

# 益气活血法通过 miR216b/Beclin1 介导萎缩性胃炎癌前病变自噬的机制

赵唯含<sup>1,2</sup>, 周莹<sup>2</sup>, 许雨晴<sup>2</sup>, 艾亚楠<sup>2</sup>, 文雯<sup>2</sup>, 穆恒<sup>1\*</sup>

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000;

2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

**【摘要】** 目的:通过观察益气活血法对萎缩性胃炎癌前病变(PLGC)模型小鼠微RNA216b(miR216b)/自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)信号通路的影响,探讨其干预PLGC的自噬作用机制。方法:将75只健康雄性SPF级昆明种小鼠随机分为空白组(12只)及造模组(63只),造模组小鼠每日采用1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(MNNG)溶液(150 mg·L<sup>-1</sup>)自由饮用及灌胃,同时每日灌胃雷尼替丁溶液(0.03 g·kg<sup>-1</sup>),造模12周。按照随机对照表将造模小鼠分为模型组、益气组(黄芪3.5 g·kg<sup>-1</sup>)、活血组(三七粉0.7 g·kg<sup>-1</sup>)、益气活血组(黄芪3.5 g·kg<sup>-1</sup>+三七粉0.7 g·kg<sup>-1</sup>)及叶酸组(2 mg·kg<sup>-1</sup>)。予相应药物灌胃8周后取材,苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠胃黏膜病理改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织微管相关蛋白1轻链3(LC3) I、LC3 II、Beclin1蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组胃黏膜Beclin1及miR-216b的mRNA表达情况。结果:与空白组比较,病理学观察显示模型组胃黏膜固有腺体减少,出现萎缩伴肠上皮化生;与模型组比较,各治疗组均有改善,其中益气活血组改善最为明显。与空白组比较,模型组小鼠胃组织LC3 I、LC3 II、LC3 II/LC3 I及Beclin1蛋白含量均明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,各治疗组胃组织LC3 I、LC3 II、LC3 II/LC3 I及Beclin1蛋白含量均有升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),其中益气活血组升高最为明显。与空白组比较,模型组小鼠Beclin1 mRNA表达下降( $P<0.05$ ),miR216b mRNA表达上升( $P<0.05$ )。与模型组比较,各治疗组小鼠Beclin1表达升高( $P<0.05$ ),miR216b表达下降( $P<0.05$ ),尤以益气活血组最为明显。结论:以黄芪、三七为代表的益气活血法治疗PLGC的作用机制可能为通过抑制miR216b的表达,激活Beclin1,从而促进自噬,发挥修复胃黏膜的作用。

**【关键词】** 益气活血法; 萎缩性胃炎癌前病变; 微RNA216b(miR216b); 自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1); 黄芪; 三七

[中图分类号] R242; R2-0; R2-031; R24; R285; R573.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)10-0117-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230990

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220517.1436.004.html>

[网络出版日期] 2022-05-17 15:41:56

## Mechanism of Qi-invigorating and Blood-activating Therapy in Mediating Autophagy of Precancerous Lesions of Atrophic Gastritis by miR216b/Beclin1

ZHAO Wei-han<sup>1,2</sup>, ZHOU Ying<sup>2</sup>, XU Yu-qing<sup>2</sup>, AI Yan-an<sup>2</sup>, WEN Wen<sup>2</sup>, MU Heng<sup>1\*</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China;*

2. *Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China*)

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effect of Qi-invigorating and blood-activating therapy on the miR216b/Beclin1 pathway in mice with atrophic precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) and analyze its

[收稿日期] 2021-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81804082);陕西省自然科学基金项目(2018JQ8009);陕西省中医药管理局课题(LCPT104);中医消化领域优势病种(慢性萎缩性胃炎)专科专病循证能力提升专项(2019XZZX-XH011)

