

莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织自噬及PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

易志荣¹, 林倚莉¹, 王煜姣², 贾庆玲², 张钰琴¹, 谢天一¹, 凌江红^{1,2*}

(1. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021;

2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:探讨莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织自噬及磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(PKB/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。方法:SPF级SD大鼠随机分为正常组、模型组、莪连颗粒组和胃复春组。除正常组常规饲养外,模型组、莪连颗粒组及胃复春组使用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)综合法诱导构建胃癌大鼠模型,并分别予以生理盐水、莪连颗粒水溶液(3.240 g·kg⁻¹)及胃复春水溶液(0.390 g·kg⁻¹)灌胃,连续48周。剖腹取胃,肉眼观察胃大体改变,采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠胃组织病理学变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠胃组织微管相关蛋白1轻链3β(LC3B),Beclin1,p62,PI3K,Akt,mTOR mRNA及蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠胃胀大,胃壁变薄,胃黏膜色泽苍白,皱襞萎缩浅平,走行紊乱,可见结节及赘生物;与模型组比较,莪连颗粒组大鼠胃胀大减轻,胃壁变薄改善,胃黏膜色暗,皱襞减少,走行尚规整,偶见细颗粒状结节。HE染色显示,与正常组比较,模型组大鼠胃组织腺体排列拥挤紊乱,形态多样,细胞形态不一,胞浆嗜碱性,核大深染不规则,可见核分裂像,黏膜肌层浸润破坏;与模型组比较,莪连颗粒组大鼠胃组织腺体排列尚规整,少部分可见轻度异型细胞。与正常组比较,模型组大鼠胃组织LC3B,Beclin1 mRNA和蛋白表达明显降低(P<0.05),PI3K,p62,Akt及mTOR mRNA和蛋白表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,莪连颗粒组胃组织LC3B,Beclin1 mRNA和蛋白表达明显升高(P<0.05),PI3K mRNA及p62,Akt,mTOR mRNA和蛋白表达明显降低(P<0.05)。结论:莪连颗粒可改善胃癌大鼠胃组织细胞异型性,其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路促进自噬相关。

[关键词] 莪连颗粒; 胃癌; 自噬; 磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0084-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212222

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210927.2111.003.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 12:26

Effect of Elian Granule on Autophagy and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Gastric Tissue of Rats with Gastric Cancer

YI Zhi-rong¹, LIN Yi-li¹, WANG Yu-jiao², JIA Qing-ling², ZHANG Yu-qin¹, XIE Tian-yi¹,
LING Jiang-hong^{1,2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Elian granule on autophagy and the phosphatidylinositol -3 kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in gastric tissue of rats with gastric cancer. **Method:** SPF SD rats were randomly divided into

[收稿日期] 20210727(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560763);2019年国家中医药管理局《中医药循证能力建设项目》(2019XZZX-XH013)

[第一作者] 易志荣,在读硕士,主治医师,从事中西医结合消化疾病研究,E-mail:zhucyx@163.com

[通信作者] *凌江红,博士,主任医师,博士生导师,从事脾胃病研究,E-mail:ljh18817424778@163.com

the normal, model, Elian granule, and Weifuchun groups. In addition to the routine feeding in the normal group, the model, Elian granule, and Weifuchun groups received *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) to induce gastric cancer in rats, and they were respectively given normal saline, Elian granule aqueous solution ($3.240 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Weifuchun aqueous solution ($0.390 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by gavage (*ig*) for 48 weeks. The gross changes of the stomach taken by laparotomy were observed by naked eyes. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the histopathological changes of the gastric tissue in rats. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot (WB) were used to detect the mRNA and protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B), Beclin1, p62, PI3K, Akt, mTOR in rat gastric tissue. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed gastric distension, thinner gastric wall, pale gastric mucosa, atrophied and flat folds, disordered course, and visible nodules and vegetations. Compared with the model group, the Elian granule group demonstrated alleviated gastric distension, dark gastric mucosa, reduced folds, and regular course, with the thinned gastric wall improved and granular nodules observed occasionally. According to HE staining, compared with the normal group, the model group showed crowded and disordered rat gastric glands, diverse in shape, varied cell morphology, basophilic cytoplasm, large irregular hyperchromatic nuclei, visible mitosis, and infiltrated and destroyed muscularis mucosae. While compared with the model group, the arrangement of gastric glands was regular, and a few mildly atypical cells could be observed in rats of the Elian granule group. Compared with the normal group, the model group exhibited decreased expression of LC3B and Beclin1 mRNA and protein in gastric tissue ($P<0.05$), and increased expression of PI3K, p62, Akt, and mTOR mRNA and protein ($P<0.05$). Compared with the model group, the Elian granule group showed increased expression of LC3B and Beclin1 mRNA and protein in gastric tissue ($P<0.05$), and decreased expression of PI3K mRNA and p62, Akt, and mTOR mRNA and protein ($P<0.05$). **Conclusion:** Elian granule can improve the cell atypia of gastric tissue in rats with gastric cancer, and the mechanism may be related to the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to promote autophagy.

