

朱景茹,洪银洁,黄婉仪,等. 柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 9-14.

Zhu JR, Hong YJ, Huang WY, et al. Effects of Chaishao LiuJun decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis factors in rats with chronic atrophic gastritis of liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 9-14.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 002

柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的影响

朱景茹¹,洪银洁¹,黄婉仪²,张 斐¹,涂文玲¹,杨宗保³,甘慧娟^{1*}

(1.福建中医药大学中医证基地,福州 350122;2.福建中医药大学针灸学院,福州 350122;
3.厦门大学中医系,福建 厦门 361102)

【摘要】 目的 探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎(CAG)模型大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的作用机制。**方法** 26只雌雄各半SD大鼠根据Excel随机生成数字分为正常组6只和造模组20只,造模组采用复合因素造模法建立肝郁脾虚型CAG大鼠模型并评价,成模后随机分为模型组、维酶素组、柴芍六君汤组,每组6只,正常组不予处理。干预过程中,柴芍六君汤组予柴芍六君汤5.1 g/(kg·d),维酶素组予维酶素混悬液240 mg/(kg·d),正常组和模型组予灭菌饮用水,分别灌胃4周。HE染色观察胃黏膜组织病理改变,qPCR法检测胃黏膜细胞凋亡基因c-myc和p53的表达,IHC法检测增殖因子PCNA和Ag-NOR含量,TUNEL法检测胃黏膜细胞凋亡指数。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠活动度减少,病理显示胃黏膜固有腺体萎缩、炎性细胞浸润,胃黏膜c-myc、p53、PCNA、Ag-NOR表达以及凋亡指数均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,维酶素组和柴芍六君汤组大鼠活动度增加,胃黏膜病理萎缩均有一定程度改善、炎性细胞浸润减少;柴芍六君汤组大鼠胃黏膜c-myc、p53、PCNA、Ag-NOR表达以及凋亡指数均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);维酶素组大鼠胃黏膜c-myc、p53表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PCNA、Ag-NOR蛋白表达及凋亡指数下降,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与维酶素组比较,柴芍六君汤组大鼠一般情况及胃黏膜组织形态改善更明显,胃黏膜c-myc、p53 mRNA表达上升,PCNA、Ag-NOR蛋白表达及凋亡指数下降,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 胃黏膜细胞增殖凋亡与CAG的发展演化关系密切,柴芍六君汤对肝郁脾虚型CAG大鼠胃黏膜具有良好的保护和修复作用,其作用机制可能与抑制c-myc、p53、PCNA以及Ag-NOR等表达,从而调节胃黏膜细胞过度增殖凋亡有关。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎;柴芍六君汤;肝郁脾虚;大鼠模型;增殖凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0009-06

Effects of Chaishao LiuJun decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis factors in rats with chronic atrophic gastritis of liver depression and spleen deficiency

ZHU Jingru¹, HONG Yinjie¹, HUANG Wanyi², ZHANG Fei¹, TU Wenling¹, YANG Zongbao³, GAN Huijuan^{1*}

(1. Research Base of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.

2. School of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122.

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873237);福建省自然科学基金项目(2018J01889);福建省大学生创新创业训练项目(202010393025);福建中医药大学校管课题(X2020012)。

