

基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨半夏泻心汤 对 PLGC 大鼠黏膜微环境的影响

刘嘉诚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:对胃癌前病变(Precancerous Lesion of Gastric Cancer, PLGC)模型大鼠从整体、细胞及分子水平的指标进行观察,分析其胃黏膜微环境的特点,并初步探讨半夏泻心汤对其胃黏膜的作用机制。方法:清洁级雄性SD大鼠70只,随机分成3组:模型组50只,造模加中药干预组10只,空白组10只。采用改良MNNG+复合法制备PLGC大鼠模型,于造模中期第10周、造模结束期第20周,各组随机抽取5只大鼠,分别从整体水平、细胞水平及分子水平检测半夏泻心汤对其胃黏膜微环境的影响。结果:1)启动子PTEN,造模加中药干预组较模型组表达高,但仍低于空白组;2)调控器PI3K/Akt/mTOR信号通路,PI3K、Akt、mTOR的表达造模加中药干预组较模型组低,但仍高于空白组;3)效应子HIF-1 α 及其下游基因,造模加中药干预组较模型组表达低,但仍高于空白组;上述结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:中药半夏泻心汤通过影响PLGC大鼠胃黏膜组织微环境变化的3个关键环节,即PI3K/Akt/mTOR信号通路中的启动子、调控器及效应子,从而影响并阻断PLGC的发生发展。

[关键词] 胃癌前病变;半夏泻心汤;PI3K/Akt/mTOR通路;黏膜微环境;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.12.050

Effect of Banxia Xiexin decoction on mucosal microenvironment in rat model of PLGC based on the PI3K/Akt/mTOR pathway

LIU Jiacheng¹, 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 observe various indices of a rat model of precancerous lesion of gastric cancer (PLGC) at gross, cellular, and molecular levels, to analyze the characteristics of gastric mucosal microenvironment in the rats, and to primarily explore the mechanism of action of Banxia Xiexin decoction on gastric mucosa. Methods: A total of 70 clean male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: 50 in model group, 10 in modeling plus traditional Chinese medicine treatment group (MTCM group), and 10 in blank group. The rat model of PLGC was established by modified MNNG + composite method. At the 10th week of modeling (interim period) and the 20th week of modeling (end period), 5 rats were randomly selected from each group to determine the effect of Banxia Xiexin decoction on gastric mucosal microenvironment in the rats at gross, cellular, and molecular levels. Results: 1) The MTCM group had a higher expression level of the promoter PTEN than the model group, but it was still lower than that in the blank group; 2) The MTCM group had a lower expression level of the signal pathway regulators PI3K/Akt/mTOR than the model group, but it was still higher than that in the blank group; 3) The MTCM group had a lower expression level of the effector HIF-1 α and its downstream genes than the model group, but it was still higher than that in the blank group; all the differences in the above results were significant ($P < 0.05$). Conclusion: The traditional Chinese medicine Banxia Xiexin decoction affects and prevents the development and progression of PLGC by involving three key steps in the microenvironmental changes of gastric mucosa in the rats with PLGC, namely promoters, regulators, and effectors in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[Key words] precancerous lesion of gastric cancer; Banxia Xiexin decoction; PI3K/Akt/mTOR pathway; mucosal microenvironment; experimental study

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:刘嘉诚,男,2016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

胃癌是全球常见的恶性肿瘤,预后相对较差,严重威胁人类健康。根据国际癌症研究机构的统计数据,2012 年全球胃癌新发病例约 95.1 万例,因胃癌死亡病例约 72.3 万例,分别位于恶性肿瘤发病率第 5 位、病死率第 3 位。超过 70% 的胃癌新发病例发生在发展中国家,约 50% 的病例发生在亚洲东部,主要集中在中国^[1]。影响胃癌发生、发展的因素是多层次、多方面的,故实施针对病因的一级预防比较困难,因此对胃癌前病变(PLGC)的研究成为了胃癌二级预防的重要内容之一。本实验旨在通过研究半夏泻心汤对 PLGC 大鼠胃黏膜微环境的影响来探讨辛开苦降、寒热平调代表方半夏泻心汤对 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(动物合格证号:11400700193917)70 只,鼠龄 15d,体质量(120 ± 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 1g/L 的母液,4℃ 避光储存,临用时用双蒸水配成 100μg/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。按邓中甲主编的第七版《方剂学》教材所载比例及煎药方法。中药汤剂浓缩为 0.75g(生药)/ml 以灌胃。大鼠用量根据《药理实验方法学》人和动物间接按体表面积折算的等效剂量计算法确定。

