

猪苓多糖对胃肠上皮化生细胞模型的影响*

林贞妍¹ 冯小可¹ 崔国良¹ 魏睦新¹

[摘要] 目的:探讨猪苓多糖对鹅去氧胆酸(CDCA)诱导 GES-1 细胞株的肠上皮化生相关分子标志物的影响。方法:CCK8 法检测不同浓度 CDCA、猪苓多糖对 GES-1 细胞增殖能力的影响;RT-qPCR、Western blot 法检测肠上皮化生相关分子标志物表达水平。结果:CDCA 诱导后,GES-1 细胞的尾型同源盒 2(CDX2)、Kruppel 样转录因子 4(KLF4)蛋白及 mRNA 表达水平明显上调($P < 0.05$),性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2)蛋白及 mRNA 表达水平显著下调($P < 0.05$)。猪苓多糖干预后可抑制由 CDCA 诱导的肠上皮化生细胞模型 CDX2、KLF4 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$),并促进 SOX2 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$)。结论:猪苓多糖可通过下调 CDX2 和 KLF4 的表达,上调 SOX2 的表达,从而在一定程度上阻断胃黏膜上皮细胞向肠上皮化生转变的进程。

[关键词] 胃癌前病变;胃肠上皮化生;猪苓多糖;鹅去氧胆酸;细胞模型

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2021.01.02

[中图分类号] R445 **[文献标志码]** A

Effect of polyporus umbellatus polysaccharides on gastrointestinal metaplasia cell model induced in vitro

LIN Zhenyan FENG Xiaoke CUI Guoliang WEI Muxin

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Institute of Integrative Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China)

Corresponding author: WEI Muxin, E-mail: weimuxin@njmu.edu.cn

Abstract Objective: To explore the effect of polyporus umbellatus polysaccharides on gastrointestinal metaplasia of GES-1 cells induced by chenodeoxycholic acid. **Methods:** The effects of chenodeoxycholic acid and Polyporus umbellatus polysaccharide at different concentrations on the proliferation of GES-1 cells was detected by CCK8, and the expression of intestinal metaplasia related molecular markers was determined by RT-qPCR and Western blot. **Results:** After GES-1 cells were induced by chenodeoxycholic acid, the expression levels of CDX2, KLF4 protein and mRNA were significantly up-regulated($P < 0.05$), while the expression levels of SOX2 protein and mRNA were significantly down-regulated($P < 0.05$). Polyporus umbellatus polysaccharides can inhibit the expression of mRNA and protein of CDX2 and KLF4 in intestinal metaplasia cell model induced by CDCA($P < 0.05$), and promote the expression of SOX2 mRNA and protein($P < 0.05$). **Conclusion:** Polyporus umbellatus polysaccharides can block the transformation of gastric mucosal epithelial cells to intestinal metaplasia to some extent by down-regulating the expression of CDX2 and KLF4 and up-regulating the expression of SOX2.

*基金项目:江苏省中医药局科技项目(No: YB2015166)

¹南京医科大学第一附属医院中医科 南京医科大学中西医结合研究所(南京,210029)

通信作者:魏睦新, E-mail: weimuxin@njmu.edu.cn

[22] 潘洋,马伟,于洋,蒲元和胃胶囊联合三联疗法治疗幽门螺旋杆菌感染慢性萎缩性胃炎的临床效果观察[J]. 临床合理用药,2017,10(4):33-34.

[23] 田鹤群,谈伟伟,赵晶,等. 蒲元和胃胶囊联合三联杀菌药物对胃-十二指肠溃疡患者幽门螺杆菌根除率及愈合质量的影响[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(4):803-805.

[24] 梅洋. 蒲元和胃胶囊联合三联疗法治疗 H. pylori 相关消化性溃疡的临床研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2018.

[25] 王建清. 蒲元和胃胶囊联合三联药物在胃十二指肠溃疡治疗中的效果[J]. 包头医学院学报,2018,34(5):99-100.

[26] 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.

[27] 张声生,王垂杰. 消化性溃疡中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志,2017,32(9):4089-4093.

[28] 潘少斌,孔娜,李静,等. 香附化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2019,21(10):1429-1434.

[29] 梅武轩,曾常春. 乳香提取物对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2004,12(1):34-37.

[30] 沈正泽,古锐,曾宪泉,等. 基于数据挖掘的中药专利复方治疗幽门螺杆菌相关性胃病的用药规律分析[J]. 中国中西医结合消化杂志,2016,24(8):608-611.

