



中华中医药学刊
Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine
ISSN 1673-7717, CN 21-1546/R

《中华中医药学刊》网络首发论文

题目：安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 ULK1 相关自噬蛋白表达的影响
作者：周瑞东，徐杉，龚纯，黎镨，张帆，蒙毅，唐友明，朱永苹
网络首发日期：2021-12-31
引用格式：周瑞东，徐杉，龚纯，黎镨，张帆，蒙毅，唐友明，朱永苹. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 ULK1 相关自噬蛋白表达的影响[J/OL]. 中华中医药学刊. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20211231.1430.020.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 ULK1 相关自噬蛋白表达的影响

周瑞东¹ 徐杉¹ 龚纯¹ 黎锵¹ 张帆¹ 蒙毅¹ 唐友明² 朱永苹^{2*}

(1 广西中医药大学 广西南宁, 530200, 2 广西中医药大学附属瑞康医院 广西 南宁, 530011)

【摘要】目的 探讨 ULK1 相关自噬蛋白在安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎大鼠的机制。**方法** 将 72 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 即正常对照组、模型对照组、实验观察安胃汤 AH 组 (高剂量组)、实验观察安胃汤 AM 组 (中剂量组)、安胃汤 AL 组 (低剂量组)、阴性对照组。用氨水和脱氧胆酸钠溶液自由饮用, 饥饱失常喂养, 以建立慢性萎缩性胃炎模型。再给予不同浓度的安胃汤灌胃治疗 4 周后。观察大鼠胃组织病理变化和自噬相关基因与蛋白的表达变化。**结果** 从病理结果来看, 与阴性对照组比较, 安胃汤各治疗组胃部腺体萎缩情况有不同程度减少, 固有层内可见淋巴细胞、浆细胞、酸性细胞浸润减少; 在透射电镜的检测结果中, 正常对照组, 模型对照组和阴性对照组未发现明显自噬或极少, 而各安胃汤治疗组中均发现了有不同数量的自噬溶酶体的存在。安胃汤各治疗组中 ULK1, Atg13, beclin-1, LC3 mRNA 的表达均有明显上调 ($P < 0.05$); 安胃汤各治疗组中 ULK1, Atg13, beclin-1, LC3 蛋白的表达亦有上调 ($P < 0.05$); **结论** 安胃汤在改善慢性萎缩性胃炎的同时能够上调组织中 ULK1, Atg13, beclin-1 和 LC3 蛋白的相对表达, 可认为安胃汤的治疗机制与自噬相关。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎; 安胃汤; 自噬

Effect of Anwei Decoction on the expression of ULK1-related autophagy protein in rats with chronic atrophic gastritis

ZHOU Rui-dong¹, XU Shan¹, GONG Chun¹, LI Qiang¹, ZHANG Fan¹, MENG Yi¹, TANG You-ming², ZHU Yong-ping^{2*}

(1 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2 Ruikang Hospital

[项目基金]国家自然科学基金 (81860843), 广西自然科学基金 (2017GXNSFAA198111, 2018GXNSFAA281063), 广西一流学科建设开放课题自然科学研究项目 (2019XK165),

[作者简介] 周瑞东 (1993.02-), 女, 浙江温州人, 医师, 硕士研究生, 研究方向: 脾胃病的中西医结合诊疗研究

*[通讯作者简介] 朱永苹 (1972.03-), 女, 广西合浦人, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 消化系统疾病的中西医结合诊治研究, E-mail: 529090217@qq.com

Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011)

[Abstract] Objective To investigate whether the mechanism of Anwei Decoction in the treatment of chronic atrophic gastritis (CAG) rats is related to autophagy. **Methods** 72 SD rats were randomly divided into 6 groups: normal control group, model control group, experimental observation anwei Decoction AH group (high dose group), experimental observation Anwei decoction AM group (medium dose group), Anwei decoction AL group (low dose group), and negative control group. The model of chronic atrophic gastritis was established by free drinking with ammonia and sodium deoxycholate solution and feeding with hunger disorder. Then give different concentration of Anwei decoction intragastric treatment after 4 weeks. The pathological changes of gastric tissues and the expression of autophagy-related genes and proteins in rats were observed. **Results** The pathological results showed that compared with the negative control group, the gastric gland atrophy in each treatment group of Anwei Decoction decreased to different degrees, and the infiltration of lymphocytes, plasma cells and acid cells in the lamina propria decreased. In real-time PCR detection, the expressions of ULK1, Atg13, Beclin-1, LC3 mRNA in each treatment group of Anwei Decoction were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Western blot showed that ULK1, Atg13, Beclin-1 and LC3 proteins were also up-regulated in anwei Decoction treatment groups ($P < 0.05$). Finally, in the transmission electron microscope test results, no significant autophagy or minimal autophagy was found in the normal control group, model control group and negative control group, while different amounts of autophagy lysosomes were found in each anwei decoction treatment group. **Conclusion** Anwei Decoction can improve the relative expression of ULK1, Atg13, Beclin-1 and LC3 proteins in tissues while improving chronic atrophic gastritis, suggesting that the therapeutic mechanism of anwei decoction is related to autophagy.

