

刺五加注射液对慢性萎缩性胃炎癌前病变模型大鼠的作用及机制研究

王献超^{1*}, 孔德胜², 刘旭照³, 吴浩亮¹

1. 邯郸邯钢医院, 河北 邯郸 056000

2. 邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056000

3. 华北理工大学, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 探讨刺五加注射液(CWJI)对慢性萎缩性胃炎(CAG)癌前病变模型大鼠的作用及机制。方法 采用 N -甲基- N' -硝基- N -亚硝基胍(MNNG)复合法构建CAG癌前病变大鼠模型,模型大鼠随机分为模型组、胃复春胶囊($400\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig给药)组和CWJI低、中、高剂量(15 、 30 、 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,临床等效剂量的 0.5 、 1 、 2 倍,ip给药)组,每组12只,另取12只大鼠设为对照组,对照组和模型组ip给予等体积 0.9% 氯化钠溶液,每天给药1次,共给药12周。HE染色后光学显微镜观察胃黏膜病理变化,醋酸铀和枸橼酸铅双染色后电子显微镜观察胃黏膜上皮细胞超微结构变化;ELISA法检测血清胃蛋白酶原I(PGI)、PGII、胃泌素(GAS)、白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;流式细胞术检测外周血中自然杀伤(NK)细胞和T淋巴细胞亚群比例;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法、Western blotting法检测胃黏膜缺氧诱导因子 1α (HIF- 1α)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、核因子- κ B(NF- κ B)mRNA和蛋白表达。结果 与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI中、高剂量组大鼠胃黏膜变薄、腺泡萎缩、新生血管增生、炎性细胞浸润以及肠上皮化生、上皮内瘤变等病理改变明显改善,胃黏膜上皮细胞核大小不等、核分裂相增多、染色质结构异常等超微结构改变明显减轻;血清PGI、PGII、GAS水平和PGI/PGII值显著提高,IL- 1β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$);外周血NK细胞、CD3⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值显著升高($P<0.05$),CD8⁺T淋巴细胞比例显著降低($P<0.05$);胃黏膜HIF- 1α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。结论 CWJI可阻断或逆转大鼠CAG癌前病变,其机制可能与提高细胞免疫功能以及调控HIF- 1α /VEGFA/NF- κ B信号通路,抑制血管新生和炎症反应有关。

关键词: 刺五加注射液;慢性萎缩性胃炎;癌前病变;免疫功能;血管新生;炎症;缺氧诱导因子 1α ;核因子 κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0355-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.016

Effect and mechanism of Ciwujia Injection on chronic atrophic gastritis precancerous lesion model rats

WANG Xianchao¹, KONG Desheng², LIU Xuzhao³, WU Haoliang¹

1. Handan Iron and Steel Hospital, Handan 056000, China

2. Handan Central Hospital, Handan 056000, China

3. North China University of Technology, Tangshan 063000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Ciwujia Injection (CWJI) on precancerous lesions model rats of chronic atrophic gastritis (CAG) and explore its possible mechanism. **Methods** The CAG precancerous lesion model rats were established by N -methyl- N' -nitro- N -nitrosoguanidine (MNNG) compound method. The model rats were randomly divided into model group, Weifuchun Capsule ($400\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig administration) group, and CWJI low, medium and high dose (15 , 30 , $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, 0.5 , 1 , 2 times of the clinical equivalent dose, ip administration) group, another 12 rats in each group, 12 rats were selected as control group, rats in control group and model group were ip given the same volume of 0.9% sodium chloride solution, once a day, a total of 12 weeks of administration. The pathological changes of gastric mucosa was observed by optical microscope after HE staining, the ultrastructural changes of gastric mucosa epithelial cells was observed by electron microscope after double staining with uranyl

收稿日期: 2022-10-21

基金项目: 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目(21422083020)

*通信作者: 王献超(1986—),男,主治医师,主要从事中医内科诊治及科研工作。E-mail: wx860715@163.com

acetate and lead citrate. The contents of pepsinogen I (PG I), PG II, gastric (GAS), interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA method. The proportion of natural killer (NK) cells and T lymphocyte subsets in peripheral blood were detected by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), nuclear factor κ B (NF- κ B) in gastric mucosa were detected by real-time quantitative fluorescence PCR (qRT-PCR) and Western blotting method. **Results** Compared with model group, the pathological changes of gastric mucosa such as gastric mucosal became thinner, acinar atrophy, neovascularization, inflammatory cell infiltration, intestinal metaplasia, intraepithelial neoplasia of the rats in Weifuchun Capsule group and CWJI medium, high dose groups were significantly improved. Compared with model group, the ultrastructural changes such as unequal size of nuclei, mitotic phase increased, chromatin structure abnormal of epithelial cells of the rats in Weifuchun Capsule group and CWJI medium, high dose groups were significantly alleviated. Compared with model group, the contents of PG I, PG II, GAS in serum and the ratio of PG I/PG II were significantly increased, the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α in serum were significantly decreased ($P < 0.05$), the proportion of NK cells, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$ T lymphocytes in peripheral blood and the ratio of CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ were significantly increased ($P < 0.05$), while the proportion of CD8 $^{+}$ T lymphocyte was significantly decreased ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression of HIF-1 α , VEGFA, VEGFR2, NF- κ B in gastric mucosa were significantly decreased ($P < 0.05$) in Weifuchun Capsule group and CWJI medium, high dose groups. **Conclusion** CWJI can block or revers CAG precancerous lesions in rats, which mechanism may be related to the improvement of cellular immune function and regulating HIF-1 α /VEGFA/NF- κ B signaling pathway, inhibiting angiogenesis and inflammation.

