

述 评

引用:王颖,矫健鹏,徐晶钰,等.胃癌前病变病证结合动物模型研究进展[J].现代中医药,2024,44(1):1-4.

胃癌前病变病证结合动物模型研究进展^{*}

王颖¹ 矫健鹏² 徐晶钰² 刘焯² 王晓炜² 岳小强^{2**}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 海军军医大学附属长征医院, 上海 200003)

摘要:中医药在胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)诊疗中发挥着重要作用,病证结合动物模型是进行 PLGC 相关实验研究的前提。文章从模型动物选择、胃癌前病变疾病模型和病证结合模型三方面,对近年来 PLGC 病证结合模型的制备方法进行了归纳分析,介绍了脾胃虚弱、胃阴不足、肝胃气滞、脾胃湿热和胃络瘀血 5 个常见 PLGC 病证结合模型的造模方法,并对当前模型制备中存在的问题提出了思考与展望。

关键词:胃癌前病变;动物模型;病证结合;慢性萎缩性胃炎

中图分类号:R2-031 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)01-0001-04

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2024.01.001

Research Progress on Animal Models Combined with Disease and Syndrome of Gastric Precancerous Lesions

WANG Ying JIAO Jianpeng XU Jingyu LIU Xuan WANG Xiaowei YUE Xiaoqiang

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Changzheng Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine plays an important role in the diagnosis and treatment of gastric precancerous lesions (PLGC), and the combination of disease and syndrome with animal models is a prerequisite for conducting PLGC related experimental research. The article summarizes and analyzes the preparation methods of PLGC disease syndrome combination models in recent years from three aspects: model animal selection, PLGC disease model, and disease syndrome combination model. It introduces the modeling methods of five common PLGC disease syndrome combination models: spleen and stomach weakness, stomach Yin deficiency, liver and stomach Qi stagnation, spleen and stomach damp heat, and stomach meridian stasis blood. It also puts forward thoughts and prospects for the problems in current model preparation.

Key words: Precancerous lesions of gastric cancer; Animal models; Combination of disease and syndrome; Chronic atrophic gastritis

胃癌(Gastric Cancer, GC)是全球第三大癌症,更是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1]。根据国家癌症中心的数据,2020 年我国癌症新发病例数中胃癌 48 万、死亡人数 37 万,分别位于第三位和第二位。胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)是指一类容易发生癌变的胃黏膜病

理组织学变化,主要包括胃黏膜上皮异型增生和肠上皮化生两种类型,多伴存于慢性萎缩性胃炎中。PLGC 是胃癌发生前的一个重要阶段,加强对其相关研究,积极进行早诊早治,对于降低我国胃癌发病率、改善患者预后至关重要。近年来,中医药在参与胃癌前病变防治中的作用和地位越来越

* 基金项目:中管局“全国中医临床优秀人才”研修项目(国中医药人教函[2022]1号);上海市科委项目(19401971700)

** 通讯作者:岳小强,博士研究生导师、主任医师,教授。E-mail:yuexiaoqiang@163.com

受到重视^[2]。辨证论治是中医药的特色与优势,病证结合动物模型则是在中医药理论、现代医学理论和实验动物科学等知识的相结合下,在动物身上模拟出与疾病和证候相类似的特征^[3],非常适合进行中医药相关的胃癌前病变研究。本文就胃癌前病变研究中病证结合动物模型的制备方法做一总结。

1 模型动物的选择

因为 PLGC 造模时间较长,大鼠为最常用的实验研究对象,品系主要为 Wistar 和 SD 大鼠,多选择雄性或雌雄各半。近年来,基因敲除小鼠也被引入到 PLGC 动物模型中,如胃泌素敲除小鼠(GAS^{-/-})、IL-1 β 转基因小鼠(C57 BL/6 品系)、K-ras 转基因小鼠、Tff 1 基因敲除小鼠(Tff 1^{-/-})、p53 基因敲除小鼠、Klf4 基因敲除小鼠都以 C57 BL/6 品系小鼠为主,胰岛素胃泌素转基因小鼠(INS-GAS, FVB/N 品系)、Apt4a 基因敲除小鼠(H+/K+-ATP 酶缺失, C57)等^[4-5]。基因敲除动物模型虽然成模效果显著,但对于模型小鼠要求较高,且制作成本高,目前实际应用仍较少。