(收稿日期:2020-08-09)

Key words precancerous lesions of gastric carcinoma; intestinal metaplasia; polyporus umbellatus polysaccharides; chenodeoxycholic acid; cell model

胃癌是我国主要的恶性肿瘤之一,2019 年国家癌症中心的最新癌症报告显示,胃癌在我国恶性肿瘤中的发病率和死亡率均位居第二^[1]。根据 Correa 级联学说,胃癌前病变(precancerous lesions of gastric carcinoma, PLGC) 发展至胃癌一般要经历长时间、多步骤的病变过程,因此对 PLGC 的管理是胃癌预防的关键措施之一^[2-3]。PLGC 是一个病理组织学概念,包括慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM) 和胃黏膜上皮异型增生等多项病理改变。其中 IM 是指胃黏膜上皮细胞被肠型上皮细胞所代替,即胃黏膜中出现类似小肠或大肠黏膜的上皮细胞。在 PLGC 中,IM 的类型和范围均有预测胃癌发生危险性的重要价值,是胃黏膜上皮细胞从良性向恶性转变的关键步骤^[4-5],尤其与肠型胃癌的发展关系密切^[6],因此需要有效地密切监测和进行干预。

西医对 IM 的主要治疗方式包括一般措施如戒烟酒、服用胃黏膜保护剂和避免使用损害胃黏膜的药物^[7],尚无明确逆转其进程的药物。近年来,中医药在 PLGC 的治疗中发挥了关键作用^[8],中医分析本病的病机为外邪犯胃(包括 Hp 感染),饮食不节,情志不调,或久病及胃、药物所伤及环境因素等造成脾胃受损,运化失司,水湿内停,聚湿成痰,久而导致痰湿阻络,气血化生不足,形成瘀血。中药猪苓在临床应用广泛,主要功效为利水消肿、泄热渗湿,其中猪苓多糖(polyporus umbellatus polysaccharides, PPS) 是猪苓最主要的有效成分,药理学研究明确 PPS 具有抗肿瘤及调节免疫的作用。故近年来其常用于治疗膀胱癌、前列腺癌、肝癌及胃癌等恶性肿瘤,同时对伴有水肿及积液的患者疗效明显,但其对 PLGC,尤其是 IM 的作用尚不得知。本课题组多年来致力于观察和总结中医药逆转 PLGC 的用药经验和规律,初步发现猪苓在其中发挥了重要作用。为进一步揭示 PPS 逆转 PLGC,特别是 IM 的作用,本研究运用鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA) 作用于 GES 细胞系,建立 IM 细胞模型,观察 PPS 作用后对胃肠上皮化生的逆转效果,并初步探索其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验药物与细胞株

PPS(上海源叶生物科技有限公司)。CDCA (Sigma-Aldrich),加入二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成 1 mol/L 母液,-20℃保存。人胃黏膜上皮细胞 GES-1 细胞来自本课题组储备。结肠癌细胞 HT-29(目录号:SCSP-5032),购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂与仪器

RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自以色列 BI 公司;不完全 Mc Coy's 5A 培养液、全蛋白提取试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;PBS 缓冲液购于美国 HyClone 公司;0.25% 胰蛋白酶购于 Gibco 公司;DMSO 购于 Sigma 公司; β -actin、性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2)购自 Cell Signaling Technology 公司;Kruppel 样转录因子 4(kruppel like factor 4, KLF4)购自 Proteintech 公司;尾型同源盒 2(caudal type homeobox 2, CDX2)购自 Affinity Biosciences 公司;山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购于美国 Jackson ImmunoResearch 公司;ECL 发光液、5×SDS-PAGE 上样缓冲液购于杭州弗德生物科技有限公司;BCA 试剂盒购于 Thermo scientific 公司;CCK-8 试剂盒购于 Biosharp 公司;PCR 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;反转录试剂盒、Trizol 试剂购自日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司。

电泳仪、电泳槽、转模仪、化学发光凝胶成像系统、热循环 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 将 GES-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素+链霉素)的 RPMI 1640 培养液;HT-29 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素+链霉素)的 Mc Coy's 5A 培养液。细胞培养于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中,每 2~3 d 更换一次培养液,一周 2~3 次传代。

