

· 基础研究 ·

化浊解毒方对慢性萎缩性胃炎大鼠的保护作用

王 杰¹ 马虹宇² 高云霄¹ 贾雪梅¹ 郭瑜西¹ 杨 柳¹ 李 泽¹ 李博林³ 杨 倩³

摘要 目的 基于磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT) 信号通路探讨化浊解毒方干预慢性萎缩性胃炎 (CAG) 大鼠的作用机制。方法 采用水杨酸钠、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 以及饥饿失常多因素诱导大鼠模型。将造模成功的 50 只大鼠按随机数字表法分为模型组, 摩罗丹组, 化浊解毒高、中、低剂量组, 每组 10 只。同时另设正常组 10 只。化浊解毒方高、中、低剂量组分别灌以化浊解毒方 (36、18、9 g/kg), 摩罗丹组灌以摩罗丹 1.4 g/kg, 正常组和模型组灌同等体积生理盐水, 均干预 60 天。苏木素-伊红 (HE) 观察胃黏膜组织形态学变化; 免疫比浊法检测大鼠血清胃蛋白酶原 I (PG I)、PG II 以及计算 PG I / PG II (PGR) 比值; 放射免疫法检测大鼠血清胃泌素 17 (G-17) 水平; Western Blot 检测胃黏膜 PI3K、p-AKT 蛋白表达含量; RT-qPCR 检测 PI3K、AKT、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN)、Bcl-2 相关凋亡促进因子 (BAD)、细胞抗凋亡因子 B 淋巴瘤-2 (Bcl-2) mRNA 水平。结果 与正常组比较, 模型组胃黏膜组织固有腺体萎缩, 排列混乱数量减少, 炎性细胞浸润; 血清 G-17、PG I、PGR 及胃组织 PTEN mRNA 降低 ($P < 0.05$), 血清 PG II、胃组织 PI3K、p-Akt 蛋白升高 ($P < 0.05$), PI3K、Akt、Bad、Bcl-2 mRNA 表达亦升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各药物干预组病理情况均有所改善, 其中化浊解毒方高、中剂量组对胃黏膜炎症及萎缩改善明显 ($P < 0.05$); 化浊解毒方各剂量组和摩罗丹组血清 G-17、PG I 升高, Bad、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 化浊解毒方高、中剂量组和摩罗丹组 PGR 值、PTEN mRNA 升高, PI3K、p-AKT 蛋白及 mRNA 降低 ($P < 0.05$)。与摩罗丹组比较, 化浊解毒方高、中剂量组 G-17、PG I 升高, Bad、Bcl-2 mRNA 降低, 化浊解毒方高剂量组 PI3K mRNA 降低 ($P < 0.05$)。结论 化浊解毒方对 CAG 大鼠有干预作用, 其作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号的激活, 促进胃黏膜细胞凋亡, 从而发挥保护胃黏膜作用。

关键词 化浊解毒方; 慢性萎缩性胃炎; 大鼠; PI3K/AKT 信号通路; 中药复方

Protective Effect of Huazhuo Jiedu Recipe on Chronic Atrophic Gastritis in Rats WANG Jie¹, MA Hong-yu², GAO Yun-xiao¹, JIA Xue-mei¹, GUO Yu-xi¹, YANG Liu¹, LI Ze¹, LI Bo-lin³, and YANG Qian³ 1 Department of Spleen and Stomach, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050091); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Hebei General Hospital, Shijiazhuang (050051); 3 Department of Spleen and Stomach, Hebei Province Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050011)

ABSTRACT Objective Based on the signal pathway of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase B protein kinase B (AKT), to explore the mechanism of Huazhuo Jiedu Recipe (HZJDR) on chronic atrophic gastritis (CAG) rats. **Methods** The rat model was induced by sodium salicylate, N-methyl-nitro-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and hunger and satiety disorder. Fifty rats were randomly divided into model group, morodan group and high, medium and low dose HZJDR groups of removing turbidity and detoxification, with 10 rats in each group. At the same time, 10 rats in normal group were set up. The high, middle and low dose HZJDR groups were administered with HZJDR (36, 18, 9 g/kg) by gastrogavage, respectively. The

