

安胃汤含药血清调节 Fas/FasL 信号通路促进 MC 细胞凋亡的影响

韦 维¹ 林寿宁^{2*} 朱永苹² 张雪莲¹ 黄春全¹ 李月月¹

(1. 广西中医药大学 广西 南宁 530200; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院 广西 南宁 530011)

摘要: 目的 探讨安胃汤含药血清对 MC 细胞 [MNNG 诱导人胃黏膜上皮细胞系 (GES-1) 恶性转化] Fas/FasL 信号通路相关因子及细胞凋亡影响。方法 根据中药复方血清药理学实验方法,以 MC 细胞为研究对象,设立空白组 (A 组)、安胃汤组 (B 组)、安胃汤 + 阻断剂组 (C 组)、阻断剂组 (D 组)。含药血清处理 12 h、24 h、48 h 后的各组细胞采用流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA 检测细胞培养液上清 FasL 的含量; Western blot 和 Real-time PCR 检测 Fas、Bcl-2、Bax 蛋白及 mRNA 的表达。结果 A 组细胞凋亡率比较低, B、C、D 组细胞凋亡率有所增加; 24h 和 48h 时与 A 组比较, B、C、D 三组细胞培养液上清中 FasL 的含量均有所增加 ($P < 0.01$); 与 A 组相比, B、C、D 三组细胞内 Fas、Bax 基因及蛋白表达有所升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), Bcl-2 基因及蛋白表达有所降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 安胃汤能促进 MC 细胞细胞凋亡,可能与其通过调控 Fas/FasL 通路,调控 Bcl-2、Bax mRNA 及蛋白有关。

关键词: 安胃汤; MC 细胞; 细胞凋亡; Fas/FasL; 血清药理学

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.06.003

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2020)06-1289-05

Effect of Anwei Decoction – containing serum on promoting apoptosis of MC cells by regulating Fas/FasL signaling pathway

WEI Wei¹ LIN Shou-ning^{2*} ZHU Yong-ping² ZHANG Xue-lian¹ HUANG Chun-quan¹ LI Yue-yue¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China; 2. Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011 China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Anwei Decoction – containing serum on related factors in the Fas/FasL signaling pathway and apoptosis of MC cells obtained through MNNG – induced malignant transformation of human gastric epithelial cell strain (GES-1). **Methods** Using the methods of serum pharmacology for Chinese medicine, MC cells were randomly divided into 4 groups: blank control group (group A), Anwei Decoction group (group B), Anwei Decoction + blocker group (group C), and blocker group (group D). 12, 24, and 48 h after treatment with the medicated serum, flow cytometry was used to measure the apoptotic rate of each group of cells; ELISA was used to determine the content of FasL in the supernatant of the cell culture fluid; Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of genes Fas, Bcl-2, and Bax and their proteins, respectively. **Results** The apoptotic rate was low in group A and increased in groups B, C and D, that in group C increasing most significantly. Compared with group A, the content of FasL in the cell culture fluid supernatant increased in groups B, C, and D at 24 and 48h ($P < 0.01$), that in group C increasing most obviously; the expression levels of genes Fas and Bax and corresponding proteins increased and those of Bcl-2 and corresponding proteins decreased in groups B, C, and D ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Anwei Decoction may promote MC cell apoptosis by regulating the Fas/FasL pathway and regulating the expression of genes Bcl-2 and Bax and corresponding proteins.

Keywords: Anwei Decoction; MC cells; Apoptosis; Fas/FasL; Serum pharmacology

慢性萎缩性胃炎 (Chronic Atrophic Gastritis, CAG) 的癌变率为 2.55% ~ 7.46% 在胃黏膜癌前病变中占有重要地位,早期胃癌的治疗效果很好,但很多患者在发现时已经是中晚期,错过了根治的最佳时期^[1],因此,防治 CAG 是胃癌二级预防的重点和难

