

黄芪多糖对胃癌前病变模型大鼠胃黏膜P53、P65、VEGF蛋白表达及AI的影响

徐静雯^{1*},王楠²(1.山东中医药大学第一临床医学院,济南 250112;2.山东省肿瘤医院外九科,济南 250112)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3069-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.14

摘要 目的:探讨黄芪多糖对胃癌前病变(PLGC)模型大鼠胃黏膜P53、P65、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白及细胞凋亡指数(AI)的影响。方法:将60只大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、维酶素片组(阳性药物,0.01 g/kg)和黄芪多糖低、高剂量组(0.5、1.0 g/kg),除正常对照组外,其余各组复制PLGC模型。建模成功后,各给药组大鼠ig相应药物,正常对照组和模型对照组大鼠ig生理盐水,每天1次,连续8周。检测各组大鼠胃黏膜P53、P65、VEGF蛋白的表达及AI,并观察胃黏膜病理变化。结果:与正常对照组比较,模型对照组及各给药组大鼠胃黏膜P53、P65、VEGF蛋白表达增强($P<0.05$),AI降低;胃黏膜有变薄、欠光滑、黏液减少等PLGC现象。与模型对照组比较,各给药组大鼠胃黏膜P53、P65、VEGF蛋白表达减弱、AI升高,且黄芪多糖低、高剂量组上述指标变化较维酶素片组更为明显($P<0.05$);胃黏膜病理情况得到改善。与黄芪多糖低剂量组比较,黄芪多糖高剂量组大鼠胃黏膜P53、P65、VEGF蛋白表达减弱、AI升高更为明显($P<0.05$)。结论:黄芪多糖可下调PLGC模型大鼠P53、P65、VEGF蛋白表达,降低AI,从而控制PLGC进展。

关键词 黄芪多糖;胃癌前病变;细胞凋亡;基因突变;大鼠

Effects of Astragalus Polysaccharides on the Protein Expression of P53, P65, VEGF and AI in Gastric Mucosa of Rats with Precancerous Lesions of Gastric Cancer

XU Jingwen¹, WANG Nan²(1.The First Clinical Medical College of Shandong University of TCM, Jinan 250112, China;2.Surgical Ward 9, Shandong Cancer Hospital, Jinan 250112, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of astragalus polysaccharides on the protein expression of P53, P65 and vascular endothelial growth factor (VEGF) and apoptosis index (AI) in rats with precancerous lesions of gastric cancer (PLGC). **METHODS:** 60 rats were randomly divided into normal control group, model control group, Vitacoenzyme tablet group (positive drug, 0.01 g/kg), astragalus polysaccharide low-dose and high-dose groups (0.5, 1.0 g/kg). Except for normal control group, PLGC model was induced in those groups. After modeling, those groups were given relevant medicine intragastrically, and normal control group and model control group were given normal saline intragastrically, once a day, for 8 weeks. The protein expression of P53, P65, VEGF in gastric mucosa and AI of rats were determined, and the pathological changes of gastric mucosa was observed. **RESULTS:** Compared with normal control group, the protein expression of P53, P65, VEGF in gastric mucosa increased in model control group and treatment groups ($P<0.05$), while AI decreased; gastric mucosal lesions occurred like thin, less smooth, less mucus and other precancerous lesions. Compared with model control group, protein expression of P53, P65, VEGF in gastric mucosa decreased in treatment groups, while AI increased; the changes of above indexes in astragalus polysaccharide low-dose and high-dose groups were more significant than in Vitacoenzyme tablet group ($P<0.05$); the pathological changes were improved. Compared with astragalus polysaccharide low-dose group, the protein expression of P53, P65, VEGF in gastric mucosa decreased in high-dose group, while AI increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** Astragalus polysaccharide can down-regulate the protein expression of P53, P65, VEGF in PLGC model rats and down-regulate AI so as to control the progress of PLGC.

