOF 质谱仪, 美国珀金埃尔默股份有限公司; 高效液相色谱, 美国 Waters 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 JOPs 分离及氨基酸序列分析 1 000 mL 分液漏斗中加入 500 mL 酱香型白酒、100 mL 水和 250 mL 氯仿, 摇匀, 分离氯仿层, 重复 4 次。用旋转蒸发器(10℃)除去氯仿获得化合物。参照文献方法^[9], 依次经过超滤色谱法、疏水色谱法、阴离子交换色谱法和凝胶过滤色谱法逐步分离具有最佳保护活性的部分, 最终经过 RP-HPLC 法制备出所有具有保护活性的寡肽。SCIEX500R Q-TOF 质谱仪(美国 Framingham)进行 HPLC-ESI-MS 分析 JOP-1~9 的氨基酸序列, 质谱条件: ESI 源质量范围设为 m/z 50~1 500, 以正离子模式采集 Q-TOF-MS 数据; MS 分析条件: CAD 气体流量 7 L/min; 干燥气体温度, 550℃; 离子喷涂电压, 5 500 V; 去聚电位, 80 V。软件生成的数据文件: SCIEX OS 1.0。

1.2.2 GES-1 细胞培养 GES-1 细胞接种于 10% FBS、100 U/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素的 DMEM (高糖) 培养基中 (pH 7.2), 37℃、5% CO₂ 的湿润环境中培养, 培养液隔日更换。

GES-1 细胞接种含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的培养皿培养 24 h, 贴壁生长至 80%。无菌 PBS 液重悬 Hp, 通过测定 A_{600} 吸光度值并用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整至菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL 备用。

A、空白组; Hp 感染组: 将细胞以一定密度接种在培养板中, 待细胞贴壁后, 加入 100 倍的细菌共培养 24 h; **JOP-X 组:** 将细胞以一定密度接种在培养板中, 待细胞贴壁后, 加入 100 倍的细菌共培养 24 h, 冷 PBS 清洗 2 次, 去除细菌, 加入含 JOP-X (2 mg/mL) 的 DMEM 培养基继续培养 12 h ($X=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$)。

B、空白组; Hp 感染组: 将细胞以一定密度接种在培养板中, 待细胞贴壁后, 加入 100 倍的细菌共培养 24 h; 根据文献报道的寡肽的有效浓度^[10-11], 将 JOP-1 分为两组, 分别为低浓度组 (JOP-1-D) 和高浓度组 (JOP-1-G), JOP-1-D 组: 将细胞以一定密度接种在培养板中, 待细胞贴壁后, 加入 100 倍的细菌共培养 24 h, 冷 PBS 清洗 2 次, 去除细菌, 加入含 JOP-1 (2 mg/mL) 的 DMEM 培养基继续培养 12 h; JOP-1-G 组: 细菌、细胞比为 100:1 共培养 24 h, 收集细胞, 冷 PBS 清洗 2 次, 加入含 JOP-1 (5 mg/mL) 的 DMEM 培养基继续培养 12 h。

1.3 CCK8 检测 JOPs 对细胞活力的影响

将 GES-1 细胞接种在 96 孔板中, 每孔接种 1×10^5 个细胞, 待细胞贴壁后, 参考 1.2.2 节 GES-1 细胞培养试验方法处理, 并按照 CCK 8 试剂盒说明书检测 GES-1 细胞活力。

1.4 JOP-1 对细胞炎性因子分泌影响

将 GES-1 细胞接种在 6 孔板中, 每孔接种 1×10^6 个细胞, 待细胞贴壁后, 参考 1.2.2 节 GES-1 细胞培养 B 试验方法处理, 随后收集细胞培养液, ELISA 试剂盒检测 JOP-1 对 Hp 诱导的 GES-1 细胞培养上清液中炎性细胞因子 (TNF- α 、PGE2、IL-2、IL-6、IL-18、IL-1 β 、NO) 分泌量的变化。

1.5 JOP-1 对细胞 NF- κ B 信号通路相关蛋白、COX-2 及 iNOS 表达的影响

将 GES-1 细胞接种在 6 孔板中, 细胞密度为 1×10^6 /孔, 待细胞贴壁后, 参考 1.2.2 节细胞培养及试验分组 B 试验方法处理, 随后收集细胞, 按照胞浆和胞核蛋白提取试剂盒说明书介绍的方法提取总蛋白、胞浆和胞核蛋白, 采用 BCA 法对蛋白进行浓度定量、SDS-PAGE 电泳、每孔上样量 20 μ g, 电泳、转膜、封闭。后按照检测目的分别加入 IKK β 、p-IKK β 、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、COX-2、iNOS 一抗, 4℃孵育过夜, 洗膜后加入二抗室温

