

健脾通络解毒方对胃癌前病变患者胃黏膜 COX-2、NF- κ Bp65 及 Bcl-2 表达的影响

白宇宁¹ 张 平² 李 理³ 王少丽¹ 姚乃礼¹ 张润顺¹ 刘 震¹ 燕 东¹
朱昱翎¹ 马继征¹ 彭 艳¹ 张 玲³ 曹 戩³ 朱 岩² 刘 伟⁴

摘要 **目的** 探讨健脾通络解毒方对胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC) 患者胃黏膜 COX-2、NF- κ Bp65、Bcl-2、Bax 蛋白表达, COX-2、Bcl-2 mRNA 水平及细胞凋亡指数(apoptotic index, AI) 的影响。**方法** 应用健脾通络解毒方随证加减治疗 65 例 PLGC 患者 6 个月, 采用免疫组织化学法检测患者治疗前后 COX-2、NF- κ Bp65、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平, 采用 RT-PCR 法检测其中 54 例患者 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 水平, 同时应用原位末端标记(TUNEL) 荧光标记法检测 65 例患者治疗前后 AI 的变化。**结果** 与治疗前比较, 治疗后患者胃黏膜 COX-2、NF- κ Bp65 及 Bcl-2 蛋白阳性表达水平降低(均 $P < 0.01$), Bax 蛋白阳性表达水平升高($P < 0.05$), COX-2 及 Bcl-2 mRNA 表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), AI 则增加($P < 0.05$)。**结论** 健脾通络解毒方可能通过 NF- κ Bp65/COX-2、COX-2/Bcl-2 及 NF- κ Bp65/Bcl-2 等信号转导通路促进细胞凋亡, 从而发挥对 PLGC 的影响作用。

关键词 胃癌前病变; 健脾通络解毒方; NF- κ Bp65/COX-2/Bcl-2; 细胞凋亡

Effect of Jianpi Tongluo Jiedu Recipe on Expression Levels of COX-2, NF- κ Bp65, and Bcl-2 in Gastric Mucosa of Patients with Precancerous Lesions of Gastric Cancer BAI Yu-ning¹, ZHANG Ping², LI Li³, WANG Shao-li¹, YAO Nai-li¹, ZHANG Run-shun¹, LIU Zhen¹, YAN Dong¹, ZHU Yu-ling¹, MA Ji-zheng¹, PENG Yan¹, ZHANG Ling³, CAO Jian³, ZHU Yan², and LIU Wei⁴ 1 Department of Gastroenterology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053), China; 2 Department of Pathology, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100102), China; 3 Department of Pathology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053), China; 4 Basic Medical College, Capital Medical University, Beijing (100069), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Jianpi Tongluo Jiedu Recipe (JTJR) on protein expression levels of COX-2, NF- κ Bp65, Bcl-2, and Bax, mRNA expression levels of COX-2 and Bcl-2, and the apoptotic index (AI) in gastric mucosa of patients with precancerous lesions of gastric cancer (PLGC). **Methods** Totally 65 PLGC patients were recruited and treated by JTJR (modified by syndrome typing), one dose per day for six successive months. Protein expression levels of COX-2, NF- κ Bp65, Bcl-2, and Bax were detected in 65 patients using immunohistochemical (IHC) assay before and after treatment. mRNA expression levels of COX-2 and Bcl-2 were detected in 54 patients using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Meanwhile, changes of AI was detected in 65 patients using TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) fluorescence method. **Results** After treatment with JTJR, positive protein expression levels of COX-2, NF- κ Bp65, and Bcl-2 were obviously decreased in the gastric mucosa of PLGC patients ($P < 0.01$), but Bax positive protein expression was found to be

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81072804)

作者单位: 1. 中国中医科学院广安门医院脾胃病科(北京 100053); 2. 中国中医科学院望京医院病理科(北京 100102); 3. 中国中医科学院广安门医院病理科(北京 100053); 4. 首都医科大学基础医学院(北京 100069)

通讯作者: 姚乃礼, Tel: 010-88001319, E-mail: nailiyao@gmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.02.0167

higher ($P < 0.05$). At the same time mRNA expression levels of COX-2 and Bcl-2 were significantly lower after treatment than before treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$); AI also increased after treatment ($P < 0.05$). Conclusion JTJR could promote apoptosis possibly via NF- κ Bp65/COX-2, COX-2/Bcl-2, and NF- κ Bp65/Bcl-2 signaling pathways, thereby affecting PLGC patients.

