

参白颗粒介导细胞焦亡通路阻断胃癌前病变炎症癌转化作用机制的研究

张希颜,曹峻文,张忠绵,陶婧娜,张丽菊,陈嘉钦,王岚,林子力,张晶滢,贺柏翔,李志红*

北京中医药大学东直门医院 消化科,北京 100700

【摘要】 目的 探讨参白颗粒阻断胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)炎症癌转化的作用机制。方法 运用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)复合造模法构建PLGC大鼠模型,分别给予参白颗粒等效剂量(参白颗粒等效剂量组, $n=10$)、参白颗粒低剂量(参白颗粒低剂量组, $n=10$)、中成药对照药摩罗丹(摩罗丹药组, $n=10$)、西药对照药替普瑞酮(替普瑞酮对照药组, $n=10$)进行为期12周的药物干预,模型组($n=10$)不进行给药干预。病理检测观察大鼠胃黏膜改善情况。通过免疫组织化学、蛋白质印迹法、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、消皮素D(gasdermin D, GSDMD)、半胱氨酸天冬氨酸水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)-1及白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的表达情况。结果 病理观察发现参白颗粒等效剂量组大鼠的胃黏膜改善较其他各组明显。免疫组织化学结果提示参白颗粒等效剂量组的NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达量较模型组降低($P<0.05$);蛋白质印迹法检测发现参白颗粒等效剂量组的NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达水平较模型组低($P<0.05$);ELISA结果显示参白颗粒等效剂量组的IL-1 β 浓度较模型组低($P<0.05$)。结论 参白颗粒可以介导NLRP3炎症小体,抑制细胞焦亡,调控下游蛋白Caspase-1及GSDMD表达水平,阻碍炎症因子释放,减轻组织炎症,达到干预PLGC进展的目的。

【关键词】 癌前病变; 炎症癌转化; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3; 参白颗粒; 细胞焦亡

Research on the mechanism of ginseng white granules through the cell pyroptosis pathway in blocking the transformation of precancerous lesions of gastric cancer from inflammation to cancer

Zhang Xiyan, Cao Junwen, Zhang Zhongmian, Tao Jingna, Zhang Liju, Chen Jiaqin, Wang Lan, Lin Zili, Zhang Jinglin, He Baixiang, Li Zhihong*

Digestive Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

*Corresponding Author: Li Zhihong, E-mail: Lzhls1966@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of ginseng white granules blocking the process of precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) inflammation-cancer transformation. **Method** The PLGC rat model was constructed by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), with ginseng white granules equivalent dose (ginseng white granules equivalent dose group, $n=10$), ginseng white granules low dose (ginseng white granules low dose group, $n=10$), Chinese patent medicine control drug Morodan (Morodan control group, $n=10$) and western medicine control drug Teprenone (Teprenone control group, $n=10$) given for a period of 12

基金项目:国家自然科学基金(82074187);北京自然科学基金(7232290);北京中医药大学东直门医院临床研究和成果转化能力提升试点项目(DZMG-MLZY-23009)

*通信作者:李志红, E-mail: Lzhls1966@126.com

weeks. The model group ($n=10$) was without drug intervention. The improvement of gastric mucosa in each group was observed by pathological detection. The expression of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) and interleukin-1 β (IL-1 β) in each group were detected by immunohistochemical, western blot and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result** Pathological detection revealed that the improvement of gastric mucosa in the ginseng white granules equivalent dose group was more obvious than other groups. Immunohistochemical result demonstrated that the expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β were decreased in the ginseng white granules equivalent dose group, compared to the model group ($P<0.05$). Western blot showed that the expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD were decreased in the ginseng white granules equivalent dose group, compared to the model group ($P<0.05$). The level of IL-1 β detected by ELISA in the ginseng white granules equivalent dose group was lower than that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Ginseng white granules can mediated NLRP3 inflammasome to inhibit pyroptosis, regulate the expression level of downstream protein Caspase-1 and GSDMD, hinder the release of inflammatory factors, reduce tissue inflammation, and achieve the purpose of intervening in the progression of PLGC.

【Key words】 Precancerous lesions of gastric cancer; Transformation from inflammation to cancer; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; Ginseng white granules; Pyroptosis

胃癌(gastritis cancer, GC)是消化系统常见恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在我国分列恶性肿瘤的第4位和第3位^[1]。胃癌是典型的“炎癌转化”模型,其进展过程遵循正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠化生-异型增生-胃癌的疾病级联发展规律^[2-3]。异型增生是由正常胃黏膜进展为胃癌的最后关卡,属于胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)^[4],也是中医药干预的关键阶段。PLGC的本质是胃黏膜慢性炎症浸润,且该炎症特点常具有持续侵害性,长期暴露于炎症环境会使细胞和组织癌变的风险增加^[5],受损组织会不断释放信号,通过不同的分子信号通路造成毒性成分积累,是“炎癌转化”进程的催化剂。