2 实验方法

2.1 动物分组、造模及给药 将 70 只实验大鼠随机分为 3 组:模型组 50 只,造模加中药干预组 10 只,空白组 10 只,采用改良 MNNG + 复合法造模^[2]进行 PLGC 大鼠造模。模型组每天自由饮用 167mg/L 的 MNNG 溶液,每 24h 更换 1 次药液,造模期间不再给予其他饮水,同时食用含 0.03% 雷尼替丁的饲料,于每天下午灌胃 0.017mol/L 浓度的 MNNG 溶液 1ml;造模期间每进食 2d 禁食 1d,并在禁食当天下午用 56℃、15% 氯化钠注射液按 10ml/kg 灌胃攻击,连续 24 周;造模加中药干预组在造模组处理基础上,每天 2 次灌服半夏泻心汤 2ml(含生药 1.5g)/100g 体质量;空白组正常喂养。分别于造模中期第 10 周,造模结束期第 20 周,各组随机抽取 5 只大鼠,处死后取标本进行指标检测。剩余 40 只模型组大鼠进入后期实验。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 从微环境整体水平观察胃黏膜外观形态 包括黏膜颜色改变、血管透见及腺体改变。

2.2.2 从微环境细胞水平检测半夏泻心汤对组织病理学的影响 动物处死后,取全胃,沿胃大弯剪开,取胃窦和胃体部。4% 多聚甲醛浸渍固定 12h 以上,冲水 24h,50%、75%、95%、100% 乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡后,石蜡包埋。切片厚 5μm,常规苏木精-伊红染色病理学检查。观察指标及

病情分级标准: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。

2.2.3 从微环境分子水平检测半夏泻心汤对启动因素、PI3K/Akt/mTOR 信号通路、效应子的影响 (1)PTEN。按 PTEN 原位杂交检测试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司)说明书进行操作。(2)PI3K、Akt、mTOR、HIF-1α。①PI3K/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 者为阳性。②HIF-1α: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;(+++):≥ 50% 的细胞核染色,和(或)较强的胞质染色。(3)Bcl-2 mRNA、Bax mRNA、P53 mRNA。按各自所对应的原位杂交检测试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司)说明书进行操作。

2.3 统计学方法 统计分析采用 SPSS 25.0 统计软件。定量资料,满足正态分布者,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 模型组、干预组和空白组分别于第 11、14、18 周各死亡 1 只大鼠。造模中期第 10 周检测发现成模率很低,无统计学意义。故实验结果以造模结束期第 20 周为准。

3.2 肉眼观察 空白组胃黏膜粉红色,表面光滑,覆有较多黏液,黏膜皱襞平整光滑,胃壁弹性好。模型组黏膜粗糙,呈灰白色或红白相间,黏液较少,甚至出现单个或多个结节,黏膜皱襞不完整,胃壁弹性差。造模加中药干预组胃壁弹性多相对较好,胃黏膜色泽淡红、皱襞较完整,其表面见中等量黏液附着。

3.3 病理观察 空白组胃黏膜厚度正常,上皮细胞及腺体完整且排列整齐,大小形状较一致,血管形态正常,个别有轻度慢性炎症;模型组胃黏膜萎缩变薄,腺体数量减少且有不同程度萎缩,固有层内可见毛细血管扩张淤血,间质内有淋巴细胞浸润、结缔组织增生和肠上皮化生以及上皮不同程度的非典型增生;造模加中药干预组有程度不等的慢性浅表性或萎缩性胃炎,肠上皮化生等改变,但程度较模型组轻。

3.4 分子水平观察

3.4.1 各组 PTEN 的表达情况比较 与模型组比较,造模

加中药干预组大鼠胃黏膜组织中的 PTEN 表达高,但均低于空白组,差异均有统计学意义。(见表 1)

3.4.2 各组 PI3K、Akt、mTOR 的表达情况比较与模型组比较,造模加中药干预组大鼠胃黏膜组织中的 PI3K、Akt、mTOR 表达均降低,但均高于空白组,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组 PI3K、Akt、mTOR 阳性细胞计数及评分比较(̄x±s)

组别	n	PI3K		AKT		mTOR	
		阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)
模型组	4	15.25±3.86	2.00(1.50,2.00)	20.75±4.35	2.00(1.50,2.00)	20.75±2.22	2.00(1.50,2.00)
空白组	4	33.50±3.42 ^a	1.00(1.00,1.00) ^a	10.00±2.58 ^a	1.00(1.00,1.00) ^a	9.00±3.37 ^a	1.00(1.00,1.00) ^a
造模加中药干预组	4	24.75±3.50 ^{ab}	1.00(1.00,1.50)	17.00±2.58 ^b	1.00(1.00,1.50)	17.50±2.38 ^b	1.50(1.00,2.00)