[Keywords] Elian granule; gastric cancer; autophagy; phosphatidylinositol -3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

据全球癌症数据统计,胃癌在所有癌症发病率中位列第5位,癌症相关死亡位列第3位^[1],严重威胁人类身体健康。胃癌的发生是多致病因素经不同途径环节综合调控所致,其发病机制目前仍未清晰阐明。自噬可以清除导致基因毒性的活性氧,促进受损DNA修复,对于维持细胞生理功能稳态及抑制肿瘤形成具有重要作用^[2]。磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)对于调控细胞的增殖、凋亡、迁移、代谢及血管生成具有重要作用^[3-5]。研究发现PI3K/Akt/mTOR信号通路在许多肿瘤内均表达增高^[6-7],并证实参与胃癌的发病机制中^[8-9]。

目前胃癌早期采用手术治疗,进展期以手术为主,联合化疗,放疗,生物靶向治疗等综合方法。但抗肿瘤药物毒副作用及抵抗性成为胃癌治疗失败的重要原因。中医药可多成分,多途径,多靶点作用于肿瘤,且毒副作用少,具有独特的优势^[10]。莝

连颗粒是全国名老中医蔡淦教授经多年临床经验,由陈夏六君子汤化裁创制的医院制剂,在临床应用中,对胃癌前病变收效显著^[11]。前期研究发现,莝连颗粒具有促进胃癌前病变大鼠胃组织异型细胞凋亡的功能^[12],但其对胃癌的治疗作用尚未有探讨。本研究用莝连颗粒干预胃癌大鼠,采用苏木素-伊红(HE)染色,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)研究莝连颗粒对胃癌大鼠胃组织自噬及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响,为其防治胃癌提供进一步科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠24只,6周龄,体重(180±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(桂)2020-0003,使用许可证号SYXK(桂)2020-0004。动物使用和实验操作获广西医科大学动物伦理审查委员会许可,编号

202006009。

1.2 药物和试剂 莪连颗粒组成:莪术、丹参、当归、黄连、蒲公英、白花蛇舌草、党参、炒白术、甘草、制半夏、陈皮、白茯苓,由药剂科刘力主任药师鉴定均为正品,上海中医药大学附属曙光医院提供,沪药制字 Z05101150,批号 201202;胃复春片(杭州胡庆余堂药业有限公司,国药准字 Z20040003);*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG,上海梯希爱化成工业发展有限公司,批号 M0527);0.03%盐酸雷尼替丁 SPF 级大鼠颗粒饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司,批号 2019-09-22);BCA 蛋白测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 AR0146);PI3 Kinase p110 beta 兔源一抗(英国 Abcam 公司,批号 ab151549);Akt, mTOR, 微管相关蛋白 1 轻链 β (LC3B), p62, Beclin1 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔源一抗(美国 CST 公司,批号分别为 4685, 2983, 3868, 5114, 3495, 2118);羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 荧光素标记二抗(美国 CST 公司,批号 5151);苏木素,伊红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G1004, G1002);RNA 提取通用试剂 NucleoZOL(德国 Macherey-nagel 公司,批号 740404.200);TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RnaseH Plus), PrimeScript™ RT Master Mix(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 RR820A, RR036A)。

1.3 仪器 RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);BX53F 型正置荧光相差显微成像系统(日本 Olympus 公司);ABI7500FAST 型 Real-time 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Mini-PROTEAN 型垂直电泳仪,Mini Trans-Blot 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Odyssey CLx 型双色红外荧光成像系统(美国 Li-Cor 公司)。

