

健脾化痰解毒方调控 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路干预胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞自噬及凋亡

黎乐怡^{1,2,3}, 卓俊城^{1,2,3}, 谢凯枫^{1,2,3}, 彭莎^{1,2,3}, 郑柳怡^{1,2,3}, 赵自明^{2,3}, 甘海宁^{2,3}, 黄雪君^{2,3}, 曾晓会^{2,3}[1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510095; 2. 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广东 广州 510095; 3. 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095]

摘要: **目的** 探讨健脾化痰解毒方(JPHY)调控 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路干预胃癌前病变(GPL)大鼠胃黏膜上皮细胞自噬及凋亡的机制。**方法** 采用 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)自由饮用+隔日禁食法造模 28 周复制 GPL 模型。将 SD 大鼠随机均分为空白组、模型组、维酶素组(270 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、JPHY 高剂量组(9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和 JPHY 低剂量组(4.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 18 只。第 15 周起, 各给药组大鼠每天灌胃给药(10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 1 次, 连续 25 周。分别于第 18、28 和 39 周, 每组随机取 6 只大鼠, 采用 HE 染色法观察大鼠胃黏膜组织病理学形态变化; Western Blot 法测定胃黏膜组织 PI3K、Akt、HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2、BAX 蛋白的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织固有腺变薄, 非固有腺锯齿样变, 弥漫性细胞空泡样变, 固有腺细胞变为体积小、胞质少、核质比例大、深染的异型增生细胞, 呈假复层、跨腺腔灶状分布, 有炎性细胞浸润, 表现为以肠上皮化生为主; 第 18 周, 大鼠胃黏膜组织的 PI3K、Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 28 周, PI3K、Akt、BAX 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), HIF-1 α 、Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.01$); 第 39 周, Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), PI3K、BAX 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, JPHY 高剂量组的胃黏膜改善作用最明显, 异型增生细胞数量、分布范围和分布密度有明显减少, 固有层厚度明显增加, 腺腔结构趋于正常; 第 18 周的 PI3K、Akt 蛋白表达明显上调($P < 0.01$), HIF-1 α 、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显下调($P < 0.05$); 第 28 周的 PI3K、Akt、BAX 蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), HIF-1 α 、Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值表达明显下调($P < 0.01$); 第 39 周 Akt 蛋白表达明显上调($P < 0.01$), HIF-1 α 、Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** JPHY 对 GPL 不同阶段的黏膜损伤均有明显保护作用, 可能与其通过 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路调节肿瘤缺氧微环境以及调控细胞自噬、凋亡作用有关。

关键词: 胃癌前病变; 健脾化痰解毒方; PI3K/Akt/HIF-1 α 通路; 自噬; 凋亡; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)10-1444-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.005

Jianpi Huayu Jiedu Decoction Intervenes the Autophagy and Apoptosis of Gastric Mucosal Epithelial Cells in Rats with Gastric Precancerous Lesions by Regulating PI3K/Akt/HIF-1 α Pathway

LI Leyi^{1,2,3}, ZHUO Juncheng^{1,2,3}, XIE Kaifeng^{1,2,3}, PENG Sha^{1,2,3}, ZHENG Liuyi^{1,2,3}, ZHAO Ziming^{2,3}, GAN Haining^{2,3}, HUANG Xuejun^{2,3}, ZENG Xiaohui^{2,3}(1. The Fifth Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 2. Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital

收稿日期: 2020-09-28

作者简介: 黎乐怡, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 1203500875@qq.com。通信作者: 曾晓会, 博士, 主任中药师, 研究方向: 中药防治胃癌前病变机理研究。Email: 277050896@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81704043); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2017A030313845, 2020A1515010692); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2020572); 广州市科技计划项目(202102080313)。

(Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510095 Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of *Jianpi Huayu Jiedu* (JPHY) decoction for cell autophagy and apoptosis of gastric mucosal epithelial cells (GECs) by regulating PI3K/Akt/HIF-1 α pathway in rats, so as to prevent and treat gastric precancerous lesions (GPL). **Methods** The modeling rats were orally administered 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and fasted every other day for 28 weeks. The SD rats were randomly divided into control group, model group, Vitacoenzyme group (270 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high dose JPHY decoction group (9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low dose JPHY decoction group (4.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 18 rats in each group. From the beginning of week 15, rats in each group were given corresponding drugs or purified water by gavage administration (10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) every day for 25 consecutive weeks. At three time nodes of weeks 18, 28 and 39, six rats were randomly selected from each group, and the histopathological morphological changes of gastric mucosa were observed by HE staining. The protein expressions of PI3K, Akt, HIF-1 α , Beclin1, Bcl-2 and Bax in gastric mucosa were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, in the model group, the intrinsic glands became thinner, the non-intrinsic glands showed serrated changes and the vacuolar cells were diffusely distributed. The intrinsic gland cells became dysplasia cells, which were small in size, few in cytoplasm, large in nucleocytoplasmic ratio and deep in staining. These cells were distributed in multi-layer and trans-glandular foci, which were called DYS foci, and inflammatory cell infiltration could be observed; the intrinsic gland became thicker while intestinal metaplasia (IM) was still the main feature. The expression of PI3K and Akt were significantly decreased at the week 18 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression of HIF-1 α , Beclin1, Bcl-2 and Bcl-2/Bax were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the week 28, the expression of PI3K, Akt and Bax decreased obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of HIF-1 α , Beclin1 and Bcl-2/Bax ratio increased obviously ($P < 0.01$). At the week 39, the expression of Akt decreased markedly ($P < 0.05$), and the expression of HIF-1 α , Beclin1, Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio increased markedly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, in the high-dose group of JPHY, the improvement effect was the most obvious, the number, distribution range and distribution density of dysplastic cells were significantly reduced, lamina propria thickness was significantly increased, and the glandular cavity structure tended to be normal. Additionally, the decreased protein levels of PI3K, Akt and Bax in model group were up-regulated by JPHY decoction ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while HIF-1 α , Bcl-2 and Bcl-2/Bax expression was down-regulated by JPHY decoction ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** JPHY decoction can prevent and treat different pathological stages of GPL, which may be related to the role of JPHY decoction on regulating tumor hypoxic microenvironment via PI3K/Akt/HIF-1 α pathway, promoting GECs apoptosis and inhibiting autophagy in different pathological stages of GPL.