Key words: Ciwujia Injection; chronic atrophic gastritis; precancerous lesions; immune function; angiogenesis; inflammation; hypoxia-inducible factor 1 α ; nuclear factor κ B

胃癌是全球范围内发病率最高的恶性肿瘤之一,致死数约占癌因性死亡人数的8.7%,居全部恶性肿瘤的第3位。包括我国在内的东亚地区是胃癌高发区,2020年我国胃癌新发病例(47.9万)和致死病例(37.4万)均接近全球总数的50%,胃癌是威胁我国居民生命健康的主要疾病之一^[1]。病理学认为,胃癌发病过程经历“慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎(CAG)-肠上皮化生-异型增生-黏膜内癌-浸润性胃癌”几个阶段,其中CAG合并肠上皮化生或异型增生的癌变率约为10%,即癌前病变^[2]。因此,靶向抑制或逆转癌前病变是降低胃癌发病率的有效途径。

胃癌在中医属于“胃脘痛”“噎膈”“食痹”“伏梁”等症的范畴,“脾虚湿困、脾胃亏虚、湿聚痰结交阻于胃脘”是其主要病机,宜采取“益气健脾、祛湿化痰”方案治疗^[3]。中药刺五加性温、味微苦,归脾、肾经,具有益气健脾、祛痰化湿、补肾安神等功效^[4]。刺五加注射液(CWJI)是由刺五加的茎叶经水醇法提取精制而成的一种中药注射剂,目前临床上主要用于肝肾不足所致的短暂性脑缺血发作、脑动脉硬化、脑栓塞等疾病的治疗。近年来药理学研究证实,刺五加提取物通过提高免疫力、抑制炎症和血管新生对宫颈癌、肉瘤等起到一定的抑制作用^[5-6],对人胃癌 KATO III 细胞增殖具有抑制作用^[7]。CAG癌前病变病理机制非常复杂,其中免疫功能下降、炎症反应、血管新生在其发生及进展过程中发

挥着关键作用^[8-10],CWJI对CAG癌前病变的影响尚未见文献报道。本研究将探讨CWJI对CAG癌前病变的影响及其可能的作用机制,以期为临床阻断或逆转CAG癌前病变提供新的治疗思路。

1 材料

1.1 实验动物

75只清洁级健康雄性Wistar大鼠,6周龄,体重160~200 g,由赛业(固安)生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2021-003。大鼠饲料由河北省实验动物中心提供,大鼠在温度23~25℃、湿度55%~70%、12 h光暗循环的控制环境中分笼饲养,进食饮水不限。本实验通过邯郸邯钢医院伦理委员会批准[伦理号HDHGLL(K)2021-016]。

1.2 药物与主要试剂

CWJI购自多多药业有限公司(规格20 mL:100 mg,批号D2021F03017);胃复春胶囊购自杭州胡庆余堂药业有限公司(规格每粒0.35 g,批号210425);N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)购自日本化成工业株式会社(批号CXR5M-CE);盐酸雷尼替丁片购自万邦德制药集团股份有限公司(规格每粒0.15 g,批号3172012024);HE染色试剂盒、胃蛋白酶原I(PG I)、PG II、胃泌素(GAS)ELISA法检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号D006-1-4、H347-1、H348-1、H239);醋酸铀、枸橼酸铅购自国药集团化学试剂有限公司(批号200723、

191105); 白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA法检测试剂盒和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司(批号SEKR-0002、SEKR-0005、SEKR-0009、RP1100、PC0020); 自然杀伤(NK)细胞、CD3⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞荧光标记抗体购自英国Abcam公司(批号ab37016、ab51436、ab51442、ab51709); RNA提取和纯化试剂盒购自美国Thermo Fisher公司(批号00600138); 逆转录试剂盒购自美国Fementas公司(批号K1622); 缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、核因子 κ B(NF- κ B)、 β -actin上下游引物购自基因科技(上海)股份有限公司; HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B、 β -actin抗体购自美国Affinity公司(批号AF7735、AF5908、AF5416、AF3827、AF2739); IgG二抗购自北京中山金桥公司(批号ZB2305)。

1.3 主要仪器

EG1150型石蜡包埋机、RM2235型切片机、EMUC7型超薄切片机(德国Leica公司); BX53M型光学显微镜(日本Olympus公司); H-7500型透射电子显微镜(日本Hitachi公司); MA-6000型RT-PCR仪(加拿大Molarray公司); DTX 880型全波长酶标仪(美国Beckman公司); 5430R型可控温离心机(德国Eppendorf公司); PowerPac型电泳仪及转印槽(美国Bio-Rad公司); Tanon52型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模、给药及取材