基金项目: 国家中医临床研究基地建设项目 (No. 国中医药办科技函[2018]18 号); 国家科技部重点研发课题 (No. 2018YFC1704100, No. 2018YFC1704102); 河北省省级科技计划资助 (No. 21377724D, No. 21377740D); 河北省中医药管理局科研计划项目 (No. 2021034) 作者单位: 1. 河北中医学院脾胃科 (石家庄 050091); 2. 河北省人民医院中医科 (石家庄 050051); 3. 河北省中医院脾胃科 (石家庄 050011) 通讯作者: 杨 倩, Tel: 0311-69095545, E-mail: Yang0311qian@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220130.035

control group was administered with morodan 1.4 g/kg. Equal volume of normal saline was administered to rats in the normal group and model group by gastrogavage. All rats were intervened for 60 days. The histomorphological changes of gastric mucosa were observed by HE method, the levels of serum pepsinogen I (PG I) and PG II were detected by immunoturbidimetry, the ratio of PG I /PG II (PGR) was calculated, the level of serum gastrin 17 (G-17) was detected by radioimmunoassay. The protein expression of PI3K and p-AKT in gastric mucosa was detected by Western Blot, and the levels of PI3K, AKT, PTEN, Bad and Bcl-2 mRNA were detected by RT-qPCR. **Results** Compared with the normal group, the inherent glands of gastric mucosa atrophied, the number of disordered arrangement decreased, and inflammatory cells infiltrated. Serum G-17, PG I, PGR and PTEN mRNA in gastric tissue decreased, while serum PG II, PI3K and p-Akt protein in gastric tissue increased ($P<0.05$); the expressions of PI3K, Akt, Bad, and Bcl-2 mRNA were also increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological conditions of each drug intervention group were improved, and the high and medium dose HZJDR groups significantly improved the inflammation and atrophy of gastric mucosa ($P<0.05$); serum G-17 and PG I increased, the expression of Bad and Bcl-2 mRNA decreased in each dose HZJDR group and morodan group ($P<0.05$); PGR and PTEN mRNA increased, PI3K, p-Akt protein and mRNA decreased in high and medium dose HZJDR groups and morodan group ($P<0.05$). Compared with morodan group, G-17 and PG I increased, Bad and Bcl-2 mRNA decreased in high and medium dose HZJDR groups, and PI3K mRNA decreased in high dose HZJDR groups ($P<0.05$). **Conclusion** HZJDR has an interventive effect on CAG rats, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of PI3K/Akt signal and promoting the apoptosis of gastric mucosal cells, so as to protect gastric mucosa.

KEYWORDS Huazhuo Jiedu Recipe; chronic atrophic gastritis; rat; PI3K/AKT signal pathway; Chinese herbal compound

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是最常见的消化系统疾病之一, 表现为胃黏膜上皮和腺体萎缩, 腺体数量减少, 胃黏膜变薄, 黏膜基底层增厚, 伴或不伴肠上皮化生 (intestinal epithelial metaplasia, IM) 与异型增生 (atypical proliferation, ATP) [1]。CAG 作为胃癌癌前病变与肠化生、异型增生相关时, 癌变风险增强 [2]。有研究显示, 胃黏膜细胞增殖、凋亡失衡是 CAG 发生发展重要机制 [3]。在正常胃黏膜→慢性非萎缩性胃炎→CAG→肠上皮化生→异型增生→胃癌的演变过程中, 存在着异常的细胞增殖和凋亡 [4]。磷脂酰肌醇 3-激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路与胃上皮细胞的增殖和凋亡关系密切。目前中医药在预防和治疗 CAG 方面具有明显优势 [5]。

国医大师李佃贵教授总结多年临床经验及现代人们生活规律变化的观察, 独创浊毒理论, 认为浊毒内蕴为 CAG 的核心病机, 并贯穿疾病始终, 化浊解毒在 CAG 的防治上疗效显著, 可改善 IM 和异型增生, 证实了胃癌癌前病变是可逆的, 增加了通过药物预防胃癌的可能性 [6]。本研究旨在通过动物实验观察化浊解毒方对 CAG 大鼠的干预作用以及对 PI3K/AKT 蛋白表达的影响, 探讨该复方防治 CAG 的作用机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 6~8 周龄, 体重 (150 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2016-0006]。所有大鼠均在河北中医学院 SPF 级实验动物中心环境中饲养, 普通饲料喂养, 自由进食及饮水。本动物实验经由河北中医学院动物伦理委员会批准 (No. DWLL2019022)。