2 PLGC 疾病模型

疾病造模是病证结合动物模型的基础。目前学者针对 PLGC 多以复合因素造模,通过化学诱变剂甲基硝酸亚硝酸胍(1N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)自由饮用或灌胃诱发黏膜病变,配合饥饿失常、乙醇(白酒)灌胃、泻下药物、高热食物(60℃热面糊)、情绪刺激(夹尾)、劳累刺激等方式,来模拟人 PLGC 的发生机制。MNNG 是一种 N-亚硝基化合物,作用机制为分解成短寿命、高反应的亲电试剂,最终的诱变剂被认为是碱离子。Sugimura 等于 1967 年首次发现将饮用水混合 MNNG 溶液喂养大鼠会诱发胃腺癌^[6]。大鼠前胃对 MNNG 有很高的亲和力, MNNG 直接作用于胃黏膜而引起癌变,致癌机制为损伤细胞 DNA,故常应用于胃癌及癌前病变中^[7]。MNNG 的给药方式分为自由饮用和灌胃,并且实验结果与浓度相关,其中自由饮用的浓度为 60 ~ 180 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,灌胃的浓度为 80 ~ 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,造模时间大约在 20 ~ 24 周不等^[8-9]。

3 病证结合动物模型

目前中医学者根据胃癌前病变患者的典型表

现,认为其临床证候主要有脾胃虚弱、胃阴不足、肝胃气滞、脾胃湿热和胃络瘀血证五大类型^[10]。

3.1 脾胃虚弱病证结合模型 “脾胃虚弱”为 CAG 及其癌前病变的发病之本^[11],也是其核心病机与证候。郑嘉怡等^[12]采用 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG 自由饮用配合饥饿失常法(隔日禁食)复制 PLGC 脾虚证大鼠模型,在研究过程中发现,造模 18 周后雄性 SD 大鼠出现食欲不振、精神萎靡、便溏等症状,与临床 PLGC 脾虚证表现相似。病理显示肠上皮化生、异型增生,黏膜下血管密布,出现扩张微血管,甚至一只大鼠出现原位癌病变。朱萱萱等^[13]通过每周两次采用 170 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MNNG 溶液和 40% 乙醇对大鼠进行灌胃,并给予 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MNNG 溶液自由饮用,造模 10 周,采用破气苦降(耗气泻下药)、第五周饥饿失常(单日禁食、双日饱食)和大鼠疲劳仪(大鼠每天跑步 30 min)建立 CAG 脾气虚模型。10 周后 SD 大鼠体重和体温明显降低,摄食量和饮水量降低不明显,提示脾虚证成模,而在第 4 周就会开始出现肠化生、不典型增生等 PLGC 病理。张宏等^[14]使用过食酸味而致脾虚的方法进行造模^[15],饥饿 48 h 后灌胃山西白醋(首次每日 15 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,以后每日 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),10 日后以酸度 3.5 $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 的 2-乙基亚硝酸胺(每日 2.8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,连续灌胃 4 个月,120 天后 NIH 小鼠出现体重减轻、食欲减退,活动量减少,大便溏泄或成小干颗粒状等表现。

3.2 胃阴不足病证结合模型 李明等^[16]和张杨等^[17]都以 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG 溶液灌胃,配合 35% 的无水乙醇每周一、四灌胃,60℃热面糊每周二、五灌胃,含 0.3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 雷尼替丁饲料喂养来构建 PLGC 胃阴不足证候模型。16 周后模型组多数 Wistar 大鼠出现精神状态欠佳,行动迟缓,被毛疏松暗淡,食欲较差、形体偏瘦,大便时有不成形等胃阴不足的症状,肉眼观察到胃壁弹性较差,颜色偏白,病理检测出现肠化生。沈琪等^[18]予 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG 溶液自由饮用,以含 0.03% 雷尼替丁饲料喂养,加以饥饿失常法(饮食 2 天,禁食 1 天)、禁食下午灌胃 40% 乙醇 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、下午灌胃 0.017 浓度 MNNG 溶液 1 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 造模,12 周后模型组 SD 大鼠出现了精神萎靡、形态偏瘦、行动迟缓、嗝气等表现,病理显示胃黏膜较薄,光

泽度不够,弹性较差,病理显示出现不同程度的异型增生,成功地建立了 PLGC 胃阴不足证大鼠模型。

3.3 肝胃气滞病证结合模型 PLGC 发病与情绪明显相关,肝胃气滞证动物模型的建立多通过夹尾刺激或慢性束缚来进行证候造模。胡运莲^[19]予 Wistar 雄性大鼠自由饮用 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG,以含 0.03% 雷尼替丁的饲料喂养,采用饥饱失常法,进食 2 天,禁食 1 天。以 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为计量标准,灌胃 56℃ 15% 盐水,进食下午灌胃 20 mmol (0.85%) 脱氧胆酸钠溶液,禁食下午灌胃 40% 的酒精。每周用钳子夹大鼠尾部 30 分钟,使之保持愤怒状态。连续造模 24 周,发现模型组大鼠体型偏瘦,食欲减退,大便质稀。病理上出现 2 例增生结节,组织学检查分别为早期腺癌和增生性息肉,提示肝胃气滞成模。