【作者简介】 朱景茹(1991—),女,硕士研究生,主要从事中医辨治消化性疾病的理论与临床研究。E-mail: zjr19910520@163.com

【通信作者】 甘慧娟(1973—),女,教授,博士生导师,主要从事中医证的理论与临床研究。E-mail: hjganzz@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of Chaishao Liujun decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) of liver depression and spleen deficiency. **Methods** Twenty-six Sprague Dawley rats (male=13) were randomly divided into normal ($n=6$) and model groups ($n=20$). CAG rat models of liver depression and spleen deficiency were established and evaluated by the compound factor modeling method. After modeling, they were randomly divided into CAG, vitamin (VI group), and Chaishao Liujun decoction (CS group) groups, with six rats in each group. The normal group was not treated. During the intervention process, the CS group was administered Chaishao Liujun decoction $5.1 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, the VI group was given vitamin suspension $240 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, and the normal and CAG groups were given sterilized drinking water for 4 weeks. HE staining was used to observe pathological changes in the gastric mucosa. Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of apoptosis genes c-myc and p53 and Immunohistochemistry was performed to detect PCNA and Ag-NOR. TdT-mediated dUTP nick end labeling staining was undertaken to detect the apoptosis index of the gastric mucosa. **Results** Compared with the normal group, the activity of the rats in the CAG group was decreased, and the pathological changes showed atrophy of the inherent glands in the gastric mucosa, infiltration of inflammatory cells, and increased expression of c-myc, p53, PCNA, Ag-NOR and the apoptosis index in the gastric mucosa ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the CAG group, the activity of rats increased, the pathological atrophy of gastric mucosa improved to a certain extent, and the infiltration of inflammatory cells decreased in the VI and CS groups. The expression of c-myc, p53, PCNA, Ag-NOR and the apoptosis index in the gastric mucosa of rats in CS group was decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the expression of c-myc and p53 in the gastric mucosa of rats in the VI group decreased ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively), and the expression of PCNA, Ag-NOR, and the apoptosis index was decreased, with no significant difference ($P>0.05$). Compared with the VI group, the general condition and gastric mucosa morphology of the CS group were more significantly improved, c-myc and p53 mRNA expression was increased in the gastric mucosal, and the expression of PCNA and Ag-NOR and the apoptosis index were decreased, but the differences were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions**

The proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells are closely related to the development and evolution of CAG. Chaishao Liujun decoction has good therapeutic and repair effects on CAG rats with liver depression and spleen deficiency. The mechanism of action may be related to the inhibition of c-myc, p53, PCNA and Ag-NOR expression, regulating the excessive proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells.

【Keywords】 chronic atrophic gastritis; Chaishao Liujun decoction; liver depression and spleen deficiency; rat model; proliferation and apoptosis

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是临床常见的胃癌前期疾病, 可见胃黏膜组织病理萎缩、变薄, 是“炎癌转化”的关键环节^[1]。大量临床研究证实, 柴芍六君汤对 CAG 患者有显著疗效, 可以确切改善胃脘部不适症状, 逆转病理萎缩, 促进疾病向愈^[2-4]。然而, 柴芍六君汤防治 CAG 的整体调节机制尚未得到充分揭示, 因此, 有必要从分子生物学角度深入研究柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞增殖、凋亡的影响, 为中药防治 CAG、阻断其向胃癌进展的临床应用提供科学实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠, 8 周龄, 26 只, 雌雄各半, 体重 $(200 \pm 20) \text{ g}$, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK(沪) 2019-0005]。大鼠群养于垫玉米芯

的饲料笼中, 垫料 4 d 更换 1 次, 雌雄分笼饲养, 控制室温 $21^{\circ}\text{C} \sim 23^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%, 自由摄食饮水, 在厦门大学动物实验中心 [SYXK(闽) 2018-0009] 适应性喂养 7 d 后进行分组实验。本实验经厦门大学实验动物管理伦理委员会批准 (XMULAC20190142), 实验过程严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脱氧胆酸钠 (批号: 20190901, 北京奥博星生物技术); 25%~28% 氨水 (批号: C10586777, 上海百舜生物科技); 维酶素片 (批号: 20190405, 乐普恒久远药业); HE 染色试剂盒 (批号: J19S11Y125305, 上海源叶生物科技); 逆转录试剂盒 (批号: AJ52623A, 日本 TaKaRa 公司); PCNA 抗体 (货号: 24036, 美国 Proteintech 公司); Ag-NOR 染色液 (货号: G2015, 北京索莱宝科技); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (货号: C1088, 上海碧云天生物技术); 基因扩增仪、荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 正