点。随着疾病治疗模式的转变,人们越来越意识到中医药(补充与替代疗法)在调节胃肠道疾病中的作用。一项 34525 例胃肠道疾病人群调查研究显示^[2],在美国有 42% 的人使用补充替代疗法,其中排第一位就是植物药治疗,而且 80% 的人从中获益。安胃汤为广西中医药大学瑞康医院消化内科协定处方,临床治疗慢性胃病效果较显著。项目组发现安胃汤通过调控细胞核内 PI3K/Akt 通路下调 XIAP 基因及蛋白促进 MC 细胞细胞凋亡相关^[3]。课题组为了解安胃汤是否同时通过细胞膜上 Fas/FasL 信号传导通路作用并影响细胞核内 Bcl-2、Bax 基因及蛋白的表达而调控细胞凋亡效应作用机制开展本研究,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 动物和细胞株 实验用清洁级 Wistar 大鼠 12 只 [购自常州卡文斯,许可证号: SCXK(苏) 2016-0010],体重为 (170 ~ 190)

收稿日期: 2019-08-26; 修订日期: 2020-04-09

基金项目: 国家自然科学基金 (81360533)

作者简介: 韦 维 (1975-),男 (汉族),广西宾阳人,广西中医药大学教授,博士学位,主要从事中医药防治消化系统疾病临床与实验工作。

* 通讯作者简介: 林寿宁 (1956-),男 (汉族),广西贵港人,广西中医药大学附属瑞康医院主任医师,学士学位,主要从事消化系统疾病临床与实验工作。

g, 饲养环境: 温度(23 ± 3) °C 相对湿度(55 ± 8) % ,GES-1 细胞(上海生博)。

1.2 药物、试剂 安胃汤: 百合 20g, 白芍 20g, 乌药 7g, 丹参 15g, 薏苡仁 10g, 半夏 13g, 黄连 5g, 干姜 5g, 炙甘草 5g, 广西中医药大学瑞康医院制剂室提供; PI、CCK-8 (碧云天); Annexin V-FITC/PI 试剂盒(贝博生物); N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)(东京化成工业株式会社); 丽春红 S, PBS 磷酸盐缓冲液(上海国药); Trizol (美国 invitrogen); 逆转录试剂盒(美国 Thermo); LY294002(贝博生物); BCA 蛋白定量试剂盒, 5% 的 BSA (Biosharp); DEPC 处理水(美国 Sigma); pvd 膜(美国 millipore); SYBR Green PCR 试剂盒(美国 Thermo); 人凋亡相关因子配体(FASL/TNFSF6) ELISA 检测试剂盒(Elabscience E-EL-H0068c)。

1.3 仪器 细胞培养箱(Thermo Scientific 8000); 一体式化学发光成像仪(ChemiScope 5300 Pro); 光学显微镜(XDS-1A); 流式细胞仪(BD-FACSVerse); 酶标检测仪(Thermo MK3 型)(Thermo); Real-time 检测仪(ABI-7500); 倒置拍照显微镜(OLYMPUS IX71); 电泳仪(BIO-RAD)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 Wistar 大鼠 12 只, 正常喂养 3 天后, 随机分为 4 组, 以正常成人剂量按照《药理实验方法学》^[4] 中“人与动物按体表面积折算的等效剂量比值表”计算出大鼠等效剂量, 得到安胃汤剂量 $1.545 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, LY294002 浓度 $25 \mu\text{mol/L}$, 按前述药物剂量分别给予生理盐水、安胃汤 $1.545 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、安胃汤 $1.545 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} + \text{LY294002}$ (浓度 $25 \mu\text{mol/L}$)、LY294002 (浓度 $25 \mu\text{mol/L}$) 灌胃(每次 2 ml), 每日 2 次, 连续 7 天, 末次给药 12 h 采血, 制备含药血清, -20°C 保存。

2.2 MC 细胞模型的构建 MNNG 诱导人胃黏膜上皮细胞系(GES-1)恶性转化^[5,6]: 常规培养 GES-1 细胞, 达到对数生长期时向其加入 MNNG(浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 常规培养 24 h 后更换 RPMI-1640 培养液培养, 胎牛血清(FBS)培养 2 周, 期间可见大量细胞死亡脱落, 待残存的细胞长至 $75 \pm 5\%$ 的饱和度时, 按照 GES-1 细胞培养法消化传代, 传至第 4 代时, 冻存留用模型即 MC 细胞构建成功。

2.3 细胞分组培养及药物干预 实验分组分为空白组(A 组, 不做任何干预)、安胃汤组(B 组)、安胃汤+阻断剂组(C 组)、阻断剂组(D 组)。手机各组 MC 细胞, 消化后调整细胞浓度为 5×10^4 cells/mL, 加至 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, A 组加入同体积的标准培养液, B、C、D 组加入相应的药物血清, 37°C 5% CO_2 培养箱, 收集各时间点细胞(12h、24h、48h)进行相应的检测。