孵育 2 h。洗去二抗后,加入曝光液进行曝光,并运用凝胶成像系统对免疫印迹进行成像。Image J 软件分析条带的灰度值。

1.6 数据处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计,阴性对照和阳性对照采用独立样本 *t* 检验,对 JOP 处理效应进行回归分析。 $P<0.05$ 定为具有显著性差异(相比于空白对照组,## $P<0.05$,### $P<0.01$;相比于 Hp 组,* $P<0.05$,** $P<0.01$),试验均重复 3 次,结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 JOPs 的分离鉴定

本试验中,从 500 mL 酱香型白酒中分离获得 9 种寡肽类化合物,解析 ESI-MS 数据及结合 Edman 降解法,最终,寡肽的氨基酸序列被鉴定,寡肽氨基酸序列及含量见表 1。

2.2 JOPs 提升 GES-1 细胞活力

CCK8 结果显示(图 1a),JOPs 与 GES-1 细胞共培养后,细胞活力有一定的提升。其中,JOP-1、JOP-4、JOP-6、JOP-9 组细胞活力提升最为明显;相比于空白对照组(细胞活力设为 100%),JOP-1、JOP-4、JOP-6、JOP-9 组细胞活力分别提升 13.93% ($P=0.021$),9.80% ($P=0.045$),10.45% ($P=0.046$),11.38% ($P=0.036$)。

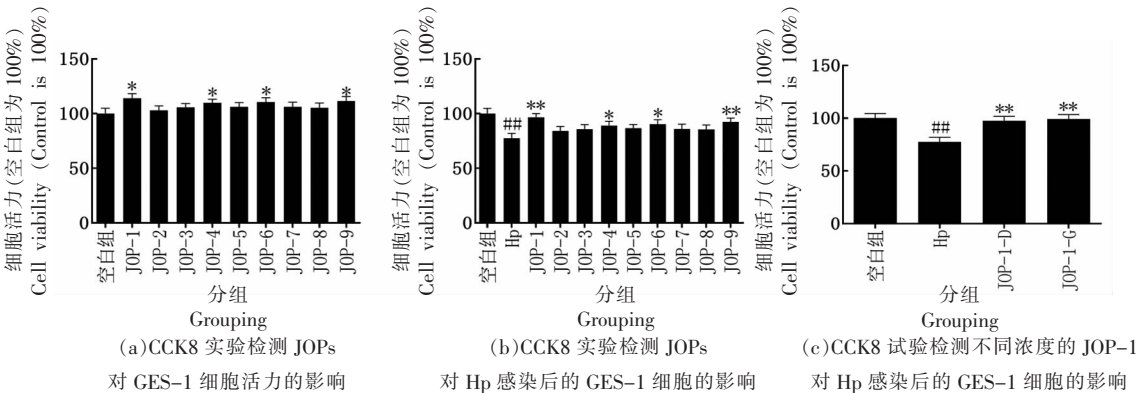
为了进一步的评价 JOPs 的保护活性,利用 JOPs 处理 Hp 感染的 GES-1 细胞,并用 CCK8 试

表 1 JOP-1~9 氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of JOP-1~9		
编号	氨基酸序列	含量/(mg/L)
JOP-1	Phe-Trp-His-Gly	1.13
JOP-2	Glu-Gly-Ala	2.67
JOP-3	Leu-Gly-Val	2.39
JOP-4	His-Lys-Glu	1.99
JOP-5	Gly-Glu-Ala	1.14
JOP-6	Gly-Glu	3.12
JOP-7	Gly-His	3.46
JOP-8	Glu-Val	3.90
JOP-9	Phe-His-Gly-Lys	1.09

