

[29] Liang J, Jiang Y T, Huang Y F, *et al.* The comparison of dyslipidemia and serum uric acid in patients with gout and asymptomatic hyperuricemia: a cross-sectional study[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1): 31.

[30] Cao C, Li F, Ding Q, *et al.* Potassium sodium hydrogen citrate intervention on gut microbiota and clinical features in uric acid stone patients[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108(1): 11-15.

[31] Dou L, Liu C, Chen X Y, *et al.* Supplemental *Clostridium butyricum* modulates skeletal muscle development and meat quality by shaping the gut microbiota of lambs[J]. *Meat Sci*, 2023, 204: 109235.

[32] Zang L, Baharlooieian M, Terasawa M, *et al.* Beneficial effects of seaweed-derived components on metabolic syndrome *via* gut microbiota modulation[J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1173225.

[33] Zhao R J, Li N, Liu W, *et al.* Low glycemic index potato biscuits alleviate physio-histological damage and gut dysbiosis in rats with type-2 diabetes mellitus induced by high-sugar and high-fat diet and streptozotocin[J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 119: 109401.

基于网络药理学与动物实验探讨参芪抑瘤方对胃癌癌前病变的影响

彭 月^{1,2}, 梁建庆^{1,3*}, 段永强^{4*}, 张延英^{1,5}, 白 敏¹, 虎峻瑞⁴, 宋 冰^{1,5}, 袁晓梅¹, 刘自由¹

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 4. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏 银川 750004; 5. 甘肃省实验动物行业技术中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 基于网络药理学与动物实验探讨参芪抑瘤方对胃癌癌前病变的影响。**方法** 通过 TC MSP 数据库获取参芪抑瘤方有效成分和作用靶点, 通过 GeneCards 数据库获取胃癌癌前病变相关靶点, Cytoscape 3. 10. 0 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络, 通过 STRING 数据库建立 PPI 网络, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。SD 大鼠随机分为空白组、模型组、叶酸组 (2 mg/kg) 和参芪抑瘤方高、中、低剂量组 (37. 5、18. 75、9. 38 g/kg), 每组 10 只, 采用复合慢性损伤因素造模法构建胃癌癌前病变模型。观察大鼠一般情况变化, HE 染色观察大鼠胃组织形态变化, ELISA 法检测大鼠胃组织 IL-6、IL-17A、TGF-β 水平, RT-qPCR 法和 Western blot 法检测大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt mRNA 和蛋白表达。**结果** 共获得参芪抑瘤方与胃癌癌前病变交集靶点 137 个, 涉及 79 种活性成分, KEGG 通路富集分析结果表明, 参芪抑瘤方可能通过 Toll 样受体信号通路作用于胃癌癌前病变。与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜结构排列紊乱, 显微镜下可见肠上皮化生, 上皮细胞异型以及细胞核的增大、拉长, 胃组织 IL-17A、IL-6 水平和 TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0. 05$), TGF-β 水平和 FOXP3 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0. 05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠胃黏膜腺体异常改善, 参芪抑瘤方各剂量组大鼠胃组织 IL-17A、IL-6 水平降低 ($P<0. 05$), 各给药组大鼠胃组织 TGF-β 水平和 FOXP3 mRNA 表达和蛋白表达升高 ($P<0. 05$), TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0. 05$)。**结论** 参芪抑瘤方可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路, 调控 Th17/Treg 免疫平衡轴, 进而减轻胃癌癌前病变大鼠胃组织的炎症反应, 改善生存状况。

关键词: 参芪抑瘤方; 胃癌癌前病变; 网络药理学; TLR4/NF-κB 通路; Th17/Treg

中图分类号: R285. 5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)02-0641-08

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2025. 02. 046

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (20JR10RA314); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2022BEG03150)

作者简介: 彭 月 (1996—), 女, 硕士生, 从事消化系统疾病及中医老年病相关中药防治研究。Tel: 15893305132, E-mail: 395047959@ qq. com

*** 通信作者:** 梁建庆 (1976—), 男, 博士, 教授, 副主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治帕金森病、肿瘤及糖尿病研究。Tel: 13639332348, E-mail: 1766424015@ qq. com

段永强 (1974—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中医老年病、脾胃病和敦煌古医方研究。Tel: 18893117856, E-mail: dyqgs2008@ 163. com

据国际癌症研究中心数据显示, 2020 年全球胃癌病死率 7.7%, 居于恶性肿瘤的第 4 位, 严重威胁着人类的健康^[1]。胃癌的发展主要经历“慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌”的级联模式^[2], 其中肠上皮化生和异型增生阶段统称为胃癌癌前病变^[3-4]。目前胃癌的病因尚未完全明确, 难以针对病因进行有效预防, 因此, 针对其前置阶段的胃癌癌前病变进行识别、防治尤为重要。

胃癌癌前病变属“本虚标实”之症, 其病机为脾胃受纳运化功能失调, 气机升降失司, 血运不畅, 滞久为瘀, 内阻胃络, 应以扶正祛邪, 化瘀散结为治法, 使脾胃健运, 气机调畅, 气行则血自行, 中焦痞满自除。吴红彦教授秉承异病同治之则, 取仲景方当归贝母苦参丸活血利湿之效, 加入人参、黄芪、半枝莲等药增强其益气扶正, 通瘀散结之力, 组成参芪抑瘤方。课题组前期研究发现, 参芪抑瘤方对胃癌具有抑制作用^[5], 但对其在胃癌癌前病变疗效机制方面的研究鲜有报道。

