

# 益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MEK/ERK 的影响

刘小莲 谢晶日 李明  
(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

**摘要:**目的:研究益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MEK/ERK 的影响。方法:75 只 Wistar 大鼠被随机分成模型组、空白组、中药低剂量组、中药高剂量组和维霉素组,每组 15 只。采用以 MNNG 为主的四因素联合造模法建立胃癌前病变的大鼠模型,维霉素组给予维霉素混悬液 1.0g/kg 每日 1 次灌胃;中药低剂量组、中药高剂量组大鼠分别给予生药浓度为 1.0g/mL、2.0g/mL 的益气养阴活血方中药煎剂(10mL/kg)每日 1 次灌胃。16 周后观察大鼠胃黏膜病理变化,以及对 MEK1 和 ERK1 水平的影响。结果:模型组大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平与空白组比较升高 ( $P<0.05$ ), 中药高剂量组大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平与模型组比较降低( $P<0.05$ ),中药高剂量组大鼠胃黏膜病理改变得到改善。结论:益气养阴活血法可改善胃癌前病变大鼠胃黏膜病理状况,下调胃黏膜 MEK1 及 ERK1 水平。

**关键词:** 益气养阴活血法;胃癌前病变;MEK;ERK

**Abstract:**Objective:To study the effect of Yiqi Yangyin Huoxue principle on the MEK/ERK pathway in rats with precancerous lesions of gastric carcinoma. Method: 75 Wistar rats were randomly divided into model group, normal control group, low dose group, high dose group and weimeisu group. The rat model of precancerous lesions of gastric carcinoma (PLGC) was established by four pathogenic factors in which MNNG was mainly used. Weimeisu was given 1.0g/kg per day in weimeisu group; Yiqi Yangyin Huoxue recipe of 1.0g/mL, 2.0g/mL drug concentration were given 10mL/kg per day in low dose group and high dose group. After 16 weeks, to observe the pathological changes in rat gastric mucosa as well as MEK1 and ERK1 levels. Result: The level of MEK1 and ERK1 in model group was significantly increased compared with normal control group ( $P<0.05$ ). The level of MEK1 and ERK1 in high dose group was significantly reduced compared with the model group ( $P<0.05$ ). The pathological changes were significantly improved in high dose group. Conclusion: Yiqi Yangyin Huoxue principle can improve the pathological conditions of gastric mucosa in rat with PLGC, and it can also prevent the progress of PLGC by reducing MEK1 and ERK1 levels.

**Key words:** Yiqi Yangyin Huoxue principle; Precancerous lesions of gastric carcinoma; MEK; ERK

中图分类号: R 735.2

文献标识码: B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.06.002

胃癌前病变 (PLGC) 是指胃黏膜上皮异型增生、胃黏膜肠上皮化生等病理组织学改变,是胃黏膜从正常向胃癌转化过程中的一个重要阶段。我们的临床实践和研究发现,发生在慢性萎缩性胃炎基础上的胃癌前病变往往具有口干渴、裂纹舌、胃黏膜萎缩、胃液分泌不足等胃阴不足等特征,提出以益气养阴活血法为主治疗 PLGC 的理论。前期研究表明益气养阴活血法可使 PLGC 大鼠胃黏膜炎症、超微结构明显改观,可部分逆转胃黏膜的肠化生和异型增生,有效地抑制胃癌前病变的发展<sup>[1,2]</sup>。本实验目的在于研究益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MAPK 通路核心因子 MEK1、ERK1 的影响。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠 75 只, 体重 60~80g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 益气养阴活血方系黄芪、焦术、沙参、石斛、三棱、莪术、白花蛇舌草等组成,由黑龙江中医药大学附属医院制剂室制成 1.0g/mL、2.0g/mL 的中药煎剂。维酶素片购自北海阳光药业有限公司, N- 甲基 -N'- 硝基 -N- 亚硝基胍 (MNNG) 购自日本东京化成工业株式会社, 食用酒精购自黑龙江华润酒精有限公司, ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