李志红教授传承“全国名中医”田德禄教授治疗脾胃病“清降论”的学术思想,创新性地提出慢性萎缩性胃炎癌前病变“因热生毒”理论^[6],创立经验方参白颗粒,方用柴胡、紫苏梗、太子参、生薏苡仁、白花蛇舌草、莪术六味药共奏行气健脾、清热养阴、活血解毒之功,临床疗效显著。炎症的特点与中医“毒热”特点相对应,祛除邪热是治疗PLGC的重要途径。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)可以介导细胞焦亡发生炎症反应,是机体炎症发生的主要通路之一。课题组在前期研究过程中从细胞层面揭示了参白颗粒可以通过调节NLRP3炎症小体表达水平抑制

机体炎症水平^[7],本研究旨在通过体内实验探讨参白颗粒介导NLRP3炎症小体干预PLGC的作用机制,为中医药治疗修复胃黏膜屏障,阻碍炎癌转化的机制提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 实验动物

选取自发肿瘤率低、对化学诱变剂较敏感且造模成功率高的3周龄雄性Wistar大鼠60只,体重(85 \pm 10)g,在北京中医药大学动物房温度20~26 $^{\circ}$ C、湿度40%~60%环境中喂养。实验大鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2019-0010。本研究已通过北京中医药大学动物伦理审查(审查编号:BUCM-2023022303-1151)。

1.2 实验药品

1.2.1 造模及麻醉药品

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)(东京化成工业株式会社, M0527)、水杨酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号30169317)均由上海程昂生物技术有限公司提供;盐酸雷尼替丁胶囊(弘森药业,国药准字H32025308);麻醉药品戊巴比妥钠(德国默克公司,批号P11011)。

1.2.2 治疗用药

参白颗粒由北京中医药大学东直门医院颗粒药房统一调配;替普瑞酮[卫材(中国)药业有限公司,国药准字H20093656];摩罗丹(邯郸制药有限

公司,国药准字 Z13021325)。

1.2.3 实验试剂

无水乙醇、二甲苯、正丁醇(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为100092683、10023418、100052190);三乙醇胺缓冲液、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、RIPA裂解液、BCA蛋白定量检测试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、正常兔血清(浓缩型)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液、DAB显色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G0001-2L、G0002、G2002-100ML、G2026-200T、GC305010、G1209、G1005、G1212);抗Actin抗体、抗NLRP3抗体、抗Caspase-1抗体、抗GSDMD抗体、抗IL-1 β 抗体、HRP-山羊抗兔、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜0.45 μ m、大鼠IL-1 β 酶联免疫吸附试验试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB15003、GB114320、GB11383、GB114198、GB11113、GB23303、G6015-0.45、GER0002-1)。

1.3 实验方法

1.3.1 胃癌前病变模型造模方式

本实验在丁霞等^[8]MNNG多因素造模的基础上,加入低浓度0.9%生理盐水复合造模^[9],方法如下。①实验大鼠每日自由饮用120 mg/L MNNG+0.9%生理盐水混合溶液,MNNG配制为1 g/L的母液,于4 $^{\circ}$ C环境下避光储存,每次使用时配制120 mg/L MNNG+0.9%生理盐水溶液,使氯化钠晶体充分融化,其间不再给予其他饮用水,每24~48小时更换1次饮用水。②每日自由进食含0.05%雷尼替丁的颗粒状无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级大鼠饲料,雷尼替丁饲料由协同生物技术有限公司统一配制,其间不予其他食物。③饥饱失常:每周二、五禁食,周一、三、四、六、日饱食。④每周二、五禁食之后,配制2%水杨酸钠溶液以5 ml/kg比例灌胃。共计50只大鼠运用上述造模方

法持续24周。具体造模方式见表1。

造模成功标准如下。①一般状态:造模过程大鼠体重较正常减轻,食量及饮水量减少,活动缓慢、反应迟钝或烦躁不安,懒动,疲倦,目无光泽、眯眼,皮毛无华粗糙,大便稀,肛门污秽等。②病理组织观察:大鼠胃黏膜病变在萎缩、肠化生阶段可参照《慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)》^[10]中的标准量化,异型增生参照《中国胃黏膜癌前状态和癌前病变的处理策略专家共识(2020)》^[4]执行。

1.3.2 分组及给药

实验分为正常组、模型组及治疗组,其中治疗组包括:参白颗粒等效剂量组、参白颗粒低剂量组、替普瑞酮对照药组、摩罗丹药组,见表2。正常组为未经过造模方式干预的健康Wistar大鼠,模型组及治疗组均为PLGC模型大鼠。造模成功后对大鼠进行给药干预,治疗组按照分组给药,给药频率为每日1次,给药时间持续12周。给药期间模型组饮食继续使用MNNG 120 mg/L自由饮用加雷尼替丁饲料,正常组及治疗组给予北京中医药大学动物房提供的蒸馏水及SPF级大鼠饲料。给药剂量参照《药理实验方法学》中“人与动物的药量换算公式”为6.3倍计算^[11],假设人体平均体重为60 kg,按照3:1的比例构建参白颗粒等效剂量组和低剂量组,剂量分别为1.113 g/kg及0.371 g/kg,同理可得替普瑞酮对照药组为15.750 mg/kg,摩罗丹药组为0.945 g/kg。