2.4 流式细胞仪细胞凋亡 将“2.3”项收集的细胞进行细胞凋亡检测, 收获细胞并用 PBS 洗涤两次, 然后将细胞重新悬浮 $300 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 中。此后, 加入 $5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{L}$ 的碘化丙啶(PI), 将细胞在避光条件下室温孵育 10 min。通过流式细胞仪对经处理的样品进行分析, 用 CELL Quest 软件分析。

2.5 ELISA 检测细胞培养液上清 FasL 的含量 具体实验步骤参照说明书进行, 主要实验步骤如下: 加样: 样品稀释液 $100 \mu\text{L}$ 加入空白孔, 标准孔、待检测样品孔分别加标准品或待测样品 $100 \mu\text{L}$, 轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜, 37°C 孵育 90min; 弃去液体, 每孔加生物素化抗体工作液 $100 \mu\text{L}$ (在使用前 15min 配制), 酶标板上覆膜, 37°C 孵育 1h; 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 3 次, 每次浸泡 $1 \sim 2 \text{ min}$, 大约 $350 \mu\text{L}/\text{孔}$; 每孔加酶结合物工作液(临用前 15min 配制) $100 \mu\text{L}$, 加上覆膜, 37°C 孵育 30min; 弃去孔中液体, 甩干, 洗板 5 次, 每次浸泡 $1 \sim 2 \text{ min}$, 大约 $350 \mu\text{L}/\text{孔}$, 甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干; 每孔加底物溶液(TMB) $90 \mu\text{L}$, 酶标板上覆膜, 37°C 避光孵育 15 min 左右; 每孔加终止液 $50 \mu\text{L}$,

终止反应, 此时蓝色立转黄色, 终止液的加入顺序与底物加入顺序相同; 用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。酶标仪应提前打开预热并设置好程序。

2.6 各组细胞内 Fas、Bcl-2、Bax 蛋白 Western blot 检测 将“2.3”项收集的细胞, 按照说明书提取总蛋白, 用 RIPA 裂解液混匀, 离心, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性, 配制分离胶, 120 V 恒温电泳至溴酚蓝刚出胶底不止, 转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 小时。稀释抗体(Fas: ab82419; Bcl-2: ab32124; Bax: 32503)和膜孵育 1 小时, 孵育一抗的膜用 TBST 洗涤 3 次, 稀释 HRP 标记的兔二抗(protech) 孵育, 洗涤 3 次, 检测 Fas、Bcl-2、Bax 蛋白的变化。

2.7 各组细胞内 Fas、Bcl-2、Bax 基因的 RT-PCR 检测 将“2.3”项收集的细胞, 加入蛋白裂解液, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, Actin 为参, 进行定量 PCR 检测, 按说明书进行。反应条件如下: 首先预变性 94°C 10 min; 其次 94°C 20s, 55°C 20s, 72°C 20s 40 个循环。每个样本重复 3 次。采用 ΔCt 法计算各组 mRNA 的相对表达。

表 1 引物序列表

Primer	Sequence(5'-3')
Fas 上游	TGCACCCGGACCCAGAATAC
Fas 下游	TCGTGTGCAAGGCTCAAGGA
Bcl-2 上游	TTCCAGCCTGAGAGCAACCG
Bcl-2 下游	GAGGGTCAGGTGGACACACAG
Bax 上游	CCAGGACGCATCCACCAAGA
Bax 下游	TCAGCTGCCACACGGAAGAA
Actin 上游	CACCCGCGAGTACAACCTTC
Actin 下游	CCCATACCCACCATCACACC

2.8 统计学分析 采用 Origin 软件进行数据分析和数据制图, 数据以 $\text{AV} \pm \text{SD}$ 表示, 统计分析方法采用 T 检验, 各组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠 MC 细胞模型的构建及鉴定及细胞凋亡分析 成功构建及鉴定大鼠 MC 细胞模型, B、C、D 细胞凋亡率较 A 组增加^[3]。

