

· 药理 ·

参术胶囊对脾虚胃癌小鼠
ERK 信号通路中 AP-1 和 IL-2 的影响

邓青秀, 彭成*, 敖慧, 谢晓芳
(成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] 目的:研究参术胶囊对脾虚胃癌小鼠细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路中转录激活蛋白-1(AP-1)和白细胞介素-2(IL-2)的影响,以探讨参术胶囊阻断脾虚胃癌发生的机制。方法:随机取 17 只 SPF 小鼠作为空白组正常喂养,其余小鼠均首日给予山西白醋 15 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,次日给予 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续 9 d,第 10 天给予 *N*-亚硝基二乙胺(DENA)按 2.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续 110 d,建立脾虚胃癌小鼠模型。将模型动物随机分为模型组、胃复春片 718 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、参术胶囊 440,220,110 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组,试验组从 111 d 起灌胃给药,连续 30 d。实验结束后,观察各组小鼠一般情况的变化;HE 染色观察参术胶囊是否阻断脾虚胃癌的发生;用免疫组化法研究参术胶囊对诱导脾虚胃癌模型 ERK1/2,AP-1,IL-2 等指标的影响。结果:参术胶囊作用脾虚胃癌小鼠模型 30 d 后,能改善诱发型脾虚胃癌小鼠模型一般状态,其病理表现较模型组明显减轻,免疫组化结果显示胃复春片组和参术胶囊 440,220 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组均能明显增强模型动物 ERK1/2,AP-1,IL-2 的表达($P<0.05$, $P<0.01$),参术胶囊 110 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组能明显增强模型动物 ERK1/2 的表达($P<0.01$),而对 AP-1,IL-2 的表达无明显改善。结论:参术胶囊可通过 ERK 信号通路阻断脾虚胃癌发生。

[关键词] ERK 信号通路;参术胶囊;脾虚;胃癌

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)10-0177-06

The Effect of Shenzhu Capsules on AP-1 and IL-2 of
ERK Signal Pathway in Gastric Cancer Mice with Spleen-deficiency

DENG Qing-xiu, PENG Cheng*, AO Hui, XIE Xiao-fang
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of Shenzhu capsules on AP-1 and IL-2 of ERK signal pathway in the gastric cancer mice with spleen-deficiency and explore the molecular mechanism of Shenzhu Capsules in inhibiting the generation of gastric cancer mice with spleen-deficiency. Method: Seventeen mice were randomly selected as normal group. The other mice were administrated by 15 mL·kg⁻¹·d⁻¹Shanxi white venigar on the first day and 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹from the second day for continuous 9 days and by 2.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹ diethylnitrosamine (DENA) for 110 days to establish gastric cancer mice model with spleen-deficiency. The model mice were divided into model group, Weifuchun group, and 3 doses of Shenzhu capsules groups (440, 220 and 110 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The mice of treatmental groups were administrated on the 111th day and for continuous 30 days. The general state of animals were observed, the HE staining was used to study whether Shenzhu capsules inhibited the occurrence of gastric cancer with spleen-deficiency and the immunohistochemistry method was used to study the influence of

[收稿日期] 20111231(012)
[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A-07-19)
[第一作者] 邓青秀,博士研究生,实验师,从事疾病动物模型与中药复方药理研究,Tel:028-87785016,E-mail:dqxlmj@126.com
[通讯作者] *彭成,博士,研究员,博士生导师,从事疾病动物模型与中药复方药理研究,Tel:028-87785016,E-mail:pengchengcao@163.com。

Shenzhu capsules on the ERK1/2, AP-1 and IL-2 expression when the experiment was over. **Result:** The general state and pathological manifestation of Shenzhu capsule groups mice was improved obviously compared with that of model group ones. The Weifuchun and the 440, 220 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Shenzhu capsules could obviously strengthen expression of ERK1/2, AP-1 and IL-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). 110 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Shenzhu capsules could obviously strengthen the expression of ERK1/2 ($P < 0.01$) but not obviously strengthen the expression of AP-1 and IL-2. **Conclusion:** Shenzhu capsules can inhibit the occurrence of gastric cancer with spleen-deficiency by inactivating ERK signal pathway.

