

· 中药药理 ·

健脾清化舒络中药对慢性萎缩性胃炎大鼠 Sonic Hedgehog 信号通路的影响*

李思汉¹ 林秀明² 田琳² 李明珠¹ 黄铭涵^{2#}

(1 广州中医药大学基础医学院 广东 510006; 2 福建中医药大学附属第二人民医院)

摘要:目的 探讨健脾清化舒络中药对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 Sonic Hedgehog 信号通路的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 59 只,随机分为空白对照组 16 只、造模组 43 只,采用复合造模法进行病证结合 CAG 模型构建,期间随机抽取造模组大鼠 3 只验证 CAG 造模是否成功。造模成功后,予健脾清化舒络中药(复方胃炎合剂)进行相关干预。具体干预方案为:将空白对照组随机分为空白组、健脾清化舒络中药高剂量[61.04 g/(kg·d)]空白组,造模组随机分为 CAG 模型组、维酶素[0.2 g/(kg·d)]组和健脾清化舒络中药低、中、高剂量[15.26、30.52、61.04 g/(kg·d)]组,每组 8 只,给予相应药物连续干预 4 周。检测大鼠胃组织 Shh、Ptch1、Smo、Gli1、Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达水平及血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、胃泌素(GAS)含量。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠 Shh、Ptch1、Smo、Gli1 蛋白表达及血清 GAS 水平降低,Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达及血清 IL-1 β 水平上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。与 CAG 模型组比较,健脾清化舒络中药低、中、高剂量组胃黏膜病变显著改善,Shh、Ptch1、Smo、Gli1 蛋白表达上调,Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达下调,血清 IL-1 β 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),健脾清化舒络中药中、高剂量组血清 GAS 水平上升($P < 0.05$)。**结论** 健脾清化舒络中药可有效改善 CAG 大鼠胃黏膜组织病理改变,其机制可能与调控血清 IL-1 β 、GAS 含量,重新激活下游 Sonic Hedgehog 信号通路的表达有关。

关键词:慢性萎缩性胃炎;健脾清化舒络中药;Sonic Hedgehog 信号通路;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.02.009

中图分类号:R285.5

Effect of spleen-fortifying, fire-clearing and collateral-unblocking medicinals on Sonic Hedgehog signaling pathway in rats with chronic atrophic gastritis*

Li Sihan¹, Lin Xiuming², Tian Lin², Li Mingzhu¹, Huang Minghan^{2#}

(1 School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China; 2 The Second People's Hospital of Fujian Province Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350003, China)

Abstract: Objective To explore the effect of spleen-fortifying, fire-clearing and collateral-unblocking (SFC) medicinals on Sonic Hedgehog signal pathway in rats with chronic atrophic gastritis (CAG).

Methods 59 male wistar rats were randomly divided into the control group ($n = 16$) and model group ($n = 43$). The CAG model was established by comprehensive modeling method. After that, 3 rats in the model group were randomly selected for gastric pathological examination. After the model was successfully established, the compound gastritis mixture (under the guidance of the SFC method) was given as a

李思汉,男,在读博士生

通信作者:黄铭涵,男,硕士,副主任医师,硕士生导师,主要研究方向:慢性萎缩性胃炎的临床与基础研究,E-mail:huangminghan2010@163.com

* 福建省自然科学基金项目(No. 2017J01305),福建省中医药科研课题项目(No. 2017FJZYJC206),福建省卫健委中青年骨干人才培养项目(No. 2019-ZQN-79),福建中医药大学中医脾胃优势学科开放课题项目(No. X2019014-学科)

representative drug for relevant intervention. Specifically, the control group was randomly divided into blank group, blank + high dose SFC group, while the model group was randomly divided into CAG group, Vitacoenzyme group, low dose, medium dose and high dose SFC groups ($n = 8$). The corresponding drugs were given continuously for 4 weeks. At last, the protein expression levels of Shh, Ptch1, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 and Sufu in gastric tissue and the concentration of IL-1 β and GAS in serum were measured. **Results** In the model group, the expression of Shh, Ptch1, Smo, Gli1 protein and the level of serum GAS decreased, while the expression of Gli2, Gli3, Sufu protein and the level of serum IL-1 β increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the CAG group, the pathological changes of gastric mucosa in the low, middle and high dose SFC groups were significantly improved, the expression of Shh, Ptch1, Smo and Gli1 protein increased, and the expression of Gli2, Gli3, Sufu protein and the level of serum IL-1 β decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The level of serum GAS in middle and high dose SFC groups increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** SFC method could possibly improve the pathological changes of CAG in rats, and its mechanism may be related to improving the contents of serum IL-1 β and GAS and reactivating the expression of Sonic Hedgehog signal pathway.

Keywords: chronic atrophic gastritis; spleen-fortifying, fire-clearing and collateral-unblocking (SFC) medicinals; Sonic Hedgehog signal pathway; rats

Corresponding author: Huang Minghan, Associate Chief Physician, Master's Supervisor. The Second People's Hospital of Fujian Province Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, No. 282, Wusi Road, Gulou District, Fuzhou 350003. E-mail: huangminghan2010@163.com

Funding: The Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01305); Traditional Chinese Medicine Research Project of Fujian Province (No. 2017FJZYJC206); Provincial Key Youth Talent Training Project of Fujian Health Commission (No. 2019-ZQN-79)

Ethical review: Institutional Animal Ethics Committee of the Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (No. FJPSPH-IAEC2018001)

