

胆碱能抗炎通路对胃癌癌前病变炎症反应的调节作用

喻大军^{1,2}, 顾康生¹, 钱 军²

摘要 目的 探讨胆碱能抗炎通路(CAP)对胃癌癌前病变(PLGC)炎症反应的调节作用。方法 将56只Wistar大鼠随机分为正常对照组10只,模型组46只。模型组采用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为主的复合造模法制备PLGC大鼠模型。将造模成功的大鼠随机抽取40只分为模型组、PNU282987低剂量组(1.6 mg/kg)、PNU282987中剂量组(2.0 mg/kg)、PNU282987高剂量组(2.4 mg/kg),每组10只。正常对照组与模型组正常饲养,PNU282987组每日按以上剂量腹腔注射1次,给药3周。检测各组大鼠血清和病变组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)促炎因子的表达。结果 PLGC造模成功的各组大鼠血清及病变组织中TNF- α 、IL-6的含量明显高于正常对照组($P < 0.05$),PNU282987高剂量组(2.4 mg/kg)大鼠血清及病变组织中TNF- α 、IL-6的含量低于中、低剂量组及模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChRs$)激动剂PNU282987可能通过CAP下调TNF- α 和IL-6等促炎因子的水平。

关键词 胆碱能抗炎通路;胃癌;炎症反应

中图分类号 R 735.2;R 364.5;R 363.27

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1128-04

胃癌癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)被认为是胃癌发病前一定存在的一个缓慢渐进的病理过程,有向胃癌转变的趋势。胃癌的发生、发展及治疗还存在不少有待解决的问题,而从肿瘤预防角度,关注PLGC的转化与逆转显得尤为重要。PLGC可激发机体自身的免疫炎症反应,激活巨噬细胞参与免疫炎症反应,释放各种促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等,造成自身炎症反应的加重,促进病理状态的恶化。多种促炎细胞因子可通过调控不同系统和局部炎症反应,最终导致胃癌的发生发展^[1-2]。PLGC被认为是一个复杂的、多种致病因素相互结合共同致病的过

程。虽然学术界认为幽门螺旋杆菌是PLGC进程中最为重要的一个因素,但研究^[3]显示抗幽门螺旋杆菌也未必可以逆转PLGC的病理进程,其主要原因是幽门螺旋杆菌感染还可以激发体内的免疫反应,造成各种促炎和抗炎因子的释放,即使根除了幽门螺旋杆菌感染,因为免疫反应被激活,各种炎症恶性循环的刺激依然会造成机体的损伤,所以抑制免疫炎症反应的恶化被认为是PLGC治疗过程中亦较为重要的一个部分。PLGC时期的治疗存在着逆转胃癌发生的可能性。胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)是近10年来研究较为热点的神经抗炎通路^[4],被认为是体内最有效,且完全没有任何毒副作用的神经抗炎通路,更重要的是CAP主要依赖迷走神经的胆碱能神经纤维支配各个效应器官,而在胃部存在体内最多的迷走神经分布^[5]。因此该研究通过N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为主的复合造模法制备PLGC大鼠模型,给予 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, $\alpha 7nAChR$)激动剂PNU282987干预,探讨CAP对PLGC炎症反应的调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 MNNG、PNU282987购自美国Sigma公司;TNF- α 及IL-6 ELISA试剂盒购自上海美轩生物科技有限公司。

1.2 实验动物及分组 8~10周龄雄性Wistar大鼠56只(蚌埠医学院实验动物中心),清洁级,体重175~200 g,随机分为正常对照组10只,模型组46只。模型组造模成功后大鼠随机抽取40只分为模型组、PNU282987低剂量组(1.6 mg/kg)、PNU282987中剂量组(2.0 mg/kg)、PNU282987高剂量组(2.4 mg/kg),每组10只。分笼饲养。

1.3 大鼠PLGC动物模型的建立 采用MNNG饮用液自由饮用法配合模拟幽门螺杆菌感染状态下高氨对胃黏膜的毒性损害法造模^[6]。用去离子水将MNNG配成1 g/L的储备液(每周配制1次),避光冷藏保存。大鼠正常饮食适应喂养1周后,临用时将其配成200 μ g/ml的饮用液,装入外贴黑色避光