[**Key words**] ERK signal pathway; Shenzhu capsules; spleen-deficiency; gastric cancer

传统名方参术膏来源于《证治准绳》,是治疗脾气虚证的基础方。彭成教授通过大量的实验研究发现参术膏治疗脾气虚证胃癌前病变和胃癌的药效物质基础是红参皂苷、白术油、红参白术复合多糖,并应用现代制药学新技术制成参术胶囊。参术胶囊能明显改善瘤细胞的异型性,诱导胃癌组织细胞分化,并能通过调控与代谢、离子通道和运输蛋白等相关的基因治疗脾虚胃癌转移鼠^[1-2]。有实验证实,机体免疫功能的低下,特别是细胞免疫的下降是胃癌前病变及胃癌原因之一,脾虚证存在细胞免疫和体液免疫状态降低现象,且细胞免疫功能受损最为明显^[3]。国内外研究发现,参术膏中主要药效部位能提高机体的非特异性和特异性免疫功能,能增加脾脏、胸腺的质量,提高肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-2、共刺激分子 MHC-II 和 B7-2 的表达和 T 淋巴细胞增殖功能^[4-11]。本研究从细胞免疫重要细胞因子 IL-2 入手,通过免疫组织化学方法对胃组织中 ERK1/2, AP-1, IL-2 的表达进行检测,观察参术胶囊对诱发脾虚胃癌小鼠免疫功能的影响,探讨参术胶囊抑制脾虚胃癌癌变的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠,体重 22 ~ 26 g,雌雄各半,由成都中医药大学动物中心提供。许可证号 SCXK(川)2008-11。

1.2 药物 参术胶囊由成都中医药大学药学院提供,每 1 g 提取物含 10 g 生药,批号 20080401,6.6 g 加无菌水溶解为 100 mL。阳性药物胃复春片,杭州胡庆余堂药业有限公司,批号 20090712。

1.3 试剂与仪器 山西白醋,山西老陈醋集团有限公司生产,酸度 $0.035 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,标准代号 GB18187.2000 液态发酵。*N*-亚硝基二乙胺(DENA)购自日本 TCI 公司,批号 BW03821。免疫组化一抗 C-Jun (AP-1 Jun) 兔抗大鼠 IgG,货号 bs-0670,北京博奥深公司提供,批号 900102W。IL-2 兔抗大鼠 IgG,货号 bs-1191R,由北京博奥深公司提供,

批号 019082。ERK1/2 (MAPK) 兔抗大鼠 IgG,货号 bs-2637R,由北京博奥深公司提供,批号 909880W。SABC 免疫组化试剂盒 SA2010-小鼠 IgG/兔,武汉博士德生物工程有限公司生产,批号 11888800。碱磷酶底物 AP-Red 试剂盒, ZLI-9042,由北京中衫金桥有限公司生产,批号 P106723C。显色剂 DAB, AB1022,由武汉博士德生物工程有限公司提供,批号 112452Q。PA2003 电子天平(上海天平仪器厂); Olympus BX50 光学显微镜(日本)。

