

- [28] 陈艳红,冯玉林.冰片的研究进展[J].中国社区医师(医学专业),2013,15(6):10-11.
- [29] 刘洋,张伯礼,胡利民.冰片的药理实验研究概况[J].天津中医药,2003,20(4):85-87.
- [30] 姚晓宝.竹茹中三萜类化合物的研究[D].杭州:浙江大学,2004.
- [31] Yang B,Chen H,Stanton C, et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease[J]. *J Funct Foods*, 2015, 15: 314-325.
- [32] 张立凤,钟涛,桂永浩.外源性视黄酸对斑马鱼心血管系统发育的影响[J].中国实验动物学报,2006,14(2):84-88;74.
- [33] Pascual A,Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(7):3908-3916
- [34] Hoeben A, Landuyt B, Highley M S, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(4):549-580.

清热化湿方对 MNU 联合幽门螺杆菌感染小鼠胃组织中 TNF- α 、IL-8 及 TLR-4 水平的影响

钟婵¹, 张涛², 黄李冰雪¹, 刘畅², 孙艳珍², 黄晓燕³, 陈远能^{2*}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530000; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科, 广西南宁 530000; 3. 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530000)

摘要: 目的 应用清热化湿方干预 N-甲基-N-亚硝基脲 (MNU) 联合幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染相关胃癌中 TNF- α 、IL-8、TLR-4 蛋白及其 mRNA 表达变化。方法 以 BALB/c 小鼠为研究对象, 除正常组外, 其余各组均采用 MNU 联合幽门螺杆菌灌胃法制备胃癌动物模型, 分成模型组、阳性对照组 (阿莫西林+克拉霉素+兰索拉唑肠溶片三联疗法)、清热化湿方组 (低、中、高剂量)。应用光镜以及透射电镜观察胃癌小鼠胃组织形态学改变及超微结构变化; 应用 Western blot、RT-PCR 技术检测胃黏膜 IL-8、TNF- α 、TLR-4 蛋白及 mRNA 表达变化。结果 正常组无异常改变; 模型组符合中分化腺癌改变; 清热化湿方组散在溃疡改变, 未见异型细胞; 阳性对照组炎症细胞浸润, 符合溃疡改变, 可见少许异型细胞。正常组无明显改变; 模型组细胞间隙连接结构严重破坏, 癌细胞散在于间质中; 清热化湿方组细胞间隙连接结构破坏, 见少许凋亡小体。阳性对照组, 细胞间隙连接结构破坏, 分化较差, 见少许凋亡小体。与正常组比较, 模型组 IL-8、TLR-4、TNF- α 蛋白及 mRNA 表达上升 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 清热化湿方组 IL-8、TLR-4、TNF- α 蛋白及 mRNA 表达下降。结论 通过清热化湿类方药干预, 可下调 TLR4、IL-8、TNF- α 的表达, 从而抑制癌细胞增殖, 发挥防治胃癌的效应。

关键词: 清热化湿方; TNF- α ; IL-8; TLR-4; 胃癌; 幽门螺杆菌

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)05-1339-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.045

胃癌仍然是全球癌症死亡的主要原因之一, 属亚洲地区分布最广^[1]。胃癌的病理发生机制颇为复杂, 受多因素、多基因的影响, 而幽门螺杆菌已被公认为致癌的关键因子^[2], 近几年已被成为研究防治胃癌的重要靶点。非可控性炎症使胃黏膜发生癌变成为必然趋势, 因此探讨幽门螺杆菌感染相关胃癌中炎症介质、肿瘤坏死因子的表达情况尤为重要。以中医药理论指导为基础, 前期课题组临床

研究观察清热化湿方能减轻炎症反应, 明显缓解幽门螺杆菌感染相关胃癌的作用反应。为进一步观察其防治胃癌的可能机制, 课题组开展清热化湿方对幽门螺杆菌相关胃癌中 TNF- α 、IL-8 及 TLR-4 表达研究。

1 材料

1.1 动物及菌株 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 90 只, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘)

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360531); 广西一流学科建设重点项目 (2018XK081)