2014-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173386)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

² 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科,蚌埠 233000

作者简介:喻大军,男,主治医师;

顾康生,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: gks63@tom.com

纸的 500 ml 饮水瓶中,整个配制过程避光操作。饮水瓶内给大鼠自由引用,每 24 h 更换 1 次药液;用 70% 乙醇 30 ml(每 3 d 1 次)以及 0.1% 氨水 10 ml(每周 1 次)加入饮水液中。造模期间不再给予其他饮水。连续 11 周。正常对照组常规喂养。于第 8 周末从造模组随机抽出 6 只大鼠,正常对照组抽出 6 只大鼠。采用戊巴比妥钠过量麻醉处死,取出胃黏膜组织,肉眼观察了解胃黏膜变化情况后,用 4% 多聚甲醛固定,于胃窦部剪取组织一块,石蜡包埋,做常规病理切片。与正常对照组比较,模型组大鼠胃黏膜呈现散落状,胃壁变薄,弹性变差等,色泽苍白,黏液分泌减少,色泽晦暗等特点,光镜下显示上皮细胞排列紊乱,异型增生,变性坏死的上皮细胞随处可见,可见核分裂,肠化生程度每只程度接近。据此可以认为本次实验模型建立成功。

1.4 实验方法 造模开始第 9 周开始给药,将造模成功的大鼠随机分为模型组、PNU282987 低剂量组(1.6 mg/kg)、PNU282987 中剂量组(2.0 mg/kg)、PNU282987 高剂量组(2.4 mg/kg),每组 10 只。正常对照组与模型组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,低剂量组 MNNG 造模后腹腔注射 1.6 mg/kg PNU282987,中剂量组 MNNG 造模后腹腔注射 2.0 mg/kg PNU282987,高剂量组 MNNG 造模后腹腔注射 2.4 mg/kg PNU282987,每日腹腔注射 1 次,给药 3 周。

1.5 标本收集及检测指标 于第 11 周末,禁食禁水 12 h 后脱颈椎处死大鼠取血检测各项指标。取大鼠心脏血,离心分离血清。立即开腹,取下大鼠胃部组织,经生理盐水冲洗漂净,然后取小块胃组织以生理盐水(pH 7.4)制备成匀浆,4 ℃(3 000 r/min,15 min)离心,取匀浆上清液分装,-80 ℃保存,用 ELISA 法检测大鼠血清及胃部组织中 TNF- α 、IL-6 水平。于胃窦部剪取一块组织,使用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋用于 HE 染色并作病理切片。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先对所有数据做正态分布检验,如果属于正态分布则组间比较采用单因素方差分析,方差齐时用 t 检验,方差不齐采用 LSD 法。非正态分布采用中位数表示。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 大鼠 PLGC 动物模型建立后,经组织学检测,模型组大鼠胃部组织细胞核深染、增

大、异形、增生活跃,腺体拥挤、形态稍不规则,可见复层及背靠背现象,间质有少量淋巴细胞浸润。大鼠发生 PLGC 炎症反应,模型构建成功。PNU282987 低剂量组黏膜完整度与模型组类似,脱落变性、坏死的上皮细胞,伴有中、重度炎症表现。中、高剂量组则表现为黏膜完整度较模型组高,表面可见少许脱落的变性、坏死的上皮细胞,肠化生程度较轻,伴有轻、中度炎症表现。见图 1。