KEYWORDS precancerous lesions of gastric cancer; Jianpi Tongluo Jiedu Recipe; NF- κ Bp65/COX-2/Bcl-2; apoptosis

胃癌前病变 (precancerous lesions of gastric cancer, PLGC) 需经过一个漫长的、多阶段、多基因的变异积累过程而发展成胃癌 (gastric cancer, GC)^[1], 其主要包括胃黏膜上皮异型增生 (dysplasia, Dys) 和肠上皮化生 (intestinal metaplasia, IM)。在正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎、IM→Dys→GC (肠型) 的发展进程中, 有效干预阻断 PLGC 对防治 GC 的发生意义重大。环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在 GC 发生、发展进程中起着重要的作用^[2], 通过其上、下游的核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 及 Bcl-2 等蛋白表达来调控胃黏膜上皮细胞的凋亡与增殖, 从而促进 GC 的发生^[3]。中国中医科学院广安门医院脾胃病科基于“脾虚毒损络阻”基本病机认识 PLGC^[4], 并临床证实基础方药“健脾通络解毒方”对 PLGC 患者有一定治疗作用^[5]。为进一步探讨健脾通络解毒方对胃黏膜细胞凋亡的影响, 本研究采用免疫组织化学 (IHC)、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 及 TUNEL 荧光标记法检测 PLGC 患者经健脾通络解毒方治疗前后胃黏膜上皮 COX-2、NF- κ Bp65、Bcl-2、Bax 及细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI) 的变化。

资料与方法

1 诊断标准 PLGC 诊断及病理诊断标准参照 2006 年中华医学会消化病学分会审定的“中国慢性胃炎共识意见”及“慢性胃炎的病理诊断标准”^[6]。中医辨证分型标准参照 2009 年中华中医药学会脾胃病分会审定的“慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见”^[7], 中医辨证分型主要包括脾胃虚弱 (脾胃虚寒)、脾胃湿热、肝胃气滞、肝胃郁热、胃阴不足、胃络瘀血等证, 且大多数为复合证候。

2 纳入及排除标准 纳入标准: 年龄 20 ~ 75 岁; 具有明确临床症状, 并于纳入前 1 个月内经电子胃镜、病理组织学检查证实, 存在慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 伴中/重度 IM, 和 (或) 伴轻 (中) 度 Dys 者; 能自愿配合治疗, 并签署知

情同意书。排除标准: 妊娠或哺乳期妇女; 合并有心、脑、肺、肝、肾等严重疾病者; 怀疑或确有精神病史, 有酒精、药物滥用史者; 已知对本方药物成分过敏者; 正在参加其他临床药物观察者。

3 一般资料 70 例均为 2011 年 2 月—2013 年 11 月中国中医科学院广安门医院脾胃病科门诊就诊的 PLGC 患者。年龄 39 ~ 75 岁, 平均 (59.5 ± 7.8) 岁; 其中男 39 例 (55.7%), 女 31 例 (44.3%), 男女比例 1.26:1; 病程 3 ~ 116 个月, 中位病程 20 个月; 纳入患者中脾胃虚弱、胃络瘀血证型均为 69 例 (98.5%); 病理诊断 (胃窦小弯) 轻度 IM 8 例 (11.4%), 中度 IM 18 例 (25.7%), 重度 IM 43 例 (61.4%), 轻 (中) 度 Dys 26 例 (37.1%)。本研究方案经中国中医科学院广安门医院伦理委员会审查批准 (No. 2011-066)。

4 治疗方法 纳入患者均给予健脾通络解毒基础方: 太子参 20 g 炒白术 15 g 茯苓 15 g 法半夏 12 g 丹参 20 g 莪术 10 g 三七粉 3 g 浙贝母 15 g 藤梨根 20 g 甘草 6 g。同时随辨证加减: 气虚甚者, 加炙黄芪 15 ~ 30 g; 中焦虚寒者, 加干姜 6 ~ 10 g, 桂枝 6 ~ 10 g; 阴虚津亏者, 加北沙参 10 ~ 15 g, 麦冬 10 ~ 15 g, 石斛 10 ~ 15 g; 胃络瘀血严重者, 加赤芍 12 ~ 15 g, 蒲黄 10 g, 五灵脂 10 g; 伴有湿浊者, 加炒苍术 10 ~ 15 g, 厚朴 10 ~ 15 g, 白豆蔻 6 ~ 10 g; 湿热明显者, 加黄连 6 ~ 10 g, 黄芩 10 ~ 15 g, 蒲公英 15 ~ 30 g; 肝气郁结者, 加柴胡 6 ~ 10 g, 炒枳壳 10 ~ 15 g, 白芍 15 ~ 20 g。煎剂由广安门医院煎药室统一提供, 水煎服, 150 mL/次, 早、晚各 1 次, 每日 1 剂。疗程为 6 个月, 观察期间不使用其他相关治疗药物。

5 观察指标及检测方法

5.1 病理标本采集 治疗前后电子胃镜 (Olympus GIF-XQ260, 日本) 检查均由同一医师操作, 以保证诊断的一致性。病理组织活检参照新悉尼分类系统^[8]要求取 4 ~ 5 块标本, 部位为胃窦 2 块 (取自距幽门 2 ~ 3 cm 的大弯和小弯侧), 胃体 2 块 [取自距贲门 8 cm 的大弯 (约胃体大弯中部) 和距胃角近侧 4 cm 处的小弯 (以小弯为主要部位)], 胃角 (中间或

