

· 经典名方 ·

基于Hedgehog信号通路探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG大鼠的影响

涂文玲, 黄妙安, 洪银洁, 洪诗晓, 陈梅妹, 甘慧娟*

(福建中医药大学中医学院, 福州 350122)

[摘要] 目的:探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠刺猬(Hedgehog)信号通路的影响。方法:随机将Wistar大鼠分为正常组和造模组,造模组采用复合造模法进行构建肝郁脾虚型CAG大鼠模型,造模成功后,分为模型组,维酶素组,柴芍六君汤组,GDC-0449(阻滞剂)组,柴芍六君汤+GDC-0449组;正常组和模型组给予生理盐水灌胃,维酶素组和柴芍六君汤组分别给予 $240\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $5.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,GDC-0449组腹腔注射 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,柴芍六君汤+GDC-0449给予腹腔注射 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和灌胃柴芍六君汤 $5.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,持续4周。苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠胃黏膜病理形态,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃黏膜组织音猬因子(Shh),12次跨膜蛋白受体Patched1(Ptch1),胶质瘤相关肿瘤基因同源物1(Gli1)mRNA和蛋白表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果:与正常组比较,模型组大鼠腺细胞减少,腺体萎缩,腺腔体积增大,可见浆细胞浸润,伴有肠上皮化生,胃黏膜组织Shh,Ptch1,Gli1 mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.01$),血清中IL- 1β ,TNF- α 含量显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,维酶素组、柴芍六君汤组细胞排列较为整齐,腺体萎缩改善,未见明显炎性浸润,GDC-0449组和柴芍六君汤+GDC-0449组并无太多改善;维酶素组、柴芍六君汤组胃黏膜组织Shh,Ptch1,Gli1 mRNA和蛋白表达水平显著上升($P<0.01$),维酶素组血清中IL- 1β 含量差异无统计学意义,TNF- α 含量显著降低($P<0.01$),柴芍六君汤组血清中IL- 1β ,TNF- α 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);GDC-0449组和柴芍六君汤+GDC-0449组,胃黏膜组织Shh,Ptch1,Gli1 mRNA和蛋白表达、血清中IL- 1β ,TNF- α 含量差异无统计学意义。结论:柴芍六君汤能有效改善肝郁脾虚型大鼠胃黏膜病理学状态,其机制可能是通过激活Hedgehog信号通路,从而降低IL- 1β ,TNF- α 含量有关。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎(CAG);柴芍六君汤;Hedgehog信号通路

[中图分类号] R2-0;R285;R33;R322.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220440

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211217.1834.005.html>

[网络出版日期] 2021-12-21 13:12

Effect of Chaishao Liujuntang on Hedgehog Signaling Pathway in Rats with Chronic Atrophic Gastritis of Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome

TU Wen-ling, HUANG Miao-an, HONG Yin-jie, HONG Shi-xiao, CHEN Mei-mei, GAN Hui-juan*

(College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fujian University of TCM,

Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Chaishao Liujuntang on Hedgehog signaling pathway in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) of liver depression and spleen deficiency. **Method:** Wistar rats were randomized into normal group and modeling group. CAG with the liver depression and spleen deficiency

[收稿日期] 20210815(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873237);福建省大学生创新创业训练计划项目(202010393025);福建中医药大学校管课题(X2020012);福建省自然科学基金项目(2021J0113)