江中医药大学附属第一医院药剂室制成 1.0g/mL、2.0g/mL 的中药煎剂。维酶素片购自北海阳光药业有限公司, N- 甲基 -N'- 硝基 -N- 亚硝基胍 (MNNG) 购自日本东京化成工业株式会社, 食用酒精购自黑龙江华润酒精有限公司, ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

## 2 实验方法

2.1 动物模型 将 MNNG 溶于水中让大鼠自由饮用, 饮水瓶用油漆涂黑避光, MNNG 应用时新鲜配制, 浓度为 100μg/mL, 灌胃量 2 mL/ 只。辅以 35% 无水乙醇 2 mL/ 只每周一、四下午灌胃各 1 次, 60℃ 热面糊 2mL/ 只每周二、五下午灌胃各 1 次。含雷尼替丁 0.3g/kg 的标准饲料喂养, 造模时间 16 周。

2.2 分组与处理 75 只大鼠随机分为空白组、模型组、维霉素组、中药低剂量组 (简称低剂量组)、中药高剂量组 (简称高剂量组), 每组 15 只, 在相同条件下, 分笼饲养, 适应性饲养 3d 后开始实验。空白组损伤作用。

## 参考文献

[1]金惠铭.病理生理学[M].北京:人民卫生出版社,2009.136-138  
[2]邵枫,林文娟,王玮雯.心理应激的免疫抑制作用及神经内分泌反应的相关性[J].心理学报,2001,33(1): 43-47  
[3]万瑜,杨钢,万曙霞,等.肾素 - 血管紧张素系统 - 应激激素反应系统[J].生理学报,1996,48(6): 521-522  
[4]陈新,赵英,何爱桃,等.心理应激前后血液中部分血管活性物质浓度的变化[J].中国行为医学科学,2003,12(2): 148-149

(收稿日期: 2010-05-06)

组饲以普通标准饲料及灭菌自来水,其余各组进行造模。在造模基础上,维霉素组给予维霉素混悬液 1.0g/kg 每日 1 次灌胃;低剂量组、高剂量组大鼠分别给予生药浓度为 1.0g/mL、2.0g/mL 的中药煎剂 (1mL/kg) 每日 1 次灌胃;模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃。

2.3 处死与取材 实验结束后所有动物禁食 24h (自由饮水),然后全部脱臼处死,处死后迅速剖腹取胃,沿胃大弯剪开,预冷的 0.01 mol/L PBS 漂洗,将胃组织平铺于冰盘上,肉眼观察胃黏膜变化情况后,于胃窦部剪取黄豆大组织 2 块,液氮处理后于 -86℃超低温保存统一进行 ELISA 检测。

2.4 MEK1、ERK1 的 ELISA 检测 准确称取 1g 胃窦组织,按 1:9(W:V)比例加入预冷生理盐水,放入匀浆器碾磨,使组织充分匀浆制成 10%组织匀浆,低温离心机 3 000 r/min 离心 15min,取上清液待测。依照次序在酶标板对应空白微孔中分别加入 50μL 的标准品;标记样品编号,加入 50μL 样品于空白微孔中,在样品孔中加入 10μL 的生物素标记液;在标准品孔和样品孔中加入 100μL 的酶标记溶液; (36± 2)℃孵育反应 60min;洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20s;每孔加入底物 A、B 液各 50μL; (36± 2)℃下避光孵育反应 15min; 每孔加入 50μL 终止液,终止反应。于波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值,以 OD 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标绘制标准曲线,根据样品的 OD 值查找对应的浓度范围。

2.5 统计方法 用统计软件 SPSS15.0 进行统计分析,检验资料正态性和方差齐性,计量资料以( $\bar{X} \pm S$ )表示。当资料满足正态分布且组间方差齐同时,应用单因素方差分析;如不满足上述条件则采用秩和检验方法。