前、后壁)1 块。如有明显病变处再加取活检,治疗前后活检部位尽量保持一致。标本要足够大,并尽量深达黏膜肌层。将活检组织立即放入 10% 中性福尔马林溶液中固定,然后行石蜡切片备 TUNEL、免疫组化检测用。另于胃黏膜病变(肠化结节增生)明显处,病理活检取材约 50 mg(3~5 块),离体 15 min 内立即放入液氮中,后转入 -80℃ 低温冰箱保存直至 RT-PCR 检测。疗程结束后 4 周内复查胃镜,并再次病理活检取材。

5.2 胃黏膜 COX-2、NF-κBp65、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平检测 选用患者病变程度较重的病理组织切片进行免疫组化检测,治疗前后部位保持一致。采用免疫组化法,使用免疫组化机(LEICA BOND-MAX,德国)进行检测。石蜡切片脱水,用 3% 过氧化氢溶液浸泡 10 min 封闭后蒸馏水冲洗,并高压热修复;滴加一抗稀释液,兔抗人 COX-2 单克隆抗体(ZA-0515,批号:13204A08)、鼠抗人 NF-κBp65 单克隆抗体(SC-8008,批号:B0713)、鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体(ZM-0010,批号:13104A10)及鼠抗人 Bax 单克隆抗体(ZM-0300,批号:13901110),当日 37℃ 孵育 1 h,或 4℃ 过夜孵育,第 2 日室温放置 20 min 复温,PBS 清洗;滴加 PV-6000 二抗染液,具体步骤参照二步法免疫组化检测试剂盒(PV-6000)说明书进行操作;DAB 显色 3~5 min,置于自来水终止显色;最后复染、脱水、透明、封片。一抗、二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。显微镜(Olympus BS-51,日本)下观察,阳性细胞呈棕黄色或棕褐色颗粒者,主要位于腺体细胞胞浆,或少量位于腺体间淋巴组织。每张切片分别从四周及中央选择 5 个具有代表性的互不重叠的高倍视野(×400),每个视野取 100 个细胞,计数 500 个细胞中的阳性细胞数,<10% 为(-),10%~25% 为(+),25%~50% 为(++),50%~75% 为(+++)。

5.3 胃黏膜 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法检测。COX-2 和 Bcl-2 引物参照 Gene Bank 及前期实验基础设计,以 hRPL13a(NM 012423)为内参基因,引物及内参均由北京赛百盛基因技术有限公司进行 mRNA 合成。具体序列、合成产物长度及退火温度见表 1。检测步骤如下:(1)取约 50 mg 胃黏膜组织,使用 Trizol 法(一步法总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent,美国 Invitrogen 公司,批号:28218)提取总 RNA,-80℃ 低温保存;(2)上述提取的 RNA 样品取 2 μL,进行 RNA 浓度测定,如 OD₂₆₀/OD₂₈₀(R) 比值为 1.8~2.0,可进行下一步实验;(3)按照 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒(北京

天根生化科技有限公司,批号:L1009)说明书步骤,逆转录合成 cDNA,冷冻保存;(4)PCR 扩增参照 2 × Taq Plus PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司,批号:L0918)试剂盒说明书步骤,使用 TC-412 PCR 扩增仪(英国 Techne 公司)进行扩增,cDNA 2 μL 加上游引物 1 μL 加下游引物 1 μL 加 2 × Taq Plus PCR Master Mix 12.5 μL 加 ddH₂O 补至 25 μL。扩增条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s→58℃ 30 s→72℃ 30 s(35 个循环),72℃ 7 min;(5)扩增产物电泳分析,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,每孔加样 10 μL,指标治疗前后与内参治疗前后为一组,平行检测 3 组,140 V 电泳约 30 min 后,采用 JeDa JD801 系列专业数码凝胶成像与分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司),对电泳条带进行光密度值检测,灰度值 = OD_{指标}/OD_{内参},取其 3 组平均灰度值,进行统计分析结果。

表 1 目的基因及引物序列

基因	引物	合成产物长度(bp)	退火温度(℃)
COX-2	上游:5'-ATATGTTCTCCTGCCTACTGGAA-3'	107	60.3
	下游:5'-GCCCTTCACGTTATTGCAGATG-3'		61.8
Bcl-2	上游:5'-GAACTGGGGGAGGATTGTGG-3'	123	59.0
	下游:5'-CCGGTTCAGGTACTCAGTCA-3'		59.0
hRPL13a	上游:5'-CGAGGTTGGCTGGAAGTACC-3'	121	62.2
	下游:5'-CTTCTCGGCCTGTTTCCTAG-3'		62.4

