

胃痞消对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞 NF-κB p65 表达的影响

曾进浩¹, 潘华峰^{1*}, 胡霞¹, 赵自明², 邵懿³, 陈汝艳³, 任金玲¹, 李海文¹, 袁玉梅¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510000; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095;

3. 泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**探讨健脾化痰解毒复方胃痞消对胃癌前病变(gastric precancerous lesions, GPL)的疗效及其分子学机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 维酶素组($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 胃痞消高、中、低剂量组($15, 7.5, 3.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。除正常对照组外, 其他组均采用 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG)饮水液自由饮用、饥饱失常、耗气泻下法复制 GPL 大鼠模型, 连续 18 周。从第 9 周起, 给药组按上述剂量连续灌胃给药共 10 周, 观察胃痞消对胃黏膜上皮细胞核因子(NF-κB) p65 阳性表达评分的影响。**结果:**模型组胃黏膜上皮细胞 NF-κB p65 的表达评分较正常组显著升高($P<0.01$); 胃痞消各剂量组可不同程度降低 NF-κB p65 的表达评分($P<0.05$), 并以胃痞消低剂量组最为显著($P<0.05$)。**结论:**胃痞消能抑制 NF-κB 信号通路的异常激活, 下调 NF-κB p65 蛋白的表达, 能在一定程度上抑制异形细胞的增殖、侵袭、迁移, 具有防治胃癌前病变的作用。

[关键词] 胃痞消; 胃癌前病变; 慢性萎缩性胃炎; 核因子-κB 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0174-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090174

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000054.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:34

[收稿日期] 20131202(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273739)

[第一作者] 曾进浩, 博士研究生, 从事消化系统疾病与肿瘤的研究, Tel:15999931573, E-mail: zengjinhao0018@126.com

[通讯作者] * 潘华峰, 医学博士, 教授, 从事中西医结合治疗脾胃病的研究, Tel:13711588328, E-mail: gzphf@126.com

形曲线, 表明 MXSGT 平喘的用药剂量与药理效应之间关系属于非典型的量-效关系。MXSGT 平喘量-效关系的复杂性机制如何, 目前尚无任何理论可有效解释, 尚须多学科深入探讨。

[参考文献]

[1] 尚尔鑫, 段金廛, 唐于平. 基于计算模拟的中药及方剂量效关系研究方法概述[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(增刊): 120.

[2] 段金廛, 范欣生, 宿树兰, 等. 中药及方剂量效关系的研究进展与思考[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(4): 241.

[3] 王伟光, 施旭光, 翟理祥, 等. 不同配伍对麻杏甘石汤主要化学成分含量的影响[J]. 中药材, 2007, 30(5): 602.

[4] 黎同明. 麻杏甘石汤不同配比药效学及对大鼠哮喘

作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008: 26.

[5] 张凤雪. 麻杏甘石汤治疗支气管哮喘的文献研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007: 21.

[6] 徐叔云, 卞如钪, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1380.

[7] 李文宏, 徐国良, 余日跃, 等. 呼吸波振幅变化率评价麻杏甘石汤平喘作用初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 174.

[8] 佟海岩. 浅议中药的量效关系[J]. 贵阳中医学院学报, 2005, 27(3): 48.

[9] 范欣生, 段金廛, 王中越, 等. 中药量效关系特征问题的探讨[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(3): 270.

[10] 段金廛, 吴勉华, 范欣生, 等. 中医方药量-效关系科学问题的探讨[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(1): 1.

[责任编辑 聂淑琴]

Effects of Weipixiao on Expression of NF- κ B p65 in Gastric Mucosal Epithelial Cells in Rats with Gastric Precancerous Lesions

ZENG Jin-hao¹, PAN Hua-feng^{1*}, HU Xia¹, ZHAO Zi-ming², SHAO Yi³,
CHEN Ru-yan³, REN Jin-ling¹, LI Hai-wen¹, YUAN Yu-mei¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;

