

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.10.013

基于 Raf/MEK/ERK 通路探讨平胃胶囊含药血清对 MNNG 诱导的人胃黏膜上皮细胞炎癌转化的影响

汪霞^{1,2}, 王丽娟¹, 牛小英¹, 樊泽坤¹, 牛媛媛¹, 毛兰芳³, 汪龙德³✉

1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市定西东路35号, 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室; 3. 甘肃中医药大学附属医院

[摘要] **目的** 从快速加速纤维肉瘤/丝裂原活化的细胞外信号调节激酶/细胞外信号调节激酶(Raf/MEK/ERK)通路探讨平胃胶囊治疗慢性萎缩性胃炎的可能作用机制。**方法** 15只SD大鼠随机分为空白组5只、平胃胶囊组10只,空白组大鼠给予1 ml/100 g的生理盐水灌胃,平胃胶囊组大鼠给予平胃胶囊混悬液0.63 g/(kg·d)灌胃,连续3天后采集血清。采用N-甲基-N-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导人胃黏膜上皮细胞GES-1建立癌前病变细胞模型。将造模成功细胞分为对照组(10%胎牛血清)、空白血清组(10%胎牛血清+10%空白血清)、含药血清组(平胃胶囊含药血清),采用CCK-8法筛选平胃胶囊含药血清干预体积分数及时间。将人胃黏膜上皮细胞GES-1分为正常组、模型组、空白血清组、含药血清组、U0126组、联合组,每组3个复孔。除空白组外其余各组细胞造模成功后,正常组和模型组加入等体积的胎牛血清,空白血清组加入等体积的空白血清,含药血清组加入筛选确认的体积分数的平胃胶囊含药血清,U0126组给予10 μmol/L的丝裂原活化的细胞外信号调节激酶1(MEK1)抑制剂U0126,联合组给予等体积的平胃胶囊含药血清+10 μmol/L的U0126。培养筛选确认的时间后,ELISA法检测细胞上清中白细胞介素6(IL-6)水平,免疫荧光检测细胞中IL-6、MEK1的表达,RT-qPCR法检测细胞IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA表达,Western Blot法检测细胞IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白表达。**结果** 选取5.35%的体积分数、干预48 h的平胃胶囊含药血清进行后续实验。与正常组比较,模型组、空白血清组细胞上清中IL-6含量,细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA及IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白表达均升高($P<0.01$)。与模型组比较,含药血清组、U0126组、联合组上述各指标均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与含药血清组比较,联合组细胞中IL-6、MEK1表达,IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA表达,IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与U0126组比较,联合组细胞中IL-6表达降低,IL-6、MEK1、ERK1/2蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 平胃胶囊含药血清可能通过抑制Raf/MEK/ERK通路改善GES-1细胞的炎癌转化,从而发挥治疗慢性萎缩性胃炎的作用。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎;平胃胶囊;人胃黏膜上皮细胞;炎癌转化;快速加速纤维肉瘤;丝裂原活化的细胞外信号调节激酶;细胞外信号调节激酶

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是一种胃黏膜上皮受到某些因素的伤害,导致固有腺体减少,同时伴或不伴肠腺化生和/或假幽门腺化生的慢性消化系统疾病^[1]。世界卫生组织已将CAG伴有不典型增生和肠上皮化生划定为胃癌前病变^[2]。胃癌前病变在CAG的基础上,向胃癌方

向发展,因此CAG及胃癌前病变是炎癌转化的关键阶段^[3]。研究发现,在CAG的发展过程中,炎症反应会产生各种免疫因子,具有传递信号、调节功能等作用,而快速加速纤维肉瘤(Raf)/丝裂原活化的细胞外信号调节激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路在调控细胞增殖、细胞周期停滞、终末分化和凋亡方面发挥重要作用^[4],且能调控多种通路与组织上皮细胞及癌细胞上皮间质转化进程^[5]。

基金项目:国家自然科学基金(82160883);甘肃省名中医传承工作室建设项目(国中医药规财函[2021]242号);敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题(DHYX23-13)