3.4 脾胃湿热病证结合模型 近年来,由于生活水平的提高和饮食习惯的改变,人们嗜食肥甘厚味,湿热交阻而导致脾胃湿热证胃癌前病变患者日益增多。脾胃湿热证动物模型的建立多模拟湿热环境或高脂高糖饮食来造模,以大鼠出现大便时溏时结、臭秽,且有生化指标改变来提示造模成功。黄琴等^[20]通过 15 日的“湿热环境加高脂高糖饮食和白酒综合法”来复制脾胃湿热证模型,再进行 12 周的灌服 150 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 55℃ 热盐水 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,2% 水杨酸 (10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 日 1 次)、饮用 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧胆酸钠,加以饥饱失常综合法 (进食 2 日,禁食 1 日) 来复制胃癌前病变模型。结果显示,12 周后 SD 大鼠喜静,食欲下降,反应缓慢,大便时干时稀、臭秽难闻,胃黏膜腺体出现大部分萎缩消失的状况,可见肠上皮化生,提示造模成功。

3.5 胃络瘀血证病证结合模型 中医认为“久病必有瘀”,PLGC 多由 CAG 发展而来,病程时间较长,久病易使气血运行不畅,出现瘀血证候。吴佳慧^[21]以 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG 溶液予 SD 大鼠自由饮用,15% 浓盐水灌胃 (禁食日、2 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$),配合饥饱失常 (2 天进食 1 天禁食) 和 0.03% 雷尼替丁饲料喂养,建立 PLGC 大鼠模型。24 周后,模型组大鼠精神较差,粪便不成形,胃黏膜充血水肿,甚至黏膜下血管分布,与中医血瘀证候相似,且大量炎性细胞被浸润,可见不典型增生细胞,提示造

模成功。刘庆生等^[22]以 167 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MNNG 溶液自由饮用,以 0.017 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 MNNG 溶液灌胃,1 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$,复制 PLGC 大鼠模型,12 周后模型组 SD 大鼠皮毛暗淡,易受刺激,胃黏膜色暗发灰、少泽,部分出现出血糜烂点,与中医血瘀证候中出血症状相似。封慧等^[23]采用以 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的大鼠体重为计量标准,每周灌胃 1 次含 0.03% 雷尼替丁的 MNNG 溶液 170 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、每周 2 次 400 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇,通过用这种综合造模法建立 PLGC 模型,造模 12 周后模型组 SD 大鼠体重明显减轻,增长速度缓慢,胃黏膜明显变薄,颜色偏白灰色,有散在出血点,部分水肿糜烂,舌质出现紫暗,并发血瘀证候。

4 病证结合动物模型的评价

在 PLGC 的动物模型中,以胃黏膜出现萎缩并伴有肠上皮化生或异型增生为主要的疾病成模标准。脾胃虚弱证的成模标准为:大鼠食欲不振,大便溏,喜静,苔薄白;胃黏膜苍白或灰白,黏膜变薄,黏液量多稀薄,胃蠕动变弱。胃阴不足证的成模标准为:大鼠形体消瘦,大便干结,舌红少苔;胃黏膜表面不平变薄,黏液减少,皱襞变细或消失,呈龟裂样改变。肝胃气滞证的成模标准为:大鼠表现为易激惹;胃黏膜呈急性活动性炎性反应,胃蠕动较快。脾胃湿热证的成模标准为:大鼠大便黏腻或稀滞,舌红苔黄腻;胃黏膜糜烂、充血红肿,黏液浑浊黏稠。胃络瘀血证的成模标准为:大鼠表现为舌暗红,有瘀斑、瘀点;胃黏膜存在出血点,血管呈暗红色^[24]。

5 问题与展望

在病证结合动物模型中,疾病造模多以 MNNG 水溶液予动物自由饮用或灌胃为主,证候造模则在中医理论指导下进行。MNNG 因其造模操作相对简便、成模率较高,因而在目前多数胃癌前病变研究中被广泛应用;其虽然作为常用的 PLGC 造模试剂,但目前文献中对于造模周期、死亡率的研究较少,使得 MNNG 造模技术运用中仍存在很多悬而未决的实际问题;而且,MNNG 的发病机制与人类发病机制存在较明显的差别,使得其用于对 PLGC 疾病分子机制探讨上可能还存在一定问题^[25-29]。