JOPs:酱香型白酒中的寡肽。

验检测细胞活性的变化。试验结果显示(图 1b),Hp 感染使细胞活力下降 22.43% ($P=0.004$),说明, Hp 感染损伤 GES-1 细胞,使细胞活力降低。而 JOPs 处理后,GES-1 细胞因 Hp 感染导致的活力降低被抑制。与 Hp 组相比,JOP-1、JOP-4、JOP-6 及 JOP-9 组细胞活力有显著提升。JOP-1、JOP-4、JOP-6 及 JOP-9 处理后,细胞活力分别提高 19.81% ($P=0.005$),11.39% ($P=0.028$),12.76% ($P=0.020$)及 15.13% ($P=0.011$)。据推测,JOP-1、JOP-4、JOP-6 及 JOP-9 能够显著抑制 Hp 感染对 GES-1 细胞的损伤,进而提高细胞活力。进一步分析试验结果显示,JOP-1 提高 GES-1 细胞活力最为显著,保护活性最优,接下来试验以 JOP-1 为代表,研究酱香型白酒中活性寡肽发挥抗 Hp 感染



注:##表示与空白对照组相比极具显著差异($P<0.01$);*表示与 Hp 组相比具有显著差异($P<0.05$);**表示与 Hp 组相比极具显著差异($P<0.01$);结果均以平均值 \pm 标准差($n=3$)表示。

图 1 JOPs 提升 GES-1 细胞活力
Fig.1 JOPs promote GES-1 cell viability

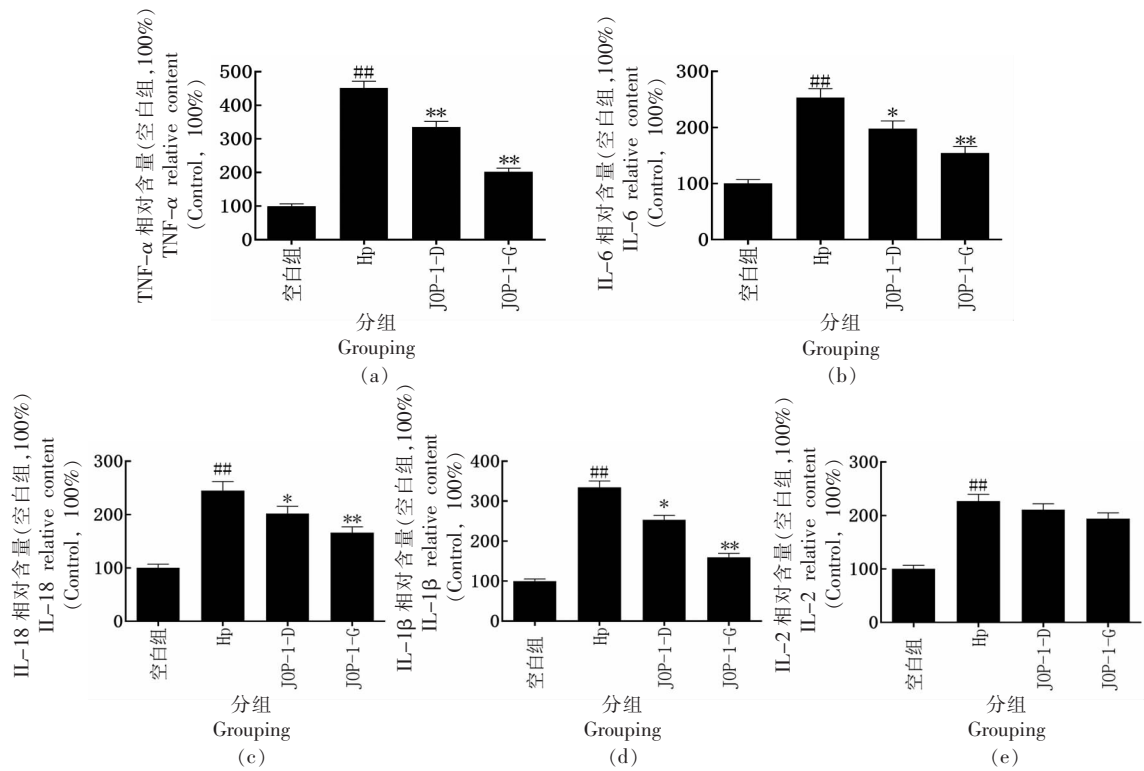
导致的细胞活力降低的潜在分子机制。

进一步评价 JOP-1 的保护活性试验结果显示 (图 1c),JOP-1 能够提升 Hp 感染导致的 GES-1 细胞活力。相比于 Hp 组,JOP-1 处理后,GES-1 细胞活力分别提高 20.04% ($P=0.004$)、21.67% ($P=0.003$)。

