

益气化瘀解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生大鼠p53的影响

魏 玥, 杨晋翔, 王再见, 黎 俊, 江海燕, 李会霞

■背景资料

异型增生是一种最易进展为胃癌的胃癌前病变, 如何有效干预异型增生, 逆转胃癌前病变, 阻断其向胃癌的发展, 是目前防治胃癌的研究关键。

魏玥, 杨晋翔, 王再见, 黎俊, 江海燕, 李会霞, 北京中医药大学第三临床医学院北京市 100029

国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20090013110002

作者贡献分布: 此课题由杨晋翔与王再见设计; 动物模型由魏玥制作完成; Real-time PCR和Western blot检测由黎俊与江海燕操作完成; 论文写作由李会霞与魏玥完成。

通讯作者: 杨晋翔, 主任医师, 100029, 北京市朝阳区安外小关51号, 北京中医药大学第三临床医学院. yjx571102@163.com
收稿日期: 2011-08-18 修回日期: 2011-10-15

接受日期: 2011-10-25 在线出版日期: 2011-12-08

Effect of Yiqi Huayu Jiedu principle on p53 expression in chronic atrophic gastritis with dysplasia in rats

Yue Wei, Jin-Xiang Yang, Zai-Jian Wang, Jun Li, Hai-Yan Jiang, Hui-Xia Li

Yue Wei, Jin-Xiang Yang, Zai-Jian Wang, Jun Li, Hai-Yan Jiang, Hui-Xia Li, the Third College of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029

Supported by: the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20090013110002

Correspondence to: Jin-Xiang Yang, Chief Physician, the Third College of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. yjx571102@163.com

Received: 2011-08-18 Revised: 2011-10-15

Accepted: 2011-10-25 Published online: 2011-12-08

Abstract

AIM: To observe the effect of Yiqi Huayu Jiedu principle on p53 expression in chronic atrophic gastritis with dysplasia in rats.

METHODS: Sixty Wistar rats were randomly divided into model group ($n = 50$) and blank group ($n = 10$). Chronic atrophic gastritis with dysplasia was induced in rats of the model group. At week 28 after model induction, 30 rats in the control group were equally and randomly divided into model group, Weimeisu group and Xiaopi Granules group. Rats of each group were given the corresponding drug once daily. After treatment for 12 wk, the expression of p53 was detected by

real-time PCR and Western blot.

RESULTS: The expression of wild-type p53 mRNA in the Xiaopi Granules group was significantly higher than that in the control group and Weimeisu group (0.710 ± 0.202 vs 0.443 ± 0.081 , 0.456 ± 0.148 , both $P < 0.01$). The protein expression of mutant p53 was significantly lower in the Xiaopi Granules group than in the control group and Weimeisu group (0.118 ± 0.040 vs 0.886 ± 0.127 , 0.350 ± 0.065 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Yiqi Huayu Jiedu principle can reverse gastric mucosal dysplasia possibly by inhibiting the mutation of p53 gene in rats with atrophic gastritis and dysplasia.

Key Words: Chronic atrophic gastritis with dysplasia; Yiqi Huayu Jiedu principle; P53

Wei Y, Yang JX, Wang ZJ, Li J, Jiang HY, Li HX. Effect of Yiqi Huayu Jiedu principle on p53 expression in chronic atrophic gastritis with dysplasia in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(34): 3494-3497

摘要

目的: 观察益气化瘀解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生模型大鼠p53基因的影响。

方法: Wistar大鼠60只随机分为造模组50只, 空白组10只。采用以MNNG为主的三因素联合造模。28 wk造模成功后, 将造模组剩余的30只大鼠随机分为模型组、维酶素组、消痞颗粒组(10只/组)。各组给予相应的药物。每天灌胃1次, 连续治疗12 wk后, Real-time PCR及Western blot法对各组大鼠p53基因进行检测。

结果: 消痞颗粒组野生型p53 mRNA表达量较模型组和维酶素组均显著增高(0.710 ± 0.202 vs 0.443 ± 0.081 , 0.456 ± 0.148 , 均 $P < 0.01$); 突变型P53蛋白表达量较模型组和维酶素组均显著降低(0.118 ± 0.040 vs 0.886 ± 0.127 , 0.350 ± 0.065 , 均 $P < 0.01$)。

■同行评议者

陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

结论: 中医益气化瘀解毒法可以逆转胃黏膜异型增生, 这种作用可能是通过抑制p53基因的突变而实现的。

关键词: 慢性萎缩性胃炎伴异型增生; 益气化瘀解毒法; p53

魏玥, 杨晋翔, 王再见, 黎俊, 江海燕, 李会霞. 益气化瘀解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生大鼠p53的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(34): 3494-3497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3494.asp>