KEYWORDS Astragalus polysaccharide; Precancerous lesions of gastric cancer; Apoptosis; Gene mutation; Rats

胃癌为消化道常见恶性肿瘤,其病死率居恶性肿瘤第2位^[1]。以往研究认为,胃癌的发生与胃黏膜上皮细胞无限增殖所引起的细胞集聚、原癌基因激活及抑癌基因活性丧失有关^[2]。据近年研究报道,胃癌患者不仅伴胃黏膜上皮细胞异常增生,同时伴生存素、核转录因子等凋亡抑制因子失衡等现象^[3]。慢性萎缩性胃炎(CAG)、胃癌前病变(PLGC)患者为胃癌高危人群。CAG与长期吸烟、饮酒和幽门螺杆菌感染有关,患者胃黏膜多伴炎性细胞浸润,有肠化生、异常增生的表现^[4];PLGC在CAG基础上伴不完全肠上皮化及中、重度异型增生。目前,对

PLGC多采用维酶素片治疗,可改善患者胃部黏膜病变、减轻炎症、预防胃癌、抑制癌细胞表达,但长期服用有一定副作用,安全性欠佳^[5]。据文献报道,中医药对PLGC有较好的治疗效果,以益气活血法为主,其在胃癌及PLGC中应用较为广泛,且疗效肯定。黄芪为常用益气药,其有效成分为黄芪多糖,目前已被证实具有高效抗病毒、抗炎症、抗氧化、抗肿瘤作用,在PLGC免疫系统调控、促进抗癌细胞素分泌中有积极作用^[6]。本研究拟以PLGC大鼠为模型动物,以维酶素片为阳性药物,考察黄芪多糖对PLGC模型大鼠P53、P65、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白以及细胞凋亡指数(AI)的影响,旨在将黄芪多糖研发为多靶点、多环节的新型抗肿瘤药物提供实验依据。

* 中医师,博士研究生。研究方向:中医内科学。E-mail: 773808510@qq.com

1 材料

1.1 仪器

BX-51 光学显微镜、DP-70 图像采集系统(日本 Olympus 公司);Ventana-ES 全自动免疫组化仪(美国 Ventana 公司);高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪多糖(南京泽郎医药科技有限公司,批号:ZL110421,纯度: $>80\%$);维酶素片(四川大冢制药有限公司,批号:20110601,规格:0.2 g/片);甲基硝基亚硝基胍(MNNG,东京仁成工业株式会社制造);兔抗人 P53、P65 单克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒(批号:NRPB32)均购自武汉博士德微生物有限责任公司;脱氧核糖核酸末端转移酶介导 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号:090606);VEGF 免疫组化检测试剂盒(上海明丰生物科技有限公司,批号:100663);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

健康 SD 大鼠 60 只,♂,体质量 140~170 g,由山东大学动物实验中心提供[合格证号:SCXK(鲁)2003-0004]。室内温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照适宜,湿度为 55%~65%,通风良好,大鼠分笼饲养,喂全价营养颗粒饲料,自由饮水。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将大鼠随机分为 5 组,即正常对照组、模型对照组、维酶素片组(0.01 g/kg,人临床用量的等效剂量)与黄芪多糖低、高剂量组(0.5、1.0 g/kg,人临床用量的 0.5、2 倍剂量),每组 12 只。除正常对照组外,其余各组大鼠均采用 MNNG 法^[1]复制 PLGC 模型。造模大鼠每天自由饮用 150 $\mu\text{g/ml}$ MNNG 溶液,配以饥饿失常处理(双日饱食、单日禁食),持续 12 周;正常对照组大鼠自由饮水,并配以相同的饥饿失常处理。12 周末,每组选 2 只大鼠,以 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉,暴露游离胃部,取胃体、胃窦标本,光镜下观察,若胃黏膜出现上皮非典型增生、肠上皮化生则视为造模成功。造模成功后,各给药组大鼠 ig 相应药液,正常对照组和模型对照组 ig 生理盐水(20 ml/kg),每天 1 次,连续 8 周。期间各组大鼠均自由摄食饮水。

2.2 取材及指标检测

末次给药 0.5 h 后,10% 水合氯醛麻醉大鼠,取腹主动脉血,分离血清,然后脱颈椎处死大鼠,取完整胃组织。10% 多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,切片,采用苏木精-伊红(HE)染色,观察大鼠胃黏膜病理变化。并采用免疫组化法检测胃黏膜 P53、P65、VEGF 蛋白的表达;采用 TUNEL 法检测胃黏膜 AI,实验操作均按照相应试剂盒说明书进行。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠胃黏膜病理观察结果