Keywords: Gastric precancerous lesions; *Jianpi Huayu Jiedu* decoction; PI3K/Akt/HIF-1 α pathway; autophagy; apoptosis; rats

胃癌前病变 (Gastric precancerous lesions, GPL) 通常指在慢性萎缩性胃炎晚期胃黏膜萎缩的基础上, 合并胃黏膜上皮细胞的肠上皮化生 (IM) 和/或异型增生 (DYS) 的病理变化。我国是慢性萎缩性胃炎的高发区, 单纯胃黏膜萎缩的癌变率为 0%~2%, 而合并肠上皮化生的慢性萎缩性胃炎癌变率可高达 10%~30%^[1]。故阻断或延缓 GPL 期慢性萎缩性胃炎进展至胃癌, 对降低胃癌高发病率、高死亡率有重要意

义^[2]。研究^[3-4]表明, PI3K/Akt 信号通路在肿瘤发生发展的过程中发挥着重要的作用, 与细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移及自噬等密切相关。低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 作为调控肿瘤微环境的关键因子, 其高表达有助于细胞适应低氧微环境, 并受 PI3K/Akt 通路调控^[5]。因此, 基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路探讨胃黏膜上皮细胞自噬^[6]、凋亡有助于阐明 GPL 的发病机制。

目前,临床上对慢性萎缩性胃炎的治疗尚无特效药物,而中医药治疗具有独特优势^[7]。慢性萎缩性胃炎属中医学“胃痞”“胃痛”“胀满”的范畴,基本病机为虚、瘀、毒互结,治宜健脾、化瘀、解毒。健脾化瘀解毒方(JPHY)由四君子汤加减化裁而成,有健脾益气,化瘀解毒之功,临床上对慢性萎缩性胃炎疗效确切^[8]。故本研究拟采用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)复制 GPL 大鼠模型,基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路探讨 JPHY 抗 GPL 的效应及调控机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 98 只, SPF 级, 6~8 周龄, 体质量 150~180 g, 购自广东省实验动物中心, 生产许可证号: SYXK(粤)2018-0002, 质量合格证号: 44007200027077。

1.2 药物及试剂 猴菇菌(批号: 180450201), 由康美药业股份有限公司提供; 黄芪(批号: 1803003)、太子参(批号: 1803001)、白术(批号: 1803001)、茯苓(批号: 1803001)、莪术(批号: 1804001)、白花蛇舌草(批号: 1712001)、三七(批号: 1802001), 由广州市岭南中药饮片有限公司佛山分公司提供; 由广东省第二中医院制剂室鉴定合格并制备成 JPHY 浸膏粉。维酶素, 德州博诚制药有限公司, 批号: W20170802; MNNG, 日本东京化成工业株式会社, 批号: 75F71-BR; 水合氯醛, 成都市科龙化工试剂厂, 批号: 2016092910; 一抗 PI3K(批号: GR277867-1)、Akt(批号: GR106629-25)、HIF-1 α (批号: GR62771-12), 均购自英国 Abcam 公司; 一抗 Beclin1(批号: 10006333)、Bcl-2(批号: 00075461)、BAX(批号: 00073304), 均购自美国 Proteintech 公司。

1.3 主要仪器 RM2235 型切片机, 德国 Leica 公司; YD-AB 型摊烤片机、YD-6L 型生物组织包埋机, 金华市益迪医疗设备有限公司; BX41/60 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司; Tanon 5200 Multi 化学发光凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; BS224S 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司产品。

1.4 模型复制 采用 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MNNG 溶液自由饮用+隔日禁食法^[9]复制 GPL 大鼠模型。分别于造模后第 8、12 周随机选取 3 只造模组大鼠和 1 只空白组大鼠, 观察胃小弯体-窦交界处胃窦侧的胃黏膜病理学变化, 如第 8 周有肠上皮化生出现, 第 12 周有异型增生出现, 即可确认 GPL 大鼠模型阶段性复制

成功, 继续造模至第 28 周末结束。从第 29 周开始停止 MNNG 造模, 以观察恢复期(第 29~39 周)模型大鼠胃黏膜组织的病理变化和 JPHY 的干预作用。

1.5 分组及给药 适应喂养 1 周后, 将 SD 大鼠随机分为空白组($n=20$)和造模组($n=78$), 空白组常规饲养, 造模组按照“1.4”项下复制 GPL 大鼠模型。将 72 只造模成功大鼠随机分为模型组、维酶素组($270\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 临床等效剂量^[10])、JPHY 高剂量组($9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 临床等效剂量)和 JPHY 低剂量组($4.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 1/2 临床等效剂量), 每组 18 只。各给药组于第 15 周开始, 按照上述剂量灌胃给药($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每日 1 次, 连续 25 周; 空白组和模型组大鼠给予等容量纯净水。实验前及实验过程中, 每周测量记录大鼠体质量。