0 引言

胃癌在全球癌症病死率中排列第2位。胃癌的发生是一个多步骤、进行性发展的过程。慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)→肠上皮化生→异型增生(dysplasia, Dys)→胃癌的Correa模式已被广泛接受^[1,2]。而肠上皮化生和Dys又被称为胃癌前病变(pre-cancerous lesions of gastric cancer, PLGC), 尤其是Dys, 轻度Dys约15%-30%会进展为重度Dys和/或腺癌, 而重度Dys的患者有60%-80%可能发展为胃癌^[3-5]。因此, 如何有效干预Dys, 逆转PLGC, 阻断其向胃癌的发展, 是目前防治胃癌的研究关键。本研究通过建立GAG伴Dys大鼠模型, 观察益气化瘀解毒法对Dys的干预作用, 为临床防治PLGC, 降低胃癌的发病率提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康♂ Wistar大鼠60只, 6 wk, 体重100-120 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。消痞颗粒, 组方为党参、炙百合、乌药、香橡皮、丹参、三七粉、莪术、蒲公英、白花蛇舌草, 由北京中医药大学第三附属医院制剂室制成含生药9 g/g的冲剂, 使用当日配制成0.36 g/mL的药液; 维酶素, 由河北环海药业有限公司生产, 使用当日碾成粉末状, 配制成0.15 g/mL悬浊液, 滤去糖衣沉渣备用; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG), 由日本TCI东京化成工业发展有限公司提供, 每周用去离子水配制成1 g/L的母液, 存放于4℃冰箱备用, 使用当日用SPF级动物饮用水稀释为120 mg/L的溶液, 整个过程均需避光操作保存; 雷尼替丁饲料, 盐酸雷尼替丁胶囊由赛诺菲安万特(杭州)制药有限公司生产, 由北京科澳协力饲料有限公司制成含0.03%雷尼替丁的颗粒状SPF级大鼠饲料; 氨水购自北京化学试剂公司, 每日用

SPF级动物饮用水配制成0.1%的溶液。TRIzol试剂盒(美国Invitrogen); M-MLV反转录试剂盒、Taq DNA聚合酶、dNTP、DNA Marker (日本Takara); SYBR Green Real time PCR Master mix试剂盒(瑞士Roche); 100 bp DNA Ladder(北京全式金生物技术有限公司); PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。蛋白质分子量Marker(Fermentas); 一抗p53为兔单克隆抗体(美国CST公司); 二抗为辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组: SPF级♂ Wistar大鼠60只, 随机分为2组。10只为空白组, 给以普通饮食喂养, 持续至实验结束。其余50只参照相关文献^[6,7]并加以改进, 创建实验性大鼠CAG伴胃黏膜Dys病变模型; 动物分笼饲养, 每日自由饮用浓度为0.1%氨水溶液, 每24 h更换1次饮用水。每日自由进食含0.03%雷尼替丁的颗粒状SPF级大鼠饲料。每日予120 mg/L的MNNG溶液灌胃1次, 每只5 mL/kg, 持续28 wk。于实验第12、16、18、20、22、24、26、28 wk末各随机抽检2只。第28 wk末造模成功后将造模后剩余的30只大鼠随机分成3组, 每组10只, 均给予普通饮食喂养。模型组予生理盐水3 mL/kg、维酶素组予维酶素悬浊液2 mL/kg(即维酶素0.3 g/kg)、消痞颗粒组予消痞颗粒制备药液3 mL/kg(含生药9 g/kg)灌胃, 每日1次。治疗阶段持续12 wk。所有大鼠于实验第40 wk末处死。以8%水合氯醛5 mL/kg腹腔注射麻醉下摘离全胃, 迅速沿大弯侧剪开, 冷1%DEPC生理盐水漂洗内容物, 滤纸吸干水分, 取胃窦部黏膜装入冻存管中, 迅速置于液氮内冷冻, 储存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 Real-time PCR法检测野生型p53 mRNA表达量: 提取胃组织总RNA, 反转录后进行PCR扩增, GAPDH为内参。引物如下: p53 Forward: 5'-GGAGTGCAAAGAGAGCACTG-3', Reverse: 5'-CTCATTTCAGCTCTCGGAACA-3', 产物长度134 bp; GAPDH Forward: 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', Reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTTCATGA-3', 产物长度128 bp。PCR反应条件: 94℃预变性15 min; 94℃变性15 s, 60℃退火34 s, 72℃延伸15 s, 40个扩增循环; 72℃补循环10 min。反应结束后由实时定量PCR仪根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理得出Ct值。用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果。