Conflicts of interest: None

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是消化系统常见的胃黏膜慢性病变, 主要组织病理学改变包括胃黏膜萎缩、肠化、上皮内瘤变, 具有病程长、易复发、难治愈的特点^[1]。人群胃镜检出率为 7.5% ~ 13.8%, 发病率与年龄增长呈正相关^[1-3]。在胃组织中, Sonic Hedgehog (Shh) 信号通路的异常表达可通过调节细胞类型特异性基因的表达来影响细胞增殖、迁移和分化^[4], 与 CAG 胃黏膜病变的进展及胃癌的发生关系密切^[5-7]。福建中医药大学附属第二人民医院脾胃病科是国家中医药管理局慢性胃炎诊疗协作组副组长单位, 我们在总结国医大师杨春波教授“胃炎 1 号”^[8]“胃炎合剂”^[9]疗效基础上, 结合中医证素调查创制健脾清化舒络中药——复方胃炎合剂 (compound gastritis mixture, CGM), 临床治疗 CAG 疗效肯定^[10]。本研究通过建立病证结合 CAG 大鼠模型, 从 Sonic Hedgehog 信号通路进一步明确复方胃炎合剂阻断或逆转 CAG 进展的分子机制, 以期为复方胃炎合剂

临床推广提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 59 只, 体质量为 (110 ± 10) g, 购于上海莱斯克实验动物有限公司, 动物许可证编号: [SCXK(沪)2017-0005], 饲养于福建中医药大学 SPF 级动物实验中心, 分笼饲养, 环境温度 (23 ± 2) °C, 空气湿度 55% ± 5%。

1.2 伦理审查

本研究经福建中医药大学附属第二人民医院动物实验伦理委员会审核通过, 设计方案符合安全性和公平性原则, 实验动物符合国家对医学实验动物的有关要求, 审核批号: FJPSPH-IAEC2018001。

1.3 药物

健脾清化舒络中药由福建中医药大学附属第二人民医院药剂室负责制备。药物组成: 炙黄芪 150 g, 党参 100 g, 炒白术 100 g, 茯苓 150 g, 枳壳 60 g, 白芍 100 g, 法半夏 100 g, 砂仁 45 g, 佩兰 100 g,

黄连 30 g, 陈皮 60 g, 地龙 150 g, 莪术 60 g, 甘草 30 g。煎液时加 8 倍量水浸泡 0.5 h 后煎煮 3 次, 第 1 次 1.5 h, 第 2 次 1 h, 第 3 次 0.5 h, 合并煎液, 滤过。滤液在 60 ~ 70 °C 减压浓缩至 500 mL, 药液浓度为含生药 2.47 g/mL, 灭菌分装, 4 °C 冰箱存用。盐酸雷尼替丁胶囊, 0.15 g/片, 赛诺菲(杭州)制药有限公司生产, 国药准字 H33021741。维酶素片, 0.2 g/片, 北海阳光药业有限公司生产, 国药准字 H45021183。

1.4 试剂与仪器

1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍, 百灵威科技有限公司, 货号: OR301388。Sonic Hedgehog 兔抗多克隆抗体, ProteinTech, 货号: 20697-1-AP; Ptch1 兔抗多克隆抗体, Sigma, 货号: AV44249; Smo 鼠抗单克隆抗体, ProteinTech, 货号: 66851-1-Ig; Gli1 鼠抗单克隆抗体, ProteinTech, 货号: 66905-1-Ig; Gli2 兔抗多克隆抗体, ProteinTech, 货号: 18989-1-AP; Gli3 兔抗多克隆抗体, ProteinTech, 货号: 19949-1-AP; Sufu 兔抗多克隆抗体, ProteinTech, 货号: 26759-1-AP。β-actin 鼠抗单克隆抗体, Immunoway, 货号: YM3029; 山羊抗兔 IgG, 康为世纪, 货号: CW0103S; 山羊抗小鼠 IgG, Solarbio, 货号: SE131。白细胞介素-1β(IL-1β) ELISA 试剂盒, ProteinTech, 货号: KE20005; 胃泌素(GAS) ELISA 试剂盒, 江苏酶免实业有限公司, 货号: MM-21284R。

低温冷冻离心机, Eppendorf, 型号: 5424R; 电动组织匀浆器, 天根生化, 型号: OSE-Y30/Y40; 酶标仪, Bio Tek, 型号: SN257300; 电泳仪, Bio-Rad, 1645070; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司, 型号: Tanon 1600。

2 方法

2.1 分组与模型构建

空白对照组 16 只, SPF 级动物标准饮食喂养。造模组 43 只, 正常饲养, 造模方法参照文献[11-12]并加以改进。以 120 mg/L 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍溶液自由饮用, 每日予雷尼替丁 0.03 g/kg 灌胃, 每周 45% 乙醇空腹灌胃 2 次, 每次 2 mL, 同时给予饥饿失常喂养法(每周禁食 1 次, 24 h/次), 连续造模 24 周。经上述造模干预, 造模组大鼠逐渐出现被毛蓬乱、松散, 毛色枯黄无光泽, 眯眼少神, 活动迟钝, 喜拱背、扎堆, 食欲食量下降。24 周末, 随机处死 3 只造模组大鼠, 取胃行病理检查, 判断 CAG 模型造模成功与否。

CAG 造模成功后, 模型组大鼠以单日禁食自由

饮水、双日予足量高脂高糖饮食, 即 20% 蜂蜜水自由饮用, 隔日上午灌服油脂 10 g/kg, 下午灌服 56 度白酒 10 mL/kg; 14 d 后放入人工气候箱中, 温度(32 ± 2) °C, 相对湿度 95%, 共计 5 d。经上述造模干预, 造模组大鼠逐渐出现小便量多色黄, 大便溏或黏稠发暗、臭明显, 造成脾虚痰湿热瘀证 CAG 大鼠模型。