3.2 对细胞培养液上清中 FasL 含量的影响 ELISA 实验结果如图 1 显示: 12h 时, 各组别中细胞培养液上清中 FasL 含量无明显变化; 24h 和 48h 时, 相比于空白对照组 A, B、C、D 三组细胞培养液上清中 FasL 的含量均有所增加, 其中安胃汤+阻断剂组增加最为明显; 随着培养时间延长, 各组别间细胞培养液上清中 FasL 含量变化越为显著($P < 0.01$) 其中 48h 各组别变化最为明显。

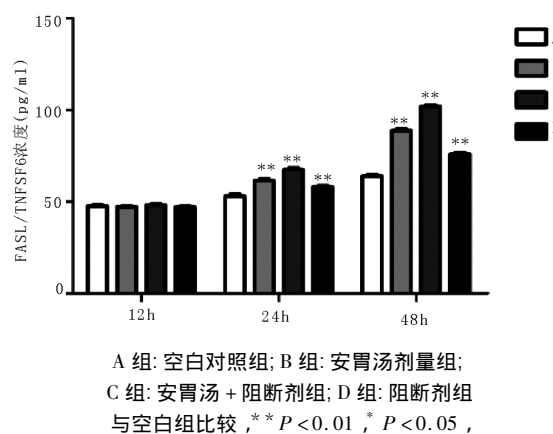
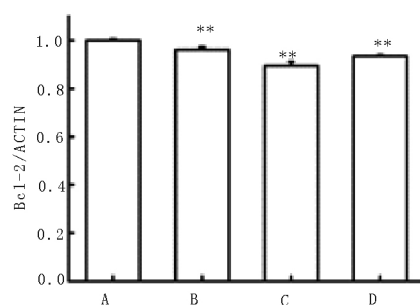
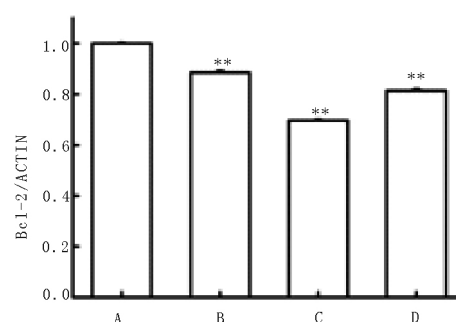
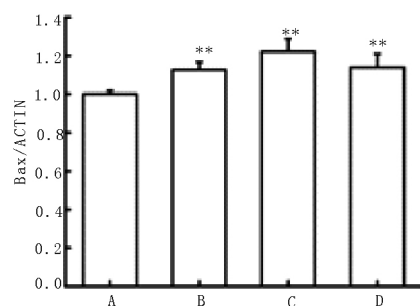
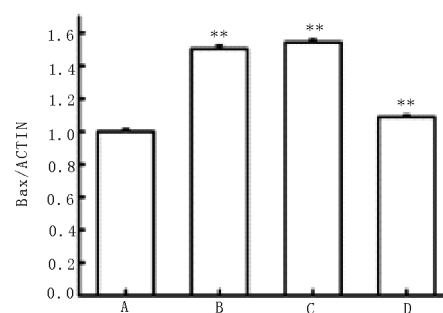
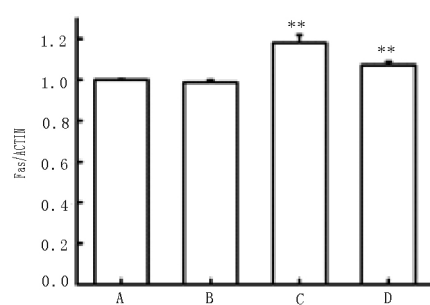
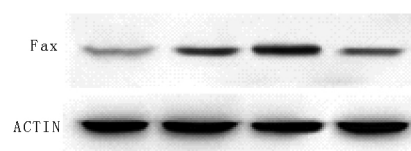
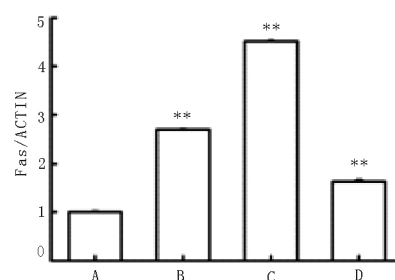


