

浊毒1号方对胃癌前病变大鼠胃黏膜细胞凋亡及 Bcl-2 基因表达的影响

宋艳琦¹, 霍永利², 董笑一², 刘昊¹, 侯姿蕾¹, 郭喜军², 李佃贵²

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011

[摘要] 目的: 通过实验观察浊毒1号方对甲基硝基亚硝基胍 (Methyl nitrate nitrosoguanidine, MNNG) 溶液造模的胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及 Bcl-2 基因表达的影响, 以期从分子生物学角度探讨该方剂对胃癌前病变的影响。方法: 将 50 只清洁级雄性 Wista 大鼠随机分为空白组、模型组、雷尼替丁组、中药高剂量组、中药低剂量组, 每组各 10 只。除空白组外, 其余 4 组用 MNNG 造模 90 天, 大鼠造模成功后开始给予相应药物治疗 4 周后处死, 检测各组大鼠胃黏膜中 Tunel 法标记的阳性颗粒, 采用图像分析系统进行计数并进行统计学分析, 检测胃黏膜细胞凋亡程度及癌基因中 Bcl-2 的表达水平。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及 Bcl-2 蛋白表达均上升 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 雷尼替丁组、中药高剂量组、中药低剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡表达及 Bcl-2 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$)。与雷尼替丁组比较, 中药高剂量组凋亡细胞表达及 Bcl-2 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$)。结论: 浊毒1号方治疗胃癌前病变是通过下调 Bcl-2 基因水平, 来减少胃黏膜细胞凋亡, 从而恢复细胞正常生理结构的。

[关键词] 胃癌前病变; 浊毒1号方; 细胞凋亡; Bcl-2; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 04-0019-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.04.006

Zhuodu No.1 Prescription Has Effect on Gastric Mucosal Apoptosis and Expression of Bcl-2 Gene of Rats with Gastric Precancerous Lesions

SONG Yanqi, HUO Yongli, DONG Xiaoyi, LIU Hao, HOU Zilei, GUO Xijun, LI Diangui

Abstract: Objective: To observe the effect of Zhuodu No.1 prescription on gastric mucosal apoptosis and expression of Bcl-2 gene in the model of rats with gastric precancerous lesions which is established by methyl nitrate nitrosoguanidine (MNNG) solution via experiment so as to explore the effect of this prescription on gastric precancerous lesions from the perspective of molecular biology. **Methods:** 50 male Wista rats of clean grade were divided into five groups randomly, namely the blank group, the model group, the ranitidine group and the high-dose and low-dose Chinese medicine groups, 10 rats in each group. Except the blank group, the model of rats with gastric precancerous lesions was respectively established by MNNG in the other four groups for 90 days. After establishment, rats in each group received the corresponding medicine, which were sacrificed after 4 weeks of treatment. Detected the positive granules labeled by Tunel staining in gastric mucosa of rats in each group, conducted counting and statistically analysis via image analysis system, and detected the degree of gastric mucosal apoptosis and the expression of Bcl-2 in oncogene. **Results:** Comparing with the blank group, gastric mucosal apoptosis and the protein expression of Bcl-2 in oncogene of rats in the model group were both increased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, gastric mucosal apoptosis and the protein expression of Bcl-2 in oncogene of rats in the ranitidine group and the high-dose and low-dose Chinese medicine groups were respectively decreased ($P < 0.05$). Comparing with the ranitidine group, gastric mucosal apoptosis and the protein expression of Bcl-2 in oncogene of rats in the high-dose Chinese medicine groups were both decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zhuodu No.1 prescription treats gastric precancerous lesions by down-regulating the expression of Bcl-2 gene to reduce gastric mucosal apoptosis, thus to promote the recovery of normal physiological structure of cells.

Keywords: Gastric precancerous lesions; Zhuodu No.1 prescription; Apoptosis; Bcl-2; Animal experiment; Rats

[收稿日期] 2018-11-12

[基金项目] 河北省健康医疗与生物医药专项项目 (冀中医 18277715D 号)

[作者简介] 宋艳琦 (1990-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗脾胃疾病。

[通信作者] 霍永利, E-mail: 345315817@qq.com.