2 药物 化浊解毒方 (藿香 10 g 黄连 6 g 炒白术 12 g 豆蔻 6 g 白花蛇舌草 15 g 半枝莲 15 g 当归 12 g 川芎 9 g 三七粉 2 g (冲) 茯苓 15 g 炒白芍 15 g 百合 12 g 炒枳实 10 g 醋香附 9 g 木香 6 g 全蝎 3 g 延胡索 10 g 砂仁 6 g) 由河北省中医院药房提供, 浓缩配成含生药 3.6、1.8、0.9 g/mL 药液, 批号分别为 201102、2010041、200904、20092901、200901、200701、2011068、20102701、20010801、20112201、200904、200404、20082601、201001、20092101、201102、200704、201001。水杨酸钠 (天津市百世化工有限公司, 批号: 20210302); N-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍 (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine, MNNG) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号:

M105583); 摩罗丹(由百合、茯苓、玄参、乌药、泽泻、麦冬、当归、茵陈、延胡索、白芍、石斛、九节菖蒲、川芎、鸡内金、三七、白术、地榆、蒲黄组成, 邯郸制药股份有限公司, 16 丸 × 18 袋, 批号: Z20090013)。

3 主要试剂及仪器 胃蛋白酶原 I (pepsinogen I, PG I)、PG II 试剂盒(北京九强生物技术股份有限公司, 批号分别为: TGS711W、TGS721W); 胃泌素 17 (gastrin-17, G-17) 试剂盒(天津市协和医药科技集团有限公司, 批号: RB40637); RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司, 批号: P0013E); 发光试剂盒(Millipore, 批号: WBKLS0500); 硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC, Pall Corporation 公司, 批号: T22740); 山羊抗兔的二抗(北京中杉金桥, 批号: ZB2301); PI3K antibody、p-AKT antibody、beta-actin antibody(北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为: bs-2067R、bs-2720R、bs-0061R); 苏木素-伊红染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司, 批号: BA4025); DEPC(Sigma, 批号: D5758); Primers(生工上海总部合成部, 批号: 260064816); MicroAmp Optical 8-Cap Strip(Life technologies, 批号: REF4323032); MicroAmp Fast Reaction Tubes(Life technologies, 批号: REF4358293)。

主要仪器: TDL-5-A 离心机(上海安亭); SHB-D 循环水真空泵(郑州长城); FJ-2021 γ -放射免疫计数器(西安二六二厂); SHA-B 恒温振荡器(常州国华); DL-CJ-1N 高性能无菌实验台(哈尔滨东联); YXQ-LS-50A 高压灭菌器(上海博迅实业有限公司); 2720 基因扩增仪(美国 AB 公司); 1-15K 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); MDF-382E 超低温保存箱(日本三洋); 756MC 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

4 动物分组及造模 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 随机抽取 14 只作为正常组, 剩余 56 只制备 CAG 模型。参考文献 [7-9] 采用复合造模法并改进复制 CAG 大鼠模型。(1) 以 2% 水杨酸钠 1 mL/100 g 饥饿时灌胃;(2) MNNG 溶液(180 μ g/mL) 避光自由饮用, 每天更换;(3) 饥饱失常法: 2 天足食, 1 天禁食。造模过程中死亡 2 只, 解剖后发现胃肠胀气明显。20 周后随机抽取正常组和模型组各 2 只, 以后每 4 周随机抽取 2 只, 直至 24 周模型成功。通过苏木素-伊红(HE)染色, 观察到胃黏膜固有腺体萎缩、数

量减少, 提示造模成功, 造模死亡率 3%。将造模成功的 50 只大鼠按随机数字表法分为: 模型组、化浊解毒方高、中、低剂量组以及摩罗丹组, 每组 10 只。正常组剩余 10 只。

5 给药方法 根据人与大鼠的体表面积折算等效剂量^[10, 11], 化浊解毒方低中高剂量比为 1:2:4, 摩罗丹组(1.4 g/kg)相当于 60 kg 成人每日剂量的 6 倍, 化浊解毒方高(36 g/kg)中(18 g/kg)、低(9 g/kg)剂量灌胃(分别对应 60 kg 成人的每日剂量 12、6、3 倍), 正常组和模型组给予等体积生理盐水灌服, 1 mL/100g, 每天 1 次, 连续干预 60 天。大鼠于末次灌胃后禁食不禁水 24 h, 麻醉, 快速打开腹腔后腹主动脉取血, 离心后分离出血清, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用; 分离大鼠胃组织, 在冰袋上切取一部分胃组织放于冻存管, 先存放于液氮罐, 快速转移到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用; 另一部分胃组织放于 4% 多聚甲醛中保存以备 HE 染色进行病理组织学评估。