3 结果

3.1 大鼠的一般状况 空白组大鼠神态安逸,活动敏捷,两眼有神,被毛光泽,紧密贴身,食量较大,体态正常,大便呈颗粒状,肛周洁净。模型组多数大鼠精神萎靡,活动少而迟钝,被毛松散无泽,食量较少,形态消瘦,拱背,粪便时有不成形。中药治疗组和维霉素组状态介于二者之间,上述症状明显轻于模型组。实验过程中空白组、模型组、低剂量组、高剂量组和维霉素组大鼠死亡数分别为 3、1、1、2、2 只。

3.2 胃黏膜病理 模型组大鼠胃黏膜腺体大部分萎缩消失,胃小凹延长,大量炎细胞浸润,甚至有淋巴细胞聚集及淋巴滤泡形成,基底部腺体上皮增

生,可见肠化生的杯状细胞,核深染甚至双核,部分腺体结构不规则,有的出现背靠背现象,有的出现共壁现象。高剂量组大鼠胃黏膜上皮相对完整,细胞形态较均一,固有膜内腺体排列整齐紧密,散见少量的淋巴细胞,腺上皮和腺管分界清楚,炎细胞浸润主要局限于黏膜浅层。低剂量组和维霉素组大鼠胃黏膜变化介于二者之间。

3.3 MEK1 水平 各组 MEK1 结果符合正态分布,各组间方差齐 (Levene Statistic=0.611,  $P=0.657$ ),故采用参数检验中单因素方差分析进行统计。单因素方差分析显示,各组间差异具有统计学意义 ( $F=27.795, P<0.0005$ )。见表 1。组间 Bonferroni 检验显示,模型组 MEK1 水平 (122.09± 12.48) 与空白组比较 (78.11± 8.69) 明显增高; 中药低、高剂量组 [(97.38± 11.86)、(88.75± 10.96)] 与模型组比较 MEK1 水平降低,且高剂量组比维霉素组 (107.29± 13.30) 效果更显著 ( $P<0.01$ )。见表 2。

| 表 1 MEK1 单因素方差分析总体检验 |           |     |          |        |
|----------------------|-----------|-----|----------|--------|
|                      | 平方和       | 自由度 | 均方       | F      |
| 组间                   | 14740.294 | 4   | 3685.073 | 27.795 |
| 组内                   | 8087.439  | 61  | 132.581  |        |
| 合计                   | 22827.733 | 65  |          | 0.000  |

| 表 2 MEK1 组间 Bonferroni 检验 pg/mL |        |       |                                         |                                        |
|---------------------------------|--------|-------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| 组别                              | 均值     | 标准差   | 差异                                      | P                                      |
| 模型组                             | 122.09 | 12.48 | -                                       | -                                      |
| 空白组                             | 78.11  | 8.69  | 43.98 <sup>△</sup>                      | 0.000 <sup>△</sup>                     |
| 低剂量组                            | 97.38  | 11.86 | 24.71 <sup>△</sup>                      | 0.000 <sup>△</sup>                     |
| 高剂量组                            | 88.75  | 10.96 | 33.35 <sup>△</sup> /-18.54 <sup>△</sup> | 0.000 <sup>△</sup> /0.001 <sup>△</sup> |
| 维霉素组                            | 107.29 | 13.30 | 14.81 <sup>△</sup> /-29.17 <sup>*</sup> | 0.021 <sup>△</sup> /0.000 <sup>*</sup> |

注:△:与模型组比较;△:与维霉素组比较;△:与空白组比较。

3.4 ERK1 水平 各组 ERK1 值经检验均符合正态分布且组间方差齐,故采用单因素方差分析进行统计,结果总体  $F=10.081 (P<0.005)$ ,表明各组间差异具有统计学意义。见表 3。组间 Bonferroni 检验显示,模型组 ERK1 水平与空白组比较显著增高 ( $P<0.005$ ); 中药高剂量组与模型组比较 ERK1 水平显著降低 ( $P<0.01$ ),效果优于维霉素组 ( $P<0.05$ )。见表 4。