近年来,随着胃癌前病变研究的不断深入和发展,从细胞学及基因角度进行的胃癌前病变相关理论研究不断丰富和完善。浊毒1号方有化浊解毒,活血祛瘀的功效,对于胃癌前病变的逆转有着很好的临床疗效,但其作用机制尚不明确。本研究将浊毒理论应用于胃癌前病变,认为胃癌前病变的治疗与抑制细胞凋亡,恢复其正常生理结构密切相关。因此,采用动物实验对浊毒1号方治疗胃癌前病变的作用机理进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 50只清洁级雄性Wista大鼠,体质量约300~350g,购自河北医科大学实验中心,实验动物合格证号1808139,许可证号SCXK(冀)2013-1003,大鼠饲养于河北中医学院动物实验中心,室温保持在20~25℃,相对湿度在50%~65%。

1.2 实验药品及试剂 甲基硝基亚硝基胍(Methyl nitrate nitrosoguanidine, MNNG)溶液购自武汉博士德生物科技有限公司;Tunel细胞凋亡检测试剂盒(ZK-8105)购自北京中杉金桥试剂有限公司;Bcl-2试剂盒购自南京生物科技发展有限公司。浊毒1号方组成为砂仁、白豆蔻、黄芩、苦参各9g;白芷、白英、白花蛇舌草各12g,黄连6g,蒲公英15g,全蝎3g,蜈蚣1条,购自河北省中医院中药房,均为神威配方颗粒剂,全方用沸水溶解,配制浓度为2.45g/mL的药液备用。雷尼替丁胶囊(石家庄四药有限公司生产,国药准字H148022482);其余试剂及所需设备由河北省中医院病理科提供。

1.3 实验仪器 IX-70倒置相差显微镜、P73数码显微镜(日本Olympus公司);HealForce NW10VF超纯水机(上海力康医疗设备有限公司);MDF-382E超低温保存箱(日本三洋公司);1-15K高速冷冻离心机(美国Sigma公司);HMIAS-2000显微图像分析系统(武汉同济医科大学)。

1.4 动物分组及模型制备 将50只实验大鼠饲以全价营养饲料和过滤后的自来水,适应性喂养7天后,通过随机数字表分组法将这些大鼠随机分成空白组、模型组、雷尼替丁组、中药高剂量组、中药低剂量组,每组10只,共5组。饲养于湿热环境中^[4],采用复合造模法,饲养环境室温维持在22℃,相对湿度固定在50%左右,MNNG溶液用蒸馏水配制成50μg/mL溶液,每次使用前配制并用黑色塑料袋包裹大鼠饮水瓶。除空白组大鼠外其余大鼠饲养过程中均采用饥饱交替,即饥饿2天,饱食2天,造模90天。每天更换饮水瓶中的MNNG溶液,每2天更换1次垫料,空白组大鼠常规给予全价营养饲料及城市自来水饮用。分别在实验开始第60天、90天各处死1只造模大鼠,常规取病理后显微镜下观察其胃黏膜形态,证实造模成功后,模型组大鼠给予生理盐水5mL灌胃,雷尼替丁组按0.03g/(kg·d),中药按体表面积公式换算后按高剂量组500mg/(kg·d),低剂量组125mg/(kg·d)的剂量灌胃,共治疗4周。

1.5 标本采集 治疗完毕后,撤去大鼠垫料,禁食24h后,

断头法处死,剖腹,距离贲门和幽门1cm处离断,取出全胃,沿胃大弯侧纵向剖开,冰盐水冲洗表面附着物后浸入40g/L的多聚甲醛固定液中,24h后脱水,通过石蜡包埋,4μm连续切片以及HE染色,在显微镜下观察病理学表现。

