

# 獐宝对大鼠胃黏膜 HSP60、HSP90、Cyt-c、Caspase9 表达的影响<sup>※</sup>

王媛媛 郑亮\*

(南京中医药大学第二附属医院脾胃病科, 江苏 南京 210017)

**摘要:**目的 探讨獐宝治疗胃癌前病变的机理。方法 清洁级 Wistar 雄性大鼠 14 只, 随机分为 4 组, 空白组(N), 模型对照组(NR), 獐宝治疗组(D), 胃复春对照组(W), 每组 3 只, 剩余 2 只 16 周时取样观察造模情况。12 周后处死大鼠, 剖腹取胃, 应用荧光定量 PCR 及免疫印迹法检测各组胃组织样本中 HSP60、HSP90、Cyt-c、Caspase9 蛋白的表达。结果 胃组织荧光定量 PCR 及免疫印迹法均显示: 与空白组相比, 模型对照组的 HSP60、HSP90 的表达减少 ( $P < 0.05$ ); 而与模型对照组相比, 给药组 HSP60、HSP90 的 mRNA 表达均有所增加 ( $P < 0.05$ ), 其中獐宝组较胃复春组增加更明显 ( $P < 0.05$ )。与空白组相比, 模型对照组的 Cleaved-Caspase9、Cyt-c 的 mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ ), 而与模型对照组相比, 给药组 Cleaved-Caspase9、Cyt-c 的 mRNA 表达有所减少, 其中獐宝组较胃复春组减少更明显 ( $P < 0.05$ )。结论 胃癌前病变的机制可能与凋亡信号通路的过度激活有关, 獐宝与胃复春能够抑制凋亡通路的过度激活, 其中獐宝疗效优于胃复春。

**关键词:** 獐宝; 胃癌前病变; 细胞凋亡; 免疫印迹; 胃黏膜; 动物实验

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.04.044

文章编号:1672-2779(2019)-04-0108-03

## Effect of Zhangbao on the Expression of HSP60, HSP90, Cyt-c and Caspase9 in Gastric Mucosa of Rat

WANG Yuanyuan, ZHENG Liang\*

(Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province, Nanjing 210017, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of Zhangbao in the treatment of precancerous lesions of gastric cancer. **Methods** Fourteen Wistar male rats were randomly divided into 4 groups: blank group (N), model control group (NR), Zhangbao treatment group (D), and Weifuchun control group (W). Only the remaining 2 samples were taken at 16 weeks to observe the modeling. After 12 weeks, the rats were sacrificed and the stomach was taken by laparotomy. The expressions of HSP60, HSP90, Cyt-c and Caspase9 in gastric tissue samples were detected by real-time PCR and immunoblotting. **Results** Quantitative PCR and immunoblotting of gastric tissue showed that the expression of HSP60 and HSP90 in the model control group was lower than that in the blank group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model control group, the administration group was HSP60 and HSP90. The mRNA expression was increased ( $P < 0.05$ ), and the Zhangbao group was more significantly increased than the Weifuchun group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group, the mRNA expression of Cleaved-Caspase9 and Cyt-c in the model control group was increased ( $P < 0.05$ ), while the mRNA expression of Cleaved-Caspase9 and Cyt-c in the drug-administered group was compared with the model control group. The reduction was more obvious in the Zhangbao group than in the Weifuchun group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The mechanism of precancerous lesions of gastric cancer may be related to the excessive activation of apoptotic signaling pathway. Zhangbao and Weifuchun can inhibit the excessive activation of apoptotic pathway, and the efficacy of Zhangbao is better than that of Weifuchun.

**Keywords:** Zhangbao; precancerous lesions; apoptosis; immunoblotting; gastric mucosa; animal experiment

胃癌是一个严重危害人民健康的疾病。我国是胃癌全球高发国家, 胃癌发病率和死亡率显著高于全球平均水平<sup>[1-2]</sup>。国内外大多数学者认可的胃癌发病模式为: 慢性萎缩性胃炎 (CAG) → 肠上皮化生 (IM) → 异型增生 (Dys, 现归于上皮内瘤变) → 胃癌。2000 年世界卫生组织公布的新版消化系统肿瘤病理学和遗传学分类中<sup>[3]</sup>, 将上皮内瘤变和肠化生视为胃癌前病变 (preaneerouslesion of gastric cancer, PLGC)<sup>[4]</sup>。目前早期胃癌患者

术后 5 年生存率达 90% 以上<sup>[5]</sup>, 所以, PLGC 的早诊早治, 是提高胃癌存活率的唯一有效措施。现代医学对治疗胃癌前病变尚无理想的治疗方法, 而中医在此方面具有一定优势。中医学讲究整体观念, 重视辨证论治, 药食兼顾, 综合治疗, 克服西药治疗阻断单环节的不足, 疗效确定, 副作用小。