2 方法

2.1 药物水溶液制备 将莪连颗粒充分溶解于去离子水制得终质量浓度为 $0.324 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水溶液。将上述溶液置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中加热 10 min 后取出冷却至室温备用。将胃复春片碾成粉末充分溶解于去离子水制得终质量浓度为 $0.039 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水溶液备用。

2.2 动物分组、模型复制与干预 SPF 雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为 4 组:正常组、模型组、莪连颗粒组和胃复春组,每组 6 只。除正常组正常饲养外,其他 3 组采用 MNNG 综合法^[13]复制胃癌大鼠模型:①MNNG($170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液锡箔纸包裹避光自由饮用;②投食含 0.03% 盐酸雷尼替丁的颗粒状 SPF 级

大鼠饲料,进食 2 d,禁食 1 d;③禁食当天下午予以 2% 水杨酸钠溶液灌胃, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。同时模型组、莪连颗粒组及胃复春组分别予以生理盐水、莪连颗粒水溶液 ($3.240 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与胃复春水溶液 ($0.390 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 灌胃, 1 次/d(大鼠使用剂量参照人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表^[14],由莪连颗粒及胃复春临床成人推荐剂量^[15]换算所得)。连续干预 48 周。以大鼠胃组织 HE 染色显示腺体排列紊乱,细胞形态不一,细胞核增大深染,核质比增高,病理性核分裂像增多,腺体有出芽或固有层浸润作为造模成功标准。

2.3 取材与胃大体改变肉眼观察 末次给药后,禁食 24 h。1.5% 戊巴比妥钠 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉,剖取全胃,纵切胃大弯,充分暴露胃腔,低温去离子水清洁,肉眼观察胃大体形态变化。取胃窦小弯侧 $20 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液,用于石蜡包埋、切片;剩余胃组织分两部分冻存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$,用于后续检测。

2.4 大鼠胃组织病理损伤观察 石蜡切片脱蜡水化,苏木素及伊红染色后,乙醇梯度脱水,二甲苯透明及中性树脂胶封片,光学显微镜 ($\times 200$) 观察各组大鼠胃组织病理损伤变化。

2.5 Real-time PCR 检测大鼠胃组织 LC3B, Beclin1, p62, PI3K, Akt 及 mTOR mRNA 表达 提取胃组织总 RNA 并逆转录为 cDNA,反应条件: $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min; $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 s; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。在无酶条件下配制含 cDNA 模板 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 正反向引物, TB Green II, Rox, 无酶水总反应体系进行 PCR 扩增,扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, 1 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 34 s, 40 个循环, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示相对 mRNA 表达量,用于实验数据统计分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,见表 1。

2.6 Western blot 检测大鼠胃组织 LC3B, Beclin1, p62, PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达 高效 RIPA 裂解液裂解提取胃组织蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒检测组织总蛋白浓度。各组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。低温下将蛋白转移至活化 PVDF 膜,5% BSA 封闭液室温封闭 1 h 后加入对应一抗 LC3B, Beclin1, p62, PI3K, Akt, mTOR (1:500), GAPDH (1:1 000) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜,加入相应羊抗兔 IgG 荧光二抗 (1:1 万),室温避光摇床孵育 1 h,使用美国 Li-Cor Odyssey Clx 双色红外荧光成像系统扫描成像。Image J software 获取各蛋白条带灰度值,并与

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CGCTAACATCAAATGGGGTG	201
	下游 TTGCTGACAATCTTGAGGGAG	
LC3B	上游 GTACGTGGTTCACACCTACTTGTC	132
	下游 CTCTTCCTGTTGCTGTTGCCTT	
Beclin1	上游 ATGCAGGTGAGCTTCGTGTG	120
	下游 CTGGGCTGTGGTAAGTAATGGA	
p62	上游 GAAAGAGCGGGTACTGATCCC	278
	下游 CCATAGCATGGGCCATAAGAG	
PI3K	上游 AGTTTGCCCTCCTGATGTT	219
	下游 GTAAGTCGGCGAGATAGCGT	
Akt	上游 TGTCTCGTGAGCGCGTGT TTT	159
	下游 CCGTTATCTTGATGTGCCCGTC	
mTOR	上游 ACAGTGAAAGTGAAGCCGAGAG	140
	下游 CAAGGAGATAGAACGGAAGAAGC	