✉ 通讯作者:wwl1dd666@163.com

脾虚湿阻、肝失疏泄、气滞血瘀是 CAG 的中医基本病机。平胃胶囊以疏肝健脾为治法，在平胃散（《太平惠民和剂局方》）的基础上化裁而来，已制成甘肃中医药大学附属医院院内制剂并应用于临床。课题组前期研究^[6-9]发现，平胃胶囊能有效改善 CAG 患者胃黏膜腺体萎缩、肠上皮化生和异型增生，并且能够保护胃黏膜、改善胃分泌功能、调节胃肠功能、抑制和清除幽门螺杆菌，可干预癌前病变的进程，但具体机制不明确。因此，本实验通过体外 N-甲基-N-硝基-亚硝基胍（MNNG）诱导人胃黏膜上皮细胞即 GES-1 细胞，使其形成上皮间质转化，以此构建胃癌前病变细胞模型，并用丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 1（MEK1）抑制剂 U0126 进行干预，探讨平胃胶囊含药血清对 GES-1 细胞炎癌转化的影响，为平胃胶囊的临床应用提供依据。本实验经甘肃中医药大学实验动物管理伦理委员会批准进行（批件号：2022-701）。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 SD 大鼠共 15 只，6~8 周龄，体质量（200±20）g，由甘肃中医药大学实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK（甘）2020-0002。饲养于甘肃中医药大学实验动物中心，自然光照，温度 22~25℃，湿度 50%~70%。GES-1 细胞（货号：FH0273）购于上海富衡生物科技有限公司。

1.2 药物

平胃胶囊药物组成：苍术 12 g，厚朴 12 g，木香 10 g，枳壳 12 g，陈皮 10 g，北柴胡 12 g，赤芍 10 g，白及 12 g，三棱 10 g，莪术 10 g，海螵蛸 12 g，浙贝母 10 g，黄连 5 g，蒲公英 15 g，鸡内金 15 g，延胡索 10 g。由甘肃中医药大学附属医院制剂中心加工制备成胶囊（院内制剂，批准文号：甘药制字 Z12002224），每粒胶囊含生药 0.5 g。按人和动物间体表面积折算的等效剂量比率表^[10]换算，去胶囊壳经碾碎后用蒸馏水配制成浓度为 4.8 g/100 ml 的悬浮液，热水煮沸 15 min 冷却后，保存在 4℃ 冰箱。

1.3 主要试剂及仪器

白细胞介素 6（IL-6）、Raf、ERK1/2（BIOSS 公司，批号 BC02286846、AA03224578、AH08292334）；MEK1（Affinity 公司，批号 39m8074）；总 RNA 提取试剂盒（YESEN 公司，批号 10606ES60）；逆转录试剂盒（批号 R202-02）、2×S6 Universal SYBR qPCR Mix（批号 Q204-01），新贝（上海）生物科

技有限公司；山羊抗兔 IgG（Immunoway 公司，批号 B0202）；RIPA 细胞裂解液（Servicebio 公司，批号 CR2101120）；MEK1 抑制剂 U0126（Beyotime 公司，批号 022423230405）；IL-6 ELISA 试剂盒（生物工程研究所有限公司，批号 20230516）；CCK-8 检测试剂盒（APEX BIO 公司，批号 K101811133EF5E）；戊巴比妥钠（国药集团化学试剂有限公司，批号 WS20051230）；MNNG（生化科技有限公司，批号 C14606106）；胎牛血清（依科赛生物科技有限公司，批号 12B276）；RPMI1640（江苏技术股份有限公司，批号 20220407-5）；青霉素、链霉素二抗（批号 20221205）、二甲基亚砜（DMSO，批号 401Q0312）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 20220312），北京索莱宝科技有限公司；ECL（Servicebio 公司，批号 CR2012200）。

显微镜（Olympus 公司，IX51 型）；离心机（Kendro 公司，D-37520 型）；酶标仪（Thermo 公司，MK3 型）；涡旋振荡器（上海沪西分析仪器厂，WH-2 型）；高速冷冻离心机（BECKMAN 公司，Microfuge22R 型）；实时定量 PCR 仪（西安天龙科技有限公司，Gentier 96R 型）。

2 方法

2.1 含药血清的制备

15 只 SPF 级 SD 大鼠喂养 3 天后用随机数字表法分为空白组 5 只、平胃胶囊组 10 只。空白组大鼠每次给予 1 ml/100 g 的生理盐水灌胃，平胃胶囊组大鼠给予平胃胶囊混悬液 0.63 g/(kg·d) 灌胃，每天灌胃 2 次，连续 3 天。最后一次灌胃 2 h 后，用 3% 戊巴比妥钠 0.5 ml/100 g 麻醉，腹主动脉取血，静置后离心，4℃、3000 r/min 离心（离心半径 7.5 cm）10 min，获得血清。56℃ 水浴中灭活处理 30 min 后，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，装于 EP 管并标记，置 -80℃ 中备用。

2.2 细胞培养与传代

GES-1 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。隔天换液，待细胞培养至 70%~80% 时，用胰酶消化，离心重悬后，传代保存。