适应性饲养1周后, 随机取12只Wistar大鼠设为对照组, 剩余63只大鼠参照文献报道^[11]的MNNG复合法构建CAG癌前病变大鼠模型: 配制质量浓度为0.04 g·mL⁻¹的MNNG溶液作为饮用水, 避光自由饮用MNNG溶液+盐酸雷尼替丁(0.03 g·kg⁻¹, 每天ig 1次)+饥饿失常(饱食2 d、禁食1 d, 3 d为1个周期), 连续20周。随机取3只大鼠进行造模结果判断, 经病理学观察, 均出现CAG伴肠上皮化生或异型增生, 即可判定造模成功^[12]。将剩余60只成模大鼠, 随机分为: 模型组、胃复春胶囊(400 g·kg⁻¹, ig给药)组和CWJ低、中、高剂量(15、30、60 mg·kg⁻¹, 临床等效剂量的0.5、1、2倍, ip给药)组, 每组12只。对照组和模型组ip给予等体积0.9%氯化钠溶液, 每天给药1次, 疗程12周。

给药结束后, 每只大鼠ip 40 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠实施麻醉后开腹, 通过抗凝管经腹主动脉采外周血5 mL, 备检; 经腹主动脉取外周血5 mL, 静置0.5 h后3 000 r·min⁻¹离心($r=10$ cm)5 min取血清, 备检。颈椎脱臼处死后取胃组织。

2.2 HE染色观察胃黏膜病理变化

取胃组织, 沿胃大弯剪开、4℃预冷0.9%氯化钠溶液冲洗, 取部分胃黏膜组织置于4%多聚甲醛溶液固定后, 依次进行石蜡包埋、4 μ m厚度切片、展片、烤片、脱蜡、二甲苯透明处理, 行HE染色后封片, 由病理科医师在光学显微镜下观察胃黏膜病理变化, 计数出现CAG、肠上皮化生、异型增生的大鼠数量。

2.3 电子显微镜观察胃黏膜上皮细胞超微结构变化

取部分胃黏膜组织, 修剪成1 mm³小块后2.5%戊二醛溶液固定2 h、1%锇酸固定2 h, 梯度丙酮脱水、环氧树脂包埋后, 60 nm超薄切片、醋酸铀和柠檬酸铅双染色(分别染色处理30 min)后, 通过透射电子显微镜观察胃黏膜上皮细胞超微结构。

2.4 ELISA法检测血清PG I、PG II、GAS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平

取血清, 遵照各试剂盒说明, 采用ELISA法检测血清PG I、PG II、GAS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.5 流式细胞术检测外周血中NK细胞和T淋巴细胞亚群比例

取外周血, 4℃、3 000 r·min⁻¹离心($r=10$ cm)10 min取沉淀, 4℃孵育NK细胞和T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)荧光标记抗体1 h后, 再次离心取沉淀, 通过流式细胞仪检测外周血中NK细胞和T淋巴细胞亚群比例。

2.6 qRT-PCR法检测胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA表达

取100 mg胃黏膜组织, 冰上剪碎后提取并纯化总RNA, 通过核酸分析仪检测总RNA浓度后, 按照试剂盒说明逆转录成cDNA后行qRT-PCR扩增, 反应条件设置: 94℃变性5 min, 95℃、30 s, 退火60℃、30 s, 72℃、30 s, 共40个循环, 72℃延伸5 min。以 β -actin为内参, 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算mRNA相对表达量。HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B、 β -actin的引物序列见表1。

2.7 Western blotting检测胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达

取100 mg胃黏膜组织, 冰上剪碎后加入1 mL

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Sequence of RT-PCR primer

名称	引物序列
<i>HIF-1α</i> 上游	5'-CCCATTCTCATCCATCAAACATT-3'
下游	5'-CTTCTGGCTCATAACCCATCAACTC-3'
<i>VEGFA</i> 上游	5'-CCTCTCCCTACCCCACTTCCT-3'
下游	5'-CACTTTCTCTTTTCTCTGCCTCCAT-3'
<i>VEGFR2</i> 上游	5'-GAGTTGGTGGAGCATTGGGAA-3'
下游	5'-ATACAGGAAACAGGTGAGGTAGGCA-3'
<i>NF-κB</i> 上游	5'-GACCTGGAGCAAGCCATTAG-3'
下游	5'-CGCACTGTCACCTGGAAGC-3'
<i>β-actin</i> 上游	5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
下游	5'-CCCATACCCACCATCACCCC-3'

蛋白裂解液进行匀浆、超声破碎,提取总蛋白并经BCA法测定水平后配平,以30 μg总蛋白量上样,10% SDS-PAGE电泳分离、转PVDF膜、室温震荡封闭1 h后,TBST洗膜后4℃孵育一抗稀释液HIF-1α(1:1 000)、VEGFA(1:1 000)、VEGFR2(1:800)、NF-κB(1:1 000)、β-actin(1:2 000)过夜,TBST洗膜后室温孵育IgG二抗稀释液(1:2 000)1 h,TBST洗膜后ECL显影,通过Image J软件分析条带灰度值,以β-actin为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.8 统计学方法

