

和蛋白的表达较正常对照组均明显增多, 附子-白术药对组、白术附子汤组 M-CSF、PTHrP 基因和蛋白的表达较模型组均明显减少, 而两组间 M-CSF、PTHrP 基因和蛋白的表达无统计学意义, 说明附子-白术药对、白术附子汤均可下调骨破坏因子 M-CSF、PTHrP 基因和蛋白的表达, 抑制破骨细胞的分化, 促进乳腺癌骨转移组织的修复。

综上所述, 白术附子汤和附子-白术药对均可延长乳腺癌骨转移裸鼠模型的生存时间, 抑制骨转移灶中破骨细胞的表达, 下调乳腺癌骨转移组织中骨破坏因子 M-CSF、PTHrP 基因和蛋白的表达, 从而抑制破骨细胞的分化, 促进乳腺癌骨转移组织的修复; 附子-白术药对与白术附子汤功效相近, 可能是白术附子汤的核心药物。

参考文献:

- [1] Akhtari M, Mensuri J, Newman KA, et al. Biology of breast cancer bone metastasis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(1): 3-9.
- [2] Coleman RE, Lipton A, Roodman GD, et al. Metastasis and bone loss: advancing treatment and prevention[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36: 615-620.
- [3] Amir E, Ocana A, Seruga B, et al. Medical oncology: Zoledronic acid for breast cancer therapy-induced bone loss[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7: 187-188.
- [4] 程旭峰, 张新峰, 刘琦, 等. 《金匱》白术附子汤加味治疗乳腺癌骨转移例临床观察[J]. *中医学报*, 2012, 27(3): 266-269.
- [5] 程旭峰, 刘胜, 杨顺芳, 等. 放射性核素骨显像支持下建立乳腺癌骨转移裸鼠模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(9): 1588-1590.
- [6] Matsumoto S, Kimura S, Segawa H, et al. Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines[J]. *Lung Cancer*, 2005, 47(1): 31-39.
- [7] Hiraga T, Myoui A, Choi ME, et al. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor enhances bone metastases in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (4): 2067-2073.
- [8] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(Suppl1): S1-S7.
- [9] 刘正霞, 徐阳, 徐进梅, 等. 不同引物及数据分析方法对定量 PCR 结果的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(8): 1112-1117.
- [10] 张登本. “肾主骨”理论的发生及其意义[J]. *河南中医学院学报*, 2007, 22(3): 6.
- [11] Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, et al. Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption[J]. *Bone*, 2004, 34(1): 187-194.
- [12] 韩艳久, 彭昊, 方洪松, 等. M-CSF 的表达与骨巨细胞瘤病理分级及生物学行为的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2009, 30(2): 248-252.
- [13] Guise TA, Chirgwin JM. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 415(Suppl): S32-S38.

(编辑: 梁进权)

胃痞消对慢性萎缩性胃炎大鼠 NF- κ Bp65 mRNA 表达的影响

郭亚蕾^{1,2}, 潘华峰², 饶 晶² (1. 三亚市中医院, 海南 三亚 572000; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 观察胃痞消对慢性萎缩性胃炎癌前病变大鼠 NF- κ Bp65 mRNA 表达的影响。**方法** SD 大鼠随机分为正常对照组, 模型组, 维酶素组, 胃痞消高、中、低剂量组, 用 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍溶液 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 复制慢性萎缩性胃炎 (CAG) 模型。RT-PCR 检测 NF- κ Bp65 mRNA 表达。**结果** 模型组 NF- κ Bp65 mRNA 的表达增强, 与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。胃痞消高、中、低剂量组和维酶素组 NF- κ Bp65 mRNA 的表达降低, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 胃痞消可以下调胃癌前病变大鼠 NF- κ Bp65 mRNA 的表达, 从而阻止 CAG 胃癌前病变的发展。

关键词: 胃痞消; 慢性萎缩性胃炎; 癌前病变; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0445-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.003

收稿日期: 2012-11-05

作者简介: 郭亚蕾, 女, 博士研究生, 研究方向: 脾胃病的临床与基础研究。Email: 770217837@qq.com。通讯作者: 潘华峰, 教授, 博士, 研究方向: 脾胃病的临床与基础研究。Email: gzphf@126.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2011010003685)。

Influence of *Weipixiao* on the NF- κ Bp65 mRNA Expression in Rats with Chronic Atrophic Gastritis

GUO Yalei^{1,2}, PAN Huafeng², RAO Jing² (1. Sanya Traditional Chinese Medical Hospital, Sanya 572000 Hainan, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the influence of *Weipixiao* on the NF- κ Bp65 mRNA expression in chronic atrophic gastritis rats with precancerous lesion. **Methods** SD rats were randomized into normal control group, model group, vitacoenzyme group, and high-, middle- and low-dose *Weipixiao* groups. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine was adopted to establish the CAG model, and RT-PCR was used to detect the expression of NF- κ Bp65 mRNA. **Results** The expression of NF- κ Bp65 mRNA was increased in the model group ($P < 0.05$ compared with that in the normal control group), and then was decreased in vitacoenzyme group and high-, middle- and low-dose *Weipixiao* groups ($P < 0.05$ compared with that in the model group). **Conclusion** *Weipixiao* can down-regulate the expression of the NF- κ Bp65 mRNA in rats with precancerous lesion of gastric carcinoma(PLGC), so it can prevent the development of PLGC in CAG rats.