6 检测指标及方法

6.1 血液指标检测 采用免疫比浊法测定血清 PG I、PG II 水平并计算 PGR (PG I / PG II); 使用放射免疫法检测大鼠血清 G-17, 实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。样本量为 10。

6.2 HE 染色观察胃黏膜病理变化 取固定后的胃组织, 石蜡包埋、切片(厚 4 μ m), 苏木素-伊红染色, 中性树脂封固。显微镜下观察大鼠胃黏膜组织病理结构变化。参照慢性萎缩性胃炎中西医结合共识意见^[1], 将炎症、萎缩等组织变化分为正常(0)、轻(+)、中(++)、重度(+++) 4 个级别。样本量为 10。

6.3 Western Blot 检测 PI3K、p-AKT 蛋白表达 取胃组织放入离心管, 加入蛋白裂解液, 4 $^{\circ}$ C 匀浆裂解, 离心取上清检测总蛋白浓度。使用 SDS-PAGE 凝胶将制备好的蛋白样品进行电泳分离, 转 NC 膜, 室温封闭 2 h, 加入稀释好的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后滴加稀释好的二抗(1:5 000), 室温孵育 90 min, 洗膜后然后显色, 实验均重复 3 次, 用 Quantity one 软件进行灰度值分析。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, 目标蛋白/ β -actin 的灰度值比值用作检测指标的半定量分析。

6.4 RT-qPCR 检测 PI3K、PTEN、AKT、Bad、Bcl-2 mRNA 表达 将各组大鼠胃黏膜组织在裂解液中研磨后, 提取纯化总 RNA, 使用紫外分光光度计进行 RNA 浓度和纯度测定。取总 RNA 2 μ g, 将 RNA 反转录为 cDNA, 随后进行荧光定量 PCR: 应用两步法反应程序, 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min, 然后

44 个循环反应: 95 °C 15 s, 60 °C 60 s。获得样本基因 Cq 值后, 以 β-actin 为内参照, 计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。样本量为 8。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列 (5' -3')	引物大小 (bp)
β-actin	上游: GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	下游: ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
PI3K	上游: CCCTGCCCATTTTCATCCTT	101
	下游: GCTGGAGGAGTTTCGGTTGA	
PTEN	上游: ACCAGGACCAGAGGAAACCT	101
	下游: CCTTGTCATTATCCGCACGC	
AKT	上游: TCTGAGACCGACACCAGGTA	107
	下游: CTCCGTTCACTGTCCACACA	
Bad	上游: ACTTATCAGCCGAAGCAGGC	100
	下游: CGGGATCGGACTTCTCAAG	
Bcl-2	上游: TCGCGACTTTGCAGAGATGT	116
	下游: CAATCCTCCCCAGTTCACC	

7 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件对数据结果进行处理和分析, 计量资料若满足正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 否则采用 $M (IQR)$ 描述, 多组间比较若满足正态性及方差齐性采用方差分析, 否则 $K-W H$ 秩和检验。计数资料采用频数 (构成比) 描述, 多组间比较定性资料采用行 × 表 χ^2 检验, 等级指标采用 $K-W H$ 秩和检验, 所有假设检验均采用双侧检验, 检验水准 α 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

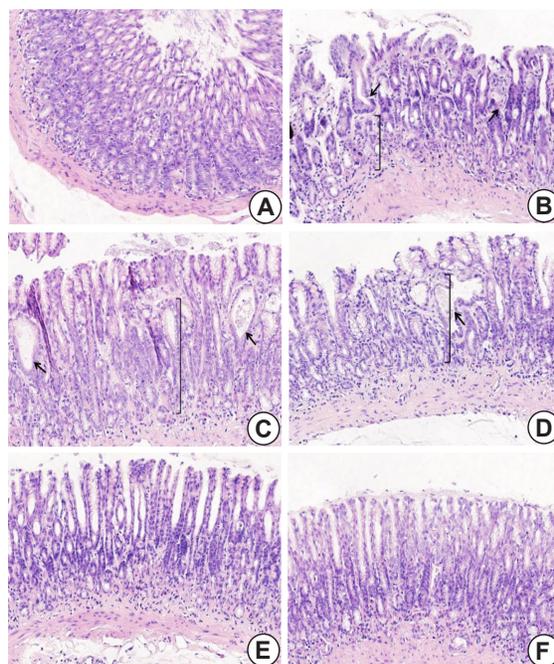
结 果

1 各组大鼠一般状态比较 正常组大鼠精神状态良好, 毛发洁白光泽, 活动灵敏, 饮食正常, 体重增长稳定; 模型组大鼠精神萎靡, 反应迟钝, 毛发暗黄无光泽, 蓬松易脱落, 饮食减少, 体重减轻; 摩罗丹组和化浊解毒方各剂量组均有改善, 精神状态以及活动灵敏度有所改善, 体重略有增加, 毛发蓬松, 稍有光泽。

