

基于MCT4/CD147探讨四君子汤加减改善酸性微环境 逆转胃癌前病变的效应机制

喻俊榕, 郝彦伟, 程敬, 王钧冬, 陈玉, 曾进浩*, 张怡*
(成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

[摘要] 目的:观察四君子汤加减治疗胃癌前病变(GPL)模型大鼠胃黏膜乳酸水平及单羧酸转运蛋白1(MCT1),单羧酸转运蛋白4(MCT4)和细胞外基质金属蛋白酶诱导物(CD147)表达的影响。方法:将74只SD雄性大鼠随机分为正常组12只,造模组62只。采用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)-氨水复合造模法诱导制作GPL大鼠模型,于第9周将造模组大鼠随机分为模型组,叶酸组(2.7 mg·kg⁻¹),四君子汤加减高、中、低剂量组(12.6, 6.3, 3.15 g·kg⁻¹),每组12只,灌胃治疗持续12周,观察大鼠一般情况。采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠胃黏膜组织病理学改变;化学比色法检测胃黏膜组织乳酸含量;免疫组化和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测胃黏膜组织MCT1, MCT4, CD147蛋白和mRNA表达。结果:四君子汤加减可显著改善GPL大鼠胃黏膜上皮腺体结构、排列紊乱和细胞异型性等病理表现。与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜组织乳酸含量显著升高($P<0.01$), MCT1, MCT4, CD147蛋白与mRNA表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,四君子汤加减各剂量组乳酸含量均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),四君子汤加减高、中、低剂量组MCT4和CD147蛋白表达均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),四君子汤加减高、中剂量组MCT4 mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),四君子汤加减高剂量组CD147 mRNA表达明显降低($P<0.05$)。四君子汤加减对MCT1无显著调控作用。结论:四君子汤加减可显著改善GPL模型大鼠胃黏膜上皮异常组织病理学表现,其机制可能与下调MCT4和CD147过度表达,抑制乳酸外流,改善胃黏膜上皮酸性微环境有关。

[关键词] 胃癌前病变; 四君子汤加减; 单羧酸转运蛋白1(MCT1); 单羧酸转运蛋白4(MCT4); 细胞外基质金属蛋白酶诱导物(CD147)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)06-0030-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210223

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201118.1601.002.html>

[网络出版日期] 2020-11-18 16:13

Explore Mechanism of Modified Si Junzitang in Improving Acidic Microenvironment and Reversing Gastric Precancerous Lesions Based on MCT4/CD147

YU Jun-rong, HAO Yan-wei, CHENG Jing, WANG Jun-dong, CHEN Yu, ZENG Jin-hao*, ZHANG Yi*
(Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Si Junzitang on the level of lactic acid in gastric mucosa and the expression of Carboxylic acid transporter 1 (MCT1), monocarboxylic acid transporter 4 (MCT4), and extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in rats with gastric precancerous lesions (GPL). **Method:** Seventy-four SD male rats were randomly divided into normal group (12 rats) and model group (62 rats). N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-ammonia compound method was used to establish GPL rat models, and at the 9th week, the model rats were randomly divided into model group, folic

[收稿日期] 20200910(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81804066, 81904178);成都中医药大学杏林学者项目(QNXZ2019017);成都中医药大学附属医院科学发展基金及“百人计划”项目(19TS03, 20-Q03, 20-Q05, 20-L01)

[第一作者] 喻俊榕, 在读硕士, 从事中医脾胃系病证的实验与研究, E-mail: 1515098466@qq.com

[通信作者] * 曾进浩, 博士, 讲师, 从事中医脾胃系疾病的防治与研究, E-mail: zengjinhao0018@126.com;