2.3 JOP-1 抑制 Hp 感染导致的 GES-1 细胞炎症因子过量分泌

研究表明,Hp 感染的患者,其血清和呼出的凝气液中的 IL-6 水平均显著增高^[12-13];在细胞水平上,Hp 同样会导致 IL-6 的过量分泌,Hp 感染导致的炎症与 IL-6 水平密切相关^[14],因此本研究首先以 IL-6 的水平为标准,GES-1 细胞经过 Hp 感染后,其 IL-6 的水平显著增高($P=0.000$),表明 Hp 感染 GES-1 细胞的体外炎症模型构建成功

(如图 2a)。随后,研究了 JOP-1 对 Hp 感染的 GES-1 细胞炎症因子过量分泌的抑制结果 (如图 2b、2c、2d、2e、2f),与空白对照组(炎症因子含量设为 100%) 比较,Hp 感染使 GES-1 细胞炎症因子分泌显著增加。说明 Hp 感染导致 GES-1 细胞炎症,诱发细胞炎症因子分泌增加。相比于空白对照组,Hp 感染组 TNF- α 、IL-6、IL-18、IL-1 β 、IL-2 含量分别增加 351.24% ($P=0.000$)、152.41% ($P=0.000$)、245.09% ($P=0.000$)、234.75% ($P=0.000$)、127.23% ($P=0.000$)。而 JOP-1 处理后,相比于 Hp 组,JOP-1-G 组 TNF- α 、IL-6、IL-18、IL-1 β 、IL-2 含量降低 55.43% ($P=0.000$)、39.12% ($P=0.000$)、32.18% ($P=0.001$)、52.35% ($P=0.000$)及 8.55%。Hp 感染诱发的细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-18 及 IL-1 β 过量分泌被显著抑制。



注:## 表示与空白对照组相比极具显著差异 ($P<0.01$);* 表示与 Hp 组相比具有显著差异 ($P<0.05$),** 表示与 Hp 组相比极具显著差异 ($P<0.01$),结果均以平均值 \pm 标准差 ($n=3$)表示。

图 2 JOP-1 抑制 Hp 感染导致的 GES-1 细胞炎症因子过量分泌

Fig.2 JOP-1 attenuates Hp-induced inflammatory epithelial cytokines over-expression

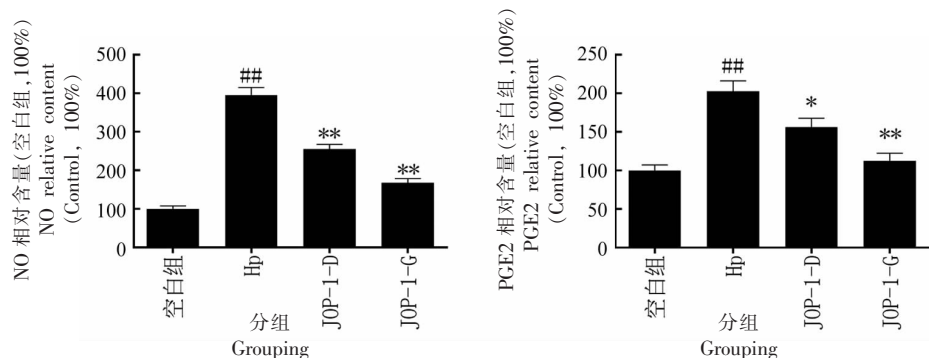
2.4 JOP-1 抑制 Hp 感染诱导的 GES-1 细胞 NO、PGE2 过量分泌

NO 和 PGE2 作为炎症的重要介质,在体内分

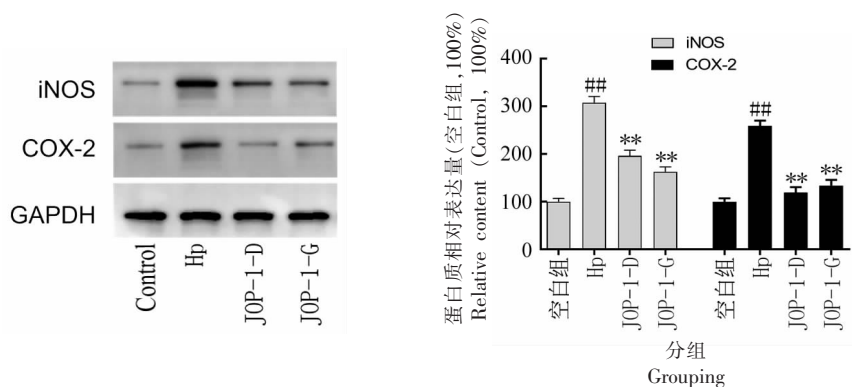
别是由 iNOS 和 COX-2 合成酶合成^[15],在人类的多种炎症模型中起到重要作用^[16]。因此本试验检测了 JOP-1 对 Hp 感染的 GES-1 细胞分泌 NO、