2.3 MNNG 诱导 GES-1 细胞转化为癌前病变细胞

将 2×10⁵ 个处于对数生长期的 GES-1 细胞接种在 6 cm² 培养皿中，用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基，于 37℃、

5%CO₂培养箱中培养过夜。将MNNG以 2×10^{-5} mol/L 的浓度溶解在DMSO中,在黑暗中诱导GES-1细胞24 h,建立胃癌癌前病变细胞模型^[11]。去除含有MNNG的培养基,加入完全培养基正常培养。1周内可见大量细胞脱落,残存的细胞生长至70%~80%时进行传代。参照文献[12-14]拟定模型成功标准:用显微镜观察GES-1细胞呈多角形,有触角伸出,细胞变长,排列不规则,其周边多呈毛刺状,胞质空泡增多,细胞间接触紧密,呈“岛样”克隆生长,以梭形细胞环绕;ELISA检测同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)表达显著低于正常组,免疫荧光检测肿瘤增殖抗原(Ki67)的表达显著高于正常组,差异有统计学意义,则证明造模成功。

2.4 CCK-8法筛选含药血清的干预时间及体积分数

用随机数字表法将造模成功的细胞分为对照组(10%胎牛血清)、空白血清组(10%胎牛血清+10%空白血清)、含药血清组(平胃胶囊含药血清)。当细胞汇合度为70%~80%时,制备单细胞悬液,96孔板接种细胞,将96孔板置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中继续培养12 h后,弃去原培养液,加入10.0%、5.0%、3.3%、2.5%、2.0%、1.7%、1.4%、1.2%体积分数的平胃胶囊含药血清和空白血清(平胃胶囊含药血清用空白血清相应的成倍数稀释)共100 μl,每个浓度梯度设置3个复孔,于37℃、5%CO₂细胞培养箱中继续培养24 h、48 h、72 h后,用CCK-8试剂盒检测。每孔加入CCK-8试剂10 μl,孵育1 h后,用酶标仪检测各孔吸光度,计算存活率。存活率=[(各血清组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)]×100%,抑制率=1-存活率。

2.5 细胞分组与干预

用随机数字表法将GES-1细胞分为正常组、模型组、空白血清组、含药血清组、U0126组、联合组(含药血清+U0126),每组设置3个复孔。除正常组外,其余各组细胞予MNNG诱导24 h建立胃癌癌前病变细胞模型。造模后,正常组加入10%的胎牛血清,模型组加入10%的胎牛血清,含药血清组加入2.4筛选的最佳体积分数的平胃胶囊含药血清,空白血清组加入同等体积分数的空白血清,U0126组给予10 μmol/L的U0126,联合组给予筛选的最佳体积分数的平胃胶囊含药血清+10 μmol/L的U0126,将培养皿放入37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养(培养时间根据2.4筛选出的干预时间)。

2.6 观察指标及方法

2.6.1 ELISA法检测细胞上清中IL-6水平 取各组细胞上清液,采用ELISA检测技术测定,按照说明书步骤进行,测定细胞上清中IL-6水平。

2.6.2 免疫荧光法检测细胞中IL-6、MEK1的表达 将固定好的细胞用PBS洗涤3次,30% H₂O₂、蒸馏水混合,室温10 min以灭活内源酶,蒸馏水洗3次。滴加正常山羊血清封闭液。烤箱37℃孵育35 min,滴加浓度为1:200的IL-6、MEK1一抗,将切片放入4℃冰箱过夜。后将切片置于37℃烤箱中复温40 min, PBS液冲洗3次。滴加二抗,37℃孵育1 h,用PBS洗3次,滴加DAPI将切片置于湿盒放在烤箱中,温度为37℃、10 min,然后用PBS洗4次。滴加抗荧光淬灭剂封片,避光保存,拍照并保存,用Image pro-Plus6.0软件采集各组荧光照片的光密度值(OD)。

2.6.3 RT-qPCR法检测细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA表达 收集细胞,加入1 ml总RNA提取液,提取RNA并逆转录成cDNA,然后进行PCR扩增反应。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCT}法进行分析。引物由上海生工生物工程有限公司合成,IL-6:正向ACATAGACGGATCACAGTGC,反向AAAATGGGGGAGGATGGCTG,长度147 bp;Raf:正向CAGGTGATGCTCCCACTCTG,反向TTGGAGGGGATAAGGAGGG,长度210 bp;MEK1:正向TAGTTGAGTGTGACGGGTGC,反向CTCCCACCTTCTGCTTCTGG,长度158 bp;ERK:正向CAGTTCTTGACCCCTGGTCC,反向TACATACTGCCGCAGGT-CAC,长度186 bp;GAPDH:正向ATGTTGCAACCGGGAAGGAA,反向AGGAAAAGCATCACCCGGAG,长度159 bp。