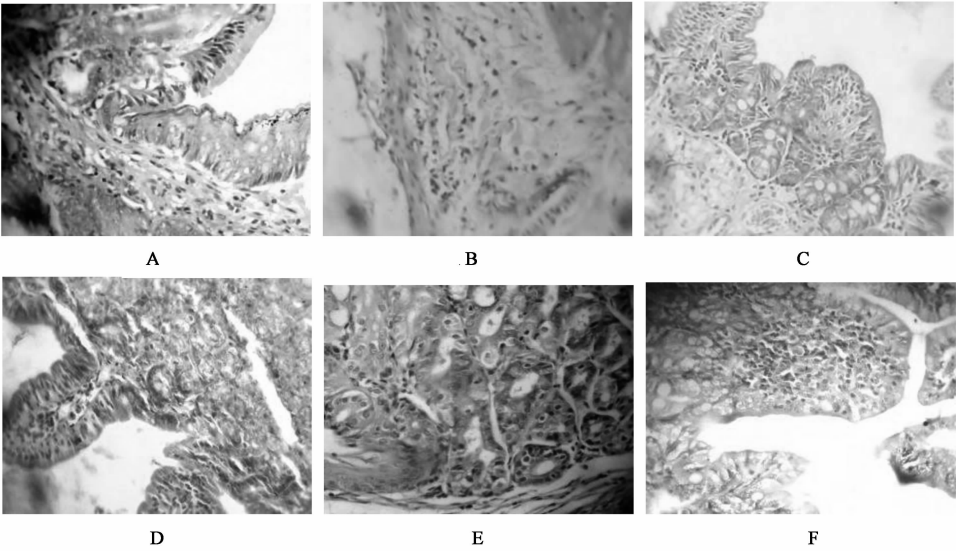
2 方法

2.1 诱发性脾虚胃癌动物模型的建立及分组处理 随机取 17 只小鼠作为空白组正常喂养,其余按以下方法造模:禁食 24 h 后首日给予山西白醋 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,次日 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig,连续 9 d,第 10 天给予 *N*-亚硝基二乙胺(DENA) $2.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig,连续 110 d。将剩余的 227 只小鼠随机分成 5 组,其中模型组 56 只,阳性组 51 只,高剂量组 46 只,中剂量组 34 只,低剂量组 40 只,其中模型组不予处理,阳性组胃复春片 $718 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig,参术胶囊高、中、低剂量组 ($440, 220, 110 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) ig,连续 30 d。每隔 10 d 测量体重、5 min 自发活动、观察脾虚表现(大便干、腹胀、耸毛、眯眼、拉尾反射阳性等)。治疗 30 d 后称取小鼠质量,再脱颈椎处死小鼠,解剖,取胃,吸去血液,修去脂肪、系膜;10% 福尔马林固定胃组织,石蜡包埋、切片、HE 染色,镜下观察胃组织切片的变化。拍照,统计各病理状态[慢性萎缩性胃炎(不伴有癌前病变)]、胃癌癌前病变、胃癌、未见明显病变)总数, Ridit 检验分析结果。

2.2 参术胶囊对诱发性脾虚胃癌模型 T 细胞活化信号通路的影响 每组随机取 10 只动物标本,切片、常规脱蜡脱水、30% H_2O_2 1 份,与蒸馏水 10 份混合,室温 10 min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次。热修复抗原:将切片浸入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5 ~ 10 min 后,反复 1 次,冷却后 PBS (pH 7.2

~7.6)洗涤 1~2 次。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗。滴加适当稀释的一抗,4 ℃ 过夜,PBS(pH 7.2~7.6)洗涤 2 min×3 次。I 抗稀释度:C-Jun 为 1:100,IL-2 为 1:200,ERK1/2 为 1:300。滴加生物素化兔抗大鼠 IgG(1:100)于 37 ℃ 孵育 30 min,PBS(pH 7.2~7.6)洗涤 2 min×3 次。滴加试剂 SABC(1:100)于 37 ℃ 20 min,PBS(pH 7.2~7.6)洗 5 min×4 次。DAB 显色:使用 DBA 显色试剂盒(AR1022),取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片上。室温显色,镜下控制反应时间,一般 5 min,蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染 2 min,脱水、透明、封片、显微镜观察。ERK1/2、C-Jun 为浆/核表达,IL-2 为浆表达。阳性:棕黄色-黄色表达于浆或膜,阴性细胞核为蓝色。采用 OlympusBX50 显微镜,在 40×10 倍光学显微镜下,用泰盟 BI-2000 医学图像分析系统将免疫组化图像采集,半定量分析表达情况。每张切片(每例动物标本)随机选取 5 个视野,计数阳性(表达)细胞个数,取平均数。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析法进行组间差异显著性分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。



A. 正常对照; B. 模型; C. 胃复春片 718 mg·kg⁻¹; D. 参术胶囊 440 mg·kg⁻¹; E. 参术胶囊 220 mg·kg⁻¹; F. 参术胶囊 110 mg·kg⁻¹(图 2~4 同)

图 1 参术胶囊对模型小鼠胃组织病理学的影响(HE, 400×)