| 表 3 ERK1 单因素方差分析总体检验 |            |     |           |        |
|----------------------|------------|-----|-----------|--------|
|                      | 平方和        | 自由度 | 均方        | F      |
| 组间                   | 148777.990 | 4   | 37194.498 | 10.081 |
| 组内                   | 225061.525 | 61  | 3689.533  |        |
| 合计                   | 373839.515 | 65  |           | 0.000  |

| 表 4 ERK1 组间 Bonferroni 检验 pg/mL |        |       |                                          |                          |
|---------------------------------|--------|-------|------------------------------------------|--------------------------|
| 组别                              | 均值     | 标准差   | 差异                                       | P                        |
| 模型组                             | 378.72 | 66.58 | -                                        | -                        |
| 空白组                             | 249.68 | 79.59 | 129.04 <sup>△</sup>                      | 0.000 <sup>△</sup>       |
| 低剂量组                            | 315.49 | 51.53 | 63.22 <sup>△</sup>                       | 0.104 <sup>△</sup>       |
| 高剂量组                            | 281.98 | 46.39 | 96.74 <sup>△</sup> /-77.87 <sup>△</sup>  | 0.002/0.018 <sup>△</sup> |
| 维霉素组                            | 359.85 | 52.92 | 18.87 <sup>△</sup> /-110.17 <sup>*</sup> | 1.000/0.000 <sup>*</sup> |

注:△:与模型组比较;△:与维霉素组比较;△:与空白组比较。

4 讨论

MAPK 信号通路是真核生物信号传递网络中的重要途径之一,在基因表达调控(下转第 28 页)

贲门失弛缓症是一种原发性食管神经肌肉病变所致的食管动力学功能障碍性疾病,以食管体部正常运动消失及吞咽时下食管括约肌松弛不良为特征,也被称为巨食管症或贲门痉挛。本病的发生率约为 1/10 万,男女发病比例大致相同,30~50 岁多见。其病因尚不清楚,最新研究发现本病食管内层环形肌与外层纵行肌之间神经丛的神经节细胞退行性变、减少或消失,肌间神经周围有淋巴细胞和嗜酸性细胞浸润,肌层明显肥厚,从而导致肌层神经丛退化,一氧化氮(NO)合成酶释放 NO、血管活性肠肽(VIP)、降钙素相关肽(CGRP)等多肽明显减少,致使食管蠕动功能失调<sup>[9]</sup>。其主要特征是食管失蠕动、食管下端括约肌高压和对吞咽动作的松弛反应减弱,临床表现为咽下困难、食物反流以及胸骨后不适或疼痛。常因精神刺激、进食过猛、上呼吸道感染等诱因而发病或病情加重。本病属中医“噎膈”、“反胃”、“呕吐”的范畴,其发病机理为情志不调,忧思易怒,肝郁气结,痰气交阻所致。《医宗必读·反胃噎膈》云:“大抵气血亏损,复因悲怒忧思,则脾胃受伤,血液渐耗,郁气生痰,痰则塞而不通,气则上而不下,妨碍通路,饮食难进,噎膈所由成也。”本病虽病位在食道,但属胃气所主,正如《灵枢·四时气》云:“饮食不下,膈塞不通,邪在胃脘。”本病还与肝、脾、肾密切相关,三脏与食道、胃均有其经络联系,功能上,脾为胃行其津液,肝气之疏泄及肾阳之温煦亦有助于胃气和降,因此肝、脾、肾如

(上接第 4 页)和细胞质功能活动中发挥关键作用,而 MEK/ERK 是 MAPK 信号转导通路三级激酶级联反应的重要组成部分。ERK 是将信号从表面受体传导至细胞核的关键,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞凋亡和细胞恶变等多种生物学反应,其异常或过度表达在细胞恶性转化及演进中起重要作用。MEK (MAPK/ERK 激酶)对 ERK 的 Tyr/Thr 双特异性磷酸化具有重要的生理意义,因为 ERK 信号通路在细胞信号转导网络中处于枢纽地位,任何错误的活化都会对细胞生命活动产生深远的影响,而这种双特异性的识别和激活机制,大大提高了信号转导的准确性,防止了 ERK 的错误激活<sup>[3]</sup>。