1.2.3 Western blot法检测突变型P53蛋白表达量:

■研发前沿

p53基因突变是各种肿瘤中最常见的基因突变类型, 目前关于胃癌的研究中p53也是热点。中医药防治胃癌的作用机制研究日趋广泛, 但尚未见中医益气化瘀解毒法对胃癌前病变过程中p53影响的报道。

■相关报道

谢晶日等研究发现, 中药欣胃颗粒对气阴两虚挟瘀型的胃癌前病变有良好的疗效。

■应用要点

益气化瘀解毒法可有效逆转p53基因的突变,提高野生型p53 mRNA的表达,从而促进p53原有抑制肿瘤生长的作用。这可能是益气化瘀解毒法逆转异型增生,防治胃癌前病变,降低胃癌发病率的有效作用机制之一。

表 1 各组野生型p53 mRNA和突变型P53蛋白表达量 ($n = 5$)

分组	野生型p53 mRNA	突变型P53蛋白
空白组	0.811 ± 0.270	0.058 ± 0.047
模型组	0.443 ± 0.081^{bd}	0.886 ± 0.127^{bd}
维酶素组	0.456 ± 0.148^{bd}	0.350 ± 0.065^{bd}
消痞颗粒组	0.710 ± 0.202	0.118 ± 0.040

^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^d $P < 0.01$ vs 消痞颗粒组。

从组织中抽提蛋白质,测定总蛋白浓度。取40 μ g总蛋白与上样液混合、变性。将蛋白加入点样孔,电泳初始电压80 V,溴酚蓝染料的前缘进入分离胶上缘后提高电压至100 V,当溴酚蓝染料到达分离胶底部时停止电泳。恒流30 mA,电转90 min。转移结束后,PVDF膜取出标记膜的方向。用5%TBS-T脱脂奶粉封闭,室温振荡60 min。TBS-T漂洗液洗膜10 min \times 3次,将膜移入杂交袋中,加入用适当漂洗液稀释的抗体(稀释比例1:1 000),封口,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;再用大量TBS-T漂洗液洗膜10 min \times 3次,将PVDF膜移入另一新的杂交袋,加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例1:2 000),37 $^{\circ}$ C振荡60 min。加入显色液暗室显色,扫描胶片,用IPP软件分析目的条带灰度值,经内参 β -actin校正后进行统计学分析。

统计学处理 采用SPSS15.0统计软件分析,计量数据用mean \pm SD表示,组间差异用单因素方差分析(One-Way ANOVA, LSD method),以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异, $P < 0.01$ 为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 各组野生型p53 mRNA表达量的比较 模型组和维酶素组与空白组比较均显著降低($P = 0.007, 0.009$);消痞颗粒组与模型组和维酶素组比较均显著增高($P = 0.039, 0.049$);消痞颗粒组与空白组比较,无统计学差异($P = 0.411$,表1)。

2.2 各组突变型P53蛋白表达量比较 模型组P53蛋白表达最高,其次是维酶素组,消痞颗粒组p53较前2组表达明显降低,与空白组相接近(图1)。各组灰度值比较,模型组和维酶素组与空白组比较均显著增高($P = 0.000, 0.001$);消痞颗粒组与模型组和维酶素组比较均显著降低($P = 0.000, 0.003$);消痞颗粒组与正常组无差异($P = 0.288$,表1)。

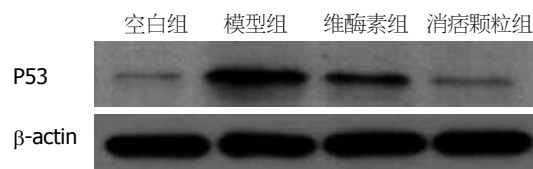


图 1 各组突变型P53蛋白表达量。

3 讨论

在多种基因共同作用的肿瘤形成过程中,p53是关键性的肿瘤抑制基因,并在参与肿瘤发生发展的多条信号通路中起主导调节作用。作为一种肿瘤抑制基因,p53可以诱导细胞周期停滞、DNA修复、细胞衰老和凋亡等^[8]。p53基因突变是各种肿瘤中最常见的基因突变类型,超过半数的肿瘤中都包含p53基因突变,在95%的人类肿瘤中可发现有p53基因的突变^[9]。突变型p53不仅导致野生型P53蛋白原有抑制肿瘤的功能丧失,而且也产生了新的功能,促进了肿瘤的发展^[10]。在某些肿瘤中,p53基因突变发生在中后期,或在晚期起重要作用,导致更具侵袭性和浸润性的肿瘤形成^[8]。在胃癌组织中p53基因的突变主要发生于外显子5-8中,以错义突变为主。p53基因突变见于萎缩性胃炎、肠化生及胃癌的各个阶段,且进展期胃癌高于早期胃癌^[11]。