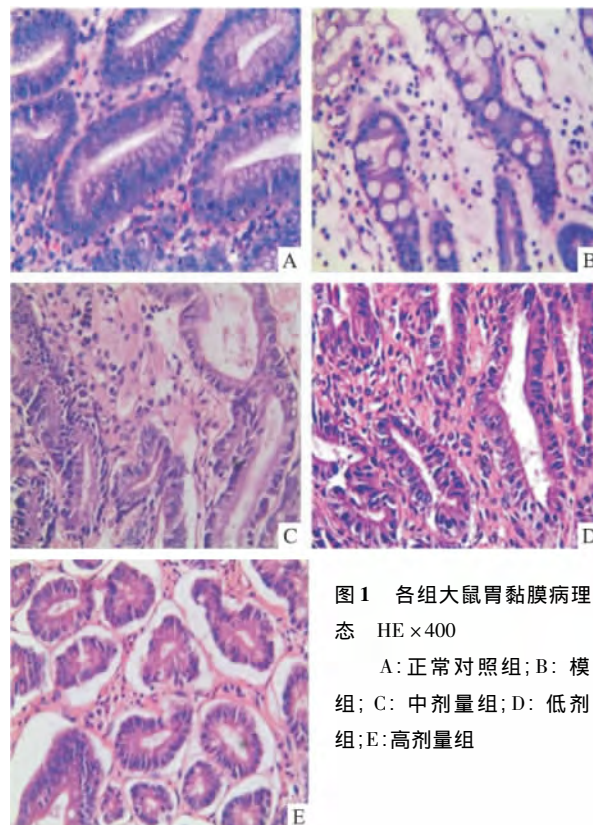


图 1 各组大鼠胃黏膜病理形态 HE $\times 400$
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 中剂量组; D: 低剂量组; E: 高剂量组

正常对照组、模型组以及 PNU282987 低、中、高剂量组大鼠死亡数目分别为 0、3、2、1、1 只。随着喂养时间的延长,正常对照组大鼠皮毛光泽,精神佳,灵活喜动,饮食正常;模型组大鼠的皮毛疏松不齐,精神萎靡不振,食量下降,反应迟钝,体重减轻。PNU282987 低、中、高剂量组大鼠均有不同程度皮毛欠光泽、反应迟钝、精神欠佳、体重减轻等,而与模型组比较较正常。

2.2 $\alpha 7nAChR$ 激动剂对 PLGC 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量的影响 模型组以及 PNU282987 低、中、高剂量组血清 TNF- α 和 IL-6 含量高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组相比,PNU282987 中、高剂量组血清 TNF- α 和 IL-6 含量降低,尤以高剂量组显著,差异有统计学意义

($P < 0.05$, $P < 0.01$); 低剂量组与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
正常对照	10	60.9 $\pm$ 15.9	22.2 $\pm$ 3.7
模型	7	183.3 $\pm$ 28.8 ^{##}	64.8 $\pm$ 3.9 ^{##}
PNU282987 低剂量	8	173.6 $\pm$ 19.4 ^{##}	59.6 $\pm$ 3.8 [#]
PNU282987 中剂量	9	131.7 $\pm$ 23.5 ^{*##}	47.5 $\pm$ 3.5 ^{*#}
PNU282987 高剂量	9	93.8 $\pm$ 26.9 ^{*##}	30.9 $\pm$ 3.2 ^{*##}

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 $\alpha 7nAChR$ 激动剂对 PLGC 大鼠胃组织 TNF- α 、IL-6 含量的影响 模型组以及 PNU282987 低、中、高剂量组胃组织 TNF- α 和 IL-6 含量高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组相比, PNU282987 中、高剂量组 TNF- α 和 IL-6 含量降低, 尤以高剂量组显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 低剂量组与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠胃组织 TNF- α 、IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (ng/g)	IL-6 (ng/g)
正常对照	10	80.7 $\pm$ 10.3	127.7 $\pm$ 14.1
模型	7	283.8 $\pm$ 33.6 ^{##}	515.1 $\pm$ 77.1 ^{##}
PNU282987 低剂量	8	200.0 $\pm$ 20.5 ^{*##}	305.6 $\pm$ 16.5 ^{*##}
PNU282987 中剂量	9	186.3 $\pm$ 17.5 ^{*##}	262.1 $\pm$ 30.2 ^{*##}
PNU282987 高剂量	9	135.6 $\pm$ 11.6 ^{*##}	166.9 $\pm$ 44.3 ^{*##}