图 1 12 h、24 h、48 h 时间点含药血清对 MC 细胞 FasL 含量的影响

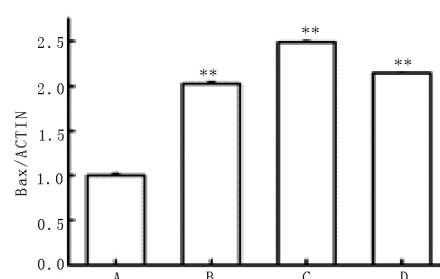
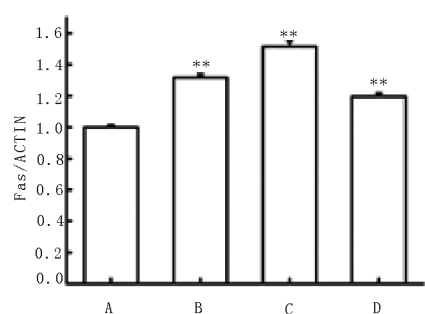
3.3 对细胞各组 Fas、Bcl-2、Bax 蛋白的表达的影响 含药血清干预 12 h、24 h、48 h 后, 与 A 组相比较, B、C、D 组细胞内 Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.01$); Fas 和 Bax 蛋白表达水平增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见图 2。

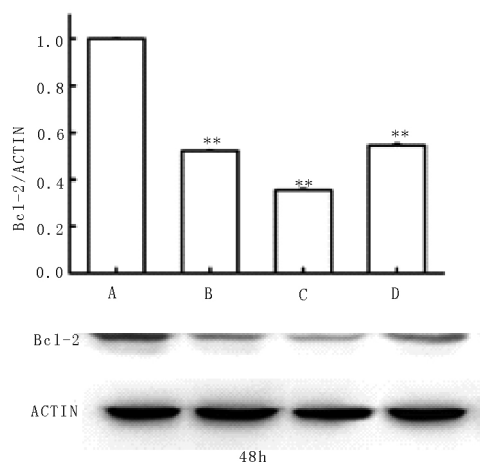


A12h



24H

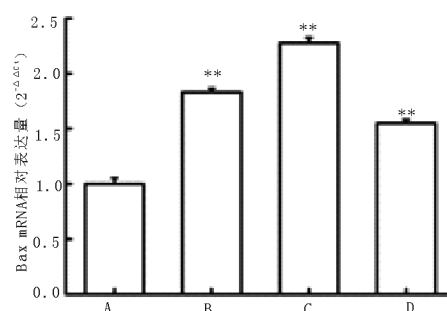
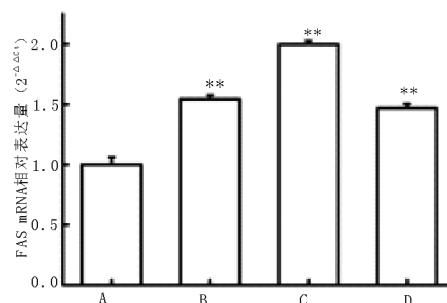
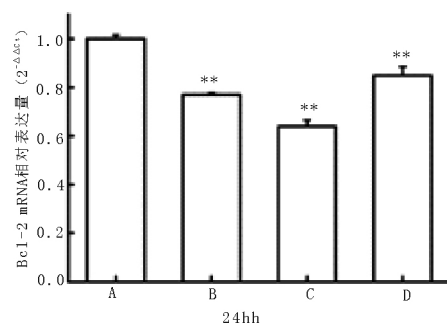
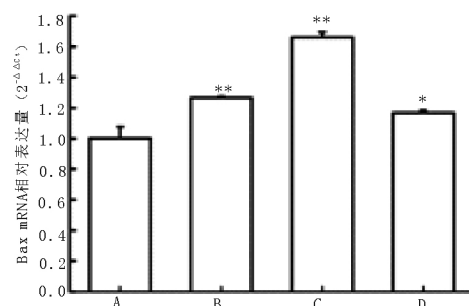
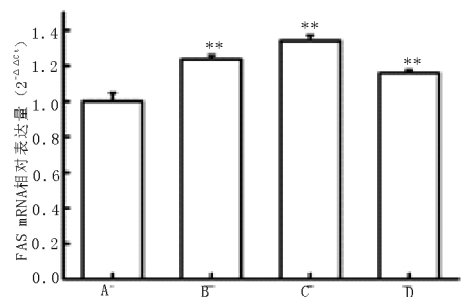
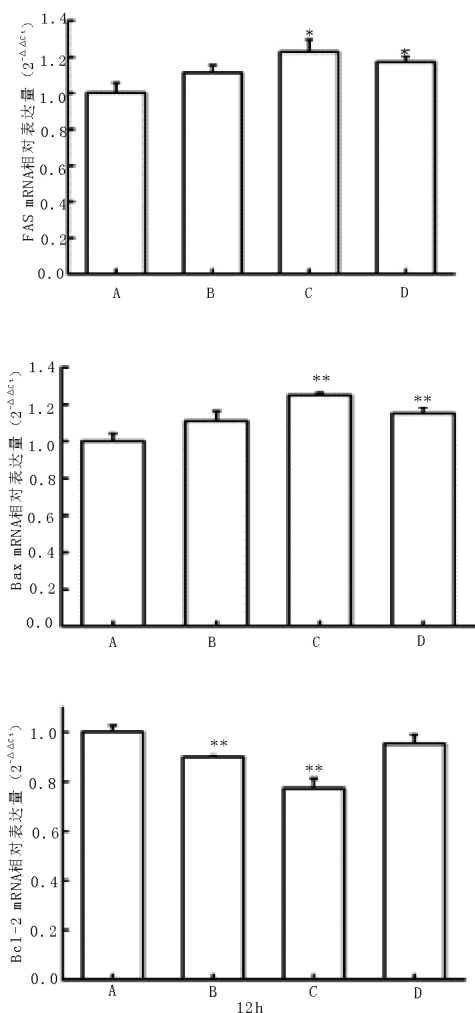