模型成功构建后, 采用随机数字法将造模大鼠分为模型组、维酶素组和健脾清化舒络中药低、中、高剂量组, 每组 8 只; 将空白对照组分为空白组、健脾清化舒络中药高剂量空白组, 每组 8 只。

2.2 药物干预

各组给予相应药液, 依据临床应用等效剂量换算, 健脾清化舒络中药低、中、高剂量分别为 15.26、30.52、61.04 g/(kg · d), 维酶素给药剂量为 0.2 g/(kg · d), 根据大鼠体重将药液用生理盐水稀释灌胃, 每次 5 mL/只。空白组及模型组每次给予 5 mL/只生理盐水灌胃。药物干预周期共 30 d。

2.3 标本制备与采集

相应药物干预结束后, 大鼠予禁食 12 h, 随后将大鼠放入大小适中透明玻璃罩中, 再将浸有乙醚的棉球投入玻璃罩内, 观察大鼠的呼吸节律和运动情况。待麻醉成功后, 沿大鼠腹部正中线剖开腹腔, 用一次性真空采血管收集腹主动脉血 5 mL, 所取全血室温凝固 2 h, 3 000 r/min 有效离心半径 15 cm 离心 15 min, 分离血清, 分装后 -80 °C 冻存备用。随即分离胃, 沿胃大弯剖开, 生理盐水冲洗, 取幽门、前胃与腺胃交界线连线的 2/5 部分, 放入冻存管中, 置于液氮中速冻, 随后置于 -80 °C 冻存备用; 胃窦部装入盛有 10% 福尔马林液的试管中固定。

2.4 行为学观察

观察大鼠的精神状态、毛发、体重、活动度、食欲、二便等。

2.5 HE 染色评价病理组织学改变

取胃组织连续切片 5 张, HE 染色, 光学显微镜下观察了解胃黏膜变化情况, 观察各组给药前后胃黏膜的病理组织学改变。

2.6 胃组织相关蛋白表达

胃组织用预冷 RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转移蛋白质于 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育 12 h, 二抗室温孵育 2 h, ECL 检测目的蛋白条带。灰度值用 Image J 软件分析, 蛋白的相对含量以目的蛋白与 β-actin 的条带灰度比值表示。

2.7 ELISA 检测

将冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的大鼠血清取出,室温解冻,检测各组大鼠血清中 IL- 1β 、GAS 含量。操作步骤严格依据 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.8 统计方法

所有数据输入 SPSS 20.0 统计软件进行处理,符合正态分布或近似符合正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐的多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般行为学表现

经过复合造模后,造模组大鼠与空白对照组大鼠比较,出现倦怠懒动,反应较迟钝,被毛松散,毛色枯黄,缺乏光泽,喜拱背、扎堆蜷卧,皮肤疏松,食量减少,小便量多色黄,大便黏腻臭秽,唇周色暗,各种症状符合中医脾虚痰湿热痞证的临床证候。经健脾清化舒络中药治疗后,各组大鼠的上述症状均得到一定缓解,其中以中药中、高剂量组改善最为明显。

3.2 病理学评价

各组大鼠胃组织病理结果见图 1。空白组和健脾清化舒络高剂量空白组大鼠胃黏膜细胞和腺体排列整齐、结构完整,形状和大小基本一致,无炎性细胞浸润,黏膜下层和肌层连续,为胃组织正常病理学表现。模型组大鼠胃黏膜层变薄和腺细胞减少,细胞核形状、大小不一,腺管不完整,可见明显的淋巴

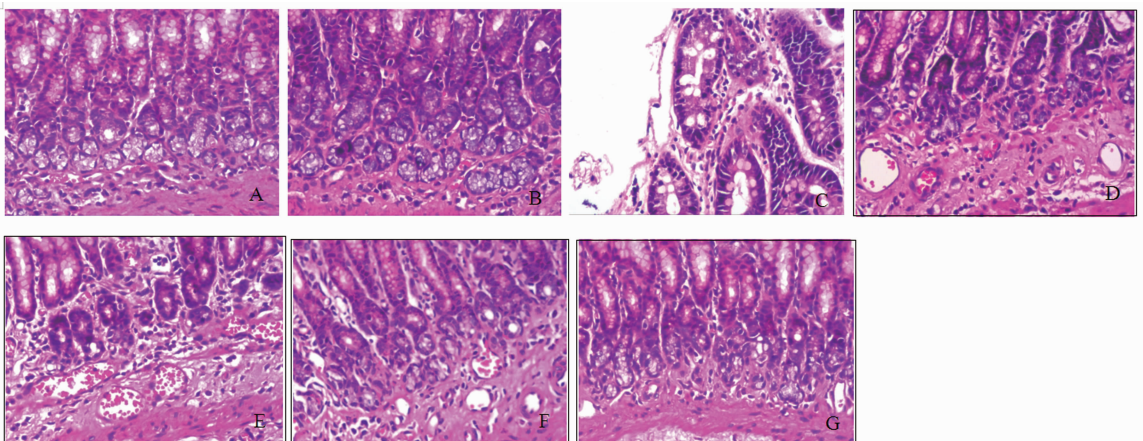
细胞、浆细胞浸润,伴有肠上皮化生和上皮内瘤变。镜下观察结果说明大鼠 CAG 模型构建成功。维酶素组和健脾清化舒络中药低、中、高剂量组大鼠胃黏膜厚度均有较模型组明显增加。其中维酶素组和健脾清化舒络中药低剂量组大鼠可见黏膜下层和基层增厚,纤维组织增生,细胞排列仍不甚规则,细胞核形状、大小较模型组均一。健脾清化舒络中、高剂量组大鼠胃黏膜细胞排列较为整齐,细胞核形状、大小较为均匀,腺管结构相对完整,未见明显炎性细胞浸润。