【Key words】 chronic atrophic gastritis; Anwei Decoction; autophagy

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是一种常见消化系统疾病,该病主要以胃黏膜上皮和腺体萎缩,黏膜变薄,黏膜肌层增厚为特征^[1]。

CAG 病程迁长且病情极易反复，而中医药在调节胃肠道疾病以及防止复发等一直都有着自己的优势，也日益受到重视。根据 CAG 的病机特点，已故全国名老中医林沛湘教授在多年临床实践基础上组方安胃汤，由半夏、黄连、干姜、乌药、丹参、百合、白芍、薏苡仁、炙甘草组成，方中制半夏，干姜，黄连，三药辛开苦降、清胃温脾、寒热并调、化湿泻浊共为君药；百合，乌药共奏润肺燥、降胃气、行胃滞、活胃络之功，共为臣药；薏仁调和木土二脏，祛湿止痛共为佐药；炙甘草补脾益气、缓急止痛、调和诸药而为使药，诸药合用，共奏“苦辛化浊调枢”之功。在多年临床实践中验证安胃汤可以有效改善胃脘疼痛、痞满、嗝气、嘈杂、泛酸、食后腹胀等临床症状；并能够减轻胃黏膜急慢性炎症；延缓胃黏膜腺体萎缩、肠上皮化生以及异型增生；近年来还从分子水平对安胃汤治疗 CAG 进行了部分相关的机制研究^[2-5]。安胃汤治疗 CAG 的疗效经多年临床检验，但中药复方的治疗大多具有多靶点多路径的特点，这也是中医药现代化的主要工作——用现代生物技术来科学地阐释中医药治疗疾病的具体机制。

自噬（autophagy）是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其内容物的过程，参与炎症反应、细胞死亡及免疫等，同时也是细胞本身的代谢需要，其过程在机体的生理和病理过程中都能见到。近年自噬与癌症相关的各类研究也愈发增多^[6-9]。慢性萎缩性胃炎诊疗共识^[10]中曾强调胃炎向胃癌发展的过程中，在胃癌前病变（即萎缩、肠化和异型增生）阶段进行积极干预为佳。CAG 作为癌前病变进展的第一步，干预其进一步发展或逆转其病理改变，是阻断胃癌发展途径，防治胃癌的关键。同时鉴于胃癌与 CAG 的密切关系，也为我们研究安胃汤治疗 CAG 的机制提供了一个新的切入点，来探讨安胃汤是否对 CAG 大鼠的自噬产生相关影响。我们将在复制 CAG 大鼠模型的基础上，通过安胃汤干预后检测其胃组织中 ULK1, Atg13, beclin 和 LC3 蛋白和基因的相对表达量。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠，雄性，体重(110±10)g，购自湖南莱克景达实验动物有限公司，饲养于广西中医药大学实验动物中心，动物使用许可证号（SYXK 桂 2019-0001）。

1.2 主要药物与试剂

1.2.1 药物: 安胃汤: 半夏 13g、黄连 5g、干姜 5g、乌药 7g、丹参 15g、百合 20g、白芍 20g 薏苡仁 10g、炙甘草 5g 为中药饮片, 由广西中医药大学附属瑞康医院药剂科黄小鸥主任药师鉴定。

1.2.2 试剂: 脱氧胆酸钠 (lot: SLBZ6975), 氨水 (lot: SHBK0854) 购自 sigma aldrich 公司。蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (lot: UK285882) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 增强型 RIPA 裂解液 (lot: 14G30C02)、BCA 蛋白定量试剂盒 (lot: 14G08A460)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (lot: 14H13B12)、特超敏 ECL 化学发光即用型底物 (lot: 7E341E9) 均购自武汉博士德生物工程有限公司; SYBR qPCR Master Mix (lot: 7E092H6)、RT Super Mix for qPCR (lot: 7E020C6)、RNA-easy TM Isolation Reagent (lot: 7E303H9) 购自南京诺唯赞生物技术股份有限公司; 兔抗鼠 Atg13 抗体 (lot: 9#13273S)、兔抗鼠 beclin-1 抗体 (lot: 10#3495S)、兔抗鼠 ULK1 抗体 (lot: 12#8054S)、兔抗鼠 LC3-A/B 抗体 (lot: 3#12741S) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔抗鼠 GAPDH 抗体 (lot: 00078427) 购买自武汉三鹰技术有限公司。

1.3 主要仪器

全波长多功能酶标仪 (瑞士 Tecan), Bio-Rad Image-Lab 凝胶成像分析系统、梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad), 罗氏 Lightcycler 96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche), 超微量分光光度计 (美国 Thermo), RM2016 病理切片机 (德国 Leica), JK-6 生物组织摊烤片机 (武汉俊杰), BX53 型生物显微镜 (日本奥林巴斯), UC7 超薄切片机 (德国 Leica), Ultra 45° 钻石切片刀 (瑞士 Daitome), HT7700 透射电子显微镜 (日本 HITACHI)。

2. 方法

2.1 动物模型建立分组及给药

2.1.1 动物模型复制

健康清洁级 SD 大鼠 72 只, 雄性, 体重 (110±10) g。饲养于一个温度 23°C 与正常节奏 (8 点到晚上 8 点, 光) 的环境。正常饲养 1 周; 后随机分为正常对照组 (N 组, n=12) 和 CAG 造模组 (M, n=60)。正常对照组大鼠饮水、饮食正常。模型组大鼠在建模开始的 16 周内采用取每天 0.5g/L 氨水和 20mmol/L 脱氧胆酸钠溶

液交替自由饮用, 并采用饥饱失常喂养, 即两日正常喂养, 一日禁食如此往复^[11]。在第 15 周随机选取模型组大鼠 2 只, 用 10%水合氯醛深度麻醉。取胃组织进行病理检查, 以确认是否顺利建立 CAG 模型。正常对照组 (N 组): 继续常规饲养。

2.1.2 安胃汤药液制备

将安胃汤中药饮片根据药量多少用 0.5~1L 的蒸馏水浸泡 20min 后用武火煎煮至沸腾 5~10min 后改文火继续煎煮 30min 后将汤药滤出, 再加入等量的蒸馏水以相同方式进行二煎, 最后混合两次所得药液浓缩至合适的浓度 (中药生药浓度=药材投料量 g/最终所得药液体积 mL)。动物给药剂量则参照《药理实验方法学》中人和动物体表面积比值剂量表, 按照体质量 60kg 成人剂量的 6.17 倍计算为 10.3g/kg, 再以正常剂量的 0.5 倍和 2 倍作为安胃汤低、高剂量组用量, 按以上计算的三种浓度对所得药液进行调整。