本研究结合网络药理学技术预测参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的可能机制, 通过动物实验对预测的分子机制进行验证, 进一步阐明其药理作用, 以期参芪抑瘤方的临床应用提供一定的理论依据和参考。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 70 d 育龄, 体质量 (200±20) g, 购自甘肃中医药大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2020-0001], 饲养于甘肃中医药大学 SPF 级实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2020-0009]。本研究经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 2022-558)。

1.2 试剂与药物 参芪抑瘤方由黄芪 30 g、当归 20 g、山慈菇 10 g、土贝母 10 g、苦参 15 g、八月扎 30 g、莪术 10 g、半枝莲 20 g、白术 18 g、枳壳 12 g、人参 15 g 组成, 药材购自甘肃中医药大学附属医院, 经甘肃中医药大学李越峰鉴定为正品。药材浸泡 40 min, 水浸过药面 3 cm 煎煮, 煮沸后文火再煎 30 min, 过滤, 再次加水文火煎煮 40 min, 过滤, 合并药液, 浓缩至生药量 1.24 g/mL, 装入已消毒玻璃瓶中, 置于 4 ℃ 冰箱储藏备用。叶酸片 (常州制药有限公司, 批号 21061111)。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, MNNG) 试剂 (上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号 C13464976); 盐酸雷尼替丁胶囊 (广东恒健制药有限公司, 批号 211005); GAPDH 抗体、HRP-IgG 抗体、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 抗体 (美国 ImmunoWay 公司, 批号 B1501、B0201、YT2928); Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 抗体 (美国 GeneTex 公司, 批号 821904926、821904538); 叉头翼状螺旋转录因子 (forkhead box protein P3, FOX P3) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR3433458-14); 转录因子孤核受体 (retinoic

acid receptor-related orphan receptor γ 1, ROR γ 1) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 BB02165872); HE 染色套装 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1003); 细胞/动物组织总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号 W9727]; 反转录试剂盒、扩增试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, 批号 H4318040、H5310690]; 大鼠白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-17A (interleukin 17A)、转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (上海源桔生物科技中心, 批号 02/2023、02/2023、02/2023)。无水乙醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20190406); 氨水 (烟台市双双化工有限公司, 批号 20220201)。

1.3 仪器 PowerPac Basic 电泳仪、垂直槽、T100 Thermal Cycle 梯度 PCR 仪、iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); LX-165T2 高速冷冻离心机 (青岛海尔股份有限公司); SpectraMax i3X 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); ICX41 倒置生物荧光显微镜 [舜宇光学科技 (集团) 有限公司]; CG-05 实时荧光定量 PCR 仪 (杭州晶格科学仪器有限公司); SH-Compact523 化学发光成像系统 (杭州申花科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学 通过 TCSMP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 检索参芪抑瘤方中的各味中药, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为标准^[6]筛选有效成分, 去除重复项并逐个对应靶点。通过 GeneCards 数据库以“precancerous lesions of gastric cancer”为检索词查询胃癌癌前病变潜在靶点。将上述数据导入 Cytoscape 3.10.0 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图。将参芪抑瘤方与胃癌癌前病变的相交蛋白导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中, 设置物种“Homo Sapiens”, 筛选置信度 >0.95 的数据, 构建“蛋白-蛋白相互作用网络”。使用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析, 导入微生信云平台网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制结果图, GO 功能分析选取生物途径功能 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 数据中排名前十的条目汇总绘制柱状图, KEGG 富集分析选取 Count 数较大的前 30 个通路绘制气泡图。

2.2 动物实验

2.2.1 分组与给药 60 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、叶酸组 (2 mg/kg) 和参芪抑瘤方高、中、低剂量组 (37.5、18.75、9.38 g/kg), 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用复合慢性损伤因素造模法制备胃癌癌前病变模型^[7-8], 采用饥饱失常喂养法喂养大鼠, 足量喂养 48 h 后禁食 24 h, 禁食日用 0.1% 氨水代替大鼠日常饮用水, 同时灌胃给予 20% 乙醇, 每只 2 mL, 足量喂养日用 100 μ g/mL MNNG 代替大鼠日常饮用水, 同时灌胃给予

0.03% 雷尼替丁溶液，每只 2 mL。从造模 21 周开始，每 2 周随机抽检大鼠做病理检查，胃黏膜组织出现肠上皮化生或异型增生即为模型复制成功。按成人（60 kg）药物剂量为 180 g，通过体质量折算系数换算^[9]，模型复制成功后，空白组和模型组大鼠给予等体积蒸馏水，各给药组大鼠灌胃给予相应药物，每天 1 次，连续灌胃 90 d。