正常对照组大鼠胃黏膜表面光滑、皱襞完整,上皮细胞呈单层柱状,排列整齐、规律,无脱落、缺损,胃底腺形态规则,主细胞、黏液细胞、壁细胞分布正常,黏膜肌层可见少量环层排列平滑肌纤维;模型对照组大鼠胃黏膜变薄、欠光滑、黏液减少,呈暗红色或红白相间,部分可见陈旧性出血点,伴环状或点状糜烂,黏膜皱襞低平、走向紊乱,黏膜下层血管暴露,上皮细胞不完整,可见上皮细胞坏死、脱落,伴浆细胞、淋巴细胞浸

润,伴散在单核、中性粒细胞及嗜酸细胞,胃底腺减少,结构不规则,且排列紊乱;维酶素片组大鼠胃黏膜病变有所改善,黏膜肌层稍有增厚,间质可见炎性细胞浸润,部分黏膜腺体结构不规则,伴少部分腺体扩张,可见壁细胞空泡样变性;黄芪多糖低剂量组大鼠胃黏膜上皮结构稍不规则,细胞排列较整齐,腺体扩张减轻,坏死黏膜减少,黏膜层及固有层炎性细胞浸润减少;黄芪多糖高剂量组大鼠胃黏膜细胞上皮结构趋向规则,细胞排列相对整齐,坏死黏膜减少或消失,腺体形态改善,未见明显坏死,固有层、黏膜层炎性细胞浸润明显减少。各组大鼠胃黏膜病理图片见图 1。

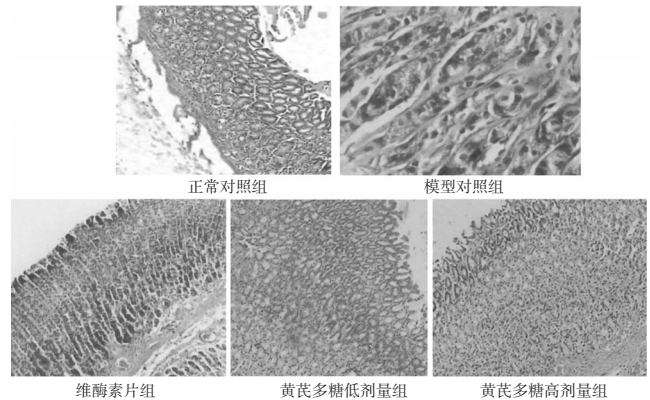


图 1 各组大鼠胃黏膜病理图片(HE, $\times 40$)

Fig 1 The pathological pictures of gastric mucosa of rats in each group(HE, $\times 40$)

3.2 各组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,模型对照组及各给药组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达增加($P < 0.05$);与模型对照组比较,各给药组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达减少($P < 0.05$);与维酶素片组比较,黄芪多糖低、高剂量组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达减少($P < 0.05$);与黄芪多糖低剂量组比较,黄芪多糖高剂量组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达减少($P < 0.05$)。各组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达测定结果见表 1。

表 1 各组大鼠胃黏膜 P53、P65 蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 1 The protein expression of P53 and P65 in gastric mucosa of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, g/kg	P53	P65
正常对照组		11.21 \pm 1.56	2.47 \pm 1.62
模型对照组		28.22 \pm 2.16*	56.94 \pm 27.43*
维酶素片组	0.01	17.46 \pm 1.32**	33.75 \pm 17.72**
黄芪多糖低剂量组	0.5	15.87 \pm 1.46** ^Δ	20.81 \pm 5.34** ^Δ
黄芪多糖高剂量组	1.0	12.95 \pm 1.85** ^Δ ^Δ	12.84 \pm 6.84** ^Δ ^Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.05$;与维酶素片组比较, ^Δ $P < 0.05$;与黄芪多糖低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, ^{*} $P < 0.05$; vs. vitacoenzyme tablet group, ^Δ $P < 0.05$; vs. astragalus polysaccharide low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠胃黏膜 AI 与 VEGF 蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,模型对照组及各给药组大鼠胃黏膜 AI 降低、VEGF 蛋白表达增加($P < 0.05$);与模型对照组比较,各给药组大鼠胃黏膜 AI 升高、VEGF 蛋白表达减少($P < 0.05$);与维酶素片组比较,黄芪多糖高、低剂量组大鼠胃黏膜 AI 升高、VEGF 蛋白表达减少($P < 0.05$);与黄芪多糖低剂量组比较,黄芪多糖高剂量组大鼠胃黏膜 AI 升高、VEGF 蛋白表达减少($P < 0.05$)。各组大鼠胃黏膜 AI 与 VEGF 蛋白表达测定结果见表 2。