各自内参蛋白的灰度值归一化用于统计分析。

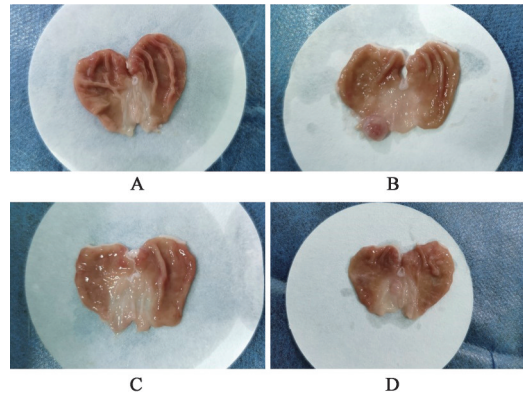
2.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 及 GraphPad Prism 8.0.2 软件对所得研究数据进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。检验数据的正态分布及方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析, 当方差分析组间差异有统计学意义时, 采用 LSD-*t* 法进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 莪连颗粒对胃癌大鼠胃大体肉眼观的影响

正常组大鼠胃体积正常, 胃壁无变薄, 胃腔见少量食物残留, 胃黏膜色红润有光泽, 表面光滑, 皱襞走行规整无中断, 无充血水肿、糜烂、结节肿块。与正常组比较, 模型组大鼠胃胀大, 胃壁变薄, 胃腔可见大量臭秽黄褐色残留物, 黏膜色泽苍白, 皱襞萎缩浅平, 走行紊乱, 可见结节及赘生物。与模型组比较, 莪连颗粒组及胃复春组大鼠胃胀大症状减轻, 胃腔偶见臭秽黄褐色液体, 胃壁变薄改善, 胃黏膜色暗, 皱襞减少, 走行尚规整, 偶见细颗粒状结节。见图1。

3.2 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织病理学改变的影响 正常组大鼠胃组织腺体排列有序, 细胞形态一致, 未见异型增生细胞。与正常组比较, MNNG 综合法构建的模型组大鼠胃组织腺体排列拥挤紊乱, 形态多样, 细胞形态不一, 细胞浆嗜碱性, 细胞核大, 深染不规则, 可见核分裂像, 黏膜肌层浸润破坏, 提示模型复制成功; 与模型组比较, 莪连颗粒组



A. 正常组; B. 模型组; C. 莪连颗粒组; D. 胃复春组(图2~4同)

图1 莪连颗粒对胃癌大鼠胃黏膜肉眼观的影响

Fig. 1 Effect of Elian granule on naked eye view of gastric mucosa in rats with gastric cancer

和胃复春组大鼠胃组织腺体排列尚规整, 少部分可见轻度异型细胞。见图2。

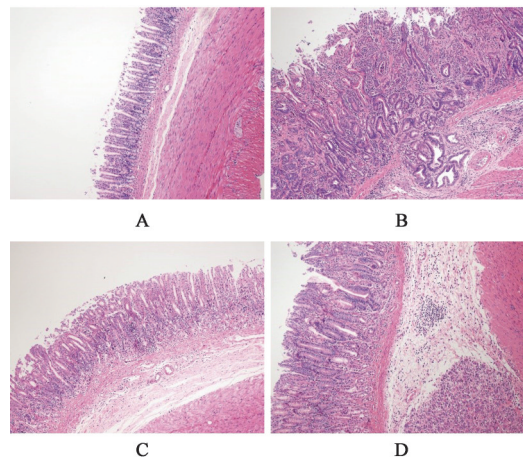


图2 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Elian granule on gastric histopathology in rats with gastric cancer(HE, ×200)

3.3 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 LC3B, Beclin1 及 p62 mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠胃组织 LC3B, Beclin1 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), p62 mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 莪连颗粒组大鼠胃组织 LC3B mRNA, Beclin1 mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), p62 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 胃复春组大鼠胃组织 LC3B mRNA, Beclin1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), p62 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与胃复春组比较, 莪连颗粒组大鼠胃组织 Beclin1 mRNA 及 p62 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), p62 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。见表2, 3, 图3。