2.6.4 Western Blot法检测细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白表达 收集各分组细胞,每管加入200 μl RIPA裂解液,混匀后于冰上裂解离心取上清,进行BCA蛋白定量,加入5×蛋白上样缓冲液于100℃、10 min条件下使蛋白变性,10% SDS-PAGE电泳上样后,转膜至PVDF膜、5%脱脂奶粉室温封闭2 h、一抗(1:1000)4℃孵育过夜,二抗(1:6000)孵育1 h, ECL发光定影,用Image J 1.53软件进行胶片条带的分析。

2.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行处理,计量资料均符合正态分布以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较若方差齐时遵循

LSD 检验，若方差不齐时遵循 Games-Howella 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 含药血清的干预时间及体积分数筛选结果

表 1 示，与同一时间对照组比较，10.0%、5.0%、2.5%、2.0% 体积分数含药血清组干预 48 h 和 72 h 时细胞抑制率显著降低 ($P<0.01$)。对比不同时间段，干预 24 h 时各体积分数的含药血清组细胞抑制率差异无统计学意义 ($P>0.05$)，干预 48 h、72 h 时 10.0%、5.0%、3.3%、2.5%、2.0%、1.7% 体积分数的含药血清组细胞抑制率均较 24 h 时降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；干预 72 h 时 10.0%、5.0%、3.3%、2.5% 体积分数的含药血清组细胞抑制率均较 48 h 时降低 ($P<0.01$)。

在干预 48 h 和 72 h 时，利用 Graphpad 软件绘制四参数拟合曲线，通过该曲线拟合浓度与抑制率的方程，计算抑制率为 30% 时的抑制浓度，抑制率为 30% 时平胃胶囊含药血清的体积分数分别是 5.35%、2.98%。考虑到与 48 h 比较，72 h 干预时间过长可能导致细胞启动自我代偿或通路进行自我反馈，而影响后续实验中通路蛋白的检测准确性，因此在后续实验中选 48 h 作为干预时间。观察 48 h 不同体积分数组含药血清对细胞的抑制率，当细胞的抑制率达到 30% 时，含药血清体积分数为 5.35%，因此选取 5.35% 的体积分数作为后续实验干预的浓度。

3.2 各组细胞上清液中 IL-6 含量及细胞中 IL-6、MEK1 表达比较

表 2 示，与正常组比较，模型组、空白血清组细胞上清中 IL-6 含量及细胞中 IL-6、MEK1 表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，含药血清组、

U0126 组、联合组细胞上清中 IL-6 含量及细胞中 IL-6、MEK1 表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与含药血清组比较，联合组细胞中 IL-6、MEK1 表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，细胞上清中 IL-6 含量表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 U0126 组比较，联合组细胞中 IL-6 表达降低 ($P<0.05$)，而细胞上清中 IL-6 含量及细胞中 MEK1 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组细胞上清中 IL-6 含量及细胞中 IL-6、MEK1 表达比较

Table 2 Comparison of IL-6 content in cell supernatants and expression of IL-6 and MEK1 in cells of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IL-6/pg·ml ⁻¹	IL-6/平均荧光强度	MEK1/平均荧光强度
正常组	3	1.768±0.958	1.000±0.225	1.000±0.124
模型组	3	5.356±0.576 ^{a)}	3.229±0.196 ^{a)}	3.313±0.186 ^{a)}
空白血清组	3	5.053±1.521 ^{a)}	3.267±0.157 ^{a)}	3.132±0.180 ^{a)}
含药血清组	3	3.284±0.520 ^{b)}	2.517±0.188 ^{c)}	2.357±0.262 ^{c)}
U0126 组	3	3.157±0.720 ^{b)}	2.235±0.199 ^{c)}	2.197±0.317 ^{c)}
联合组	3	2.147±0.999 ^{c)}	1.619±0.138 ^{c)d)f)}	1.603±0.221 ^{c)e)}

注：IL-6，白细胞介素 6；MEK1，丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 1。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与含药血清组比较， $P<0.01$ ；e) 与含药血清组比较， $P<0.05$ ；f) 与 U0126 组比较， $P<0.05$ 。

3.3 各组细胞中 IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA 表达比较

表 3 示，与正常组比较，模型组、空白血清组细胞中 IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA 表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，含药血清组、U0126 组、联合组细胞中 IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA 表达均降低 ($P<0.01$)。与含药血清组比较，U0126