[第一作者] 赵唯含, 博士, 副教授, 从事中医药防治慢性胃肠病的研究, E-mail: weihanzhaodoc@163.com

[通信作者] \* 穆恒, 硕士, 从事中医药防治慢性胃肠病的研究, E-mail: mh1609@163.com

mechanism in autophagy of PLGC. **Method:** Seventy-five healthy male SPF KM mice were randomly divided into a blank group and a model group. Mice in the model group were given 1-methyl-3-nitroso-1-nitrosoguanidine (MNNG) solution ( $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for free drinking and gavage and ranitidine solution ( $0.03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) daily for 12 weeks. According to the random control table, mice were divided into a model group, a Qi-invigorating group ( $3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of Astragali Radix), a blood-activating group ( $0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of Notoginseng Radix et Rhizoma powder), a Qi-invigorating and blood-activating group ( $3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of Astragali Radix +  $0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of Notoginseng Radix et Rhizoma powder), and a folic acid group ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The corresponding drugs were given to mice in each group for 8 weeks and then the tissues were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was carried out to observe the changes in gastric mucosa. Western blot was used to detect the protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) I, LC3 II, and Beclin1. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of Beclin1 and miR-216b. **Result:** Pathological observation showed that as compared with the blank group, the intrinsic glands of gastric mucosa decreased with atrophy and intestinal metaplasia in the model group, which were improved in all treatment groups, and the improvement of the Qi-invigorating and blood-activating group was the most obvious. As compared with the blank group, the content of LC3 I, LC3 II, LC3 II/LC3 I, and Beclin1 protein in gastric tissues of the model group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). As compared with the model group, the content of LC3 I, LC3 II, LC3 II/LC3 I, and Beclin1 protein in gastric tissues of each treatment group was increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The increase was most obvious in the Qi-invigorating and blood-activating group. As compared with the blank group, the mRNA expression of Beclin1 in the model group was decreased ( $P<0.05$ ), and that of miR216b was increased ( $P<0.05$ ). As compared with the model group, the mRNA expression of Beclin1 was increased and that of miR216b was decreased in each treatment group ( $P<0.05$ ), and the changes were the most obvious in the Qi-invigorating and blood-activating group. **Conclusion:** The mechanism of the Qi-invigorating and blood-activating therapy, represented by Astragali Radix and Notoginseng Radix et Rhizoma, in treating PLGC may be through inhibiting the expression of miR216b and activating Beclin1, thus promoting autophagy and repairing gastric mucosa.

**[Keywords]** Qi-invigorating and blood-activating therapy; precancerous lesions of gastric cancer; miR216b; Beclin1; Astragali Radix; Notoginseng Radix et Rhizoma

慢性萎缩性胃炎(CAG)是由多因素反复刺激引起的,常常出现上腹部痛或胀等不适症状。其常见病理特征是胃黏膜炎性改变及固有腺体数目的减少甚至消失<sup>[1]</sup>。CAG伴肠上皮化生或异型增生则被称为萎缩性胃炎癌前病变或胃癌前病变(PLGC),进一步发展则会导致胃癌的发生<sup>[2]</sup>。异型增生(Dys)或称为上皮内瘤变(IN),世界卫生组织(WHO)在2010版《国际肿瘤组织学分类》中为其正式更名,并将其分为高、低2种不同种类,这使PLGC的临床诊断更规范化<sup>[3]</sup>。PLGC是CAG进展为胃癌的中间环节,因此,临床上研究胃癌前期病变的发病机制及防治方案具有重要意义。课题组前期研究发现,益气活血法能有效改善萎缩性胃炎癌前病变的肠上皮化生,保护胃黏膜。本实验拟通过观察益气活血法对小鼠自噬因子蛋白及基因表达情况的影响,以揭示益气活血法作用于PLGC的具体

机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级昆明种小鼠,雄性,75只,体质量( $20\pm 2$ )g,西安交通大学医学部实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(陕)2017-003。饲养于陕西中医药大学医学科研实验中心动物房。动物房自然明暗周期各半,室温控制在 $18\sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 $50\%\sim 60\%$ ,通风良好。本实验由陕西中医药大学动物实验中心伦理委员会批准(伦理审核编号SUCMDL20190302002)