1.3.3 一般情况观察

造模过程中记录和观察大鼠体重、食量、饮水量、活动及反应速度,目光及毛发爪甲光泽,大便是否成型,肛门有无污秽等。

1.3.4 大鼠胃组织病理观察

造模过程中,于造模第20周和第24周各随机处死2只大鼠,取胃组织送检。给药干预12周后,正常组、模型组和各治疗组每组随机取3只大

表1 胃癌前病变模型造模方式

造模因素	模拟因素	用法用量	注意事项
MNNG	硝酸盐摄入过量	120 mg/L,自由饮用	4 $^{\circ}$ C避光保存,1~2 d更换1次
氯化钠	高盐饮食	0.9%生理盐水,自由饮用	与MNNG溶液一同配制
盐酸雷尼替丁	胃酸分泌减少	含0.05%盐酸雷尼替丁,自由进食	阴凉干燥密封保存,按需添加
饥饱失常	不良饮食习惯	每周二、五禁食,周一、三、四、六、日饱食	每次禁食12 h(7:00至19:00)
水杨酸钠	非甾体抗炎药	禁食之后,2% 5 ml/kg灌胃	实验大鼠处于禁食状态,防止咬伤

注:MNNG,N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍。

表2 实验分组及给药情况

分组	数量(只)	给药	给药剂量	饮食情况
正常组	10	生理盐水	不适用	SPF级大鼠饲料
模型组	10	生理盐水	不适用	MNNG 120mg/L+雷尼替丁饲料
治疗组				
参白颗粒等效剂量组	10	参白颗粒水溶液	1.113 g/kg	SPF级大鼠饲料
参白颗粒低剂量组	10	参白颗粒水溶液	0.371 g/kg	SPF级大鼠饲料
替普瑞酮对照药组	10	替普瑞酮	15.750 mg/kg	SPF级大鼠饲料
摩罗丹药组	10	摩罗丹	0.945 g/kg	SPF级大鼠饲料

注:MNNG,N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍;SPF,无特定病原体。

鼠的胃组织送检。胃组织放入4%多聚甲醛固定液固定,石蜡切片脱蜡至水、苏木精染色、伊红染色、脱水封片,中性树胶封片。显微镜下镜检,并进行图像采集分析。

1.3.5 免疫组织化学

免疫组织化学用于检测NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase)-1、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)蛋白水平,给药干预12周后,每组随机取3只大鼠进行检测。4%多聚甲醛固定液固定胃组织,石蜡切片脱蜡至水。修复液热修复抗原,PBS晃动洗涤,3%双氧水阻断液,室温避光孵育,滴加3%BSA试剂封闭。加一抗(抗NLRP3抗体,1:300;抗Caspase-1抗体,1:600;抗IL-1 β 抗体,1:400)孵育4℃过夜、二抗(HRP-山羊抗兔,1:200)孵育。滴加DAB显色液显色,苏木精染液复染细胞核、脱水封片送往镜检。运用ImageJ软件,分析5个不重复视野图片黄染的阳性区域图像的光密度值,并进行统计分析。

1.3.6 蛋白质印迹法

蛋白质印迹法用于检测NLRP3、Caspase-1、消皮素D(gasdermin D, GSDMD)蛋白表达水平,给药干预12周后,每组随机取3只大鼠进行检测。研磨胃组织,4℃离心提取组织总蛋白,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行测定,蛋白金属浴95℃变性,制胶并上样,活化PVDF膜放入装有TBST的孵育盒中,加入5%脱脂牛奶,置于脱色摇床室温封闭30min,加入配置好的一抗(抗Actin抗体,1:3000;抗NLRP3抗体,1:1000;抗Caspase-1抗体,1:1000;抗GSDMD抗体,1:1000),4℃孵育摇床过夜,加入二抗(HRP-山羊抗兔,1:5000)室温下孵育30min。洗膜后将膜放入混合好的ECL发光液中显色,保存原始图为TIFF格式。

ImageJ软件进行灰度值分析。以Actin作为参照,目标蛋白/Actin灰度值进行蛋白表达量分析。

1.3.7 酶联免疫吸附试验

采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对大鼠血清中的IL-1 β 表达水平进行检测。给药干预12周后,腹主动脉取血获得大鼠血样本,静置离心后取上清。使用ELISA试剂盒对每组3只大鼠的血清进行检测,标准品梯度稀释,吸吹混匀。加样,用封板膜封板后置37℃孵育温育1~2h,洗涤,加入生物素化抗体工作液。重复温育洗涤。加入酶结合物工作液。温育洗涤后加入TMB底物溶液,37℃避光显色,加入浓度为2mol/L的硫酸,在酶标仪上进行结果测定。

1.4 统计学方法

所有数据使用SPSS 25.0软件进行统计分析。定量数据中呈正态分布的使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,符合正态分布和方差齐性的两组间比较使用独立样本 t 检验,不符合正态分布或者方差不齐的组间比较采用非参数秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。蛋白质印迹法及免疫组织化学检测结果采用ImageJ进行定量分析。实验结果柱状图采用Graphpad作图软件进行呈现。

2 结果

2.1 造模过程中大鼠一般情况

造模期间,正常组大鼠发育正常,精力充沛,毛色光洁有泽。从第16周开始,除正常组外的大鼠逐渐出现倦怠喜卧、活动度减少、反应迟缓、毛发枯黄无泽、大便不成形、肛门污秽等情况。