置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);半自动切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物制备

维酶素混悬液:给药前用蒸馏水配制混悬液,按照大鼠是人常规剂量的 6 倍计算^[5],给药量为 240 mg/(kg·d)。柴芍六君汤出自《医宗金鉴》,组方:北柴胡 6 g,人参 9 g,白芍 4.5 g,白术 9 g,茯苓 9 g,法半夏 4.5 g,制陈皮 6 g,炙甘草 3 g,饮片由闽侯上街致诚医药商店提供,经鉴定为质量合格的中药饮片。常规煎煮 2 次后混匀,浓缩成含生药量 0.51 g/mL 中药汤剂,无菌纱布过滤后分装入瓶,4℃ 冰箱储存。

1.3.2 分组、造模与处理

26 只大鼠根据 Excel 随机生成数字分为 2 组,即正常组 6 只和造模组 20 只。正常组不予处理,造模组采用复合因素造模法^[6-7]建立肝郁脾虚型 CAG 大鼠模型:大鼠予每日现配的 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液和 0.1% 氨水溶液交替自由饮用,配合 2 d 足食、1 d 禁食的饥饱失常法,每日夹尾激惹 1 h,造模 10 周。造模组每 5 周随机抽取 1 只大鼠进行造模评价,取材胃黏膜组织观察形态色泽、皱壁厚薄及病理形态,结合大便性状、毛发色泽、精神状况及强迫游泳实验等结果综合判断。将成模大鼠随机分为 3 组,即模型组、维酶素组和柴芍六君汤组,每组 6 只。柴芍六君汤组予柴芍六君汤 5.1 g/(kg·d),维酶素组予维酶素混悬液 240 mg/(kg·d),正常组和模型组予灭菌饮用水,按体重 10 mL/kg 灌胃,干预 4 周后取材。修剪胃黏膜组织周边多余脂肪,生理盐水漂洗后观察胃黏膜形态色泽、皱壁厚薄,取胃窦部固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h,胃体部冻存-80℃ 冰箱备用。

1.3.3 胃黏膜组织形态学观察

胃黏膜组织经流水冲洗 6 h 后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋后切片,切片厚度约 4 μm,63℃ 烘片机烤片 4 h,脱蜡后行 HE 染色,显微镜观察胃黏膜组织病理结构变化。

1.3.4 qPCR 法检测胃黏膜凋亡基因 c-myc 和 p53 mRNA 水平

引物序列 5'-3': c-myc: F-TCTCCGTCCTATG TTGCG, R-GGCTGGTGCTGTCTTTTC; p53: F-GCGTT GCTCGATGCTGA, R-CAGCGTGATGATGTAAGG; β-actin: F-CTGGCTCCTAGCACCATGAA, R-AAAACGC

AGCTCAGTAACAGTC。引物由上海百赛生物技术有限公司设计合成。TRIzol 法提取胃黏膜组织总 RNA 并进行浓度测试,逆转录成 cDNA 后按照说明书配制反应体系,放入荧光定量 PCR 仪进行 qPCR 反应,记录各组 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法进行统计分析。

1.3.5 IHC 法检测 PCNA 和 Ag-NOR 含量

胃黏膜组织切片、脱蜡、水化后进行热抗原修复,10% 山羊血清室温封闭 1 h,一抗 37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗 4 次,加入二抗 37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗 10 次, DAB 显色,苏木素复染后流水冲洗 30 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后显微镜观察。运用软件 Image J v1.8.0 进行平均光密度 (IOD/area) 分析。

1.3.6 TUNEL 法检测胃黏膜细胞凋亡指数

胃黏膜组织脱蜡,蛋白酶 K 消化,按照说明书配制 TUNEL 试剂,加检测液 37℃ 避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,用抗荧光淬灭的封片液封片,绿色荧光发射波长为 515 ~ 565 nm,显微镜下计数阳性细胞个数。