* 张怡, 教授, 硕士生导师, 从事中医脾胃系疾病的防治与研究, E-mail: zhangyi2288@163.com

acid group($2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), modified Si Junzitang high, medium and low dose groups($12.6, 6.3, 3.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 12 rats in each group. After intragastric administration for 12 weeks, the general conditions of the rats were observed. Hematoxylin-eosin(HE)staining was used to observe the histopathological changes of gastric mucosa in rats, chemical colorimetry was used to detect the content of lactic acid in gastric mucosa; immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction(Real-time PCR) were used to detect MCT1, MCT4, CD147 protein and mRNA expression in gastric mucosal tissues. **Result:** Modified Si Junzitang significantly improved the pathological manifestations in GPL rats such as gastric mucosal epithelial gland structure, disorder of arrangement and cell atypia. Compared with the normal group, the lactic acid content of the gastric mucosa tissue in the model group increased significantly ($P<0.01$), and the protein and mRNA expressions of MCT1, MCT4, CD147 significantly increased ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the model group, the lactic acid content in each dose group of modified Si Junzitang was significantly reduced($P<0.05, P<0.01$), and the protein expression levels of MCT4 and CD147 were also significantly reduced in each dose group of modified Si Junzitang($P<0.05, P<0.01$). The mRNA expression of MCT4 was significantly reduced in the middle and high dose groups($P<0.05, P<0.01$), and the mRNA expression of CD147 was significantly reduced in the high dose group ($P<0.05$). Modified Si Junzitang showed no significant regulatory effect on MCT1. **Conclusion:** Modified Si Junzitang can significantly improve the abnormal histopathology of gastric mucosal epithelium in GPL model rats. Its mechanism may be related to down-regulating the overexpression of MCT4 and CD147, inhibiting lactic acid outflow, and improving the acidic microenvironment of gastric mucosal epithelium.

[Key words] gastric precancerous lesions; modified Si Junzitang; monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1); monocarboxylic acid transporter 4 (MCT4); extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147)

胃癌前病变(GPL)指在慢性萎缩性胃炎伴见肠上皮化生和异型增生,具有癌变倾向。GPL患者罹患胃癌(GC)的危险率较常人明显上升^[1]。GPL早期干预治疗是降低GC发病率的关键措施。目前西医在逆转GPL治疗方面缺乏特异性,主要为根除幽门螺杆菌(HP),应用非甾体类药物和环氧化酶-2(COX-2)抑制剂,补充维生素类及对症用药等^[2]。中医药运用辨证论治、专病专方等方法治疗本病,疗效明显,具有靶点多、复发率低、安全性良好等优势^[3]。

肿瘤细胞依赖有氧糖酵解供给自身能量,持续的高糖酵解率导致乳酸生成大量增加,胞内pH降低,为避免酸中毒引起细胞凋亡必须输出乳酸。单羧酸转运蛋白(MCTs)主要介导乳酸等单羧酸类物质的跨膜转运,是细胞内外pH调节的关键因子,包含14个成员,其中单羧酸转运蛋白1(MCT1)和单羧酸转运蛋白4(MCT4)是乳酸转运的关键载体^[4],并被证实与多种肿瘤的发生发展密切相关^[5-7]。细胞外基质金属蛋白酶诱导物(CD147)是一种高度糖基化并广泛表达于人体组织的跨膜糖蛋白,作为MCT1, MCT4的伴侣蛋白协同转运乳酸^[8]。研究表

明,抑制MCT1, MCT4和CD147的过度表达,调控乳酸转运,改善酸性微环境是治疗肿瘤的潜在靶点^[9]。GPL脾胃虚弱为本,瘀阻胃络为标的基本病机,得到大部分中医学者的广泛认同^[10-11],临床常用四君子汤加味,疗效显著^[12-13]。四君子汤加减作为成都中医药大学附属医院消化科协定处方且已运用多年,但其治疗GPL的具体机制尚不明确。本研究通过观察四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜组织乳酸含量及MCT1, MCT4, CD147蛋白和mRNA表达的影响,旨在揭示四君子汤加减通过改善酸性微环境,逆转大鼠GPL的效应机制。

1 材料

1.1 动物 74只SPF级SD雄性大鼠,鼠龄7~8周,体质量(190 ± 10)g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号SCXK(川)2020-030。饲养于成都中医药大学中医脏腑病证实验室,光照时间(12 h/12 h),室温维持(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度维持(50%~70%)。本研究动物实验获成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,审核备案编号2019-17。