PGE2的影响,结果如图3a所示。Hp感染使GES-1细胞NO、PGE2分泌显著增加,进一步说明,Hp感染导致GES-1细胞炎症,损伤细胞。相比于空白对照组,Hp感染组NO、PGE2含量增加295.14%($P=0.000$)、102.47%($P=0.000$)。而JOP-1处理后,相比于Hp组,JOP-1-G组NO、PGE2含量分别降低57.84%($P=0.000$)、44.62%($P=0.001$)。

进一步的,我们检测了JOP-1对Hp感染的GES-1细胞中NO、PGE2合成酶、iNOS、COX-2蛋白表达影响,结果如图3b所示。Hp感染使GES-1细胞iNOS、COX-2蛋白表达显著增加;而JOP-1处理后,相比于Hp组,JOP-1-G组iNOS、COX-2蛋白高表达被显著抑制。



(a)ELISA 检测 GES-1 细胞分泌 NO、PGE2 的水平变化



(b)WB 检测 GES-1 细胞中 iNOS 和 COX-2 的表达量的变化

注:Hp:幽门螺杆菌;iNOS:诱导型一氧化氮合酶;COX-2:环氧化酶-2;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;##表示与空白对照组相比极具显著差异($P<0.01$);*表示与Hp组相比具有显著差异($P<0.05$);**表示与Hp组相比极具显著差异($P<0.01$),结果均以平均值 \pm 标准差($n=3$)表示。

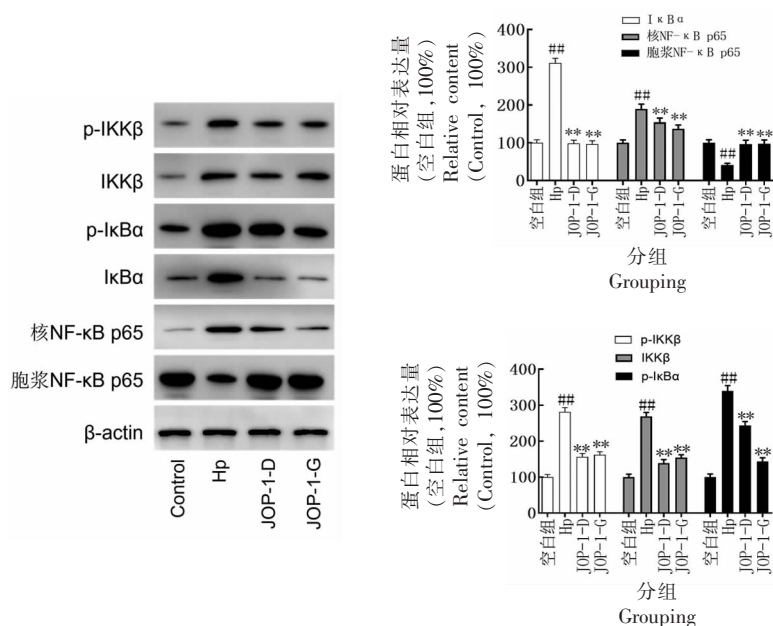
图3 JOP-1抑制Hp诱导的GES-1细胞iNOS、COX-2蛋白过表达

Fig.3 JOP-1 inhibits Hp-induced iNOS、COX-2 over-expression

2.5 JOP-1抑制Hp诱导的GES-1细胞NF- κ B信号通路激活

NF- κ B信号通路是炎症的经典信号通路,同时定植于胃黏膜上的Hp释放的毒性因子会影响胃黏膜上皮细胞骨架重排,进而激活NF- κ B通路,诱导促炎因子的表达和释放,最终导致胃上皮细胞损伤、凋亡^[17]。因此,本研究中,我们还检测了JOP-1对Hp暴露诱导的GES-1细胞中NF- κ B信号通路相关蛋白表达的变化,结果如图4所示。