1.4 统计学方法

运用软件 SPSS 23.0 进行统计分析,计量资料属正态分布用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,反之则用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。多组比较符合正态分布采用单因素方差分析,组间比较不符合正态分布用秩和检验。按 $\alpha=0.05$ 检验水准,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型评价

正常组大鼠活泼喜动,好奇心强,毛发洁白光泽,大便色褐且无明显臭味;胃黏膜组织形态正常,上皮细胞完整无缺损,固有腺体整齐规则。造模组大鼠毛发淡黄质硬,神态疲倦,大便味臭,溏结不调;胃黏膜组织固有腺体萎缩,炎性细胞浸润,主细胞和壁细胞减少;强迫游泳静止时间较正常组明显延长 ($P<0.01$)。见表 1。

2.2 大鼠一般情况比较

正常组大鼠毛发洁白光泽,活跃好奇,精力充沛,灌胃抵抗较明显;模型组大鼠毛发蓬松无光泽,色淡黄质硬,神态仍稍疲惫,偶见安静扎堆,反应较迟钝,灌胃时温顺不抵抗;维酶素组大鼠毛发蓬松,少有光泽,活泼警惕,灌胃偶有抵抗;柴芍六君汤组

大鼠毛发淡黄质硬,稍有光泽,活泼好动,灌胃抵抗。

2.3 大鼠胃黏膜组织形态学比较

正常组大鼠胃黏膜组织颜色鲜红,色泽光亮,黏膜皱襞丰富充盈,形态正常;光镜下可见组织结构完整,细胞排列紧密整齐,未见细胞坏死。模型组大鼠胃黏膜组织颜色稍灰暗,厚度变薄,色泽较差,皱襞减少甚至消失;固有腺体萎缩,炎性细胞浸润,部分细胞脱落、坏死,排列紊乱。维酶素组大鼠胃黏膜组织色泽鲜红,胃黏膜厚度较模型组增厚,黏膜皱襞增加;胃黏膜形态较模型组改善,炎性细胞浸润减轻,腺腔仍较大,细胞排列较整齐。柴芍六君汤组大鼠胃黏膜形态趋向于正常组,胃黏膜未见充血水肿,黏膜皱襞明显增多,厚度较厚;固有腺体萎缩改善,黏膜层连续完整,腺腔体积小,少量炎性细胞浸润。见图 1。

2.4 大鼠胃黏膜凋亡基因 c-myc 和 p53 比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均显著上升($P<0.01$);维酶素组和柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 p53 mRNA 表达上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),c-myc mRNA 表达较正常组均有上升趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比,维酶素组和柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均有上升趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。这说明柴芍六君汤和维酶素均能抑制肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度凋亡且作用基本一致。见表 2,图 2。

2.5 大鼠胃黏膜增殖因子 PCNA 和 Ag-NOR 比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA 蛋白表达显著上升($P<0.01$),柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均有上升趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达较模型组有下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 表达均有下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。这提示柴芍六君汤在抑制肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度增殖方面的效果要

优于维酶素。见表 3,图 3。

表 1 两组大鼠强迫游泳静止时间比较 M(P_{25} , P_{75})

Table 1 Comparison of static time in forced swimming of rats in two groups M(P_{25} , P_{75})

组别 Groups	静止时间(s) Immobile time
正常组 Normal group	45.74(39.45,60.81)
造模组 Model group	80.17(64.81,169.76) ^b

注:与正常组比较,^b $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$.

