

● 实验研究 ●

半夏泻心汤对 PLGC 大鼠胃黏膜 P13k/Akt/mTOR 通路的影响及其防治研究

彭雪靖¹, 刘 洁²

(1. 天津中医药大学, 天津, 300193;

2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津, 300150)

[摘要] 目的: 通过检测大鼠胃癌前病变(Precancerous Lesion of Gastric Cancer, PLGC)胃黏膜微环境 P13k/Akt/mTOR 通路的相关指标, 揭示半夏泻心汤对 PLGC 大鼠胃黏膜微环境的影响及防治作用机制。方法: 将 50 只清洁级雄性 SD 大鼠采用改良 MNNG + 复合法造模, 分别于造模第 10 周末和第 20 周末各随机抽取 5 只检测造模是否成功。将剩余 40 只模型大鼠随机分为 4 组: 中药组(予半夏泻心汤灌胃)、西药组(予叶酸片液灌胃)、中西药结合组(予半夏泻心汤 + 叶酸片液灌胃)和模型对照组(继续造模处理), 每组 10 只, 于药物干预的第 6 周和第 12 周末停药 2d 后各组随机抽取 5 只实验大鼠观察药物干预对 PLGC 大鼠胃黏膜微环境的影响。结果: 药物干预第 6 周末不成模, 故无结果。干预第 12 周末, 与模型对照组比较, 中药组大鼠胃黏膜 P13k 和 P53 表达高, Akt、mTOR、HIF-1 α 和 Bcl-2 表达低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 半夏泻心汤可使 PLGC 大鼠胃黏膜微环境 P13k 的表达升高, Akt、mTOR 的表达降低, 从而使 HIF-1 α 的表达水平降低, 由此提高 P53 水平, 降低 Bcl-2 的表达, 达到治疗甚至逆转 PLGC 的目的。

[关键词] PLGC; 半夏泻心汤; P13k/Akt/mTOR; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.10.069

Effect of Banxia Xiexin decoction on the P13k/Akt/mTOR pathway in gastric mucosa of rats with precancerous lesion of gastric cancer and related preventive and treatment methods

PENG Xue-jing¹, LIU Jie²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China)

Abstract: Objective: To investigate the indices of the P13k/Akt/mTOR pathway in gastric mucosa of rats with precancerous lesion of gastric cancer (PLGC), as well as the effect of Banxia Xiexin decoction on the gastric mucosa of PLGC rats and its mechanism of action in prevention and treatment. Methods: A total of 50 clean male Sprague-Dawley rats were selected and the modified MNNG method was used to establish a rat model. At the end of weeks 10 and 20 of modeling, 5 rats each were randomly selected to evaluate whether the model was successfully established. The remaining 40 rats were randomly divided into traditional Chinese medicine (TCM) group (treated with Banxia Xiexin decoction by gavage), Western medicine group (treated with folic acid solution by gavage), TCM-Western medicine group (treated with Banxia Xiexin decoction + folic acid solution by gavage), and model control group, with 10 rats in each group. At the end of weeks 6 and 12 of drug intervention, 5 rats were randomly selected from each group on day 2 after drug withdrawal to observe the effect of drug intervention on the microenvironment of gastric mucosa in PLGC rats. Results: The model was not successfully established at week 6 of drug intervention. At the end of week 12 of drug intervention, compared with the model control group, the TCM group had significantly higher expression of P13k and P53 and significantly lower expression of Akt, mTOR, HIF-1 α , and Bcl-2 in gas-

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划项目(编号: 20140217)

第一作者: 彭雪靖, 女, 2017 级硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗脾胃病

通讯作者: 刘洁, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中西医结合治疗脾胃病, E-mail: liujie1994@126.com

tric mucosa($P < 0.05$). Conclusion: Banxia Xiexin decoction can increase the expression of P13k and reduce the expression of Akt and mTOR in the gastric mucosa of PLGC rats, thus reducing the expression of HIF-1 α , increasing the level of P53, and reducing the expression of Bcl-2. Banxia Xiexin decoction can help with the treatment or even reversal of PLGC.