[第一作者] 涂文玲,在读硕士,从事消化系统疾病的中医证研究,E-mail:2439282754@qq.com

[通信作者] *甘慧娟,博士,教授,从事消化系统疾病的中医证研究,Tel:0591-22861513,E-mail:hjganzz@126.com

syndrome was induced in rats in the modeling group with a compound method. After modeling, they were classified into the model group, vitacoenzyme group, Chaishao Liujuntang group, GDC-0449 (blocker) group, and Chaishao Liujuntang + GDC-0449 group. Normal group and model group were given (*ig*) normal saline. Vitacoenzyme and Chaishao Liujuntang group received (*ig*) corresponding drugs at $240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $5.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively, and GDC-0449 group was treated (*ip*) with GDC-0449 at $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. For the Chaishao Liujuntang + GDC-0449 group, rats received GDC-0449 (*ip*) at $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and Chaishao Liujuntang (*ig*) at $5.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. The administration lasted 4 weeks. The pathological morphology of rat gastric mucosa was observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining. mRNA and protein expression of sonic hedgehog (Shh), 12th transmembrane receptor Patched1 (Ptch1), and glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli1) in gastric mucosa tissues was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. Content of serum interleukin- 1β (IL- 1β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with normal group, the model group demonstrated decrease in gland cells, glandular atrophy, large lumen volume, plasma cell infiltration, intestinal metaplasia, decrease in the mRNA and protein expression of Shh, Ptch1, and Gli1 in gastric mucosa ($P<0.01$), and rise of serum IL- 1β and TNF- α content ($P<0.01$). Compared with model group, vitacoenzyme group and Chaishao Liujuntang group showed ordered cells, alleviation of gland atrophy, and no obvious inflammatory infiltration, and GDC-0499 group and Chaishao Liujuntang + GDC-0449 showed no significant improvement. Significant rise in the mRNA and protein expression of Shh, Ptch1, and Gli1 in gastric mucosa tissues of vitacoenzyme group and Chaishao Liujuntang group ($P<0.01$), no significant difference in serum IL- 1β content and significant decrease in TNF- α content in vitacoenzyme group ($P<0.01$), significant reduction in content of serum IL- 1β and TNF- α in Chaishao Liujuntang group ($P<0.05$, $P<0.01$) were observed compared with those in the model group. The mRNA and protein expression of Shh, Ptch1, and Gli1 in gastric mucosa and the content of serum IL- 1β and TNF- α were insignificantly different between the GDC-0449 group and Chaishao Liujuntang + GDC-0449 group. **Conclusion:** Chaishao Liujuntang can effectively improve the pathological state of gastric mucosa in CAG rats with liver depression and spleen deficiency, which may be related to the activation of Hedgehog signaling pathway and the decrease of IL- 1β and TNF- α content.

[Keywords] chronic atrophic gastritis; Chaishao Liujuntang; Hedgehog signaling pathway

慢性萎缩性胃炎(CAG)是在胃黏膜慢性炎症基础上,后期出现胃黏膜固有腺体萎缩和化生,继而出现上皮内瘤变的一种消化系统疾病^[1],与胃癌的发病率呈正相关。在全球范围内CAG年发病率在0~10.9%^[2],随着年龄的不断增长,CAG发病率迅速增加,且每增长10岁会伴随14%的新发病率^[3]。中医药在整体观指导下进行辨证论治,对胃黏膜损伤有很好的保护作用^[4-6]。CAG辨证分型不统一,目前多数医家认可CAG有肝胃不和、脾胃虚弱、胃阴不足证、脾胃湿热、胃络血瘀5型,临床多表现为虚实兼存,寒热交错的病理现象^[7]。课题组前期研究表明,慢性胃炎的病位主要涉及胃、脾、肝;病性上以虚实夹杂、寒热错杂为主^[8],肝郁脾虚是CAG的重要病理特点。

柴芍六君汤出自《医宗金鉴》,具有健脾平肝,化痰祛风之功效,是疏肝健脾的经典方剂,常常在

临床上治疗肝郁脾虚型CAG^[9-10]。已有的动物实验研究发现刺猬(Hedgehog)信号通路在胃黏膜胃底腺中表达,当胃黏膜萎缩、肠化生时,会有异常的刺猬(Hh)信号分子的表达,这与进一步发展成胃癌有着密切的关系^[11]。本研究通过建立病证结合CAG大鼠模型,旨在观察柴芍六君汤对Hedgehog信号通路阻断或逆转CAG的分子机制的调控作用,为柴芍六君汤的后续研究提供更有力的科学支持,并对临床治疗CAG等相关消化类疾病提供新的思路与方法。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级Wistar雄性大鼠,体质量100~120g,购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部,动物合格证号SCXK(沪)2018-006,饲养于福建中医药大学SPF级动物实验中心。本研究经福建中医药大学伦理委员会批准,伦理编号

FJTCMIACUC2020075。

1.2 药物 柴芍六君汤中药由福建中医药大学附属第三人民医院提供,药物组成为北柴胡6 g,人参9 g,白芍4.5 g,白术9 g,茯苓9 g,法半夏4.5 g,陈皮6 g,炙甘草3 g。将药材洗净后浸泡30 min,武火煮沸后改用文火煎煮30 min,二煎15 min,混合2次药液并滤过,浓缩为生药量为 $0.51\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱分装存用。维酶素片(乐普恒久远药业有限公司,国药准字H41024448);溶于纯水配成含药量 $24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维酶素混悬液。阻滞剂GDC-0449(美国APEX BIO公司,批号A302151337769),参考文献[12]方法溶于二甲基亚砷(DMSO)配成 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.3 试剂 脱氧胆酸钠(北京奥博星生物技术有限公司,批号20200915);氨水(西陇科学股份有限公司,批号202001021);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号J21D10Y106492);RNA提取试剂盒(南京Vazyme公司,批号R401-01);逆转录试剂,聚合酶链式反应(PCR)试剂[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为AKF1919A, AK41790A];音猬因子(Shh),胶质瘤相关肿瘤基因同源物1(Gli1)抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(中国ProteinTech公司,货号分别为20697-1-AP, 66905-1-Ig, 60004-1-Ig);12次跨膜蛋白受体Patched1(Ptch1)抗体,BCA蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,增强型RIPA裂解液,PVDF膜(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为PB0344, 16E25C46, 16E24C38, 16E28C02, 16B20B36);白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为LOT20210510A, LOT20210512A)。