2.2 造模过程中大鼠胃黏膜组织病理形态

造模第20周及第24周送检大鼠胃组织的病理表现见图1。20周病理图可见杯状细胞存在,提示大鼠胃黏膜已进展至肠化生阶段。24周病理图

可见腺体分布不规则、腺管紊乱、细胞极性改变、多见异型性、核大深染、可见异常核分裂象,提示低级别上皮内瘤变,即异型增生存在,可以认定为造模成功。

2.3 给药期间大鼠胃黏膜组织病理形态

给药干预12周后,各组大鼠胃组织病理形态见图2。其中,正常组大鼠胃黏膜腺体结构紧密整齐,腺体排列规则,未见组织坏死、萎缩、化生等病理改变(图2A1、A2)。模型组大鼠胃黏膜固有层厚薄不均,胃黏膜上皮腺体结构排列紊乱;胃黏膜上皮细胞形态大小不一,可见大量杯状细胞,基底层细胞异型性明显(图2B1、B2)。参白颗粒等效剂量组大鼠腺体结构完整,边界清晰,固有层结构保存完好,未见细胞异型性(图2C1、C2)。参白颗粒低

剂量组大鼠胃黏膜腺体结构排列紊乱,未见明显细胞异型性(图2D1、D2)。摩罗丹药组大鼠胃黏膜腺体结构较紊乱,腺体较拥挤、密集;胃黏膜上皮可见少量细胞异型性(图2E1、E2)。替普瑞酮对照组大鼠胃黏膜腺体结构紊乱,胃黏膜上皮细胞形态大小不一,可见少量杯状细胞和异型性细胞(图2F1、F2)。结果提示参白颗粒可以改善大鼠的胃组织病理。

2.4 免疫组织化学检测结果

免疫组织化学检测可见模型组出现明显黄褐色颗粒聚集(图3~图5),量化后的光密度值较其余各组升高。与模型组相比,参白颗粒等效剂量组的NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达量下降最多($P<0.001$),其余各组的蛋白表达量均有不同程度

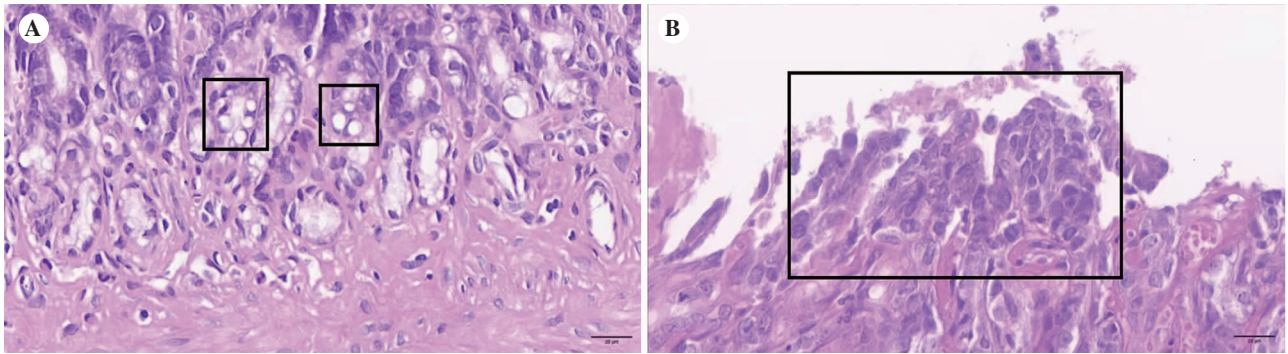


图1 造模期间大鼠胃黏膜组织病理形态(苏木精-伊红染色)