表 2 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 LC3B, Beclin1, p62 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Elian granule on expression of LC3B, Beclin1, p62 mRNA in gastric tissue of rats with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3B	Beclin1	p62
正常		1.030±0.042	1.123±0.112	0.988±0.044
模型		0.552±0.040 ¹⁾	0.492±0.119 ¹⁾	3.441±0.179 ¹⁾
胃复春	0.390	0.878±0.040 ²⁾	0.789±0.271	1.529±0.088 ²⁾
莪连颗粒	3.240	0.830±0.061 ²⁾	0.911±0.126 ^{2,3)}	1.101±0.053 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与胃复春组比较³⁾P<0.05(表 3~5 同)。

表 3 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 LC3B, Beclin1, p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Elian granule on expression of LC3B, Beclin1, p62 protein in gastric tissue of rats with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3B- II /LC3B- I	Beclin1/GAPDH	p62/GAPDH
正常		1.226±0.237	1.312±0.303	0.251±0.054
模型		0.536±0.057 ¹⁾	0.468±0.183 ¹⁾	1.277±0.218 ¹⁾
胃复春	0.390	0.621±0.101	1.134±0.012 ²⁾	0.534±0.224 ²⁾
莪连颗粒	3.240	0.715±0.129	1.061±0.292 ²⁾	0.968±0.147 ^{2,3)}

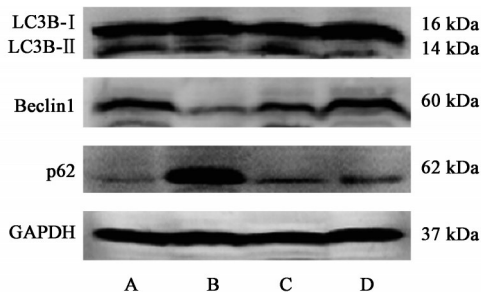


图 3 莪连颗粒作用胃癌大鼠胃组织 LC3B, Beclin1 及 p62 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Elian granule on expression of LC3B, Beclin1 and p62 protein in gastric tissue of rats with gastric cancer

3.4 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,莪连颗粒组大鼠胃组织 PI3K mRNA, Akt 和 mTOR mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P<0.05$),胃复春组大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR mRNA 和蛋白表达明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与胃复春组比较,莪连颗粒组大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4, 5, 图 4。

表 4 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Elian granule on expression of PI3K, Akt, and mTOR mRNA in gastric tissue of rats with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR
正常		1.052±0.077	1.003±0.045	1.028±0.278
模型		4.534±0.741 ¹⁾	3.475±0.079 ¹⁾	4.705±0.312 ¹⁾
胃复春	0.390	2.736±0.620 ²⁾	2.174±0.160 ²⁾	2.446±0.348 ²⁾
莪连颗粒	3.240	1.329±0.295 ^{2,3)}	1.820±0.297 ^{2,3)}	1.511±0.091 ^{2,3)}

表 5 莪连颗粒对胃癌大鼠胃组织 PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Elian granule on expression of PI3K, Akt, and mTOR protein in gastric tissue of rats with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH
正常		0.552±0.059	0.382±0.094	0.473±0.174
模型		1.276±0.315 ¹⁾	1.154±0.121 ¹⁾	1.006±0.178 ¹⁾
胃复春	0.390	0.748±0.269 ²⁾	0.841±0.125 ²⁾	0.451±0.364 ²⁾
莪连颗粒	3.240	1.103±0.341	0.692±0.224 ²⁾	0.282±0.206 ²⁾

4 讨论

胃癌属于中医“胃脘痛”“反胃”“噎膈”“伏梁”

的范畴,其病机以正气虚弱为本,痰、热、瘀、毒相互搏结为标,虚实夹杂。莪连颗粒是蔡淦教授尊清代

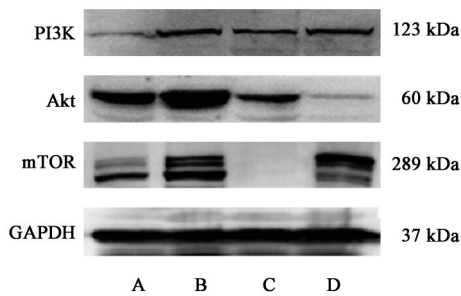


图4 莪连颗粒作用胃癌大鼠胃组织PI3K, Akt及mTOR蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Elian granule on expression of PI3K, Akt and mTOR protein in gastric tissue of rats with gastric cancer