2 化浊解毒方对 CAG 大鼠胃黏膜的影响 (表 2, 图 1) 光镜下, 正常组胃黏膜组织结构完整, 细胞排列规整, 固有层腺体数量多, 无明显炎性细胞浸润, 无水肿和充血, 未见细胞坏死; 与正常组比较, 模型组胃黏膜固有层腺体萎缩, 数量减少, 排列错乱, 黏膜层变薄, 炎性细胞浸润, 且多纤维组织填充, 有出血点, 部分细胞脱落、坏死, 排列紊乱 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 摩罗丹组和化浊解毒方各剂量组固有腺体胃黏膜萎缩程度和炎性细胞数量均有不同程度改善; 其中化浊解毒方高、中剂量组以及摩罗丹组对炎

表 2 各组胃黏膜炎症和萎缩情况

组别	n	炎性细胞浸润程度				固有腺体萎缩程度			
		0	+	++	+++	0	+	++	+++
正常	10	8	2	0	0	9	1	0	0
模型	10	0	1	4	5	0	2	6	2
摩罗丹	10	3	5	2	0	0	3	6	1
化浊解毒方高剂量	10	5	4	1	0	3	6	1	0
化浊解毒方中剂量	10	4	4	2	0	3	7	0	0
化浊解毒方低剂量	10	0	3	5	2	0	5	4	1



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为摩罗丹组; D 为化浊解毒方低剂量组; E 为化浊解毒方中剂量组; F 为化浊解毒方高剂量组; 括号表示黏膜层变薄; 箭头表示结构异常的腺体; 图 2 同

图 1 化浊解毒方对 CAG 大鼠胃黏膜组织病理的影响 (HE, ×200)

症改善明显 ($P < 0.05$), 化浊解毒方高、中剂量组对萎缩改善明显 ($P < 0.05$)。

3 各组 CAG 大鼠 G-17、PG I、PG II、PGR 水平比较 (表 3) 与正常组比较, 模型组血液 G-17、PG I、PGR 降低, PG II 升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 化浊解毒方各剂量组和摩罗丹组血液 G-17、PG I 明显升高 ($P < 0.05$), PG II 降低差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 化浊解毒方高、中剂量组和摩罗丹组血液 PGR 明显升高 ($P < 0.05$); 与摩罗丹组比较, 化浊解毒方高、中剂量组 G-17、PG I 升高 ($P < 0.05$)。

4 各组大鼠 PI3K、p-AKT 蛋白水平比较 (表 4, 图 2) 与正常组比较, 模型组胃黏膜 PI3K、p-AKT 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 化

表 3 各组大鼠血清 G-17、PG I、PG II 和 PGR 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	G-17 (pg/mL)	PG I (ng/mL)	PG II (ng/mL)	PGR
正常	10	26.75 ± 1.56	24.51 ± 3.78	19.46 ± 1.05	1.26 ± 0.19
模型	10	16.21 ± 1.82*	14.19 ± 3.19*	25.70 ± 4.63*	0.57 ± 0.16*
摩罗丹	10	21.61 ± 1.84 [△]	19.76 ± 2.47 [△]	22.02 ± 2.01	0.94 ± 0.11 [△]
化浊解毒方高剂量	10	24.70 ± 1.85 ^{△▲}	23.73 ± 3.03 ^{△▲}	21.26 ± 2.11	1.14 ± 0.24 [△]
化浊解毒方中剂量	10	24.11 ± 1.92 ^{△▲}	23.08 ± 1.69 ^{△▲}	21.36 ± 4.69	1.14 ± 0.31 [△]
化浊解毒方低剂量	10	18.56 ± 1.57 [△]	18.53 ± 4.52 [△]	25.09 ± 3.32	0.76 ± 0.26