2.2.2 观察大鼠一般情况变化 实验过程中，观察并记录各组大鼠的皮毛颜色光泽度变化、异常行为活动、反应灵敏度程度、粪便性状、体质量变化等。

表 1 胃黏膜病理学评分标准

指标	评分/分	病理描述
慢性炎性反应	0	慢性炎性细胞不超过 5 个
	1	慢性炎性细胞不超过黏膜层的 1/3
	2	慢性炎性细胞不超过黏膜层的 2/3
	3	慢性炎性细胞占据黏膜全层
活动性	0	无中性粒细胞浸润
	1	黏膜固有层有少数中性粒细胞浸润
	2	中性粒细胞较多存在于黏膜层,可见于表面上皮细胞、小凹上皮细胞或腺管上皮内
	3	中性粒细胞较密集,可见小凹脓肿
萎缩	0	胃固有腺体无减少
	1	固有腺体数减少不超过原有腺体的 1/3
	2	固有腺体数减少介于原有腺体的 1/3~2/3 之间
	3	固有腺体数减少超过 2/3,仅残留少数腺体,甚至完全消失
肠化生	0	未出现肠化生
	1	肠化生区占腺体和表面上皮总面积 1/3 以下
	2	肠化生区占腺体和表面上皮总面积 1/3~2/3
	3	肠化生区占腺体和表面上皮总面积 2/3 以上
异型增生	0	未出现异型增生
	1	腺体排列紊乱,细胞异型明显,核大,染色质粗
	2	异型腺体与正常腺体分界清楚,细胞核伸长,染色质增加,核浆比增加
	3	可见腺体内腺体,细胞核呈圆形或椭圆形,可见病理性核分裂

2.2.4 ELISA 法检测大鼠胃组织 IL-6、IL-17A、TGF-β 水平 严格按照试剂盒说明书步骤，采用双抗体夹心 ELISA 法，检测大鼠胃组织匀浆液 IL-6、IL-17A、TGF-β 水平。

2.2.5 RT-qPCR 检测大鼠胃组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB*、*FOXP3*、*RORγt* mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取大鼠胃组织总 RNA，检测总 RNA 浓度，按照反转录试剂盒进行逆转录反应，使用 Hieff UNICON[®] qPCR SYBR Green Master 预混型 qPCR 试剂盒进行扩增反应，引物序列见表 2，反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s 共 40 个循环，以 *GAPDH* 为内参，使用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量处理。

2.2.6 Western blot 法检测大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解大鼠胃组织，提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h，分别加入 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt 抗体（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗（1：5 000）室温孵育 1 h，曝光显影，以 GAPDH 为内参，通过 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

2.2.3 HE 染色观察大鼠胃组织病理学变化 取材前大鼠禁食 24 h，异氟烷麻醉后处死，收集胃组织，沿胃大弯剪开后用生理盐水清洗干净，保留胃黏膜腺区，4% 多聚甲醛固定，脱水浸蜡，石蜡包埋，切片；常规脱蜡、水化、苏木素染色、返蓝、伊红染色、脱水封片；显微镜下观察胃组织病理变化，参照文献 [10-11] 报道，以慢性炎性反应、活动性、萎缩情况、肠化生、异型增生程度为评价指标，进行大鼠胃黏膜病理学评分，标准见表 1。

表 2 引物序列

基因	序列	长度/bp
<i>TLR4</i>	正向 5'-TGCATCTGGCTGGGACTCTG-3'	115
	反向 5'-TTCTGATCCATGCATTGGTAGGTAA-3'	
<i>MyD88</i>	正向 5'-ACGGTTCATCACTATCTGCCACTA-3'	140
	反向 5'-GGCTCCAAGTCAGCTCATCTTC-3'	
<i>NF-κB</i>	正向 5'-CGACGTATTGCTGTGCCTTC-3'	139
	反向 5'-TTGAGATCTGCCAGGTGGA-3'	
<i>FOXP3</i>	正向 5'-TACTGCTGCCACTGGAGTCTT-3'	145
	反向 5'-GTTGCTGTCTTTCCTGGGTGT-3'	
<i>RORγt</i>	正向 5'-AGAATGTCTGCAAGTCCTACCG-3'	125
	反向 5'-CATCTCCCACATTGACTTCCTCT-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-GGCAGAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	143
	反向 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	

2.3 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，符合正态分布，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐时采用 LSD 法检验，方差不齐时采用 Tamhane' T2 法检验；不符合正态分布，数据以 [$M(Q_{25}, Q_{75})$] 表示，组间比较采用非参数检验 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学 参芪抑瘤方中各味中药有效成分分别为黄芪 20 种、当归 2 种、山慈菇 3 种、土贝母 13 种、苦参 45 种、八月扎 6 种、莪术 3 种、半枝莲 29 种、白术 7 种、枳壳 5 种、人参 22 种，去除重复项后筛选得到有效成分 79 种，靶点 244 个。共得到胃癌癌前病变相关基因 2 644 个，药物与疾病的交集靶点 137 个。利用两组靶点数据绘制韦恩图，见图 1。“药物-成分-靶点-疾病”网络图包含 229 个节点和 793 条边，共涵盖 79 种有效成分和 137 个靶点，根据 Degree 得分，排名前三的化合物分别为槲皮素、木犀草素、山柰酚，见图 2。PPI 网络图中共包含 137 个节点，529 条边，见图 3。