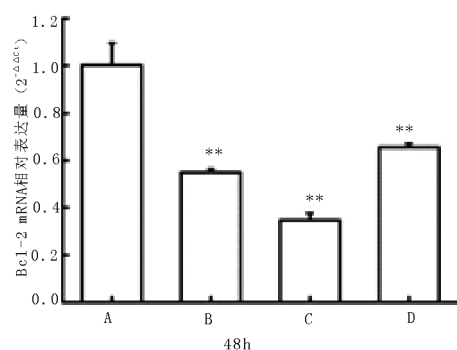


A 组: 空白组; B 组: 安胃汤剂量组; C 组: 安胃汤 + 阻断剂组;
D 组: 阻断剂组; 与空白组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图 2 12 h、24 h、48 h 时间点含药血清对 MC 细胞
Fas、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

3.4 对各组细胞内 Fas、Bcl-2、Bax 基因的表的影响 含药血清干预 12 h、24 h、48 h 后, 与 A 组相比, B、C、D 组细胞内 Bcl-2 基因表达水下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 A 组相比, B、C、D 组细胞内 Fas 和 Bax 基因表达水平升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见图 3。





A 组: 空白组; B 组: 安胃汤剂量组;
C 组: 安胃汤 + 阻断剂组; D 组: 阻断剂组
与空白组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$
图 3 12 h、24 h、48 h 时间点含药血清对 MC 细胞
Fas、Bcl-2、Bax 基因表达的影响

4 讨论

安胃汤^[7]是林沛湘教授治疗慢性胃病验方,疗效显著。临床研究表明,安胃汤对 CAG 治疗效果部分作用机制为调节 GAS、MTL、SP 等胃肠激素达到增加微循环血流,促进腺体的再生,改善胃黏膜的炎症反应,促进局部胃黏膜的修复^[8],可以明显改善患者胃黏膜萎缩、肠化生及不典型增生^[9]。实验机理研究方面,安胃汤通过^[10]抑制 JAK1/STAT3 信号传导通路调节细胞凋亡,通过^[11]抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性,促进 CAG 模型大鼠胃黏膜萎缩腺体上皮细胞凋亡,促进腺体再生及胃黏膜修复。

研究表明, Fas 作为细胞表面重要的死亡受体,发挥抑制细胞凋亡的作用,形成诱导细胞凋亡的经典途径之一^[12,13]。Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平高低与凋亡调控关系密切。Bcl-2/Bax 比值降低诱导细胞凋亡, Bcl-2/Bax 值升高抑制细胞凋亡^[14,15]。Fas/FasL 信号通路失衡可以导致胃黏膜癌变过程中细胞凋亡抑制^[16],目前,中医药诱导细胞凋亡已成为防治胃癌的比较重要机制。国外有研究表明^[17], Fas 和 Fas 配体分子在包括中性粒细胞在内的各种细胞类型的凋亡信号传导中起着中心作用。Fas 受体通过诱导细胞凋亡控制局部炎症的发展^[18]。幽门螺杆菌通过调节 Bax/Bcl-2 水平诱导宿主细胞凋亡发生^[19]。王成龙等^[20]发现 Fas 和 FasL 在正常黏膜、间变黏膜、胃癌黏膜病理发展过程中表达率分别逐步降低和逐步升高。