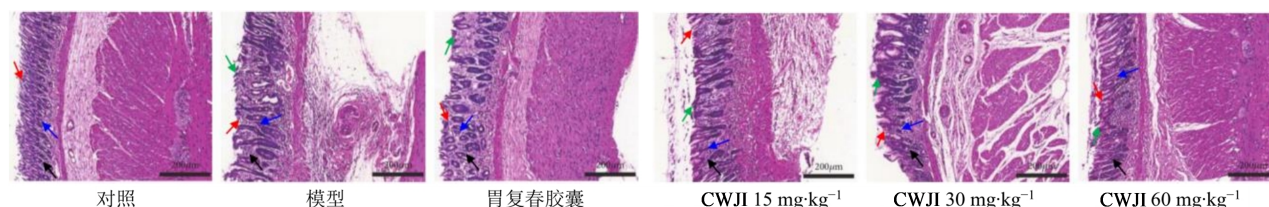
采用SPSS 20.0对数据进行处理,计量资料符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐)或Dunnett's T3检验(方差不齐);计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜病理变化的影响

对照组胃黏膜结构完整、上皮细胞排列整齐、腺泡饱满;模型组可见胃黏膜变薄,上皮细胞增生、大小不一、排列不规则,腺泡萎缩、数量减少,新生血管增生,炎性细胞浸润以及肠上皮化生、上皮内瘤变等病理变化;与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI中、高剂量组胃黏膜病理变化明显改善。结果见图1。

与对照组比较,模型组未见异常动物数显著减少($P<0.05$),腺体减少、肠上皮化生、异型增生动物数均显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI中、高剂量组未见异常动物数显著增加($P<0.05$),腺体减少、肠上皮化生、异型增生动物数均显著减少($P<0.05$);低剂量组肠上皮化生、异型增生动物数均显著减少($P<0.05$)。结果见表2。



黑色箭头表示胃黏膜,红色箭头表示上皮细胞,蓝色箭头表示腺泡,绿色箭头表示肠上皮化生

Black arrow represents gastric mucosa, red arrow represents epithelial cells, blue arrow represents acini, green arrow represents intestinal metaplasia

图1 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜病理变化的影响(×400)

Fig. 1 Effect of CWJI on pathological changes of gastric mucosa in rats with CAG precancerous lesions (×400)

表2 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜病理变化的影响

Table 2 Effect of CWJI on pathological changes of gastric mucosa in rats with CAG precancerous lesions

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只(占比/%)			
		未见异常	腺体减少	肠上皮化生	异型增生
对照	—	12(100)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
模型	—	0(0.00)*	12(100)*	11(91.67)*	4(33.33)*
胃复春胶囊	400	3(25.00) [#]	9(75.00) [#]	4(33.33) [#]	0(0.00) [#]
CWJI	15	1(8.33)	11(91.67)	6(41.67) [#]	1(8.33) [#]
	30	3(25.00) [#]	9(75.00) [#]	3(25.00) [#]	0(0.00) [#]
	60	6(50.00) [#]	6(50.00) [#]	1(8.33) [#]	0(0.00) [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

3.2 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞超微结构变化的影响

对照组胃黏膜上皮细胞排列有序,胞核等圆、居中,核膜边界清晰;模型组胃黏膜上皮细胞可见数量增生、排列无序、胞核大小不等、核分裂相增多、染色质结构异常等超微结构改变;与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI低、中、高剂量组胃黏膜上皮细胞超微结构变化明显改善,且CWJI作用呈剂量相关性。见图2。

3.3 CWJI对CAG癌前病变大鼠血清PG I、PG II、GAS水平的影响

与对照组比较,模型组血清PG I、PG II、GAS水平和PG I/PG II值显著降低($P<0.05$);与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI低、中、高剂量组血清PG

I、PG II、GAS水平及PG I/PG II值显著升高($P<0.05$),且CWJI上述作用呈剂量相关性。见表3。

3.4 CWJI对CAG癌前病变大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

与对照组比较,模型组血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI低、中、高剂量组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$),且CWJI上述作用呈剂量相关性。见表4。

3.5 CWJI对CAG癌前病变大鼠外周血中NK细胞和T淋巴细胞亚群比例的影响

与对照组比较,模型组外周血中NK细胞、CD3⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值显著降低,CD8⁺T淋巴细胞比例显著升

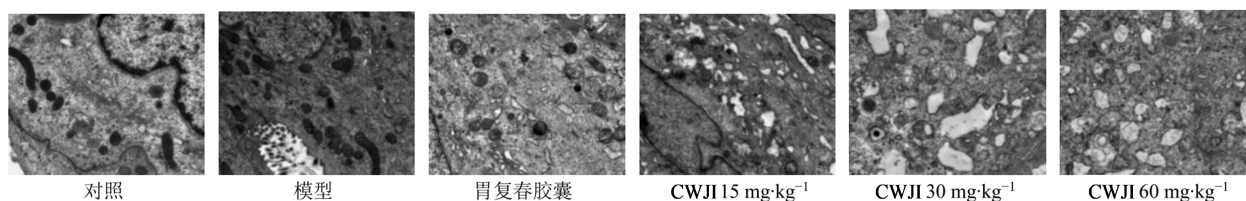


图2 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞超微结构变化的影响($\times 10\ 000$)

Fig. 2 Effect of CWJI on ultrastructure of gastric mucosal epithelial cells in rats with CAG precancerous lesions ($\times 10\ 000$)