表2 各组大鼠胃黏膜AI与VEGF蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 The AI and protein expression of VEGF in gastric mucosa of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量, g/kg	AI, %	VEGF
正常对照组		10.56 ± 2.31 [#]	176.23 ± 28.91 [#]
模型对照组		3.32 ± 2.64 [*]	265.25 ± 38.26 [*]
维酶素片组	0.01	5.68 ± 0.52 ^{**}	238.66 ± 24.11 ^{**}
黄芪多糖低剂量组	0.5	7.53 ± 0.32 ^{**Δ}	210.42 ± 21.23 ^{**Δ}
黄芪多糖高剂量组	1.0	9.89 ± 0.36 ^{**ΔΔ}	184.12 ± 22.72 ^{**ΔΔ}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型对照组比较,[#] $P<0.05$;与维酶素片组比较,^Δ $P<0.05$;与黄芪多糖低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal control group, ^{*} $P<0.05$; vs. model control group, [#] $P<0.05$; vs. vitacoenzyme tablet group, ^Δ $P<0.05$; vs. astragalus polysaccharide low-dose group, ^Δ $P<0.05$

4 讨论

现代医学研究证实,黄芪富含多糖、皂苷、氨基酸、叶酸等多类微量元素,可强化机体免疫抵抗力、利尿、保肝,且抗应激、抗衰老、抗氧化、抗菌作用显著,黄芪多糖为其主要活性成分^[8]。黄芪多糖有较强的抗肿瘤作用,可增强B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞活性,促进免疫因子释放,强化机体免疫功能,抵抗外界不良因子的入侵^[9]。此外其还可通过调节神经-内分泌-免疫系统发挥作用,对诱导干扰素有其积极作用,可促进细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖。

PLGC指发生于癌变前的胃黏膜病理学改变,是正常胃黏膜向胃癌转变的过程,诱导PLGC细胞凋亡是防治胃癌的重要途径。Liding C等^[10]研究显示,在胃癌形成过程中,原癌基因被激活、抑癌基因活性丧失是促进肿瘤生长的原因。P53为抗癌基因,其介导的细胞信号转导在调节细胞正常生命活动中发挥着重要作用,P53基因功能失调或突变可导致肿瘤恶性增生、加速癌变。Bathaie SZ等^[11]研究显示,约有50%肿瘤组织中P53基因发生突变,为肿瘤常见的遗传学改变。本研究结果显示,维酶素片组和黄芪多糖低、高剂量组大鼠胃黏膜组织中P53蛋白表达均明显下调。

P65蛋白是核因子 κ B(NF- κ B)蛋白因子重要组成部分,正常情况下,NF- κ B蛋白与其相关抑制蛋白(IKB)结合为复合体,稳定存在于细胞质内。当受到外界因素刺激时,IKB被磷酸化,在蛋白水解酶作用下降解,从而激活NF- κ B蛋白进入细胞核,与DNA模块特异性蛋白结合,促进P53核移位并聚集于细胞核内,导致NF- κ B蛋白异常激活、促进转录、影响正常信号通路转导、促进癌变、提高抑凋亡蛋白表达、抑制癌细胞凋亡、加速癌症进展。Manikandan P等^[12]研究发现,P65在胃癌患者胃黏膜组织上皮细胞浆及细胞核内表达水平较正常人群高,故认为NF- κ B蛋白异常激活与胃癌的发生及进展存在密切联系,可将P65蛋白水平作为评估胃癌良/恶性的有效标志。本实验结果显示,模型对照组大鼠胃黏膜P65蛋白表达较正常对照组明显升高,表明PLGC大鼠存在NF- κ B蛋白异常激活现象;在给予药物干预后,给药组大鼠胃黏膜P65蛋白水平均明显降低,表明NF- κ B蛋白异常激活现象得到改善。