本研究结果显示, B、C、D 细胞凋亡率较 A 组增加; ELISA 实验结果显示: 12h 时, 各组别中细胞培养液上清中 FasL 含量无明显变化; 24h 和 48h 时, 相比于 A 组, B、C、D 三组细胞培养液上清中 FasL 的含量均有所增加, 其中 C 组增加最为明显 ($P < 0.01$); WB 实验结果及 RT-PCR 实验结果显示: 与 A 组相比, B、C、D 三组细胞内 Fas 和 Bax mRNA 及蛋白表达有所升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与 A 组相比, B、C、D 三组细胞内 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达有所降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

综上所述, 安胃汤能抗 CAG, 可能与其调控 Fas/FasL 通路, 上调 Bax 及下调 Bcl-2 mRNA 及蛋白, 进而促进 MC 细胞细胞凋亡, 可能是其抗 CAG 的作用机制之一。至于在抗 CAG 的作用过程中, 细胞膜上的 Fas/FasL 信号通路和细胞内 PI3K/Akt 信号通

路、JAK1/STAT3 信号传导通路之间促进细胞凋亡的关系如何, 有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Shen L, Shan YS, Hu HM, et al. Management of gastric cancer in Asia: resource-stratified guidelines [J]. Lancet Oncol, 2013, 14(12): 535.
- [2] Dossett ML, Davis RB, Lembo AJ, et al. Complementary and alternative medicine use by US adults with gastrointestinal conditions: Results from the 2012 National Health Interview Survey [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(11): 1705.
- [3] 韦维, 林寿宁, 朱永苹, 等. 安胃汤含药血清通过调节 PI3K/Akt 信号通路促进 MC 细胞凋亡的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2059.
- [4] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 A 版. [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 70.
- [5] Wang B, Su X, Ke Y. Activation of proto-oncogenes induced by MNNG on primary culture of human gastric epithelium and immortalized human gastric epithelial cell line [J]. Chin J Oncol, 1996, 18(1): 6.
- [6] 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.
- [7] 林寿宁. 中医临床家 - 林沛湘 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 99.
- [8] 朱永苹, 林寿宁, 黄适. 安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎 32 例临床观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(10): 1030.
- [9] 朱永苹, 林寿宁, 韦维, 等. 安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对 EGFR mRNA 的影响 [J]. 广西中医药, 2012, 35(2): 8.
- [10] 韦维, 汪波, 万文雅, 等. 安胃汤干预慢性萎缩性胃炎大鼠 JAK/STAT 信号传导通路的作用机制 [J]. 中医药导报, 2017, 23(15): 22.
- [11] 韦维, 林寿宁, 汪波, 等. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 PI3K/Akt 信号传导通路的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(5): 1088.
- [12] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 412.
- [13] 张玲霞, 张沥. 细胞凋亡及其调控基因与萎缩性胃炎 [J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(5): 581.
- [14] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759.
- [15] McClintock DS, Santore MT, Lee VY, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(1): 94.
- [16] Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki W, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach [J]. J Pathol, 2002, 196(2): 171.
- [17] Ozel EG, Duran GG, Celik MM, et al. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in Turkish patients with Familial Mediterranean Fever [J]. Gene, 2017, 623: 29.
- [18] Bieñ K, migrodzka M, Orowski P, et al. Involvement of Fas/FasL pathway in the murine model of atopic dermatitis [J]. Inflamm Res, 2017, 66(8): 679.
- [19] Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, et al. Binding of the Helicobacter pylori OipA causes apoptosis of host cells via modulation of Bax/Bcl-2 levels [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8036.
- [20] 王成龙, 谭家麟. 胃癌发生发展中 Fas、FasL 和 hBcl-2 的表达 [J]. 中国肿瘤, 2001, 10(1): 46.