1.2 药物 四君子汤加减由南沙参12 g,制枳壳18 g,茯苓15 g,莪术8 g,麸炒白术12 g,羌活鱼5 g

组成。所有饮片均购自广州至信药业股份有限公司,经成都中医药大学药学院中药资源与鉴定系陈江副教授鉴定。取10倍量的纯净水浸泡中药材30 min,分3次煎煮,头煎武火煮沸后转文火煎煮20 min,二煎和三煎25 min,将3次药液过滤后浓缩为 $3\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,羌活鱼研粉末冲服。叶酸(常州制药有限公司,批号H32023302)。

1.3 试剂 MCT1, CD147抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab90582, ab232991); MCT4抗体(美国Proteintech公司,批号22787-1-AP); *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG, 日本东京化成工业株式会社,批号CFFC-M0527-5G); DAB显色剂, 苏木素染液, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1211, G1004, GB23303); 乳酸(LD)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号A019-2); 伊红染液(国药集团化学试剂有限公司,批号71014544); RNA提取液, First Strand cDNA Synthesis Kit, 2 \times SYBR Green qPCR Master Mix(High ROX)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G3013, G3330, G3322)。

1.4 仪器 RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司); Epoch型酶标检测仪(美国BioTek公司); Stepone plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司); Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(麦克奥迪仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 大鼠适应性饲养1周,采用随机数字表法将74只SD雄性大鼠分为正常组12只,造模组62只。实验采用MNNG-氨水复合造模法诱导制作GPL大鼠模型^[14],给予造模组大鼠0.1%氨水溶液自由饮用, $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG溶液灌胃,每周禁食2次,每次24 h(不禁饮)。第8周末从造模组中随机选择2只处死,取胃体-窦交界处胃黏膜,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下确认早期GPL黏膜肠上皮化生病变^[15]。随后将造模组大鼠随机分为模型组,叶酸组,四君子汤加减高、中、低剂量组,每组各12只。除正常组外均继续给予0.1%氨水溶液自由饮用和 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MNNG溶液灌胃。

2.2 给药方法 从第9周开始灌胃给药治疗,剂量相当于成人临床等效剂量(根据体表面积比率换算)^[16],四君子汤加减高、中、低剂量组分别按12.6, 6.3, $3.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,叶酸组将叶酸片研碎成粉末,

制成混悬液以 $2.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃。模型组和给药组均予 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ MNNG溶液灌胃,正常组予等量生理盐水灌胃,持续12周。

2.3 标本采集与处理 第20周结束后,禁食,不禁水24 h,用20%戊巴比妥钠($2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,分离血清,提取上清液,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。大鼠取仰卧位固定于解剖板,沿腹中线剪开,充分暴露腹腔,分离胃组织并置于冰盘上,沿胃大弯剪开,用生理盐水冲洗干净,取胃体-窦交界处黏膜组织2块,置于4%多聚甲醛固定液中,常温保存。其余新鲜胃黏膜组织于冰台上分切为 $0.3\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 大小,立即放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.4 HE染色观察胃黏膜组织病理学改变 胃黏膜组织于4%多聚甲醛中固定液中固定24 h,进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切片 $5\sim 6\text{ }\mu\text{m}$, HE染色,于光镜下观察大鼠胃黏膜组织病理学改变。

2.5 化学比色法检测乳酸含量 胃黏膜组织按质量(mg)-体积(μL)1:9,加入9倍于体积的匀浆介质,冰浴后机械匀浆,制备匀浆液, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液检测,具体操作按试剂盒说明书进行。

2.6 免疫组化检测MCT1, MCT4, CD147蛋白的表达 取胃黏膜组织,石蜡包埋切片,经二甲苯脱蜡、不同浓度乙醇水化后用蒸馏水浸洗3次,3 min/次;抗原热修复后置于磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤3次,5 min/次;阻断内源性过氧化物酶,室温避光孵育25 min, PBS洗涤;滴加3%BSA覆盖组织,室温封闭30 min;滴加一抗(1:100),切片置于湿盒内 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS洗涤后滴加二抗,室温孵育50 min; PBS洗涤甩干后,滴加新鲜配制的DAB显色液,控制显色时间,自来水冲洗以终止显色;复染细胞核后置于梯度乙醇中脱水、二甲苯透明和中性树胶封片;显微镜镜检,以棕黄色颗粒为阳性表达。在200倍光镜下随机选取3个视野进行观察,采用Image-Pro Plus 6.0软件统计分析每张切片阳性染色部分的平均积分吸光度 AA 。

