

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.07.03

Foxo3a 激活 FasL 参与胃黏膜上皮细胞凋亡探讨 舒胃汤防治肝胃郁热型胃溃疡的研究

张 琪, 梁海业, 陈世新, 李丽清
(广西桂平市中医医院 脾胃病科, 广西 桂平 537200)

摘要:[目的]通过检测治疗前、后胃黏膜上皮细胞凋亡、Foxo3a、FasL 及胃镜变化,探讨舒胃汤防治胃溃疡的可能机制。[方法]选择符合诊断标准、纳入标准及排除标准的胃溃疡患者 30 例,予舒胃汤连续 6 周。应用电子胃镜检测治疗前、后溃疡变化;TUNEL 染色检测治疗前后胃黏膜上皮细胞凋亡变化;以及 Real-time PCR 技术检测治疗前后 Foxo3a、FasL、Caspase-8 变化。[结果]从胃镜下溃疡修复分析,舒胃汤治疗肝胃郁热型胃溃疡总有效率为 80%,治疗前胃黏膜上皮细胞凋亡率为 $14.36 \pm 2.71\%$,Foxo3a、FasL 及 Caspase-8 mRNA 表达分别为 1.89 ± 0.32 、 2.13 ± 0.25 、 2.04 ± 0.22 ;治疗后胃黏膜上皮细胞凋亡率为 $5.73 \pm 0.46\%$,Foxo3a、FasL 及 Caspase-8 mRNA 表达分别为 1.02 ± 0.11 、 1.13 ± 0.19 、 1.21 ± 0.09 。[结论]舒胃汤可能通过下调 Foxo3a、FasL 及 Caspase-8 表达,延缓上皮细胞凋亡,促进黏膜修复,达到防治胃溃疡的效用。

关键词:舒胃汤;Foxo3a/FasL;胃黏膜上皮细胞凋亡;胃溃疡

中图分类号:R573.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2015)07-0458-04

Clinical study on Shuwei decoction in the prevention and treatment of gastric ulcer with heat stagnancy of liver and stomach through Foxo3a activated FasL mediating gastric epithelial cell apoptosis

ZHANG Qi, LIANG Hai-ye, CHEN Shi-xin, LI Li-qing

(Department of Spleen Stomach Disease, The TCM Hospital of Guiping City, Guiping 537200, China)

Corresponding author: ZHANG Qi, E-mail: 327664246@qq.com

Abstract:[Objective]To access the prevention mechanism of Shuwei decoction on gastric ulcer by detecting the apoptosis of gastric mucosa epithelial cells and the expression of Foxo3a, FasL and the changes under gastroscop before and after the treatment. [Methods]Thirty gastric ulcer patients who matched the diagnostic criteria, inclusion criteria and exclusion criteria were given Shuwei decoction for 6 weeks. The changes of ulcer were observed under the gastroscop before and after the treatment. The apoptosis of gastric mucosal epithelial cells was detected by TUNEL staining. The expression of Foxo3a, FasL and Caspase-8 were detected by Real-time PCR. [Results]Based on the analysis of ulcer repair under gastroscop, the total efficiency of Shuwei decoction was 80%. Before the treatment, the apoptosis rate of gastric mucosa epithelial cells was $14.36 \pm 2.71\%$. The expression of Foxo3a, FasL and Caspase-8 mRNA were 1.89 ± 0.32 , 2.13 ± 0.25 , 2.04 ± 0.22 , respectively. But after the treatment, the apoptosis rate of gastric mucosa epithelial cells was $5.73 \pm 0.46\%$. The expression of Foxo3a, FasL and Caspase-8 mRNA were 1.02 ± 0.11 , 1.13 ± 0.19 , 1.21 ± 0.09 respectively. [Conclusion]Shuwei decoction can prevent the occurrence of gastric ulcer by reducing the expression of Foxo3a, FasL and Caspase-8, delaying the epithelial cell apoptosis and promote mucosal repair.