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

PLGC 包括慢性萎缩性胃炎的中重度肠上皮化生以及上皮内瘤变。浅表性胃炎在胃黏膜长期慢性炎症浸润的基础上, 经过伴有肠化生的多灶性胃炎后由于干细胞不稳定、DNA 复制错误或超甲基化导致基因突变积累或杂合型丢失, 可发生上皮内瘤变, 胃癌发生^[7]。炎性微环境在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的促进作用。CAP 是一条中枢神经系统与免疫系统之间的具有拮抗炎症反应作用的通路, 其作用在内毒素血症、失血性休克、心肌缺血再灌注^[8]、实验性关节炎^[9]、溃疡性结肠炎^[10]和胰腺炎等多种动物模型中均已得到证实, 但其是否参与 PLGC 的调控, 目前国内外尚未见文献报道。

使用胆碱能受体激动剂可活化 CAP, 产生抗炎效应, $\alpha 7nAChR$ 激动剂 PNU282987 是一种强力拟胆碱药, 与巨噬细胞表面的烟碱受体 $\alpha 7nAChR$ 结合, 阻止炎症细胞因子的释放^[9, 11]。TNF- α 是由巨噬细胞/单核细胞活化产生的一种细胞因子, 在炎症反应、细胞免疫、肿瘤免疫等多种生理和病理过程中发挥关键作用。TNF- α 作为一种重要的炎症细胞因子, 其慢性刺激也可促进肿瘤的发生^[12]。IL-6 是一个生物学效应极其复杂的白介素类细胞因子, 其可以促进 T 细胞表面 IL-2 受体的表达, 增强 IL-1 和 TNF- α 对 Th1 细胞的致有丝分裂作用; 在外伤感染的时候, 引起急性炎症反应, 诱导急性期反应中反应蛋白的合成, 以淀粉样蛋白 A 和 C-反应蛋白增加为主; 促进 B 细胞增殖, 分化并产生抗体; IL-6 还能有效地促进 TNF- α 和 IL-1 诱导恶病质, 促进糖皮质激素合成^[13]; 刺激破坏骨细胞活性和角质细胞生长, 其主要作用并非直接作用形成炎症, 而是加强各种促炎细胞因子的致炎效果^[14]。两者介导炎症反应和肿瘤免疫等方面发挥关键作用^[15], 其在血浆的含量也是测量细胞免疫和体液免疫功能的重要指标。本研究通过构建 MNNG 为主的复合造模法制备 PLGC 大鼠模型, 给予 $\alpha 7nAChR$ 激动剂 PNU282987 干预, 结果 PLGC 大鼠血清及病变组织中 TNF- α 、IL-6 的含量降低, 尤以高剂量组 (2.4 mg/kg) 显著, 表明其可能通过 CAP 下调 TNF- α 和 IL-6 等促炎因子的水平。

综上所述, 采用 MNNG 可以有效的造成大鼠 PLGC 的病理状态, 而且还激活了体内免疫炎症反应, 造成了大鼠自身的免疫炎症表现。基于 CAP 的假说, 使用药物干预的方式, 发现激活 CAP 可以有效的对抗炎症反应, 可通过下调 TNF- α 和 IL-6 等促炎因子的水平, 以 2.4 mg/kg 剂量疗效最佳, 使癌变的胃黏膜上皮得到一定的修复, 表明了炎症反应对胃黏膜上皮也存在一定的影响, 控制炎症对其存在疗效。本研究提出了一种逆转 PLGC 炎症发展的方法, 对胃癌的早期预防, 早期干预有一定的应用价值。但 CAP 对炎症的调节方式究竟是否是通过 $\alpha 7nAChR$ 或毒蕈碱受体来实现的, 以及是通过何种方式或途径实现的需要进一步研究证实。相信随着对迷走神经及其递质 Ach 抗炎作用的深入研究, 人们可能会从新的角度对炎症反应有一个新的认识, 并将 CAP 作为一种替代疗法或潜在疗法用于治疗。