5.4 胃黏膜上皮细胞 AI 检测 采用原位末端标记(TUNEL)荧光法。(1)酶消化:石蜡切片脱蜡,逐级入水,滴加蛋白酶 K 工作液(20 mg/L,不含核酸酶,pH 7.4~8.0)37℃ 消化 15 min,PBS(pH 7.4)洗 5 min × 3 次;(2)反应:按说明书滴加 TUNEL 检测液(德国 Roche 公司 TUNEL 试剂盒,In Situ Cell Death Detection Kit,POD,50 tests),TdT 酶与荧光标记液浓度比 1:9,37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 5 min × 3 次;(3)封片:稍微晾干,滴加含 DAPI 的荧光封片剂(mounting medium with DAPI)封片;(4)阳性、阴性对照:先分别用 DNase I 液诱导标记前 DNA 链断裂,PBS 洗 3 min × 3 次,阳性对照照片加 TUNEL 检测液,阴性对照照片直接滴加未混合 TdT 酶的荧光标记液,PBS 洗 3 min × 3 次,后加含 DAPI 液封片;(5)照相:将 TUNEL 染色后组织切片移动至荧光显微镜(LEICA DM2000,德国)低倍镜下,先选择蓝色荧光激发光观察组织标本,随后切换至高倍镜视野,转换为红色荧光激发光,曝光度 1 s,镜下随机选取 5 个视野(×400 倍)拍摄,后再转换至蓝色荧光激发光,曝光

减少到 350 ms 再拍照; (6) TUNEL 染色阳性及 AI 判定: 每张片子随机选择 5 个高倍视野(×400 倍) 进行拍照后, 将同一部位拍摄的两张不同激发光源照片进行共定位处理(photoshop7. 0. 1, IP Win5 图像软件), 凋亡细胞核出现红色荧光信号且与蓝色核荧光信号相重合者为阳性, 每个高倍视野照片中计 100 个腺体细胞中的阳性细胞数, 共计 5 个视野中的阳性细胞数, 取其平均值为 AI。

6 统计学方法 采用 SPSS 17. 0 统计学软件进行数据分析。计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布资料描述最大值、最小值及中位数 [M (Min, Max)] 表示; 满足正态性检验的计量资料组间比较采用 *t* 检验, 非正态资料采用 Wilcoxon 秩和检验。假设检验采用双侧检验。 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 临床纳入病例及治疗完成情况 研究期间共纳入 70 例 PLGC 患者, 由健脾通络解毒方随证辨治 6 个月, 其中 5 例患者脱落(2 例失访, 3 例拒绝按时复查胃镜及病理活检), 共计完成治疗 65 例, 脱落率为 7. 1%。 65 例患者治疗前后的胃黏膜病理组织标本均进行免疫组化及 TUNEL 荧光标记法检测。因患者胃镜检查耐受程度及入组时的实际情况不同, 故使用 RT-PCR 技术检测其中 54 例患者治疗前后低温冰冻的组织标本。

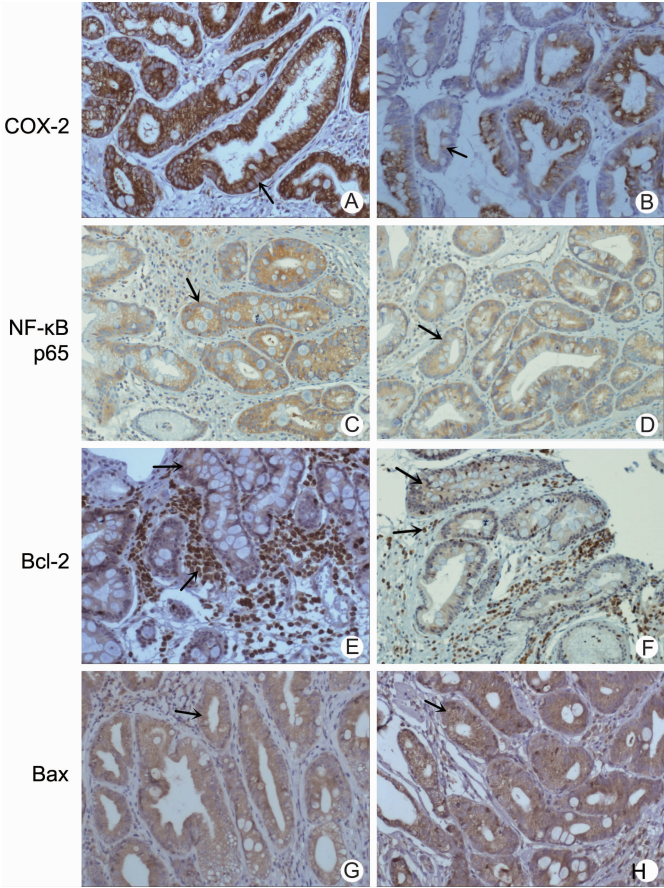
2 65 例 PLGC 患者治疗前后胃黏膜 COX-2、NF-κBp65、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达比较(表 2, 图 1) COX-2 与 NF-κBp65 染色主要分布于胃黏膜腺体细胞胞浆中, Bcl-2 与 Bax 染色主要分布于胃黏膜腺体细胞胞浆及周围淋巴组织中, 免疫组化染色阳性表达均呈棕黄色颗粒。经健脾通络解毒方治疗后, 65 例 PLGC 患者胃黏膜 COX-2、NF-κBp65 及 Bcl-2 蛋白阳性表达水平下降(均 $P < 0. 01$), Bax 蛋白阳性表达增强($P = 0. 016$)。