1.4 仪器 EG1150H型组织包埋机, RM2245型半自动切片机(德国Leica公司);5424R型低温冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Infinite M200Pro型酶标仪(奥地利Tecan公司);TissueLyser II型研磨机(德国Qiagen公司);Nanodrop 2000型紫光光度仪器(美国Thermo Scientific公司);QuantStudio6 Flex型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);Tanon-5200型超高灵敏化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 造模前对50只大鼠进行旷场、强迫游泳实验,随后将大鼠随机分为正常组8

只,造模组42只。造模组参考文献[13]方法并加以改进复合因素造模法建立CAG肝郁脾虚型大鼠模型:0.1%氨水溶液和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱氧胆酸钠溶液每日交替饮用,配合饥饿失常法(2日足食,1日禁食)与每日夹尾刺激1 h,束缚3 h(保持大鼠抑郁状态),造模16周。经过上述造模干预,造模组大鼠出现毛发蓬乱,毛色枯黄无光泽,懒动,扎堆蜷卧;旷场实验中穿越方格数和直立次数减少,强迫游泳静止不动时间延长;病理检测胃黏膜腺体萎缩,判断为造模成功^[13]。将造模成功的40只大鼠随机分为模型组,维酶素组,柴芍六君汤组,GDC-0449组和柴芍六君汤+GDC-0449组,每组8只。造模分组后,按照人与动物剂量比例换算,大鼠给药剂量为人剂量的6倍,维酶素组、柴芍六君汤组、柴芍六君汤+GDC-0449组分别给予维酶素混悬液 $0.240\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,柴芍六君汤 $5.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,GDC-0449阻滞剂给药剂量参考文献[12],GDC-0449组和柴芍六君汤+GDC-0449组给予GDC-0449 $0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射,正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,每日1次,连续干预4周。

2.2 大鼠一般行为观察 观察大鼠精神状态、毛发、大便形状并且每周测量体质量。

2.3 旷场、强迫游泳实验 旷场反应箱高40 cm,长、宽均为100 cm,将旷场箱底面划分为 5×5 的方格,旷场实验于安静的环境下进行。每次将大鼠统一放入旷场箱中间方格,记录5 min内每只大鼠的穿越方格数、直立次数和洗脸修饰次数。强迫游泳桶高65 cm,直径20 cm,注入水深以大鼠尾巴无法触到桶底为主,根据老鼠大小的改变而改变,记录5 min内每只大鼠静止不动时间。

2.4 标本采集 大鼠禁食不禁水12 h,麻醉后行腹主动脉采血,全血室温静止4 h, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径15 cm),取上清液,分装后冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。沿胃大弯剖开,冰生理盐水漂洗干净的胃内容物,选取胃窦部放入4%多聚甲醛的试管中固定,胃体部位 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

2.5 HE染色观察大鼠胃黏膜病理形态变化 将胃组织进行包埋,切片,染色,光学显微镜下观察大鼠胃黏膜病理变化。

2.6 Real-time PCR检测胃组织相关mRNA表达 取胃黏膜组织50 mg进行碾磨,提取RNA,用紫外分析仪测RNA浓度与纯度。然后将mRNA逆转录为cDNA,取cDNA $2\ \mu\text{L}$ 为模板进行PCR扩增。反应体系:TB Green Ex Taq(TilRaseH Plus) $10\ \mu\text{L}$,

ROX Reference Dye II 0.4 μL , 引物各 0.8 μL , ddH₂O 6 μL , cDNA 2 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 40个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, 引物由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|----------------|-----------------------------|-------|
| Shh | 上游 AGGCTGGATTCGACTGGGTCTA | 142 |
| | 下游 AACTTGGTGCCACCTGCTC | |
| Ptch1 | 上游 GGAGCTCAGGCACTATGAAGCAC | 123 |
| | 下游 TGATGTCTGGAGTCAGGATGCAC | |
| Gli1 | 上游 AACATGGCAGTCGGTAACATGAG | 132 |
| | 下游 CCGCGTGTGTGTAGCCATTTAG | |
| β -actin | 上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA | 150 |
| | 下游 GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG | |

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织相关蛋白表达 胃组织用提前预冷的RIPA裂解液进行提取蛋白, SDS-PAGE电泳, 转移蛋白至PVDF膜上; 室温封闭 15 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次, 每次 10 min; Shh一抗(1:1 000), Ptch1一抗(1:2 000), Gli1一抗(1:4 000), GAPDH一抗(1:2万) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS冲洗3次, 每次 10 min; 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, PBS冲洗3次, 每次 10 min; 避

表2 柴芍六君汤对造模前后两组大鼠旷场实验结果的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Chaishao Liujuntang on open field experiment results of two groups of rats before and after modeling ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 穿越方格数/个 | | 直立次数/次 | | 洗脸修饰/次 | |
|----|-------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 造模前 | 造模后 | 造模前 | 造模后 | 造模前 | 造模后 |
| 正常 | 88.50 \pm 15.35 | 121.83 \pm 12.54 | 14.83 \pm 5.71 | 23.83 \pm 5.27 | 1.80 \pm 0.45 | 1.33 \pm 1.03 |
| 造模 | 81.52 \pm 22.87 | 38.60 \pm 20.75 ²⁾ | 18.10 \pm 4.19 | 7.27 \pm 4.02 ²⁾ | 1.40 \pm 0.50 | 1.33 \pm 1.45 |

注:与正常组比较²⁾ $P<0.01$ 。

3.3 对大鼠体质量的影响 正常组大鼠因是正常饮食, 干预前体质量明显高于其余各组, 当达到一定体质量后, 体质量增长将会趋于平缓; 与正常组比较, 模型组大鼠体质量显著增长($P<0.01$); 与模型组比较, 维酶素组、柴芍六君汤大鼠体质量增量显著增长($P<0.01$)。见表3。

3.4 对大鼠胃黏膜病理形态的影响 正常组腺体和细胞排列整齐且结构完整, 无炎性浸润, 这是胃黏膜组织正常病理学表现。模型组大鼠腺细胞减少, 腺体萎缩, 腺腔体积增大, 可见浆细胞浸润, 伴有肠上皮化生, 说明大鼠CAG模型构建成功。经过

光显影。使用Image Lab软件进行灰度值分析。

2.8 ELISA检测大鼠血清中IL-1 β , TNF- α 的含量 将已分装的血清从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出1份, 室温解冻, 按照试剂盒步骤检测血清中IL-1 β , TNF- α 含量。

2.9 统计学方法 采用SPSS 23.0软件分析数据, 符合正态分布则数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐则采用最小显著性差异法(LSD), 方差不齐则采用盖姆斯-豪厄尔检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般行为表现的影响 造模后, 造模组大鼠与正常组大鼠比较, 出现了懒动, 扎堆蜷卧, 毛发枯黄、无光泽, 大便稀溏。经过维酶素、柴芍六君汤治疗后, 以上症状有所改善, 但是GDC-0449组、柴芍六君汤+GDC-0449组未见明显改善。

3.2 对造模前后大鼠旷场、强迫游泳实验的影响 造模前, 两组大鼠穿越方格数、直立次数、洗脸修饰无差异; 造模后, 造模组比正常组穿越方格数、直立次数显著减少($P<0.01$), 洗脸修饰无差异, 见表2。由强迫游泳实验结果看: 造模前, 正常组大鼠静止时间为(81.07 \pm 37.50) s, 模型组为(79.51 \pm 17.41) s, 两组差异无统计学意义; 造模后, 正常组大鼠静止时间为(73.43 \pm 11.07) s, 模型组为(140.67 \pm 22.38) s, 与正常组比较, 模型组大鼠静止时间显著升高($P<0.01$)。说明肝郁脾虚型大鼠模型构建成功。

治疗后, 维酶素组、柴芍六君汤组细胞排列较为整齐, 腺体萎缩改善, 未见明显炎性浸润, GDC-0499组和柴芍六君汤+GDC-0449组并无明显改善, 见图1。

3.5 对大鼠胃黏膜组织Shh, Ptch1, Gli1 mRNA表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠Shh, Ptch1, Gli1 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 维酶素组、柴芍六君汤组大鼠Shh, Ptch1, Gli1 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$), GDC-0449组、柴芍六君汤+GDC-0449组大鼠Shh, Ptch1, Gli1 mRNA表达水平差异无统计学意义。见表4。