表3 CWJI对CAG癌前病变大鼠血清PG I、PG II、GAS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of CWJI on content of PG I, PG II, and GAS in serum of rats with CAG precancerous lesion ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PG I/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PG II/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PG I/PG II	GAS/(ng·L ⁻¹)
对照	—	80.43 $\pm$ 11.57	2.21 $\pm$ 0.20	36.40 $\pm$ 4.08	84.16 $\pm$ 10.29
模型	—	39.85 $\pm$ 6.02 [*]	1.44 $\pm$ 0.13 [*]	27.67 $\pm$ 2.99 [*]	41.73 $\pm$ 5.52 [*]
胃复春胶囊	400	61.26 $\pm$ 8.94 [#]	1.85 $\pm$ 0.15 [#]	33.12 $\pm$ 3.57 [#]	63.29 $\pm$ 8.67 [#]
CWJI	15	47.59 $\pm$ 6.38 [#]	1.60 $\pm$ 0.15 [#]	30.54 $\pm$ 3.05 [#]	51.24 $\pm$ 6.71 [#]
	30	60.84 $\pm$ 8.72 [#]	1.78 $\pm$ 0.16 [#]	34.18 $\pm$ 3.26 [#]	62.19 $\pm$ 8.84 [#]
	60	75.65 $\pm$ 10.04 [#]	1.99 $\pm$ 0.21 [#]	38.01 $\pm$ 3.49 [#]	76.08 $\pm$ 9.15 [#]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

表4 CWJI对CAG癌前病变大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of CWJI on content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum of rats with CAG precancerous lesion ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)
对照	—	7.36 $\pm$ 1.08	22.14 $\pm$ 2.95	16.49 $\pm$ 2.16
模型	—	19.64 $\pm$ 2.75 [*]	76.58 $\pm$ 11.30 [*]	57.03 $\pm$ 10.82 [*]
胃复春胶囊	400	11.39 $\pm$ 1.50 [#]	42.74 $\pm$ 6.01 [#]	32.81 $\pm$ 5.69 [#]
CWJI	15	16.72 $\pm$ 2.13 [#]	61.52 $\pm$ 8.74 [#]	43.59 $\pm$ 7.05 [#]
	30	12.98 $\pm$ 1.65 [#]	43.86 $\pm$ 5.98 [#]	30.52 $\pm$ 5.17 [#]
	60	10.47 $\pm$ 1.46 [#]	30.95 $\pm$ 3.82 [#]	21.81 $\pm$ 3.04 [#]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

高($P<0.05$);与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI中、高剂量组NK细胞、CD3⁺ T淋巴细胞、CD4⁺ T淋巴细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值显著升高($P<0.05$),CD8⁺ T淋巴细胞比例显著降低($P<0.05$),CWJI低剂量组NK细胞比例显著升高($P<0.05$),CWJI上述作用呈剂量相关性。见表5。

3.6 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA表达量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI低、中、高剂量组

HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA表达量显著降低($P<0.05$),且CWJI上述作用呈剂量相关性。见表6。

3.7 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,胃复春胶囊组和CWJI中、高剂量组HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达量显著降低($P<0.05$),CWJI低剂量组VEGFA蛋白表达量显著降低($P<0.05$),且CWJI上述作用呈剂量相关性。见图3、表7。

表5 CWJI对CAG癌前病变大鼠外周血中NK细胞和T淋巴细胞亚群比例的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 5 Effect of CWJI on proportion of NK cells and T lymphocyte subsets in peripheral blood of rats with CAG precancerous lesion ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NK/%	CD3 ⁺ T细胞/%	CD4 ⁺ T细胞/%	CD8 ⁺ T细胞/%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照	—	20.08±2.31	69.04±8.25	40.87±5.16	16.94±2.47	2.41±0.33
模型	—	11.76±1.20 [*]	38.51±5.03 [*]	24.95±3.71 [*]	28.83±4.26 [*]	0.87±0.16 [*]
胃复春胶囊	400	15.27±1.77 [#]	48.54±6.39 [#]	29.36±4.10 [#]	21.65±3.18 [#]	1.36±0.20 [#]
CWJI	15	13.59±1.47 [#]	42.83±5.75	26.17±3.96	26.92±3.81	0.97±0.18
	30	15.64±1.83 [#]	50.91±6.42 [#]	30.24±4.08 [#]	22.75±3.20 [#]	1.33±0.23 [#]
	60	17.95±2.01 [#]	58.36±7.14 [#]	35.08±4.42 [#]	19.16±2.87 [#]	1.83±0.29 [#]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

表6 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 6 Effects of CWJI on mRNA expression of HIF-1 α , VEGFA, VEGFR2, and NF- κ B in gastric mucosa of rats with CAG precancerous lesion ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HIF-1 α /β-actin	VEGFA/β-actin	VEGFR2/β-actin	NF- κ B/β-actin
对照	—	0.38±0.07	0.41±0.08	0.17±0.02	0.28±0.04
模型	—	1.31±0.20 [*]	1.09±0.19 [*]	0.44±0.08 [*]	0.72±0.15 [*]
胃复春胶囊	400	0.78±0.14 [#]	0.75±0.15 [#]	0.29±0.06 [#]	0.49±0.09 [#]
CWJI	15	1.09±0.18 [#]	0.91±0.17 [#]	0.35±0.07 [#]	0.58±0.10 [#]
	30	0.82±0.15 [#]	0.73±0.14 [#]	0.28±0.05 [#]	0.46±0.08 [#]
	60	0.56±0.11 [#]	0.58±0.12 [#]	0.22±0.04 [#]	0.37±0.06 [#]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