吴鞠通“治中焦如衡,非平不安”的学术思想针对脾胃虚弱为本,痰热互结为标之胃脘痛所创制^[15],具有活血化瘀,清化健脾的功效。方中莪术行气破血,消积止痛,为君药;臣以丹参活血凉血,祛瘀止痛;黄连清热泻火解毒,蒲公英、白花蛇舌草清热解毒,消肿散结,半夏燥湿化痰,消痞散结;并伍以党参、炒白术、白茯苓健脾益气,除邪不伤正;佐以当归活血补血,行血不伤血;陈皮理气健脾,燥湿化痰,以使补而不滞。使以甘草益气健脾,调和诸药。全方体现了攻补兼施,调和气血,以平为期的原则。前期研究发现,莪连颗粒能改善胃癌前病变大鼠胃黏膜组织细胞的异型性^[16-17]。本研究HE染色提示莪连颗粒可改善大鼠胃癌细胞异型增生,与前期研究具有一致性。

胃癌的发生与细胞自噬异常密切相关。机体发生应激时,UNC51-like kinase 1(ULK1)复合物启动自噬发生,在Vacuolar protein sorting 34(Vps34)与Beclin1等复合物的参与下形成前自噬体结构。自噬泡延伸过程中,Atg5-Atg12系统和LC3系统发挥重要作用。其中LC3前体由ATG4蛋白酶酶切为胞浆性LC3-I,与磷脂酰乙醇胺结合后形成自噬标志物LC3-II,后者与自噬体膜融合。包含LC3相互作用的结构域和泛素结合结构域的p62可介导泛素化蛋白与LC3-II的结合,连同细胞内受损、变性或衰老的细胞器转移至溶酶体进行消化降解^[18]。细胞自噬具有防止各种损伤因子对细胞的损害,抑制细胞癌变^[2],在细胞内发挥“清道夫”作用。有研究表明在胃癌组织中Beclin1与LC3B显著下调^[19]。Beclin1可影响胃癌发生及转移,是胃癌预后的重要影响因子^[20]。此外,在幽门螺杆菌相关胃癌中,幽门螺杆菌感染早期可通过空泡细胞毒素及细胞毒素相关蛋白等诱导胃上皮细胞发生自噬。长期暴露于这些毒素下可引起自噬紊乱,致使自噬缺陷,

造成基因稳态失常,成为幽门螺杆菌诱发胃癌的重要机制^[21]。另外,多项研究证实通过上调自噬可抑制胃癌细胞的活性^[22-24],为胃癌提供了新的治疗策略。本研究结果显示,模型组大鼠胃组织LC3B, Beclin1 mRNA及蛋白表达明显降低,p62 mRNA及蛋白表达明显增高,表明自噬参与模型组大鼠胃癌形成,与文献报道一致。经莪连颗粒干预后,LC3B mRNA, Beclin1 mRNA及蛋白表达明显升高,p62 mRNA及蛋白表达明显降低,提示莪连颗粒可诱导大鼠胃癌细胞自噬的发生,进一步抑制胃癌的形成。

自噬受多条信号轴调控,过程复杂精细。PI3K/Akt/mTOR信号通路是其经典调控通路之一。其下游信号分子mTOR可通过磷酸化抑制自噬调控因子ULK1进而抑制自噬的启动^[25-26]。此外,PI3K蛋白家族及Akt可影响肿瘤细胞增殖、凋亡、血管生成及代谢等多方面生物过程^[27-30]。PI3K, Akt可激活下游mTOR,进一步通过激活核糖体蛋白S6激酶1^[31],来调节肿瘤细胞的增殖、存活和侵袭转移^[32-34]。多个研究表明,在胃癌中检测到PI3K/Akt/mTOR信号通路高表达^[35-37]。PI3K/Akt通过促进细胞周期蛋白D₁(CyclinD₁),基质金属蛋白酶(MMP)-2和MMP-9表达,抑制活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白解酶(cleave Capase-3)表达,进而缩短胃癌细胞增殖周期,促进侵袭转移及抗胃癌细胞凋亡^[38]。PI3K还可通过上调血管内皮生长因子表达促进胃癌血管的生成^[39]。本研究发现MNNG综合造模法诱导的胃癌大鼠胃组织PI3K, Akt, mTOR mRNA及蛋白表达水平明显上调,提示PI3K/Akt/mTOR途径与胃癌发病机制密切相关。经莪连颗粒干预后,PI3K, Akt及mTOR mRNA, Akt和mTOR蛋白表达水平明显下调,表明莪连颗粒可以抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路发挥抗癌作用。有相关研究表明,莪术醇,丹参酮II_A,当归,蒲公英萜醇,白花蛇舌草,党参多糖,半夏,陈皮,甘草查尔酮A等均可抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,具有增强自噬的作用,进而可以影响相关肿瘤细胞存活^[40-47],进一步佐证了莪连颗粒抗胃癌具有相关的可能机制。