VEGF为反映肿瘤细胞生长的相关指标,其过度表达可诱导肿瘤细胞和血管内皮细胞增殖,增加血管通透性,促进细胞分裂、增生、转化,参与肿瘤的进展、浸润及转移,其高表达与肿瘤进展有关。且在癌病及肿瘤形成的早期过程中,常伴大部分癌细胞凋亡表现,与癌前病变机体为平衡癌细胞增殖所产生的调节机制有关。细胞凋亡组基因快速、规律降解,以预防肿瘤发生及进展,但在肿瘤形成后,抗凋亡基因失活,导致

癌细胞聚集速率增加,肿瘤生长速度加快,影响组织分化、发育及自身稳定,更易出现恶性病变。Nakamura M等^[13]研究显示,在胃黏膜癌变过程中,可能存在细胞选择性增殖现象,其中部分细胞保留且增殖,部分细胞则因凋亡而被淘汰。其中具备高增殖能力的细胞可形成稳定高增殖性群体,降低AI、加快细胞聚集速率、促进肿瘤生长。本研究中,模型对照组AI低于其他各组,表明肿瘤生长速度加快;但采用药物干预后,AI升高,表明增殖细胞群体减少、癌变进程延缓。

综上,黄芪多糖可下调PLGC大鼠P53、P65、VEGF蛋白表达,升高AI,减轻PLGC大鼠胃黏膜损伤,对控制PLGC进展有积极的作用。

参考文献

- [1] 李雪平,惠起源.胃癌发生部位变化的流行病学研究进展[J].中国医药导报,2014,11(17):160.
- [2] 何钦,陶飞宝,叶旭星,等.益气、化痰、清热中药对胃癌前病变患者Th1/Th2免疫漂移的影响[J].中国药房,2015,26(17):2367.
- [3] 李海文,潘华峰,赵自明,等.胃痞消对胃癌前病变大鼠血浆肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-4表达的影响[J].广州中医药大学学报,2015,32(2):271.
- [4] 郭喜军,张颜伟,赵见文,等.胃癌前病变大鼠中抑癌基因APC、P16表达与浊毒的相关性研究[J].河南中医,2011,31(10):1119.
- [5] 陈欣童,蒋红玉,陈李华,等.胃炎康加维酶素对胃癌前病变的作用及其机理研究[J].中医药学刊,2004,22(9):1703.
- [6] 刘跃华,黄静,王雍,等.注射用黄芪多糖联合化疗治疗中晚期胃癌的疗效[J].实用医学杂志,2011,27(3):516.
- [7] Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M. Animal models of stomach carcinogenesis[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5):636.
- [8] 李岩,王垂杰.中药不同组方对胃癌前病变模型大鼠胃黏膜细胞ROS、Ca²⁺表达的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2012,20(10):447.
- [9] 何文涓,袁志坚,何晓升,等.黄芪多糖的药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2012,33(5):692.
- [10] Liding C, Xue W, Xiao DC, et al. Comparison between the digestive behaviors of a new in vitro rat soft stomach model with that of the in vivo experimentation on living rats: motility and morphological influences[J]. *J Food Eng*, 2013, 117(2):183.
- [11] Bathaie SZ, Hoshyar R, Miri H, et al. Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer[J]. *Biochem Cell Biol*, 2013, 91(6):397.
- [12] Manikandan P, Vinothini G, Vidya Priyadarsini R, et al. Eugenol inhibits cell proliferation via NF-kappaB suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG[J]. *Invest New Drug*, 2011, 29(1):110.
- [13] Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, et al. New pharmaceutical treatment of gastric MALT lymphoma: anti-angiogenesis treatment using VEGF receptor antibodies and celecoxib[J]. *Curr Pharm Design*, 2014, 20(7):1097.

(收稿日期:2016-03-09 修回日期:2016-06-01)

(编辑:林静)