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ；与摩罗丹组比较，[▲] $P < 0.05$

浊解毒方高、中剂量组以及摩罗丹组胃组织 PI3K、p-AKT 降低 ($P < 0.05$)。各药物干预组间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠胃组织 PI3K、p-AKT 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	p-AKT
正常	3	0.30 ± 0.07	0.20 ± 0.08
模型	3	0.76 ± 0.05*	0.62 ± 0.12*
摩罗丹	3	0.50 ± 0.07 [△]	0.37 ± 0.11 [△]
化浊解毒方高剂量	3	0.49 ± 0.09 [△]	0.36 ± 0.08 [△]
化浊解毒方中剂量	3	0.49 ± 0.08 [△]	0.40 ± 0.10 [△]
化浊解毒方低剂量	3	0.67 ± 0.12	0.50 ± 0.10

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$

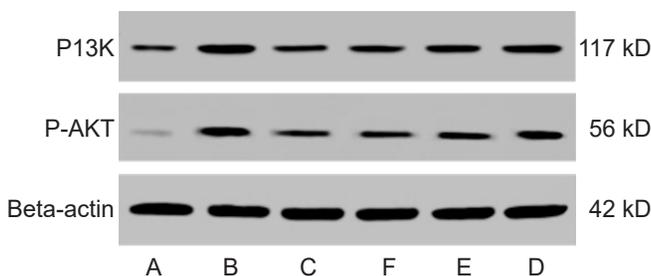


图 2 各组大鼠胃组织 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平

5 各组大鼠 PI3K、AKT、PTEN、Bad、Bcl-2 mRNA 表达比较 (表 5) 与正常组比较，模型组胃黏膜 PI3K、AKT、Bad、Bcl-2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)，PTEN mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，化浊解毒方高、中剂量组以及摩罗丹组胃组织 PI3K、AKT mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，PTEN

mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)；化浊解毒方高、中、低剂量组以及摩罗丹组胃组织 Bad、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)；与摩罗丹组比较，化浊解毒方高剂量组 PI3K mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，化浊解毒方高、中剂量组 Bad、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。

讨 论

CAG 是消化系统常见疾病，文献报道 1/50 的 CAG，1/39 的肠腺化生，以及 1/19 的胃黏膜异型增生可在 20 年内发展为胃癌^[12]。因此，通过药物阻断 CAG 进一步发展为胃癌极为关键，中医药在治疗 CAG 方面有广阔前景。

CAG 根据其临床症状将其归属中医学“胃脘痛”“痞满”“嘈杂”“暖气”等范畴。国医大师李佃贵教授结合当今社会快速发展，饮食明显改善，体内湿热之邪居多，湿热互结，久而化为浊毒，壅遏中焦，胃体失于濡养，导致腺体萎缩。据此李教授确立化浊解毒组方，该方已经申请备案为香连化浊颗粒。方中藿香芳香化浊，和胃降逆；黄连清热解毒，厚肠胃，清浊毒同为君。麸炒白术、豆蔻健脾化浊和胃；半枝莲、白花蛇舌草清热解毒为臣。当归、川芎、三七活血止痛；麸炒枳实、醋香附、木香行气和胃，消胀除痞；茯苓健脾渗湿，炒白芍养血缓中；百合养阴安神，砂仁化浊开胃，全蝎解毒散结，醋延胡索行气活血止痛，诸药合用共奏化浊解毒之功。现代药理学表明，广藿香具有保护胃黏膜屏障、促进消化液分泌、调节胃肠

表 5 各组大鼠胃组织 PI3K、AKT、PTEN、Bad、Bcl-2 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	AKT	PTEN	Bad	Bcl-2
正常	8	0.96 ± 0.12	0.67 ± 0.07	1.19 ± 0.19	0.92 ± 0.16	0.78 ± 0.18
模型	8	1.31 ± 0.08*	1.46 ± 0.07*	0.74 ± 0.15*	1.51 ± 0.10*	1.59 ± 0.14*
摩罗丹	8	1.15 ± 0.05 [△]	0.83 ± 0.06 [△]	1.00 ± 0.10 [△]	1.31 ± 0.08 [△]	1.34 ± 0.09 [△]
化浊解毒方高剂量	8	0.98 ± 0.09 ^{△▲}	0.82 ± 0.29 [△]	1.17 ± 0.18 [△]	0.99 ± 0.09 ^{△▲}	0.72 ± 0.07 ^{△▲}
化浊解毒方中剂量	8	1.08 ± 0.16 [△]	0.87 ± 0.19 [△]	1.16 ± 0.20 [△]	1.08 ± 0.14 ^{△▲}	0.92 ± 0.14 ^{△▲}
化浊解毒方低剂量	8	1.31 ± 0.11	1.16 ± 0.31	0.88 ± 0.14	1.36 ± 0.16 [△]	1.32 ± 0.13 [△]