表3 柴芍六君汤对大鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Chaishao Liujiangtang on body weight of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 体质量 | 体质量增量 |
|----------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常 | | 420.22±35.63 | 20.93±10.09 |
| 模型 | | 320.54±11.58 ²⁾ | 39.00±12.83 ²⁾ |
| 维酶素 | 0.24 | 348.45±18.68 ³⁾ | 62.14±12.15 ⁴⁾ |
| 柴芍六君汤 | 5.1 | 340.48±10.11 ³⁾ | 57.41±12.18 ⁴⁾ |
| GDC-0449 | 0.05 | 302.69±29.34 | 37.38±19.87 |
| 柴芍六君汤+GDC-0449 | 5.1+0.05 | 298.10±3.96 | 23.91±10.91 |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4-6同)。

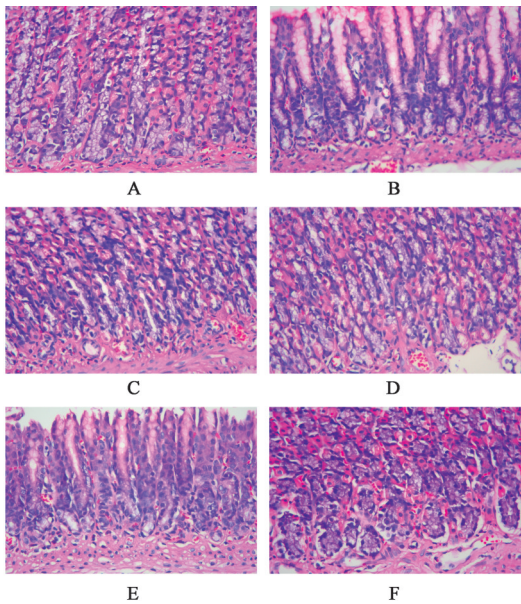


图1 柴芍六君汤对大鼠胃黏膜病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Chaishao Liujiangtang on pathological morphology of gastric mucosa in rats (HE, ×400)

表4 柴芍六君汤对大鼠胃黏膜组织 Shh, Ptch1, Gli1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effects of Chaishao Liujiangtang on mRNA expression levels of Shh, Ptch1 and Gli1 in gastric mucosa of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Shh | Ptch1 | Gli1 |
|----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 1.06±0.24 | 0.95±0.13 | 0.93±0.16 |
| 模型 | | 0.31±0.12 ²⁾ | 0.27±0.07 ²⁾ | 0.53±0.11 ²⁾ |
| 维酶素 | 0.24 | 2.71±0.17 ⁴⁾ | 0.65±0.86 ⁴⁾ | 1.00±0.18 ⁴⁾ |
| 柴芍六君汤 | 5.1 | 0.88±0.21 ⁴⁾ | 1.04±0.19 ⁴⁾ | 0.93±0.12 ⁴⁾ |
| GDC-0449 | 0.05 | 0.33±0.10 | 0.49±0.10 | 0.51±0.14 |
| 柴芍六君汤+GDC-0449 | 5.1+0.05 | 0.11±0.04 | 0.20±0.03 | 0.40±0.11 |

3.7 对大鼠血清中 IL-1 β , TNF- α 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠 IL-1 β , TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,柴芍六君汤组 IL-1 β 含量明显降低($P<0.05$),维酶素组差异无统计学意义;维酶素组、柴芍六君汤组 TNF- α 含量显著降低($P<$

3.6 对大鼠胃黏膜组织 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维酶素组、柴芍六君汤组 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达水平显著升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),GDC-0449 组、柴芍六君汤+GDC-0449 组 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达水平差异无统计学意义。见图2,表5。

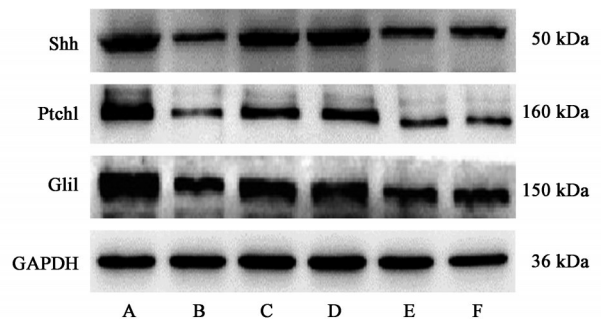


图2 大鼠胃黏膜组织 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Shh, Ptch1 and Gli1 protein expression in gastric mucosa of rats