Keywords: *Weipixiao*; Chronic atrophic gastritis; Precancerous lesion; Nuclear factor- κ B

在世界范围内最常见的恶性肿瘤中,胃癌发病排第4位^[1]。在我国大中城市中胃癌居男性恶性肿瘤发病的第2位,死亡率则居恶性肿瘤的第1位^[2]。慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)被认为是一种癌前疾病,CAG基础上伴有肠上皮化生和不典型增生则是胃癌的癌前病变(gastric precancerous lesions, PLGC)。阻断及逆转癌前病变对降低胃癌的发病率,防治胃癌具有重要的意义,因此开发研制阻断及逆转胃癌前病变的相关药物显得极其紧迫而必要。胃癌消是我们临床应用多年的治疗CAG癌前病变的有效中药复方,前期研究^[3-4]显示,胃癌消可以逆转及阻断癌前病变进一步发展,可通过促进p53和Bax表达,同时抑制Bcl-2表达,阻止CAG脾虚大鼠胃黏膜上皮细胞从G₀/G₁期进入S期,并通过诱导凋亡,抑制胃癌前病变不典型增生基础上的癌性恶变。本研究从启动细胞增殖、凋亡的核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)通路入手,研究胃癌消治疗CAG癌前病变的作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级SD大鼠,雄性,体质量(200±20)g,中山大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2011-0029,动物质量合格证号:0094983。

1.2 药物及试剂 胃癌消,组方为黄芪、白术、太子参、丹参、白花蛇舌草,饮片购自广州中医药大学门诊部中药房,由广东省中医研究所制备成水提液,4℃恒温冰箱保存。1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍

(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG),东京化成工业株式会社,批号:ZG4T1-FP;维酶素片,北海阳光药业有限公司,批号:110310;乌拉坦,中国医药上海试剂化学公司,批号:20080512;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、Maxima™ SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)、GeneRuler™ 100 bp DNA Maker,美国Fermentas公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇、冰乙酸均为国产分析纯。

1.3 仪器 BX60光学显微镜,日本OLYMPUS公司;IQTM5型荧光定量PCR仪、SmartSpec plus核酸蛋白测定仪、PowerPac Basic电泳仪,美国Bio-Rad公司;AlphaImager HP凝胶成像分析系统,美国Alpha Innotech公司;Milli-Q Plus超级纯水仪,美国Millipore公司;JY-SPC水平电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;FA/JA精密电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司。

1.4 CAG大鼠模型的复制 用灭菌自来水将MNNG配制成10 g·L⁻¹的储存液,避光冷藏保存,用时将其配成167 mg·L⁻¹的饮用液,配制及保存均避光。将动物随机分为正常对照组、模型组。模型组大鼠自由饮用MNNG溶液代替饮用水,每天更换,同时每天下午灌胃MNNG溶液1 mL。模型复制期间每进食2 d,禁食1 d,并在禁食当天下午用40%酒精2 mL灌胃攻击。每周用止血钳夹尾刺激(以不破皮流血为度),使之保持激怒、争斗状态,持续30 min,连续16周,16周末随机取模型大鼠10只,光镜下

观察,以确认 CAG 大鼠模型。

1.5 分组及给药 将模型大鼠随机分为模型组(17 只),胃痞消高、中、低剂量组及维酶素组(各 12 只),并设正常对照组(10 只)。从实验第 17 周开始,正常对照组灌胃等量生理盐水,胃痞消高、中、低剂量组分别灌胃胃痞消水煎剂 30, 20, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹,相当于临床用量的 15, 10, 5 倍。维酶素组灌胃维酶素 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃容积为 2 mL·kg⁻¹,共 4 周。于第 20 周末,禁食禁水 12 h 后取样。

1.6 标本制备 脱颈椎处死动物,剖取全胃,沿大弯剪开,从前胃至胃窦切取胃黏膜组织,10 %中性福尔马林固定,留取部分胃黏膜立即置于 -70 ℃ 低温冰箱中保存。

1.7 大鼠胃黏膜组织病理学观察 取固定好的胃黏膜组织,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察^[5]。胃黏膜组织病理改变的诊断标准参照实验性胃腺癌的分类和诊断标准^[6]。