1.6 样品采集、处理 于实验第 18、28 和 39 周(JPHY 干预前期、后期和恢复期)分别从 5 个动物分组中随机选取 6 只大鼠, 称体质量后处死, 立即剖取大鼠胃窦部组织, 其中胃小弯体-窦交界处胃窦壁全层用 10%中性福尔马林固定, 其余胃窦部取胃黏膜上皮组织, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.7 胃黏膜组织病理学观察 取 10%中性福尔马林固定的大鼠胃窦部组织, 依次进行组织脱水、透明、浸蜡包埋、切片、HE 染色及封片等步骤, 于光学显微镜下观察大鼠胃黏膜组织病理学形态变化。

1.8 Western Blot 法测定胃黏膜组织相关蛋白的表达^[11] 称取 100 mg 大鼠胃黏膜冻存组织, 置于离心管中, 同时加入 1 mL 蛋白裂解液(RIPA 裂解液: 磷酸酶抑制剂=100:1), 用手持式匀浆机于冰上充分研磨至无明显的可见颗粒。将匀浆液置于冰上 30 min, 待组织充分裂解后, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 8 cm) 离心 10 min。取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 用裂解液调整各组样本的蛋白浓度一致; 加 5 \times 上样缓冲液配制含 45 μg 总蛋白原液, 用于检测 β -actin、PI3K、Akt、HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2、BAX 蛋白表达。取蛋白样品依次进行 SDS 凝胶电泳、转膜、切膜、抗原封闭、一抗孵育(按说明书稀释)、二抗孵育等步骤操作后, 浸泡于显影液中 1 min, 置于显影机中发光显影。以 β -actin 为内参, 采用 ImageJ 软件分析目的蛋白的相对表达水平。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),

方差齐则组间比较采用 SNK 检验，方差不齐用 Dunnett's T3 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JPHY 对 GPL 大鼠体质量的影响 结果见图 1。各组大鼠体质量在观察时间内均呈持续增加趋势，空白组大鼠体质量呈快速增加趋势，模型组大鼠体质量呈缓慢上升趋势，与空白组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较，JPHY 高剂量组大鼠体质量有一定升高趋势，在恢复期表现明显，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明，MNNG 诱导结合隔日禁食法造模可引起大鼠体质量明显降低，JPHY 对 GPL 大鼠体质量有一定改善作用。

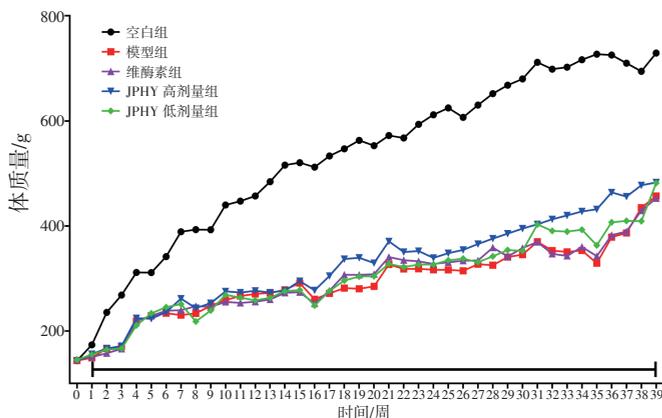


图 1 健脾化痰解毒方(JPHY)对胃癌前病变大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 1 Effects of Jianpi Huayu Jiedu decoction on body mass of GPL rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 JPHY 对 GPL 大鼠胃黏膜组织病理学变化的影响 结果见图 2。3 个不同时间点的空白组大鼠胃黏膜组织并无明显差异。胃黏膜层较厚，固有层结构完整， $\geq 2/3$ 胃黏膜厚度，黏膜、基底膜厚度均一；胃腺腔由单层上皮细胞构成，腺腔多闭合；固有腺主要由偏红染的壁细胞和偏蓝染的主细胞构成，两类细胞体积大、胞质丰富、核质比小，细胞大小均一、排列整齐，无充血、炎性细胞浸润。

第 18 周，模型组大鼠胃黏膜变薄(固有层 $\leq 2/3$ 胃黏膜厚度)，可见炎性细胞浸润和肠上皮化生(胃腔侧黏膜锯齿样或 U 型管样变、组织结构异性性、细胞弥漫性空泡样变)，固有层轻度萎缩伴基底膜轻度增厚、厚度不均匀；胃小凹相邻腺腔管壁增厚、腺腔变大、开口于胃腔，或于固有层形成小黏液湖；散在分布于胃黏膜基底侧的异型增生细胞表现为体积小(约为正常胃黏膜上皮细胞的 1/2)、胞质少

深蓝染色(超过主细胞核染色)、多形性、核分叶状、核质比例大、排列紊乱。与模型组相比，JPHY 高剂量组改善作用最明显，大鼠胃黏膜尤其是固有层厚度明显改善，异型增生细胞或炎性细胞浸润明显减少，偶见异型增生细胞，但空泡样变、锯齿样变仍较明显。