作者简介: 钟婵 (1993—), 女, 硕士生, 从事消化系统疾病诊治研究。Tel: 15970119638, E-mail: 762099518@qq.com

* 通信作者: 陈远能 (1964—), 男, 教授, 从事消化系统疾病诊治研究。Tel: 13768118639, E-mail: cyn60668@aliyun.com

网络出版日期: 2019-01-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20190124.1719.002.html>

2001-0003, 合格证号 0060892, 实验单位使用许可证编号 SCXK (桂) 2010-0001。幽门螺杆菌悉尼菌株 SS1 系南昌大学第一附属医院消化疾病重点实验室惠赠。大鼠组织取材于广西中医药大学实验动物中心实验室。

1.2 仪器与试剂 哥伦比亚血琼脂基础 (批号 CM911)、无菌脱纤维绵羊血 (北京索莱宝科技有限公司); *N*-甲基-*N*-亚硝基脲 (MNU, 美国 Sigma 公司, 批号 N136701); Anti-TLR4 antibody (批号 AB13556)、Anti-TNF- α antibody (批号 AB6671), 均购自英国 Abcam 公司; IL-8 antibody (批号 38419, 美国 Sab 公司); RM2135 切片机 (德国徕卡公司); 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 离心机、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京华肽先锋生物科技有限公司)。

1.3 药物 清热化湿方 (藿香 6 g, 川厚朴 3 g, 姜半夏 4.5 g, 赤茯苓 9 g, 杏仁 9 g, 生薏苡仁 12 g, 白豆蔻 1.8 g, 猪茯苓 4.5 g, 淡豆豉 9 g, 泽泻 4.5 g, 黄连 12 g, 栀子 12 g) 购自广西中医药大学第一附属医院仁爱分院。上述药材用蒸馏水煎成药液, 浓缩, 配制成 1 g 生药/1 mL 药液, 过滤分装 4 °C 冰箱保存。兰索拉唑肠溶胶囊 (批号 H20065186, 扬子江药业集团有限公司, 15 mg); 阿莫西林胶囊 (批号 H44021351, 珠海联邦制药有限公司, 250 mg); 克拉霉素 (批号 H20031041, 江苏恒瑞医药有限公司, 500 mg)。

2 方法

2.1 幽门螺杆菌培养 将幽门螺杆菌悉尼菌株 SS1 系复苏后, 接种于 7% 琼脂羊血培养基中, 37 °C 细菌培养箱, 在厌氧条件下培养 48 h, 可见菌落长出, 将菌落刮下溶于布氏肉汤, 制成幽门螺杆菌菌液, 紫外分光光度计测浓度, 幽门螺杆菌菌液为 10⁹ CFU/mL。经快速尿素酶试验验证幽门螺杆菌培养成功。

2.2 模型制备 参照文献 [3] 将适应性喂养 1 周的 90 只健康 BALB/c 小鼠, 随机分成 6 组, 正常组、模型组、清热化湿方组 (低、中、高剂量)、阳性对照组 (抗幽门螺杆菌三联药)。除正常组外, 剩余各组均予小鼠幽门螺杆菌菌液 0.8 mL 灌胃, 隔天 1 次, 共 5 次。待幽门螺杆菌定植成功后开始进行分组干预, 不同剂量清热化湿方组的小鼠分别按低、中、高 (2.71、5.43、10.86 g/kg) 剂量灌胃, 1 d/次, 持续 28 周; 阳性对照组 (兰索拉唑肠溶胶囊+克拉霉素+阿莫西林) 的小鼠按成人用药的 6 倍给药灌胃。同时予干预组小鼠 MNU 悬液 [MNU-水 (5 mg : 3 mL)] 0.3 mL 灌胃, 每周 1 次, 持续 10 周; 并注意观察各小鼠一般情况。末次给药后处死全部小鼠, 沿胃小弯纵轴将胃组织分为两半, 一半做快速尿素酶试验, 另一半置于 10% 中性甲醛、电镜固定液中备测。