**1.2 药物与试剂** 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(MNNG,日本TCI公司,批号8WF3N-LC),盐酸雷尼替丁胶囊(江西汇仁药业股份有限公司,批号20180501),黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根,由四川新绿色药业科技发展有限公司加工为黄芪免煎颗粒(批号

YPK000030104423),三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根和根茎(北京同仁堂药业股份有限公司,批号 244003638),由陕西中医药大学附属医院杨红莲主任鉴定为正品,叶酸片(常州制药厂有限公司,批号 20180623,国药准字 H20003143,0.4 mg/片);苏木素(美国 Sigma 公司,批号 H9627),伊红 Y、无水乙醇、二甲苯(国药集团,批号分别为 71014544、10009218、10023418),RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(武汉 Servicebio 公司,批号分别为 G2002、G2026、G2003),微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)兔多克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号 00072777),自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1(Beclin1)兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德公司,批号分别为 BM0627、BA1051、BA1054),内参蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国 Abcam 公司,批号 Ab9485)。

**1.3 仪器** JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司),RM2016 型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司),DYY-7C 型电子显微镜(日本奥林巴斯公司),QuantStudio5 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司),Nano-300 型微量分光光度计(杭州奥盛公司),Neofuge23R 型冷冻离心机(香港利康生物公司),DYCZ-40G 型转印电泳仪(北京六一仪器厂),NanoDrop One 型微量分光光度计(美国赛默飞公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 参考文献[4]方法,采用 MNNG 复合雷尼替丁进行造模。将 75 只 SPF 级雄性 KM 小鼠按随机对照表分为空白组(12 只)及造模组(63 只),空白组小鼠每天自由摄食饮水,同时每天灌胃去离子水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  鼠体质量。造模组小鼠每日自由饮用 MNNG(MNNG 配置时需避光)溶液( $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),同时按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  鼠体质量灌胃,结合雷尼替丁溶液每日按  $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃。共造模 12 周。12 周后,随机抽取 4 只小鼠处死,4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片进行苏木素-伊红(HE)染色。依据参考文献[5],符合 PLGC 病理要求,提示造模成功。过程中空白组大鼠死亡 1 只,造模组死亡 8 只,造模率为 87.3%。

**2.2 分组及给药** 造模成功后,运用随机数字表法将造模组小鼠分为 5 组,模型组(10 只,去离子水

$10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、益气组(11 只,黄芪  $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、活血组(10 只,三七粉  $0.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、益气活血组(10 只,黄芪  $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ +三七粉  $0.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、叶酸组(11 只,  $0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )分别给予相应的药物灌胃,连续治疗 8 周。用药剂量按实验动物与 60 kg 成人表面积比等效量核算比率,计算动物的等效剂量,实验时以去离子水配制成所需浓度,4 °C 冰箱保存。

**2.3 标本采集** 给予治疗药物 8 周后取材,脱颈处死,腹部打开,取出胃组织。沿胃大弯处剪开胃组织,并取出全部胃内容物。0.9% NaCl 冲洗组织,滤纸吸去多余水分后并展开,观察胃黏膜形态结构后拍照。沿角切迹剪开,胃窦部横向条状取材胃黏膜组织,放于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片进行 HE 染色。光学显微镜下观察病理情况。取胃体部分,放入冻存管内,-80 °C 冰箱条件下保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)及 Real-time PCR 实验。

**2.4 Western blot 检测胃组织 LC3 I、LC3 II、Beclin1 的蛋白表达** 将胃组织取出,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后切碎放入匀浆管中,提取总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测,完成蛋白变性,低温保存。蛋白转移至硝酸纤维素膜上,放入稀释的一抗 LC3 I、LC3 II (1:1 000), Beclin1 (1:1 000), GAPDH (1:5 000), 4 °C 孵育过夜,次日以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。在暗室里把曝光液混匀进行曝光,胶片扫描,用 Image J 软件进行灰度值转换,计算各蛋白的相对表达量。