注:A,造模第20周大鼠胃黏膜组织病理形态,黑框部分为杯状细胞;B,造模第24周大鼠胃黏膜组织病理形态,黑框部分表示低级别上皮内瘤变。标尺=20 μm 。

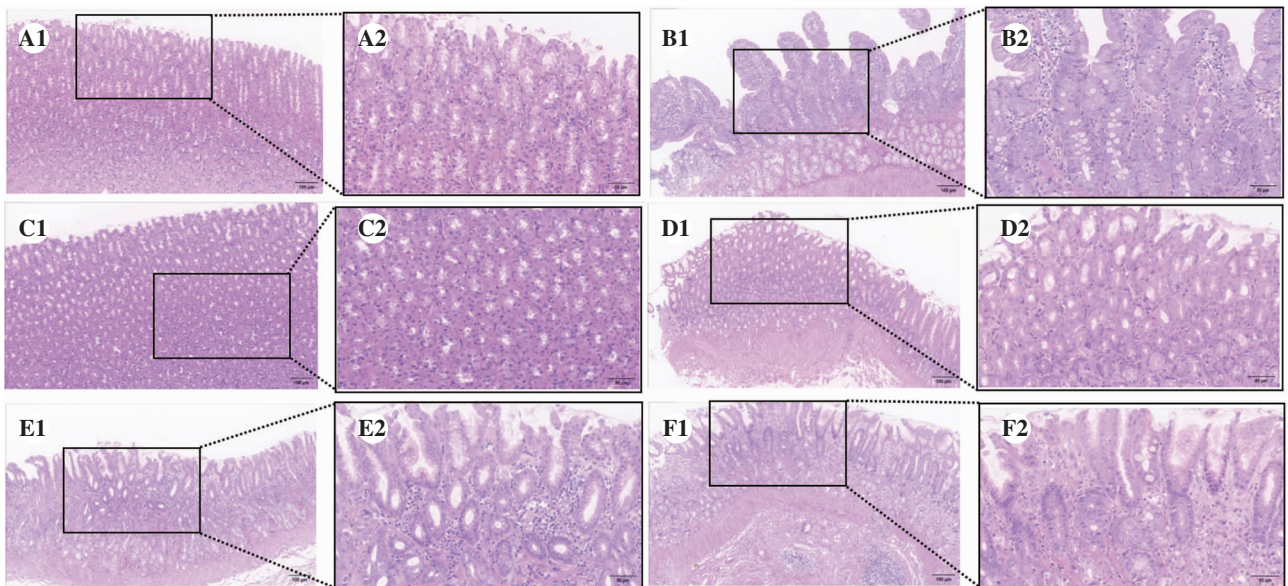


图2 给药期间大鼠胃黏膜组织病理形态(苏木精-伊红染色)

注:A,正常组;B,模型组;C,参白颗粒等效剂量组;D,参白颗粒低剂量组;E,摩罗丹药组;F,替普瑞酮对照组。A1、B1、C1、D1、E1、F1 标尺=100 μm ,A2、B2、C2、D2、E2、F2 标尺=50 μm 。

的降低(均 $P < 0.01$), 见表 3。

2.5 蛋白质印迹法检测结果

蛋白质印迹法检测提示, 正常组的 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 蛋白表达水平低于模型组 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 参白颗粒等效剂量组、摩

罗丹药组的 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 4 和图 6。

2.6 酶联免疫吸附试验检测结果

各组的 IL-1 β 浓度如图 7 所示, 与模型组相比,

表 3 免疫组织化学检测各组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数(个)	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β
正常组	5	0.112 \pm 0.007***	0.105 \pm 0.010***	0.101 \pm 0.010***
模型组	5	0.164 \pm 0.012	0.148 \pm 0.005	0.150 \pm 0.005
参白颗粒等效剂量组	5	0.119 \pm 0.007***	0.103 \pm 0.010***	0.094 \pm 0.007***
参白颗粒低剂量组	5	0.134 \pm 0.005**	0.112 \pm 0.013***	0.124 \pm 0.015**
摩罗丹药组	5	0.137 \pm 0.005**	0.126 \pm 0.005***	0.121 \pm 0.015**
替普瑞酮对照药组	5	0.139 \pm 0.009**	0.130 \pm 0.005***	0.120 \pm 0.009***

注: Caspase-1, 半胱氨酸天冬氨酸水解酶-1; IL-1 β , 白介素-1 β ; NLRP3, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3。与模型组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

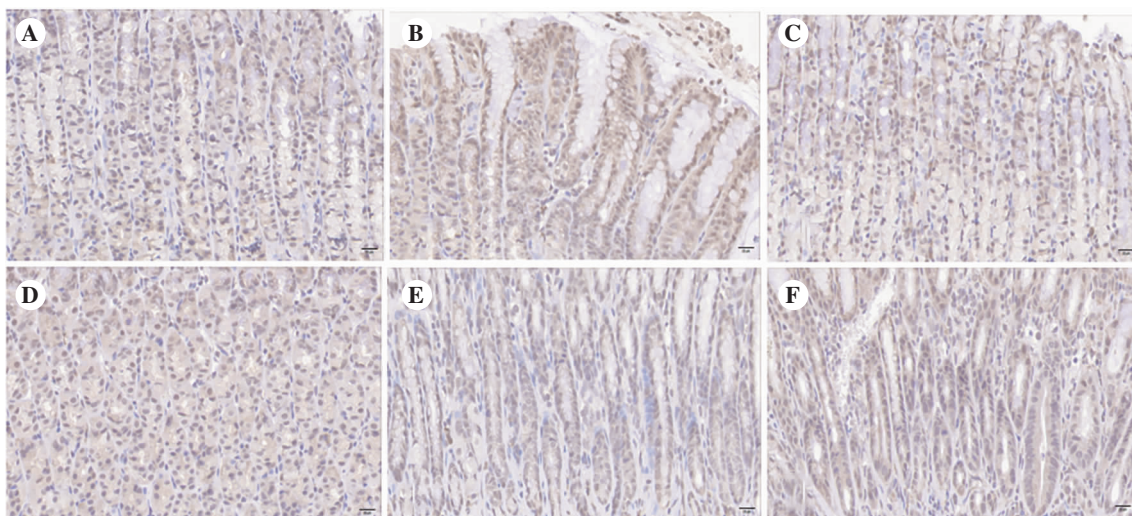


图 3 免疫组织化学检测各组 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 表达情况(EnVision 二步法)