2.3 小鼠胃组织形态学改变及超微结构变化 常规 HE 染色, 光镜下观察炎症和癌变情况; 使用醋酸铀染色, 透射电镜下观察小鼠胃黏膜超微结构变化。

2.4 RT-PCR 检测胃黏膜 IL-8、TLR-4 及 TNF- α mRNA 表达 以 β -actin 为内参, 检测胃黏膜 IL-8、TLR-4 及 TNF- α

mRNA 表达, 采用 TRIzol 法提取 RNA, 然后取 2 μ g RNA 进行逆转录得到 cDNA, 将逆转录的 cDNA 稀释 10 倍, 作为模板进行 PCR 检测。反应条件为 95 °C 120 s~95 °C 5 s~60 °C 30 s, 35~40 循环。以目的基因与内参的 mRNA 表达比值作为目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	正向 GAGACCTTCAACACCCAGC	263
β -actin	反向 ATGTCACGCACGATTTCCC	
TLR-4	正向 TCCCTGCATAGAGGTAGTTCCTAA	233
TLR-4	反向 AGAGGTGGTGTAAAGCCATGC	
TNF- α	正向 ACAGAAAGCATGATCCGCGA	245
TNF- α	反向 TGGTGGTTTGTGAGTGTGAGG	
IL-8	正向 CATCTTCGTCGGTCCCTGTG	278
IL-8	反向 ACAGAAGCTTCATTGCCGGT	

2.5 Western blot 检测胃黏膜 IL-8、TLR-4 及 TNF- α 蛋白表达 以 GAPDH 抗体为内参, 检测胃黏膜 IL-8、TLR-4 及 TNF- α 蛋白表达, 采用凝胶成像系统扫描, 以特异性条带浓度与面积的乘积为有效值, 反映蛋白表达水平。具体步骤为蛋白制备, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜、封闭、抗原抗体反应, 显色、检测分析。

2.6 统计方法 用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布, 采用方差分析; 等级资料采用秩和检验。以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 造模第 13 周开始, 模型组部分小鼠出现精神差、食欲不振、毛发脱落、慵懒嗜睡等现象, 有 4 只小鼠死亡; 正常组小鼠一般情况尚可; 清热化湿方组、阳性对照组中各有 2 只小鼠死亡。经解剖发现, 模型组部分死亡的小鼠腹腔脏器有穿孔、粘连、局部黑变等现象。

3.2 光镜下各组小鼠胃黏膜组织病理学变化 图 1 可见光镜下正常组无改变; 小鼠胃癌造模成功率约 70%, 模型组癌变率占 66.67%, 模型组符合中分化腺癌改变; 药物干预后, 清热化湿方组散在溃疡改变, 未见异型细胞。阳性对照组炎症细胞浸润, 符合溃疡改变, 可见少许异型细胞。

3.3 吉姆萨染色检测各组小鼠幽门螺杆菌感染情况 图 2 可见正常组无幽门螺杆菌感染; 模型组、阳性对照组、清热化湿方组胃黏膜细胞核呈蓝色或紫色, 胞浆呈粉红色, 幽门螺杆菌呈平滑的淡蓝色至蓝色, 弯曲状或弧形, 菌体清楚, 主要分布在胃黏膜及胃小凹表面, 呈单个散在、片灶状或成团聚集, 组织背景清晰, 胃黏膜病变易见。提示模型组、阳性对照组、清热化湿方组幽门螺杆菌定植成功。

3.4 各组电镜下小鼠胃黏膜超微结构变化 图 3 可知正常组无明显改变; 模型组细胞间隙连接结构严重破坏, 癌细胞散在于间质中; 清热化湿组细胞间隙连接结构破坏, 分化较差的上皮细胞和肠化生细胞核质比大于 1, 见少许凋亡小体。阳性对照组细胞间隙连接结构破坏, 分化较差, 见少许凋亡小体。