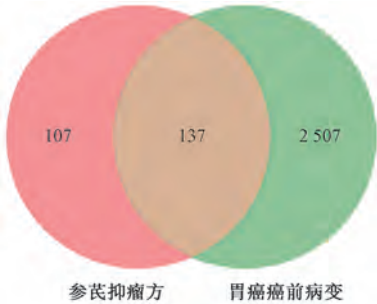
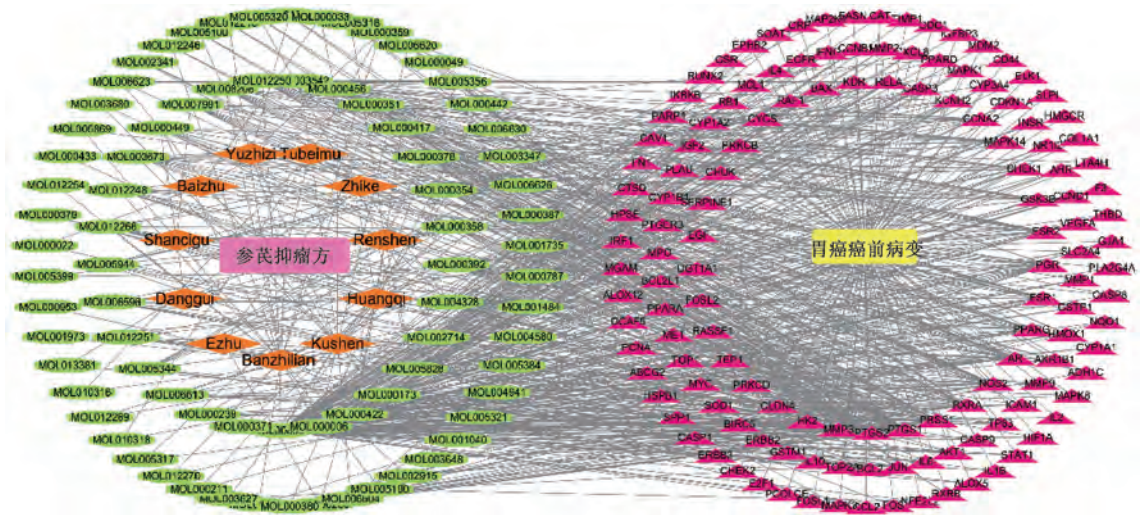


图 1 参芪抑瘤方有效成分与胃癌癌前病变的交集基因



注：绿色椭圆形为中药有效成分，橙色菱形为中药名称，红色三角形为靶点基因。
图 2 参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的“药物-成分-靶点-疾病”网络



图 3 参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的 PPI 网络图

GO 富集分析显示，靶蛋白分子功能主要集中于核受体活性、配体激活的转录因子活性、核类固醇受体活性、蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、以醇基为受体、激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、酶激

活剂活性、激酶调节剂活性等方面；生物途径功能涉及细胞对镉离子的反应、对活性氧的反应、细胞对化学应激的反应、对无机物的反应、对激素的反应等方面；细胞成分涉及膜筏、膜微域、细胞质囊腔、囊泡腔、分泌颗粒腔等组成，见图 4。KEGG 分析结果显示，参芪抑瘤方治疗胃癌癌前病变是通过多种途径实现的，通路富集主要涉及 Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等多种途径，其中 Toll 样受体信号通路是参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的关键通路，见图 5。

3.2 动物实验

3.2.1 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠一般情况的影响 空白组大鼠皮毛浓密光泽，无刻板、嗜睡等异常行为活动，反应灵敏，便质成形；与模型组比较，模型组大鼠皮毛黯淡粗糙，空嚼、咬栏，出现抱团、倦卧等活性降低表现，反应较为迟钝，便质溏稀，体质量降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，参芪抑瘤方高、中剂量组大鼠体质量升高 ($P < 0.05$)，见表 3。

3.2.2 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织病理学的影响 空白组大鼠胃黏膜固有腺体未减少，排列整齐，未见