獐宝早在《本草纲目》中就有记载, 是一种名贵稀有药材。它是鹿科动物幼獐吮吸獐奶后在胃中凝结的奶凝块, 过去主要用于小儿疳积, 功能性消化不良等。江苏省第二中医院脾胃病科郑亮教授研发獐宝治疗胃癌前病变获得三项国家发明专利, 并且在临床中取得满意疗效。近年来基于此所做的前期动物实验

※ 基金项目: 江苏省第十三批“六大人才高峰”高层次人才选拔培养资助项目 [No.WSN-018]

\* 通讯作者: 13915919898@126.com

研究发现<sup>[6]</sup>, 獐宝可以逆转慢性萎缩性胃炎大鼠胃粘膜肠上皮化生, 轻度-中度不典型增生。本课题旨在进一步探讨獐宝对胃癌前病变凋亡机制线粒体通路的影响。

### 1 实验材料

清洁级 Wistar 雄性大鼠 (由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供) 14 只 (4 组, 每组 3 只, 剩余 2 只 16 周时取样观察造模情况), 体质量 180~220 g。胃复春片 (由杭州于庆堂制药有限公司提供), 獐宝: (由南京万御宝生物技术有限公司提供)。

### 2 实验方法

#### 2.1 分组与造模

2.1.1 分组 将雄性大鼠体质量 180~220 g, 随机分为: 4 个组, 每组 3 只大鼠。空白组 (N); 模型对照组 (NR); 胃复春对照组 (W); 獐宝治疗组 (D)。

2.1.2 造模 采用 MNNG 自由饮水法配合抑酸、饥饿失常及脱氧胆酸钠、乙醇灌胃法联合造模。空白组给予等量生理盐水灌胃。于造模 16 周末将待观察造模情况的 2 只大鼠, 取胃窦及胃体组织各 1 块, 用常规苏木素-伊红染色, 用 20% 福尔马林固定后, 光镜下观察胃黏膜均存在萎缩, 且出现肠上皮化生和不典型增生, 确认造模成功。

2.1.3 给药处理 造模 16 周后, 獐宝剂量组以 56 mg/kg 灌胃, 胃复春组 25.13 mL/kg 灌胃, 空白组、模型对照组给予 10 mL/kg 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 每周 6 次。连续给药时间均为 12 周。

2.1.4 样本取材 12 周后处死大鼠, 剖腹取胃, 在胃的大弯侧剖开全胃, 取出 0.2 cm×0.2 cm 长条形胃组织, 迅速放于 4% 甲醛溶液固定。

2.1.5 采用荧光定量 PCR 检测胃组织 HSP60、HSP90、Cyt-c、Caspase-9 的 mRNA 表达情况。

2.1.6 采用免疫印迹法测定胃组织 HSP60、HSP90、Cyt-c、Caspase-9 的蛋白浓度。

2.4 统计学方法 采用统计软件 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )”进行统计学描述。多组间比较用单因素方差分析, 组间比较采用 *Q* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 实验结果

3.1 Q-PCR 实验结果 Q-PCR 检测各组大鼠胃组织的 HSP60、HSP90、Caspase9、Cytc 的 mRNA 表达水平, 与空白组相比, 模型对照组的 HSP60、HSP90 的表达均减少 (*P*<0.05); 而与模型对照组相比, 给药组 HSP60、HSP90 的 mRNA 表达均有所增加 (*P*<0.05)。与空白组相比, 模型对照组的 Cleaved-Caspase9、Cytc 的 mRNA

表达增加 (*P*<0.05), 而给药组与模型对照组相比, Cleaved-Caspase9、Cytc 的 mRNA 表达有所减少 (*P*<0.05), 且獐宝对凋亡信号通路的抑制效果优于胃复春组 (*P*<0.05)。见表1、图1~2。

表1 獐宝对不同组别 Q-PCR 实验  
凋亡信号通路的抑制作用的比较

组别	HSP60	HSP90	Caspase9	Cytc
空白组	1.00±0.12	1.08±0.15	1.03±0.15	1.04±0.19
模型对照组	0.35±0.16	0.23±0.08	7.61±1.05	4.65±1.15
胃复春组	0.51±0.21	0.32±0.11	5.52±1.65	3.57±1.06
獐宝组	0.63±0.16	0.42±0.16	4.33±1.37	2.95±0.65
<i>P</i> 值	0.000 <sup>*</sup> 0.007 <sup>**</sup> 0.000 <sup>***</sup> 0.045 <sup>#</sup>	0.000 <sup>*</sup> 0.002 <sup>**</sup> 0.037 <sup>***</sup> 0.000 <sup>#</sup>	0.000 <sup>*</sup> 0.000 <sup>**</sup> 0.016 <sup>***</sup> 0.000 <sup>#</sup>	0.000 <sup>*</sup> 0.003 <sup>**</sup> 0.027 <sup>***</sup> 0.000 <sup>#</sup>