3.3 参术胶囊对脾虚胃癌模型 ERK 信号通路中 AP-1 和 IL-2 的影响 参术胶囊作用于诱发性脾虚胃癌动物模型 30 d 后,模型组 ERK1/2 表达的阳性细胞数较空白组显著减少,有显著性差异($P < 0.01$);胃复春片组、参术胶囊高、中、低剂量组

3 结果

3.1 一般状态表现 脾虚胃癌模型组在实验过程中动物出现不同程度的脾虚表现。小鼠毛色灰暗、失去光泽、形体瘦弱、行动迟缓、精神萎靡不振、摄食量和饮水量减少。空白组与模型组体重大致呈上升趋势,但是模型组上升趋势较空白组明显变慢;造模后模型组自发活动数较空白组明显减少。动物自然死亡后观察到胃有增生、出血、溃疡、小肠肠胀气、充血等现象。用药 30 d 后以上症状均有改善,见表 1。

表 1 参术胶囊对脾虚胃癌模型 30 d 小鼠一般状态的影响($\bar{x} \pm s$)					
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	只数	存活率 /%	体重 /g	5 min 自发 活动数/次
空白对照	-	17	100 ²⁾	48.75 ± 6.37 ²⁾	17.21 ± 4.34 ²⁾
模型	-	15	26.79	27.7 ± 6.2	2.59 ± 1.21
胃复春片	718	13	25.49	29.2 ± 2.68	2.98 ± 0.98
参术胶囊	440	19	41.30	30.85 ± 5.96	3.02 ± 1.55 ¹⁾
	220	12	35.29	29.65 ± 5.06	3.12 ± 1.31 ¹⁾
	110	16	40	29.2 ± 5.55	3.03 ± 0.65

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 胃组织病理表现 模型动物用药 30 d 后,模型组病理改变较空白组癌变明显;胃复春片组、参术胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量病理改变较模型组癌变明显减轻,有部分模型动物恢复正常。见图 1。

ERK1/2 表达的阳性细胞数较模型增加明显,有显著性差异($P < 0.01$)。参术胶囊对诱发性脾虚胃癌动物模型 AP-1 和 IL-2 的影响为模型组表达的阳性细胞数较空白组有明显减少;胃复春片组、参术胶囊高、中剂量组表达的阳性细胞数较模型组增加明显,

有显著性差异($P < 0.01$)。参术胶囊低剂量组表达的阳性细胞数较模型组有增加趋势。见表 2。

表 2 参术胶囊对脾虚胃癌模型 ERK 信号通路中 AP-1 和 IL-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ERK1/2 阳性细胞数	AP-1 阳性细胞数	IL-2 阳性细胞数
空白对照	—	$1.60 \pm 0.516^{2)}$	2.00 ± 1.33	2.80 ± 1.99
模型	—	0.20 ± 0.42	1.10 ± 0.88	0.70 ± 1.01
胃复春片	718	$2.10 \pm 0.57^{2)}$	$2.60 \pm 0.84^{1)}$	$3.30 \pm 1.06^{2)}$
参术胶囊	110	$1.40 \pm 0.52^{2)}$	1.90 ± 1.10	1.90 ± 0.74
	220	$3.60 \pm 1.07^{2)}$	$6.80 \pm 2.93^{2)}$	$3.30 \pm 0.83^{2)}$
	440	$5.10 \pm 1.37^{2)}$	$7.30 \pm 2.41^{2)}$	$5.60 \pm 0.97^{2)}$