已有研究发现,幽门螺杆菌在体外可诱导胃癌细胞 AGS 中 ERK1、ERK2 的活化<sup>[4]</sup>,但在人体的胃癌组织中 ERK1、ERK2 是否表达以及其与胃癌临床病理的关系仍不清楚。ERK1、ERK2 在胃癌组织

有病可影响食道及胃而渐生噎膈<sup>[7]</sup>。其治疗以降逆和中、理气止痛、益气健脾为主要法则,每见显效。

半夏泻心汤出自《伤寒论》,由半夏、黄芩、干姜、人参、炙甘草、黄连、大枣组成,具有和中降逆、消痞之功,主治中阳虚损、脾胃不和、寒热错杂所致之呕、利、痞,表现心下痞满,呕而肠鸣等证。方中选半夏为君,以降逆止吐;芩、连、姜寒热并用,辛开苦降,和中平逆止呕;加大党参用量以补益脾胃;加入白蔻仁、砂仁化湿和中止吐;全方标本兼治,恢复健运,故疗效满意。可回收防反流食管支架治疗贲门失弛缓症具有操作简便、并发症少、回收方便、疗效好等优点。半夏泻心汤与可回收防反流食管支架合用可达到标本兼治的目的,且此法方便有效,患者易于接受,依从性也较好,所选患者均按要求完成了治疗,是治疗贲门失弛缓症的有效治疗方法。

#### 参考文献

- [1]徐恩斌,张忠兵,张雷,等.贲门失弛缓症发病机制的初步探讨[J].中华消化内镜杂志,2004,21(5):320-322
- [2]朱瑶.贲门失弛缓症诊治进展[J].云南医药,2006,27(4):400-402
- [3]王志纯,张德昌,马贵,等.贲门失弛缓症腔内支架术的应用价值[J].临床军医杂志,2004,32(1):50-52
- [4]Ramacciatto G, Mercantini P, Amodio P M, et al. The laparoscopic approach with antireflux surgery is superior to the thoracoscopic approach for the treatment of esophageal achalasia? Experience of a single surgical unit[J]. Surg Endosc, 2002, 16(10): 1431-1437
- [5]West RL, Hirsch DP, Bartelsman JF, et al. Long term results of pneumatic dilation in achalasia followed for more than 5 years[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(6): 1346-1351
- [6]罗金燕,牛春燕.功能性胃肠病与胃肠动力疾病的新概念[J].中华消化杂志,2002,22(9):554
- [7]陶可胜,吕树进,许太玉,等.贲门失弛缓症的中西医结合治疗进展[J].山东中医杂志,2004,23(4):251

(收稿日期:2010-06-21)

中呈高表达,提示 ERK1 与胃癌相关,ERK1 信号传导途径可能参与了胃癌细胞的增殖和分化过程。虽然针对 MAPK 和 ERK 与胃癌的相关研究较多,但是对 MEK 与胃癌的相关研究则基本属于空白。本项研究发现,胃癌前病变大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平升高,而益气养阴活血法可降低胃癌前病变大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平,并使胃黏膜病理改变得到改善,在一定程度上可干预胃癌前病变的进展,具有早期防治胃癌的效果。

#### 参考文献

- [1]谢晶日,王海强,张杨.益气养阴活血法对胃癌前病变干预的研究[J].临床医学杂志,2007,14(21):63-65
- [2]谢晶日,李明,张杨.慢性萎缩性胃炎中医治疗体会[J].中医药信息,2008,25(6):52-53
- [3]李宗海. Ras/Raf/MEK/Erk 通路调控细胞功能的机制[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2000,20(1):12-14
- [4]王群英,林煥建,钟慧闽,等.幽门螺杆菌过氧化氢酶对 SW480 细胞中 NF- $\kappa$ B 和 ERK 通路的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(7):629-633

(收稿日期:2010-08-17)