第 28 周，模型组大鼠主要以肠上皮化生为主，胃黏膜尤其是固有层变薄(固有层厚度约为胃黏膜厚度的 1/2 左右)，基底膜增厚，膜隆起/枝状突起于胃黏膜且有纤维增生；腺腔开口大且较深(可深达胃黏膜全层)，胃腔侧黏膜锯齿样变或 U 型管样变明显；固有层细胞间质有较多炎性细胞浸润，胃黏膜全层上皮细胞均出现轻度或重度空泡样变(形成杯状细胞)，固有层黏液湖变大，弥漫散在分布于近固有层全层的异型增生细胞沿腺腔扩散，相邻腺腔内异型增生细胞呈灶性分布(灶内异型细胞数少且灶间距离大)，相邻腺腔双基膜层融合为单层(“共壁”)或消失(“背靠背”)和出现假复层现象；有微血管扩张；与第 18 周比较，胃黏膜固有层萎缩更为明显，U 型管、空泡样变等肠上皮化生病变程度明显加重，异型增生细胞数量有所增加，异型增生灶出现。与模型组相比，JPHY 高剂量组改善作用最明显，固有层厚度恢复明显(约占 2/3)，异型增生细胞数量明显减少，分布范围缩小，仅见于基底膜一侧，“共壁”和“背靠背”或假复层减少甚至消失，大鼠基底膜变薄，纤维化情况有所缓解；胃黏膜上皮组织腺体异型变化有一定改善，但仍可见轻中度紊乱；有细胞空泡样变和小黏液湖等肠上皮化生表现。

第 39 周，模型组大鼠固有层明显萎缩，基底膜中度或重度增厚并伴有纤维化；固有层腺腔单层上皮变为多层无规则排列，无管腔结构的细胞团，细胞异性性较大，形状和大小不一，胞质丰富、偏红或偏蓝染色，胞核可见，但多为形状不规则；炎性细胞浸润常见，细胞间质减少；与第 28 周比较，黏膜微血管明显可见。与模型组相比，JPHY 高剂量组改善作用最明显，异型增生细胞数量、分布范围和分布密度均有明显减少，固有层厚度明显增加，腺腔结构趋于正常，但仍可见弥漫性空泡样变、小黏液湖和锯齿样变。

2.3 JPHY 对 GPL 大鼠胃黏膜组织中 PI3K、Akt、HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2、BAX 蛋白表达的影响

第 18 周结果见图 3。与空白组比较，模型组大鼠胃黏膜组织的 PI3K、Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$,

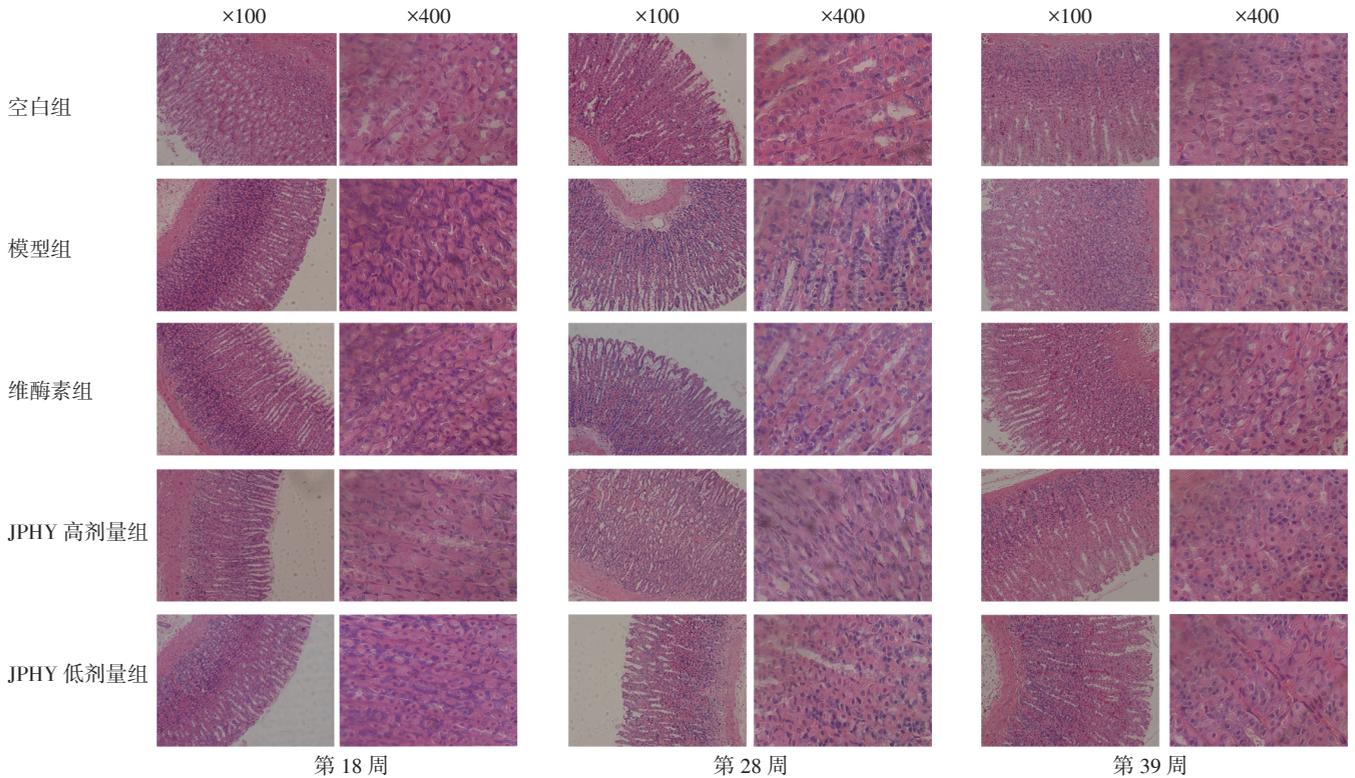
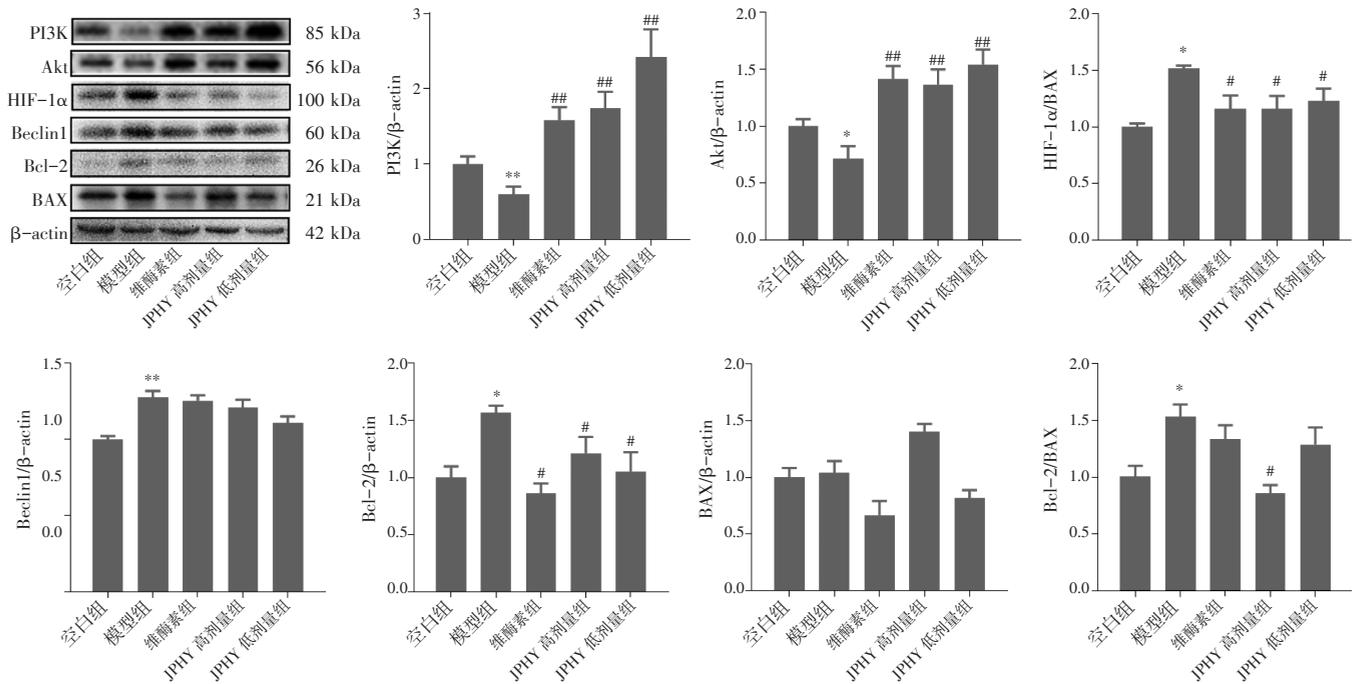