2.1.3 分组与药物干预

确认建模成功后再将造模大鼠随机分为模型对照组: 持续模型建立期间喂养方式; 实验观察安胃汤 AH 组 (高剂量组): 安胃汤灌胃 2.0g/mL 浓度, 2mL · 1 次⁻¹ · d⁻¹; 实验观察安胃汤 AM 组 (中剂量组): 安胃汤灌胃 1.0g/mL 浓度, 2mL · 1 次⁻¹ · d⁻¹; 安胃汤 AL 组 (低剂量组): 安胃汤灌胃 0.5g/mL 浓度, 2mL · 1 次⁻¹ · d⁻¹; 阴性对照组给药: 生理盐水灌胃, 2mL · 1 次⁻¹ · d⁻¹。此后 4 周内按分组干预。

2.1.4 动物样本的采集与处理

各组于用药治疗 4 周后, 禁食 24h, 将大鼠用 10%水合氯醛按体重 0.3mL/100g 进行麻醉, 剖腹取出全胃, 沿胃大弯剪开, 先在胃窦近幽门口处取大小 1mm × 1mm × 1mm 的胃组织, 迅速投入电镜固定液 4℃ 固定, 再于胃窦近幽门口至胃大弯方向取胃组织 3 块, 2 块置于冻存管 -80℃ 冰箱保存, 用作 Western blot 检测和 real-time PCR 检测; 另 1 块投入 10%甲醛, 作常规石蜡切片。

2.2 CAG 模型大鼠病理检测

胃组织投入 10%甲醛中固定, 再用乙醇由低浓度到高浓度脱水, 以二甲苯为透明剂脱水和透明。后将组织块置于石蜡中包埋。定型后对蜡块进行切片, 薄度为 5~8 μm。经脱蜡后, 用苏木精和伊红染色。最后, 将染色后的切片、脱水、透明和固封。200× 高倍镜下观察胃黏膜上皮排列情况, 有无炎症细胞浸润, 有无溃疡形成, 有无腺体萎缩减少, 有无异型增生等情况。

2.3 Real-time PCR 法检测大鼠胃黏膜组织相关 mRNA 的表达

提取胃组织 Total RNA，紫外分光光度计测 RNA 的含量及纯度。将 RNA 进行逆转录为 cDNA。稀释后取 5 μ L cDNA 进行 real-time PCR，以 GAPDH 为内参，反应体系 20 μ L。扩增 40 个循环。计算 Ct 值，以 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算目的基因的表达水平。

2.4 Western blot 法检测大鼠胃黏膜组织相关蛋白的表达

取部分胃组织，加入 RIPA 裂解液机械研磨，充分裂解后离心，取其上清，BCA 法测定蛋白浓度，加入上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C 变性。取 30~50 μ g 样品蛋白/孔上样，电泳，转膜，5%BSA 封闭，分别用 ULK1，Atg13，beclin 和 LC3 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，洗涤，二抗室温平摇孵育，洗涤，ECL 显色液显色，凝胶成像分析系统成像拍照，对蛋白条带进行数据分析，以目标蛋白条带与 GAPDH 条带的比值作相对定量，分析各样品中目标蛋白表达的差别。

2.5 透射电镜下观察大鼠胃组织微观结构

新鲜组织迅速投入电镜固定液 4 $^{\circ}$ C 固定，后用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 PB (pH7.4) 漂洗。1%的锇酸·0.1mol/L 磷酸缓冲液 PB (pH7.4) 再固定。0.1mol/L 磷酸缓冲液 PB (pH7.4) 漂洗。脱水：组织依次入不同浓度酒精-不同浓度丙酮上行脱水。渗透：丙酮：包埋剂=1：1，2~4h；丙酮：包埋剂=2：1 渗透过夜；纯包埋剂 5~8h；将样品插入包埋板后包埋：60 $^{\circ}$ C 烤箱聚合 48h。切片：切片 60~80nm 超薄切片。染色：铀铅双染色，切片室温干燥过夜。最后在透射电子显微镜下观察，采集图像分析。

2.6 统计学分析

所有数据采用 Graphpad Prism 软件进行处理与分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠实验中情况

在模型建立过程中，正常对照组 12 只，无意外死亡。在第 15 周，选取实验观察 AH 组和实验观察 AM 组中各 1 只处死做病理检测。后续安胃汤干预阶段，第 17 周，实验观察 AH 组和实验观察 AL 组分别意外死亡 1 只和 2 只；第 18 周，实

实验观察 AM 组和阴性对照组各意外死亡 1 只；第 19 周，实验观察 AL 组意外死亡 1 只；该阶段大鼠的死亡均为灌胃操作失误所致。最终取材阶段各组数量为正常对照组 12 只，模型对照组 12 只，实验观察 AH 组 10 只，实验观察 AM 组 10 只，实验观察 AL 组 9 只，阴性对照组 11 只。

3.2 CAG 大鼠胃组织病理检测结果

正常对照组（图 1A）胃黏膜肌层厚，各层结构正常，未见萎缩、脱落或缺损，胃黏膜上皮细胞排列整齐，固有腺体形状规则。模型对照组（图 1B）胃黏膜上皮细胞排列不规则，基底部有炎症细胞浸润，黏膜层变薄，腺体细胞减少，伴有不完全腺管。实验观察 AH 组（图 1C）：胃组织各层结构正常，腺体排列较紧密规则，少许炎症细胞浸润。实验观察 AM 组（图 1D）：胃黏膜肌层厚度适中，各层结构较为正常，腺体结构排列较为规则。实验观察 AL 组（图 1E）：部分腺体细胞数量减少，结构排列尚规则。阴性对照组（图 1F）胃黏膜上皮细胞排列不规则，基底部有炎症细胞浸润，黏膜层变薄，腺体细胞数量明显减少，伴有不完全腺管及肠化生表现。