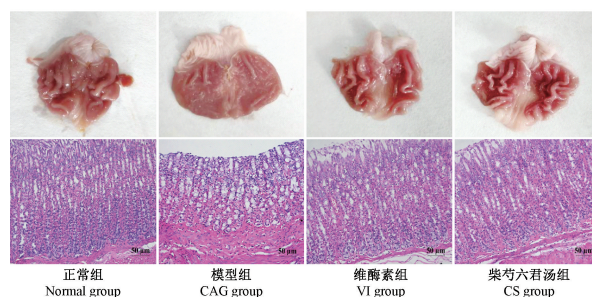


图 1 大鼠胃黏膜组织直观图与组织病理图(HE 染色)

Figure 1 Visual and histopathological images of gastric mucosa in rats (HE staining)

表 2 大鼠胃黏膜细胞凋亡基因 c-myc 和 p53 比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Comparison of apoptosis genes c-myc and p53 in gastric mucosa of rats

组别 Groups	c-myc	p53
正常组 Normal group	1.06±0.36	1.06±0.38
模型组 CAG group	11.42±3.21 ^b	17.26±6.28 ^b
维酶素组 VI group	3.44±1.62 ^d	5.80±1.85 ^{bc}
柴芍六君汤组 CS group	4.08±2.58 ^d	7.43±2.85 ^{ac}

注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with the CAG group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.



图 2 大鼠胃黏膜细胞凋亡基因 c-myc 及 p53 电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of apoptosis genes c-myc and p53 in rat gastric mucosa

2.6 大鼠胃黏膜凋亡指数比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜凋亡指数上升($P<0.05$)。与模型组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜凋亡指数下降($P<0.05$),维酶素组大鼠胃黏膜凋亡指数较模型组有下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜凋亡指数有下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。这表明柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度凋亡具有抑制作用。见表 4,图 4。

3 讨论

胃癌发病率和死亡率均居我国恶性肿瘤第 3 位,严重威胁人类生命健康,CAG 是由于多种致病因素关联作用于机体后出现胃黏膜侵袭与防御因

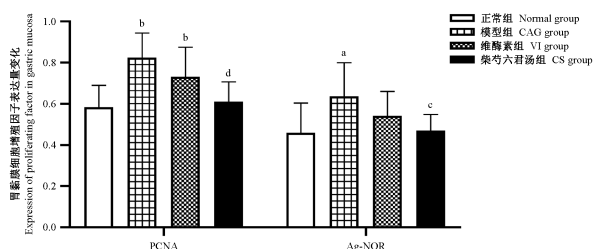
表 3 大鼠胃黏膜细胞增殖因子 PCNA 和 Ag-NOR 表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Comparison of PCNA and Ag-NOR expression in gastric mucosa of rats

组别 Groups	PCNA	Ag-NOR
正常组 Normal group	0.58±0.10	0.46±0.14
模型组 CAG group	0.83±0.12 ^b	0.64±0.16 ^a
维酶素组 VI group	0.73±0.14 ^b	0.54±0.12
柴芍六君汤组 CS group	0.61±0.77 ^d	0.47±0.77 ^c

注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with the CAG group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.



注:PCNA:增殖细胞核抗原; Ag-NOR:核仁组成区嗜银蛋白。

与正常组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$;与模型组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ 。

图 3 大鼠胃黏膜 PCNA 和 Ag-NOR 表达量

Note. PCNA, Proliferating cell nuclear antigen. Ag-NOR, Argyrophilic nucleolar organizer region protein. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with the CAG group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