2.7 Real-time PCR检测MCT1, MCT4, CD147 mRNA的表达 胃黏膜组织经trizol试剂制成匀浆液,按照常规方法提取总RNA。PCR管依次加入RNA溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 和oligo(dT) $18\text{ }\mu\text{L}$,于PCR仪 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置5 min,待冷却后依次滴加 $5\times$ reaction buffer $4\text{ }\mu\text{L}$, dNTP Mix $2\text{ }\mu\text{L}$, RiboLock RNAase抑

制剂 1 μL 和 revertAi M-muLV 逆转录酶 1 μL, 混匀后灭活反转录酶。配制 PCR 反应体系: 2×qPCR Mix 10 μL, 2.5 μmol·L⁻¹ 基因引物 2 μL, 反转录产物 2 μL, ddH₂O 6 μL, 进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 溶解曲线 60 °C, 95 °C 每 15 s 升温 0.3 °C, 共循环 40 次。采用 2^{-ΔΔC_t} 表示 mRNA 相对表达量。引物设计与合成委托武汉赛维尔生物科技有限公司完成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
MCT1	上游 TCTGTAACACGGTGCAGGAACT	295
	下游 CCTTGCTGAGGCCCTATTGG	
MCT4	上游 AAGGTGCGGCCCTACTCTGT	269
	下游 AGCAGCTTGCTCCTGATGG	
CD147	上游 TGGACATGAACGTGGACCC	273
	下游 GGCACATTCTTGTCCTTG	

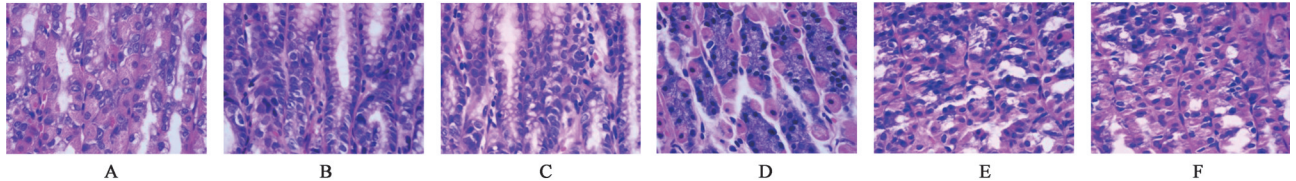
2.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行实验数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 Turkey 法, 方差

不齐时采用 Dunnett T3 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 正常组大鼠精神状态良好, 毛色光泽, 无明显脱毛, 体质量、饮水及进食量正常, 大便成形。造模组大鼠精神萎靡, 喜蜷缩, 毛色偏黄且无光泽, 脱毛严重, 体质量明显偏低, 饮水与进食量减少, 大便稀溏不成形。经治疗后叶酸组、四君子汤加减各剂量组一般情况均有不同程度改善。实验结束前模型组死亡 2 只, 四君子汤加减中剂量组死亡 1 只, 解剖后其中 2 只胃腔胀气明显, 考虑为不耐受氨水复合 MNNG 溶液造模所致, 1 只食管和胃部有机械性创伤, 考虑为灌胃手法不当所致。

3.2 对 GPL 大鼠胃黏膜组织病理学的影响 正常组胃黏膜上皮细胞排列整齐, 腺体结构完整、形状规则、边界清晰, 细胞核大小均一, 呈椭圆形, 核仁明显, 核浆比正常。模型组胃黏膜上皮腺体结构、排列紊乱, 可见复层及背靠背改变, 存在核深染、增大, 核浆比增加, 细胞核极性明显减弱, 可见核分裂增加。叶酸组及四君子汤加减组大鼠胃黏膜上皮腺体结构较完整, 排列相对整齐, 少见复层及背靠背改变, 细胞异型性表现均有不同程度改善。以四君子汤加减高剂量组的改善最为明显。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 叶酸组; D~F. 四君子汤加减低、中、高剂量组(图 2~4 同)