综上,莪连颗粒可改善胃癌大鼠胃黏膜细胞的异型性,发挥抗胃癌作用,其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路在胃组织中的异常激活,而上调肿瘤细胞自噬水平维持基因稳态有关。这对扩大莪连颗粒的临床应用范围具有一定的理论意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA-Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] RYBSTEIN M D, BRAVO-SAN PEDRO J M, KROEMER G, et al. The autophagic network and cancer[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3):243-251.
- [3] KARAR J, MAITY A. PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, doi: 10.3389/fnmol.2011.00051.
- [4] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4):605-635.
- [5] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN-ATALAY R. The PI3K/Akt/mTOR interactive pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7):1946-1954.
- [6] GOLOB-SCHWARZL N, KRASSNIG S, TOEGLHOFER A M, et al. New liver cancer biomarkers: PI3K/Akt/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors [J]. *Eur J Cancer*, 2017, doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.003.
- [7] PEREZ-RAMIREZ C, CANADAS-GARRE M, MOLINA M A, et al. PTEN and PI3K/Akt in non-small-cell lung cancer[J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(16):1843-1862.
- [8] HUANG Y, ZHANG J, HOU L, et al. LncRNA AK023391 promotes tumorigenesis and invasion of gastric cancer through activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2017, 36(1):194.
- [9] RONG L, LI Z, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109726.
- [10] 冯颖,吴成亚,李杰. 中医药治疗胃癌的优势及可能机制研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(1): 200-203.
- [11] 丛军,廖玲君,朱梅萍,等. 莪术颗粒治疗慢性萎缩性胃炎临床疗效观察[J]. *安徽中医药大学学报*, 2015, 34(1):27-30.
- [12] 崔儒涛,蔡淦,程勇,等. 乐胃煎对大鼠胃黏膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因的影响[J]. *中国中西医结合脾胃杂志*, 2000, 8(2):67-69.
- [13] 祁向争,李慧臻,段鑫鑫,等. MNNG+复合法造模胃癌前病变大鼠对炎症因子影响的实验研究[J]. *湖北中医杂志*, 2019, 41(1):3-4.
- [14] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [15] 顾志坚,唐人彦,林江,等. 莪术颗粒治疗脾虚瘀热型慢性萎缩性胃炎伴肠化生临床随机对照研究[J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(4):40-43.
- [16] 蔡淦,王松坡,窦丹波,等. 乐胃煎对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞动力学的影响[J]. *新中医*, 2000, 32(2):35-37.
- [17] 王松坡,蔡淦,窦丹波,等. 乐胃煎对大鼠胃癌前病变胃黏膜异型性的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2001, 9(3):145-147.
- [18] XU J, YUAN L, TANG Y, et al. The role of autophagy in gastric cancer chemoresistance: friend or foe? [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.621428.
- [19] 刘丽霞,张路,杨丽. 胃癌组织中 miR-184、Beclin1、LC3B 的表达及临床意义[J]. *山东医药*, 2021, 61(13):29-32.
- [20] 郑华川,申道福,杨雪峰,等. Beclin1 表达在胃癌发生和演进中的临床病理意义及作用机制[J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(12):1061-1065.
- [21] ESLAMI M, YOUSEFI B, KOKHAEI P, et al. Current information on the association of *Helicobacter pylori* with autophagy and gastric cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9):14800-14811.
- [22] LI G M, LI L, LI M Q, et al. DAPK3 inhibits gastric cancer progression via activation of ULK1-dependent autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(3): 952-967.
- [23] 梁晓晖,余明珠,石海莲,等. 高良姜素抑制胃癌 MGC803 细胞 NF- κ B 通路促进自噬[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(16):4167-4174.
- [24] 霍浩然,秦瑞峰,薛佳栋,等. 川芎嗪抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的机制研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(10):1819-1823.
- [25] 张少泉,倪向荣,李鑫辉. 知母皂苷元通过 AMPK-mTOR-ULK1 途径抑制肾小球系膜基质合成和激活自噬治疗糖尿病肾病的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(11):1180-1186.
- [26] 孙阳,孙悦,顾媛媛,等. mTOR 信号通路在细胞自噬和凋亡调节中的作用[J]. *中国医学装备*, 2021, 18(1):162-166.
- [27] GUO J Y, WHITE E. Autophagy, metabolism, and cancer [J]. *Cold Spring Harb Sym*, 2016, doi: 10.1101/sqb.2016.81.030981.