1.8 RT-PCR 检测 NF-κBp65 mRNA 表达 根据 GenBank 提供的基因序列设计特异性引物,引物设计用 Primer 5.0 生物软件,用于扩增内参 18S(GenBank accession no. M11188)和 NF-κBp65(NM_199267)等基因引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。设计的引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL, Maxima™ SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) 12.5 μL, 上游引物、下游引物各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL, 总体积 25 μL。置荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。

表 1 扩增基因的引物信息

Table 1 Primer information for gene amplification

基因名称	引物序列	产物大小
18S	F(5'-3'): TCAGCCACCCGAGATT	204 bp
	R(5'-3'): GCTTATGACCCGCACTTA	
NF-κBp65	F(5'-3'): TGGAGCAAGCCATTAG	189 bp
	R(5'-3'): GGGCACGGTTATCAA	

反应条件: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 55 ℃,

30 s; 72 ℃, 50 s, 45 个循环; 72 ℃, 7 min。每组 6 个样品,分别取 1 μL 作为 cDNA 模板扩增,记录各个样品扩增反应的 Ct 值,运用公式 2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量。

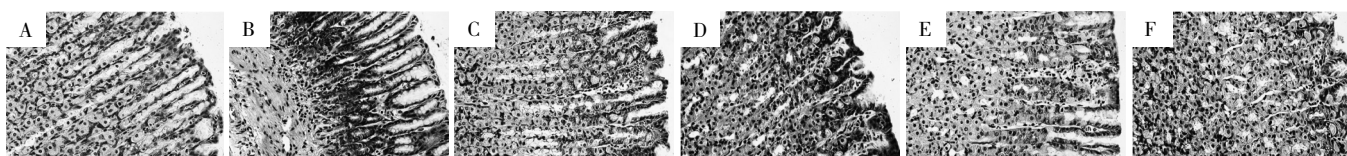
$$F=2^{-\left(\frac{\text{待测组目的基因}}{\text{平均 } \alpha \text{ 值}} - \frac{\text{待测组内参基因}}{\text{平均 } \alpha \text{ 值}}\right) - \left(\frac{\text{对照组目的基因}}{\text{平均 } \alpha \text{ 值}} - \frac{\text{对照组内参基因}}{\text{平均 } \alpha \text{ 值}}\right)}$$

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件,多组比较采用单因素方差分析,用 Student-Newman-Keuls 进行两两比较,数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠胃黏膜组织病理学的影响 光学显微镜下观察,正常对照组大鼠胃黏膜上皮完整,上皮细胞排列整齐,无脱落或缺损,腺体形态规则,固有层未见炎细胞浸润,黏膜肌层完整(图 1A)。模型组大鼠胃黏膜不完整,呈灰白色,可见不同程度的变性或坏死的脱落细胞,黏膜层变薄,黏膜皱襞变平或走向紊乱,且胃黏膜呈多灶性萎缩,腺体排列紊乱,部分腺体呈囊状扩张,上皮细胞形态大小不一,排列紊乱,核大深染,核浆比例增大,核形不规则,黏膜肌层向黏膜层延伸,间质水肿、充血、炎细胞浸润;胃组织受浸润的炎细胞主要是淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和少量单核细胞(图 1B)。维酶素组大鼠胃黏膜呈粉红色,光泽度欠佳,胃黏膜变薄、皱襞较紊乱,偶见炎细胞浸润;间质水肿、充血、炎细胞浸润(图 1C)。胃痞消中、低剂量组大鼠胃黏膜呈粉红色,光泽度差,胃黏膜变薄、皱襞紊乱;偶见间质水肿、充血,可见中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润(图 1D-E)。胃痞消高剂量组大鼠胃黏膜呈粉红色,光泽度欠佳;腺体排列相对较整齐,腺体形态尚规则;偶见间质水肿、充血,可见少量中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润(图 1F)。

2.2 对 CAG 癌前病变大鼠 NF-κBp65 mRNA 表达的影响 模型组 NF-κB p65 mRNA 的表达增强,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。维酶



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 维酶素组; D-F 分别为胃痞消低、中、高剂量组

图 1 胃痞消对大鼠胃黏膜组织病理学的影响(HE 染色 × 200)

Figure 1 The effect of Weipixiao on gastric mucosal histopathology in rats(by HE staining, × 200)

素组 NF- κ Bp65 mRNA 的表达降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。胃痞消高、中、低剂量组 NF- κ Bp65 mRNA 的表达降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中高剂量组作用最为显著,见表 2。