图2 健脾化痰解毒方(JPHY)对胃癌前病变大鼠胃黏膜组织病理变化的影响(HE染色)

Figure 2 Effects of Jianpi Huayu Jiedu decoction on gastric mucosal histopathological changes in GPL rats(HE staining)



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 健脾化痰解毒方(JPHY)对第18周胃癌前病变大鼠胃黏膜组织自噬、凋亡通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 3 Effects of JPHY on autophagy and apoptosis proteins of gastric mucosal in GPL rats in week 18($\bar{x} \pm s, n=6$)

$P < 0.01$), HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠胃黏膜组织的 PI3K、Akt

蛋白表达明显上调($P < 0.01$), HIF-1 α 、Bcl-2 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), JPHY 高剂量组的 Bcl-2/BAX 比值明显降低($P < 0.05$)。

第 28 周结果见图 4。与空白组比较，模型组大鼠胃黏膜组织的 PI3K、Akt、BAX 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)，HIF-1 α 、Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较，各给药组大鼠胃黏膜组织的 PI3K、Akt 蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)，HIF-1 α 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显下调($P < 0.01$)，JPHY 高剂量组的 Beclin1 蛋白表达明显下调($P < 0.01$)，JPHY 高、低剂量组的 BAX 蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

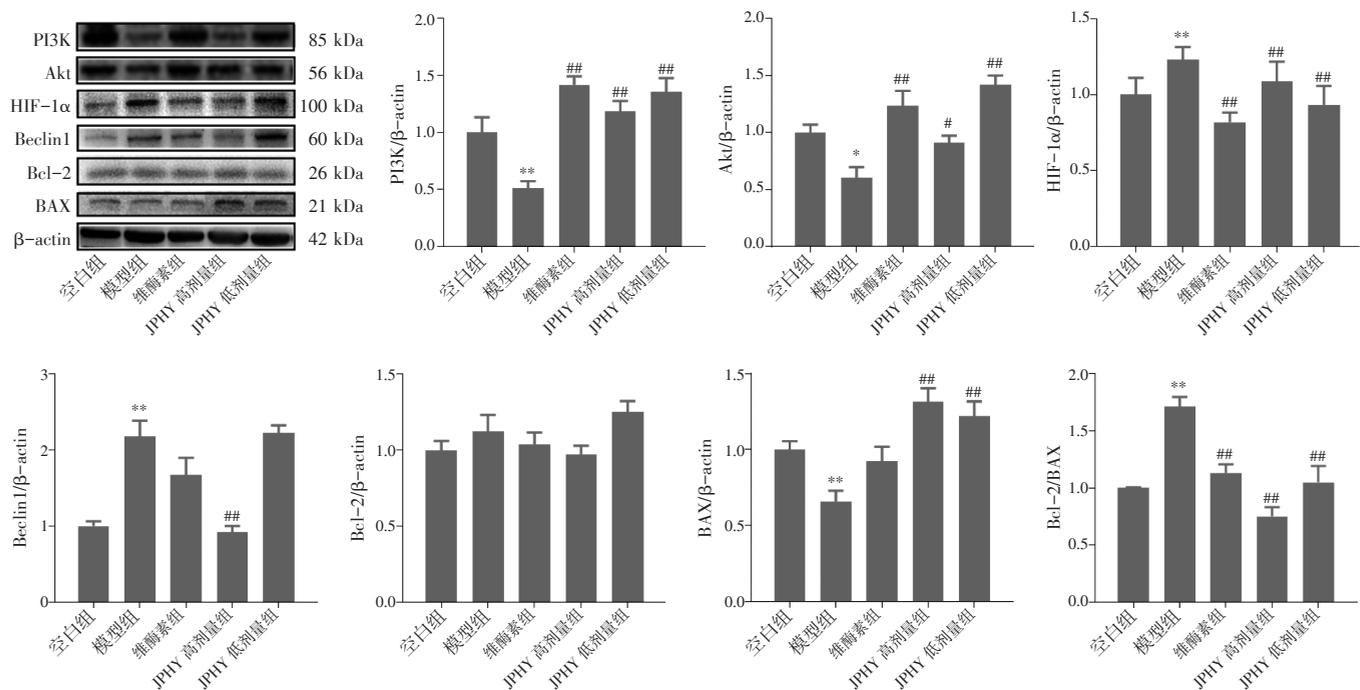