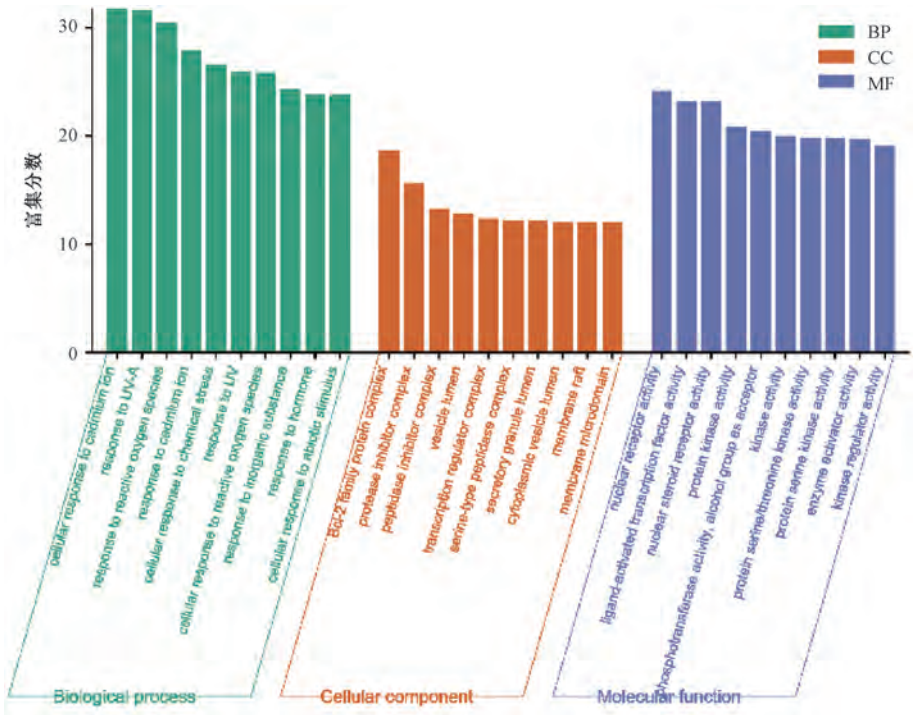


图 4 参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的 GO 生物学过程富集分析

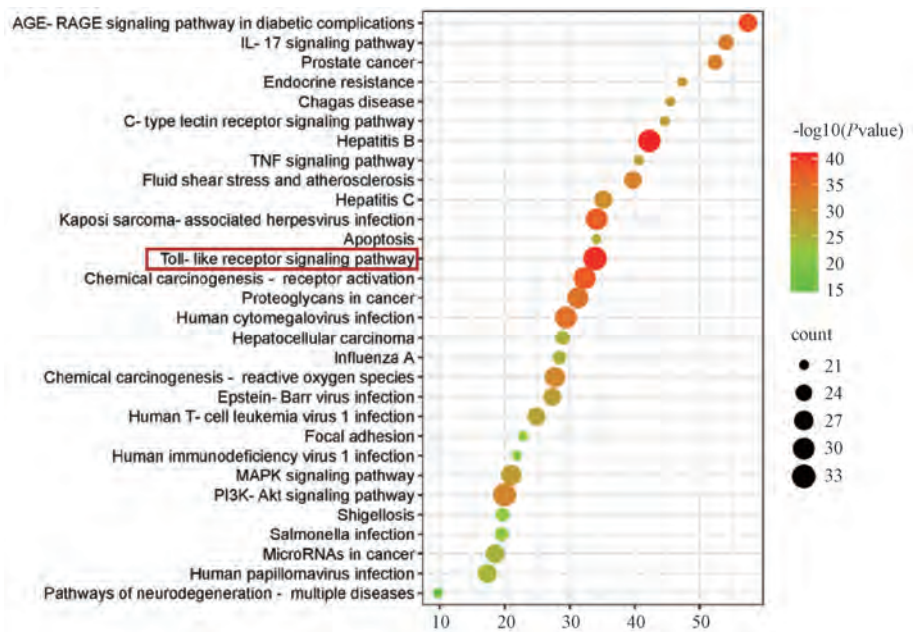


图 5 参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变共同靶点的 KEGG 富集分析

表 3 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠体质量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g
空白组	—	549.58±40.27
模型组	—	450.05±52.07 [*]
叶酸组	0.002	471.68±53.68
参芪抑瘤方高剂量组	37.5	529.51±60.32 [#]
参芪抑瘤方中剂量组	18.75	518.45±43.50 [#]
参芪抑瘤方低剂量组	9.38	492.44±50.34

注：与空白组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。

杯状细胞及中性粒细胞浸润。与空白组比较，模型组大鼠胃黏膜腺体数减少，减少介于原有腺体的 1/3~2/3 之间，排列扭曲（如红色箭头所示），可见杯状细胞，部分肠化生深至整个胃黏膜层，出现腺体扩张（如黄色箭头所示），可见偏离正常分化的异型增生，包括细胞核深染、增大、核质比增加、核形态发生梭形改变（如蓝色箭头所示）；出现中性粒细胞浸润（如绿色箭头所示），可见黏膜肌下层水肿（如黑色箭头所示）；与模型组比较，参芪抑瘤方高剂量组大鼠胃黏膜腺体排列尚紧密规整，未见明显肠化生及异型

增生, 损伤程度较模型组有改善, 中剂量组胃黏膜腺体少量脱落, 可见炎症细胞浸润, 损伤程度较模型组有所缓解, 低剂量组与叶酸组腺体萎缩, 部分可见杯状细胞, 肌层结构紊乱, 但较模型组稍有好转, 见图 6。与空白组比较, 模