图 1 四君子汤加减对 GPL 大鼠胃黏膜组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Si Junzhitang on gastric mucosa of GPL rats (HE, ×200)

3.3 对 GPL 大鼠胃黏膜组织乳酸含量的影响 与正常组比较, 模型组乳酸含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 四君子汤加减各剂量组和叶酸组乳酸含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.4 对 GPL 大鼠胃黏膜 MCT1, MCT4, CD147 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 MCT1, MCT4, CD147 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 四君子汤加减各剂量组和叶酸组 MCT4, CD147 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 叶酸组 MCT1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2~4, 表 3。

3.5 对 GPL 大鼠胃黏膜 MCT1, MCT4, CD147 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 MCT1,

表 2 四君子汤加减对 GPL 大鼠胃黏膜组织乳酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of modified Si Junzhitang on content of lactic acid in gastric mucosa of GPL rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	乳酸/mmol·g ⁻¹
正常		0.245±0.069
模型		0.509±0.116 ²⁾
四君子汤加减	12.6	0.294±0.074 ⁴⁾
	6.3	0.350±0.078 ³⁾
	3.15	0.367±0.081 ³⁾
叶酸	0.002 7	0.344±0.052 ³⁾

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 3, 4 同)。

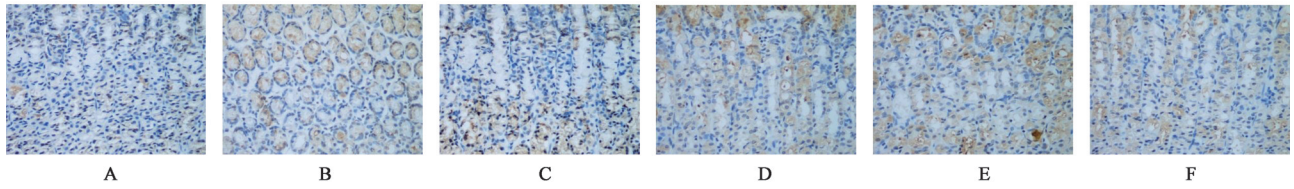


图2 四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜组织MCT1蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 2 Effect of modified Si Junzitang on expression of MCT1 in gastric mucosa of GPL rats (IHC, ×200)

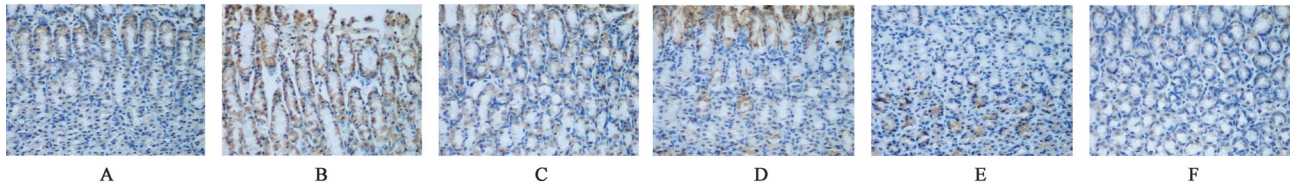


图3 四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜组织MCT4蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of modified Si Junzitang on expression of MCT4 in gastric mucosa of GPL rats (IHC, ×200)

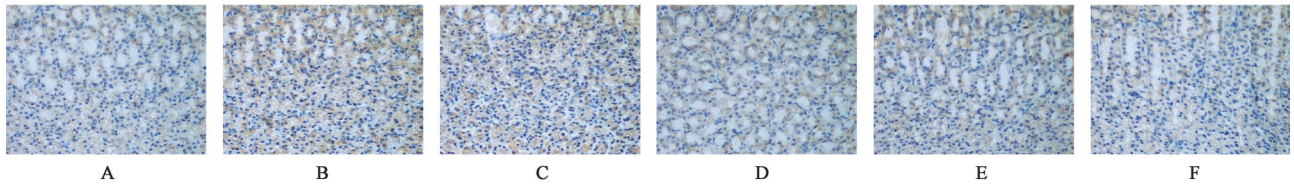


图4 四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜组织CD147蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of modified Si Junzitang on expression of CD147 in gastric mucosa of GPL rats (IHC, ×200)