表 2 65 例 PLGC 患者治疗前后胃黏膜 COX-2、NF-κBp65、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达比较 [半定量积分, M(Min, Max)]

时间	COX-2	NF-κBp65	Bcl-2	Bax
治疗前	3 (0, 3)	2 (0, 3)	2 (0, 3)	2 (0, 3)
治疗后	2 (0, 3) **	1 (0, 3) **	1 (0, 3) **	2 (0, 3) *

注: 与治疗前比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$

3 54 例 PLGC 患者治疗前后胃黏膜 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 表达水平比较(表 3, 图 2) 纳入患者中



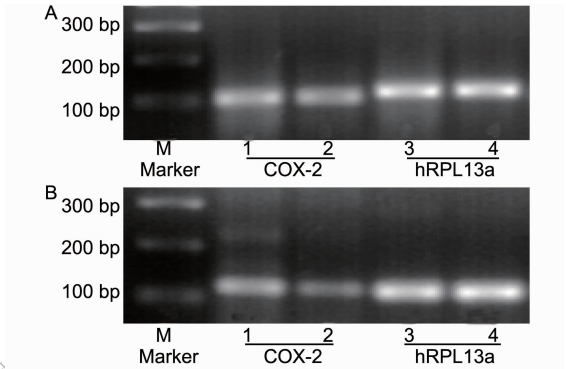
注: A、C、E、G 为健脾通络解毒方治疗前; B、D、F、H 为健脾通络解毒方治疗后; 箭头所示为阳性表达区域

图 1 65 例 PLGC 患者治疗前后胃黏膜 COX-2、NF-κBp65、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 (免疫组化, ×200)

表 3 54 例 PLGC 患者治疗前后 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 表达水平比较

时间	COX-2 ($\bar{x} \pm s$)	Bcl-2 [M(Min, Max)]
治疗前	0.318 ± 0.254	0.225 (0.003, 0.756)
治疗后	0.216 ± 0.188 *	0.140 (0.013, 0.727) **

注: 与治疗前比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$

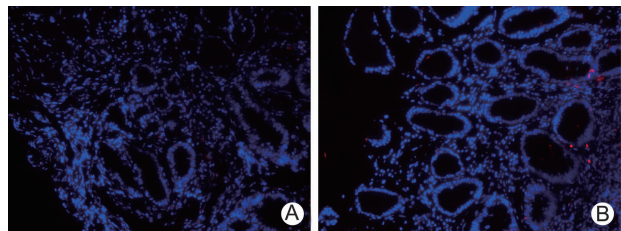


注: M 为 Marker; A-1 为治疗前 COX-2; A-2 为治疗后 COX-2; B-1 为治疗前 Bcl-2; B-2 为治疗后 Bcl-2; A-3/ B-3 为治疗前 hRPL13a, A-4/ B-4 为治疗后 hRPL13a

图 2 54 例 PLGC 患者治疗前后 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 电泳图

有 54 例在治疗前后进行了 RT-PCR 检测,与治疗前比较,患者治疗后 COX-2 及 Bcl-2 mRNA 表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 65 例 PLGC 患者治疗前后胃黏膜细胞 AI 比较(图 3) 将两张不同激发光源照片进行共定位,背景蓝色核荧光信号与凋亡细胞核的红色荧光信号相重叠者为阳性细胞。经健脾通络解毒方治疗后,65 例 PLGC 患者胃黏膜上皮凋亡细胞阳性表达增多,治疗前 AI 为 3.32 (0, 65.61),治疗后 AI 为 4.41 (0, 75.56),治疗前后比较,差异有统计学意义($P = 0.046$)。



注:A 为治疗前;B 为治疗后

图 3 胃黏膜上皮细胞凋亡荧光染色图
(TUNEL 法, $\times 200$)