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ；与摩罗丹组比较，[▲] $P < 0.05$

功能^[13]。黄连有效成分萜类、黄酮、生物碱等具有抑制幽门螺旋杆菌、抗肿瘤作用，黄连主要成分小檗碱可通过调节 Bax、Bcl-2 蛋白表达，最终达到抗肿瘤作用^[14]。以上化浊解毒方中主要有效成分的研究间接证实了其延缓 CAG 的可能作用机制，但有关其复方的研究较少，需要进一步展开。

胃蛋白酶原是胃黏膜消化腺分泌的一种消化酶前体，分为 PG I 和 PG II 两个亚群，血清胃蛋白酶原可以较为准确地体现胃黏膜的状态和功能。PG I 主要由颈黏液细胞、主细胞分泌，PG II 不仅由颈黏液细胞、主细胞分泌，而且还可以由幽门腺、十二指肠、Brunner 腺等产生。故当胃黏膜腺萎缩时，PG I 分泌减少，而分泌 PG II 的来源较广且相对稳定，故变化不大，但会使 PGR 降低。G-17 是主要由胃窦 G 细胞合成和分泌的重要激素，主要生理功能为刺激胃酸分泌，促进胃黏膜增殖和分化^[15, 16]，用于反应胃黏膜损伤情况的重要指标^[17]。CAG 胃黏膜腺体萎缩，G 细胞数量减少，血清 G-17 降低。PG I、PG II 和 G-17 表达水平同时被称为“血清学活检”，可用来筛查胃黏膜萎缩。当胃黏膜发生炎症、萎缩、癌变等病变时，血清 PG I、PG II、PGR 及 G-17 会出现不同变化^[18, 19]。已有研究表明，CAG 患者血清 G-17、PG I、PGR 水平会下降^[20, 21]。

PI3K/AKT 是人体内一条重要的信号转导通路，与胃上皮细胞的增殖和凋亡关系密切，且与癌症的发生密切相关^[22]。现代研究发现，PI3K/AKT 通路在癌变的细胞中被过度激活，并且在正常组织细胞中、CAG 组织细胞中、胃癌组织细胞中 PI3K/AKT 通路的活性是逐渐递增的，表明 PI3K/AKT 信号通路在正常胃组织发展为胃癌过程中激活。PTEN 抑癌基因同时作为 PI3K/Akt 信号通路的负调控因子，调控细胞周期，在细胞生长、凋亡、迁移等方面具有重要作用。PTEN 促使 PIP2 磷酸化转变为 PIP3，进而促使 AKT 磷酸化，AKT 磷酸化的产物为 p-AKT，导致下游促凋亡蛋白 Bad 活化^[23]。细胞抗凋亡因子 Bcl-2 是一种重要的细胞凋亡的抑制基因，可抑制凋亡促进细胞存活，Bcl-2 相关凋亡促进因子 (Bcl-2-associated death promoter, BAD) 是 Bcl-2 家族中重要的促凋亡因子之一，是 AKT 信号通路重要的下游组分，Bad 既可以抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xl 和 Bcl-2，也可以直接激活促凋亡蛋白 Bax 和 Bak^[24]，从而调节细胞增殖和凋亡等活动。AKT 活化使 Bad 的 Ser136 残基磷酸化，从而降低了其与 Bcl-2、Bcl-xl 的结合而发挥抑制凋亡的作用；另一方面在胞质或细胞内膜 Bad 与 14-3-3

蛋白结合成稳定复合物，在凋亡信号刺激作用下，使促凋亡成员构型改变，去磷酸化的游离 Bad 可置换 Bcl-xl/Bax、Bcl-2/Bax 二聚体上的 Bax 而形成新的异源二聚体发挥促凋亡作用^[25]。本研究中 Bad 基因的表达，可能是在 AKT 活化使 Bad 的 Ser136 残基磷酸化，降低了其与 Bcl-2 的结合，尚需进一步探讨。