1.6 指标检测 胃黏膜细胞凋亡情况采用Tunel法检测。在光学显微镜下随机选择5个视野,互不重叠,发现细胞核内有棕黄色染色颗粒即可视为阳性。半定量测定单位视野棕黄色颗粒的平均光密度值(OD值)作为其表达情况的指标。胃黏膜细胞Bcl-2蛋白的表达采用免疫组织化学染色法,均按试剂盒说明书步骤操作。该Bcl-2染色阳性颗粒弥漫分布于细胞质中,镜下可观察到细胞质被染色为棕黄色颗粒,颜色深浅不一致。应用图像处理系统进行定量灰度扫描,求选定范围内OD值。

1.7 统计学方法 采用SPSS16.0统计分析软件对数据进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,对各组数据先进行正态及方差齐性检验,满足方差齐时,各组间采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验,方差不齐时用K-W-H检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡结果比较 见表1。与空白组比较,各大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡均有不同程度的表达增强($P < 0.05$)。与模型组比较,雷尼替丁组、中药高剂量组、中药低剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡表达均有下降($P < 0.05$)。与雷尼替丁组比较,中药高剂量组凋亡细胞表达下降($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠Bcl-2蛋白表达结果比较 见表1。与空白组比较,模型组Bcl-2蛋白表达均明显上升($P < 0.05$);与模型组比较,雷尼替丁组、中药高剂量组、中药低剂量组Bcl-2蛋白表达均明显下降($P < 0.05$);与雷尼替丁组比较,浊毒1号方高剂量组Bcl-2蛋白表达明显下降($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及

组别	n	Bcl-2蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)		%
		胃黏膜上皮细胞凋亡率	Bcl-2蛋白表达阳性率	
空白组	10	1.15 ± 0.10	2.21 ± 0.29	
模型组	8	36.69 ± 0.42 ^①	30.15 ± 0.243 ^①	
雷尼替丁组	9	18.52 ± 0.06 ^②	17.24 ± 0.15 ^②	
中药高剂量	9	11.34 ± 0.54 ^{②③}	10.70 ± 0.07 ^{②③}	
中药低剂量	9	19.97 ± 0.11 ^②	18.94 ± 0.06 ^②	

与空白组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与雷尼替丁组比较,③ $P < 0.05$

3 讨论

目前认为胃癌的发生发展通常有其自身的规律,主要是从正常细胞开始变为慢性浅表性炎症-萎缩性炎症-肠上皮化生-不典型增生,最终成为胃癌^[5]。胃癌前病变是指较正常组

织或其他病理改变更倾向于癌变的组织病理改变,具体发病机制目前尚不明确,公认的是多种因素共同作用的结果。细胞凋亡对于正常细胞新陈代谢的生理过程有着重要作用,作为胃黏膜的第5道屏障,在黏膜上皮、腺体的损伤、再生和修复过程中发挥着重要的作用^[4]。Bcl-2起初作为原癌基因在淋巴瘤的滤泡B细胞中发现,目前已发现的该家族成员扩大到15个,分别行使着抑制细胞凋亡与促进细胞凋亡的使命,当细胞受到来自于或内或外的刺激后,细胞内与促进细胞凋亡的基因相对活性决定了细胞凋亡是否发生。也就是说,Bcl-2的表达一定程度上决定了细胞的凋亡^[5]。然而又有研究证实,过度的细胞凋亡同时伴随有代偿性细胞增殖,其中增殖活跃的细胞会在多种因素作用下偏离生理性分化方向,甚至会慢慢演化为肠上皮化生、腺瘤等癌前病变^[6]。由此可见,癌前病变的发生与Bcl-2的表达及胃黏膜上皮细胞的过度凋亡有关。

