

基于 Raf-1 基因探讨加味七方胃痛颗粒干预慢性萎缩性胃炎大鼠模型的作用机制研究

王婷¹, 全胜源², 常亮¹, 唐燕¹, 李英豪¹, 梁英业³, 唐梅文¹ (1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200; 2. 平南县人民医院, 广西 贵港 537300; 3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023)

摘要: **目的** 观察加味七方胃痛颗粒对慢性萎缩性胃炎(Chronic atrophic gastritis, CAG)大鼠模型 Raf-1 基因和蛋白的影响。**方法** 将 120 只大鼠随机分为正常组, 模型组, 胃复春组和加味七方胃痛颗粒高、中、低剂量组, 每组各 20 只。正常组自由饮用自来水, 其余 5 组饮用 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)水溶液, 建立 CAG 模型。造模成功后, 正常组和模型组用生理氯化钠溶液灌胃, 胃复春组、加味七方胃痛颗粒组分别给予胃复春片和相应浓度的加味七方胃痛颗粒灌胃。连续干预 30 d 后取大鼠胃黏膜, 分别用 Real-time PCR、Western Blot 以及免疫组化法检测 Raf-1 基因及蛋白的表达情况。**结果** 与正常组比较, 模型组 Raf-1 基因表达明显增加($P<0.01$), 与模型组比较, 胃复春组、加味七方胃痛颗粒组 Raf-1 基因表达均明显下调($P<0.01$), 其中以大剂量组下调幅度最明显; Western Blot 法检测 Raf-1 蛋白表达显示, 与正常组比较, 模型组 Raf-1 蛋白表达明显增加($P<0.01$), 与模型组比较, 胃复春组、加味七方胃痛颗粒组 Raf-1 表达均明显下调($P<0.01$), 其中以中剂量组下调幅度最明显; 免疫组化法检测 Raf-1 的蛋白表达显示, 与正常组比较, 模型组 Raf-1 蛋白表达明显增加($P<0.01$), 与模型组比较, 胃复春组、加味七方胃痛颗粒组 Raf-1 表达均明显下调($P<0.01$), 其中以中剂量组下调幅度最明显。**结论** 加味七方胃痛颗粒对 CAG 有明显的疗效, 能保护胃黏膜, 其作用机制与其下调 CAG 大鼠的 Raf-1 基因及蛋白的表达有关。

关键词: 加味七方胃痛颗粒; Raf-1; 胃癌癌前病变; 慢性萎缩性胃炎; 作用机制; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)10-1474-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.009

Exploring the Mechanism of Jiawei Qifang Weitong Granules Intervening Chronic Atrophic Gastritis in Rats Based on Raf-1 Gene

WANG Ting¹, QUAN Shengyuan², CHANG Liang¹, TANG Yan¹, LI Yinghao¹, LIANG Yingye³, TANG Meiwen¹ (1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000 Guangxi, China; 2. People's Hospital of Pingnan County, Guigang 537300 Guangxi, China; 3. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023 Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Jiawei Qifang Weitong Granules (JWQF) on Raf-1 gene in chronic atrophic gastritis (CAG) rat model. **Methods** 120 rats were randomly divided into normal group, model group, Weifuchun group, JWQF high-dose, medium-dose and low-dose groups, with 20 rats in each group. Rats in the normal group were given free tap water, and the other five groups were given 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of N-methyl-N'-nitronitroguanidine (MNNG) to establish the CAG model. After successful model establishment, normal group and model group rats were intragastrically administered with normal saline, while Weifuchun group and JWQF group were intragastrically administered with Weifuchun tablet and corresponding concentration of JWQF. After continuous