3.3 胃组织 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达比较

与空白组比较,模型组大鼠 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各治疗组大鼠 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 其中以健脾清化舒络中药中、高剂量组疗效差异最显著 ($P < 0.01$)。结果见表 1。各组大鼠胃组织 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达电泳图见图 2。

3.4 胃组织 Gli1、Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达比较

与空白组比较,模型组大鼠 Gli1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各治疗组大鼠 Gli1 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$), Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 2。各组大鼠胃组织 Gli1、Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达电泳图见图 3。



A: 空白组; B: 健脾清化舒络中药空白组; C: 模型组; D: 维酶素组; E: 健脾清化舒络中药低剂量组; F: 健脾清化舒络中药中剂量组; G: 健脾清化舒络中药高剂量组。标尺 = $100\text{ }\mu\text{m}$ 。

A: Blank group; B: Blank + high dose SFC group; C: Model group; D: Vitacoenzyme group; E: Low dose SFC group; F: Medium dose SFC group; G: High dose SFC group. scale = $100\text{ }\mu\text{m}$.

图 1 各组大鼠胃组织 HE 染色病理学改变 ($\times 200$)

Fig. 1 The pathological changes of the gastric mucosal tissue in HE staining ($\times 200$)

表 1 各组大鼠胃组织 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)Table 1 Comparison of the expressions of Shh, Ptch1 and Smo in gastric mucosal tissue ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	Shh	Ptch1	Smo
空白组 Blank group		0.842 ± 0.150	1.000 ± 0.168	0.908 ± 0.116
健脾清化舒络中药空白组 Blank + high dose SFC group	61.04	1.000 ± 0.153 ** $\Delta\Delta$	0.943 ± 0.131 $\Delta\Delta$	1.000 ± 0.138 * $\Delta\Delta$
模型组 Model group		0.323 ± 0.035 **	0.256 ± 0.055 **	0.361 ± 0.035 **
维酶素组 Vitacoenzyme group	0.20	0.592 ± 0.074 ** $\Delta\Delta$	0.379 ± 0.069 ** Δ	0.567 ± 0.075 ** $\Delta\Delta$
健脾清化舒络中药低剂量组 Low dose SFC group	15.26	0.393 ± 0.050 **	0.351 ± 0.039 **	0.479 ± 0.054 ** Δ
健脾清化舒络中药中剂量组 Medium dose SFC group	30.52	0.577 ± 0.072 ** $\Delta\Delta$	0.442 ± 0.083 ** $\Delta\Delta$	0.594 ± 0.061 ** $\Delta\Delta$
健脾清化舒络中药高剂量组 High dose SFC group	61.04	0.697 ± 0.135 ** $\Delta\Delta$	0.664 ± 0.143 ** $\Delta\Delta$	0.824 ± 0.088 $\Delta\Delta$
<i>F</i>		40.493	60.550	58.193
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared with the blank group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with the model group.

表 2 各组大鼠胃组织 Gli1、Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)Table 2 Comparison of the expressions of Gli1, Gli2, Gli3 and Sufu in gastric mucosal tissue ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	Gli1	Gli2	Gli3	Sufu
空白组 Blank group		0.961 ± 0.143	0.431 ± 0.037	0.331 ± 0.064	0.391 ± 0.040
健脾清化舒络中药空白组 Blank + high dose SFC group	61.04	1.000 ± 0.139 $\Delta\Delta$	0.517 ± 0.077 $\Delta\Delta$	0.348 ± 0.062 $\Delta\Delta$	0.417 ± 0.076 $\Delta\Delta$
模型组 Model group		0.275 ± 0.084 **	1.000 ± 0.186 **	1.000 ± 0.105 **	1.000 ± 0.093 **
维酶素组 Vitacoenzyme group	0.20	0.471 ± 0.074 ** $\Delta\Delta$	0.598 ± 0.109 ** $\Delta\Delta$	0.212 ± 0.047 ** $\Delta\Delta$	0.559 ± 0.108 ** $\Delta\Delta$
健脾清化舒络中药低剂量组 Low dose SFC group	15.26	0.439 ± 0.072 ** $\Delta\Delta$	0.721 ± 0.097 ** $\Delta\Delta$	0.749 ± 0.111 ** $\Delta\Delta$	0.781 ± 0.100 ** $\Delta\Delta$
健脾清化舒络中药中剂量组 Medium dose SFC group	30.52	0.578 ± 0.093 ** $\Delta\Delta$	0.554 ± 0.101 * $\Delta\Delta$	0.457 ± 0.085 ** $\Delta\Delta$	0.603 ± 0.072 ** $\Delta\Delta$
健脾清化舒络中药高剂量组 High dose SFC group	61.04	0.877 ± 0.154 $\Delta\Delta$	0.746 ± 0.155 ** $\Delta\Delta$	0.384 ± 0.050 $\Delta\Delta$	0.687 ± 0.098 ** $\Delta\Delta$
<i>F</i>		51.184	20.582	99.625	48.268
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with the model group.