**2.5 Real-time PCR 检测小鼠胃组织 Beclin1 和 miR216b mRNA 表达** 将组织研磨成细腻的絮状物。提取总 RNA,取 RNA 2.5  $\mu\text{L}$  使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。反转录为 cDNA。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参,使用特异性引物合成产物,反应条件为 95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 1 min,40 个循环。计算方法为  $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\beta\text{-actin}}}$ ,  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{用药物组}}} - \Delta C_{t_{\text{空白组}}}$ ,使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示各组基因的相对表达量,进行统计分析。引物由武汉 Servicebio 公司合成,引物序列见表 1。

**2.6 统计学分析** 统计分析采用 SPSS 21.0 统计软件,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较符合正态分布且方差齐采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对各组小鼠胃黏膜组织病理的影响** 病理学

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

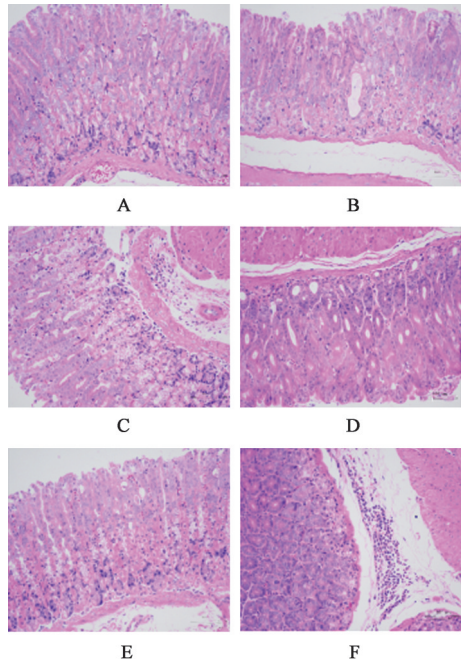
引物	引物序列(5'-3')	长度/bp
$\beta$ -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	92
	下游 GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	
Beclin1	上游 GAGATTGGACCAGGAGGAAGCT	126
	下游 GTGCCAAACTGTCCGCTGTG	
miR216b	上游 CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGG	150
	CAATTCAGTTGAGTCACATT	
	下游 ACACTCCAGCTGGGAAATCTCTG	
	CAGGCAA	

注:此表中所有引物均由武汉 Servicebio 公司提供

观察显示空白组小鼠黏膜结构正常。腺体排列紧密,大致未见异常。模型组胃黏膜出现程度不一的萎缩,伴肠上皮化生,黏膜层变薄,固有层腺体数量减少;壁细胞数量明显较少,可见排布疏散;一部分腺体体积扩大,黏膜肌层增厚。与模型组比较,各治疗组病理均有改善,其中以益气活血组最为明显,腺体排列整齐,数量较前明显多。见图1。

**3.2 对 各 组 小 鼠 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠胃组织 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,益气组、活血组及叶酸组小鼠 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ),益气活血组小鼠 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组小鼠 LC3 II/LC3 I 明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,益气组、活血组及叶酸组小鼠 LC3 II/LC3 I 明显升高( $P<0.05$ ),益气活血组小鼠 LC3 II/LC3 I 显著升高( $P<0.01$ )。见图2、表2。

**3.3 对 各 组 小 鼠 Beclin1、miR216b mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠胃组织 Beclin1 mRNA 表达明显降低( $P<0.05$ ), miR216b mRNA



注:A.空白组;B.模型组;C.益气组;D.活血组;E.益气活血组;F.叶酸组(图2同)

图1 益气活血法对 各 组 小 鼠 胃 黏 膜 组 织 病 理 的 影 响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Yiqi Huoxue method on pathology of gastric mucosa in mice of each group (HE,  $\times 200$ )

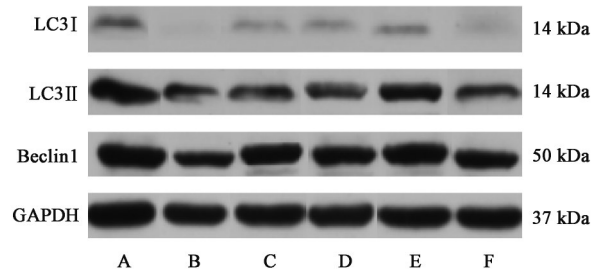


图2 各 组 小 鼠 胃 组 织 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of LC3 I, LC3 II and Beclin1 protein expression in gastric tissue of mice in each group