收稿日期: 2021-03-15

作者简介: 王婷, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 中医药防治脾胃病的研究。Email: 1811691287@qq.com。通信作者: 唐梅文, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治脾胃病的研究工作。Email: 648979206@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760862、81260535); 广西中医药大学青年基金项目(2020QN004)。

intervention for 30 days, the gastric mucosa of rats was taken, and the gene and protein expression levels of Raf-1 were detected by Real-time PCR, Western Blot and immunohistochemical methods. **Results** Compared with the normal group, the expression of Raf-1 gene in the model group was increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of Raf-1 gene in the *Weifuchun* group and the JWQF groups were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the down-regulated rate was the most obvious in the high-dose group. Western Blot assay showed that, compared with the normal group, the protein expression of Raf-1 in the model group was higher than that in the normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of Raf-1 in the *Weifuchun* group and the JWQF group was significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the down-regulated rate was the most obvious in the medium-dose group. The protein expression of Raf-1 was detected by immunohistochemistry. Compared with the normal group, the protein expression of Raf-1 in the model group was higher than that in the normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of Raf-1 in the *Weifuchun* group and the JWQF group was significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the down-regulated extent was most obvious in the medium-dose group. **Conclusion** JWQF has obvious curative effect on CAG and can protect gastric mucosa. Its mechanism is related to the down-regulation of Raf-1 gene and protein expression in CAG rats.

Keywords: *Jiawei Qifang Weitong* Granules; Raf-1; gastric cancer precancerous lesions; chronic atrophic gastritis; active mechanism; rats

胃癌高居 2012 年全球癌症发病率的第 5 位以及病死率的第 3 位^[1-2], 在中国肿瘤发病率和病死率中, 胃癌分别排在第 2 位和第 3 位^[3-4]。晚期胃癌对化疗、手术切除以及放化疗联合治疗等传统方法效果均欠佳^[5]。因此在胃癌早期及癌前病变时期及时治疗就显得尤为重要。目前医学界较认可的胃癌发展模式是慢性非萎缩性胃炎-慢性萎缩性胃炎-胃黏膜肠上皮化生-异型增生-黏膜内癌-浸润性癌的模式^[6]。在胃癌发病过程的众多环节中, 任意阻断其中一个, 均可达到避免胃癌发生的作用。胃癌癌前病变中的胃黏膜肠上皮化生和异型增生, 都发生在慢性萎缩性胃炎(Chronic atrophic gastritis, CAG)这一阶段^[7]。因此在 CAG 时期进行干预对胃癌的防治具有重要意义。本课题组应用加味七方胃痛颗粒治疗 CAG 取得了满意的疗效, 同时发现其可以减轻 CAG 模型大鼠胃黏膜固有层炎性细胞浸润, 改善腺体萎缩程度、上皮化生程度, 增加胃黏膜厚度; 透射电镜显示胃黏膜腺体饱满, 腺腔完整, 与周围连接紧密, 腺细胞形态饱满, 分泌颗粒丰富^[8-9]。因此加味七方胃痛颗粒可以减轻 CAG 模型大鼠胃黏膜的炎症程度, 具有保护胃黏膜的作用, 但其作用机制尚未清楚。基于此, 本研究建立 CAG 大鼠模型, 使用加味七方胃痛颗粒进行治疗, 观察 CAG 大鼠胃黏膜 Raf-1 基因及其蛋白的表达变化, 从分子细胞维度阐明加味七方胃痛颗粒治疗 CAG、降低胃癌发生率的

作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠 120 只, SPF 级, 体质量 160~200 g, 雌雄各半, 由广西医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(桂)2014-0001。大鼠饲养条件: 温度为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度为 50%~60%。

1.2 试剂与药物 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG), 日本东京化成工业株式会社, 批号: M0527。用 400 mL 的无菌水将 MNNG 溶液稀释, 配制成浓度为 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 避光 4°C 保存; 将母液配制成 $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 并装入外贴黑色避光纸的饮水瓶中。加味七方胃痛颗粒(为免煎中药颗粒), 江阴天江药业公司, 批号: 1108075。由红参 10 g、白术 10 g、茯苓 10 g、炙甘草 9 g、黄连 6 g、吴茱萸 3 g、木香 6 g、枳实 6 g、半夏 10 g、黄精 6 g、黄芪 30 g、白芍 30 g、丹参 10 g、炒鸡内金 9 g、瓜蒌壳 20 g、天花粉 10 g 组成。胃复春片, 每片 0.36 g, 杭州胡庆余堂药业有限公司, 批号: 国药准字 Z20040003。将胃复春片碾碎溶于无菌水中制成浓度为 $77.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 保存于 4°C 冰箱中待用。S-P 免疫组化试剂盒, 北京中杉金桥公司, 批号: SPN-9002; 兔抗大鼠 Raf-1 多克隆抗体(批号: ab181115)、羊抗兔 IgG(H+L, 批号: ab150077)、BAC 蛋白定量试剂盒(批号: ab102536)、

兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体(批号: ab8226), 均购自英国 abcam 公司; TRIzol 试剂, 美国默克公司, 批号: T9424-100M; PCR 逆转录试剂盒(批号: DRR036A)、聚合酶链式反应试剂盒(批号: RR820A)、Raf-1 引物(forward 5'-CCGCCCCGAGAGTCTTAATCG-3' and reverse 5'-CCCCTCACCTTGAGTGCTTT-3')、GAPDH 引物(forward 5'-GACTTCAA CAGCAACTCCCAC-3' and reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'), 宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 仪器 Centrifuge 5810R 台式高速冷冻离心机, 济南鑫贝西生物技术有限公司; YI-875 型超净工作台, 苏州净化设备厂; DYY 电泳仪, 杭州诺丁科学器材有限公司; U-2000 紫外可见光光度计, 屹谱仪器制造(上海)有限公司; LAS-400 化学发光成像系统, 美国 GE 公司; Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Roche 公司; UV-3000 紫外分析仪, 上海金鹏分析仪器有限公司; T-2A BIORAD 凝胶成像系统, 上海固讯电子科技有限公司; GF-1 组织细胞匀浆机, 北京众益中和生物技术有限公司。

2 方法

2.1 分组及造模 将 120 只大鼠按随机数字表法分为正常组, 模型组, 胃复春组, 加味七方胃痛颗粒高、中、低剂量组, 每组各 20 只。正常组自由饮用自来水, 其余 5 组给予 $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MNNG 水溶液, 每 24 h 更换 1 次, 在此期间不予其他饮水。造模 2 个月后随机选取模型组雌雄大鼠各 1 只, 取其胃窦和胃体的组织, 制备病理切片, 光镜下观察, 结果出现胃窦腺体轻度萎缩, 说明造模有效; 继续给药到第 3 个月, 再次在光镜下观察大鼠胃窦和胃体的组织, 结果出现腺体萎缩和异型增生, 说明 CAG 大鼠模型建立成功。

2.2 给药 自第 91 天起, 加味七方胃痛颗粒组(简称七方颗粒组)以加味七方胃痛颗粒临床等效剂量($18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)作为中剂量, 高、中、低剂量分别为 36 、 18 、 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 胃复春组用无菌水溶解胃复春片, 按 $0.387 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药; 正常组和模型组给予灌胃生理氯化钠溶液。各组每日灌胃给药 1 次, 给药体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 30 d。

2.3 取材 各组大鼠给药 30 d 后, 禁食 24 h, 用 10%水合氯醛($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)皮下注射麻醉, 手术剪开腹, 剖取胃组织, 沿着胃小弯切开, 用生理氯化钠溶液冲洗干净胃黏膜。从前胃沿着胃小弯直到幽门处, 取下全肌层壁 1 块, 甲醛固定、石蜡包埋、切

片, 供免疫组化检测使用; 再取一小块胃窦黏膜组织, 保存于 -80°C 冰箱, 用于 Western Blot、Real time PCR 的检测。

2.4 Real time PCR 法检测 Raf-1 基因表达 取胃黏膜组织, 用 Trizol 试剂盒, 按照说明书操作, 提取组织总 RNA, 以 RNA 为起始材料经逆转录成 cDNA, 按聚合酶链式反应试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR(Real time PCR, RT-PCR)操作。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达水平, 以检测 CAG 大鼠胃黏膜 Raf-1 的基因表达。