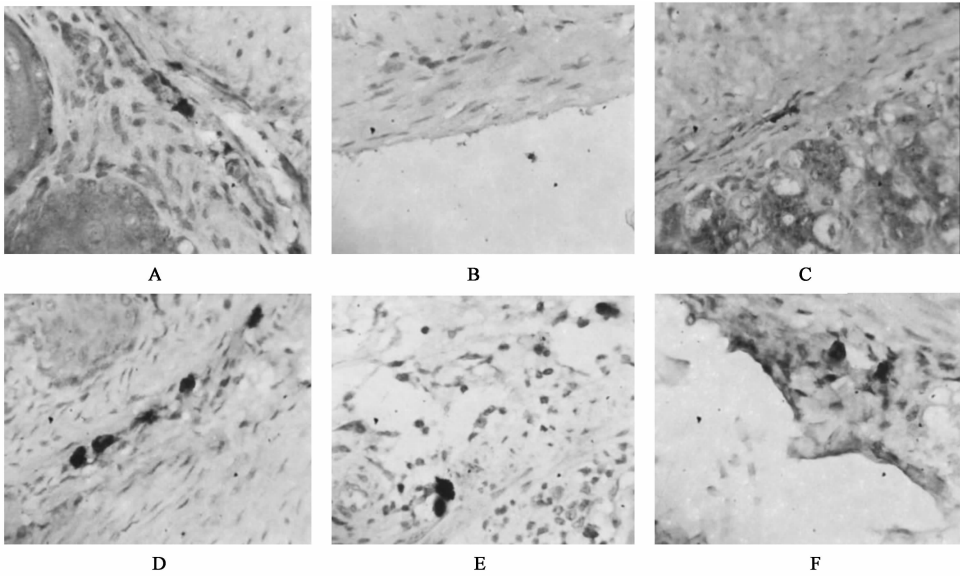


图 2 参术胶囊对模型小鼠 ERK1/2 表达的影响 (HE 染色, 400 ×)

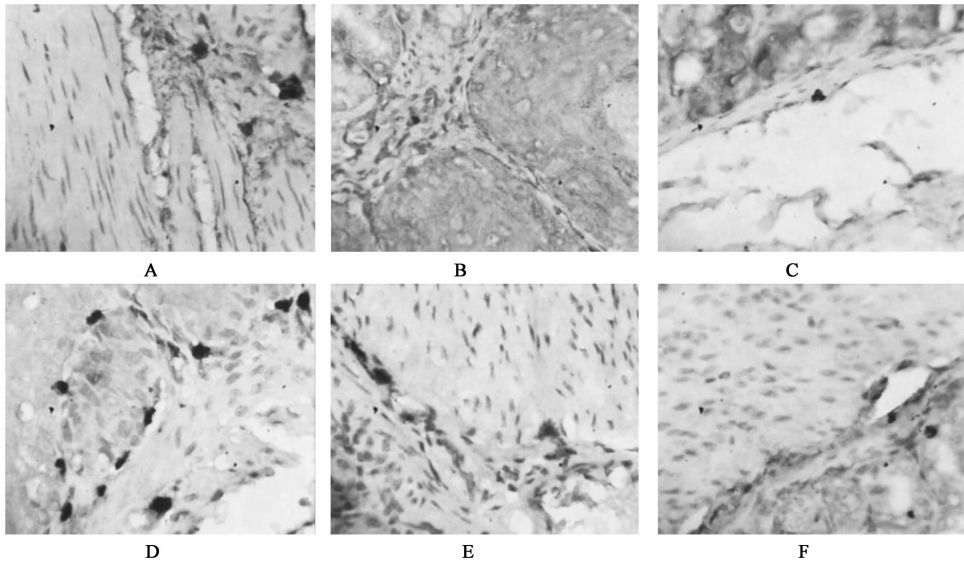


图 3 参术胶囊对模型小鼠 AP-1 表达的影响 (HE 染色, 400 ×)