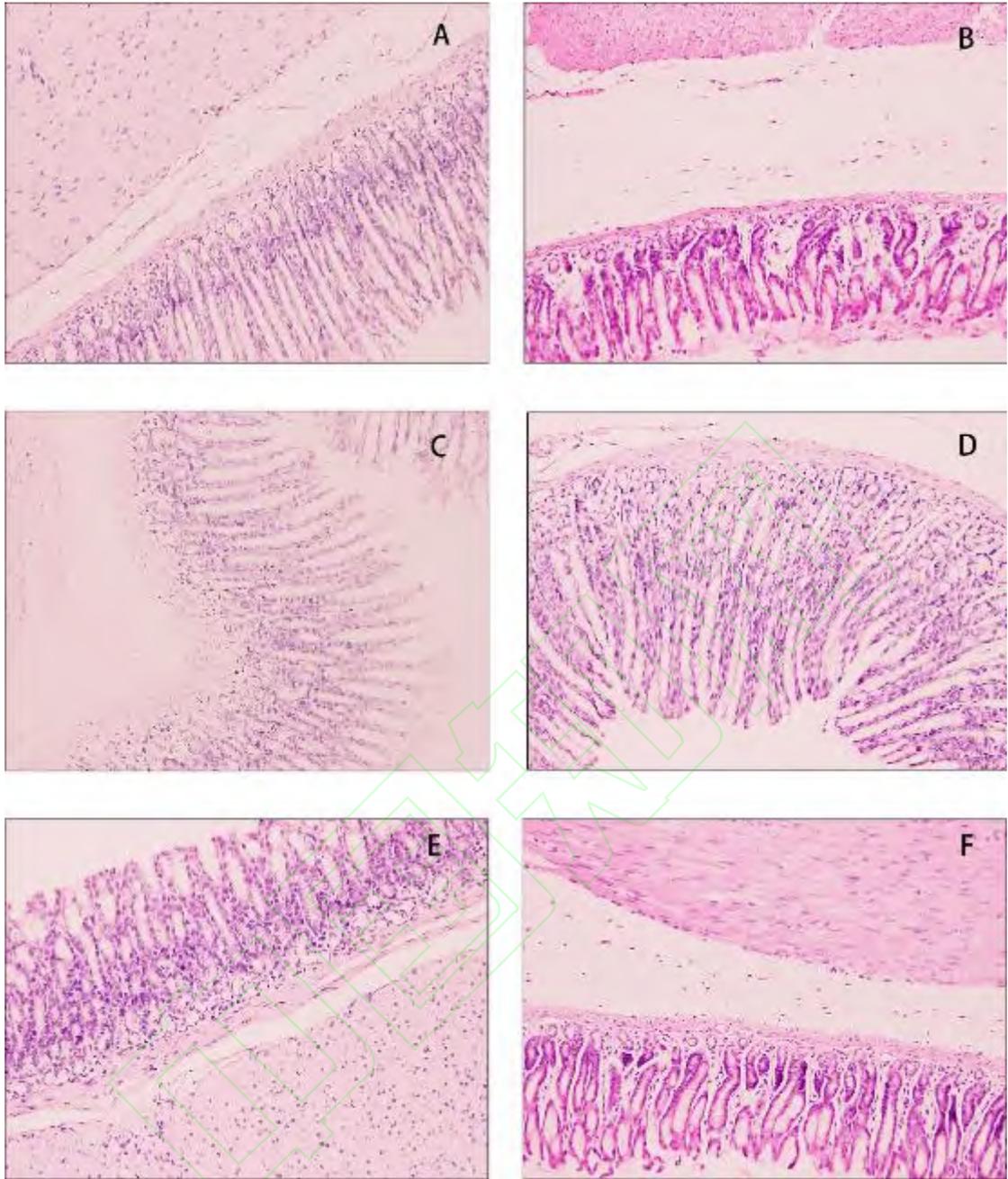


图1 实验各组大鼠胃组织病理切片镜检图 (×200)

(A: 正常对照组, B: 模型对照组, C: 实验观察 AH 组, D: 实验观察 AM 组, E: 实验观察 AL 组, F: 阴性对照组)

3.3 ULK1, Atg13, beclin-1 和 LC3 基因在 CAG 大鼠胃组织中的表达

与正常对照组比较, 模型对照组中 ULK1, Atg13, beclin-1, LC3 mRNA 表达没有明显差异 ($P>0.05$)。而与阴性对照组比较, 实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组在 ULK1, Atg13, beclin-1, LC3 的 mRNA 表达均有明显上

调 ($P < 0.05$)。而治疗组各组间的两两比较, 在 LC3 的表达上实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 ULK1 的表达上实验观察 AM 组的表达量最高, 实验观察 AH 和实验观察 AL 组次之间无差异 ($P > 0.05$); 在 Atg13 的表达上, 实验观察 AH 组表达高于实验观察 AM 组和实验观察 AL 组 ($P < 0.05$); 在 beclin-1 的表达上, 同样是实验观察 AH 组表达高于实验观察 AM 组和实验观察 AL 组 ($P < 0.05$)。