综上所述，化浊解毒方对 CAG 大鼠一般状态 and 病理形态化具有改善作用。化浊解毒方能够修复受损的胃黏膜组织，其作用机制可能是通过调控 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平，从而实现增殖-凋亡的动态平衡，体现了化浊解毒方通过调节机体内环境，增加机体免疫力达到治疗疾病的作用。为临床应用化浊解毒方治疗 CAG 提供了客观依据。但该方为复方制剂，多靶点、多途径整体治疗是中药复方治疗的优势，但具体各药物的作用靶点尚不十分明确，是否涉及更多蛋白的影响或调控，有待进一步深入研究。

利益冲突：无。

参 考 文 献

- [1] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见 (2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26 (2): 121-131.
- [2] de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, et al. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands [J]. Gastroenterology, 2008, 134 (4): 945-952.
- [3] 韦维, 林寿宁, 汪波, 等. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 PI3K/Akt 信号传导通路的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45 (5): 1088-1091.
- [4] Wang LJ, Chen SJ, Chen Z, et al. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and the regulating mechanism of protein expression in rats [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7 (8): 634-640.
- [5] 张扬, 丁悦悦, 赵悦, 等. 慢性萎缩性胃炎的中医药治疗进展 [J]. 中医药学报, 2021, 49 (12): 112-116.
- [6] 默雪梅, 刘建平, 张晓玉. 化浊解毒汤对 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生疗效的临床研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29 (5): 320-324.
- [7] 于春月, 刘婷, 刘凯歌, 等. 慢性萎缩性胃炎病证结合

- 动物模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2140-2144.
- [8] 周晶, 黄柳向, 喻斌, 等. MNNG 诱导胃癌前病变模型的探讨[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(11): 888-890.
- [9] 庄昆海. 基于“炎—癌链”探讨健脾清热活血法对慢性萎缩性胃炎的干预机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等主编. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-928.
- [11] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30.
- [12] Song H, Ekheden IG, Zheng ZL, et al. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk Western population[J]. BMJ, 2015, 351(8020): 351.
- [13] 李媚, 陈盛君, 王协和, 等. 广藿香 UPLC 指纹图谱研究及基于网络药理学的广藿香潜在质量标志物预测[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2665-2677.
- [14] 马国琴, 刘东玲. 黄连药理研究进展[J]. 甘肃农业, 2019, (10): 97-99.
- [15] 于艳, 刘铁娥, 李红. 幽门螺杆菌感染对血清胃蛋白酶原及胃泌素-17 的影响分析[J]. 中华保健医学杂志, 2021, 23(3): 240-242.
- [16] 张斐, 黄锦成, 李杏欢. 联合检测胃蛋白酶原、G-17 及 CEA、CA19-9 在胃癌诊断中的应用价值分析[J]. 黑龙江医药, 2021, 34(3): 705-707.
- [17] 常璜蓉, 符改梅. 醒脾养儿颗粒联合奥美拉唑对功能性消化不良患儿腹胀积分、血清细胞因子及胃蛋白酶原的影响[J]. 贵州医药, 2021, 45(6): 895-897.
- [18] Parhusip DH, Siregar GA, Dairi LB. The difference of serum gastrin-17 level based on gastritis severity and helicobacter pylori infection[J]. Open Access Maced J Med Sci, 2019, 7(8): 1266-1269.
- [19] Park YH, Kim N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer[J]. J Cancer Prev, 2015, 20(1): 25-40.
- [20] 刘怀智, 周海娟, 陈刚, 等. 基于 NOX/ROS 信号通路探讨益气化痰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.
- [21] Tong Y, Wu Y, Song Z, et al. The potential value of serum pepsinogen for the diagnosis of atrophic gastritis among the health check-up populations in China: a diagnostic clinical research[J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 88.
- [22] 段永强, 巩子汉, 王丽园, 等. 香砂六君子汤对慢性萎缩性胃炎大鼠胃组织 PI3K 信号通路相关因子表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(3): 33-38.
- [23] Xie Y, Liu L. Analysis of correlation between HP infection and activation of PI3K/Akt pathway in mucosal tissues of gastric cancer and precancerous lesions[J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 5615-5620.
- [24] 李思汉, 黄铭涵, 黄健, 等. 健脾清化中药复方对慢性萎缩性胃炎大鼠 TLR4/NF- κ B/COX-2 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(7): 504-508.
- [25] Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development[J]. Semin Immunol, 2014, 26(1): 75-79.

(收稿: 2021-10-15 在线: 2022-03-02)

责任编辑: 白 霞