第 39 周结果见图 5。与空白组比较，模型组大鼠胃黏膜组织的 Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$)，HIF-1 α 、Beclin1、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)，PI3K、BAX 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较，JPHY 高、低剂量组大鼠胃黏膜组织的 Akt 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)，Beclin1 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)，各给药组大鼠胃黏膜组织的 HIF-1 α 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

慢性萎缩性胃炎病因病机尚未明确，流行病学研究^[12]发现，慢性萎缩性胃炎与长期摄入亚硝酸盐等致

癌物有关。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)是一种基因突变率高达 1% 的全细胞周期、多位点突变、胃黏膜通透性高的亚硝酸盐类强诱变剂，可烷化 DNA 碱基产生突变，MNNG 诱发胃癌的组织学特性与人类胃癌相似^[13]，常用于复制慢性萎缩性胃炎、胃癌前病变(GPL)和胃癌动物模型^[14]。长期低浓度摄入 MNNG 并配合饥饿失常，可提高复制 GPL 动物模型的成功概率^[15]，使其产生胃黏膜体-窦交界处出现炎性反应(炎性细胞浸润)、萎缩、肠上皮化生(空泡样变、黏液湖、组织异型性)、异型增生与微血管新生等不同程度的病理表现^[16]。

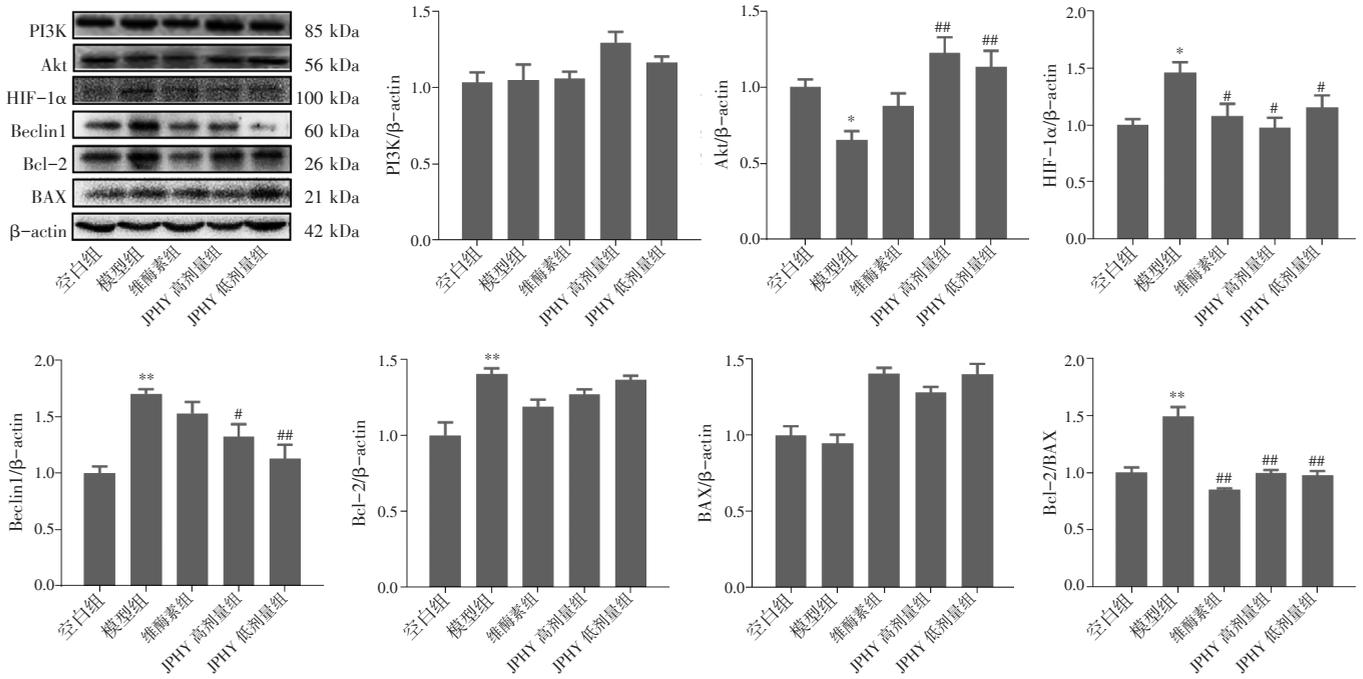
本课题组前期研究^[6]表明，GPL 过程存在胃黏膜细胞自噬凋亡失衡现象，其调控机制可能与 PI3K/Akt 通路有关。PI3K/Akt 信号通路对 LC3、Beclin1、ATG5、SQSTM1 等自噬蛋白及 Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2、BAX 等凋亡蛋白具有负向调控作用，抑制 PI3K/Akt 通路可促进细胞自噬、凋亡^[17]。Beclin1 在哺乳动物细胞中是一个关键的自噬调节器，在参与自噬过程中受到多条通路的调控，对自噬体膜的形成有重要意义。Beclin1 通过与 Ambra1、HMGB1 等蛋白的相互作用来调节 Vps34 以及促进 III 型 PI3K 复合物的形成，影响自噬体成核过程^[18]。因此，Beclin1 蛋白表达在一定程度上可以反映自噬水平^[19]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 BAX 是凋亡家族的代表性