2.5 免疫组化(SP 法)检测 Raf-1 的蛋白表达 胃黏膜组织用 4%甲醛固定后, 行石蜡包埋和切片, 使用 SP 免疫组化试剂盒进行检测。一抗为兔抗大鼠 Raf-1 多克隆抗体, 二抗为生物素标记的山羊抗兔 IgG(H+L), 检测 CAG 大鼠胃黏膜组织 Raf-1 的蛋白表达。参考本课题组前期研究方法^[6], 根据阳性细胞数和着色深度计分, 每标本均随机观察计数 5 个视野($\times 400$), 按照阳性细胞在病变范围所占的比例计算, 分成 5 个等级, 即: $0 \sim 5\%$ 为 0 分; $6\% \sim 25\%$ 为 1 分; $26\% \sim 50\%$ 为 2 分; $51\% \sim 75\%$ 为 3 分; $> 76\%$ 为 4 分。阳性细胞表达的着色深度: 未染色计 0 分; 淡黄色计 1 分; 棕黄色计 2 分; 棕褐色计 3 分。免疫组化的最后判定结果(即显色指数)按以上两项相加, 得出阳性细胞的 4 个评分等级: $0 \sim 1$ 分为阴性(-), $2 \sim 3$ 分为弱阳性(+), $4 \sim 5$ 分为阳性(++), $6 \sim 7$ 分为强阳性(+++)。

2.6 Western Blot 法检测 Raf-1 蛋白的水平 取胃黏膜组织放入蛋白裂解液中进行研磨匀浆, 按照每 100 mg 组织加入 1 mL 蛋白裂解液, 低温匀浆, 超声破碎, 于 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min(离心半径为 16 cm), 取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白, 并转至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h, 滴加一抗 c-kit, 稀释比为 $1:1\,000$, 4°C 孵育过夜。次日 TBST 缓冲液清洗 3 次后二抗孵育 1 h。采用 HRP 标记的二抗, 稀释比例为 $1:5\,000$ 。孵育后再用 TBST 先快速洗 3 次。ECL 显影, 使用化学发光成像系统 LAS-400 曝光。使用 ImageJ 软件分析图像结果, 以 c-kit 条带与 β -actin 条带灰度值的比值表示 c-kit 蛋白的表达水平。

2.7 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组

间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

本实验共 120 只大鼠, 在实验过程中死亡 28 只, 最终各组动物样本量为: 正常组 20 只, 模型组 11 只, 七方颗粒高、中、低剂量组分别为 17、16、13 只, 胃复春组 15 只。

3.1 加味七方胃痛颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜组织 Raf-1 基因表达的影响 与正常组比较, 模型组胃黏膜 Raf-1 基因表达明显增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 七方颗粒高、中、低剂量组及胃复春组胃黏膜 Raf-1 基因表达明显降低 ($P < 0.01$)。与胃复春组比较, 七方颗粒高、中剂量组胃黏膜 Raf-1 基因表达明显降低 ($P < 0.05$), 但七方颗粒低剂量组与胃复春组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。七方颗粒高、中剂量组胃黏膜 Raf-1 基因表达显著降低 ($P < 0.05$), 而七方颗粒高、中剂量组的胃黏膜 Raf-1 基因表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 加味七方胃痛颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜组织 Raf-1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of JWQF on Raf-1 gene expression in gastric mucosa of CAG rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	Raf-1 相对表达量
正常组	20	0.402 ± 0.050
模型组	11	1.037 ± 0.082 ^{**}
胃复春组	15	0.518 ± 0.102 [#]
七方颗粒高剂量组	17	0.365 ± 0.051 ^{△△}
七方颗粒中剂量组	16	0.372 ± 0.063 ^{△△}
七方颗粒低剂量组	13	0.481 ± 0.080 [#]

注: 与正常组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与胃复春组比较, [△] $P < 0.05$; 与七方颗粒低剂量组比较, [△] $P < 0.05$

3.2 加味七方胃痛颗粒对大鼠胃黏膜 Raf-1 蛋白的影响

3.2.1 免疫组化(SP 法)检测结果 Raf-1 蛋白表达在胃黏膜腺上皮细胞以及间质炎症细胞的胞浆内。正常组 Raf-1 蛋白在胃黏膜腺上皮细胞中表达甚微, 而模型组 Raf-1 蛋白在胃黏膜腺上皮细胞以及间质炎症细胞的胞浆内都有高表达。胃复春组与七方颗粒高、中、低剂量组 Raf-1 蛋白在胃黏膜腺上皮细胞的胞浆内表达均显著降低, 间质炎症细胞未见 Raf-1 蛋白阳性表达, 见图 1。与正常组比较, 模型组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组比