注:<sup>\*</sup>模型组与空白组相比;<sup>\*\*</sup>胃复春组与模型组相比;<sup>\*\*\*</sup>獐宝组与模型组相比;<sup>#</sup>獐宝组与胃复春组相比

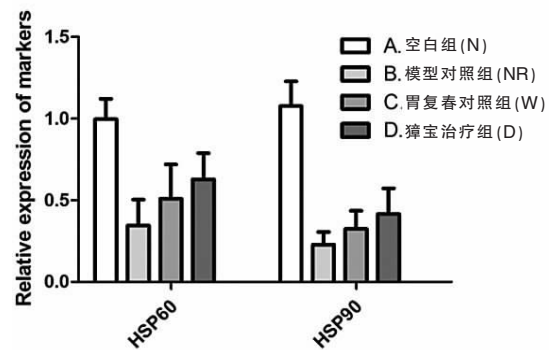


图1 獐宝对不同组别 Q-PCR 实验 HSP60 和 HSP90 的影响

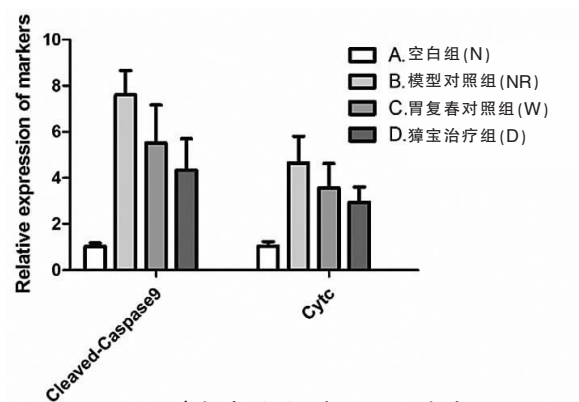


图2 獐宝对不同组别 Q-PCR 实验  
Cleaved-Caspase9 和 Cytc 的影响

3.2 免疫印迹实验结果 提取动物胃组织样本, 提取蛋白进行免疫印迹实验, 结果大体上与 Q-PCR 一致, 与空白组相比, 模型对照组的 Cleaved-Caspase9、Cyt-c 的蛋白表达增加 (*P*<0.05), 总 Caspase9 保持不变 (*P*>0.05), 而给药组与模型对照组相比, 总 Caspase9 仍然保持不变 (*P*>0.05), 而 Cleaved-Caspase9、Cyt-c 的蛋白表达有所减少 (*P*<0.05)。见表2、图3。

表2 獐宝对不同组别免疫印迹实验结果比较

组别	HSP60	HSP90	Cleaved-Caspase-9/GAPDH	Caspase-9/GAPDH
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型对照组	0.27±0.12	0.15±0.05	4.45±0.93	1.14±0.14
胃复春组	0.55±0.12	0.40±0.04	2.65±0.53	0.99±0.15
獐宝组	0.88±0.08	0.65±0.05	1.83±0.49	1.19±0.13
P值	0.003*	0.001*	0.000*	0.503*
	0.008**	0.001**	0.006**	0.311**
	0.002***	0.000***	0.013***	0.762***
	0.008#	0.002#	0.000#	0.189#