Key words:Shuwei decoction; Foxo3a/FasL; gastric epithelial cell apoptosis; gastric ulcer

收稿日期:2015-01-15

基金项目:广西卫生厅自筹经费项目(No:Z2014554)

作者简介:张 琪,女,本科,副主任中医师,主要从事消化性溃疡中医药防治。

通讯作者:张 琪,女, E-mail: 327664246@qq.com

从“无酸则无溃疡”→“无 *H. ploryi* 则无溃疡”→“提高黏膜愈合质量是溃疡治疗的关键”被认为是消化性溃疡防治史的三次飞跃^[1-3]。胃溃疡的愈合质量与胃黏膜屏障修复密切相关,而胃黏膜屏障的修复与上皮细胞凋亡息息相关,如果胃上皮细胞凋亡增加则必然导致溃疡愈合迟缓。那么,调控胃上皮细胞凋亡对于提高溃疡愈合质量无疑是有利的^[4]。晚近研究发现 PI3 K/AKT 信号通路参与胃上皮细胞的增殖、分化及凋亡,尤其是 PI3 K/AKT 通路下游重要的转录因子叉头框蛋白 O3 a(fork-head box protein O3 a,Foxo3a)激活 FasL 在胃黏膜上皮细胞凋亡中有着重要作用^[5-6]。笔者前期在中医药理论指导下,自拟舒胃汤并应用该方治疗肝胃郁热型胃溃疡疗效确切,但关于其具体效应机制尚未明了。由此,本文从 Foxo3a 激活 FasL-Caspase8 参与胃黏膜上皮细胞凋亡角度,探讨舒胃汤防治胃溃疡的作用机理。

1 对象与方法

1.1 病例来源

全部病例均源自于我院消化内科门诊 2013 年 1 月~2014 年 1 月就诊患者,其中男性 14 例,女性 16 例,平均年龄(37.23±11.16)岁,病程(2.45±1.12)个月。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参照《内科学》第八版中有关消化性溃疡章节中的诊断内容^[7]。

1.2.2 中医诊断标准 参照中华中医药学会主编《中医内科常见疾病诊疗指南·西医疾病部分》中消化性溃疡辨证分型章节关于肝胃郁热诊断标准^[8]。

1.3 纳入标准

①符合诊断标准;②年龄 18~65 岁;③理解和

签署知情同意书。

1.4 排除标准

①不符合诊断标准;②溃疡>1 cm;③合并消化道出血、幽门梗阻、癌变及穿孔者;④孕妇及近 3 月有意怀孕者。

1.5 研究方法

研究设计:采用历史前后自身对照设计,观察 30 例患者治疗前、治疗后胃镜、胃黏膜上皮细胞凋亡、凋亡相关基因包括 Foxo3a、FasL、Caspase-8 表达变化。

药物干预:全部病例均予舒胃汤(柴胡 10 g、白芍 12 g、枳壳 10 g、甘草 6 g、厚朴 10 g、砂仁 6 g、蒲公英 15 g、石斛 15 g、郁金 12 g、川楝子 6 g、延胡索 12 g、芦根 15 g),连续 6 wk,应用免煎中药颗粒剂,由江苏江阴天江药业有限公司生产,购自本院药房。

观察指标:①胃镜下观察胃黏膜愈合质量:参照中国中西医结合消化专业委员会 2011 年修订《消化性溃疡中西医结合诊治共识意见》中关于内镜下评价溃疡内容判断胃黏膜愈合质量,于治疗前、治疗后 6 wk 检查胃镜^[9];②胃黏膜上皮细胞凋亡检测:分别于治疗前、治疗后 6 周,采用 TUNEL 染色法观察胃黏膜上皮细胞凋亡变化,严格按照实验步骤进行,应用 Image pro plus 6.0 进行图像分析;③胃黏膜 Foxo3a、FasL、Caspase-8 mRNA 表达:分别于治疗前、治疗后 6 周,采用 Real-time PCR 技术检测胃黏膜 Foxo3a、FasL、Caspase-8 基因表达,具体实验步骤严格按照试剂说明进行,Foxo3a、FasL、Caspase-8 以及 GAPDH 引物序列设计由广州达安基因生物公司合成,见表 1。

表 1 Foxo3a、FasL、Caspase-8 以及 GAPDH 引物序列

基因	上游序列	下游序列	扩增片段/bp
Foxo3a	5'CCGGATATCGGCAGAGGCACCGGCTT'3	5'CGCGGATCCTCAGCCTGGCACCCA'3	136
FasL	5'GATATGCTGTGGATCAT GGC'3	5'AACTTTTCGTTCAACAG'3	201
Caspase-8	5'GATATTGGGGAACAACCTGGAC'3	5' CATGTCATCATCCAGTTTGCA'3	121
GAPDH	5'CGGAGTCAACGGATTTGGTC'3	5'AGCCTTCTCCATGGTGGTGA'3	72