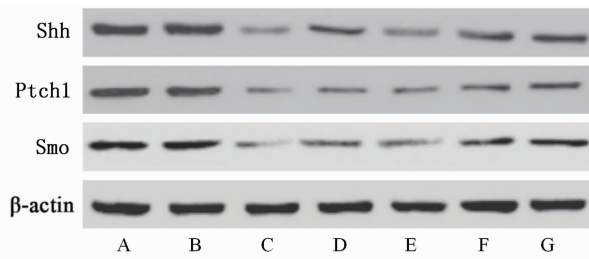
3.5 各组大鼠血清 IL-1 β 及 GAS 水平的比较

与空白组比较,模型组大鼠 IL-1 β 显著升高($P < 0.01$), GAS 显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 IL-1 β 显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),各治疗组 GAS 均有所上升,其中健脾清化舒络中药中、高剂量组 GAS 显著升高($P < 0.05$)。结果见表 3。

4 讨论

作为胃癌的重要癌前疾病,及时阻断或逆转 CAG 的病情进展,对于胃癌的防治有重要意义。在前期研究中,我们结合福建地域特点,认为 CAG 证

候多以脾胃气虚为本,痰、湿、热、瘀为标,其病机为脾胃气虚,脾胃运化功能失健,饮食水谷停聚,聚湿成痰,蕴久化热,损伤胃络,久踞则胃络瘀滞,痰、湿、热、瘀交阻,致胃黏膜腺体萎缩、肠上皮化生或上皮内瘤变。^[13-14]根据该病机,制定本病的主要治法为健脾清化舒络法。课题组在该法指导下和对“胃炎 1 号”“胃炎合剂”疗效总结基础上,结合证素调查结果创制“复方胃炎合剂”。方中以四君子汤(党参、炒白术、茯苓、甘草)及炙黄芪健运脾胃、补益中气,配法半夏、陈皮理气化痰,佩兰、砂仁芳香化湿,

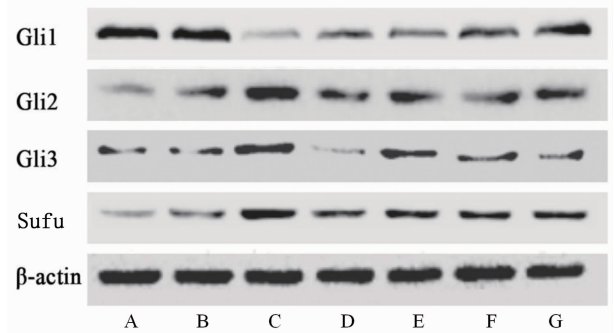


A: 空白组; B: 健脾清化舒络中药空白组; C: 模型组; D: 维酶素组; E: 健脾清化舒络中药低剂量组; F: 健脾清化舒络中药中剂量组; G: 健脾清化舒络中药高剂量组。

A: Blank group; B: Blank + high dose SFC group; C: Model group; D: Vitacoenzyme group; E: low dose SFC group; F: medium dose SFC group; G: high dose SFC group.

图2 各组大鼠胃组织 Shh、Ptch1、Smo 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Expressions of Shh, Ptch1 and Smo in gastric mucosa of the rats measured by Western-blot



A: 空白组; B: 健脾清化舒络中药空白组; C: 模型组; D: 维酶素组; E: 健脾清化舒络中药低剂量组; F: 健脾清化舒络中药中剂量组; G: 健脾清化舒络中药高剂量组。

A: Blank group; B: Blank + high dose SFC group; C: Model group; D: Vitacoenzyme group; E: low dose SFC group; F: medium dose SFC group; G: high dose SFC group.

图3 各组大鼠胃组织 Gli1、Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达电泳图

Fig. 3 Expressions of Gli1, Gli2, Gli3 and Sufu in gastric mucosa of rats measured by Western-blot

表3 各组大鼠血清 IL-1β、GAS 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$; $n = 8$)

Table 3 Comparison of the levels of IL-1β and GAS in serum ($\bar{x} \pm s$; $n = 8$)

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	IL-1β(μg/L)	GAS(ng/L)
空白组 Blank group		56.358 ± 11.405	73.695 ± 9.85
健脾清化舒络中药空白组 Blank + high dose SFC group	61.04	59.153 ± 10.916 ^{△△}	74.207 ± 12.281 ^{△△}
模型组 Model group		130.904 ± 21.982 ^{**}	56.749 ± 7.81 ^{**}
维酶素组 Vitacoenzyme group	0.20	92.994 ± 25.117 ^{**△△}	65.646 ± 7.414
健脾清化舒络中药低剂量组 Low dose SFC group	15.26	104.896 ± 18.325 ^{**△}	62.160 ± 8.723 [*]
健脾清化舒络中药中剂量组 Medium dose SFC group	30.52	80.110 ± 18.828 ^{*△△}	66.875 ± 9.29 [△]
健脾清化舒络中药高剂量组 High dose SFC group	61.04	69.881 ± 16.955 ^{△△}	69.521 ± 7.516 [△]
F		15.027	3.272
P		<0.001	0.009

注:与空白组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with the model group.