与空白组相比,Hp组GES-1细胞p-IKK β 、p-I κ -B α 和胞核中NF- κ B p65蛋白表达显著上调,胞浆NF- κ B p65蛋白表达显著下调($P<0.01$);而与Hp组相比,JOP-1处理后,Hp暴露导致的NF- κ B信号通路蛋白异常表达被显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。因此,JOP-1可能是通过抑制NF- κ B信号通路的激活,从而抑制Hp对GES-1细胞造成的损伤。



注:Hp:幽门螺杆菌;p-IKK β :磷酸化人抑制KB激酶 β ;IKK β :人抑制KB激酶 β ;p-I κ B α :磷酸化蛋白抑制剂 κ B α ;I κ B α :蛋白抑制剂 κ B α ;##表示与空白对照组相比极具显著差异($P<0.01$);*表示与Hp组相比具有显著差异($P<0.05$),**表示与Hp组相比极具显著差异($P<0.01$);结果均以平均值 \pm 标准差($n=3$)表示。

图4 JOP-1抑制Hp诱导的GES-1细胞NF- κ B信号通路激活

Fig.4 JOP-1 inhibits Hp-induced NF- κ B signal pathway activation

3 讨论

Hp感染会降低胃黏液黏蛋白含量、破坏黏液离子完整性、破坏胃黏膜屏障,最终导致胃炎、胃溃疡^[8],是胃癌发生的重要诱因^[9]。研究发现,酱香型白酒中含有多种有机酸、酚类、吡嗪类、氨基酸等活性成分,具有抗炎、促进血液循环等药理活性^[5]。本研究从酱香型白酒中分离获得寡肽类物质,并发现其具有调控NF- κ B信号通路从而抑制Hp感染导致的胃上皮细胞炎症的功能。

定植于胃黏膜上皮的Hp能够通过释放细胞毒素相关基因A(Cytotoxin-associated gene A, CagA)蛋白、空泡毒素相关蛋白A(vacuolating cytotoxin A, VacA)以及尿素酶等蛋白刺激胃黏膜上皮细胞,导致促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等)的表达、释放,进而诱发胃上皮细胞凋亡^[20]。NO是内源性左旋精氨酸在一氧化氮合成酶(NOS)催化下生成的,高浓度的NO往往会诱发细胞及组织损伤;COX-2是环加氧酶的诱导亚型,可以将花生四烯酸转化为前列腺素,是PGE2的合成酶^[15]。研究表明,COX-2在90%以上的胃癌中高表达,并且COX-2高表达的主要诱因是Hp感染,作为一

种重要的炎症因子,COX-2/PGE2通路对于Hp感染后,从胃炎到进展到胃癌的整个过程起到关键的调节作用^[21]。还有研究表明,高浓度的NO还会促进PGE2的产生和其他促炎性细胞因子的释放^[22]。在本研究中,Hp暴露后,GES-1细胞中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、IL-2、NO及PGE2的分泌量显著上升,同时NO和PGE2上游的iNOS和COX-2的表达量也显著上调,这些数据表明,Hp感染会诱发GES-1细胞炎症;而JOP-1处理后可显著逆转上述异常的改变,说明JOP-1抑制Hp感染诱发的GES-1细胞炎症在JOP-1发挥保护活性方面起着重要作用。JOP-1提升细胞活力可能是通过抑制和缓解Hp感染诱发的GES-1细胞炎症性损伤实现的。

研究发现,Hp释放的毒性因子能够激活NF- κ B相关蛋白,进而启动炎症因子基因转录,促进IL-6、TNF- α 等炎症因子分泌,使炎症反应信号传递、级联放大并参与Hp感染导致的胃黏膜损伤^[17]。NF- κ B信号通路激活是Hp感染胃黏膜上皮细胞,产生炎症反应的重要步骤。研究表明,GES-1细胞主要通过Toll样受体2(Toll-like re-