注:在 Gen Bank 上查找目的基因 mRNA 序列,在 CDS 区设计特异性引物。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计分析软件,计数指标(胃镜计分)用频数和构成比描述,等级资料采用秩和检验;计量指标用 $\bar{x} \pm s$ 描述,符合正态分布则采用 ANOVA 方差分析或 t 检验, $P < 0.05$,为有统计学

意义。

2 结果

2.1 从镜下胃溃疡变化评价总体疗效

从治疗前、后内镜下胃溃疡变化判断临床治愈 3 例,显效 6 例,有效 15 例,无效 6 例,总有效率为

80%。

2.2 治疗前和治疗后胃黏膜上皮细胞凋亡率

治疗前和治疗后胃黏膜上皮细胞凋亡率见表 2。

表 2 治疗前、后胃黏膜上皮细胞凋亡率比较
%, $\bar{x}\pm s$

组别	例数	胃上皮细胞凋亡率
治疗前	30	14.36 $\pm$ 2.71 ¹⁾
治疗后	30	5.73 $\pm$ 0.46

与治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

2.3 治疗前和治疗后胃黏膜 Foxo3a、FasL、Caspase-8 mRNA 表达

治疗前,胃黏膜 Foxo3a、FasL、Caspase-8 mRNA 表达均呈上升趋势;治疗后 Foxo3a、FasL、Caspase-8 mRNA 表达较治疗前下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 治疗前、后胃黏膜 Foxo3a、FasL、Caspase-8 mRNA 表达变化
 $\bar{x}\pm s$

组别	例数	Foxo3a	FasL	Caspase-8
治疗前	30	1.89 $\pm$ 0.32 ¹⁾	2.13 $\pm$ 0.25 ¹⁾	2.04 $\pm$ 0.22 ¹⁾
治疗后	30	1.02 $\pm$ 0.11	1.13 $\pm$ 0.19	1.21 $\pm$ 0.09

与治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

如何提高溃疡愈合质量?减少溃疡复发?在胃溃疡的发生、发展过程中,胃上皮细胞凋亡参与黏膜修复备受关注,调控胃上皮细胞凋亡相关基因促进黏膜修复的作用亦受到越来越多的重视^[10]。上皮细胞凋亡无外主动凋亡途径(死亡受体途径)和被动凋亡途径(线粒体通路),Foxo3a 激活 FasL 途径,Caspase-8 活化在胃黏膜上皮细胞凋亡过程中的地位不容忽视^[11]。本研究结果亦发现,胃溃疡患者 Foxo3a、FasL 及 Caspase-8 表达呈明显上升趋势,该趋势与胃上皮细胞凋亡率增加变化齐同,而予以舒胃汤治疗 6 wk 后,胃溃疡在获得临床疗效的同时,胃黏膜上皮细胞凋亡率下降,伴见 Foxo3a、FasL 及 Caspase-8 表达下降。作者基于中医药理论指导下,依据多年临床经验,从肝胃郁热角度出发,在清肝和胃、降逆抑酸、理气止痛为大法下自拟舒胃汤,该方由柴胡 10 g、白芍 12 g、枳壳 10 g、甘草 6 g、厚朴 10 g、砂仁 6 g、蒲公英 15 g、石斛 15 g、郁金 12 g、川楝子 6 g、延胡索 12 g、芦根 15 g 组成,临床疗效确切。

生理情况下,胃上皮细胞处于不断自我更新和维持组织平衡,这一进程需要多条信号通路的协调以保证上皮细胞的增殖和分化之间维持平衡^[12]。表皮细胞生长因子(epidermal growth factor,EGF)与其受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)结合后,激活 p85 募集 p110 在细胞膜附近使其活化,进而催化膜内表面的磷酸肌醇二磷酸(PIP2)生成磷酸肌醇三磷酸(PI3 P),PI3 P 作为第二信使,激活 Akt,进而激活磷酸化的 Foxo3a,使其与胞核内结构蛋白 GSK3 β 特异性结合,从胞核转移到胞浆,经过泛素化讲解,丧失正常的转录活性,从而降低细胞凋亡,共同维持胃上皮细胞的生长和增殖^[13]。病理情况下,PI3 K/AKT 信号通路过度活化,去磷酸化的 Foxo3a 大部分进入细胞核内,不被泛素化讲解,将加速上皮细胞凋亡^[14]。本研究发现,胃溃疡患者治疗前胃黏膜上皮细胞凋亡率明显高于治疗后,且治疗前 Foxo3a、FasL、Caspase-8 表达明显呈上升趋势;治疗后,胃黏膜上皮细胞凋亡率下降,伴见 Foxo3a、FasL、Caspase-8 表达下降,上述指标改变与病情改善呈正相关。