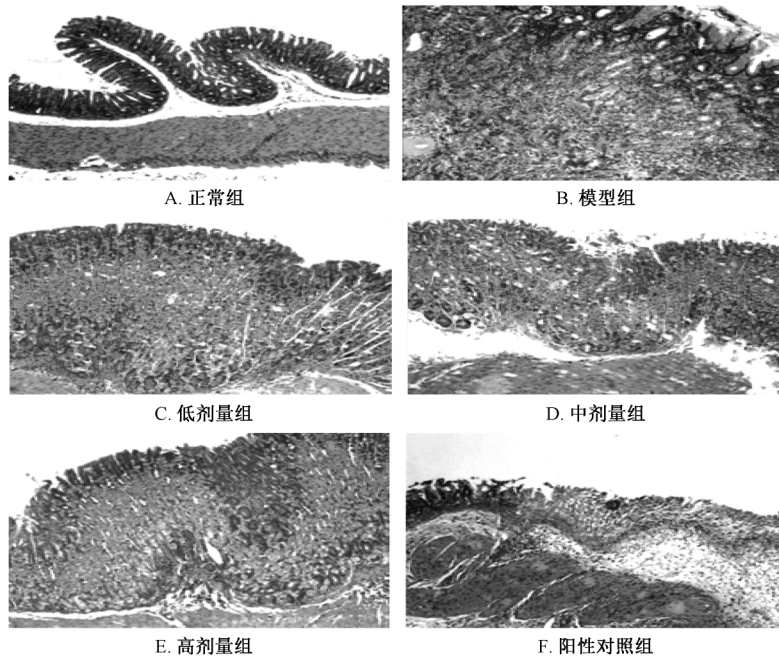


图1 光镜下各组小鼠胃黏膜组织病理学变化

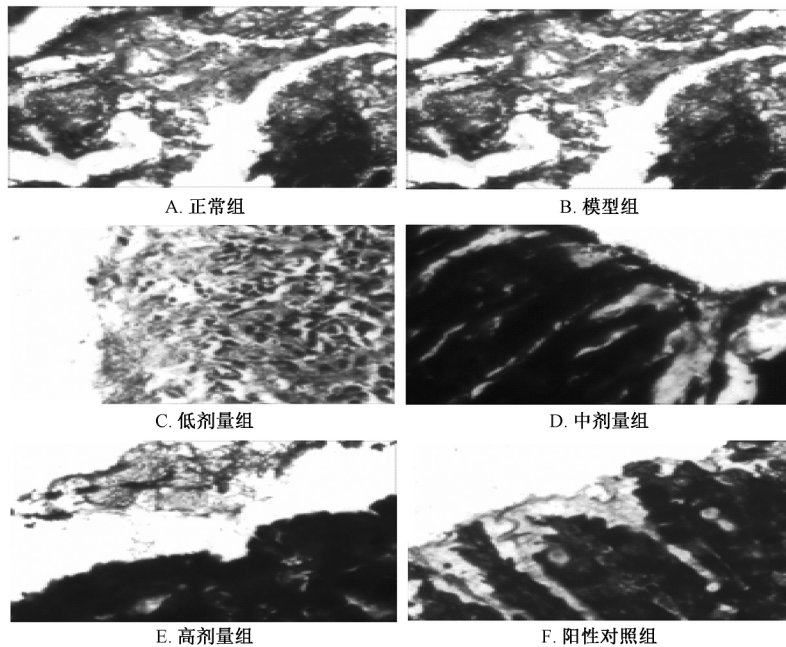


图2 吉姆萨染色检测各组小鼠幽门螺杆菌感染情况 (×40)

3.5 各组小鼠胃黏膜 IL-8、TLR-4、TNF- α 蛋白表达 与正常组比较,模型组 IL-8、TLR-4、TNF- α 表达上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,清热化湿方组 IL-8、TLR-4、TNF- α 表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.6 各组小鼠胃黏膜 IL-8、TLR-4、TNF- α mRNA 表达 与正常组比较,模型组 IL-8、TLR-4、TNF- α 表达上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,清热化湿方组 IL-8、TLR-4、TNF- α 表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图5。