黄连清热化痰,枳壳、地龙、莪术理气祛瘀、通络止痛,加白芍与甘草相配缓急止痛。诸药合用,标本兼治,寒温平调,共奏健脾清化、祛痰理气、散瘀舒络之功,以达阻断、逆转 CAG 病理改变之效。

有研究表明^[15-16],Shh 信号通路表达异常与胃黏膜萎缩、肠化、上皮内瘤变及胃癌的发生有着密切的联系。Nusslein-Volhard 和 Wieschaus 利用果蝇的突变筛选,首先发现了 Hedgehog (Hh) 基因^[17],随后鉴定了从果蝇到哺乳动物都非常保守的 3 个同源物,分别为 Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh) 和 Desert Hedgehog (Dhh)。Shh 信号通路内部具有反馈调节机制,通常情况下,Smo 是正向激活转录因子,但 Ptch1 受体能抑制 Smo 蛋白活性,从而抑制下游通路的激活,实现通路内部的自我调

节^[18-19]。Hh 通路的转录因子是 Gli 蛋白家族,包括 Gli1、Gli2、Gli3 亚型。Sufu 是 Hh 途径的重要负调控因子,响应 Smo 调节而触发的磷酸化决定了初级纤毛内 Shh 通路成分的定位,并参与 Smo-Sufu-Gli 轴的调控^[20]。在哺乳动物体内,Shh 是 Hh 的 3 个同源物中分布最广,通路机制研究也是最为深入的一个信号分子^[21-23]。在胃组织中,胃上皮产生的 Shh 在胞浆内经过一系列反应后形成具有信号转导功能的成熟肽,以旁分泌的形式分泌出细胞外,并作为 Shh 信号通路的配体靶向作用于间质细胞,与 Ptch1 的 12 次跨膜受体结合^[24],从而解除 Ptch1 对 G 蛋白偶联受体 Smo 的抑制作用^[25]。活跃的 Smo 通过微管运输将 Shh 信号向细胞内传递,导致 Sufu-Gli 在细胞纤毛上募集,随后复合物迅速解离^[26],激

活 Gli 蛋白家族形成转录激活子, Gli1、Gli2、Gli3 蛋白由细胞浆转位至细胞核,与 DNA 共有位点(5'-GACCACCCA-3')结合促进靶基因表达^[27]。实际上,当 Shh 不存在时,受体 Ptch1 抑制 Smo 的功能,转录因子 Gli2 和 Gli3 经蛋白酶解加工,生成缺少转录活域的转录因子抑制形式,入核后抑制 Shh 靶基因的表达;当 Shh 存在时,Shh 与 Ptch1 结合后,Smo 的抑制作用被解除,Sufu-Gli 解离,Gli2 和 Gli3 蛋白酶解加工步骤被阻断,形成转录激活子,入核促进靶基因表达。其中,Gli1 不受蛋白酶加工处理,是 Shh 通路中主要转录激活子。

在既往的研究中,关于 CAG 与脾虚及痰、湿、热、瘀证关系的临床总结和实验研究均已较为深入^[28-30],也已明确 Shh 信号通路调控异常是 CAG 向胃癌转化的重要机制之一^[31]。而涉及“证”与 Shh 信号通路的研究和论述却相对较少,研究多关注 Shh 信号通路与脾虚、痰、瘀间的关系^[32-34]。湿、热作为 CAG 发生炎-癌转化的重要因素,可增加肿瘤易感性、侵袭性和转移性,与 Shh 信号通路的研究尚需进一步完善。而对于 CAG 脾虚痰湿热瘀证与 Shh 信号研究尚欠缺、应用健脾清化舒络法治疗 CAG 的具体机制亦待进一步阐明,本文可填补此部分空白。

在本研究中,通过胃病理结果,可以证实该病证结合复合造模法,能较好构建大鼠 CAG 模型,并体现脾虚痰湿热瘀证的证候表现。CAG 模型组大鼠采用维酶素和健脾清化舒络中药各剂量治疗后,大鼠的胃黏膜病理均在一定程度上获得改善,其中健脾清化舒络中药中、高剂量组疗效显著,与前期临床研究相符,表明该方治疗 CAG 疗效肯定。在对 Shh 信号通路的研究中发现,CAG 模型组大鼠 Shh、Ptch1、Smo、Gli1 蛋白表达较空白组出现下调,同时 Gli2、Gli3、Sufu 蛋白表达较空白组出现相应上调,与既往的研究一致^[35]。因此我们认为,当胃黏膜处于萎缩状态时,Shh 信号通路处于抑制状态,采用健脾清化舒络为治法,经过健脾清化舒络中药治疗后,Shh 信号通路可被重新激活,这可能是健脾清化舒络中药治疗 CAG 的分子基础。

另有研究提示,胃黏膜在低酸条件可以阻止 Shh 加工^[36]。而 IL-1 β 是胃酸分泌的有效抑制剂^[37-38],能通过阻断细胞内钙离子分布和钙依赖性蛋白激酶 C 增加来抑制胃酸分泌^[39-40]。GAS 也可通过钙依赖性机制促进胃酸生成^[41],并能够促进胃窦、胃体收缩、增加胃肠道的运动,是调节胃肠道运