型组大鼠胃黏膜病理评分升高 ($P<0.05$), 与模型组比较, 参芪抑瘤方高剂量组大鼠胃黏膜病理评分降低 ($P<0.05$), 见表 4。

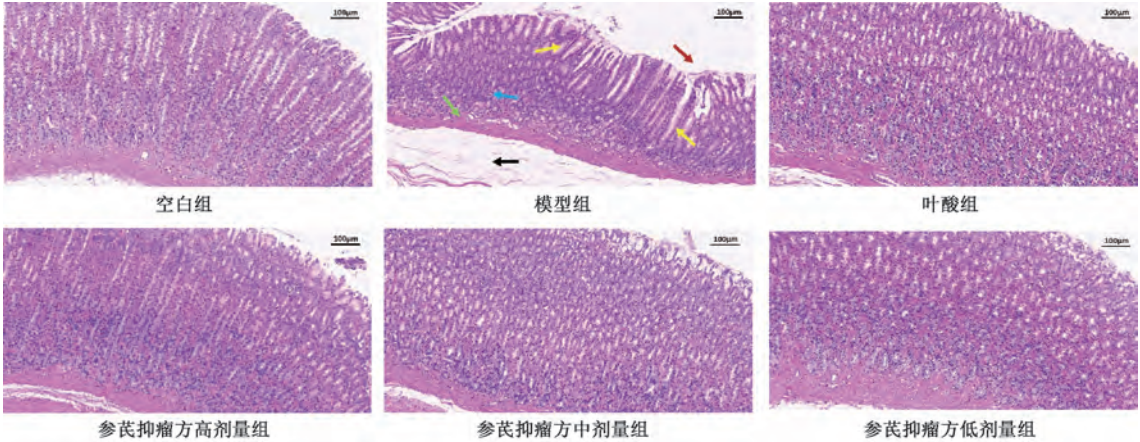


图 6 各组大鼠胃组织 HE 染色图 (×200)

表 4 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃黏膜病理学评分的影响 [分, $M(Q_{25}, Q_{75})$, $n=6$]

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	慢性炎性反应	活动性	萎缩	肠化生	异型增生
空白组	—	0(0,0.25)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
模型组	—	3.00(2.75,3.00)*	2.00(1.75,3.00)*	2.50(2.00,3.00)*	3.00(2.00,3.00)*	2.00(1.00,2.00)*
叶酸组	0.002	3.00(2.00,3.00)	2.00(1.00,2.25)	2.00(2.00,3.00)	2.00(2.00,3.00)	1.50(1.00,2.00)
参芪抑瘤方高剂量组	37.5	1.00(1.00,2.00) [#]	0.50(0,1.00) [#]	1.00(0,1.00) ^{#△}	0(0,0.25) ^{#△}	0(0,0) ^{#△}
参芪抑瘤方中剂量组	18.75	2.00(2.00,2.00)	1.00(1.00,1.25)	1.00(1.00,1.00)	0.50(0,1.00) [#]	0(0,0.25) ^{#△}
参芪抑瘤方低剂量组	9.38	2.50(2.00,3.00)	2.00(1.75,2.25)	2.00(1.00,2.00)	1.00(1.00,2.00)	1.00(0.75,1.25)

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$; 与叶酸组比较, [△] $P<0.05$ 。

3.2.3 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 IL-6、IL-17A、TGF-β 水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠胃组织 IL-17A、IL-6 水平升高 ($P<0.05$), TGF-β 水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 叶酸组大鼠胃组织 IL-17A 水平

降低 ($P<0.05$), 参芪抑瘤方各剂量组大鼠胃组织 IL-17A、IL-6 水平降低 ($P<0.05$), 各给药组大鼠胃组织 TGF-β 水平升高 ($P<0.05$); 与叶酸组比较, 参芪抑瘤方高剂量组大鼠胃组织 IL-17A、IL-6 水平降低 ($P<0.05$), 见表 5。

表 5 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 IL-17A、IL-6、TGF-β 水平的影响 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-17A	IL-6	TGF-β
空白组	—	95.81±6.29	153.46±35.31	290.26±21.68
模型组	—	132.43±11.09*	206.86±17.27*	220.48±14.82*
叶酸组	0.002	118.43±6.35 [#]	196.98±20.15	247.95±15.85 [#]
参芪抑瘤方高剂量组	37.5	102.93±6.87 ^{#△}	165.07±17.08 ^{#△}	261.14±27.34 [#]
参芪抑瘤方中剂量组	18.75	110.25±12.41 [#]	168.64±16.29 ^{#△}	255.92±15.93 [#]
参芪抑瘤方低剂量组	9.38	110.88±9.01 [#]	176.14±14.56 [#]	251.79±19.25 [#]

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$; 与叶酸组比较, [△] $P<0.05$ 。

3.2.4 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt mRNA 表达升高 ($P<0.05$), FOXP3 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠胃组织 MyD88、NF-κB mRNA 表达降低 ($P<0.05$), FOXP3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 参芪抑瘤方高、中剂量组大鼠胃组织 TLR4、RORγt mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与叶酸组比较, 参芪抑瘤方高、中剂量组大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt mRNA 表达降低 ($P<0.05$), FOXP3 mRNA

表达升高 ($P<0.05$), 见表 6。

3.2.5 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt 蛋白表达升高 ($P<0.05$), FOXP3 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 参芪抑瘤方各剂量组 MyD88、NF-κB 蛋白表达降低 ($P<0.05$), FOXP3 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 参芪抑瘤方高、中剂量组大鼠胃组织 TLR4、RORγt 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与叶酸组比较, 参芪抑瘤方高、中剂量组大鼠胃组织 MyD88、NF-κB、RORγt 蛋白