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 4 健脾化瘀解毒方(JPHY)对第 28 周胃癌前病变大鼠胃黏膜组织自噬、凋亡通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 4 Effects of JPHY on autophagy and apoptosis proteins of gastric mucosal in GPL rats in week 28($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图5 健脾化痰解毒方(JPHY)对第39周胃癌前病变大鼠胃黏膜组织自噬、凋亡通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 Effects of JPHY on autophagy and apoptosis proteins of gastric mucosal in GPL rats in week 39($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

蛋白，Bcl-2/BAX 的比值能代表性地反映细胞凋亡程度^[20]。有研究^[21]表明，胃癌患者胃黏膜组织中 Bcl-2 阳性表达率显著高于慢性萎缩性胃炎患者，而 BAX 阳性表达率正好相反，表明癌变过程中可能存在凋亡抑制。低氧诱导因子 1α(HIF-1α)作为调控肿瘤微环境的关键因子，对于维持氧稳态具有关键作用，是 PI3K/Akt 的靶向蛋白之一。在化学物质诱导的缺氧条件下，HIF-1α 转录增加，激活各种微环境因素，调控细胞凋亡和自噬^[22]。PI3K/Akt 信号通路可以调控细胞自噬、凋亡等生物学行为，与许多疾病的发生发展密切相关，PI3K/Akt 的调控网络错综复杂，不仅能够调控各种功能蛋白，其下游蛋白亦能与 PI3K/Akt 形成负反馈环，如 mTORC1、酪蛋白激酶 1α^[23-24]。

中医学认为 GPL 属于“胃痞”“胃脘痛”范畴，其病变核心在脾胃，属本虚标实，“脾虚血瘀挟毒”是其基本病机。健脾化痰解毒方(JPHY)中黄芪甘温，有补气固表之功，为君药；太子参、白术、茯苓健脾益气，猴菇菌补虚健胃，为臣药；莪术、三七、守宫行气破血、通络止痛，为佐药；白花蛇舌草清热解毒、消痈散结，为使药；全方合用，结合“温、清、补、通”诸法，共奏健脾化痰解毒之功。临床研究^[25]表明，JPHY 能有效保护胃黏膜损伤，改善慢性萎缩性胃炎及胃黏膜病变。本研究通过组织

病理学观察表明，在不同病理阶段，JPHY 均可抑制 GPL 大鼠胃黏膜萎缩，增加固有层黏膜厚度占比，减少炎性细胞浸润、异型增生细胞计数、异型增生细胞分布范围和分布密度。提示其可能通过抑制胃黏膜炎性反应，保护受损胃黏膜上皮细胞，从而逆转胃黏膜萎缩、肠上皮化生和异型增生^[26]。本研究还观察到，GPL 模型大鼠胃黏膜组织的 HIF-1α 蛋白始终高表达，但可被 JPHY 抑制，推测 JPHY 可能通过改善局部缺氧微环境，从而调节细胞的能量代谢方式，进而保护胃黏膜。在不同病理阶段，GPL 大鼠胃黏膜组织的 Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值均显著上调，而 JPHY 能够明显下调 Beclin1 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值，体现了其促胃黏膜上皮细胞凋亡及抑制自噬的作用。

本课题组前期研究^[27]表明，JPHY 可抑制 PI3K/AKT/HIF-1α 信号通路的激活，抑制有氧糖酵解代谢产物 LDHA 表达，阻断细胞的恶性增殖与肠上皮化生，改善局部缺氧微环境，延缓 GPL 恶变。本研究结果显示，在第 18 周、28 周 GPL 大鼠胃黏膜组织的 PI3K 和 Akt 蛋白表达明显下调，第 39 周 PI3K 蛋白表达与空白组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。推测可能与前期研究的小鼠胃黏膜病变以异型增生为主，而本研究的 GPL 大鼠以固有层萎缩伴肠上皮化生为主，胃黏膜组织病理形态在不同阶段存在明