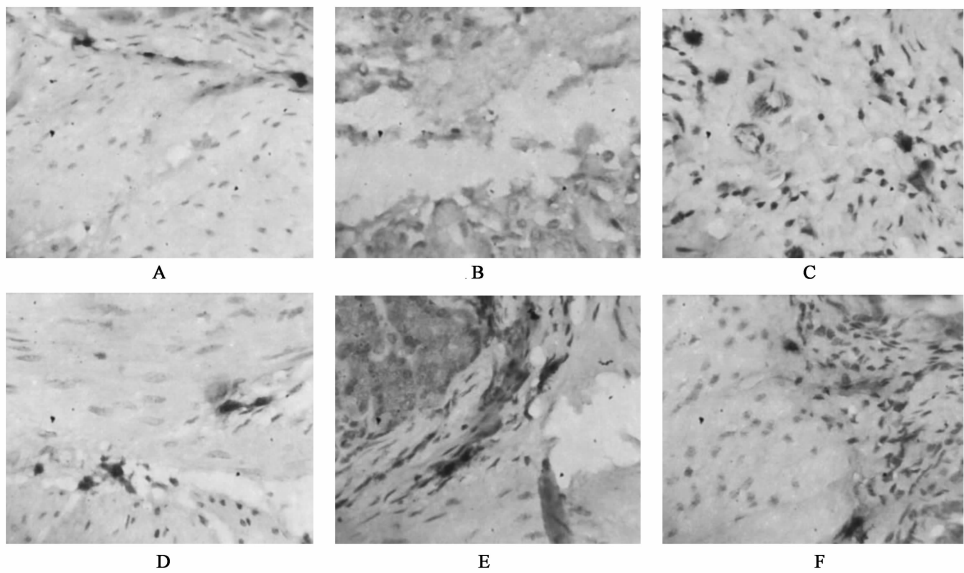


图 4 参术胶囊对模型小鼠 IL-2 表达的影响(HE 染色,400 ×)

4 讨论

胃癌是消化道常见恶性肿瘤,属传统医学“反胃”、“噎膈”、“癥瘕积聚”等范畴。中医药治疗胃癌具有毒副作用小,增强免疫功能的独特优势,从而使得中医药抗癌在当代有着很强的活力。中医药治疗可应用于各期胃癌患者以及胃癌治疗的各个阶段,尤其对于无法手术及放化疗的晚期患者,中医治疗作为主要的治疗手段,在胃癌的治疗中发挥着重要的作用。补气健脾法是各医家治疗胃癌的主要方法之一,是以提高机体细胞免疫功能为主,常用人参、白术、茯苓、生黄芪等中药^[12-14]。本研究结果提示了参术胶囊能改善诱发型脾虚胃癌小鼠模型病理改变,明显增强模型动物 ERK1/2, AP-1, IL-2 的表达,从而提高脾虚胃癌小鼠的免疫功能。

细胞因子是细胞间信号网络的重要成员之一,在机体免疫应答等诸多方面起着重要作用,IL-2 是机体免疫调节中的最重要的细胞因子,且反映机体细胞免疫功能状态^[15]。IL-2 是 T 细胞在体外长期生长所必需的因子,也是 TC 细胞成熟因子,它可促进已活化的 T 细胞增殖并分化成熟为效应 TD 细胞和 TC 细胞,诱导 T 细胞表面 IL-2R 的表达增加,并增强机体对肿瘤的免疫反应性,促进 T, B 细胞的增殖和分化,促进 NK 细胞增殖,增强单核巨噬细胞的杀伤能力。目前,IL-2 已被开发为临床肿瘤治疗药物,但是 IL-2 的剂量依赖性毒副作用限制了它在临床中的广泛应用。研究提示刺激内源性的 IL-2 的产生,能够改善患者的免疫紊乱的状态^[16],如能从细胞外刺激出发,增加内源性 IL-2 活性和数量,开

发安全、高效的肿瘤治疗药物,应具有较为广阔的前景。

从细胞外刺激作用于细胞,至细胞出现相应的生物学效应,须通过 MAPK 信号转导通路的三级激酶级联反应。细胞外调节蛋白激酶(ERK)包括 ERK1 和 ERK2,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键,其中 ERK1 和 ERK2 的相对分子质量分别为 44×10^3 , 42×10^3 。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 Ap-1 (c-fos 基因和 c-Jun 基因)的转录活化,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应^[17]。其中 AP-1 作为转录因子,具有多种生物活性,其中之一即过表达 c-fos 和 c-jun 能明显促进 T 细胞的活化,以及增强 IL-2 和其他多种细胞因子基因的表达^[18-19]。