表3 四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜MCT1, MCT4, CD147蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of modified Si Junzitang on protein expression of MCT1, MCT4 and CD147 in gastric mucosa of GPL rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MCT1	MCT4	CD147
正常		1.066±1.055	1.485±0.525	2.271±0.685
模型		11.557±1.939 ²⁾	24.273±3.128 ²⁾	13.208±3.260 ²⁾
四君子汤加减	12.6	10.239±1.511	8.068±2.238 ⁴⁾	5.799±1.801 ⁴⁾
	6.3	10.046±2.157	9.380±2.118 ⁴⁾	7.406±1.831 ⁴⁾
	3.15	10.116±2.373	11.733±3.272 ⁴⁾	8.885±1.313 ³⁾
叶酸	0.002 7	8.741±1.469 ³⁾	14.336±1.767 ⁴⁾	8.998±1.218 ³⁾

MCT4和CD147 mRNA表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,四君子汤加减高、中剂量组和叶酸组MCT4 mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<$

0.01);四君子汤加减高剂量组CD147 mRNA表达明显降低($P<0.05$);叶酸组MCT1 mRNA表达明显降低($P<0.05$)。见表4。

表4 四君子汤加减对GPL大鼠胃黏膜MCT1, MCT4, CD147 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of modified Si Junzitang on mRNA expression of MCT1, MCT4 and CD147 in gastric mucosa of GPL rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MCT1	MCT4	CD147
正常		1.000±0.252	1.000±0.152	1.000±0.219
模型		3.043±0.800 ¹⁾	1.948±0.329 ²⁾	2.462±0.564 ²⁾
四君子汤加减	12.6	2.392±1.013	1.002±0.168 ⁴⁾	1.187±0.182 ³⁾
	6.3	2.455±0.934	1.284±0.218 ³⁾	1.422±0.432
	3.15	2.401±1.041	1.480±0.215	1.538±0.375
叶酸	0.002 7	1.572±0.421 ³⁾	1.326±0.110 ³⁾	1.615±0.161

4 讨论

中医学将 GPL 归属“痞满”“胃脘痛”范畴,认为病久伤正,脾运不及,胃阴耗伤,迁延日久,传经入络,由气入血,瘀而阻络,故以气阴两亏为本,瘀阻胃络为标^[17]。临床研究证实,中医病证结合治疗 GPL 具有独特优势,能有效改善患者临床症状和阻断 GPL 胃黏膜恶性转化^[18]。四君子汤加减由南沙参、茯苓、莪术、炒白术、制枳壳、羌活鱼组成,具有益气养阴、化痰通络之效。方中南沙参性微寒而味甘,有气阴双补之功,是为君药;茯苓、炒白术健脾益气,共助南沙参益气养阴,而无伤津耗液之弊;莪术化痰通络,辅以枳壳理气宽中,行滞消胀,羌活鱼行气止痛,三药相合,共奏化痰通络行滞之功。现代药理研究显示,南沙参、茯苓、枳壳均具有调节免疫、抗肿瘤活性,抑制肿瘤细胞增殖、转移的作用^[19-21];莪术醇能多靶点诱导胃癌细胞凋亡^[22];白术具有促进胃黏膜上皮细胞再生、抗炎、抗肿瘤的作用^[23]。全方温清并用,邪正兼顾,恰合 GPL“虚”和“瘀”的病机特点。本研究中,HE 染色可见模型组大鼠胃黏膜上皮腺体结构、排列紊乱,可见复层及背靠背改变,存在核深染、增大,可见核分裂增加,成功复制了 GPL 大鼠模型。经四君子汤加减治疗后,大鼠胃黏膜上皮腺体结构排列紊乱、复层及背靠背现象等病理表现均有不同程度改善,说明四君子汤加减可有效阻断或部分逆转 GPL 胃黏膜恶变。