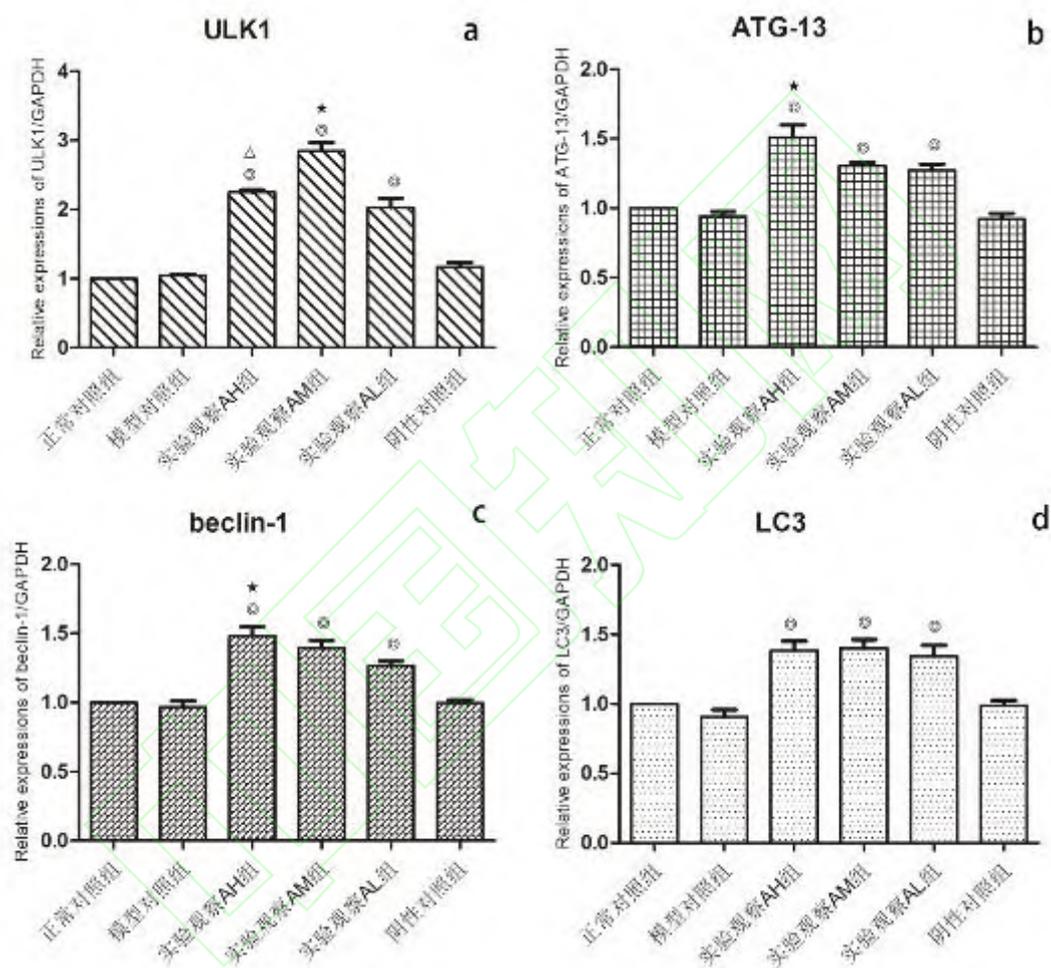


图2 实验各组大鼠胃组织中自噬相关基因的表达

((注 1: 与正常对照组比较 ◆ $P < 0.05$, 与阴性对照组比较 ◎ $P < 0.05$, 与实验观察 AL 组比较 ★ $P < 0.05$, 与实验观察 AM 组比较 △ $P < 0.05$)

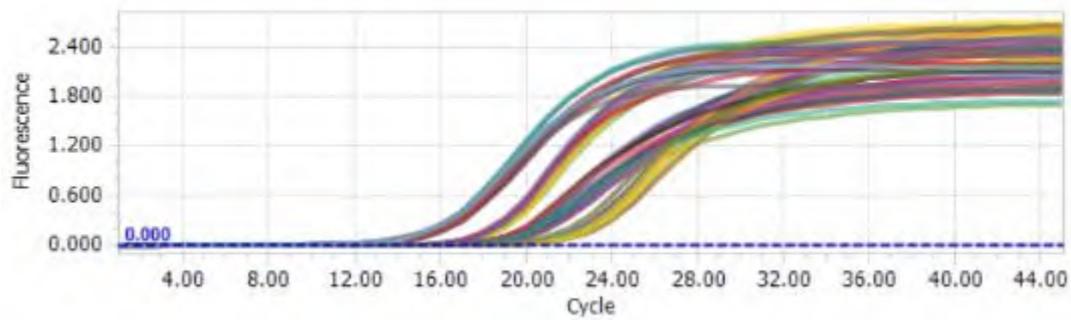


图 3 Real-time PCR 实验中扩增曲线

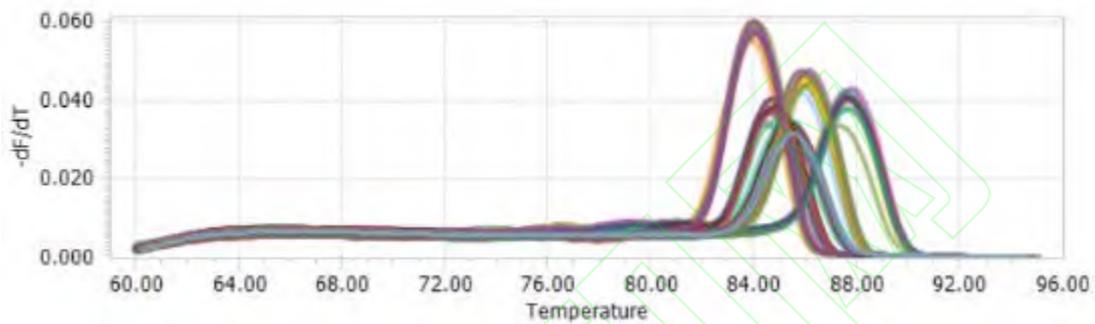


图 4 Real-time PCR 实验中熔解曲线

3.4 ULK1, Atg13, beclin-1 和 LC3 蛋白在 CAG 大鼠胃组织中的表达

与正常对照组比较, 模型对照组中 ULK1, Atg13, beclin-1 和 LC3 蛋白的表达量没有明显差异 ($P>0.05$)。而与阴性对照组比较, 实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组在 ULK1, Atg13, beclin-1, LC3 蛋白的相对表达则均有明显上调 ($P<0.05$)。治疗组各组间的两两比较, 在 ULK1 的表达上实验观察 AL 组的表达量最高, 实验观察 AH 和实验观察 AL 组之间无差异 ($P>0.05$); 在 Atg13, beclin-1 和 LC3 的相对表达上, 均为实验观察 AL 组的相对表达量最高, 实验观察 AH 组次之, 实验观察 AM 组最低 ($P<0.05$)。