PLGC属病理学名词,中医学根据其临床表现认为本病属于“胃脘痛”、“痞满”、“呃逆”、“呕吐”等范畴,目前多数学者认为PLGC应归属于“痞证”来研究^[12]。由于PLGC常为CAG进一步发展而来,且Dys又是PLGC程度较重的类型,故CAG伴Dys属于痞证的后阶段。痞满病程较长时,常形成正虚邪实,虚实夹杂的格局。正虚为脾胃气虚和/或阴虚,邪实为瘀血邪毒。邪毒又包括热毒、气滞、湿毒等。虚实之间常可相互转化,如瘀血邪毒内阻日久,可损伤脾胃,致脾胃气虚;脾胃气虚日久,气机升降不利,也易产生瘀血邪毒^[13-15]。根据以上病机,制定本病的主要治法为益气化瘀解毒法。在该法指导下组方的消痞颗粒由百合乌药汤化裁而成,全方药物组成为党参、炙百合、乌药、丹参、三七粉、蒲公英、白花蛇舌草、香橡皮、莪术。方中党参、炙百合益气养阴健脾;丹参、三七粉活血化瘀;蒲公英、白花蛇舌草清热解毒化湿;乌药、香橡皮理气消胀;莪术理气散结。诸药配伍,补虚祛实,标本同治,共奏益气化瘀解毒之功。

本研究结果显示,模型组野生型p53 mRNA

的表达显著低于空白组, 突变型p53灰度值显著高于空白组, 说明在Dys这种PLGC过程中也存在着p53基因的突变, 这与其他相关文献报道一致. 本研究结果还表明, 以中医益气化瘀解毒法为指导组方的消痞颗粒可促进CAG伴Dys模型大鼠野生型p53 mRNA的表达、抑制突变型P53蛋白的表达, 这种作用与模型组和维酶素组比较均有显著差异, 与空白组比较均无统计学差异, 说明益气化瘀解毒法可有效逆转p53基因的突变, 提高野生型p53 mRNA的表达, 从而促进p53原有抑制肿瘤生长的作用. 这可能是益气化瘀解毒法逆转Dys, 防治PLGC, 降低胃癌发病率的有效作用机制之一.

4 参考文献

- 1 胡品津, 刘新光. 消化内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 34
- 2 Deng X, Liang J, Liu DH, Zhu CY, Li LH, Qin LK. An experimental research of Weining granule in treating gastric precancerous lesions. *Chin-Ger J Clin Oncol* 2009; 8: 137-141
- 3 Lee JR, Chung WC, Kim JD, Lee KM, Paik CN, Jung SH, Jung JH, Lee YK, Han SW. Differential LINE-1 Hypomethylation of Gastric Low-Grade Dysplasia from High Grade Dysplasia and Intramucosal Cancer. *Gut Liver* 2011; 5: 149-153
- 4 蒋时红, 刘旺根, 张文娴, 刘燕. 中医治法对胃癌前病变大鼠胃黏膜细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3012-3015
- 5 游伟程. 胃癌早诊早治进展. *中国肿瘤* 2009; 18: 698
- 6 Li CQ, Liu WW, Fang DC. Experimental study on model establishment, mechanism of Production, and reverse therapy of gastric mucosal precancerous lesions in rats. *J Med Coll PLA* 1994; 9: 103-107
- 7 Si J, Zhou W, Wu J, Cao Q, Xiang Z, Jiang L, Lü W, Huang H. Establishment of an animal model of chronic atrophic gastritis and a study on the factors inducing atrophy. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 1323-1325
- 8 Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* 2011; 2: 466-474
- 9 Levine AJ. Introduction: The Changing Directions of p53 Research. *Genes Cancer* 2011; 2: 382-384
- 10 Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 978312
- 11 周亚东, 甘润良. 抑癌基因p53与胃癌的研究进展. *医学综述* 2010; 16: 1326-1330
- 12 弓淑珍. 胃炎I号对大鼠PLGC组织基质金属蛋白酶-7, 9调控机制的研究. 广州: 广州中医药大学, 2009: 3
- 13 周仲瑛. 中医内科学. 第2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 208
- 14 姜良铎, 杨晋翔. 国医大家董建华医学经验集成. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 328-341
- 15 杨晋翔, 邱岳, 李志钢. 中医药干预治疗慢性萎缩性胃炎伴异型增生的研究进展. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2010; 17: 37-40

■同行评价

文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)