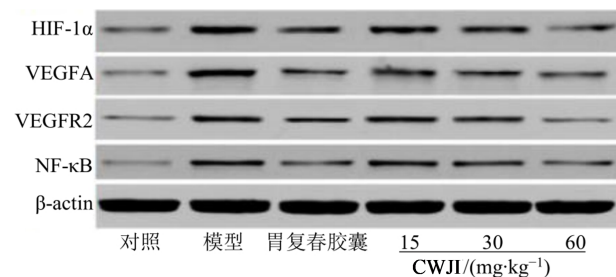


图3 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of CWJI on protein expression of HIF-1 α , VEGFA, VEGFR2, NF- κ B in gastric mucosa of rats with CAG precancerous lesion

4 讨论

CAG是一种以腺体丧失为主要病理特征的慢性消化系统疾病,发病率10.9%。胃黏膜萎缩会显著增加胃癌患病风险,目前病理学认为CAG伴肠上皮化生或异型增生是最重要的胃癌癌前病变之一^[13]。本研究发现,CAG癌前病变大鼠呈现胃黏膜变薄、新生血管增生、腺泡萎缩、数量减少、炎性细胞浸润以及肠上皮化生、上皮内瘤变等病理改变,与黄铭涵等^[14]和王艺臻等^[15]报道一致;胃黏膜上皮细胞呈现数量增生、排列无序、胞核大小不等、核分裂相增多、染色质结构异常等超微结构改变,与张

表7 CWJI对CAG癌前病变大鼠胃黏膜HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)Table 7 Effects of CWJI on protein expression of HIF-1 α , VEGFA, VEGFR2, and NF- κ B in gastric mucosa of rats with CAG precancerous lesion ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HIF-1 α / β -actin	VEGFA/ β -actin	VEGFR2/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
对照	—	0.08 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01
模型	—	0.61 $\pm$ 0.11 [*]	0.64 $\pm$ 0.12 [*]	0.38 $\pm$ 0.07 [*]	0.32 $\pm$ 0.06 [*]
胃复春胶囊	400	0.23 $\pm$ 0.04 [#]	0.18 $\pm$ 0.03 [#]	0.15 $\pm$ 0.03 [#]	0.11 $\pm$ 0.02 [#]
CWJI	15	0.54 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.09 [#]	0.36 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.06
	30	0.34 $\pm$ 0.07 [#]	0.25 $\pm$ 0.04 [#]	0.30 $\pm$ 0.05 [#]	0.24 $\pm$ 0.05 [#]
	60	0.10 $\pm$ 0.02 [#]	0.14 $\pm$ 0.03 [#]	0.07 $\pm$ 0.02 [#]	0.09 $\pm$ 0.02 [#]

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

成哲等^[16]报道一致; CWJI则能够剂量相关性地改善CAG癌前病变大鼠胃黏膜组织病理学变化和胃黏膜上皮细胞超微结构改变。PG I和PG II是由胃黏膜腺体分泌的2种消化酶前体, PG I由胃底腺主细胞和黏液颈细胞分泌, PG II由胃底腺、胃体腺、幽门腺、十二指肠腺分泌, 对维持胃分解消化功能起着重要作用; GAS是由胃窦及十二指肠近端黏膜细胞分泌的一种多肽类激素, 具有促进胃酸分泌、保护胃黏膜、增强胃动力等生理作用。本研究发现, CAG癌前病变大鼠血清PG I、PG II、GAS水平和PG I/PG II值明显降低, 与Wang等^[17]和刘怀智等^[18]报道一致; 易文全等^[19]报道PG I、PG II、GAS水平及PG I/PG II值变化能够反映胃黏膜萎缩状况, 对胃癌癌前病变筛查具有重要意义。CWJI则能够剂量相关性地提高CAG癌前病变大鼠血清PG I、PG II、GAS水平和PG I/PG II值。提示CWJI能够阻断或逆转大鼠CAG癌前病变, 改善胃功能。

免疫功能下降、炎症反应及血管新生是CAG癌前病变的重要因素。NK细胞和T淋巴细胞对抗肿瘤免疫反应具有重要作用, NK细胞能够杀伤肿瘤细胞; T淋巴细胞数量能够反映机体细胞免疫功能, 其中CD3⁺ T淋巴细胞能够反映T淋巴细胞总量, CD4⁺ T淋巴细胞可刺激B淋巴细胞分泌抗体而抑制肿瘤细胞, CD8⁺ T淋巴细胞对细胞免疫功能具有负向调控作用, CD4⁺/CD8⁺值与细胞免疫功能呈正相关^[20-21]。杨姗莹等^[8]报道通过药物改善CAG癌前病变患者免疫功能, 对癌前病变进展具有抑制作用。杜菲等^[22]报道CAG癌前病变患者炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高, 引发局部炎症反应。IL-1 β 可促进炎症浸润, IL-6和TNF- α 可诱导中性粒细胞、单核细胞等在炎症部位聚集并进一步释放促炎因子而加重炎症反应^[23]。血管新生是肿瘤快速生长所需营养、