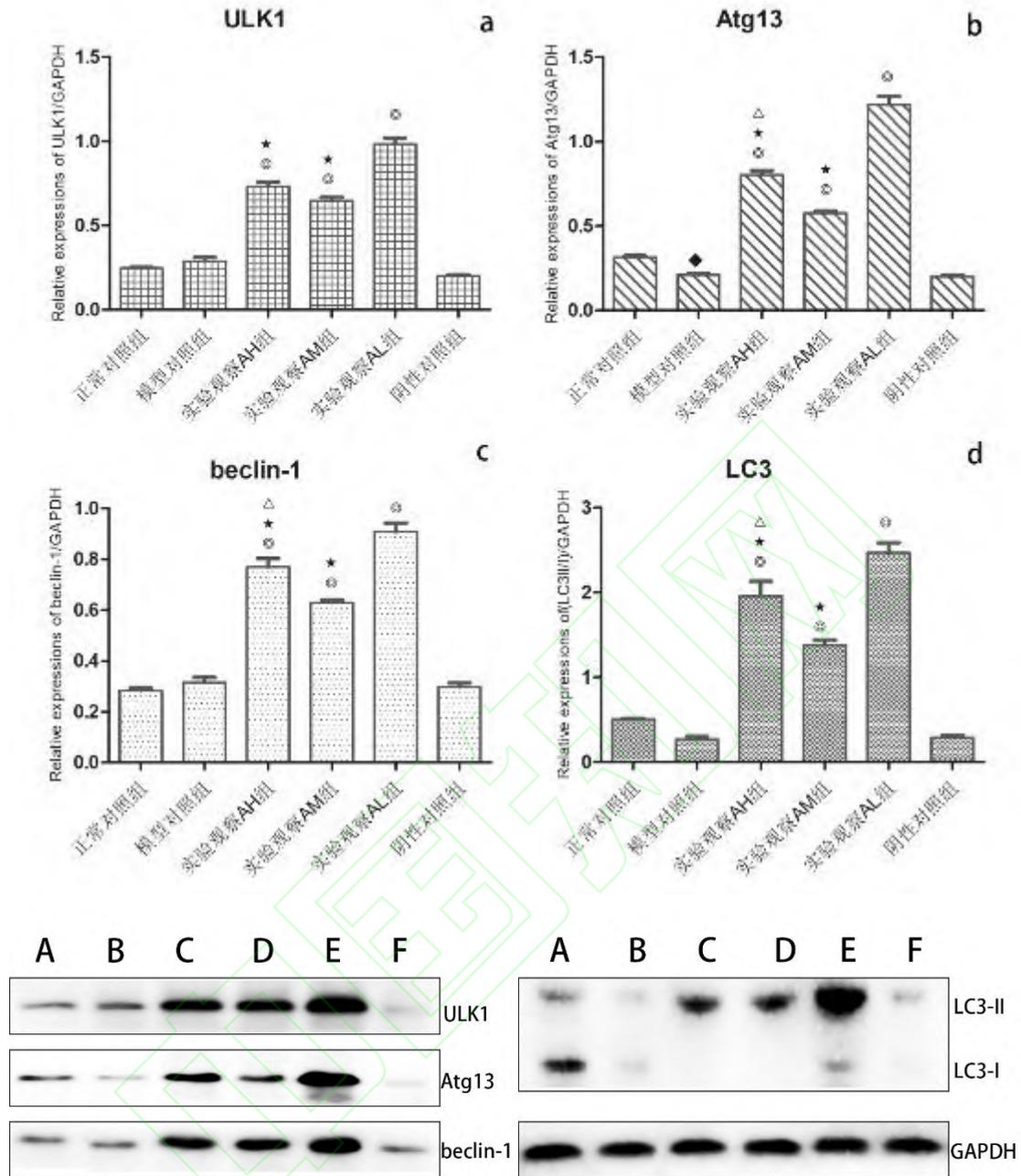


图5 实验各组大鼠胃组织中自噬相关蛋白的表达

(注 1: 与正常对照组比较 ◆ $P < 0.05$, 与阴性对照组比较 ◎ $P < 0.05$, 与实验观察 AL 组比较 ★ $P < 0.05$, 与实验观察 AM 组比较 △ $P < 0.05$ 注 2: A: 正常对照组, B: 模型对照组, C: 实验观察 AH 组, D: 实验观察 AM 组, E: 实验观察 AL 组, F: 阴性对照组)

3.5 透射电镜观测结果:

正常对照组 (图 6img2868) 细胞胞内线粒体 (M) 分布较均匀, 未见明显肿胀, 个别基质不匀, 少量嵴断裂; 粗面内质网 (RER) 少量局部轻度扩张, 表面