4 讨论

以中医理念探讨胃癌病机,祖国医学认为,饮食不节,情志失调,脾胃受损,运化升降失常,使气结痰凝,瘀停热蕴,气、痰、瘀、毒互结胃腑而成。中医胃癌治则始终以保护脾胃正气,推动其运化生气血,条达升降之职。课题组以清热化湿、健脾和胃的治则,选择清热化湿方探讨该方防治胃癌的相关机制;方中淡豆豉、藿香芳香透湿,开郁阳气;藿香、白蔻仁、厚朴芳香化湿,佐半夏行运脾化湿之功;杏仁开泄肺气于上焦,肺气宣降,水道自调,而治湿宜利小便,水道通调,则湿有去路,故茯苓、猪苓、

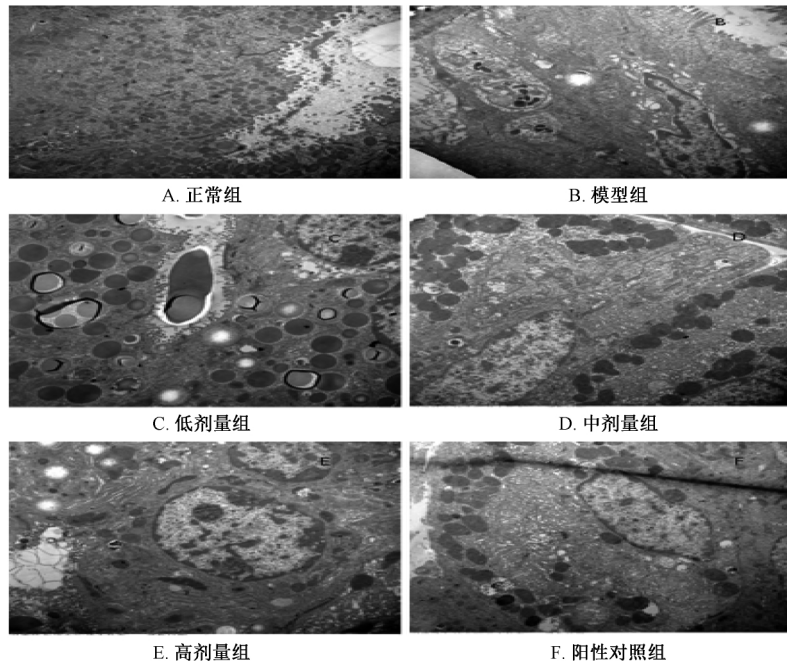
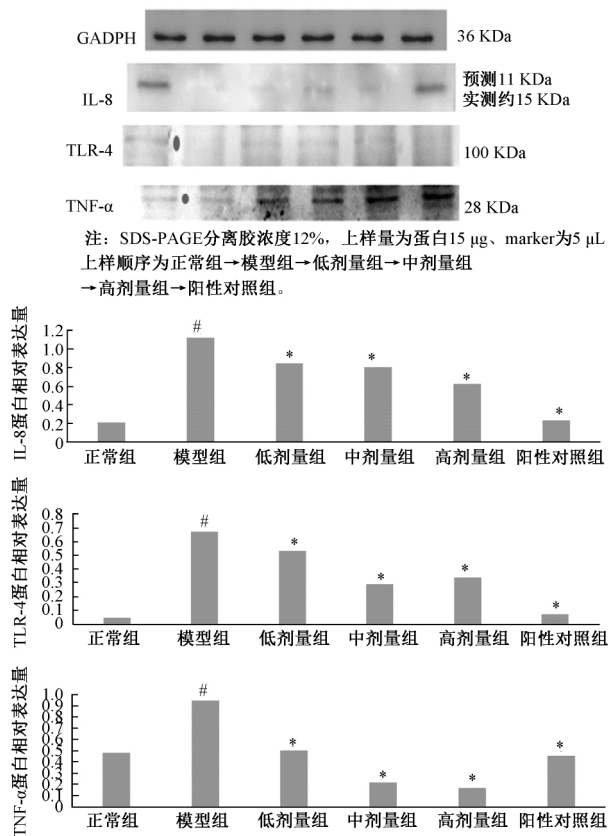