较, 七方颗粒高、中、低剂量组及胃复春组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。与胃复春组比较, 七方颗粒高、中、低剂量组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。七方颗粒中剂量组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达显著低于高剂量组 ($P < 0.05$)。七方颗粒高、中剂量组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达与低剂量组相比均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1 和表 2。

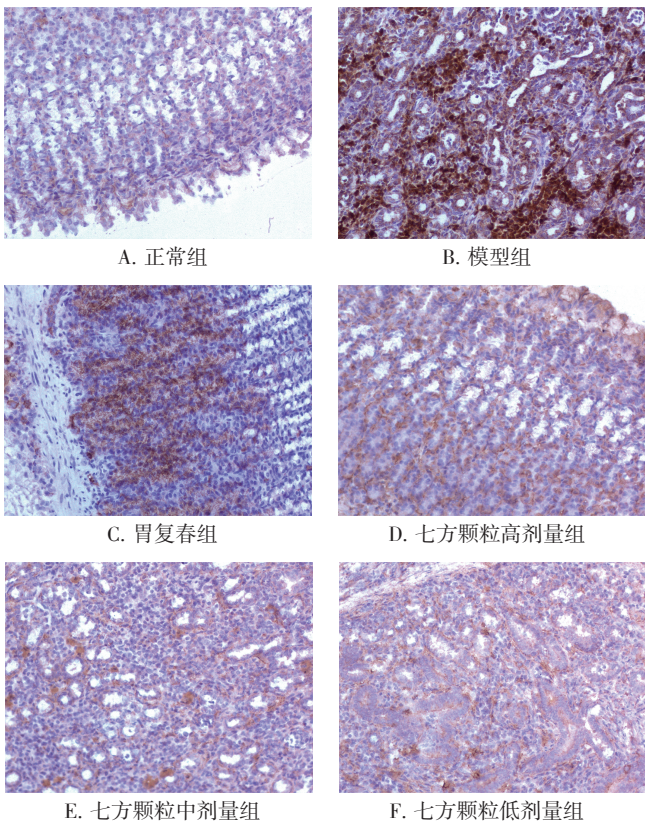


图 1 Raf-1 蛋白在各组大鼠胃黏膜中的表达[免疫组化(SP 法)]

Figure 1 Immunohistochemical expression of Raf-1 in each group (immunohistochemistry)

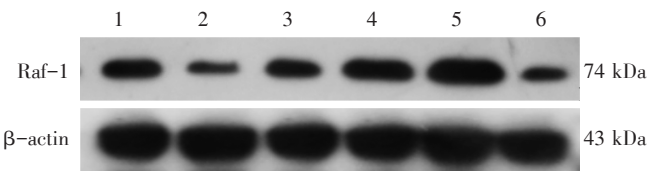
表 2 各组大鼠胃黏膜 Raf-1 蛋白的相对表达量[免疫组化(SP 法), $\bar{x} \pm s$]

Table 2 Relative expression levels of Raf-1 in gastric mucosa of rats in each group

组别	鼠数/只	Raf-1 蛋白的显色指数
正常组	20	1.43 ± 0.21
模型组	11	6.17 ± 1.32 ^{**}
胃复春组	15	4.75 ± 1.08 [#]
七方颗粒高剂量组	17	3.06 ± 0.89 ^{△△}
七方颗粒中剂量组	16	2.06 ± 0.47 ^{△△}
七方颗粒低剂量组	13	2.23 ± 0.53 ^{△△}

注: 与正常组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与胃复春组比较, [△] $P < 0.05$; 与七方颗粒高剂量组比较, [△] $P < 0.05$

3.3.2 Western blot 检测结果 与正常组比较, 模型组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达显著增高($P<0.01$)。与模型组比较, 七方颗粒高、中、低剂量组及胃复春组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。与胃复春组比较, 七方颗粒中、低剂量组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达显著降低($P<0.05$), 而七方颗粒高剂量组与胃复春组差异无统计学意义($P>0.05$)。七方颗粒高、中、低剂量组胃黏膜 Raf-1 蛋白表达比较均无统计学意义($P>0.05$), 见图 2 和表 3。