癌细胞向周边及全身转移扩散的通道, 有文献报道^[24]如果不存在血管新生, 肿瘤体积不会超过2 mm³。VEGFA为VEGF亚型, 能够与定位于血管内皮细胞的VEGFR2结合, 进而促进血管内皮细胞增殖和分化, 是促进血管新生的关键细胞因子。肿瘤快速增殖所致局部环境缺氧可诱导HIF-1 α 表达, VEGFA和VEGFR2均为HIF-1 α 下游靶基因, HIF-1 α 可诱导VEGFA和VEGFR2转录表达而促进肿瘤组织新生, 加速肿瘤生长^[25]。NF- κ B表达受VEGFA调控, 而NF- κ B能够诱导IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子表达而引发炎症反应^[26]。本研究发现, CWJI能够明显降低CAG癌前病变大鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 提高外周血NK细胞、CD3⁺ T淋巴细胞、CD4⁺ T淋巴细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值, 降低CD8⁺ T淋巴细胞比例, 降低HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、NF- κ B表达量, 提示CWJI能够提高CAG癌前病变大鼠细胞免疫功能, 抑制炎症反应和血管新生, 可能与调控HIF-1 α /VEGFA/NF- κ B信号通路有关。

CWJI可阻断或逆转大鼠CAG癌前病变, 其机制可能与提高细胞免疫功能以及调控HIF-1 α /VEGFA/NF- κ B信号通路、抑制血管新生和炎症反应有关。本研究结果为CWJI作为CAG癌前病变阻断或逆转药物提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国胃癌筛查与早诊早治指南(2022, 北京) [J]. 中国肿瘤, 2022, 31(7): 488-527.
He J, Chen W Q, Li Z S, et al. China guideline for the screening, early detection and early treatment of gastric cancer (2022, Beijing) [J]. China Cancer, 2022, 31(7): 488-527.

- [2] Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process: First American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention [J]. Cancer Res, 1992, 52(24): 6735-6740.
- [3] 陈慧君, 张宁苏, 邢向荣. 原发性胃癌中医证候病性分布特点研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(9): 16-20.
Chen H J, Zhang N S, Xing X R, et al. Study on the distribution characteristics of TCM syndromes in primary gastric cancer [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2018, 39(9): 16-20.
- [4] 梁子涵, 王旖瑶, 赖逸翔, 等. 刺五加提取物及其活性成分免疫调节作用的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4895-4904.
Liang Z H, Wang Y Y, Lai Y X, et al. Research progress on immunomodulatory effects of extracts and active ingredients of *Acanthopanax senticosus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(15): 4895-4904.
- [5] Lau K M, Yue G G, Chan Y Y, et al. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components [J]. Chin Med, 2019, 14: 25.
- [6] Meng Q L, Pan J Z, Liu Y J, et al. Anti-tumour effects of polysaccharide extracted from *Acanthopanax senticosus* and cell-mediated immunity [J]. Exp Ther Med, 2018, 15 (2): 1694-1701.
- [7] Hibasami H, Fujikawa T, Takeda H, et al. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells [J]. Oncol Rep, 2000, 7(6): 1213-1216.
- [8] 杨姗姗, 庄羽骁, 郭丽坤, 等. 莪连颗粒治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的疗效及对患者免疫功能的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(9): 638-641.
Yang S Y, Zhuang Y X, Guo L K, et al. Effect of Elian Granules on precancerous lesions of chronic atrophic gastritis and its influence on patients' immune function [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2021, 29(9): 638-641.
- [9] 徐晶钰, 张璇, 裴蓓, 等. 基于NLRP3炎症小体探讨从肝胃论治胃癌前病变阻断"炎-癌"转化的重要性 [J]. 中医药学报, 2022, 50(4): 5-8.
Xu J Y, Zhang X, Pei B, et al. Importance of blocking 'inflammation-cancer' transformation in treatment of PLGC from liver and stomach based on NLRP3 inflammasome [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2022, 50 (4): 5-8.
- [10] 蔺焕萍, 王巧侠, 王小平, 等. 基于VEGF, STAT3和HIF-1 α 信号转导分子探讨参佛胃康逆转小鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变作用机制 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2320-2322.
Lin H P, Wang Q X, Wang X P, et al. Based on VEGF, STAT3 and HIF-1 α signal transduction molecules, the mechanism of Shenfo Weikang in reversing precancerous lesions of chronic atrophic gastritis in mice was discussed [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(10): 2320-2322.
- [11] 白雪峰, 谭娟, 高枫. 理中汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜保护作用及对ADAM17、EGFR蛋白的影响 [J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 32-36, 41.
Bai X F, Tan J, Gao F. Effect of Lizhong Decoction(理中汤) on gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis and influence on proteins of ADAM17 and EGFR [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(10): 32-36, 41.
- [12] 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.
Fang J Y, Du Y Q, Liu W Z, et al. China consensus on chronic gastritis (Shanghai, 2017) [J]. Chin J Gastroenterol, 2017, 22(11): 670-687.
- [13] Wang J E, Kim S E, Lee B E, et al. The risk of diffuse-type gastric cancer following diagnosis with gastric precancerous lesions: A systematic review and Meta-analysis [J]. Cancer Causes Control, 2022, 33(2): 183-191.
- [14] 黄铭涵, 李思汉, 田琳, 等. 基于Sonic Hedgehog通路探讨复方胃炎合剂干预慢性萎缩性胃炎癌前病变的机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 230-235.
Huang M H, Li S H, Tian L, et al. Based on sonic hedgehog pathway to explore the mechanism of compound gastritis mixture on precancerous lesions of gastric cancer [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(2): 230-235.
- [15] 王艺臻, 王佳林, 朱西杰. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路研究复方蜥蜴散凝胶对胃癌前病变模型大鼠的调控作用 [J]. 中医学报, 2021, 36(10): 2154-2158.
Wang Y Z, Wang J L, Zhu X J. Effect of compound lizard powder gel on rats with precancerous lesions of gastric cancer based on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Acta Chin Med, 2021, 36(10): 2154-2158.
- [16] 张成哲, 卓俊城, 蔡甜甜, 等. 胃炎1号方对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞缺氧及缺氧耐受的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(5): 896-901.
Zhang C Z, Zhuo J C, Cai T T, et al. Effects of No. 1 Weiyang Decoction on hypoxia and hypoxic tolerance in gastric mucosal epithelial cells in rats with gastric precancerous lesion [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39 (5): 896-901.
- [17] Wang S M, Roth M J, Murphy G A, et al. Serologic profile of antiparietal cell antibodies, pepsinogens, and *H. pylori* and risk of upper gastrointestinal cancer: A nested