动的兴奋性胃肠肽^[42]。有研究表明,GAS 缺乏的小鼠 Shh 蛋白表达显著降低,而再输注 GAS 可改善 Shh 蛋白表达^[36]。因此,在上述研究的基础上,我们采用 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 及 GAS 水平,发现 CAG 模型组中大鼠血清 IL-1 β 上调,而 GAS 下调。故我们推测,Shh 信号通路的抑制,可能是因为大鼠体内 IL-1 β 及 GAS 水平的改变导致胃黏膜处于低酸环境,阻止了 Shh 的有效表达,进一步引起其下游信号通路分子表达的改变。GAS 的下调导致胃肠道兴奋性降低,加之胃中低酸的环境进一步导致脾虚、运化失常,引起水谷积聚中焦,痰湿热内生,阻滞胃络,腺体萎缩,痰湿热瘀内阻导致以自分泌和旁分泌为主的 Shh 在 CAG 大鼠中的生成和分泌显著减少。经过药物干预后,各治疗组大鼠 IL-1 β 及 GAS 水平均趋于好转。因此我们认为,健脾清化舒络中药可能通过抑制 IL-1 β 和上调 GAS,从而进一步激活下游 Shh 信号通路的表达。但中药复方多具有多靶点的治疗作用,因此,不排除健脾清化舒络中药在下调 IL-1 β 和上调 GAS 时,存在同时激活 Shh 信号通路 Shh 配体的可能,具体是否存在此种交互作用机制,有待今后进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] 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.
Fang JY, Du YQ, Lui WZ, et al. Consensus on chronic gastritis in China (2017, Shanghai)[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2017,22(11):670-687.
- [2] 李佃贵,杜艳茹,郭敏,等. 化浊解毒方治疗胃癌前病变临床疗效及对微量元素的影响[J]. 中药材,2011,34(1):158-160.
Li DG, Du YR, Guo M, et al. Clinical effect of Huazhuo Jiedu Decoction on gastric precancerous lesions and its influence on trace elements[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011,34(1):158-160.
- [3] 单兆伟. 慢性萎缩性胃炎及其癌前病变的治疗体会[J]. 江苏中医药,2007,39(8):4-5.
Shan ZW. Experience in the treatment of chronic atrophic gastritis and its precancerous lesions[J]. Journal of Jiangsu Traditional Chinese Medicine, 2007,39(8):4-5.
- [4] Zeng C, Yan R, Yang G, et al. Hedgehog signaling activation required for glypican-6-mediated regulation of invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells [J]. Biosci Rep, 2020, 40(6):BSR20193181.
- [5] Xin L, Liu L, Liu C, et al. DNA-methylation-mediated silencing of miR-7-5p promotes gastric cancer stem cell invasion via increasing Smo and Hes1 [J]. J Cell Physiol,

- 2020,235(3):2643-2654.
- [6] Ke B, Wang XN, Liu N, et al. Sonic Hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates cell migration and invasion via induction of epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *J Cancer*, 2020,11(13):3932-3943.
- [7] 丁霞,苏泽琦,沈洪,等.慢性胃炎“炎癌转化”病证结合大鼠模型建立中的难点问题及应对策略[J].*北京中医药大学学报*,2020,43(12):973-979.
- Ding X, Su ZQ, Shen H. Challenges and solutions in the establishment of rat models of gastritis deteriorating into gastric carcinoma[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2020,43(12):973-979.
- [8] 王少明,林才经,杨春波,等.胃炎1号对胃黏膜癌前病变大鼠P53蛋白表达的影响[J].*福建中医药*,2006,37(6):50-51.
- Wang SM, Lin CJ, Yang CB, et al. Weiyan No. 1 recipe on P53 protein expression in rats with precancerous lesion of gastric mucosa[J]. *Journal of Fujian Traditional Chinese Medicine*, 2006,37(6):50-51.
- [9] 潘秀珍,徐顺扬,杨春波,等.中药胃炎合剂治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察[J].*中医杂志*,1984,25(2):27-28.
- Pan XZ, Xu SY, Yang CB, et al. Observation on curative effect of Chinese medicine gastritis mixture on chronic atrophic gastritis[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1984,25(2):27-28.
- [10] 黄铭涵,黄健,李思汉,等.复方胃炎合剂逆转胃癌前病变的临床研究[J].*中国中医药信息杂志*,2016,23(4):20-23.
- Huang MH, Huang J, Li SH, et al. Clinical research on reversion of precancerous lesions of gastric carcinoma by compound gastritis mixture [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2016,23(4):20-23.
- [11] 魏玥,杨晋翔,王再见,等.益气化痰解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生大鼠EGFR/MAPK信号通路的影响[J].*北京中医药大学学报*,2015,38(2):95-99.
- Wei Y, Yang JX, Wang ZJ, et al. Effects of Yiqi Huayu Jiedu method on EGFR/MAPK signal pathway in rats with chronic atrophic gastritis exhibiting dysplasia[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2015,38(2):95-99.
- [12] 周晶,黄柳向,喻斌,等.MNNG诱导胃癌前病变模型的探讨[J].*中国中西医结合消化杂志*,2016,24(11):888-890.
- Zhou J, Huang LX, Yu B, et al. Study on MNNG-induced gastric precancerous lesion model [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion*, 2016,24(11):888-890.
- [13] 林平,黄小燕,施婧瑶,等.慢性胃炎的证素特点[J].*福建中医药大学学报*,2013,23(2):7-9.
- Lin P, Huang XY, Shi JY, et al. Study on distribution features of syndrome elements of chronic gastritis [J]. *Journal of Fujian University of TCM*, 2013,23(2):7-9.
- [14] 林平,翁顺珠,郑进敏.运用证素及中医体质理论探讨脾胃湿热型慢性胃炎的中医病理特点[J].*福建中医*
- 药,2015,46(1):3-5.
- Lin P, Weng SZ, Zheng JM. Using syndrome elements and traditional Chinese medical constitution theory to explore the pathological characteristics of chronic gastritis of spleen and stomach damp-heat type[J]. *Journal of Fujian Traditional Chinese Medicine*, 2015,46(1):3-5.
- [15] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumors [J]. *Nature*, 2003,425(6960):846-851.
- [16] Lee SY, Han HS, Lee KY, et al. Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma [J]. *Oncol Rep*, 2007,17(5):1051-1055.
- [17] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980,287(5785):795-801.
- [18] Hu A, Song BL. The interplay of patched, smoothed and cholesterol in Hedgehog signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019,61:31-38.
- [19] Deshpande I, Liang J, Hedeem D, et al. Smoothed stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity [J]. *Nature*, 2019,571(7764):284-288.
- [20] Scheidt T, Alka O, Gonczarowska-Jorge H, et al. Phosphoproteomics of short-term hedgehog signaling in human medulloblastoma cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2020,18(1):99.
- [21] Ruiz Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002,2(5):361-372.
- [22] Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, et al. Cloning, expression, and chromosomal location of Shh and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog [J]. *Genomics*, 1995,28(1):44-51.
- [23] Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on sonic hedgehog orthologs [J]. *Oncol Rep*, 2005,14(4):1087-1090.
- [24] Merchant JL. Hedgehog signaling in gut development, physiology and cancer [J]. *J Physiol*, 2012,590(3):421-432.
- [25] Yoon C, Park DJ, Schmidt B, et al. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2014,20(15):3974-3988.
- [26] Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes [J]. *J Cell Biol*, 2010,191(2):415-428.
- [27] Winklmayr M, Schmid C, Laner-Plamberger S, et al. Non-consensus GLI binding sites in Hedgehog target gene regulation [J/OL]. *BMC Mol. Biol.*, 2010(11):2 [2020-08-10]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/11/2>.
- [28] 陈润花,张厂,苏泽琦,等.非萎缩性胃炎到萎缩性胃炎的中医证候演变研究[J].*北京中医药大学学报*,2015,38(5):310-314.