国医大师李佃贵认为湿热日久化生浊毒为本病的发病机制,由于感受外邪、饮食不节、情志不舒而致肝郁气滞,脾胃损伤,终致肝胃不和,中焦失司,健运失职,水谷不得运化则化生水湿,湿瘀日久则致气、血、痰、瘀丛生,日久化热,热毒血瘀则成毒,形成浊毒瘀阻中焦,致气机不畅,湿热浊毒损伤胃络,阻碍气血津液输布,血不荣胃络,胃失于濡养,日久胃液枯竭,腺体萎缩、黏膜受损而致萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生等癌前期病变^[7]。其运用化浊解毒法治疗胃癌前病变临床疗效确切,现阶段总结出浊毒1号方具有良好的疗效和前景^[8]。组方中砂仁、白豆蔻芳香化浊,行气和胃;黄芩、黄连清热燥湿,泻火解毒;白豆蔻、砂仁温中化湿,醒脾和胃,作为醒脾调胃之要药,为化湿浊常用药对,可清中焦湿阻,温中止呕、止泻。《本草纲目》有云:“豆蔻治病,取其辛热浮散,能入太阴、阳明,除寒燥湿,开郁化食之力而已”。药理研究表明,白豆蔻的主要有效成分为挥发油,该油的主要成分是1,4桉叶素及右旋樟脑,芳香健胃,有促进胃液分泌、增强胃肠蠕动、抑制肠内异常发酵,祛除胃肠积气功效^[9]。徐新献等^[10]将豆蔻煎剂用于重症监护病人,在临床上联合莫沙比利鼻饲,监测腹部手术后患者的肠鸣音恢复时间及排便时间,均较对照组明显缩短,证明白豆蔻能使胃肠蠕动增加。苦参、蒲公英清胃肠湿热;白芷性温味辛,反佐清热解毒药性之凉,且有引诸药归脾经之效;白英、白花蛇舌草、全蝎、蜈蚣解毒散结,现代药理研究证实蒲公英、白花蛇舌草和全蝎、蜈蚣2对煎剂具有明显的抗肿瘤及抗菌消炎作用^[11];李佃贵认为胃黏膜癌变区是浊毒聚集之地,当解毒散结方可奏效,诸药相合,共奏化浊解毒之功。

本研究结果证实胃癌前病变与胃黏膜上皮细胞过度凋亡及Bcl-2蛋白高表达有关。模型组大鼠胃黏膜上皮细胞过度凋亡的表现已经开始出现,Bcl-2蛋白表达增强,治疗后各治疗组

凋亡细胞及Bcl-2蛋白表达均有不同程度降低,其中高剂量组降低最为明显,与空白组最接近,效果相近的为低剂量组与雷尼替丁组。从实验角度说明浊毒1号方较之雷尼替丁能更好的治疗胃癌前病变,对胃黏膜损伤的修复具有确切疗效,且疗效与药物浓度在一定范围内呈现正相关。浊毒1号方对胃癌前病变的修复作用机制可能与其抑制胃黏膜上皮细胞过度凋亡,抑制Bcl-2蛋白的表达有关。此外,本实验样本含量较小,且仅对凋亡细胞及Bcl-2蛋白表达进行检测,后续的实验以及临床方面的具体疗效范围、药物安全性评估有待进一步的挖掘。

【参考文献】

- [1] 陆为民. 大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变气虚血瘀证动物模型的研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2000, 16(3): 156.
- [2] 韦淑琴, 刘国军, 安洋, 等. P53, nm23 和 c-erbB-2 蛋白在子宫内膜癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(10): 9-11.
- [3] 徐婷婷, 朱方石. 外源性胃黏膜损伤因素与脾虚相关性研究进展及评价[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 37(6): 1176-1179.
- [4] Wallace JC, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense[J]. FASEB J, 1996, 10(7): 731-740.
- [5] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994, 145: 1323-1336.
- [6] Hiwa H, Endo K, Wada R, et al. Cellular Proliferation and differentiation in rat atrophic gastric mucosa induced by N-methyl-nitrosoguanidine[J]. J clin Gastroenterol, 1997: 25: 116-121.
- [7] 王正品, 李佃贵, 杜艳茹, 等. 浊毒致病论与现代中医病因学[J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 11-13.
- [8] 霍永利, 李佃贵, 马小顺. 化浊解毒法治疗胃癌前病变患者61例[J]. 中医杂志, 2011, 52(8): 698-699.
- [9] 原皓, 李时光, 崔慎茹. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠结肠炎症及 MCP-1 表达的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(31): 41-42.
- [10] 徐新献, 王志坦. 中西医结合内科手册[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2003: 383.
- [11] 沈敬华, 杨丽敏, 张林娜, 等. 5种中药提取物抗肿瘤作用的研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2005, 27(4): 300.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)