0.01), GDC-0449 组、柴芍六君汤+GDC-0449 组 IL-1 β 及 TNF- α 含量差异无统计学意义。见表6。

4 结论

CAG 病情迁延,难以治愈,与胃癌的发生密切相关,如若不及时阻断或逆转,该病有很大几率向

表5 柴芍六君汤对大鼠胃黏膜组织 Shh, Ptch1, Gli1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Chaishao Liujuntang on protein expression levels of Shh, Ptch1 and Gli1 in gastric mucosa of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Shh/GAPDH | Ptch1/GAPDH | Gli1/GAPDH |
|----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 1.49±0.09 | 2.24±0.34 | 1.79±0.38 |
| 模型 | | 0.42±0.17 ²⁾ | 0.38±0.16 ²⁾ | 0.32±0.15 ²⁾ |
| 维酶素 | 0.24 | 1.15±0.17 ⁴⁾ | 0.87±0.37 ⁴⁾ | 1.21±0.29 ⁴⁾ |
| 柴芍六君汤 | 5.1 | 1.21±0.16 ⁴⁾ | 1.15±0.36 ⁴⁾ | 1.21±0.17 ⁴⁾ |
| GDC-0449 | 0.05 | 0.46±0.16 | 0.40±0.15 | 0.29±0.03 |
| 柴芍六君汤+GDC-0449 | 5.1+0.05 | 0.45±0.20 | 0.37±0.15 | 0.23±0.07 |

表6 柴芍六君汤对大鼠血清中 IL-1β, TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Chaishao Liujuntang on serum levels of IL-1β and TNF-α in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | IL-1β | TNF-α |
|----------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| 正常 | | 23.06±4.51 | 116.46±11.15 |
| 模型 | | 32.67±3.19 ²⁾ | 276.35±28.01 ²⁾ |
| 维酶素 | 0.24 | 28.03±3.57 | 201.08±25.67 ⁴⁾ |
| 柴芍六君汤 | 5.1 | 28.09±1.90 ³⁾ | 203.38±30.42 ⁴⁾ |
| GDC-0449 | 0.05 | 36.89±4.72 | 254.31±11.79 |
| 柴芍六君汤+GDC-0449 | 5.1+0.05 | 32.55±5.28 | 265.17±45.41 |

胃癌发展,因此对该病的及时阻断和预防具有极为重要的意义。肝郁脾虚型 CAG 是以肝胃不和为主要病机,患者肝气郁滞、横逆犯胃,致使脾失濡养、脾胃虚弱,进而引发呃逆、呕吐、泛酸、胃痞等临床表现,故治疗本病的主要治法应该是疏肝健脾^[14]。柴芍六君汤出自《医宗金鉴》,方中柴胡、白芍一收一散,达到疏肝养肝之功效,人参、茯苓、白术益气健脾共为臣药;半夏、陈皮均可理气健脾、燥湿化痰、和胃止呕,因而共为佐药,甘草性缓可调节诸药。现代研究发现柴芍六君汤可显著增强消化道运动,增强胃窦收缩,加速胃排空^[15-16]。前期笔者通过动物实验研究发现柴芍六君汤能明显改善肝郁脾虚型大鼠抑郁状态,减轻黏膜炎性细胞浸润,抑制胃黏膜增殖^[17]。维酶素片是一类具有多种核黄素和维生素的用于保护胃黏膜的药物,在临床上常用来治疗 CAG 且具有良好疗效,故本研究以该药物为阳性药。

“病证结合”动物模型在中医药现代化研究中具有明显优势^[18],多以行为学指标、宏观表征作为模型评价标准,该模型可克服西医辨病与中医辨证局限,使诊疗过程更加具有个体差异,使临床医疗行为更加精准^[19]。本研究结果显示,造模组大鼠出现懒动,扎堆蜷卧,毛发枯黄、无光泽,大便稀溏,旷

场实验穿越方格数和直立次数明显减少,强迫游泳不动时间延长等表现,说明模型组大鼠具备肝郁脾虚证的症状学表现;再加上大鼠胃黏膜固有腺体萎缩,腺腔扩大和炎性细胞浸润,提示了 CAG 疾病模型造模成功;综上可提示肝郁脾虚型 CAG 病证结合大鼠模型造模成功。