ceptor, TLR2) 识别 Hp, Hp 诱导 TLR2 和 TLR5 的过量表达, 并通过 cag PAI 非依赖的方式激活经典的 NF- κ B 信号通路, 主要途径为 Hp 激活受体, 使得 IKK β 磷酸化, 随后导致 I κ B α 的磷酸化, 磷酸化后的 I κ B α 会从 I κ B α /p65/p50 三聚体中脱离, 从而激活 p65/p50 二聚体入核并激活下游相关基因的转录, 导致炎症因子的转录增强, 诱发炎症。因此, 有效遏制 Hp 感染诱发的胃黏膜损伤可通过抑制 NF- κ B 信号通路激活实现^[23,24]。NF- κ B 信号通路调节近 400 种基因的表达, 其下游蛋白包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种炎症因子, iNOS 和 COX-2 作为重要的炎症相关合成酶也受到 NF- κ B 信号通路严密调节^[25], 是经典的炎症信号通路, 同时也是新型抗炎药的热门靶标, NF- κ B 信号通路被抑制后, 下游的炎症因子的转录均会被抑制, 从而缓解炎症的症状^[26]。本试验中, Hp 暴露使 GES-1 细胞内 NF- κ B 信号通路激活; 而 JOP-1 能够有效抑制 Hp 暴露诱发的 GES-1 细胞 NF- κ B 信号通路激活。可见, JOP-1 发挥抗炎活性, 其作用机制可能与其抑制 Hp 暴露诱发的 GES-1 细胞 NF- κ B 信号通路炎性激活有密切关系。

综上所述, 酱香型白酒中含有的活性寡肽类物质对 Hp 暴露诱导的胃黏膜上皮细胞有保护作用, 其作用机制是通过增强细胞抗炎功能以及抑制 NF- κ B 信号通路炎性激活、抑制炎症因子过量分泌实现的。

参 考 文 献

- [1] GAO H Y, LI G Y, HUANG J, et al. Protective effects of Zhuyeqing liquor on the immune function of normal and immunosuppressed mice *in vivo* [J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 252.
- [2] LIU Q, LAWRENCE A J, LIANG J H. Traditional Chinese medicine for treatment of alcoholism: From ancient to modern [J]. Am J Chin Med, 2011, 39(1): 1-13.
- [3] MEGRAUD F, BRUYNDONCKX R, COENEN S, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe in 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community [J]. Gut, 2021, 70(10): 1815-1822.
- [4] ZHU S K, LU X, JI K L, et al. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2007, 597(2): 340-348.
- [5] 郑岩, 汤庆莉, 吴天祥, 等. GC-MS 法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究 [J]. 中国酿造, 2008(9): 74-76, 91.
ZHEN Y, TANG Q L, WU T X, et al. Study on fingerprint construction of Kweichow Moutai liquor by GC-MS [J]. China Brewing, 2008(9): 74-76, 91.
- [6] LIU N Y, ZHOU L S, FANG J, et al. Effects of IQW and IRW on inflammation and gut microbiota in ETEC-induced diarrhea [J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 2752265.
- [7] YANG D Q, ZUO Q N, WANG T, et al. Mitochondrial-targeting antioxidant SS-31 suppresses airway inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6644238.
- [8] ZHAO W X, XU Z P, CAO J B, et al. Elamipretide (SS-31) improves mitochondrial dysfunction, synaptic and memory impairment induced by lipopolysaccharide in mice [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 230.
- [9] 赵传欣, 李叶婷, 卜凡莉, 等. 枸杞环肽调控 NLRP3 及 NF- κ B 信号通路减轻 BaP 诱导的气道上皮细胞炎性损伤 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 92-99.
ZHAO C X, LI Y T, BU F L, et al. *Lycium barbarum* cyclic peptide regulates NLRP3 and NF- κ B signaling pathways to reduce BaP-Induced inflammatory airway epithelial cell injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 92-99.
- [10] 郭洪辉, 张怡评, 洪专, 等. 河豚鱼皮胶原寡肽螯合锌的体内体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 66-71.
GUO H H, ZHANG Y P, HONG Z, et al. Study on *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity of collagen oligopeptide chelated zinc from puffer skin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 66-71.
- [11] 陈炫宏, 嵇威, 董雷超, 等. 豌豆寡肽对饮食诱导的高血压大鼠血管紧张素转化酶活性及肠道菌群调节效果评价 [J]. 食品科学, 2021, 42(13): 143-150.