2. Guangdong Provincial Institute of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China;

3. Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Weipixiao, which has functions of fortifying the spleen, dissipating blood stasis, and detoxifying, on gastric precancerous lesions (GPL) and the related molecular mechanisms. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, Weimeisu group ($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), Weipixiao high dose, middle dose and low dose groups ($15, 7.5, 3.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Except for normal group, the rats in other groups were provided with spontaneous intake of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) solution, irregular diet and purgative herbs to establish GPL rat model for 18 consecutive weeks. At the beginning of 9th week, the mediation groups were provided with treatment for 10 weeks at corresponding doses mentioned above, and the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 in gastric mucosal epithelial cells was observed. **Result:** Compared with normal group, the scores of NF- κ B p65 expression in gastric mucosal epithelial cells of the model group were significantly higher ($P < 0.01$), but decreased in three different dosage of Weipixiao groups ($P < 0.05$), particularly in Weipixiao low dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Weipixiao could significantly inhibit the aberrant activation of NF- κ B signaling pathway, down-regulating the expression of NF- κ B p65 protein. Weipixiao, might probably inhibit the proliferation, invasion and metastasis of atypical cells, as a consequence it can prevent and cure gastric precancerous lesions.

[Key words] Weipixiao; gastric precancerous lesions; chronic atrophic gastritis; NF- κ B signaling pathway

胃癌(gastric cancer, GC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率、高死亡率的特点。胃黏膜癌变的 Correa 模式^[1]:即正常胃黏膜-浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌的病变模式已得到了广泛认可,胃癌前病变(gastric precancerous lesions, GPL)是病理性概念,主要指在慢性萎缩性胃炎基础上出现胃黏膜肠上皮化生和异型增生的病变,与胃癌的发生有密切联系,因此,积极治疗胃癌前病变是降低胃癌发病率的重要举措。由于发病的具体机制不明确,在胃癌前病变阶段很难实施二级预防,而中医药则显示具有较好防治胃癌前病变的作用^[2-4]。真核细胞核因子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)在炎症、免疫、细胞增殖凋亡等方面起到重要作用,在胃癌前病变的发生进展中扮演重要角色,研究显示中医药通过调节胃黏膜上皮细胞 NF- κ B 信号通路可起到防治萎缩性胃炎的作用^[5]。本课题组前期的研究从细胞凋亡和增

殖^[6-7]、免疫^[8]等角度证实了健脾化痰解毒复方胃痞消治疗胃癌前病变的分子学机制,本次实验进一步探讨胃痞消对胃癌前病变 NF- κ B 信号通路及上游因子 NF- κ B p65 的干预作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体重 140~170 g,由中山大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK[粤]2011-0029。实验在广东省中医研究所完成(SPF 级别大鼠实验室,环境设施许可证号 SYXK[粤]2010-0059)。

1.2 药品与试剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG,日本东京株式会社,批号 ZG4T1-FP),临用时将其配成 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的饮用液。胃痞消(太子参 15 g,北黄芪 30 g,白术 15 g,丹参 20 g,白花蛇舌草 30 g)及小承气汤(大黄 12 g,厚朴 6 g,枳实 9 g)购自广州中医药大学门诊部,由广东省中医研究所药物制剂室批量加工制剂。维酶素(四川大冢制药有

限公司,批号 120711)。NF- κ B p65 mouse mAb (cell signaling technology 公司,批号#6956S)。

1.3 仪器 RM2135 型轮转式切片机,TP1020 型全自动组织脱水机,EG1140 型石蜡包埋机,HI1210 型摊片机和 HI1220 型烘片机(均为德国徕卡);CX21-BIM 型生物显微镜(日本奥林巴斯)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 将大鼠随机分为正常组 10 只,模型组 15 只,维霉素组以及胃痞消高、中、低剂量组各 13 只。正常组常规喂养,其他组参考 MNNG 饮用液自由饮用法配合饥饱失常加泻下耗气法^[3]造模,并予以改良创新,采用 200 mg·L⁻¹ MNNG 溶液自由饮用、小承气汤灌胃法及饥饱失常复制 GPL 大鼠模型,连续 18 周。第 9 周开始灌胃,正常组与模型组大鼠灌胃蒸馏水,2 mL/只/d。维霉素组按 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,胃痞消高剂量组按 15 g·kg⁻¹·d⁻¹(2 倍成人临床等效量)、中剂量组按 7.5 g·kg⁻¹·d⁻¹(1 倍成人临床等效量)、低剂组按 3.75 g·kg⁻¹·d⁻¹(0.5 倍成人临床等效量)灌胃共 10 周。