表达明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,各给药组小鼠胃组织 Beclin1 mRNA 表达明显升高( $P<0.05$ ),

表2 益气活血法对 各 组 小 鼠 胃 组 织 LC3 I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达量及 LC3 II/LC3 I 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Effect of Yiqi Huoxue method on expression of LC3 I, LC3 II, Beclin1 protein and LC3 II/LC3 I in gastric tissue of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3 I /GAPDH	LC3 II /GAPDH	Beclin1/GAPDH	LC3 II /LC3 I
空白组	11	10 <sup>a</sup>	0.21±0.05	1.23±0.09	0.93±0.08	6.12±0.22
模型组	10	10 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>1)</sup>	0.17±0.02 <sup>1)</sup>	0.60±0.01 <sup>1)</sup>	3.10±0.10 <sup>1)</sup>
益气组	11	3.5	0.12±0.02 <sup>2)</sup>	0.54±0.01 <sup>2)</sup>	0.74±0.02 <sup>2)</sup>	4.52±0.02 <sup>2)</sup>
活血组	10	0.7	0.11±0.01 <sup>2)</sup>	0.49±0.05 <sup>2)</sup>	0.74±0.01 <sup>2)</sup>	4.49±0.02 <sup>2)</sup>
益气活血组	10	3.5+0.7	0.17±0.01 <sup>3)</sup>	0.98±0.06 <sup>3)</sup>	0.82±0.02 <sup>3)</sup>	5.57±0.05 <sup>3)</sup>
叶酸组	11	0.002	0.10±0.01 <sup>2)</sup>	0.46±0.02 <sup>2)</sup>	0.71±0.02 <sup>2)</sup>	4.44±0.04 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;a.mL·kg<sup>-1</sup>(表4同)

miR216b mRNA表达明显降低( $P<0.05$ )。以益气活血组改善较为明显。见表3。

表3 益气活血法对各组小鼠胃组织 Beclin1、miR216b mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Effect of Yiqi Huoxue method on expression of Beclin1 and miR216b mRNA in gastric tissue of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Beclin1	miR216b
空白组	11	10 <sup>a</sup>	1.60±0.07	0.85±0.07
模型组	10	10 <sup>a</sup>	0.56±0.05 <sup>1)</sup>	3.86±0.04 <sup>1)</sup>
益气组	11	3.5	0.94±0.02 <sup>2)</sup>	1.73±0.02 <sup>2)</sup>
活血组	10	0.7	0.84±0.02 <sup>2)</sup>	1.84±0.06 <sup>2)</sup>
益气活血组	10	3.5+0.7	1.07±0.02 <sup>2)</sup>	1.66±0.05 <sup>2)</sup>
叶酸组	11	0.002	0.64±0.06 <sup>2)</sup>	2.09±0.05 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