Key words: precancerous lesion of gastric cancer; Banxia Xiexin decoction; P13k/Akt/mTOR; experimental study

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率在我国居于第 2 位,在全球位列第 5^[1]。1988 年 Correa 提出慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌的发展模式,是目前较为认可的发展模式。胃癌前病变(PLGC)即慢性萎缩性胃炎伴不完全性大肠化和/或高级别上皮内瘤变^[2]。如能及早识别癌前病变并进行积极干预,阻断其发展,将有效降低胃癌的发生率和病死率^[3]。半夏泻心汤可通过“调寒热,调气机,调虚实”的作用来“调和”PLGC“胃黏膜微环境”,抑制胃癌的发生发展。本实验通过研究半夏泻心汤对 PLGC 大鼠胃黏膜组织病理及微环境中的 P13k/Akt/mTOR 通路、HIF-1 α 、P53 及 Bcl-2 的影响,旨在揭示半夏泻心汤对 PLGC 的防治作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠(具备动物合格证号)70 只,鼠龄 15d,体质量(120 $\pm$ 10)g,适应性饲养 1 周。

1.2 药物 雷尼替丁(天津太平洋制药有限公司);N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG,Fluka 公司),每周用双蒸水配成浓度为 1g/L 的母液,4℃避光储存,临用时用双蒸水配成浓度为 100 μ g/mL(每天配 1 次),供大鼠自由饮用,饮水瓶用油漆涂黑避光;半夏泻心汤药物组成和剂量:半夏 12g,黄芩 9g,干姜 9g,人参 9g,炙甘草 9g,黄连 3g,大枣 12 枚。饮片购自天津中医药大学第二附属医院药房,制备成浓度为 0.75(生药)/mL 的中药水煎液。叶酸片:配制浓度为 0.5 μ g/mL 叶酸液。

2 实验方法

2.1 实验分组、造模及给药 随机选取 50 只实验大鼠,采用改良 MNNG+复合法制备 PLGC(大鼠模型)。造模第 10 周末和第 20 周末各随机抽取 5 只检测造模是否成功。将剩余的 40 只模型大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为中药组(予半夏泻心汤 2mL/100g 体质量灌胃)、西药组(予叶酸片液 0.5mg/kg·d 灌胃)、中西药结合组(予半夏泻心汤+叶酸片液)及模型对照组(继续造模处理),分别给予各组大鼠相应的药物干预,于药物干预第 6 周末和第 12 周末停药 2d 后,各组随机抽取 5 只,进行整体、细胞和分子水平相关指标检测。

2.2 指标观察和测定 (1)胃黏膜外观形态:观察黏膜颜色改变、血管透见及腺体改变等;(2)观察胃黏膜组织病理学改变;(3)P13k/Akt/mTOR、HIF-1 α 、P53 及 Bcl-2 等指标的测定。

2.3 指标观察的检测方法和病理评定标准 (1)P13k/Akt/mTOR:采用 Envision 二步法染色。评分标准:细胞阳性率<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;显色度按切片中细胞显色有无及染色深浅记分,细胞无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;最后将 2 项评分相乘,总积分为 0 者为阴性,积分 ≥ 1 为阳性。(2)HIF-1 α :采用免疫组织化学 SP 法。结果判断按照肿瘤细胞的染色比例分级,以伴或不伴胞质染色的细胞核染色为阳性计数标准。(-):没有染色或<1%的细胞核染色;(+):1%~10%的细胞核染色,和(或)较弱的胞质染色;(++):10%~<50%的细胞核染色,和(或)明显的胞质染色;(+++): $\geq 50\%$ 的细胞核染色,和(或)较强的胞质染色。(3)组织病理:按常规苏木精-伊红染色病理学进行检查。病情分级按腺体萎缩病理组织学分级标准、肠上皮化生及异型增生分度标准。(4)Bcl-2 及 P53 水平测定:按各自所对应的原位杂交检测试剂盒说明书进行操作。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件。组间比较采用($\bar{x} \pm s$)进行描述,组内两两比较采用 Dunnett-t 检验;若为偏态分布,采用中位数(四分位数)[M(P25,P75)]表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 实验误差 模型对照组于干预第 7 周死亡 1 只大鼠,西药组于干预第 9 周死亡 1 只大鼠,中药组和中西药结合组于干预第 11 周分别死亡 1 只大鼠。药物干预第 6 周不成模,故本次实验结果为药物干预 12 周末停药 2d 后对于 PLGC 胃黏膜的影响。