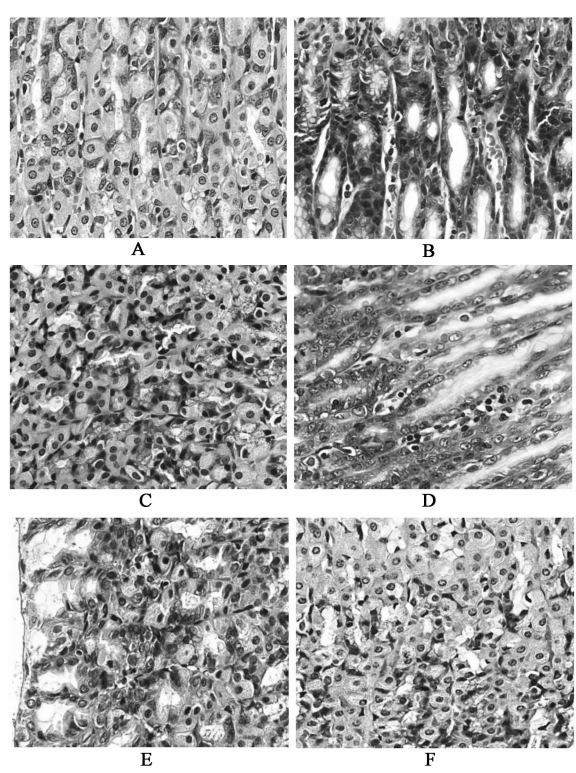
2.2 NF- κ B p65 的检测 第 18 周末,禁食禁水 12 h 后,处死大鼠。取全胃,沿大弯剪开,取 1 mm³ 大小的胃小弯体-窦交界处胃黏膜组织,用免疫组化 Evison 法进行检测。

2.3 结果判断 细胞质见棕黄色或棕色颗粒定义为 NF- κ B p65 染色阳性。400 倍光镜下随机选取 5 个视野,运用 Image Pro Plus 6.0 图像软件进行分析,选取吸光度均值(A)、面积比总和值、累积吸光度均值进行 NF- κ B p65 阳性表达评分。

2.4 数据统计方法 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均值的比较采用单因素方差分析,方差齐组间均值两两比较采用 S-N-K 法(Student-Newman-Keuls 检验),方差不齐时,改用 Dunnett T3 检验;上述统计均由 SPSS 19.0 完成。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 病理学改变 正常组腺体结构正常,形态规则,边界清楚,固有层由排列紧密的管状腺构成,黏膜上皮向固有层内凹陷形成了胃小凹,胃黏膜细胞排列整齐,细胞核呈椭圆型嗜碱性,位于基底部,核浆比例正常,细胞质着色浅淡;模型组可见结构紊乱,形态不规则,排列拥挤,并有复层及背靠背现象,细胞核极性消失,胞核增大、深染、异形,核浆比例明显增高,可见病理性核分裂,核仁突出;治疗组大鼠胃黏膜异型增生较模型组有不同程度改善。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 维霉素组;D. 胃痞消 15 g·kg⁻¹组;
E 胃痞消 7.5 g·kg⁻¹组;F 胃痞消 3.75 g·kg⁻¹组
图 1 各组大鼠胃黏膜组织病理学变化(HE 染色,×400)

3.2 各组大鼠胃黏膜上皮细胞 NF- κ B p65 的表达评分 模型组 NF- κ B p65 阳性表达的吸光度均值、面积比总和值、累积吸光度均值较正常组显著增加($P < 0.01$)。与模型组相比,维霉素组 NF- κ B p65 阳性表达的累积吸光度均值显著降低($P < 0.05$),吸光度均值、面积比总和值虽有下降趋势,但无统计学意义;胃痞消高组 NF- κ B p65 阳性表达的面积比总和值、累积吸光度值显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),吸光度均值有下降趋势,但无统计学意义;胃痞消中组 NF- κ B p65 阳性表达的累积吸光度值显著降低($P < 0.05$),吸光度均值、面积比总和值有下降趋势,但无统计学意义;胃痞消低组 NF- κ B p65 阳性表达的面积比总和值、累积吸光度值显著降低($P < 0.01$),光密度均值有下降趋势,但无统计学意义。与维霉素组相比,胃痞消高、中组 NF- κ B p65 阳性表达的吸光度均值、面积比总和值、累积吸光度均值有下降趋势,但无统计学意义;胃痞消低组 NF- κ B p65 阳性表达的面积比总和、累积光密度均值显著降低($P < 0.05$),吸光度均值无统计学意义。与胃痞消高组相比,胃痞消中、低组 NF- κ B p65 阳性表达的吸光度均值、面积比总和值、累积