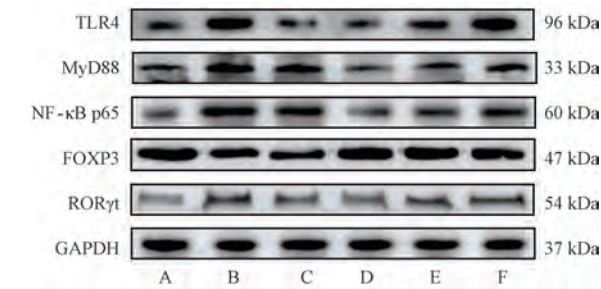
表达降低 ($P<0.05$), FOXP3 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 见图 7、表 7。

表 6 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)						
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TLR4	MyD88	NF-κB	FOXP3	RORγt
空白组	—	1.01±0.18	1.01±0.15	1.02±0.23	1.00±0.05	1.01±0.15
模型组	—	3.21±0.14 [*]	3.85±0.34 [*]	3.10±0.16 [*]	0.56±0.02 [*]	2.48±0.23 [*]
叶酸组	0.002	3.00±0.13	3.46±0.19 [#]	2.57±0.38 [#]	0.68±0.06 [#]	2.42±0.24
参芪抑瘤方高剂量组	37.5	1.42±0.22 ^{#Δ}	1.66±0.05 ^{#Δ}	1.68±0.06 ^{#Δ}	0.88±0.08 ^{#Δ}	1.43±0.07 ^{#Δ}
参芪抑瘤方中剂量组	18.75	1.60±0.08 ^{#Δ}	1.93±0.04 ^{#Δ}	1.82±0.02 ^{#Δ}	0.80±0.03 ^{#Δ}	1.64±0.09 ^{#Δ}
参芪抑瘤方低剂量组	9.38	2.99±0.13	2.80±0.15 ^{#Δ}	2.40±0.21 [#]	0.73±0.05 [#]	2.43±0.23

注:与空白组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与叶酸组比较,^Δ $P<0.05$ 。

表 7 参芪抑瘤方对胃癌癌前病变大鼠胃组织 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt 蛋白表达影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)						
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TLR4/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF-κB/GAPDH	FOXP3/GAPDH	RORγt/GAPDH
空白组	—	0.79±0.13	0.65±0.07	0.39±0.07	1.98±0.16	0.55±0.11
模型组	—	1.30±0.11 [*]	1.97±0.28 [*]	1.44±0.22 [*]	1.18±0.15 [*]	1.38±0.27 [*]
叶酸组	0.002	1.07±0.14	1.83±0.27	1.27±0.26	1.27±0.20	1.15±0.20
参芪抑瘤方高剂量组	37.5	0.89±0.10 [#]	1.09±0.15 ^{#Δ}	0.59±0.17 ^{#Δ}	1.90±0.14 ^{#Δ}	0.72±0.15 ^{#Δ}
参芪抑瘤方中剂量组	18.75	0.90±0.15 [#]	1.26±0.19 ^{#Δ}	0.67±0.17 ^{#Δ}	1.74±0.13 ^{#Δ}	0.71±0.18 ^{#Δ}
参芪抑瘤方低剂量组	9.38	1.13±0.20	1.46±0.10 ^{#Δ}	0.91±0.17 ^{#Δ}	1.47±0.10 [#]	1.05±0.21

注:与空白组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与叶酸组比较,^Δ $P<0.05$ 。



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为叶酸组, D~F 分别为参芪抑瘤方高、中、低剂量组。

图 7 各组大鼠 TLR4、MyD88、NF-κB、FOXP3、RORγt 蛋白电泳图

4 讨论

参芪抑瘤方为使用多年的临床方剂,能够有效减轻患者胃脘部痞闷、满胀不舒的症状^[12]。本研究复建胃癌癌前病变模型大鼠进行实验,结果表明参芪抑瘤方能够有效改善胃癌癌前病变模型大鼠胃组织病理形态,以参芪抑瘤方高剂量组最为显著。网络药理学分析发现,参芪抑瘤方组药物中关键活性成分包括槲皮素、木犀草素、山柰酚等。现代药理学研究表明,此类药物作为抗癌剂具有抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用^[13-15]。KEGG 通路富集分析表明,Toll 样受体信号通路可能为参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的关键通路。既往研究证实,Toll 样受体基因与胃癌发生风险具有相关性,其家族成员 TLR4 与非幽门螺旋杆菌感染的胃癌癌前病变关系尤为密切,非侵入性检查 TLR4 可能是鉴别患者是否出现异常增生的重要条件^[16]。TLR4 激活后通过 MyD88 进行胞内信号转导,刺激 IκB 发生磷酸化和泛素化而激活 NF-κB 通路,引发下游 TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症因子的合成与释放^[17]。研究表明,NF-κB 信号通路激活后释放的下游炎症因子 IL-6 会促使 Th17 分化启动,

进一步增加 Th17 细胞的数量,使 Th17/Treg 免疫平衡轴失衡,从而导致炎症级联反应的逐步放大,进一步加速胃癌癌前病变病程发展^[18-19]。在胃黏膜免疫微环境中,Th17 介导免疫反应,调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)介导免疫抑制,两者在功能上相互拮抗,共同维持机体免疫平衡。RORγt 是决定 Th17 细胞分化的特异性转录调节因子,Th17 主要分泌细胞因子 IL-17A,IL-17A 具有强烈促炎作用;Foxp3 是调节 Treg 细胞发育的转录因子,Treg 和 TGF-β 共同作用介导免疫抑制^[20]。