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与空白组比较,^b*P*<0.05。

3.4.3 各组 HIF-1α 的表达情况比较与模型组比较,造模加中药干预组大鼠胃黏膜组织中的 HIF-1α 表达降低,但均高于空白组,差异有统计学意义。(见表 3)。

3.4.4 各组 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA、P53 mRNA 的表达情况与模型组比较,造模加中药干预组大鼠胃黏膜组织中的 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达均降低,但均高于空白组,差异有统计学意义;与模型组比较,造模加中药干预组大鼠胃黏膜组织中的 P53 mRNA 表达高,但低于空白组,差

表 4 各组 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA、P53 mRNA 阳性细胞计数及评分比较(̄x±s)

组别	n	Bcl-2 mRNA		BAX mRNA		P53 mRNA	
		阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)	阳性率(%)	评分(分)
模型组	4	34.00±2.58	3.00(3.00,3.00)	11.75±2.75	1.00(1.00,1.00)	12.25±2.22	1.00(1.00,1.00)
空白组	4	19.00±3.65 ^a	1.50(1.00,2.00) ^a	36.00±2.58 ^a	3.00(3.00,3.00) ^a	38.25±2.99 ^a	3.00(3.00,3.00) ^a
造模加中药干预组	4	26.75±2.22 ^{ab}	2.00(2.00,2.00) ^a	19.25±3.86 ^{ab}	1.50(1.00,2.00) ^b	19.75±2.75 ^{ab}	1.50(1.00,2.00) ^b

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与空白组比较,^b*P*<0.05。

4 讨 论

本课题组通过前期研究发现,半夏泻心汤对肠化生和不典型增生等癌前病变具有较好的阻断和逆转作用,但主要机制尚不完全清楚。肿瘤微环境(TME)的研究已成为近年来肿瘤防治的热点,其中低氧是恶性肿瘤微环境的特征之一^[2]。低氧微环境是 PLGC 向胃癌形成过程中的重要因素,具体来讲就是在缺氧条件下可引起局部微环境 PTEN 表达降低^[3-4],由于缺氧对 PI3K/Akt 的作用似乎是细胞特异的^[5],将使信号通路 PI3K-Akt 以及下游 mTOR 相继被激活,而 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活化可通过多种途径上调 HIF-1α 的表达^[4],势必引起 HIF-1α 表达增加,导致其下游靶基因激活,反过来进一步加重微环境缺氧。此外,低氧条件下 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路调节失常,造成下游涉及多个癌基因如 Bcl-2、Bax 等的激活和抑癌基因如 P53 等的失活。如此形成恶性循环,最终导致胃黏膜环境失和。

半夏泻心汤是“和法”的代表方剂。寒热互用以和其阴阳,苦辛并进以调其升降,补泻兼施以顾其虚实是其组方特

表 1 各组 PIEN 阳性细胞计数及评分比较(̄x±s)

组别	n	阳性率(%)	评分(分)
模型组	4	15.25±3.86	1.00(1.00,1.50)
空白组	4	33.50±3.42 ^a	3.00(3.00,3.00) ^a
造模加中药干预组	4	24.75±3.50 ^{ab}	2.00(2.00,2.00) ^{ab}

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与空白组比较,^b*P*<0.05。

表 3 各组 HIF-1α 阳性细胞计数及评分比较(̄x±s)

组别	n	阳性率(%)	评分(分)
模型组	4	22.50±2.65	2.00(2.00,2.00)
空白组	4	9.50±3.42 ^a	1.00(1.00,1.00) ^a
造模加中药干预组	4	16.25±3.86 ^{ab}	1.50(1.00,2.00)

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与空白组比较,^b*P*<0.05。另有统计学意义。(见表 4)

点。本研究结果显示半夏泻心汤针对 PLGC 的主要病机,从整体观念调控 PLGC 向胃癌转变时微环境变化的 3 个关键环节,使细胞的生存环境得到优化,即所谓“阴阳调和”,从而抑制疾病发展,防止胃癌的发生。

参考文献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(5):359-386.

[2] 郭花,朱金水. 低氧微环境与胃癌[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(21):2381-2384.

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

[4] 魏晓萍,惠起源,王圣巍. 缺氧诱导因子-1α 与胃癌治疗研究的新进展[J]. 天津医药, 2011, 39(3):283-285.

[5] 郭花,朱金水,王龙,等. PI3K/Akt 信号通路及 HIF-1α 在胃癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(10):1913-1916.

(收稿日期:2018-05-22)