吸光度无显著性意义。与胃痞消中组相比,胃痞消低组NF-κB p65阳性表达的面积比总和值、累积

吸光度均值显著降低($P < 0.05$),吸光度均值无统计学意义。见表1。

表1 各组大鼠胃黏膜上皮 NF-κB p65 的表达评分($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	吸光度值	面积比总和	累积吸光度均值
正常	—	$0.039 \pm 0.041^{1)}$	$0.002 \pm 0.002^{1)}$	$2.473 \pm 2.657^{1)}$
模型	—	0.126 ± 0.056	0.152 ± 0.067	56.930 ± 27.425
维霉素	0.2	0.118 ± 0.054	0.086 ± 0.037	$33.762 \pm 18.728^{2)}$
胃痞消	15	0.116 ± 0.054	$0.056 \pm 0.028^{2)}$	$21.803 \pm 12.389^{1)}$
	7.5	0.099 ± 0.043	0.084 ± 0.042	$33.920 \pm 17.867^{2)}$
	3.75	0.098 ± 0.040	$0.027 \pm 0.016^{1,3,4)}$	$12.839 \pm 6.824^{1,3,4)}$

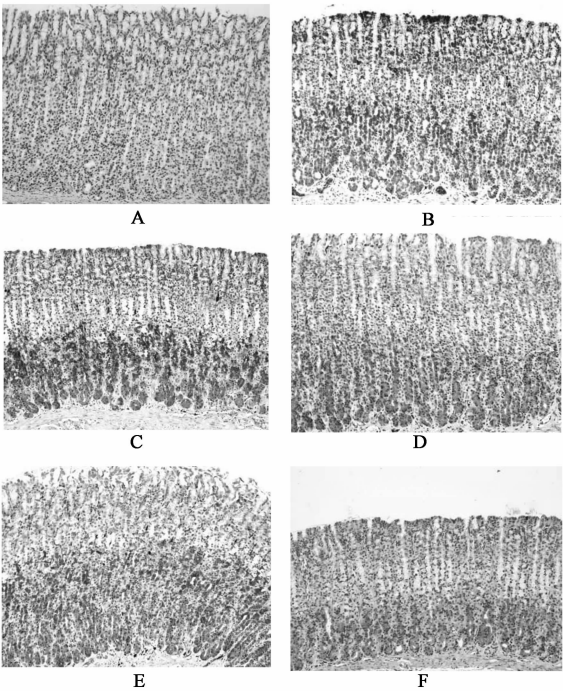
注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与维霉素组比较³⁾ $P < 0.05$;与胃痞消中剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠胃黏膜上皮细胞 NF-κB p65 的表达情况 正常组大鼠胃黏膜 NF-κB p65 呈阴性表达;模型组 NF-κB p65 主要表达于细胞质,阳性表达细胞染色较深,密集分布于胃黏膜全层;治疗组 NF-κB p65 主要表达于细胞质,但较模型组有不同程度改善,阳性表达细胞染色变浅,数量减少,散在分布于胃黏膜基底侧,以胃痞消低剂量组改善最明显。见图2。

面^[9-11]发挥重要调控作用。除了参与肿瘤的发生发展、增殖分化之外,NF-κB 还能调节转录许多黏附、侵袭、转移相关因子,进而参与肿瘤细胞的侵袭转移^[12-13]。目前研究发现,NF-κB p65 是 NF-κB 蛋白因子家族中重要成员,广泛存在与体内细胞中,正常情况下,NF-κB 与其抑制因子 IκB 结合形成复合体,稳定在胞质中,然而在外界刺激因素的作用下,使 IκB 磷酸化并在蛋白水解酶作用下发生降解,从而使 NF-κB 得以激活进入细胞核,启动相关基因的转录和表达,因此,NF-κB p65 的核移位则意味着 NF-κB 的异常激活。研究证实^[14-15] NF-κB p65 在胃癌黏膜上皮细胞胞浆及胞核中表达水平较正常黏膜上皮细胞明显升高,说明 NF-κB 的异常激活与胃癌的发生、浸润、转移关系密切,NF-κB p65 蛋白的表达水平是评价胃癌恶性程度的良好指标。