注: 1. 七方颗粒高剂量组; 2. 七方颗粒中剂量组; 3. 七方颗粒低剂量组; 4. 胃复春组; 5. 模型组; 6. 正常组

图 2 各组大鼠胃黏膜 Raf-1 蛋白的表达(Western Blot 法)
Figure 2 The protein expression of Raf-1 in gastric mucosa of rats in each group(Western blot)

表 3 各组大鼠胃黏膜 Raf-1 蛋白的表达(Western Blot 法, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Protein expression of Raf-1 in gastric mucosa of rats in each group(Western blot, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	Raf-1/β-actin
正常组	20	0.347 ± 0.035
模型组	11	0.898 ± 0.048**
胃复春组	15	0.577 ± 0.066**
七方颗粒高剂量组	17	0.495 ± 0.073**
七方颗粒中剂量组	16	0.404 ± 0.041**△
七方颗粒低剂量组	13	0.414 ± 0.056**△

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组相比, ** $P<0.01$; 与胃复春组相比, △ $P<0.05$

4 讨论

慢性萎缩性胃炎可归属于中医胃脘痛、痞满、嘈杂等病证范畴^[10]。慢性萎缩性胃炎以痞满、呃逆、暖气等为主要症状, 多由脾胃虚弱, 气滞、痰湿、瘀血等蕴结于胃, 脾胃纳运失调所致, 其辨证以脾胃虚弱, 肝脾不和为主, 常伴有不同程度的肝郁化热、湿热蕴脾、瘀血内阻等证^[11]。加味七方胃痛颗粒以益气健脾、清肝泻火、行气和血、活血化瘀、降逆止呕、健脾和营、疏肝解郁、健脾导滞为治则, 取四君子汤、丹参饮、左金丸、逍遥散、枳实芍药散、枳术丸、木香槟榔丸等 7 个不同功效的古方化裁而成。方中以红参、黄芪、黄精、炙甘草益气健

脾; 丹参、木香活血行气止痛; 白术、白芍舒肝止痛; 茯苓利湿, 枳实理气, 炒鸡内金消食; 黄连、吴茱萸清泄郁热; 天花粉生津止渴; 瓜蒌壳行气宽中, 半夏消痞散结, 共奏健脾益气、疏肝解郁、清热止呕、行气化痰等功效, 以扶正祛邪, 达到阴阳和合的目的^[6]。

Raf 激酶是由 Raf 基因编码的蛋白产物, Raf-1 是首先被验证的家族成员, 是酪氨酸激酶相关的信号传导途径中的重要信号分子之一。Raf-1 可通过与其他信号分子的相互作用, 从而影响肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡, 起到促进肿瘤发生、发展的作用^[12]。有研究^[13]表明, 在 NIH3T3 细胞中激活 Raf-1 蛋白激酶时, 可以促使静止的细胞进入增殖活跃状态。应用 Raf-1 抑制剂 Forsoln 或应用 siRNA 抑制 Raf-1 蛋白表达都可以抑制胃癌细胞的增殖^[14]。Ras/Raf/MEK/ERK 通路是 MAPK 众多信号通路中的一个, Raf 为其中重要的一员, 其作用是磷酸化并激活下游底物 MEK。Raf-1 在细胞增殖信号通路中的作用是通过 ERK1/2 来实现的。由此可见, Raf-1 与肿瘤细胞的增殖息息相关, 其可能是通过 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路介导肿瘤细胞的增殖。Raf-1 除了可以促进肿瘤细胞增殖外, 还参与到肿瘤细胞的凋亡中。应用流式细胞检测发现使用 Raf-1 抑制剂 Forsoln 或 siRNA 抑制 Raf-1 蛋白表达都可以促进胃癌细胞的凋亡^[14]。Bcl-2 作为一种凋亡抑制蛋白, 当其过表达时可以激活 Raf-1, 从而将抑制细胞凋亡信号传递至线粒体, 介导了 Bcl-2 家族成员促凋亡蛋白 Bad 的磷酸化失活, 发挥抑制细胞凋亡的作用^[15-18]。