注: A, 正常组; B, 模型组; C, 参白颗粒等效剂量组; D, 参白颗粒低剂量组; E, 摩罗丹药组; F, 替普瑞酮对照药组。标尺=20 μ m。

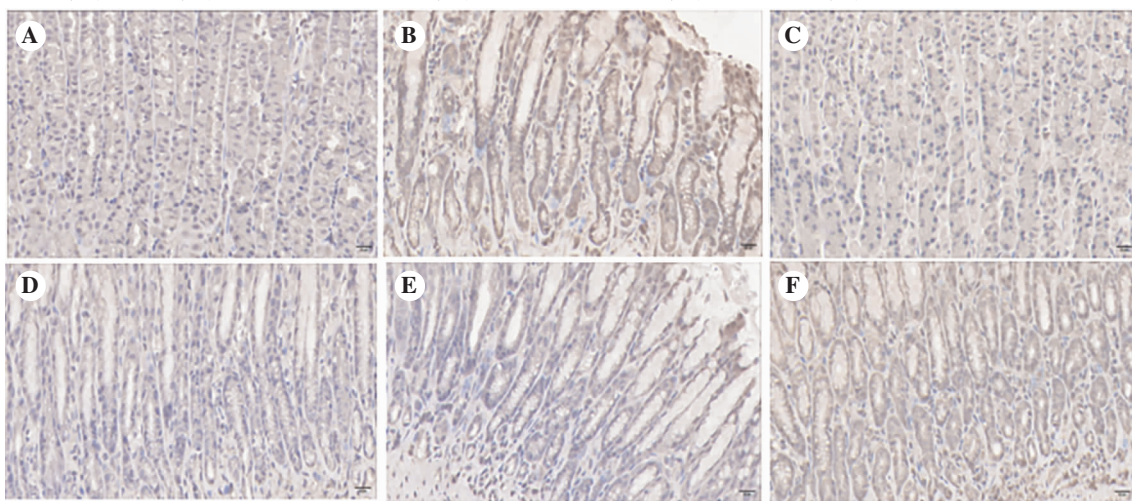


图 4 免疫组织化学检测各组半胱氨酸天冬氨酸水解酶-1 表达情况(EnVision 二步法)

注: A, 正常组; B, 模型组; C, 参白颗粒等效剂量组; D, 参白颗粒低剂量组; E, 摩罗丹药组; F, 替普瑞酮对照药组。标尺=20 μ m。

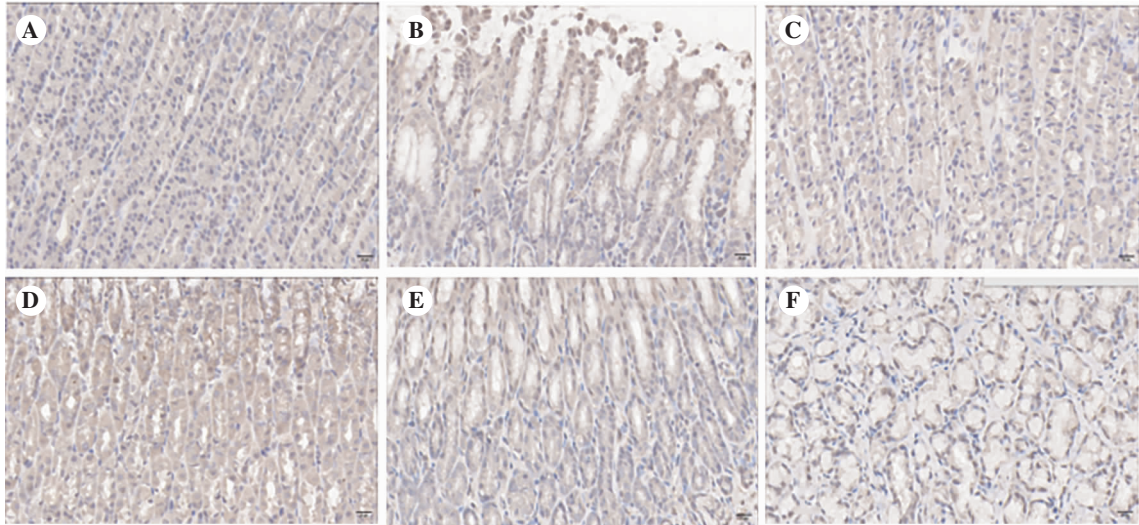


图5 免疫组织化学检测各组白介素-1 β 表达情况(EnVision 二步法)

注:A,正常组;B,模型组;C,参白颗粒等效剂量组;D,参白颗粒低剂量组;E,摩罗丹药组;F,替普瑞酮对照药组。标尺=20 μ m。

表4 蛋白质印迹法检测各组 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 蛋白水平($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(只)	NLRP3	GSDMD	Caspase-1
正常组	3	0.55 \pm 0.09***	0.37 \pm 0.19***	0.70 \pm 0.09***
模型组	3	1.08 \pm 0.07	1.01 \pm 0.08	1.29 \pm 0.07
参白颗粒等效剂量组	3	0.59 \pm 0.02***	0.31 \pm 0.19***	0.49 \pm 0.09***
参白颗粒低剂量组	3	0.82 \pm 0.08	0.54 \pm 0.08**	0.64 \pm 0.14***
摩罗丹药组	3	0.79 \pm 0.16*	0.60 \pm 0.02**	0.71 \pm 0.14***
替普瑞酮对照药组	3	0.75 \pm 0.23**	0.70 \pm 0.06	0.63 \pm 0.16***

注:Caspase-1,半胱氨酸天冬氨酸水解酶-1;GSDMD,消皮素D;NLRP3,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3。与模型组比较,* P <0.05,** P <0.01,*** P <0.001。