讨 论

浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎、胃癌前病变→胃癌,是一个由气及血入络的渐变复杂过程,既有脾胃虚弱之本虚,又有邪毒内蕴及气滞血瘀之标实,三者各有侧重并相互影响,终致气血同病,故笔者认为“脾虚毒损络阻”是 PLGC 的基本病机,应以虚实兼顾、通补并用,健脾、通络与解毒权衡治之^[4]。健脾通络解毒方由太子参、炒白术、茯苓、法半夏、丹参、莪术、三七粉、浙贝母、藤梨根、甘草等组成,具有健脾益气、活血通络、消积解毒之功。现代药理学证实,太子参含有糖类、苷类、环肽类、氨基酸等成分,具有抗疲劳、增强免疫、抗菌、抗氧化、抗病毒等作用,可降低胃癌、结直肠癌、肝癌等恶性肿瘤的病死率,对病毒诱发的肿瘤有抑制作用^[9,10];丹参有效成分丹参酮 II A 能明显抑制人结直肠癌细胞增殖,并通过调控 COX-2 表达而抑制结直肠癌细胞血管内皮生长因子表达^[11];莪术有效成分莪术油可通过抑制 PCNA 的阳性表达,下调 Cyclin D1 表达抑制细胞增殖,进而发挥抑瘤作用^[12];浙贝母对小鼠 Lewis 肺癌有抑瘤及抑制癌转移作用,并能显著增加小鼠肿瘤 LM2 细胞凋亡率^[13];藤梨根乙醇提取物对胃癌细胞 MKN-45 有抗增殖及诱导凋亡作用,其作用机制可能是使胃癌细胞 DNA 合成受阻,细胞

周期阻滞于 G0/G1 期,进而诱导胃癌细胞凋亡^[14]。本课题组前期临床观察表明,健脾通络解毒方可改善 PLGC 患者主要临床症状,并对胃镜下黏膜征象,病理组织学 Dys、慢性炎症及 IM 等具有一定影响,临床总有效率为 77.5%^[5]。

细胞凋亡在 PLGC 进程中的作用日益受到重视。研究发现,CAG 胃黏膜细胞凋亡增加,并认为此种变化与黏膜萎缩、肠化乃至癌变有密切关系^[15]。细胞凋亡异常在胃黏膜癌前病变发生中起决定性作用,被认为是 GC 演化进程中的早期事件^[16]。本研究应用 TUNEL 法荧光标记,原位观察荧光染色的凋亡细胞,并进行定量的胃黏膜细胞 AI 分析。结果提示,健脾通络解毒方治疗后患者胃黏膜上皮 AI 较治疗前增加($P = 0.046$)。结合前期临床病理组织学疗效^[5]进行分析,提示该方有可能通过促进胃黏膜上皮细胞凋亡,从而改善 PLGC 胃黏膜 Dys、IM 及慢性炎症等病理变化,其分子、蛋白信号转导调控机制需进一步研究探讨。

NF- κ B 是介导细胞内信号传递最重要的核转录因子。通常以 p50/p65 异二聚体非活性形式存在于细胞浆中,并与特异性抑制物 I κ B 相结合,在病毒、细菌、炎症等刺激因子及 I κ B 激酶作用下使两者解离,激活的 NF- κ B 由胞质进入胞核内,与调控免疫应答、炎症反应、细胞凋亡增殖所必需的细胞因子靶基因启动子序列上存在的 NF- κ B 结合位点结合,迅速诱导靶基因 mRNA 的转录合成^[17,18]。

Bcl-2 是最重要的抑制细胞凋亡基因,通常以同源二聚体或异源二聚体形式促进细胞存活,抑制细胞凋亡。线粒体在细胞凋亡中处于中心地位,重要的线粒体内膜蛋白的释放,大都由 Bcl-2 家族蛋白所调控,从而提示 Bcl-2 是在线粒体水平上(线粒体凋亡途径)调控凋亡因子释放的最主要的调节因子。Bax 为 Bcl-2 相关蛋白,细胞凋亡时各种因素调控 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2/Bax 比例下降,Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少,Bax 同源二聚体增多,故 Bax 具有抑制 Bcl-2 而促进细胞凋亡的作用^[19]。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素(prostaglandins, PGs)合成过程中一个重要的限速酶,它催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化成各种前列腺素产物而参与机体的炎症反应、发热、组织损伤修复等多种生理病理过程。COX-2 的异常表达与 GC 发生、发展紧密相关,从 PLGC 恶变为 GC 过程中,COX-2 表达逐渐增加,提示 COX-2 参与了 GC 的发病过程^[20,21]。目前认为 COX-2 对 GC 的影响机制主要包括:抑制肿瘤细胞凋亡,促进细胞增殖及免疫