3.2 胃黏膜外观形态 中药组可见大鼠胃黏膜偏粉红色,表面光泽、覆有黏液,走向基本规则。西药组大鼠胃黏膜暗粉色,表面较为光泽,走向基本规则。中西药结合组可见大鼠胃黏膜呈粉红色,表面光泽、覆有黏液,黏膜皱襞较为光滑,走向基本规则。模型对照组大鼠胃壁红白相间或紫暗,黏膜粗糙、黏液少,可见散在糜烂出血点或小结节。

3.3 组织病理学 中药组大鼠胃黏膜厚度基本正常,细胞及腺体排列较为整齐,毛细血管有不同程度扩张淤血,个别间质内有淋巴细胞浸润。西药组胃黏膜厚度大体正常,细胞及腺体排列不整齐,个别有结缔组织增生及肠上皮化生改变。中西药结合组胃黏膜厚度基本正常,细胞及腺体排列较为整齐,个别毛细血管扩张淤血。模型对照组胃黏膜

萎缩变薄,腺体有不同程度的萎缩,固有层可见毛细血管淤血,内有结缔组织增生及肠上皮化生等不同程度的非典型增生。

3.4 分子水平测定

3.4.1 各组 P13k/Akt/mTOR 表达情况比较 与模型对照组

表 1 各组 P13k/Akt/mTOR 阳性细胞计数及评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P13k		Akt		mTOR	
		阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)
模型对照组	4	11.00 $\pm$ 1.83	3.00(3.00,3.00)	35.50 $\pm$ 3.42	3.00(3.00,3.00)	33.75 $\pm$ 2.75	3.00(3.00,3.00)
中药组	4	26.75 $\pm$ 2.75 ^a	1.50(1.00,2.00)	18.25 $\pm$ 3.50 ^a	1.50(1.00,2.00)	15.25 $\pm$ 4.03 ^a	1.00(1.00,1.50)
西药组	4	17.50 $\pm$ 3.70 ^{ab}	2.00(1.50,2.00)	19.00 $\pm$ 3.37 ^a	1.50(1.00,2.00)	18.75 $\pm$ 4.03 ^a	1.50(1.00,2.00)
中西药结合组	4	38.00 $\pm$ 2.58 ^{abc}	1.00(1.00,1.00)	10.75 $\pm$ 2.50 ^{abc}	1.00(1.00,1.00)	8.50 $\pm$ 3.42 ^{abc}	1.00(1.00,1.00)

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.05$;与中药组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$ 。

3.4.2 各组 HIF-1 α /Bcl-2/P53 表达情况比较表 与模型对照组比较,各治疗组大鼠胃黏膜 HIF-1 α 和 Bcl-2 均表达低、P53 表达高,差异均有统计学意义;与中药组比较,

比较,各治疗组大鼠胃黏膜 P13k 表达高、Akt 和 mTOR 表达低,差异均有统计学意义;与中药组比较,西药组 P13k 表达低,中西药结合组 P13k 表达高、Akt 和 mTOR 表达低,差异均有统计学意义;与西药组比较,中西药结合组 P13k 表达高、Akt 和 mTOR 表达低,差异均有统计学意义。(见表 1)