显差异有关；其次，推测自噬凋亡蛋白对上游基因存在漫长的负反馈调节，GPL 大鼠在病变以肠上皮化生向异型增生发展过程中，PI3K/Akt 蛋白表达由抑制状态逐渐转变为激活状态，进而发展为癌细胞的自噬抑制状态，但具体机制有待深入探究。

综上所述，健脾化痰解毒方对胃癌前病变不同阶段的黏膜损伤均有明显保护作用，可能与其通过 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路调节肿瘤缺氧微环境以及调控细胞自噬、凋亡的作用有关。鉴于 GPL 是一个较为漫长的癌前病变过程，其级联反应是否与自噬、凋亡调节有关仍有待深入探讨。

参考文献：

[1] 时艳华, 任喜尚, 秦芳, 等. 扶正消萎汤治疗脾胃虚弱型慢性萎缩性胃炎的临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(5): 86-88.

[2] CHAPELLE N, PÉRON M, MOSNIER J, et al. Prevalence, characteristics and endoscopic management of gastric premalignant lesions in france[J]. Digestive Diseases, 2020, 38(4): 286-292.

[3] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(2): 575-587.

[4] ZHOU J, JIANG Y Y, CHEN H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Cell Proliferation, 2020, 53(2): e12739.

[5] ZHANG T, ZHU X, WU H, et al. Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(5): 3711-3723.

[6] CAI T, ZHANG C, ZHAO Z, et al. The gastric mucosal protective effects of astragaloside IV in mnng-induced GPL rats[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 291-299.

[7] 李昊. 健脾化痰解毒汤治疗胃癌前病变临床观察[J]. 当代临床医刊, 2017, 30(1): 2858-2860.

[8] 曾进浩, 潘华峰, 赵自明, 等. 健脾化痰解毒复方治疗胃癌前病变的临床疗效及对 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1544-1548.

[9] CAI T, ZHANG C, ZENG X, et al. Protective effects of Weipixiao decoction against MNNG-induced gastric precancerous lesions in rats [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 120: e109427.

[10] 唐亮华. 浅谈慢性萎缩性胃炎的治疗中应用加味半夏泻心汤的效果[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(35): 205-206.

[11] ZHANG C, CAI T, ZENG X, et al. Astragaloside IV reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma in rats: regulation on glycolysis through miRNA-34a/LDHA pathway[J]. Phytotherapy Research, 2018, 32(7): 1364-1372.

[12] 范志巍, 陆敏, 樊欣钰. 饮食失宜与慢性萎缩性胃炎相关性探讨 [J]. 山东中医杂志, 2019, 38(4): 309-311, 342.

[13] 朱萱萱, 史淋峰, 吴旭彤, 等. 实验性慢性萎缩性胃炎脾气虚证

模型的建立及不同时期病理形态学的改变[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 231-233.

[14] YIN J, YI J, YANG C, et al. Chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia induced by high-salt and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine intake in rats[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4): 315-322.

[15] 陈泽慧, 魏玥, 安静, 等. 慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变大鼠造模方法的文献研究[J]. 天津中医药, 2019, 36(9): 850-855.

[16] 郑嘉怡, 赵自明, 潘华峰, 等. 胃癌前病变脾虚证大鼠胃黏膜病变的病理与超微结构研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1730-1735.

[17] YANG J, PI C, WANG G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 103: 699-707.

[18] XIANG H, ZHANG J, LIN C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(4): 569-581.

[19] ELSHEIKH M, MESALAM A A, IDREES M, et al. Nicotinamide supplementation during the *in vitro* maturation of oocytes improves the developmental competence of preimplantation embryos: potential link to SIRT1/AKT signaling[J]. Cells (Basel, Switzerland), 2020, 9(6): 1550-1561.

[20] 裴岩岩, 李雅, 闫春生, 等. 黄芪甲苷通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1077-1082.

[21] 朱玉侠, 赵明星, 姜登鹤, 等. 抑癌基因 p53、凋亡抑制基因 Bcl-2、促凋亡基因 Bax 在胃癌及癌前病变中的表达[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25(9): 1040-1043.

[22] ZHANG X, QI Z, YIN H, et al. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4- and HIF-1 α -mediated regulation of apoptosis and autophagy[J]. Theranostics, 2019, 9(4): 1096-1114.

[23] CHEONG J K, ZHANG F, CHUA P J, et al. Casein kinase 1 α -dependent feedback loop controls autophagy in RAS-driven cancers [J]. Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(4): 1401-1418.

[24] OU Z L, YANG X L, LIN F J, et al. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K/AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK/MAPK and mTOR pathways[J]. OncoTargets and Therapy, 2014, 7: 1033-1047.

[25] 赵自明, 潘华峰, 曾晓会, 等. 胃痞灵对氨水所致慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜病理学、SOD、MDA 和 NO 含量的影响[J]. 按摩与康复医学, 2017, 8(13): 74-77.

[26] 陈秋凤, 赖思蓓, 祁真. 猴头菌提取物颗粒治疗慢性胃溃疡的疗效及对胃黏膜的修复作用[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(10): 143-145.

[27] 潘华峰, 袁冬生, 刘伟, 等. 健脾化痰解毒方抑制 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路阻断胃癌前病变恶性进展的机制[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2786-2790.

(编辑：邹元平)