核糖体无明显脱颗粒；胞内未见明显自噬。模型对照组（图 6img6765）胞内线粒体（M）数量丰富，轻度肿胀，基质变浅，嵴排列较整齐、少量断裂；粗面内质网（RER）轻度扩张，表面核糖体无明显脱颗粒；胞内未见明显自噬。实验观察 AH 组（图 6img8809）胞内线粒体（M）数量丰富，未见明显肿胀，基质均匀，少量嵴断裂；粗面内质网（RER）扩张，部分空泡变；胞内可见较多自噬溶酶体（ASS，4 个）。实验观察 AM 组（图 6img7652）胞内线粒体（M）数量丰富，未见明显肿胀，基质均匀，少量嵴断裂；粗面内质网（RER）轻度扩张，表面核糖体无脱颗粒；胞内可见较多自噬溶酶体（ASS，5 个）。实验观察 AL 组（图 6img0770）胞内线粒体（M）分布较均匀，未见明显肿胀，个别基质不匀，少量嵴断裂；粗面内质网（RER）未见明显扩张，表面核糖体无明显脱颗粒；胞内可见较多自噬溶酶体（ASS，7 个）。阴性对照组（图 6img2902）胞内线粒体（M）数量丰富，轻度肿胀，基质变浅，嵴排列较整齐、少量断裂；粗面内质网（RER）轻度扩张，表面核糖体无明显脱颗粒；胞内未见明显自噬。

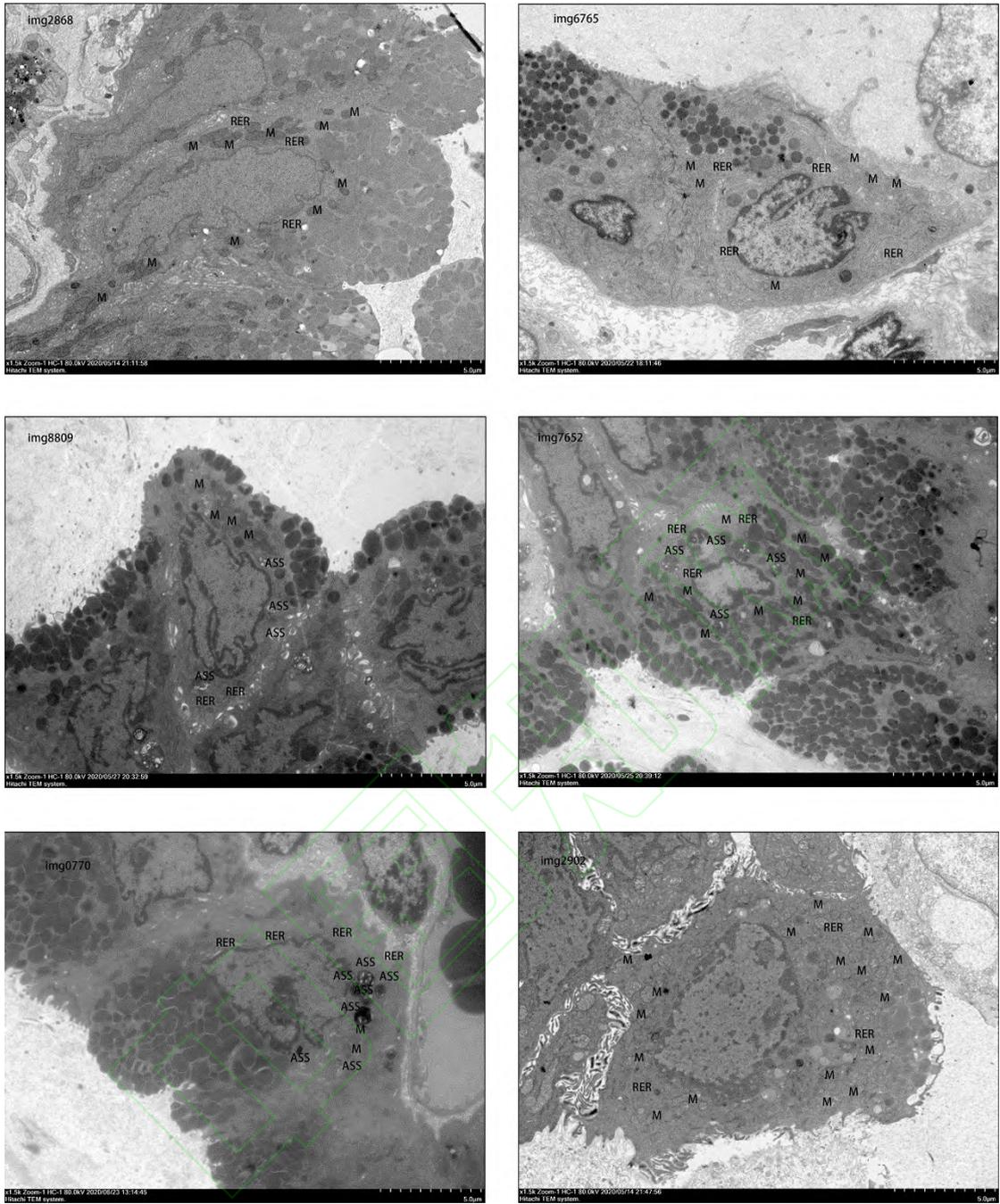


图6 透射电镜下实验各组大鼠胃组织镜检图

4. 讨论

在本研究中所涉及的几个因子均与自噬有重要关联，其中 ULK1 (unc-51 样自噬激活激酶 1) 是自噬启动步骤的主要调控因子，作为 Atg1 的同源蛋白，其具有启动自噬的功能^[12]，主要方式则是与黏着斑激酶家族的相互作用蛋白 FIP200、自噬相关蛋白 Atg13 和 Atg101 形成 ULK 复合体，该复合体的激活能进一步激活下游自噬信号通路，促进自噬小体的形成。其中 Atg13 参与 ULK 复合物的形成，