Figure 3 Expression of PCNA and Ag-NOR in gastric mucosa of rats

素失衡的胃黏膜损伤性疾病,与胃癌的发病率呈正相关^[8-10],因此,对 CAG 采取早期干预措施,防止甚至逆转肠化生与上皮内瘤变的发生,是阻断胃癌进展的重要手段。中医认为脾胃虚弱是 CAG 的发病基础,气滞亦为本病核心,课题组前期研究表明,肝郁脾虚是 CAG 重要病理特点,二者常相互影响导致 CAG 的发病,又因气滞不行或脾虚不运,妨碍津液正常运行,以致痰聚湿阻,日久易致癌变^[11]。肝郁脾虚型病证结合动物模型一直是中医药基础研究的热点和特色理论,有学者从宏观表征、行为学以及理化指标方面进行模型评价^[12]。本实验造模结束后,造模组大鼠病理可见胃黏膜固有腺体萎缩,明显炎性细胞浸润;一般行为观察出现毛发色黄质硬,神态疲倦,大便溏结不调,安静扎堆,行为抑郁,强迫游泳静止时间明显延长,上述表现较符合肝郁脾虚型 CAG 的生物学特征,提示模型成功建立。柴芍六君汤是临床治疗肝郁脾虚型 CAG 的经典方剂,具有疏肝健脾化痰的作用,经本方治疗后,模型大鼠可见精神状态好转,活动度增加,胃黏膜皱襞明显增多、固有腺体萎缩改善、少量炎性细胞浸润。本实验结果提示,柴芍六君汤能够明显改善肝郁脾虚型 CAG 大鼠的精神及活动状态,促进胃黏膜组织损伤修复。

CAG 发生发展过程中涉及胃黏膜细胞信号转导紊乱和多基因表达异常,细胞增殖、凋亡失衡是 CAG

表 4 大鼠胃黏膜凋亡指数比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Comparison of gastric mucosal apoptosis index in rats

组别 Groups	凋亡指数(%) Apoptosis index
正常组 Normal group	0.19±0.07
模型组 CAG group	0.64±0.21 ^a
维酶素组 VI group	0.39±0.16
柴芍六君汤组 CS group	0.19±0.51 ^b

注:与正常组比较, ^a $P<0.05$;与模型组比较, ^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the CAG group, ^b $P<0.05$.

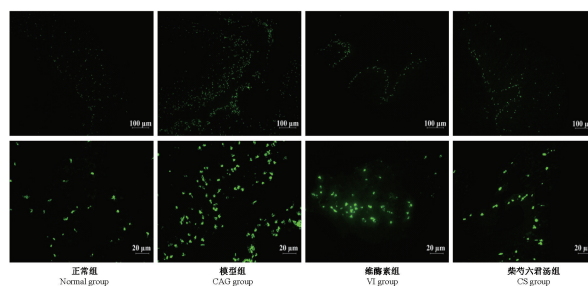


图 4 大鼠胃黏膜凋亡情况

Figure 4 Apoptosis of gastric mucosa in rats

发生的关键因素之一,有研究指出,促凋亡基因 *c-myc* 和 *p53* 等异常表达均可能参与癌变的某个环节^[13-14]。*c-myc* 作为原癌基因磷酸化蛋白质,能够直接控制 DNA 的合成,在细胞凋亡、分化、黏附以及细胞周期调控中发挥重要作用,可以维持胃癌细胞的恶性表型,在 CAG 甚至胃癌中存在过表达情况^[15]。*p53* 是肿瘤抑制基因,能够监护细胞基因的完整性,其蛋白活化水平的增加可降低细胞发生凋亡反应的阈值,癌组织分化越差,*p53* 异常表达的分布就越广泛^[16]。本实验结果显示,模型组大鼠存在胃黏膜细胞过度凋亡的表现,凋亡基因 *c-myc*、*p53* 以及凋亡指数表达均升高,经药物干预后,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达和凋亡指数均下降,维酶素组大鼠胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达下降,凋亡指数有下降趋势但无统计学差异,提示柴芍六君汤和维酶素都能够有效抑制 CAG 大鼠胃黏膜细胞的过度凋亡,下调胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达水平,从而起到治疗肝郁脾虚型 CAG 的作用。

PCNA 主要参与细胞 DNA 复制、修复及细胞周期调控等多个重要环节,其含量反映出细胞的生长速度及状态,对胃癌癌前病变的诊断、分级、指导治疗、预后转归具有实用性价值,是具有代表性的细胞增殖标记物^[17]。Ag-NOR 含量取决于转录活动的水平和染色体组中携带 NOR 染色体的数量,细胞增殖活跃导致 Ag-NOR 大量增加,细胞中 Ag-NOR 的含量对胃黏膜变异程度研究有着重要意义^[18]。IHC 检测结果证实,模型组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白存在高表达,经药物干预后,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达水平均出现不同程度的下降,维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达有下降趋势但无统计学差异,表明柴芍六君汤能够对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞的过度增殖起抑制作用,且相较于阳性药物维酶素具有更大的治疗优势。