Hedgehog 信号通路在包括胃癌和胰腺癌在内的各种癌症中常常过度表达,并且与炎症因子存在密切内在联系^[20-21],同时也在慢性胃炎的癌变过程中起到了重要作用。最早发现 Hedgehog 信号通路是在果蝇体^[22-23],由 Hedgehog 蛋白家族 (Shh, Ihh, Dhh),跨膜受体 (Ptch, Smo) 和下游转录因子 (Gli)^[24]3 部分组成,多表达于胃黏膜胃底腺中^[25]。该通路中 Hh 蛋白为启动因子,也是 Ptch 蛋白的配体^[26],Hh-Ptch 结合后,Ptch 对 Smo 的抑制作用会大幅降低,并对 Gli 转录因子的表达进行调控,最终激活 Hedgehog 信号通路。本研究结果中,模型组大鼠 Shh, Ptch1, Gli1 mRNA 和蛋白相对正常组的表达明显降低,与之前研究结果一致^[27]。因此笔者认为,胃黏膜处于萎缩状态时,Hedgehog 信号通路相关蛋白 Shh, Ptch 和 Gli1 可能处于抑制状态。在经过维酶素、柴芍六君汤等对症治疗后,会重新激活该信号通路,这可能是柴芍六君汤中药治疗 CAG 的分子基础。

CAG 向胃癌发展过程中炎症始终参与,IL-1β, TNF-α 常常用来评价胃黏膜损伤程度^[28],IL-1β 能有效抑制胃酸的分泌^[29],持续低酸环境会加重胃黏膜萎缩程度;TNF-α 是炎症过程中的重要介质^[30],研究发现 TNF-α 在胃溃疡幽门螺旋杆菌 (Hp) 阳性患者中过度表达,明显比阴性患者高。研究表明 IL-1β 和 TNF-α 是胃酸分泌强有力的抑制因子引起胃内 pH 升高^[31-32],而 pH 升高会导致 Shh 的表达被抑制。另有研究发现 Hedgehog 信号通路阻滞剂使用在 LN229 炎症细胞模型中,可促进 IL-1β, TNF-α 等炎

症因子的释放^[33],而如果使用Hedgehog信号通路激动剂可下调IL-1 β , TNF- α 等炎症因子的表达^[34]。此外相关研究表明,激活Hedgehog信号通路,可有效抑制巨噬细胞或者小胶质细胞的活化,降低中枢神经系统的炎症反应^[35],由此可见选用IL-1 β , TNF- α 作为检测指标,可较好地反映出CAG的炎症水平与Hedgehog信号通路的关系。笔者在上述研究基础上采用了ELISA法检测血清中IL-1 β , TNF- α 含量,发现模型组大鼠IL-1 β , TNF- α 含量明显上升。故笔者认为IL-1 β , TNF- α 和Hedgehog信号通路有某种联系,可能是IL-1 β , TNF- α 升高抑制胃酸分泌使得胃黏膜pH升高,从而使得Shh表达受到抑制,进一步使得下游分子表达改变,亦存在由于Hedgehog信号通路受到抑制,促进了IL-1 β , TNF- α 的表达。经过维酶素和柴芍六君汤治疗后,血清中IL-1 β , TNF- α 含量降低。另有研究表明Hedgehog信号通路的激活可通过固有免疫和适应性免疫进一步降低IL-1 β , TNF- α 等促炎信号^[36]。因此笔者认为,柴芍六君汤可能是通过激活Hedgehog信号通路进而降低IL-1 β , TNF- α 表达,同时也有可能存在柴芍六君汤在激活该通路过程中,同时降低IL-1 β , TNF- α 的表达,有待进一步的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 林果为,王吉耀,葛均波. 实用内科学[M]. 15版. 北京:人民卫生出版社,2017:1508.

[2] ADAMU M A, WECK M N, GAO L, et al. Incidence of chronic atrophic gastritis: systematic review and meta-analysis of follow-up studies [J]. *Eur J Epidemiol*, 2010, 25(7):439-448.

[3] 刘京运,金世禄. CAG患病率与年龄的关系及发病的影响因素[J]. *川北医学院学报*, 2017, 32(1):152-154.

[4] 支江平,王文娟. 胃复宁治疗CAG的研究[J]. *湖北中医杂志*, 2011, 33(12):3-5.

[5] 郭书敏. 益气健胃法治疗CAG46例[J]. *中国民间疗法*, 2008, 12(8):51-52.

[6] 刘晓伟,张红梅,曲宏达,等. 左金丸对应激性胃溃疡黏膜损伤保护作用机理的研究[J]. *江西中医药*, 2004, 35(8):18-20.

[7] 邹世昌. 乌梅丸加减治疗CAG78例[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2008, 18(3):175-176.

[8] 甘慧娟,梁丽丽,韩木龙,等. 慢性胃炎的证素分布特征及与性别关系的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(7):2456-2459.

[9] 洪婷,黄青,彭胜男,等. 加味柴芍六君汤治疗慢性非萎缩性胃炎(脾虚肝郁型)60例[J]. *江西中医药*, 2014, 45(6):24-26.