NF-κB 信号通路的异常激活在胃癌的发生进展中发挥重要作用,但在胃癌前病变中关于 NF-κB 信号通路的研究则较少,从此角度研究中医药实施一级预防的分子学机制,对防止胃癌前病变向胃癌转化有重大意义,这也是本次研究的创新点。胃痞消由黄芪、太子参、白术、丹参、白花蛇舌草组成,方中选用黄芪为主药,黄芪乃补气之首药,功擅益气化瘀、补气生津,药理研究^[16-17]也证实黄芪的主要成分能有效逆转黏膜的萎缩、肠化和异型增生,并可通过增强小鼠细胞免疫水平起到抑制肿瘤的作用。白花蛇舌草是扶正解毒之效药,可直接抑制肿瘤生长,并能通过刺激机体的免疫系统并杀伤或吞噬肿瘤细胞^[18-19]。诸药合用,共奏健脾、化瘀、解毒的功效,组方符合胃癌前病变“虚”、“瘀”、“毒”的病机。

实验结果显示,模型组胃癌前病变大鼠 NF-κB p65 的表达评分较正常组明显升高($P < 0.01$),说明 NF-κB p65 蛋白的异常阳性表达及 NF-κB 信号



A. 正常组;B. 模型组;C. 维霉素组;D. 胃痞消 15 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
E. 胃痞消 7.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F 胃痞消 3.75 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图2 NF-κB p65 蛋白在各组胃黏膜组织中的表达(免疫组化 Evison 法, $\times 100$)

4 讨论

NF-κB 是一类具有多向调控作用的蛋白质因子,在机体炎症反应、免疫应答、细胞增殖和凋亡方

通路的活化状态可能是胃癌发生进展过程中的重要分子事件,并提示在胃癌前病变阶段异型增生胃黏膜上皮细胞具有类似肿瘤细胞的异常增殖、侵袭、转移特性。综合吸光度均值、面积比总和值、累积吸光度均值的结果提示,胃痞消各剂量组可不同程度降低 NF- κ B p65 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$),并以胃痞消低剂量组最为显著 ($P < 0.05$),其机制可能如下:胃痞消能抑制 NF- κ B 通路的异常激活,下调 NF- κ B p65 蛋白的表达,能在一定程度上抑制异形细胞的增殖、侵袭、迁移,从而阻断和逆转胃癌前病变。

[参考文献]

[1] Correa P. A human model of gastric carcinogenesis [J]. Cancer Research, 1988, 48(13):3554.

[2] 邓鑫,梁健,刘东华,等. 胃宁颗粒治疗胃癌前病变实验研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2008,(5):313.

[3] 陈小野,邹世洁,樊雅莉,等. 大鼠慢性萎缩性胃炎证病结合模型胃黏膜病理研究 [J]. 上海实验动物科学, 2002,(1):35.

[4] 郭亚蕾,饶晶,潘华峰,等. 健脾化痰解毒法对慢性萎缩性胃炎的临床疗效及对细胞周期蛋白 E 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):292.

[5] 林海燕,赵岩,于佳宁. 萎胃康颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜病理形态学影响及细胞增殖抑制作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011,17(11):1220.

[6] 赵霞,潘华峰,鞠晓云,等. 胃痞消对慢性萎缩性胃炎脾虚证大鼠胃黏膜上皮细胞增殖及调控蛋白 Cyclin E 影响的研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(1):9.

[7] 潘华峰,任金玲,赵自明,等. 胃痞消对脾虚型慢性萎缩性胃炎癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞增殖周期分布及凋亡基因表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(5):488.

[8] 刘静,潘华峰,赵自明,等. 胃痞消对脾虚型 CAG 胃癌前病变大鼠外周血 T 细胞亚群的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2):116.

[9] Dutta J, Fan Y, Gupta N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB [J]. Oncogene, 2006, 25(51):6800.

[10] Baldwin A S, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease [J]. J Clin Invest, 2001, 107(1):3.

[11] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. Ann Rev immunol, 2009, 27:693.

[12] Andela V B, Schwarz E M, Puzas J E, et al. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB [J]. Cancer Res, 2000, 60(23):6557.

[13] Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma [J]. J Neurosurg, 2002, 96(5):909.

[14] Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(12):4136.

[15] Zhou X X, Ji F, Zhao J L, et al. Anti-cancer activity of anti-p185HER-2 ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(7):1266.

[16] 王茵萍,范刚启,孙茂峰,等. 穴注黄芪、当归注射液对实验性慢性萎缩性胃炎胃黏膜屏障的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(3):195.

[17] 张蔷,高文远,满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21):3203.

[18] 单保恩,张金艳,杜肖娜,等. 白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(5):370.

[19] 曾永长,梁少瑜,罗佳波,等. 白花蛇舌草水提部位体内外抗肿瘤实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011(5):521.

[责任编辑 聂淑琴]