- Chen RH, Zhang C, Su ZQ, et al. Evolution of TCM patterns from non-atrophic to atrophic gastritis[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 38(5):310-314.
- [29] 李思汉,李书楠,黄铭涵,等.胃癌前病变“痰”“湿”证素特征研究[J].中华中医药杂志,2019,34(3):970-973.
- Li SH, Li SN, Huang MH, et al. Study on the characteristics of syndrome elements “phlegm” and “dampness” in precancerous lesions of gastric carcinoma[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(3):970-973.
- [30] 刘凯歌,苏泽琦,于春月,等.调气活血养阴方对慢性萎缩性胃炎大鼠壁细胞超微结构的影响[J].北京中医药大学学报,2019,42(4):289-295.
- Liu KG, Su ZQ, Yu CY, et al. Effects of Tiaoqi Huoxue Yangyin Fang on oxyntic cell ultrastructure in rats with chronic atrophic gastritis[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 42(4):289-295.
- [31] 张曼玲,时昭红,刘云,等.胃癌前病变信号通路及相关中医药治疗的研究进展[J].天津中医药,2020,37(2):227-234.
- Zhang ML, Shi ZH, Liu Y, et al. Signal pathways of precancerous lesions of gastric cancer and the related research progress of traditional Chinese medicine treatment[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020,37(2):227-234.
- [32] 陈露,于佳宁,吕俊慧,等.中药萎胃康通过影响 Hedgehog 通路治疗慢性萎缩性胃炎的机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2019,25(12):1668-1672.
- Chen L, Yu JN, Lyu JH, et al. Mechanism of Weiweikang in treating chronic atrophic gastritis by affecting Hedgehog pathway[J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2019,25(12):1668-1672.
- [33] 赵唯含,史瑞,谭祥,等.益气活血法对 MNNG 诱导萎缩性胃炎癌前病变大鼠 hedgehog 信号通路的调控作用[J].环球中医药,2017,10(11):1307-1312.
- Zhao WH, Shi R, Tan X, et al. Regulation effects of invigorating qi and activating blood therapy on the hedgehog signal pathway in rats with precancerous lesions of atrophic gastritis [J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2017,10(11):1307-1312.
- [34] 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.
- Zhao WH, Gao KL, Li NF, et al. Effects of Radix Astragalii seu Hedysari, Radix Notoginseng and their compatibility on the hedgehog signal pathway in rats with chronic atrophic gastritis[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2016,31(5):1951-1955.
- [35] Cai D, Yu J, Qiu J, et al. Dynamic changes of sonic hedgehog signaling pathway in gastric mucosa of rats with MNNG-induced gastric precancerous lesions[J]. J Cell Physiol, 2019,234(7):10827-10834.
- [36] Zavros Y, Waghray M, Tessier A, et al. Reduced pepsin A processing of sonic hedgehog in parietal cells precedes gastric atrophy and transformation [J]. J Biol Chem, 2007,282(46):33265-33274.
- [37] Pachathundikandi SK, Müller A, Backert S. Inflammation Activation by Helicobacter Pylori and Its Implications for Persistence and Immunity (Vol. 397) [M]. Erlangen: Curr Top Microbiol Immunol, 2016:117-131.
- [38] Hong JB, Zuo W, Wang AJ, et al. Helicobacter pylori infection synergistic with IL-1 β gene polymorphisms potentially contributes to the carcinogenesis of gastric cancer [J]. Int J Med Sci, 2016,13(4):298-303.
- [39] Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, et al. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells[J]. Am J Physiol, 1998,275(5):G1094-G1105.
- [40] Waghray M, Zavros Y, Saqui-Salces M, et al. Interleukin-1beta promotes gastric atrophy through suppression of sonic hedgehog [J]. Gastroenterology, 2010,138(2):562-572.
- [41] Stepan V, Ramamoorthy S, Nitsche H, et al. Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells [J]. J Biol Chem, 2005,280(16):15700-15708.
- [42] 黄保民,李颖,马仲丽,等.大承气汤对里实热证大鼠胃肠激素 GAS、MTL、VIP、NT 的影响[J].北京中医药大学学报,2012,35(10):683-687.
- Huang BM, Li Y, Ma ZL, et al. Influences of Dachengqi Tang on gastrointestinal hormones-GAS, MTL, VIP and NT in rats with interior excess and heat syndrome [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2012,35(10):683-687.

(收稿日期:2020-08-20)