肿瘤细胞的增殖是一个能量消耗的过程,主要依赖有氧糖酵解途径供能,即“Warburg 效应”^[24]。高糖酵解率导致乳酸大量生成不仅形成酸性微环境,同时还作为氧化代谢燃料和信号转导因子,抑制抗肿瘤活性,促进肿瘤细胞侵袭和免疫逃逸^[25-26]。因此,调控有氧糖酵解通路,减少乳酸生成可能是肿瘤潜在的治疗靶点。研究证实,乳酸参与多种实体肿瘤的增殖,并与其预后密切相关^[27-28],检测胃癌患者的胃黏膜组织乳酸水平有利于其早期诊断^[29]。本实验中,模型组大鼠胃黏膜组织乳酸水平较正常组明显升高,提示 GPL 大鼠胃黏膜上皮乳酸生成过多形成酸性微环境;经四君子汤加减治疗后的 GPL 大鼠乳酸水平均显著下降,说明四君子汤加减可降低乳酸含量并改善酸性微环境。

MCT1, MCT4 作为关键乳酸/质子转运体,是肿瘤细胞中表达最广泛的 MCT 亚型。其中 MCT1 主要介导氧合细胞摄取乳酸, MCT4 促进糖酵解细胞释放乳酸,并在糖酵解/缺氧细胞中优先表达^[30]。为适应乳酸高产生率,避免细胞酸中毒、凋亡, MCT 常

在肿瘤细胞中过度表达。CD147 作为 MCT1, MCT4 的辅助蛋白,负责协同转运乳酸,促进 MCT1, MCT4 的膜表达,而 CD147 的表达同样取决于 MCT1, MCT4, 三者之间相互作用密切。研究证实,相较于正常胃组织, MCT1, MCT4 和 CD147 在胃癌组织中表达上调,其中 MCT1 和 MCT4 的表达水平与肿瘤的恶性程度及预后呈正相关, CD147 的表达可为判断胃癌预后独立的生物学标志物^[31-32]。本实验显示, MCT1, MCT4 和 CD147 mRNA 及蛋白表达在 GPL 模型大鼠均升高,而四君子汤加减能下调 GPL 模型大鼠 MCT4, CD147 的表达水平,与其抑制乳酸外流、改善酸性微环境有关,降低肿瘤细胞增殖速度和诱导细胞死亡,起到防治胃癌的作用。

本实验发现四君子汤加减对 MCT1 无明显的调控作用,分析其原因可能为① GPL 为慢性疾病,需长期治疗,可能存在治疗周期不足,实验样本量较少的原因;②在煎煮过程中复方有效成分挥发,可能产生新的药效成分,或存在功效强但药效成分含量低的情况^[33];③四君子汤加减是中药复方,药理成分复杂,具有多靶点、多途径特点,而 MCT1 可能不是四君子汤加减治疗 GPL 的作用靶点。此外,肿瘤细胞各代谢通路之间的联系错综复杂^[34],故对于四君子汤加减调控有氧糖酵解及乳酸代谢还需进一步实验研究。

综上所述,四君子汤加减可改善 GPL 大鼠胃黏膜上皮腺体结构、排列紊乱和细胞异型性等病理表现,其机制可能与其下调 MCT4 和 CD147 过度表达,抑制乳酸外流,改善胃黏膜上皮酸性微环境有关。本研究为进一步探索 GPL 的发病机制提供了实验依据,后续还需完善糖酵解通路中的相关指标检测,增加样本量进行深入研究,为四君子汤加减治疗 GPL 提供更多有效的理论依据和实验基础。

[参考文献]

- [1] 周晔祿, 杨志宏. 沈舒文辨治胃癌前病变临床经验采撷[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(6): 1-4, 29.
- [2] 华秋雯. 石丹颗粒对胃癌前病变的疗效评价及基于 NF- κ B 信号通路的作用机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [3] 魏玮, 杨洋, 史海霞. 慢性萎缩性胃炎中医诊疗现状、挑战及展望[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1424-1426.
- [4] 张永欣, 张璐. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈筛查中的意义[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(7): 816-818, 830.