表 2 对 CAG 癌前病变大鼠 NF- κ Bp65 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of NF- κ Bp65 mRNA in each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	NF- κ Bp65 mRNA
正常对照组	10		0.9930 ± 0.04193
模型组	17		1.7290 ± 0.08104 [*]
维霉素组	12	0.2	1.3640 ± 0.04588 [#]
胃痞消高剂量组	12	30	1.1120 ± 0.04239 [#]
胃痞消中剂量组	12	20	1.2450 ± 0.03270 [#]
胃痞消低剂量组	12	10	1.3180 ± 0.05432 [#]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3 讨论

NF- κ B 信号通路的激活与肿瘤的发生、发展、浸润转移及肿瘤耐药等密切相关,其中 NF- κ B 在肿瘤细胞凋亡的调控中起关键性作用,抑制肿瘤细胞 NF- κ B 的活性可引起肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长^[7]。NF- κ B 主要通过参与多种凋亡相关基因(如 IAPs、Bcl-2、Bcl-xL、c-myc 等)的转录调控来实现抑制细胞凋亡的作用^[8]。已有的研究显示 NF- κ B 在癌症的早期事件中,通过激活癌基因转录,造成细胞凋亡/增殖失衡,参与细胞恶性转化而促肿瘤形成^[9]。大量的研究显示胃癌前病变及胃癌中存在 NF- κ B 信号通路的异常^[10-11]。崔涛等^[12]研究发现,随着轻度不典型增生、重度不典型增生向胃癌的演变,NF- κ B 阳性表达率逐渐上升,凋亡指数逐渐下降,在胃癌组织中 NF- κ B 与凋亡指数之间呈负相关。王维等^[13]研究发现在正常胃黏膜向肠化、异型增生、胃癌转变过程中,NF- κ Bp65 的阳性表达逐渐上升。

胃癌前病变属中医学胃脘痛、胃痞、积聚、腹胀等范畴,具有起病隐匿、症状不典型或缺如、病机复杂、病程缠绵、治疗棘手等特征。中医药治疗 CAG 具有一定优势。胃痞消是广东省著名的脾胃病专家余绍源教授拟订的复方制剂,具有益气运脾、化瘀解毒功效,前期研究显示其不仅可以明显改善 CAG 患者的临床症状,而且可以逆转及阻断胃癌前病变进一步发展^[3-4]。

本研究结果表明,在 CAG 癌前病变的胃组织中 NF- κ Bp65 mRNA 的表达率明显增高,胃痞消高、中、低剂量组能明显下调 NF- κ Bp65 mRNA 的表达。胃痞消治疗 CAG 胃癌前病变的作用与可能与其能下调胃癌前病变大鼠模型 NF- κ B 通路中 NF- κ Bp65 mRNA 的表达有关。

参考文献:

- [1] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. Journal of Clinical Oncology, 2006, 24(14): 2137-2150.
- [2] Wu CX, Zheng Y, Bao PP. Pattern of changing incidence of gastric cancer and its time trend in shanghai [J]. J Sur Concepts Prat, 2008, 13(1): 24-29.
- [3] 赵霞,潘华峰,鞠晓云,等.胃痞消对 CAG 脾虚大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及调控蛋白 Caspase-3 影响的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(1): 42-43.
- [4] 赵霞,潘华峰,鞠晓云,等.胃痞消抑制慢性萎缩性胃炎脾虚大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及调控蛋白 Caspase-3 和 P53 表达[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(13): 1018-1021.
- [5] 潘华峰,赵霞,鞠晓云,等.胃痞消对试验性大鼠慢性萎缩性胃炎的作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13(5): 287-289.
- [6] 孙丽群,胡运莲,谭大琦,等.加味左金丸治疗大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变的药理研究[J]. 湖北中医杂志, 2005, 27(4): 11-13.
- [7] Zhu BS, Xing CG, Lin F, et al. Blocking NF- κ B nuclear translocation leads to p53-related autophagy activation and cell apoptosis[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(4): 478-487.
- [8] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et al. To be, or not to be: NF- κ B is the answer--role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis[J]. Oncogene, 2003, 22(56): 8961-8982.
- [9] Staudt LM. Oncogenic Activation of NF- κ B [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(6): a000109.
- [10] Shibata W, Takaishi S, Muthupalani S, et al. Conditional deletion of IkappaB-kinase-beta accelerates helicobacter-dependent gastric apoptosis, proliferation, and preneoplasia[J]. Gastroenterology, 2010, 138(3): 1022-1034.
- [11] Ooi CH, Ivanova T, Wu J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer[J]. Plos Genetics, 2009, 5(10): e1000676.
- [12] 崔涛,朱祖安,刘莹,等. NF- κ B、bcl-2、bax 在胃不典型增生、胃癌中的表达及其意义[J]. 山东大学学报(医学版), 2006, 44(7): 689-693.
- [13] 王维,罗和生,余保平. 人胃癌及癌前病变中 NF- κ B 和 c-myc 蛋白的表达与意义[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(4): 285-287.

(编辑:梁进权)