注：\*模型组与空白组相比；\*\*胃复春组与模型组相比；\*\*\*獐宝组与模型组相比；#獐宝组与胃复春组相比

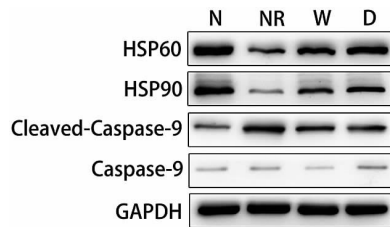


图3 獐宝对不同组别免疫印迹实验电泳结果

#### 4 讨论

近年来研究表明，胃癌的发生发展与癌基因激活、抑癌基因失活、抗凋亡基因过度表达、抑制细胞凋亡、刺激细胞分化和增殖密切相关。细胞凋亡的异常是胃粘膜癌变的重要原因之一。细胞凋亡是一个复杂的过程，至少有三条通路参与了细胞凋亡的发生，即死亡受体通路、内质网通路以及线粒体通路<sup>[7]</sup>。虽然凋亡刺激信号可激活三种凋亡通路中的一种，但是在某些情况下三者是相互联系的，它们之间存在串话（cross talking），其中线粒体是多种促细胞凋亡信号转导分子的靶点，同时也是细胞死亡通路的整合元件，在细胞凋亡三条通路中均起着中心调控作用，细胞凋亡中许多重要事件都与线粒体密切相关。线粒体的膜间腔内有很多促凋亡因子，其中重要的一种就是细胞色素 C（Cyt-c）。线粒体途径可使Cyt-c 从线粒体中释放至胞浆中，从而激活 caspas9，一旦 caspas9 被激活，即激活下游的效应 Caspase-3，启动Caspase 的级联反应，引发细胞凋亡。本课题发现与空白组相比，模型对照组的 Cyt-c、Cleaved-Caspase9 的 mRNA 表达增加，提示我们胃癌癌前病变的病理机制与过度激活凋亡信号通路有关，而给药组与模型对照组相比，Cyt-c、Cleaved-Caspase9 的 mRNA 表达有所减少，说明獐宝与胃复春可以抑制 Cyt-c 的释放，降低 caspas9 的活性，从而抑制凋亡信号通路的过度激活，且獐宝对凋亡信号通路的抑制效果优于胃复春组。热休克蛋白（HSPs）又称作应激蛋白（SP）<sup>[8]</sup>，近年来研究发现，HSPs 与肿瘤的发生发展存在一定关联性<sup>[8]</sup>。HSP60 是原核细胞和真核细胞

的分子伴侣，可能参与了肿瘤特殊信号的传递，在胃粘膜炎症、萎缩和癌变中所起的作用近年来也越来越被重视。在发生胃粘膜萎缩初期，其蛋白表达是增加的。随着萎缩程度的加重，表达反而下降，疾病进展过程中呈现出一个双向性。一般认为 HSP60 具有抗凋亡作用。HSP90 不仅参与蛋白的运输、解聚以及保护细胞免受环境压力，同时还参与了抗感染、肿瘤免疫、自身免疫，可能对肿瘤细胞的增殖和存活起着重要的作用。本试验与空白组相比，模型对照组 HSP60、HSP90 表达减少（ $P<0.05$ ），胃复春治疗组、獐宝治疗组 HSP60、HSP90 表达增加（ $P<0.05$ ）。其中獐宝组较胃复春组比较增加更为显著（ $P<0.05$ ），这也进一步证实了胃癌癌前病变造模后，模型组凋亡处于活跃状态。而给予獐宝治疗一定程度减少凋亡的过度激活。这一结果与部分文献报道不一致<sup>[8-9]</sup>，其原因可能因为胃粘膜癌变启动阶段可能存在着活跃的细胞增殖和大量细胞凋亡共存的现象<sup>[10]</sup>。慢性萎缩性胃炎向胃癌的发生是个多步骤缓慢的过程，是正常细胞增殖与凋亡平衡打破的过程，这一过程非常微妙，目前仍有一些未知的凋亡通路中的蛋白表达高低影响着凋亡的过程。HSP60、HSP90 同时具有抗凋亡和促凋亡的作用，其在恶性肿瘤的表达中呈现双向性，即或促进凋亡亦或抑制凋亡。本研究得出的结果是不同个体在同一疾病状态下凋亡蛋白的表达，验证以上推论还需要监测同一个体在不同疾病状态下凋亡蛋白的表达，这也是我们今后研究的一个方向。

#### 参考文献

- [1] 王宝华,王宁,冯雅靖,等. 1990年与2013年中国人群胃癌疾病负担分析[J]. 中华流行病学杂志,2016,37(6):763-767.
- [2] Feday J,Shin H,Bray F,et al. GLOBOCAN 2008;cancer incidence and mortality worldwide[M]. Lyon:IARC Press,2010:29.
- [3] Hamilton S R, Aaltonen L A. World Health Organization classification of tumours, Pathology and genetics of tumours of digestive system[M]. Lyon:IARC Press,2000.
- [4] Gutierrez-Gonzalez L, Graham T A, Rodriguez-Justo M, et al. The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach[J]. Casastroaerology,2011,140(4):1251-1260.
- [5] 王永向,高亮,王元宇,等. 早期胃癌预后的影响因素分析[J]. 中华胃肠外科杂志,2014,17(2):180-181.
- [6] 梅雨玫,郑亮. 獐宝治疗大鼠胃癌前期病变的实验研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(23):156-157.
- [7] 陈月桥,王丽,武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. 中国实用医药,2007,2(33):186-187.
- [8] 高艳萍,原素梅,张海芳. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜病变中 HSP60 表达的相关性研究[J]. 医学综述,2008,14(7):1112-1113.
- [9] 余慧. 胃癌中 Hsp90 $\alpha$  和 p53 的表达及意义[J]. 中国医药导报,2010,7(1):27-29.
- [10] Grenz S. Naschherger E,Merkel S,et al. IFN-gamma-driver intratumoral microenvironment exhibits superior prognostic effect compared with colon carcinoma[J]. Am J Pathol,2013,183(6):1897-1909.

(本文编辑:李海燕 本文校对:李 镇 收稿日期:2018-10-09)