- [28] KARDIDEH B, SAMIMI Z, NOROOZNEZHAD F, et al. Autophagy, cancer and angiogenesis: where is the link? [J]. Cell Biosci, 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0327-6.
- [29] SU Z, YANG Z, XU Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis [J]. Mol Cancer, 2015, doi: 10.1186/s12943-015-0321-5.
- [30] 赵革, 张丹, 杨小会, 等. 丁香活性组分抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5):1197-1204.
- [31] HOLZ M K, BLENIS J. Identification of S6 Kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase [J]. J Biol Chem, 2005, 280(28):26089-26093.
- [32] ZITO C I, QIN H, BLENIS J, et al. SHP-2 regulates cell growth by controlling the mTOR/S6 kinase 1 pathway [J]. J Biol Chem, 2007, 282(10):6946-6953.
- [33] DENG L, JIANG L, LIN X, et al. Luteolin, a novel p90 ribosomal S6 kinase inhibitor, suppresses proliferation and migration in leukemia cells [J]. Oncol Lett, 2017, 13(3):1370-1378.
- [34] CZAPLINSKA D, GÓRSKA M, MIECZKOWSKI K, et al. RSK1 promotes murine breast cancer growth and metastasis [J]. Folia Histochem Cyto, 2018, 56(1):11-20.
- [35] JIA X, WEN Z, SUN Q, et al. Apatinib suppresses the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. J BUON, 2019, 24(5):1985-1991.
- [36] WANG W, DONG X, LIU Y, et al. Itraconazole exerts anti-liver cancer potential through the Wnt, PI3K/Akt/mTOR, and ROS pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110661.
- [37] TAN A C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3):511-518.
- [38] 衣兰娟, 衣兰杰, 任珺, 等. miR-32-5p 低表达通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭并诱导凋亡 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2020, 23(6):567-572.
- [39] LV W, HU Y, LI Z, et al. PAX3 silencing suppresses gastric cancer proliferation and angiogenesis via MET/PI3K signaling [J]. Neoplasma, 2020, 67(2):304-311.
- [40] 吴皓, 李政, 彭信幸. 莪术醇通过调控 PI3K/Akt 通路促进人肝癌 HepG2 细胞凋亡 [J]. 中南药学, 2019, 17(1):11-14.
- [41] 曹慧敏, 宋因, 张妮, 等. 丹参酮 II_A 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控自噬抗内皮细胞氧化应激损伤研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11):933-939.
- [42] 刘汝银, 彭晓艳, 岳宗进, 等. 当归对大鼠椎间盘髓核细胞自噬及氧化应激损伤的作用及机制研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(2):176-182.
- [43] 朱坤, 丁米娜, 李月, 等. 蒲公英萜醇通过 mTOR 信号通路诱导乳腺癌细胞自噬 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21):32-37.
- [44] 章尤权, 王清泰, 陈旭征, 等. 白花蛇舌草对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠皮下移植瘤 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. 肿瘤基础与临床, 2015, 28(4):277-280.
- [45] 刘云鹤, 蔡金保, 王红丽. 党参多糖抑制 PI3K/Akt 通路对人肝癌 HepG2 细胞生长和运动能力的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9):1108-1113.
- [46] 孙亚男, 黄小波, 梁伟, 等. 陈皮、半夏对动脉粥样硬化小鼠 PI3K-Akt 通路、SOD、MDA、SA- β -gal 水平的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(6):805-809.
- [47] 辛红, 徐巍. 甘草查尔酮 A 通过 PI3K/AKT/MTOR 信号通路诱导肾癌细胞自噬的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17):3545-3552.

[责任编辑 张丰丰]