本研究中,模型动物 IL-2 表达减弱,说明 IL-2 生成活性和数量均可能存在下降。而 HE 结果提示,模型组与空白组比较,其病理结果有极其显著性差异($P < 0.01$),且 15 个样本中出现 4 只胃癌,8 只胃癌癌前病变,表明模型组具有向胃癌发展的趋势,这与 IL-2 合成生成减少关系密切。而用药 30 d 后,各用药组和阳性组与模型组相比,一般状态好转,病理结果明显减轻($P < 0.05$),说明参术胶囊阻断了脾虚胃癌的发生。而各用药组和阳性组 IL-2 表达较模型组均出现增强,说明 IL-2 生成数量和活性有所上升,这从某种程度解释了参术胶囊阻断了胃癌发生的原因——IL-2 增多,从而增强机体对肿瘤的免疫反应性。IL-2 合成增多,可能是 MAPK 信号转

导通路作用的结果——即 ERK1/2 被激活,进而介导 Ap-1 (c-fos 和 c-Jun) 的转录活化,增强 IL-2 的表达。实验结果亦显示,模型动物 ERK1/2, Ap-1 较空白组表达减弱 ($P < 0.05$),各用药组和阳性组较模型组 ERK1/2, Ap-1 表达增强 ($P < 0.05$) 或出现增强趋势。说明参术胶囊作用后 IL-2 表达增强原因可能是 ERK1/2 表达增强,Ap-1 转录活化。

综上,参术胶囊阻断脾虚胃癌发生的机制可能与激活 MAPK 信号转导通路有关:即激活 ERK1/2,进而介导 Ap-1 (c-fos 和 c-Jun) 的转录活化,增强 IL-2 的表达。

[参考文献]

[1] 叶冰,彭成. 参术胶囊对脾虚胃癌转移鼠胃癌细胞形态影响的研究[J]. 实验动物科学与管理,2006,23(3):15.

[2] 敖慧,彭成,林代华,等. 参术胶囊治疗脾虚胃癌转移鼠模型的基因表达谱研究[J]. 云南中医学院学报,2010,33(1):7.

[3] 刘红春,王红霞,刘旺根. 黄芪建中汤抗大鼠脾气虚证实验研究[J]. 郑州大学学报:医学版,2004,39(2):316.

[4] 任杰红,陈林芳,张路哈. 人参皂苷 Rg₁ 的免疫促进作用[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(2):92.

[5] 但汉雄,刘翠霞,江南. 人参二醇苷对实验动物的免疫促进作用[J]. 湖北中医学院学报,2003,5(1):36.

[6] 曲婷婷,金岩,柳越冬,等. 人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 与 5-氟脲嘧啶对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中医研究,2006,19(5):16.

[7] 王庭富,孟正木. 人参皂苷 Rg₃ 对免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报,1999,30(2):133.

[8] 张才军,郭民,柳波,等. 人参皂苷 Rh₁ 对免疫功能降低小鼠的免疫调节作用研究[J]. 昆明医学院学报,

2009,30(11):51,58.

[9] Kim M H,Byon Y Y,Ko E J, et al. Immunomodulatory activity of ginsan, apolysaccharide of panax ginseng, ondendritic cells[J]. Koraen J Physiol Pharmacol,2009,13(3):169.

[10] 关晓辉,曲嫻,杨志萍,等. 白术挥发油对小鼠免疫功能的影响[J]. 北华大学学报:自然科学版,2001,2(2):122.

[11] 雷萍,关洪全,王昊,等. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):218.

[12] 王星,王三虎,郭华. 中药复方抗癌实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(6):71.

[13] 唐武军. 郁仁存老师治疗胃癌经验总结[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(8):69.

[14] 周滢,周梅,段恒. 中医药治疗胃癌的理论研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):284.

[15] 张然,岳永花,康永,等. 扶正固本颗粒联合化疗放疗对于荷瘤小鼠的免疫增强作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):137.

[16] 任周新,许前磊,李青雅,等. 薯蓣丸对 Friend 白血病病毒感染小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):191.

[17] Tan X,Egami H,Ishikawa S,et al. Relationship between the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the dissociation of pancreatic cancer cells: Involvement of ERK1/2 in the dissociation status of cancer ceils[J]. Int J Oncol,2004,24(4):815.

[18] 何庆南,易著文. 转录因子 AP-1 的研究进展[J]. 国外医学:儿科学分册,1999,26(3):152.

[19] Shaulian E. Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death[J]. Nat Cell Biol,2002,4(5):E131.

[责任编辑 古云侠]