参考文献

- [1] Sicherer S H , Sampson H A . Food allergy [J]. *Allergy Clin Immunol* 2010 ,125(2) : 116 – 25.
- [2] Abraham S N , St John A L . Mast cell-orchestrated immunity to pathogens [J]. *Nat Rev Immunol* ,2010 ,10(6) : 440 – 52.
- [3] Zorzetto V , Maddalo G , Basso D , et al . Immunotherapy for gastric premalignant lesions and cancer [J]. *Immunotherapy* 2012 4(6) : 587 – 99.
- [4] MacDonald T T , Di Sabatino A . The immunologic basis for gastrointestinal food allergy [J]. *Curr Opin Gastroenterol* ,2009 ,25(6) : 521 – 6.
- [5] Tong W D , Ridolfi T J , Kosinski L , et al . Effects of autonomic nerve stimulation on colorectal motility in rats [J]. *Neurogastroenterol Motil* 2010 22(6) :688 – 93.
- [6] Nguyen T L , Dipaolo R J . A new mouse model of inflammation and gastric cancer [J]. *Oncoimmunology* 2013 2(10) :e25911.
- [7] Paul W E , Zhu J . How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified [J]. *Nat Rev Immunol* 2010 ,10(4) : 225 – 35.
- [8] Xiong J , Yuna Y J , Xue F S , et al . Postconditioning with $\alpha 7$ nAChR agonist attenuates systemic inflammatory response to myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Inflammation* , 2012 35(4) :1357 – 64.
- [9] Wang H , Yu M , Ochani M , et al . Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation [J]. *Nature* 2003 421(6921) :384 – 8.
- [10] Lunney P C , Leong R W . Review article: Ulcerative colitis , smoking and nicotine therapy [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2012 , 36(11 – 12) :997 – 1008.
- [11] Stuckenholz V , Bacher M , Balzer-Geldsetzer M , et al . The $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice [J]. *J Parkinsons Dis* , 2013 3(2) :161 – 72.
- [12] Mclean M H , El-Omar E M . Genetics of inflammation in the gastrointestinal tract and how it can cause cancer [J]. *Recent Results Cancer Res* 2011 ,185:173 – 83.
- [13] Sugimoto M , Yamaoka Y , Furuta T . Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer [J]. *World J Gastroenterol* 2010 ,16(10) :1188 – 200.
- [14] Howlett M , Menheniott T R , Judd L M , et al . Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2009 , 1793(11) :1623 – 33.
- [15] Szlachet A , Krzysiek-Maczka G , Pajdo R , et al . The impact of asymmetric dimethylarginine (ADAMA) , the endogenous nitric oxide (NO) synthase inhibitor , to the pathogenesis of gastric mucosal damage [J]. *Curr Pharm Des* 2013 ,19(1) :90 – 7.

Regulation of cholinergic anti-inflammatory pathway of inflammation on gastric precancerous lesions

Yu Dajun^{1,2} , Gu Kangsheng¹ , Qian Jun²

(¹ Dept of Medical Oncology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022 ;

² Dept of Surgical Oncology , The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College , Bengbu 233000)

Abstract Objective To investigate the regulation of cholinergic anti-inflammatory pathway on gastric precancerous lesions and inflammatory reaction. **Methods** 56 Wistar rats were randomly divided into normal group ($n = 10$) and modeling group ($n = 46$) which were prepared into PLGC rats model by the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) based composite modeling. Then 40 rats selected from the successfully modeling rats were randomly divided into model group , PNU282987 low dose group (1.6 mg/kg) , PNU282987 dose group (2.0 mg/kg) , PNU282987 high doses group (2.4 mg/kg) , ($n = 10$). The control group and model group were fed normally. PNU282987 groups were given above daily doses of PNU282987 by intraperitoneal injection for three weeks. Then the expressions of TNF- α , IL-6 in serum and stomach tissue were detected. **Results** The contents of TNF- α , IL-6 in serum and stomach tissue of PLGC groups were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). The contents of TNF- α , IL-6 in serum and stomach tissue of PNU282987 high dose group (2.4 mg/kg) were lower than the low-dose group , dose group and model group ($P < 0.05$). The difference was significant. **Conclusion** The $\alpha 7$ nAChR agonist PNU282987 can down-regulate the level of TNF- α and IL-6 through the cholinergic anti-inflammatory pathway.

Key words cholinergic anti-inflammatory pathway; gastric cancer; inflammatory reaction