逃避,诱导肿瘤血管形成,影响黏附分子增加肿瘤侵袭力,改变端粒酶活性,参与过氧化物代谢等^[3]。

COX-2、NF- κ B、Bcl-2 表达与细胞凋亡涉及众多信号转导通路的调控,它们之间形成一个密切而复杂的网络(cross-talk),其中 COX-2 相关通路则是重要的通路之一。COX-2 基因上游有 NF- κ B 的结合位点,NF- κ B 与其结合后上调 COX-2 的表达,在 CAG→Dys→GC 的进程中,二者表达平行增加^[22]。COX-2 表达增加 PGE₂ 的合成,后者可诱导细胞增殖并刺激凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白表达,从而抑制细胞凋亡,并同时降低凋亡蛋白 Bax 的表达,可见 COX-2 抗细胞凋亡作用可能是通过上调 Bcl-2 而实现^[23,24]。Bcl-2 启动子上也存在 NF- κ B 的特异性结合位点,NF- κ B 可通过转录途径直接上调 Bcl-2 表达^[25],抑制 NF- κ B 活性可抑制 Bcl-2 的表达,进而诱导细胞凋亡^[26]。

本课题组前期已通过较小样本量(36 例)的临床研究表明,健脾通络解毒方对 PLGC 患者胃黏膜 NF- κ B、Bcl-2 蛋白表达及细胞凋亡有一定影响^[27,28]。本研究中,PLGC 患者经健脾通络解毒方治疗后,胃黏膜 COX-2、NF- κ Bp65 及 Bcl-2 蛋白表达明显降低,Bax 蛋白表达增高,与 Bcl-2 蛋白表达趋势相反,Bcl-2/Bax 比例呈下降趋势;COX-2 与 Bcl-2 mRNA 表达水平亦下降,其 mRNA 水平变化与蛋白表达变化趋势相一致;治疗后 AI 也相应增加,这与上述各蛋白表达调控细胞凋亡趋势相一致。故笔者认为,健脾通络解毒方可能通过 NF- κ B/COX-2、COX-2/Bcl-2、NF- κ B/Bcl-2 等信号转导通路来调控胃黏膜上皮细胞凋亡,从而实现对 PLGC 的干预影响。上述转导通路调控机制还有待从不同层面及角度进一步系统研究。

本研究采取辨证施治的方法,体现中医治病特色,依照不同的证候类型及邪正偏盛而采取不同的治疗药物,但总体基础方药与治则不变,即又体现了在各个疾病中基础病机的重要性。因医学伦理与临床实际情况所限,并考虑本项目不是临床新药疗效观察,故采用开放的、自身前后对照试验设计。今后在继续扩大临床病例数的基础上,考虑增加慢性非萎缩性胃炎及 GC 等不同程度与阶段的疾病对照组,可动态观察中医药干预 PLGC 发生、发展进程中的某些重要机制,同时还可开展各个分子、蛋白指标与证型之间的相关性研究。

参 考 文 献

- [1] Correa P, Shiao YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(7 Suppl): 1941–1943.
- [2] Cheng J, Fan XM. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(42): 7361–7368.
- [3] 王俊先,张开光.COX-2 与胃癌关系的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(4): 378–383.
- [4] 白宇宁,张润顺,姚乃礼,等.从“脾虚络阻毒损”辨治慢性萎缩性胃炎及癌前病变[J]. *中医杂志*, 2013, 54(1): 26–28.
- [5] 白宇宁,王少丽,姚乃礼,等.健脾通络解毒方加减辨治慢性萎缩性胃炎癌前病变 40 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2014, 55(4): 301–304.
- [6] 中华医学会消化病学分会.中国慢性胃炎共识意见(下)(2006,上海)[J]. *中华消化杂志*, 2007, 27(2): 118–120.
- [7] 中华中医药学会脾胃病分会.慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见(2009,深圳)[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2010, 18(5): 345–349.
- [8] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis, The updated Sydney system [J]. *Am J Surg Pathol*, 1996, 20(10): 1161–1181.
- [9] 晏春耕.药用植物太子参的研究及其应用[J]. *现代中药研究与实践*, 2008, 22(2): 61–65.
- [10] 蔡巧燕,林珊,肖桂清,等.太子参内生真菌体外抗肿瘤、抗氧化活性研究[J]. *福建中医药大学学报*, 2011, 21(6): 41–43.
- [11] 周利红,王炎,范忠泽,等.丹参酮 II A 调节 COX-2 对人结肠癌 HCT-116 细胞 VEGF 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(15): 1561–1567.
- [12] 湛学军,徐燕萍,谢大泽,等.发光法分析莪术油等中药对肝、胃癌细胞增殖活性抑制作用的实验研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(1): 30–33.
- [13] 杨庆,聂淑琴,翁小刚,等.乌头、贝母单用及配伍应用体内、外抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(4): 25–28.
- [14] 附舰,陈光伟,刘理礼,等.藤梨根提取物对人胃癌 MKN-45 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(1): 20–22.
- [15] 许岸高,李韶光,刘集鸿,等.胃癌前病变演化与细胞凋亡和增殖的关系[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(3): 185–186.
- [16] Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, et al. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling [J]. *Virchows Arch*, 1996, 428(4–5): 229–235.
- [17] Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers [J]. *Cancer Immunol Res*,