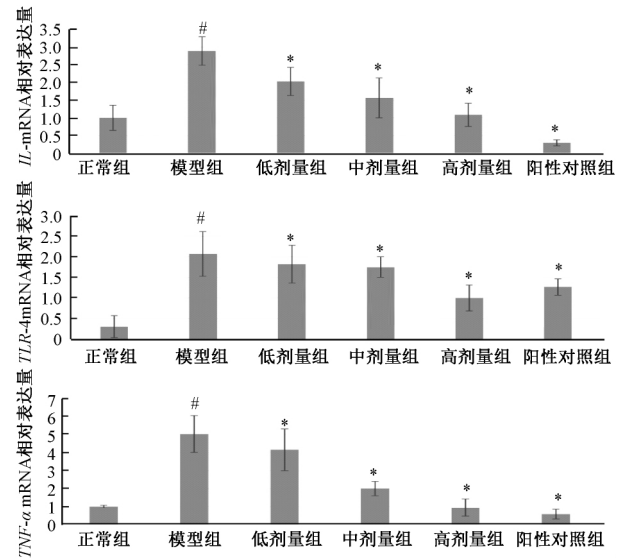
图3 各组小鼠电镜下胃黏膜超微结构变化 (×12 000)



注: 与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

图4 各组小鼠胃黏膜 IL-8、TLR-4、TNF-α 蛋白表达

泽泻、薏苡仁相伍通渗下焦。黄连擅清中焦湿热之邪，栀子清三焦之火。诸药合用，宣化表里湿热，通调上、中、下三焦，奏清热化湿、健脾和胃功效^[4-7]。



注: 与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

图5 各组小鼠胃黏膜 IL-8、TLR-4、TNF-α mRNA 表达

研究报道，幽门螺杆菌感染参与了胃癌的演变过程^[8]，幽门螺杆菌可刺激胃上皮细胞产生炎症因子，如 IL-8、TNF-α 等，而幽门螺杆菌要启动炎症因子必须借助 TLR-4 受体，该受体参与识别细菌细胞壁中的脂多糖 (LPS)，几乎所有的 TLRs 都能激活 MyD88 依赖性的通路而诱发炎症反应，而有相关报道说明，在 MiR-155 的多个靶点中，MyD88 被认为是 IL-8 调控的靶点，MiR-155 可能通过抑制翻译而下调蛋白 MyD88 的表达进而降低 IL-8 的产生^[9-10]。经研究表明，幽门螺杆菌感染可促进 IL-8 在胃黏膜中过度表达，且 IL-8 的高表达与胃癌预后不良呈直接相关^[11]。相关研究表明 IL-8 rs4073 多态性可能作为亚洲人胃

癌的遗传生物标记物^[12]。相关 Meta 分析表明, *TNF- α* 基因多态性与胃癌风险有关, 尤其是对亚洲人而言^[13]。据研究表明, *TNF- α* -85 7C/T、*IL-8*-845 T/C 功能多态性均可明显增加胃癌或慢性胃炎的发生风险, 还观察到多态性 C 等位基因携带者的 *IL-8* 基因表达水平显著增高^[14]。研究发现, TLR-4 中的 rs4986790 和 rs4986791 多态性可以作为预测幽门螺杆菌诱发胃癌风险的遗传标记^[15]。这进一步阐明 *IL-8*、TLR-4、*TNF- α* 均参与诱导炎症免疫, 且在胃癌的进展中起重要作用。由此说明, 由慢性胃炎发展至胃癌过程中, 必须在幽门螺杆菌感染基础上通过介导 TLR-4 信号通路激活下游靶基因 *MyD88*, 使 AP-1 转录因子产生核易位进而调节 *IL-8*, 此时 *TNF- α* 也加速了炎症反应进程。本研究发现, 清热化湿方干预 MNU 联合幽门螺杆菌感染小鼠后, 其胃黏膜组织 *IL-8*、*TNF- α* 及 TLR-4 蛋白和 mRNA 表达均呈下降趋势, 提示清热化湿类方药可以调控 *IL-8*、*TNF- α* 、TLR-4 表达, 发挥防治胃癌的效应。基于本实验结果, 下一步可以从胃癌的靶向分子治疗角度, 筛选出与 TLR-4 信号通路密切相关靶基因, 拟采用分子生物技术调控该靶基因下游相关蛋白, 并检测相关指标表达。同时结合清热化湿方药进行干预, 进一步揭示清热化湿类方药干预胃癌的作用机理与有效靶点, 开拓中医药防治胃癌的新领域。