表 1 各组细胞不同时间细胞抑制率比较

Table 1 Comparison of inhibition rate at different times in each group of cells ($\bar{x}\pm s$)

组别	体积分数/%	样本数	24 h	48 h	72 h
对照组	—	3	1.000±0.038	1.000±0.060	1.000±0.096
空白血清组	—	3	1.080±0.068	1.024±0.043	0.991±0.077
含药血清组	10.0	3	0.906±0.056	0.598±0.030 ^{a) b)}	0.348±0.010 ^{a) b) d)}
	5.0	3	0.921±0.092	0.690±0.046 ^{a) b)}	0.442±0.027 ^{a) b) d)}
	3.3	3	0.955±0.027	0.736±0.053 ^{a) b)}	0.558±0.055 ^{a) b) d)}
	2.5	3	0.961±0.048	0.794±0.059 ^{a) c)}	0.615±0.029 ^{a) b) d)}
	2.0	3	0.976±0.008	0.828±0.044 ^{a) b)}	0.787±0.005 ^{a) b)}
	1.7	3	1.028±0.036	0.937±0.030 ^{a)}	0.920±0.005 ^{b)}
	1.4	3	1.037±0.089	0.985±0.009	0.960±0.060
	1.2	3	1.062±0.017	0.993±0.048	0.999±0.011

注：a) 与同一时间对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与同一体积分数 24 h 比较， $P<0.01$ ；c) 与同一体积分数 24 h 比较， $P<0.05$ ；d) 与同一体积分数 48 h 比较， $P<0.01$ 。

表3 各组细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA表达比较

Table 3 Comparison of IL-6, Raf, MEK1 and ERK mRNA expression in cells of each group ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IL-6	Raf	MEK1	ERK
正常组	3	1.001±0.133	1.010±0.180	1.009±0.165	1.006±0.141
模型组	3	2.108±0.060 ^{a)}	3.017±0.080 ^{a)}	2.046±0.080 ^{a)}	3.402±0.117 ^{a)}
空白血清组	3	2.137±0.011 ^{a)}	2.985±0.551 ^{a)}	1.994±0.073 ^{a)}	3.476±0.237 ^{a)}
含药血清组	3	1.587±0.084 ^{b)}	1.838±0.072 ^{b)}	1.386±0.055 ^{b)}	1.804±0.054 ^{b)}
U0126组	3	1.296±0.086 ^{b) c)}	1.551±0.068 ^{b) c)}	1.200±0.037 ^{b)}	1.514±0.045 ^{b)}
联合组	3	1.175±0.037 ^{b) c)}	1.345±0.072 ^{b) c)}	1.128±0.034 ^{b) d)}	1.374±0.046 ^{b) d)}

注：IL-6，白细胞介素6；Raf，快速加速纤维肉瘤；MEK1，丝裂原活化的细胞外信号调节激酶1；ERK，细胞外信号调节激酶。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与含药血清组比较， $P<0.01$ ；d) 与含药血清组比较， $P<0.05$ 。

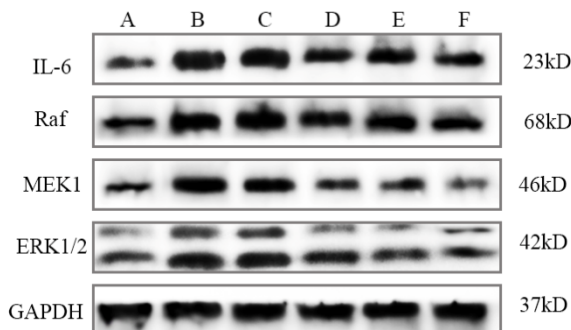
组细胞中IL-6、Raf mRNA表达降低，联合组细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK mRNA均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.4 各组细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白表达比较

表4示，与正常组比较，模型组、空白血清组细胞中IL-6、Raf、MEK1及ERK1/2蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，含药血清组、U0126组、联合组细胞中IL-6、Raf、MEK1及ERK1/2蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。与含药血清组比较，U0126组细胞中Raf蛋白表达降低，联合组细胞中IL-6、Raf、MEK1及ERK1/2蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与U0126组比较，联合组细胞中IL-6、MEK1及ERK1/2蛋白表达降低 ($P<0.01$)。各组细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白电泳图见图1。

4 讨论

根据CAG临床表现，可归属于中医学“痞满”“胃脘痛”“嘈杂”等范畴。脾胃运化失司可导致气滞、湿热、痰饮、火郁、食积、瘀血等一系列的病理性产物，从而进一步引起气机阻滞，湿火相合，痰瘀互结，因此认为脾虚湿阻、肝失疏泄、气滞血瘀