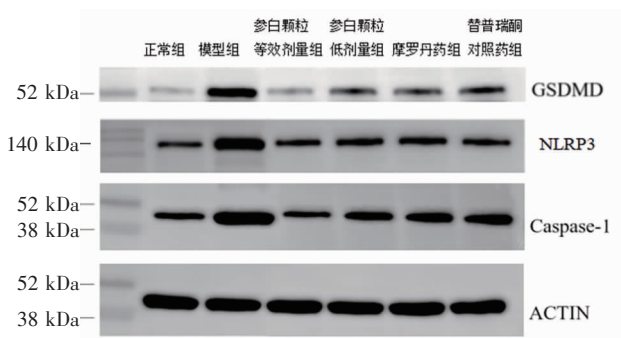


图6 蛋白质印迹法检测各组 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白3、消皮素D、半胱氨酸天冬氨酸水解酶-1 蛋白水平

注:Caspase-1,半胱氨酸天冬氨酸水解酶-1;GSDMD,消皮素D;NLRP3,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3。

参白颗粒等效剂量组的 IL-1 β 浓度下降(P <0.001)。

3 讨论

胃癌是我国重大公共卫生问题之一,是严重

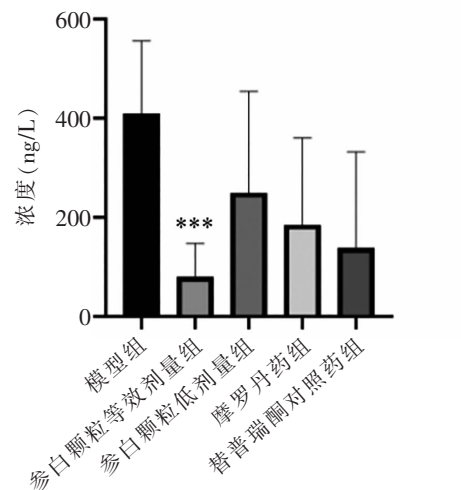


图7 酶联免疫吸附试验检测各组白介素-1 β 浓度的柱状图
注:与模型组比较,*** P <0.001。

威胁人民群众生命健康的常见消化道肿瘤,对处于胃癌前阶段的胃癌高风险人群进行有效的筛查诊断和早期干预治疗是预防胃癌发生的重要举措^[12]。从胃癌的演变历程看,炎症对胃癌的发生发展起

到了至关重要的推动作用,持续的炎症刺激可诱导化生性腺体细胞增殖,导致具有癌变特征的异型细胞群产生,PLGC便是癌症发生之前的异型病理阶段,有较高的癌变风险。现代医学对PLGC的治疗尚无特异性的手段,利用传统医学辨证论治的优势在炎癌转化发生之前对其施加干预治疗十分有必要。

炎癌转化的特点符合“因热生毒”理论的证候变化规律。著名脾胃病专家田德禄教授认为当代脾胃病以“多实、多郁、多热(火)”为主要特点,当代人饮食结构改变,嗜食辛辣炙烤之品,生活压力增加导致情志郁结,至胃气壅滞,肝胃不和日久化热,此为“热”证候的成因^[13]。炎癌转化的初始阶段,病变以浅表性为主,内镜下见胃黏膜充血水肿,此时病理可见大量炎症细胞在局部组织浸润,热气结盛,与炎症反应特点相似。病程日久,病变向胃黏膜萎缩、肠上皮化生及PLGC进展时,内镜下见胃黏膜颗粒不平,肠化斑存在,病理可见胃黏膜上皮细胞呈现异型性。邪热渐入营血,燔灼营血,瘀血渐生,湿浊胶结,炼液为痰,渐生热毒,“因热生毒”乃炎癌转化的关键所在。参白颗粒以“因热生毒”理论立方,诸药合用奏行气健脾、清热养阴、活血解毒之功。

研究表明,细胞焦亡是炎症性细胞程序性死亡的途径之一,NLRP3焦亡通路与炎症风暴密切相关,最早在巨噬细胞中发现^[14]。细胞焦亡是一个复杂的分子机制,其发生主要依靠炎症小体多聚体复合物,激活Caspase家族蛋白,进而引发下游炎症反应。细胞焦亡的经典途径为NLRP3介导,NLRP3炎症小体包含三联结构吡喃结构域(pyrimin domain, PYD)、中心的核苷酸结合和寡聚化结构域以及富亮氨酸重复结构域等多个结构域,是细胞焦亡的关键靶点^[15]。病原体相关分子模式和危险/损伤相关分子模式被免疫细胞识别导致凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein contain a Caspase-recruitment domain, ASC)和Caspase-1前体组装,在NLRP3炎症小体组装后,NLRP3与ASC的PYD之间相互作用形成同型PYD-PYD结构,ASC中的Caspase募集结构域(Caspase recruitment domain, CARD)可以招募并结合Caspase-1的CARD^[16],在此过程中ASC主要起到连接受体蛋白和效应蛋白的桥梁作用。被激活的炎症小体复合物NLRP3,唤醒Caspase-1剪