参考文献:

[1] Venerito M , Vasapolli R , Rokkas T , et al . Gastric cancer: epidemiology , prevention , and therapy [J]. *Helicobacter* , 2018 , 23 (Suppl 1) : e12518 .
[2] Amedei A , Munari F , Bella C D , et al . Helicobacter pylori secreted peptidyl prolyl cis , trans-isomerase drives Th17 inflammation in gastric adenocarcinoma [J]. *Intern Emerg Med* , 2014 , 9 (3) : 303-309 .
[3] 孙艳珍 , 张 涛 , 陈良荣 , 等 . 幽门螺杆菌联合 MNU 灌胃法制备 balb/c 小鼠胃癌模型研究 [J]. *重庆医学* , 2017 , 46 (20) : 2806-2808 ; 2811 .
[4] 张 涛 , 陈远能 , 张保静 , 等 . 基于 CD14 及 *IL-1 β* 变化探讨清热化湿颗粒剂干预慢性糜烂性胃炎临床研究 [J]. *中成药* , 2012 , 34 (5) : 787-790 .

[5] 张保静 , 黄会云 , 张 涛 , 等 . 基于 CD14 表达及胃癌 SGC-7901 细胞凋亡变化探讨清热化湿类方药防治胃癌研究 [J]. *时珍国医国药* , 2013 , 24 (6) : 1354-1356 .
[6] 张保静 , 陈远能 , 张 涛 , 等 . 基于 CD14 , *IL-1 β* 表达及 SGC-7901 细胞凋亡变化探讨清热化湿方防治胃癌的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志* , 2013 , 19 (20) : 246-250 .
[7] 张 涛 , 黄会云 , 陈思羽 , 等 . 稳定沉默 CD14 胃癌 SGC-7901 细胞系变化及清热化湿类方药干预研究 [J]. *时珍国医国药* , 2015 , 26 (3) : 762-765 .
[8] Kumar S , Dhiman M . Inflammasome activation and regulation during Helicobacter pylori pathogenesis [J]. *Microb Pathog* , 2018 , 125 : 468-474 .
[9] Lee K E , Khoi P N , Xia Y , et al . Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol* , 2013 , 19 (45) : 8192-8202 .
[10] Tang B , Xiao B , Liu Z , et al . Identification of MyD88 as a novel target of miR-155 , involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation [J]. *FEBS Lett* , 2010 , 584 (8) : 1481-1486 .
[11] Ramis I B , Vianna J S , Goncalves C V , et al . Polymorphisms of the *IL-6* , *IL-8* and *IL-10* genes and the risk of gastric pathology in patients infected with *Helicobacter pylori* [J]. *J Microbiol Immunol Infect* , 2017 , 50 (2) : 153-159 .
[12] Wang X , Yang F , Xu G , et al . The roles of *IL-6* , *IL-8* and *IL-10* gene polymorphisms in gastric cancer: A meta-analysis [J]. *Cytokine* , 2018 , 111 : 230-236 .
[13] Xu T , Kong Z , Zhao H . Relationship between tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis [J]. *Front Physiol* , 2018 , 9 : 469 .
[14] De Oliveira J G , Rossi A F , Nizato D M , et al . Influence of functional polymorphisms in *TNF- α* , *IL-8* , and *IL-10* cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer [J]. *Tumour Biol* , 2015 , 36 (12) : 9159-9170 .
[15] Loganathan R , Nazeer M , Goda V , et al . Genetic variants of TLR4 and TLR9 are risk factors for chronic *Helicobacter pylori* infection in South Indian Tamils [J]. *Hum Immunol* , 2017 , 78 (2) : 216-220 .