注：A，正常组；B，模型组；C，空白血清组；D，含药血清组；E，U0126组；F，联合组；IL-6，白细胞介素6；Raf，快速加速纤维肉瘤；MEK1，丝裂原活化的细胞外信号调节激酶1；ERK1/2，细胞外信号调节激酶1/2。

图1 各组细胞中IL-6、Raf、MEK1、ERK1/2蛋白电泳图
Figure 1 Electrophoresis of IL-6, Raf, MEK1, ERK1/2 proteins in each group of cells

是CAG的基本病机。平胃胶囊秉承了国医大师周信有教授“复方多法、综合运用、整体调节”的学术思想^[15]，以疏肝健脾为治法，全方共奏燥湿健脾、疏肝理气、和胃止痛、活血消滞之功。肝主疏泄，性喜条达而恶抑郁，辛能散能行，当肝气郁结时，应以辛散之品疏理肝气，使肝气条达顺畅；当肝气升泄太过时应以酸敛之品收敛、消减其刚烈之

表4 各组细胞中IL-6、Raf、MEK1及ERK1/2蛋白表达比较

Table 4 Comparison of IL-6, Raf, MEK1 and ERK1/2 protein expression in cells of each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IL-6	Raf	MEK1	ERK1/2
正常组	3	0.593±0.026	0.565±0.057	0.357±0.030	0.865±0.049
模型组	3	1.085±0.023 ^{a)}	1.035±0.020 ^{a)}	0.804±0.025 ^{a)}	1.400±0.047 ^{a)}
空白血清组	3	1.044±0.032 ^{a)}	0.957±0.035 ^{a)}	0.722±0.036 ^{a)}	1.309±0.020 ^{a)}
含药血清组	3	1.000±0.043 ^{b)}	0.906±0.029 ^{b)}	0.532±0.024 ^{b)}	1.221±0.038 ^{b)}
U0126组	3	0.938±0.035 ^{b)}	0.693±0.030 ^{b) c)}	0.587±0.030 ^{b)}	1.124±0.062 ^{b)}
联合组	3	0.795±0.060 ^{b) c) e)}	0.622±0.031 ^{b) c)}	0.450±0.026 ^{b) d) e)}	0.958±0.058 ^{b) c) e)}

注：IL-6，白细胞介素6；Raf，快速加速纤维肉瘤；MEK1，丝裂原活化的细胞外信号调节激酶1；ERK1/2，细胞外信号调节激酶1/2。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与含药血清组比较， $P<0.01$ ；d) 与含药血清组比较， $P<0.05$ ；e) 与U0126组比较， $P<0.01$ 。

性。脾主运化，喜燥恶湿，若痰饮水湿困遏脾气，致使脾气不升、脾阳不振，应以苦能燥湿之性治之。肝脾功能失调可导致气滞、湿热、痰饮、火郁、食积、瘀血等一系列病理产物的产生；反之，病理产物堆积，则呈现“愈虚愈实”的病机特点，表现为气机阻滞、湿火相合、痰瘀互结等。针对此病机特点，平胃胶囊方中苍术辛苦性温，燥湿健脾，助脾之运化；柴胡辛香入肝，疏肝理气，共为君药。厚朴行气燥湿除满，为消除胀满之要药，助苍术燥湿运脾；浙贝母化痰散结；延胡索行气活血止痛，枳壳行气宽胸而除胀，配合陈皮、木香疏肝理气为臣。佐以黄连、蒲公英清热解毒以除热，用海螵蛸制酸止痛；赤芍活血化瘀、行气止痛，配合三棱、莪术破血行气消积；鸡内金消食导滞，白及止血生肌，扶助胃气。全方气血同调，寒温并用，同时兼顾次症。本研究首先对含药血清干预时间及体积分数进行了筛选，结果发现 5.35% 平胃胶囊含药血清干预 GES-1 细胞 48 h 时，细胞抑制率可达 30%，故选取为实验干预时间及体积分数。

IL-6 作为一种炎性介质在各种炎症性疾病中大量产生，当受到刺激时，IL-6 可作用于目的细胞，促使机体发生炎症反应，调节免疫应答、调控细胞相关基因的增殖与凋亡^[16]。Raf、MEK 和 ERK 是 IL-6 的下游因子，被激活后 ERK 移位到细胞核中磷酸化转录因子，调节它们的活性，抑制细胞的凋亡，推动癌症的发生^[17-18]。研究证实，Raf/MEK/ERK 通路与胃癌有密切关系，且 IL-6 通过激活 Raf/MEK/ERK 通路，调控癌症的进程，干预炎症的转化^[19]。通过下调 IL-6 可抑制 Raf/MEK/ERK 通路，改善炎症因子的水平，进而抑制肿瘤的发展^[19-20]。