在中医证候造模中,虽然病证结合动物模型

的研究取得了一定的进展,但在模型判定上大致符合人体证候表现,而人体与动物发病机制存在显著差异,故此类造模方法未得到众多研究人员认同;并且不同病证结合的造模方法不尽相同,未明确统一标准。中医证候动物模型的诊断依据应包括症状(本证)、病因(正证)、治疗(反证)、相关因素(佐证)、客观指标(佐证)五个方面^[30],但目前多数证候动物模型尚不能满足以上全部五个标准。另外,病证结合动物模型由于干预措施复杂、步骤较多,客观上导致造模的可重复性较差。

总之,PLGC的发病周期长、机制复杂,其病证结合动物模型的研究虽然取得了一定进展,但还存在诸多实际问题,需要广大科研工作者在不断的实践中,不断发现并加以改进。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 郝长浩, 李吉彦, 沈会, 等. 胃癌前病变中医临床研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(2): 117-121.
- [3] 康洁, 高碧珍. 病证结合动物模型研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11): 2357-2359.
- [4] Jiang Y, Yu Y. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research [J]. Oncotarget, 2017 Jan 10, 8(2): 3696-3710.
- [5] 樊湘珍, 赵自明, 杨良俊, 等. 健脾化痰解毒方下调氧感知通路抑制胃癌前病变小鼠胃黏膜上皮细胞超期生存研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2541-2545.
- [6] Waters M D, Brady A L, Stack H F, et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds [J]. Mutat Res, 1990, 238(1): 57-85.
- [7] 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康, 等. 大鼠胃黏膜癌前病变模型的建立[J]. 浙江中医学院学报, 1998(2): 3-4.
- [8] 陆钰婷, 刘华一, 尚家驹, 等. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍复合法建立胃癌前病变大鼠模型的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(16): 4089-4095.
- [9] 李春英, 梁爱华, 高双荣, 等. 大鼠胃癌前病变模型的建立[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1): 89-93.
- [10] 黄钰萍, 王熠慧, 安振涛, 等. 胃癌前病变中医证型分类探讨[J]. 中医学报, 2021, 36(2): 406-409.
- [11] 郑保平. 慢性萎缩性胃炎及其癌前病变的病机和证治探讨[J]. 江苏中医药, 2010, 42(1): 8-9.
- [12] 郑嘉怡, 赵自明, 潘华峰, 等. 胃癌前病变脾虚证大鼠胃黏膜病变的病理与超微结构研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1730-1735.
- [13] 朱莹莹, 史淋峰, 吴旭彤, 等. 实验性慢性萎缩性胃炎脾虚证模型的建立及不同时期病理形态学的改变[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 231-233.
- [14] 张宏, 林代华, 余成浩, 等. 脾虚胃癌病证结合动物模型的建立[J]. 四川动物, 2007(3): 699-701.
- [15] 彭成, 罗亮. 过食酸味所致脾虚机理的实验研究[J]. 山东中医学院学报, 1989(6): 13-14.
- [16] 李明. 益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 TGF- β /Smads 通路影响的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.
- [17] 张杨. 益气养阴活血法治疗胃癌前病变的临床与实验研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.
- [18] 沈琪. 加减益胃汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变胃阴不足证疗效评价研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [19] 胡运莲. 加味左金丸治疗胃癌前病变大鼠的作用机理研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2005.
- [20] 黄琴, 魏瑄, 王和生, 等. 王氏连朴饮对脾胃湿热胃癌前病变大鼠胃黏膜 IL-6、NF- κ B 表达的影响[J]. 山西中医, 2016, 32(2): 55-57.
- [21] 吴佳慧. 化痰消痞方对胃癌前病变大鼠 PTEN、FAK、paxillin 表达的影响[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [22] 刘庆生, 王小奇, 桑怡, 等. 益气活血法对胃癌前病变大鼠胃黏膜组织病理学的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(12): 926-928.
- [23] 封慧. 健脾活血法对胃癌前病变大鼠干预的实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [24] 张声生, 唐旭东, 黄穗平, 等. 慢性胃炎中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3060-3064.
- [25] 陈心怡, 舒劲. MNNG 溶液联合多因素诱导胃癌前病变大鼠模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 104-108.
- [26] 周文婷, 沈会, 姜永珊, 等. 胃癌前病变动物模型复制实验进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(5): 1439-1447.
- [27] 刘婷, 彭敏, 刘倩倩, 等. 胃癌前病变大鼠病证结合模型的构建与评价[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3624-3627.
- [28] 陈泽慧, 魏玥, 安静, 等. 慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变大鼠造模方法的文献研究[J]. 天津中医药, 2019, 36(9): 850-855.
- [29] 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.
- [30] 陈小野. 证候动物模型诊断依据的设想与评价[J]. 中国医药学报, 1987(1): 50-53.