本研究结合胃癌癌前病变研究进展及网络药理学预测结果,认为抑制 TLR4/NF-κB 信号通路在胃癌癌前病变大鼠胃组织中的炎性表达以调控 Th17/Treg 免疫平衡轴可能是参芪抑瘤方干预胃癌癌前病变的核心机制之一。为进一步验证,本研究以胃癌癌前病变模型大鼠为研究对象,应用参芪抑瘤方进行干预,在评估模型大鼠一般生存状况及胃黏膜组织病理学改变的基础上,采用分子生物学技术检测胃组织中相关信号通路的关键蛋白及免疫因子表达变化。叶酸为水溶性维生素,有助于人体细胞生长与繁殖^[21],能够参与 DNA 合成,维持其稳定性和完整性,并且能够修复异常的 DNA 甲基化和畸变。胃癌癌前病变患者接受叶酸治疗时,抑癌基因 P53 表达升高,而致癌蛋白表达降低,对防治胃癌癌前病变有益,结合本研究动物模型 MNNG 诱导、非 Hp 感染的特性,综合考虑选用叶酸作为阳性药物进行对照^[22]。结果显示,参芪抑瘤方可有效改善大鼠胃黏膜病理状况,降低 IL-17A、IL-6 水平,升高 TGF-β 水平,同时降低 TLR4、MyD88、NF-κB、RORγt mRNA 和蛋白表达,升高 FOXP3 mRNA 和蛋白表达,提示参芪抑瘤方可能是通过抑制 TLR4/NF-κB 通路改善炎症反应,上调 Treg 表达,改善 Treg/Th17 免疫平衡轴失衡状态,从而实现对胃癌癌前病变的干预作用。其结果与网络药理学预测结果一致。

参考文献:

[1]

Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *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, Piazzuelo M B. The gastric precancerous cascade[J]. *J Dig Dis*, 2012, 13(1): 2-9.

[3]

刘跃平, 柳茂森, 朱临江, 等. 慢性萎缩性胃炎胃黏膜免疫相关指标变化研究[J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(1): 39-43.

[4]

侯建忠, 董珊珊, 袁 明, 等. 2013 年中国肿瘤登记地区胃癌死亡及寿命损失模式分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(14): 986-990.

[5]

皮林君, 马春林, 李海龙, 等. 参芪抑瘤方含药血清对 BGC-823 胃癌细胞增殖和周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 121-125.

[6]

Ru J L, Li P, Wang J A, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 16(6): 13.

[7]

林 玲, 韩 涛, 陆 璐, 等. 慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变动物模型的总结应用与评述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 220-227.

[8]

封壮壮, 宋瑞平, 豆鹏程, 等. 基于 mTOR/Beclin1/LC3 信号轴探讨制萎扶胃丸对胃癌前病变大鼠胃窦组织自噬的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28(4): 361-370.

[9]

施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 335.

[10]

房静远, 杜奕奇, 刘文忠, 等. 中国慢性胃炎共识意见 (2017 年, 上海) [J]. 中华消化杂志, 2017, 37(11): 721-738.

[11]

李 媛. 胃粘膜不典型增生性肠化及异型增生: 形态学和分子生物学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.

[12]

朱凯敏, 吴红彦, 马春林, 等. 基于中医学理论概述参芪抑瘤方防治胃癌的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(16): 88-89; 91.

[13]

Haghi A, Azimi H, Rahimi R. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of three phytochemicals, curcumin, quercetin, and allicin, in the treatment of gastric cancer[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2017, 48(4): 314-320.

[14]

Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, *et al.* Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108612.

[15]

Kim T W, Lee S Y, Kim M, *et al.* Kaempferol induces autophagic cell death *via* IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 875.

[16]

Yakut M, Örmeci N, Erdal H, *et al.* The association between precancerous gastric lesions and serum pepsinogens, serum gastrin, vascular endothelial growth factor, serum interleukin-1 β , serum toll-like receptor-4 levels and *Helicobacter pylori* Cag A status[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2013, 37(3): 302-311.

[17]

尹文君, 王秋平, 李绵利, 等. IL-17A 通过 NF- κ B 活化促进 HepG2 细胞炎症因子分泌[J]. 湘南学院学报 (医学版), 2018, 20(3): 1-4.

[18]

Shan S, Qiao L. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population *via* TGF- β 3[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(9): 2488-2498.

[19]

Jang J S, Choi S R, Han S Y, *et al.* Predictive significance of serum IL-6, VEGF, and CRP in gastric adenoma and mucosal carcinoma before endoscopic submucosal dissection[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2009, 54(2): 99-107.

[20]

Li Q X, Li Q J, Chen J X, *et al.* Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3): 1215-1222.

[21]

中国医药教育协会临床合理用药专业委员会, 中国医疗保健国际交流促进会高血压分会, 中国妇幼保健协会围产营养与代谢专业委员会, 等. 中国临床合理补充叶酸多学科专家共识[J]. 医药导报, 2021, 40(1): 1-19.

[22]

Lei J, Ren F G, Li W Y, *et al.* Use of folic acid supplementation to halt and even reverse the progression of gastric precancerous conditions: a meta-analysis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 370.