本研究结果显示，模型组细胞上清中 IL-6 含量明显升高，说明细胞中炎症反应增加，同时细胞中 IL-6、Raf、MEK1、ERK 蛋白和 mRNA 表达升高，说明炎症因子参与了炎症转化的过程。平胃胶囊含药血清干预后，细胞上清中 IL-6 含量及细胞中 IL-6、Raf、MEK1、ERK 蛋白和 mRNA 表达降低，表明平胃胶囊能够抑制炎症反应，且与 Raf/MEK/ERK 信号通路相关。U0126 为 MEK1 的抑制剂，与 U0126 组比较，含药血清组降低 IL-6、Raf、MEK1、ERK 的表达与 U0126 组无显著差异，联合干预后 IL-6、Raf、MEK1、ERK 的表达进一步降低，说明联合组能够更显著地改善炎症因子的表达，调控炎症转化的进程。本研究结果与既往相关研究结果^[21]一致。

综上所述，平胃胶囊含药血清可改善 MNNG

诱导的 GES-1 细胞的胃癌前病变，其可能通过抑制 Raf/MEK/ERK 通路干预炎症转化的进程，是改善胃癌前病变的重要机制之一。本研究未与中医证型结合，在后期实验中应注重病证结合的探索。在未来的实验研究中，有待应用现代科研技术单细胞组学深入探讨平胃胶囊治疗胃癌前病变的作用机制，不断丰富其科学内涵与临床应用范畴。

参考文献

- [1] 李军祥, 陈詒, 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.
- [2] CORREA P, SHIAO Y. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis[J]. Cancer Research, 1994, 54 (7 Suppl): 1941s-1943s.
- [3] 刘伟, 倪家慧, 张丹, 等. 中医药调控胃“炎症转化”癌前微环境的思考与策略[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38 (4): 1431-1435.
- [4] WU PK, BECKER A, PARK JI. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5436.
- [5] 杨丹芬, 谢圆媛, 康睿. 血管紧张素 II 通过 Raf/MEK/ERK 通路对 PDGF 诱导的气道上皮细胞转分化的影响[J]. 河北医药, 2022, 44(8): 1141-1146.
- [6] 杨少军, 汪龙德, 张晶, 等. 平胃胶囊治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变 45 例临床研究[J]. 中医杂志, 2014, 55 (20): 1745-1749.
- [7] 王琦, 杨少军. 平胃胶囊治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(11): 2685-2686.
- [8] 王四兵, 汪龙德, 刘晓燕, 等. 平胃胶囊治疗慢性萎缩性胃炎伴肠化生 45 例[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20 (9): 75-76.
- [9] 何子才, 庞国学, 汪龙德. 平胃胶囊治疗慢性萎缩性胃炎疗效分析[J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(8): 689-689, 690.
- [10] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [11] 刘雪, 孙向红, 戚欣. MNNG 诱导 GES-1 细胞恶性转化细胞模型的建立[J]. 齐鲁医学杂志, 2013, 28(2): 115-116, 120.
- [12] 孙振卿, 闫慧明, 贾彬, 等. 从形态及功能研究 MNNG 诱导 GES-1 永生细胞的恶性转化[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(22): 14-18.
- [13] 闫慧明, 孙振卿, 贾彬, 等. 研究 MNNG 诱导 GES-1 发生恶性转化后 PTEN 蛋白的变化意义[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(23): 6, 50.
- [14] 徐星榕, 白菊萍, 边芸, 等. CK、MUC5ac、Ki67 表达与胃癌癌前病变的关系及对胃癌早期诊断的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(12): 1522-1525.

- [15]李欣瑜,刘俊宏,户艳玲,等. 国医大师周信有教授辨治消化性溃疡的经验总结[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4):966-967.
- [16]郭金惠,武彩娥. 胃癌前病变时血浆白细胞介素 2 和白细胞介素 6 的变化[J]. 标记免疫分析与临床, 1996(1):58.
- [17]DEGIRMENCI U, WANG M, HU J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy [J]. Cells, 2020, 9(1):198.
- [18]ULLAH R, YIN Q, SNELL AH, et al. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85(10):123-154.
- [19]YOSIFOV DY, REUFSTECK C, KONSTANTINOV SM, et al. Interleukin-6, osteopontin and Raf/MEK/ERK signaling modulate the sensitivity of human myeloma cells to alkylphosphocholines[J]. Leuk Res, 2012, 36(6):764-772.
- [20]LI S, TIAN J, ZHANG H, et al. Down-regulating IL-6/GP130 targets improved the anti-tumor effects of 5-fluorouracil in colon cancer [J]. Apoptosis, 2018, 23 (5):356-374.
- [21]郭敏,王晓鸽,杨国红,等. 健脾活瘀方抑制 IL-6/JAK1/STAT3 信号通路抗胃癌前病变的机制研究[J]. 中医药信息, 2020, 37(3):44-49.