祖国传统医学对于PLGC没有明确指出其归属于哪个病名。后世医家依据其胃脘胀满、疼痛、反酸、嗝气的症状,将其定义为“胃痞”。目前认为本病的病性属于“本虚标实”。“本虚”以脾胃气虚、阳虚为主,脾胃虚弱,运化功能失调,无以布输精微物质予全身,正气不足,实邪停滞,日久更为虚弱;“标实”是脾胃气虚,无力输布气血津液运行,导致气机阻滞,水湿停聚,瘀血内结。王道坤教授认为本病的病机以脾胃亏虚为本,瘀毒内结为标,自拟化痰消痞方以温补脾胃兼益气化瘀<sup>[6]</sup>。王义相<sup>[7]</sup>采用2种不同治疗方法对84例PLGC患者进行观察,最后发现中药组治疗率高达92.9%。李洁等<sup>[8]</sup>临床通过扶正通络汤与胃复春对PLGC给予对比治疗发现,扶正通络汤对于改善胃黏膜情况,逆转肠化生疗效显著。戴辉煌等<sup>[9]</sup>认为本虚是PLGC病机的关键,六君子汤是他临证治疗的常用方,方中黄芪具有修复胃黏膜,增强胃黏膜屏障作用。刘庆生等<sup>[10]</sup>通过动物实验发现益气活血法可在一定程度上防治PLGC的发展。参考古今文献及现代临床经验认为本病的病机关键属“脾虚血瘀”,益气活血法为治疗本病的常用方法。课题组前期研究发现以黄芪、三七为代表的益气活血法可以明显减轻PLGC大鼠胃黏膜的萎缩及肠化情况,升高大鼠血清胃蛋白酶原(PG) I/PG II及胃泌素(G17)水平<sup>[11]</sup>。并且还发现黄芪、三七可以通过影响Hedgehog通路的下游因子胶质瘤相关癌基因同源蛋白(Gli)-1/Gli-2/Gli-3、细胞周期蛋白D<sub>1</sub>(Cyclin D<sub>1</sub>)、苏氨酸蛋白激酶Fused抑制因子(SuFu)的表达来对PLGC进行干预<sup>[12]</sup>。因此课题组认为益气活血法为治疗本病的基本

治法,而黄芪、三七可作为益气活血法的代表药对,临床上以黄芪、三七为主治疗PLGC亦取得了很好的疗效。

近期研究显示,细胞自噬对CAG损伤胃黏膜的修复有重要作用<sup>[13]</sup>,研究PLGC与自噬的具体发生机制成为现在消化界的热点之一。自噬是在应激状态下,将细胞内坏死的物质运到溶酶体内降解消化<sup>[14]</sup>。研究表明应激状态下自噬活性迅速激活,形成大量自噬体,会严重影响疾病的发生和发展<sup>[15]</sup>。在肿瘤的发生中,细胞自噬常常显示为两面性,早期细胞自噬常可保护机体抑制癌变,而肿瘤一旦形成,细胞自噬为癌细胞提供更丰富的营养,促进肿瘤生长。有Meta分析指Beclin1可以作为一个可靠的胃癌预后指标,分析结果提示Beclin1的高表达有利于胃癌患者的预后<sup>[16]</sup>。YU等<sup>[17]</sup>检测了胃癌组织和癌旁组织中Beclin1的表达水平,并在多种胃癌细胞系中进行了验证,发现Beclin1的高表达与胃癌的良好预后相关,而Beclin1的低表达与胃癌的转移和分化有关。马陆军等<sup>[18]</sup>研究发现Beclin1蛋白在cag、癌前病变、胃癌中的表达率逐渐降低,证明Beclin1诱导的细胞自噬在胃黏膜修复及更新方面发挥作用。

Beclin1是酵母Atg6的同类物,位于染色体17q21基因,该基因突变可导致肿瘤形成<sup>[19]</sup>。miRNAs是一类长21~23个核苷酸的非编码RNA,miRNA可以与靶mRNA的3'UTR区完全或者非完全结合,直接降解基因的mRNA或者在翻译后水平抑制靶基因的表达。课题组经过查找数据库发现,miR216b能够与Beclin1的3'UTR区域中的579~585段结合。程艳香等<sup>[20]</sup>发现miR216b可靶向作用于Beclin1,并对其进行负向调节,从而影响细胞自噬水平。因此课题组推测miR216b能够靶向Beclin1 mRNA,抑制Beclin1的表达,从而对Beclin1介导的细胞自噬发挥负调控的作用。本实验结果中,PLGC模型组miR216b的表达较高,而Beclin1的趋势与miR216b正好相反,提示miR216b对Beclin1有负向调控作用,这与课题组前期的推测相符。

本研究结果显示,在MNNG诱导的PLGC的模型中,益气活血法可以明显改善小鼠胃黏膜肠化生、IN情况。经过益气活血法干预治疗后,PLGC小鼠胃组织LC3 I、LC3 II、Beclin1蛋白表达量、LC3 II/LC3 I及Beclin1的基因表达量均明显升高,其中以益气活血组最为明显,提示益气活血法可能对