切GSDMD,形成N端和C端,N端可以引起细胞焦亡,C端可以与N端结合抑制焦亡。GSDMD是一种被广泛研究的细胞焦亡关键效应物,受到其上游因素调控而裂解,是细胞焦亡的直接执行者,可诱导下游的成熟炎症因子分泌。游离的N端对细胞膜进行打孔,导致膜内外渗透压改变,细胞膜肿胀变形破损,释放同样被Caspase-1前体激活的IL-1 β 等炎症因子于细胞外,引起炎症反应。细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)介导的Caspase-4/5、Caspase-11激活非经典途径,同样可以切割GSDMD释放N端促进细胞焦亡,驱动炎症相关级联反应,参与多种慢性炎症疾病。细胞焦亡诱导如IL-1 β 等细胞炎症因子的释放,促进巨噬细胞和T淋巴细胞的活化,可进一步募集膜外的炎症细胞,促使身体产生持续而强烈的炎症刺激,增加了肿瘤发生的可能性^[17]。

本课题组的前期研究对患者胃黏膜进行检测,发现使用参白颗粒治疗的患者治疗前后的胃黏膜NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及GSDMD蛋白水平具有明显差异,参白颗粒干预后各蛋白水平均不同程度下降^[18],提示参白颗粒可能抑制细胞焦亡相关蛋白表达从而阻断炎癌转化,这与既往文献报道相契合^[19-20]。基于此,本课题组开展体外细胞实验,结果表明LPS模型组人胃黏膜上皮细胞(GES-1)中的NLRP3、Caspase-1、P65及GSDMD等蛋白表达均存在不同程度的升高^[7],可见在PLGC发病过程中,细胞焦亡是介导其发生发展的重要机制。此外,NLRP3基因沉默后,用药干预结果提示各蛋白水平差异没有统计学意义,说明NLRP3是参白颗粒保护胃黏膜、逆转炎癌转化进程的关键靶点。

本研究在课题组前期研究的基础上进行了体内验证,参白颗粒干预后大鼠胃黏膜病理均有不同程度的改善,通过免疫组织化学、蛋白质印迹法、ELISA等不同检测手段均发现参白颗粒等效剂量组的NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1及GSDMD蛋白水平较模型组下降,且差异有统计学意义,提示参白颗粒通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡通路,减少细胞内炎症因子释放,减轻胃黏膜炎症水平,从而达到阻断炎癌转化进程的终极目标。中药方剂参白颗粒具有多通路多靶点的作用特点,已阐明其可通过介导细胞焦亡这一通路改善胃黏膜病理,抑制炎症反应阻碍炎癌转化,日后应扩大视

野,研究其在不同分子通路中的作用机制,以期为PLGC的治疗及新药开发提供方向和思路。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] CORREA P, HAENSZEL W, CUELLO C, et al. A model for gastric cancer epidemiology [J]. *Lancet*, 1975, 306(7924):58-60.
- [3] 李扬, 年媛媛, 孟宪梅. 胃癌前病变的诊断和治疗现状[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2022, 14(2):113-118.
- [4] 国家消化系疾病临床医学研究中心(上海), 国家消化道早癌防治中心联盟, 中华医学会消化病分会幽门螺杆菌学组, 等. 中国胃黏膜癌前状态和癌前病变的处理策略专家共识 (2020)[J]. *中华消化杂志*, 2020, 40(11):731-741.
- [5] WEI X, XIE F, ZHOU X, et al. Role of pyroptosis in inflammation and cancer [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(9): 971-992.
- [6] 李亚可, 方俐晖, 张轶斐, 等. 从“因热生毒”探讨慢性萎缩性胃炎炎癌转化机制[J]. *北京中医药*, 2022, 41(3):285-289.
- [7] 李亚可. 参白颗粒治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的疗效观察及分子机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2022.
- [8] 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.
- [9] 陆钰婷, 刘华一, 尚家驹, 等. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍复合法建立胃癌前病变大鼠模型的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(16):4089-4095.
- [10] 李军祥, 陈諝, 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] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:202-204.
- [12] 唐旭东, 刘林, 王凤云, 等. 胃癌二级预防与中医药对策[J]. *中国科学:生命科学*, 2022, 52(6):812-822.
- [13] 李志红, 田德禄. 田德禄教授应用“清降法”治疗脾胃疾病的经验[J]. *北京中医药大学学报(中医临床版)*, 2011, 18(6):34-36.
- [14] ZYCHLINSKY A, PREVOST MC, SANSONETTI PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages[J]. *Nature*, 1992, 358(6382):167-169.
- [15] VANAJA SK, RATHINAM VA, FITZGERALD KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(5): 308-315.
- [16] BAROJA -MAZO A, MARTÍN -SÁNCHEZ F, GOMEZ AI, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(8):738-748.
- [17] ZHAO H, WU L, YAN G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):263.
- [18] 张葳. 基于NLRP3炎症小体信号通路探讨理气活血解毒法治疗CAG伴IM的机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [19] 林翔英, 王鑫, 钟国栋, 等. 基于NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路探讨清化饮对慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮细胞焦亡的影响 [J/OL]. *实用中医内科杂志*. (2023-08-23) [2024-07-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20230823.1109.002.html>.
- [20] 张丹, 刘伟, 田雯, 等. 健脾化痰解毒方抑制细胞焦亡防治胃癌前病变的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5):2831-2835.

收稿日期:2024-08-22