Exploring the Effect of Medication-Containing Serum of *Pingwei Capsules* (平胃胶囊) on MNNG-Induced Inflammatory Cancer Transformation of Human Gastric Mucosal Epithelial Cells Based on Raf/MEK/ERK Pathway

WANG Xia^{1,2}, WANG Lijuan¹, NIU Xiaoying¹, FAN Zekun¹, NIU Yuanyuan¹, MAO Lanfang³, WANG Longde³

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; 2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Translation Department, Ministry of Education; 3. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Pingwei Capsules* (平胃胶囊) for chronic atrophic gastritis from rapidly accelerated fibrosarcoma / mitogen-activated protein kinase / extracellular-signal-regulated kinase (Raf/MEK/ERK) pathway that influences the activation of fibrosarcoma protein/mitogen. **Methods** Fifteen SD rats were randomly divided into 5 rats in the blank group and 10 rats in *Pingwei Capsules* group. The rats in the blank group were given 1 ml/100 g of saline by gavage, and the rats in *Pingwei Capsules* group were given 0.63 g/(kg·d) of *Pingwei Capsule* suspension by gavage, and serum was collected for 3 consecutive days. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) was used to induce human gastric mucosal epithelial cells GES-1 to establish a precancerous lesion cell model. The successful cells were divided into control group (10% fetal bovine serum), blank serum group (10% fetal bovine serum plus 10% blank serum), and medication-containing serum group (serum with medication of *Pingwei Capsule*), and the volume fraction and time of intervention of *Pingwei Capsule*-containing serum were screened by CCK-8 assay. Human gastric mucosal epithelial cells GES-1 were divided into normal group, model group, blank serum group, medication-containing serum group, U0126 group, and combined group, with 6 replicate wells in each group. After successful modelling of the cells in all groups except the blank group, an equal volume of fetal bovine serum was added to the normal and model groups, an equal volume of blank serum was added to the blank serum group, a screening volume fraction of *Pingwei Capsule*-containing serum was added to *Pingwei Capsule* group, a 10 μmol/L mitogen-activated extracellular signal regulated kinase 1 (MEK1) inhibitor U0126 was administered in the U0126 group, an equal dose of *Pingwei Capsule*-containing serum plus 10 μmol/L of U0126 was administered to the combined group. After the selected incubation time, the level of interleukin 6 (IL-6) was detected in the cells by ELISA, the expression of IL-6 and MEK1 was detected by immunofluorescence, and the expression of IL-6, Raf, MEK1, and ERK mRNA was detected by RT-qPCR, and the expression of IL-6, Raf, MEK1, and ERK mRNA in the cells was detected by Western blot. **Results** The 5.35% volume fraction, 48 h intervention of *Pingwei Capsule*-containing serum was selected for subsequent experiments. Compared with the normal group, the IL-6 content in cell supernatants and the expression of IL-6, Raf, MEK1, ERK mRNA and ERK1/2 proteins in cells increased in the model group and blank serum group ($P < 0.01$). Compared with the model group, all of the above indexes were improved in medication-containing serum group, U0126 group, and combined group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with medication-containing serum group, the expression of IL-6, MEK1 expression, the expression of IL-6, Raf, MEK1 and ERK mRNA, and the expression of IL-6, Raf, MEK1 and ERK1/2 proteins reduced in the cells of combined group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the U0126 group, IL-6 expression reduced and IL-6, MEK1 and ERK1/2 protein expression reduced in cells of combined group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The *Pingwei Capsule*-containing serum may play a role in the treatment of chronic atrophic gastritis by improving the inflammation-cancer transformation of GES-1 cells through inhibiting the Raf/MEK/ERK pathway.

Keywords chronic atrophic gastritis; *Pingwei Capsules* (平胃胶囊); human gastric mucosal epithelial cells; inflammation-cancer transformation; rapidly accelerated fibrosarcoma; mitogen-activated protein kinase; extracellular-signal-regulated kinase

(收稿日期: 2023-12-05; 修回日期: 2024-01-27)

[编辑: 邓媛]