[10] 刘丽,韩远峰,郭益湘. 柴芍六君汤合丹参饮加减治疗CAG疗效观察[J]. *实用中医药杂志*, 2017, 33(2):123-124.

[11] BERMAN D M, KARHADKAR S S, MAITRA S, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours [J]. *Nature*, 2003, 425(6960):846-851.

[12] YUE Q, CHEN Y H, MULDER T, et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]GDC-0449 (vismodegib), an orally active hedgehog pathway inhibitor, in rats and dogs: a unique metabolic pathway via pyridine ring opening [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(6):952-965.

[13] 朱景茹,黄婉仪,杨宗保,等. 柴芍六君汤对CAG肝郁脾虚证模型大鼠胃黏膜组织NF- κ B、c-Myc、STAT1表达的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(11):984-989.

[14] 刘华,伍静,孙铜林. 柴芍六君子汤辅助化疗治疗肝郁脾虚型中晚期胰腺癌临床研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(2):26-29.

[15] 张峥祥,姬润美,高龙. 柴芍六君子汤加减治疗中虚气逆型食管反流病对复发的影响[J]. *贵州医药*, 2020, 44(1):99-101.

[16] 蒋忠,何强,刘涛. 柴芍舒胆汤加减治疗慢性胆囊炎30例临床观察[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(2):49-50.

[17] 朱景茹,洪银洁,黄婉仪,等. 柴芍六君汤对肝郁脾虚型CAG大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(7):9-14.

[18] 李晓娟,白晓晖,陈家旭,等. 中医动物模型研制方法及展望[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(7):2263-2266.

[19] 蔡定芳. 论病证结合临床诊疗模式[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(2):133-135.

[20] KWON H, SONG K, HAN C, et al. Inhibition of hedgehog signaling ameliorates hepatic inflammation in mice with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2016, 63(4):1155-1169.

[21] SWIDE R, SKA-SYN M, XIE G, et al. Hedgehog regulates yes-associated protein 1 in regenerating mouse liver[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1):232-244.

[22] SAQUI-SALCES M, MERCHANT J L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(7):786-795.

[23] PAULA M, LEWIS, MATTHEW P, et al. Cholesterol modification of sonic Hedgehog is required for long-

- range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1[J]. Cell,2001,105(5):599-612.
- [24] ARMEL G, RALPH R, LAURENT R, et al. Therond cholesterol modification of Hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to Hedgehog[J]. Dev Cell, 2003, 4(2):191-204.
- [25] COHEN M M. The hedgehog signaling network[J]. Am J Med Genet,2003,123A(1):5-28.
- [26] 陈曦,孙明瑜,刘宁宁,等. 胃癌癌前病变分子遗传学改变研究进展[J]. 中国医刊,2018,53(5):477-481.
- [27] SHIOTANI A, LISHI H, UEDO N. et al. Evidence that loss of sonic hedgehog is an indicator of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer [J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100 (3) : 581-587.
- [28] 刘跃平,柳茂森,朱临江,等. CAG胃黏膜免疫相关指标变化研究[J]. 中国预防医学杂志,2017,18(1):39-43.
- [29] BEALES I L, CALAM J. Interleukin 1β and tumour necrosis factor α inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways [J]. Gut, 1998,42(2):227.
- [30] SZLOSAREK P W, BALKWILL F R. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours [J]. Lancet Oncol, 2003, 4 (9) : 565-573.
- [31] TAKASHIMA M, FURUTA T, HANAI H, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils [J]. Gut,2001,48(6):765-773.
- [32] BEALES IL, CALAM J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways [J]. Gut, 1998,42(2):227-234.
- [33] 王迪. 阻断SHH信号通路对胶质细胞炎性激活的实验研究[D]. 广州:广州医学院,2012.
- [34] 邵帅. Sonic hedgehog/PI3K/Akt信号通路在帕金森病炎症模型中发挥神经保护作用的研究[D]. 广州:广州医科大学,2017.
- [35] GENEVIEVE M, SULLIVAN, REGINA C, et al. Transplanted adult neural stem cells express sonic hedgehog *in vivo* and suppress white matter neuroinflammation after experimental traumatic brain injury [J]. Stem Cells Int, 2017, doi: 10.1155/2017/9342534.
- [36] 贺自克,王上增,沈锦涛. 基于Hedgehog通路探讨补肾活血方对实验性膝骨性关节炎兔退变软骨的保护作用[J]. 中国病理生理杂志,2020,36(4):700-706.

[责任编辑 孙丛丛]