- 2014, 2(9): 823-830.
- [18] Sethi G, Sung B, Aggarwa BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 23(1): 21-31.
- [19] 陈晔光, 张传茂, 陈佳主编. 分子细胞生物学 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2006: 446-447.
- [20] Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, et al. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2006, 18(4): 363-374.
- [21] 伊正辉. 胃癌组织中 COX-2 表达的 Meta 分析 [J]. *中国肿瘤*, 2007, 16(5): 365-367.
- [22] 唐爱萍, 曲春雁, 曲延刚. 核因子- κ B 和环氧合酶-2 在胃癌及癌前病变中的表达 [J]. *山西医药杂志*, 2007, 36(7): 648-649.
- [23] Singh B, Irving LR, Tai K, et al. Overexpression of COX-2 in celecoxib-resistant breast cancer cell lines [J]. *J Surg Res*, 2010, 163(2): 235-243.
- [24] Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E_2 in human colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(2): 362-366.
- [25] Xie CY, Yang W, Ying J, et al. B-cell lymphoma-2 over-expression protects δ -elemene-induced apoptosis in human lung carcinoma mucoepidermoid cells via a nuclear factor kappa B-related pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(8): 1279-1286.
- [26] Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, et al. Targeting Bcl-2 overexpression in various human malignancies through NF- κ B inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib [J]. *Cancer Chemother Pharm*, 2005, 56(1): 46-54.
- [27] 朱昱翎, 白宇宁, 李理, 等. 健脾通络解毒法对胃癌前病变患者 NF- κ B 细胞凋亡通路影响的研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(5): 845-848.
- [28] 朱昱翎, 彭艳, 白宇宁, 等. 基于 NF- κ B/Bcl-2 细胞凋亡通路探讨健脾通络解毒方对胃癌前病变的作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(4): 1208-1211.
- (收稿: 2014-09-14 修回: 2014-10-23)

中国中医药研究促进会消化整合医学分会成立大会暨消化整合医学学术研讨会在北京召开

中国中医药研究促进会消化整合医学分会于 2015 年 1 月 23 日在北京中国科技馆举行成立大会。国医大师路志正教授、樊代明院士作为名誉会长, 柯美云、刘新光、危北海、李乾构、田德禄、杨云生等专家作为学会顾问出席了本次大会。中国中医科学院望京医院魏玮教授当选会长, 陈詒、唐旭东、张声生、刘凤斌、张学智、舒劲、丁霞 7 位中医专家和侯晓华、周丽雅、白文元、李岩、蓝宇、唐艳萍 6 位西医专家当选为副会长。另有常务理事及执行理事共 45 人。参会人员近 200 名。

学术会议期间, 有关专家学者围绕“消化整合医学”专题进行了精彩的学术报告。樊代明院士主要从个体与群体、体外与体内、外环境与内环境、结构与功能、局部与整体、微观与宏观、静态与动态、瞬间与长期、直接与间接、生理与心理、客观与主观、数据与事实、证据与经验、因果与相关、科学与伦理、理论与实践共 17 个方面介绍了医学与科学的关系。田德禄教授谈及中西医整合医学发展时指出: 目前中医临床、科研及新药开发等工作均要求中西医双重标准; 世界在对西药等化学制剂疗效和毒副作用提出异议的同时, 也对中医药等传统治疗寄予厚望, 中医走向世界, 让世界医学界接受中医, 需要中西医整合。每一位医务工作者均应以包容的态度和务实的工作为中西医整合的发展做出贡献。侯晓华教授进一步强调合理使用中成药的规范性和重要性, 并以中西医结合制定中成药治疗功能性胃肠病 (FGIDs) 的指南为例, 针对 FGIDs 特点, 提出疾病(病)-证候(证)-症状(症)结合, 建议推广中医的辨证施治以指导中成药在临床更精准有效地应用, 更好地促进中西医沟通。刘凤斌教授强调: 随着传统的临床结局评价模式改革的发展, 量表的研制及应用已得到广泛的国际认可。量表研制的理论、方法及技术在不断发展。张学智教授从 *H.pylori* 感染是全球共同的健康问题、*H.pylori* 感染的西医共识与治疗瓶颈-耐药性问题、*H.pylori* 感染的中西医学整合方案和制定 *H.pylori* 感染的诊疗共识意见 4 个方面解读了当前幽门螺杆菌诊治的中西整合策略。

本学会的发展方向为: (1) 引领行业发展; (2) 继续教育与人才培养; (3) 社会回馈公益与科普宣教活动; (4) 配合政府工作, 满足社会需求。中西消化医学在各自理论研究及临床实践上先行先试, 必将为推动医学发展和保障人类的健康做出自己应有的贡献!

(苏晓兰供稿)