- case-control study in China [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(12): 2022-2029.
- [18] 刘怀智, 周海娟, 陈刚, 等. 基于 NOX/ROS 信号通路探讨益气化瘀解毒方治疗慢性萎缩性胃炎的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2936-2940.
- Liu H Z, Zhou H J, Chen G, et al. Mechanism of Yiqi Huayu Jiedu Decoction on chronic atrophic gastritis based on NOX/ROS signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5): 2936-2940.
- [19] 易文全, 郝卫刚, 刘睿, 等. 血清胃蛋白酶原 I、II 及胃泌素 17 检测对慢性萎缩性胃炎的诊断价值 [J]. 西部医学, 2022, 34(7): 1021-1025.
- Yi W Q, Hao W G, Liu R, et al. Early diagnosis of serum pepsinogen I, II and gastrin 17 in patients with chronic atrophic gastritis [J]. Med J West China, 2022, 34(7): 1021-1025.
- [20] Chraa D, Naim A, Olive D, et al. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes [J]. J Leukoc Biol, 2019, 105(2): 243-255.
- [21] 王松, 王玲玲, 阿依恒·曲库尔汗. 灵芝三萜对鼻咽癌小鼠免疫功能及 T 细胞亚群分化的影响 [J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 6-10.
- Wang S, Wang L L, Ayiheng Q K R H. Effects of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* on immune function and differentiation of T cell subsets in mice with nasopharyngeal carcinoma [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(9): 6-10.
- [22] 杜菲, 刘芳, 蒋曦依, 等. 幽门螺杆菌毒力因子及人遗传易感基因与胃癌及癌前病变的关联 [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2021, 48(1): 71-75.
- Du F, Liu F, Jiang X Y, et al. Recent progress on the association of *Helicobacter pylori* virulence factors and human genetic susceptibility with risk of gastric cancer and precancerous lesions [J]. Int J Epidemiol Infect Dis, 2021, 48(1): 71-75.
- [23] 李萍, 王静, 戴成祥, 等. 移植前输注间充质干细胞对脑死亡供鼠移植肾炎症细胞浸润及 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. 成都医学院学报, 2020, 15(1): 40-45.
- Li P, Wang J, Dai C X, et al. Effect of the infusion with mesenchymal stem cells before transplantation on the renal inflammatory cell infiltration and the expression of TNF- α and IL-1 β in brain-dead donor rats [J]. J Chengdu Med Coll, 2020, 15(1): 40-45.
- [24] 张伟令, 胡慧敏, 张谊, 等. 儿童恶性实体瘤肿瘤组织中 VEGF 的表达水平与临床预后的相关性研究 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2019, 24(6): 295-298, 342.
- Zhang W L, Hu H M, Zhang Y, et al. Study on the relationship between VEGF expression level of tumor tissue and clinical prognosis in children with malignant solid tumors [J]. J China Pediatr Blood Cancer, 2019, 24(6): 295-298, 342.
- [25] 杨瑶瑶, 陈丽, 龚莉, 等. 缺氧微环境对宫颈癌 HeLa 细胞 HIF-1 α 及 VEGF-A 表达的影响 [J]. 西南医科大学学报, 2017, 40(2): 123-127.
- Yang Y Y, Chen L, Gong L, et al. Effect of hypoxia on the expression of HIF-1 α and VEGF-A in HeLa cells [J]. J Southwest Med Univ, 2017, 40(2): 123-127.
- [26] 朱婷婷, 程紫薇, 邢东炜, 等. 基于 HIF-1 α /VEGF/NF- κ B 信号通路探讨天冬多糖调控 COMMD3 抑制肝癌血管生成的作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2836-2841.
- Zhu T T, Cheng Z W, Xing D W, et al. Antiangiogenic mechanism of asparagus polysaccharide in hepatocellular carcinoma by regulating COMMD3 via the HIF-1 α /VEGF/NF- κ B signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(5): 2836-2841.

[责任编辑 兰新新]