综上所述,柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠精神状态和病理形态具有明显改善作用,且能够下调胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 和 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达水平,抑制胃黏膜细胞过度增殖、凋亡。因此认为,柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠的整体治疗作用可能与调控胃黏膜细胞过度增殖、凋亡,从而使其增殖、凋亡水平趋向于平衡状态有关。此外,是否还涉及其他更多增殖凋亡基因参与或者信号转导通路的影响,还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] 于春月,李依聪,苏泽琦,等.慢病消对慢性萎缩性胃炎大鼠血清炎症指标 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(5):1979-1983.
- [2] 刘丽,韩远峰,郭益湘.柴芍六君汤合丹参饮加减治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察[J].实用中医药杂志,2017,33(2):123-124.
- [3] 马立华,蔡柏.柴芍六君加味方抑制慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜腺体萎缩及机制研究[J].西部中医药,2019,32(7):80-82.
- [4] 洪婷,黄青,彭胜男,等.加味柴芍六君汤治疗慢性非萎缩性胃炎(脾虚肝郁型)60 例[J].江西中医药,2014,45(6):24-26.
- [5] 邵义祥.医学实验动物学教程[M].南京:东南大学出版社,2016.
- [6] Liu Y, Li X, Qin X. Saccharum Granorum ameliorated mitochondrial dysfunction in chronic atrophic gastritis rats using organelle-specific metabolomics and network pharmacology approaches[J]. Food Res Int, 2020, 136:109503.
- [7] 严茂祥.大鼠胃黏膜癌变模型的建立[J].浙江中医学院学报,2008,22(2):3-5.
- [8] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [9] 房静远,杜奕奇,刘文忠,等.中国慢性胃炎共识意见(2017 年,上海)[J].胃肠病学,2017,22(11):670-687.
- [10] 纪润壁,马吉春,闻向梅,等.大鼠胃炎癌转化模型建立与早期诊断方法探索[J].中国实验动物学报,2018,26(4):444-447.
- [11] 甘慧娟,梁丽丽,韩木龙,等.慢性胃炎的证素分布特征及与性别关系的研究[J].中华中医药杂志,2015,30(7):2456-2459.
- [12] 刘佳,许可,张兰.肝郁脾虚证动物模型评价方法[J].中医药导报,2019,25(23):120-122.
- [13] Wei W, Li L, Wang X, et al. Overexpression of caudal type homeobox transcription factor 2 inhibits the growth of the MGC803 human gastric cancer cell line *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1):905-912.
- [14] 杨宗保,王亚东,常小荣,等.电针抑制慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡的作用机制研究[J].中华中医药杂志,2016,31(8):3005-3008.
- [15] 魏玥,杨晋翔,王再见,等.益气化瘀解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生大鼠 *c-myc* 的影响[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2013,20(1):12-15.
- [16] 陈华,吴小红,谢忠忱,等.*C-myc*、*p53* 基因和 AFP 在家兔诱发性肝癌及癌旁组织中的表达[J].中国实验动物学报,2004(4):231-234.
- [17] 陆喜荣,陶鸣浩,杨炜,等.健脾理气、活血化瘀法促进慢性萎缩性胃炎大鼠胃腺体增殖的作用机制[J].中医药导报,2020,26(15):33-35,39.
- [18] 杨宗保,王晨光,陈娇龙,等.艾灸对慢性萎缩性胃炎癌前病变大鼠胃黏膜细胞增殖因子的影响[J].中国针灸,2015,35(12):1269-1273.

[收稿日期]2020-08-10