中西药结合组胃黏膜 HIF-1 α 和 Bcl-2 表达低,差异有统计学意义;与西药组比较,中西药结合组 HIF- α 、Bcl-2 均表达低,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组 HIF-1 α /Bcl-2/P53 阳性细胞计数及评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF- α		Bcl-2		P53	
		阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)
模型对照组	4	34.75 $\pm$ 3.50	3.00(3.00,3.00)	36.00 $\pm$ 2.94	3.00(3.00,3.00)	9.25 $\pm$ 3.77	1.00(1.00,1.00)
中药组	4	19.75 $\pm$ 4.57 ^a	1.50(1.00,2.00)	28.25 $\pm$ 2.75 ^a	2.50(2.00,3.00)	21.00 $\pm$ 2.58 ^a	2.00(1.50,2.00)
西药组	4	19.50 $\pm$ 3.42 ^a	1.50(1.00,2.00)	24.75 $\pm$ 2.50 ^a	2.00(2.00,2.00)	22.75 $\pm$ 4.27 ^a	2.00(1.50,2.00)
中西药结合组	4	9.00 $\pm$ 3.37 ^{abc}	1.00(1.00,1.00)	14.75 $\pm$ 3.10 ^{abc}	1.00(1.00,1.50)	18.50 $\pm$ 3.11 ^a	1.50(1.00,2.00)

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.05$;与中药组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$ 。

4 讨 论

P13k/Akt/mTOR 通路通过下游分子的激活及失活,产生级联放大反应,对细胞的生存、生长和增殖起中心调控作用^[4]。缺氧条件下,信号通路 PI3K、Akt 以及下游 mTOR 被激活,而 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活化可通过多种途径上调 HIF-1 α 的表达^[5],势必引起 HIF-1 α 表达增加。P53 为抑癌基因,中药干预可下调 P53 蛋白异常表达,降低其增殖活性从而逆转 PLGC^[6]。Bcl-2 可参与对胃黏膜细胞恶性转化过程中的调控,对凋亡具有抑制性调控的作用^[7]。通过本次实验可以发现,与模型对照组相比,中药组大鼠胃黏膜 P13k 和 P53 表达高,Akt、mTOR、HIF-1 α 及 Bcl-2 表达低,可以说明 PLGC 的发展与微环境密切相关。

PLGC 属于中医学“胃痞”“胃脘痛”的范畴,其病位在脾、胃,病机总属本虚标实,其本虚为脾胃气血亏虚,标实则 为寒热错杂、痰湿凝滞、瘀毒内阻^[8]。半夏泻心汤出自《伤寒论》,为“和法”的代表方剂,方中以苦味的黄连、黄芩清泄胃火;以辛味的半夏、干姜温燥脾湿;配甘味的党参、甘草、大枣以益气、健脾、补虚,治脾胃之虚。诸药相配,寒热并用,辛开苦降,补气和 中,以“调寒热,调气机,调虚实”为法,则诸症息平。本课题组前期研究证实中药具有较好的逆转 PLGC 组织病理学及基因调控作用,通过本次实验证实半夏泻心汤与胃黏膜微环境密切相关,且半夏泻心汤可通过改

善 P13k/Akt/mTOR 等相关指标使 HIF-1 α 的表达降低,由此提高 P53 水平,减低 Bcl-2 的表达,从而达到治疗甚至逆转 PLGC 的目的。

参考文献

[1] 宋杰,陈风格,赵伟,等. 胃癌的发病率现状与治疗研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制,2016,24(9):704-707.

[2] 李慧臻,刘琳,刘华一,等. 半夏泻心汤对 PLGC 大鼠胃黏膜组织病理学及 HP 的影响研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(1):35-39.

[3] 王萍,唐旭东. 胃癌前病变的逆转与中医药治疗探讨[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(10):1305-1308.

[4] 张刚,郭剑,李杰,等. P13k/Akt/mTOR 信号通路在胃癌组织中的表达及意义[J]. 广东医学,2016,37(9):1330-1332.

[5] 牛国梁,张树友. PI3K/Akt 信号传导通路与肿瘤[J]. 现代生物医学进展,2010,10(20):3994-3996,3990.

[6] 姜宁,黄争,范一宏,等. 中药辨证治疗对胃癌前病变患者 APC、P53、Ki67 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(2):356-360.

[7] 伍冬梅,李春鸣. Bcl-2、Bax 在胃癌及胃癌前病变中的表达与细胞凋亡的关系[J]. 遵义医学院学报,2014,37(2):201-203.

[8] 王相东,殷鑫,郭小青. 基于循证医学对胃癌前病变中医辨证分型的研究[J]. 陕西中医学院学报,2007,30(2):7-8.

(收稿日期:2018-05-22)