自噬具有激活作用。小鼠胃组织 miR216b 的基因表达情况中,模型组表达量最高,益气活血组表达量较其他治疗组明显下降,提升益气活血法可抑制 miR216b 的表达。因此,以黄芪、三七为代表的益气活血法治疗 PLGC 的作用机制可能为通过抑制 miR216b 的表达,激活 Beclin1,从而促进自噬,发挥修复胃黏膜的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 杨印智,王继栓,王晓琴,等.慢性萎缩性胃炎的诊断与中医药治疗[J].现代中西医结合杂志,2014(24):2686-2687.

[2] 黄远程,潘静琳,黄超原,等.慢性萎缩性胃炎癌前病变证型、证素演变规律文献研究[J].中医杂志,2019,60(20):1778-1783.

[3] 中华医学会消化病学分会.中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J].胃肠病学,2017,22(11):670-687.

[4] WATARI J, CHEN N, AMENTA P S, et al. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(18):5461-5473.

[5] 房静远,杜奕奇,刘文忠,等.中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J].胃肠病学,2017,22(11):670-687.

[6] 王韶康,段永强.王道坤运用化瘀消痞汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变经验[J].中国中医药信息杂志,2019,26(1):122-124.

[7] 王义相.益气活血法治疗胃癌前病变的疗效观察[J].中国处方药,2014(9):116-116,117.

[8] 李洁,李敏,王伟,等.扶正解毒通络汤在防治胃癌前病变中的应用及对患者胃功能的影响[J].肿瘤药学,2018,8(6):947-950.

[9] 戴辉煌,王常松.从本虚论治胃癌前病变经验浅析[J].天津中医药大学学报,2017,36(4):251-253.

[10] 刘庆生,蔡丹莉,陈芝芸,等.益气活血方对胃癌前病

变大鼠 NF- $\kappa$ B、CyclinD<sub>1</sub> 和 p16 表达的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(8):1979-1982,后插21.

[11] 赵唯含,高康丽,李宁飞,等.黄芪、三七及其配伍对慢性萎缩性胃炎大鼠胃组织 Hedgehog 信号通路的调节作用[J].中华中医药杂志,2016,31(5):1951-1955.

[12] 赵唯含,毛堂友,高康丽,等.黄芪、三七及其配伍对 MNNG 诱导萎缩性胃炎癌前病变大鼠 Gli1/2/3、SUFU 及 CyclinD<sub>1</sub> 水平的影响[J].北京中医药,2018,37(1):44-48,封3.

[13] 马佳乐,李慧臻,赵双梅,等.中医药通过调控自噬治疗胃癌及癌前病变的研究现状[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(4):233-239.

[14] 缪春明,张勇,王伟伟,等.自噬及凋亡相关蛋白在 PC12 细胞缺糖缺氧过程中的表达及其意义[J].中国老年学杂志,2010,30(1):78-80.

[15] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature,2008,451(7182):1069-1075.

[16] HE Y, ZHAO X, SUBAHAN N R, et al. The prognostic value of autophagy-related markers Beclin-1 and microtubule-associated protein light chain 3B in cancers: A systematic review and Meta-analysis[J]. Tumour Biol,2014,35(8):7317-7326.

[17] YU M, GOU W F, ZHAO S, et al. Beclin-1 expression is an independent prognostic factor for gastric carcinomas[J]. Tumour Biol, 2017, 34(2):1071-1083.

[18] 马陆军,林瑶光.S100A11 和自噬基因 Beclin1 在胃癌组织中的表达及临床意义[J].世界华人消化杂志,2012,33(1):3266-3271.

[19] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. Oncogene,2004,23(16):2891-2906.

[20] 程艳香,杨潇,陈干涛.miR-216b 通过靶向调控 Beclin-1 的表达抑制宫颈癌细胞自噬[J].肿瘤防治研究,2016,43(11):954-958.

[责任编辑 王鑫]