- CHEN X H, JI W, DONG L C, et al. Regulatory effects of pea oligopeptides on ace activity and intestinal flora in diet-induced hypertensive rats[J]. Food Science, 2021, 42(13): 143-150.
- [12] YILDIRIM Z, BOZKURT B, OZOL D, et al. Increased exhaled 8-isoprostane and interleukin-6 in patients with helicobacter pylori infection[J]. Helicobacter, 2016, 21(5): 389-394.
- [13] RASOOL K H, MAHMOOD ALUBADI A E, AL-BAYATI I F I. The role of serum interleukin-4 and interleukin-6 in *Helicobacter pylori*-infected patients[J]. Microb Pathog, 2022, 162: 105362.
- [14] TAFRESHI M, GUAN J, GORRELL R J, et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion system and its adhesin subunit, cagI, mediate potent inflammatory responses in primary human endothelial cells[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 22.
- [15] KIM N, KIM C, RYU S H, et al. Anti-Inflammatory effect of sparstolonin B through inhibiting expression of NF- κ B and STAT-1[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10213.
- [16] WEINBERG J B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation [J]. Immunol Res, 2000, 22(2/3): 319-341.
- [17] KIM J E, LEE J Y, KANG M J, et al. Withaferin A inhibits *Helicobacter pylori*-induced production of IL-1 β in dendritic cells by regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation[J]. Immune Netw, 2015, 15(6): 269-277.
- [18] MATSUO Y, KIDO Y, YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(3):101.
- [19] BURUCOA C, AXON A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection[J]. Helicobacter, 2017, 22 Suppl 1:10.1111/hel.12403.
- [20] 李艾虹, 周欢, 何峰, 等. 幽门螺杆菌感染与炎症性肠炎关系及危险因素分析[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(5): 589-592, 596.
- LI A H, ZHOU H, HE F, et al. Analysis of the relationship between helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease and the risk factors[J]. Journal of Chengdu Medical College, 2019, 14(5): 589-592, 596.
- [21] ECHIZEN K, HIROSE O, MAEDA Y, et al. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and toll-like receptor/MyD88 pathways[J]. Cancer Sci, 2016, 107(4): 391-397.
- [22] HISATSUNE J, YAMASAKI E, NAKAYAMA M, et al. *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells[J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4472-4481.
- [23] NAUMANN M, SOKOLOVA O, TEGTMEYER N, et al. *Helicobacter pylori*: A paradigm pathogen for subverting host cell signal transmission[J]. Trends Microbiol, 2017, 25(4): 316-328.
- [24] MAUBACH G, LIM M C C, SOKOLOVA O, et al. TIFA has dual functions in *Helicobacter pylori*-induced classical and alternative NF- κ B pathways[J]. EMBO Rep, 2021, 22(9): e52878.
- [25] AHN K S, AGGARWAL B B. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1056: 218-33.
- [26] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.

The Effect of Oligopeptides from Soy Sauce-Type Baijiu on *Helicobacter pylori*-Induced Inflammatory Damage in Gastric Epithelial Cells

Guan Zhicheng, Ma Yanfei, Lin Peichun, Zeng Chuanling, Liu Jie, Liu Xiaoyu*

(Institute of Allergic Reactions and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong)

Abstract Objective: To investigate the activity of oligopeptide components in Soy Sauce-Type Baijiu (JOPs) to alleviate the inflammatory damage of gastric mucosal epithelial cells caused by *Helicobacter pylori* (Hp) infection and its molecular mechanism. Methods: The JOPs were isolated and amino acid sequence identified. The cell model of human gastric mucosal epithelial cells (GES-1) under Hp-exposure was established. CCK8 assay method was used to detect the cell vi-

ability, and ELISA method was applied to evaluate the inflammatory epithelial cytokines levels. Western blotting was applied to detect the protein expression in NF- κ B signal pathway. Results: The JOP-1 (Phe-Trp-His-Gly) performed the most protective activity against the Hp-induced GES-1 cell viability decline. JOP-1 significantly inhibited Hp-induced inflammatory epithelial cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2 and NO) over-release. At the same time, JOP-1 inhibited the Hp-induced NF- κ B signal pathway activation, and attenuated the Hp-induced COX-2 and iNOS proteins over-expression. Conclusion: The oligopeptides in Soy Sauce-Type Baijiu can alleviate the *Helicobacter pylori* induced inflammatory damages on gastric mucosal epithelial cells by regulating NF- κ B signaling pathway and the COX-2, iNOS protein expression. Furthermore, the Hp-exposure induced inflammatory epithelial cytokines over-secretion was also inhibited.

Keywords soy sauce-type Baijiu; oligopeptide; *Helicobacter pylori*; NF- κ B