- [5] KONG S C, NØHR-NIELSEN A, ZEEBERG K, et al. Monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 regulate migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Pancreas*, 2016, 45 (7) : 1036-1047.
- [6] PINHEIRO C, ALBERGARIA A, PAREDES J, et al. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma [J]. *Histopathology*, 2010, 56 (7):860-867.
- [7] DE OLIVEIRA A T, PINHEIRO C, LONGATTO-FILHO A, et al. Co-expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its chaperone (CD147) is associated with low survival in patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs) [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(1):171-178.
- [8] 汪婷婷, 何永文. 单羧酸转运蛋白家族介导乳酸转运在肿瘤发生发展中的作用[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(7):354-358.
- [9] CHEN L, PAN Y, GU L, et al. ERK1/2 signalling pathway is involved in CD147-mediated gastric cancer cell line SGC7901 proliferation and invasion [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(8):903-912.
- [10] 赵彦, 郑彩华. 郭光业治疗慢性萎缩性胃炎经验[J]. *河北中医*, 2014, 36(4):490-491.
- [11] 燕东. 姚乃礼教授治疗脾胃病学术思想及慢性胃炎辨治经验的临床研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2016.
- [12] 郭占芳. 四君子汤加味治疗胃癌前病变疗效分析[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(4):41.
- [13] 孙方园. 脾胃虚弱证胃癌患者术前使用四君子汤对肠内营养疗效的观察[D]. 太原:山西中医药大学, 2017.
- [14] 陈泽慧, 魏玥, 安静, 等. 慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变大鼠造模方法的文献研究[J]. *天津中医药*, 2019, 36(9):850-855.
- [15] 蔡甜甜. 胃痞消对MNNG诱导的胃癌前病变大鼠胃黏膜损伤的保护作用研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2018.
- [16] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:18.
- [17] 王丽华, 单兆伟. 单兆伟慢性萎缩性胃炎诊疗经验浅探[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(6):1194-1195.
- [18] 莫喜晶, 韦春回, 陈国忠. 中医药治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变疗效的系统评价[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(5):840-846.
- [19] 张小倩. 南沙参多糖的提取、降解优化及其单糖组成分析[D]. 保定:河北大学, 2014.
- [20] 张年, 李兆星, 李娟, 等. 茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(2):220-233.
- [21] 李陈雪, 杨玉赫, 冷德生, 等. 枳壳化学成分及药理作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(2):158-161.
- [22] 张弘, 张连荣, 姜海军, 等. 莪术醇对胃癌SGC7901细胞凋亡及AIF、Endo G表达的影响[J]. *肿瘤学杂志*, 2015, 21(9):703-707.
- [23] 凌汶静. 常用抗肿瘤中药的临床应用与规律探讨[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [24] KORNBERG M D. The immunologic Warburg effect: evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2020, 12(5):e1486.
- [25] DANG C V. Links between metabolism and cancer [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(9):877-890.
- [26] KENNEDY K M, DEWHIRST M W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation [J]. *Future Oncol*, 2010, 6(1):127-148.
- [27] 任筱璐. mTOR通过上调糖酵解关键酶LDHA的表达影响肺腺癌增殖及转移的研究[D]. 太原:山西医科大学, 2020.
- [28] 尉浩斌. 肿瘤患者肠屏障功能临床影响因素分析[D]. 新乡:新乡医学院, 2020.
- [29] ZHANG H, CUI L, LIU W, et al. 1H NMR metabolic profiling of gastric cancer patients with lymph node metastasis [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(4):1-13.
- [30] 张宝月, 瞿全新, 顾安康. CD147、MCT1及MCT4在宫颈病变中的表达及临床意义[J]. *国际妇产科学杂志*, 2015, 42(2):194-196.
- [31] CAO Y W, LIU Y, DONG Z, et al. Monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 are independent prognostic biomarkers for the survival of patients with clear cell renal cell carcinoma and those receiving therapy targeting angiogenesis [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(6):e15-e25.
- [32] HU C, DONG X, WU J, et al. CD147 overexpression may serve as a promising diagnostic and prognostic marker for gastric cancer: evidence from original research and literature [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19):30888-30899.
- [33] 张王宁, 李爱平, 李科, 等. 中药药效物质基础研究方法进展[J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(10):761-764.
- [34] 王相宜, 张锦, 李燕, 等. 肿瘤代谢调控与肿瘤免疫治疗以及代谢分析方法研究进展[J]. *药学报*, 2020, 55(9):2080-2091.

[责任编辑 张丰丰]