由此,我们推测,在炎症持续这种强应激信号刺激下,胃溃疡患者 Foxo3a 高表达,启动促凋亡基因 FasL,进而激活凋亡蛋白酶 Caspase-8,促进胃黏膜上皮细胞凋亡,反过来又加重炎症;而舒胃汤可能通过降低 Foxo3a、FasL、Caspase-8 表达而延缓胃上皮细胞凋亡而发挥缓解症状,减轻炎症,促进黏膜修复的效用。

参考文献

[1] SUGIMOTO M, UOTANI T, FURUTA T. Does rebamipide prevent gastric mucosal injury in patients taking aspirin and clopidogrel[J]? Dig Dis Sci., 2014, 59:1671-1673.

[2] GONG M, LING S S, LUI S Y, et al. Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease[J]. Gastroenterology, 2010, 139:564-573.

[3] LUO X J, LIU B, DAI Z, et al. Stimulation of calcitonin gene-related peptide release through targeting capsaicin receptor:a potential strategy for gastric mucosal protection[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58:320-325.

[4] KOBAYASHI M, TAKEUCHI M, HASHIMOTO S, et al. Contributing factors to gastric ulcer healing after endoscopic submucosal dissection including the promoting effect of rebamipide[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57:119-126.

[5] HUANG P, ZHOU Z, WANG H, et al. Effect of the IGF-1/PTEN/Akt/FoxO signaling pathway on the development and healing of water immersion and restraint

stress-induced gastric ulcers in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30:650—658.

[6] XIA H H, TALLEY N J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96:16—26.

[7] 葛均波, 徐永健主编. 内科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:347—350.

[8] 中华中医药学会. 中医内科学常见病诊治指南, 西医疾病部分[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008:97—99.

[9] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 消化性溃疡中西医结合诊疗共识意见[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2012, 32(6):733—739.

[10] LV G, ZHU H, ZHOU F, et al. AMP-activated protein kinase activation protects gastric epithelial cells from *Helicobacter pylori*-induced apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453:13—18.

[11] ZHU W L, TONG H, TEH J T. Forkhead box protein o3 transcription factor negatively regulates autophagy in human cancer cells by inhibiting forkhead box protein o1 expression and cytosolic accumulation[J]. *PLoS One*, 2014, 9:e115087.

[12] McCRACKEN K W, CATÁE M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids [J]. *Nature*, 2014, 516:400—404.

[13] ZAIDI S F, MUHAMMAD J S, SHAHRYAR S, et al. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141:403—410.

[14] WANG J, LIU S, YIN Y, et al. FOXO3-mediated up-regulation of Bim contributes to rhein-induced cancer cell apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2014, [Epub ahead of print]

(上接第 457 页)

[2] 袁以洋, 于庆生, 潘晋方, 等. 芪黄煎剂对胃切除大鼠小肠黏膜上皮内和固有层 T 淋巴细胞的影响[J]. *安徽中医学院学报*, 2012, 31(1):42—46.

[3] 杨建军, 秦环龙, 耿 翔, 等. 不同营养途径对急性胰腺炎大鼠肠道淋巴细胞归巢的影响[J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(4):281—283.

[4] 杨 辉, 唐承薇, 郝理华, 等. 生长抑素或肠血管活性多肽调节大鼠肠淋巴细胞归巢机制初探[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(2):194—197.

[5] 周开国, 何桂珍, 董良广, 等. 建立大鼠持续性肠内营养的输注模型和淋巴液引流方法[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(3):49—51.

[6] 于庆生, 陈子义, 唐雄荣. 芪黄煎剂对胃癌切除后早期淋巴细胞免疫功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1996;2(2):13—15.

[7] YU Q S, CHEN Z Y, TANG X R, et al. Study on early application of Chinese medicinal herbs after total gastrectomy[J]. *CJIM*, 2000, 6:188—191.

[8] 于庆生, 侯 勇, 张福忠, 等. 胃癌术后小肠内滴注中药改善细胞免疫功能和肠黏膜通透性临床研究[J]. *安徽中医学院学报*, 2006, 25(1):7—11.

[9] 于庆生, 张 琦, 潘晋方, 等. 中药芪黄煎剂对大鼠胃癌术后早期免疫功能和肠黏膜屏障的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2009, 15(2):135—138.