本研究显示, 模型组 Raf-1 基因表达上调, 胃复春组以及加味七方胃痛颗粒组 Raf-1 基因表达均低于模型组, 说明胃复春及加味七方胃痛颗粒均能抑制 Raf-1 基因的表达。而 Western Blot 及免疫组化检测结果证实加味七方胃痛颗粒能够下调 Raf-1 蛋白的表达, 效果优于阳性对照药胃复春, 其中以加味七方胃痛颗粒中剂量组(18 g·kg⁻¹)的作用最明显。本实验结果证实了在癌前病变的 CAG 大鼠模型中, Raf-1 表达上调, 而加味七方胃痛颗粒可以下调 Raf-1 表达, 从而抑制胃癌癌前病变的进展。本课题组前期研究^[6]已证实加味七方胃痛颗粒可以通过下调 Bcl-2 和 cyclinD1 的表达, 抑制 CAG 细胞增殖, 促进凋亡的作用。据此推测加味七方胃痛颗粒可通过 Raf-1 基因介导 CAG 细胞增殖和凋亡, 从而抑制胃癌癌前病变

的进展,其具体调控机制将是我们下一步的研究方向。

参考文献:

- [1] 姚树坤.胃癌前病变的防治策略[J]. 医学与哲学(B), 2015, 36(11): 16-18.
- [2] 陈廷玉,卢春风,苗智,等.宫颈癌PCNA和PTEN的表达与癌细胞增殖及淋巴结转移的关系[J]. 解剖学研究, 2010, 32(1): 17-20.
- [3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [4] 李海文,潘华峰,王超,等.从癌毒角度论述胃癌前病变[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 381-183.
- [5] COBURN N G, GOVINDARAJAN A, LAW C H, et al. Stage-specific effect of adjuvant therapy following gastric cancer resection: a population-based analysis of 4041 patients[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(2): 500-507.
- [6] 王鲜庭.加味七方胃痛颗粒对胃癌前病变大鼠bcl-2、cyclinD1表达的影响[D]. 南宁:广西中医药大学, 2016.
- [7] 王少墨,王秀薇,柳涛,等.王庆其治疗胃癌前病变思路探析[J]. 中医杂志, 2014, 55(22): 1902-1905.
- [8] 唐梅文,王伟,李桂贤,等.加味七方胃痛颗粒对大鼠实验性萎缩性胃炎胃黏膜组织超微结构的影响[J]. 新中医, 2010, 42(5): 105-107.
- [9] 唐梅文,罗伟生,李桂贤,等.七方胃痛胶囊对实验性胃溃疡大鼠表皮生长因子及其受体的影响[J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(20): 1290.
- [10] 谢伟昌,刘磊,姜小艳,等.基于内质网IRE1-JNK通路探讨萎缩性胃炎治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(21): 2298-2304.
- [11] 苏泽琦,陈润花,李培彩,等.慢性萎缩性胃炎证候分布规律研究现状与思考[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(1): 42-45, 62.
- [12] LI J, FAN Y, ZHANG Y N, et al. The Raf-1 inhibitor GW5074 and the ERK1/2 pathway inhibitor U0126 ameliorate PC12 cells apoptosis induced by 6-hydroxydopamine[J]. Pharmazie, 2012; 67(8): 718-24.
- [13] GAVIN, THURETON. Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage[J]. Journal of Anatomy, 2002, 200(6): 575-580.
- [14] 孟繁平. Raf-1在胃癌及其血管生成中的作用及分子机制研究[D]. 西安:第四军医大学, 2005.
- [15] LEICHT D T, BALAN V, KAPLUN A, et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1196-212.
- [16] DHILLON A S, HAGAN S, RATH O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer[J]. Oncogene, 2007, 14, 26(22): 3279-3290.
- [17] KHOLODENKO B N, HANCOCK J F, KOLCH W. Signalling ballet in space and time[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(6): 414-426.
- [18] WANG H G, RAPP U R, REED J C. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria[J]. Cell, 1996, 15, 87(4): 629-638.

(编辑:梁进权)