并且是通过 Atg13 其 c 端极短的肽链 (Thr478、Leu479 和 Gln480) 与 ULK1 直接结合^[13-15]。在本实验结果中, 我们可以看到在正常对照组, 模型对照组和阴性对照组这三组的 ULK1 和 Atg13 基因和蛋白表达的差异没有统计学意义; 而实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组中的 ULK1 和 Atg13 基因和蛋白表达对比阴性对照组的相对表达量有所提高, 且差异具有统计学意义。另外 ULK1 及其复合物作为自噬的启动因子, 也参与了大量下游自噬相关信号通路的调控, 其中 Beclin-1 就是 ULK1 的直接下游靶点之一^[16]。在本实验结果中, 正常对照组, 模型对照组和阴性对照组中的 Beclin-1 基因和蛋白的相对表达量的差异无统计学意义; 但实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组中的 Beclin-1 基因和蛋白表达对比阴性对照组的相对表达量显著提高, 差异具有统计学意义。而微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 作为自噬小体的重要构成蛋白, 是自噬发生的标志蛋白之一^[17], 其中最具意义的指标为 LC3II/LC3I。在本次实验结果中, 正常对照组, 模型对照组和阴性对照组中 LC3 基因相对表达量的差异无统计学意义; 但实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组中的 Beclin-1 基因对比阴性对照组的相对表达量具有提高, 差异具有统计学意义; 且该差异趋势在 Western blot 检测中 LC3II/LC3I 的比值上更为显著。

综上所述, 我们可以看到安胃汤干预可以提高 CAG 大鼠胃组织中 ULK1, Atg13, beclin-1 和 LC3 基因和蛋白的相对表达量。同时透射电镜下的微观结构观察结果中正常对照组, 模型对照组和阴性对照组中自噬溶酶体的数量极少或没有, 而实验观察 AH 组, 实验观察 AM 组和实验观察 AL 组中均发现不同数量的自噬溶酶体, 说明了其自噬水平的上升同时也与上述自噬相关因子检测的实验结果相互印证。最后, 安胃汤各治疗组之间的差异, 可能是由于最终得到的药液浓度在中药饮片煎煮浓缩的过程中存在一定误差, 但就实验结果来看, 无论是安胃汤哪个实验观察组在与阴性对照组相比较的情况下都具有明显差异, 由此可初步认为安胃汤在治疗 CAG 的过程中能够一定程度上增强自噬并缓解胃黏膜损伤。但自噬这个过程在机体中往往呈现出双向调节的作用, 同时在一些特定条件下也会发生, 其本身又分为多种类型涉及众多信号通路^[18-19], 因此鉴于生物机体环境的复杂性, 自噬与 CAG 的关联以及治疗机制应该需要体外实验或更深入的研究验证。

参考文献

- [1] Sipponen P, Maaros HI. Chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol*, 2015,50(6):657-67.
- [2] 韦维, 汪波, 万文雅, 等. 安胃汤干预慢性萎缩性胃炎大鼠 JAK/STAT 信号传导通路的作用机制. [J] 中医药导报, 2017,23(15):22-26.
- [3] 唐友明, 林寿宁, 朱永莘, 等. 安胃汤治疗胃溃疡的远期疗效观察. [J] 安徽中医学院学报, 2011,30(4):21-23.
- [4] 朱永莘, 韦维, 林寿宁, 等. 安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对 EGFmRNA 的影响. [J] 广西中医药, 2012,35(2):8-11.
- [5] 韦维, 林寿宁, 汪波, 等. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 PI3K/Akt 信号传导通路的影响. [J] 辽宁中医杂志, 2018,45(5):1088-1091+1122.
- [6] Wang X, Wu W, Gao J, et al. Autophagy inhibition enhances PD-L1 expression in gastric cancer. [J] *Exp Clin Cancer Res*, 2019,38(1):140-154.
- [7] Yamazaki T, Bravo-San Pedro JM, Galluzzi L, et al. Autophagy in the cancer-immunity dialogue. [J] *Adv Drug Deliv Rev*, 2020,169:40-50.
- [8] Zhang F, Chen C, Hu J, et al. Molecular mechanism of Helicobacter pylori-induced autophagy in gastric cancer. [J] *Oncol Lett*, 2019,18(6):6221-6227.
- [9] Xin L, Zhou Q, Yuan YW, et al. METase/lncRNA HULC/FoxM1 reduced cisplatin resistance in gastric cancer by suppressing autophagy. [J] *Cancer Res Clin Oncol*, 2019,145(10):2507-2517.
- [10] 李军祥, 陈喆, 吕宾, 等. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017 年). [J] 中国中西医结合消化杂志, 2018,26(2):121-131.
- [11] Liu Y, Xu W, Wang G, et al. Material basis research for Huangqi Jianzhong Tang against chronic atrophic gastritis rats through integration of urinary metabonomics and SystemsDock.[J] *Ethnopharmacol*, 2018,223:1-9.
- [12] Kuroyanagi H, Yan J, Seki N, et al. Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment.[J]*Genomics*, 1998,51(1):76-85.
- [13] Hara T, Takamura A, Kishi C, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. [J] *Cell Biol*, 2008,181(3):497-510.
- [14] Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. [J] *Mol Biol Cell*, 2009,20(7):1981-1991.
- [15] Hieke N, Löffler AS, Kaizuka T, et al. Expression of a ULK1/2 binding-deficient ATG13 variant can partially restore autophagic activity in ATG13-deficient cells. [J]*Autophagy*, 2015,11(9):1471-1483.
- [16] Russell RC, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. [J]*Nat Cell Biol*, 2013,15(7):741-750.
- [17] Johansen T, Birgisdottir ÅB, Huber J, et al. Methods for Studying Interactions Between Atg8/LC3/GABARAP and LIR-Containing Proteins. [J]*Methods Enzymol*, 2017,587:143-169.
- [18] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease.[J]*N Engl J Med*, 2013,368(19):1845-1846.
- [19] Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease.[J]*Nat Cell Biol*, 2018,20(5):521-527.