1.3.2 CCK8 法检测 CDCA、PPS 对 GES-1 细胞增殖-毒性实验 将 GES-1 细胞按 5.6×10^3 个/孔接种在 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,且设置空白对照组。待细胞贴壁生长 24 h 后,用 RPMI 1640 培养液饥饿 12 h 之后,加入不同浓度的 CDCA (50、100、150、200 μ mol/L) 及 PPS (1.0、2.5、5.0、10.0 mg/mL) 各 100 μ L/孔处理细胞 24 h 后,每孔加入 CCK8 试剂 10 μ L,放入细胞培养箱继续培养 2 h,用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长的吸收度。计算细胞增殖率,增殖率(%) = [(实验组吸收度值-空白组吸收度值)/(对照组吸收度值-空白组吸收度值)] × 100%。重复实验 3 次,取均值。

1.3.3 Western Blot 检测 IM 相关蛋白表达 将处于对数生长期的 GES-1 细胞按照 1.7×10^5 个/孔接种在 6 孔板上。设置 HT-29 细胞为阳性对照组,每孔细胞数为 1.6×10^5 个。培养箱孵育 24 h,

用不同浓度 CDCA(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) + 不同浓度 PPS(2.5、5.0 mg/mL)处理 GES-1 细胞 72 h 之后,将细胞用 PBS 缓冲液洗 3 次,加入全蛋白提取试剂,置冰上裂解 30 min 后,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 15 min,提取细胞总蛋白。按照 BCA 试剂盒说明进行蛋白定量测定。加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,混匀后用金属浴 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。将待测蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(80 V, 60 min;120V,30 min),电泳完成后采取 PVDF 膜湿转法,冰水浴中将凝胶中的蛋白转移到膜上(300 mA,70 min)。将膜放入 5% 的脱脂牛奶中封闭 2 h,TBST 清洗 3 次后,加入一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日孵育二抗 2 h,TBST 清洗 3 次。PVDF 膜经 ECL 化学发光法显影后,用 Image Lab 软件获取图像并分析灰度值。

1.3.4 RT-qPCR 检测 CDCA 对 GES-1 细胞 CDX2、KLF4、MUC2、SOX2mRNA 表达的影响,将 3.5×10^4 个/孔的 GES-1 细胞接种在 24 孔板上,用不同浓度 CDCA(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)作用 48 h 之后收集细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后,进行 RT-qPCR 扩增(反应体系为 5 μL),扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环;溶解曲线:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。引物序列见表 1。每个样品设置 3 个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对 GAPDH 值作归一化处理,计算相对表达量。

1.4 统计学分析

各实验组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;用 Graphpad 8.0.2 统计软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

| 基因名称 | 上游序列(5'-3') | 下游序列(5'-3') | 种属 |
|-------|---------------------------|------------------------------|----|
| GAPDH | ATGTCGTGGAGTCTACTGGC | TGACCTTGCCCACAGCCTTG | 人 |
| CDX2 | TTCACACTACAGTCGCTACATCACC | TTGTTGATTTTCTCTCCTTTGCG | 人 |
| KLF4 | CGGACTCCCTGCCATAGAGGAGG | CAGCTTCACCTATCCGATCCGG | 人 |
| MUC2 | GGAGATCACCAATGACTGCGAG | GAATCGTTGTGGTCACCCT | 人 |
| SOX2 | TACAGCATGTCTACTCGCAGGAGGG | GGAGTGGGAGGAAGAGGTAACCACAGGG | 人 |

2 结果

2.1 CDCA、PPS 对 GES-1 细胞增殖的影响

与正常对照组相比,CDCA 50 $\mu\text{mol/L}$ 组对 GES-1 细胞的增殖未见明显改变。当 CDCA 处理浓度升高时,GES-1 细胞的相对细胞活性显著下降,且当 CDCA 浓度大于 150 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对细胞的抑制率达到 50% 以上。当 PPS 处理浓度为 1.0、2.5、5.0 mg/mL 时,GES-1 细胞相对活性无明显改变,见表 2。因此,本研究选择浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 及其以下的 CDCA、5 mg/mL 及其浓度以下的 PPS 进行后续实验。

2.2 不同浓度 CDCA 对 GES-1 细胞的影响

与空白组相比,CDCA 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导的 GES-1 细胞内 SOX2 蛋白及 mRNA 表达量明显下降($P < 0.05$),CDX2、KLF4 蛋白及 mRNA 表达量显著升高($P < 0.05$)。CDCA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的 CDX2 蛋白及 mRNA 表达水平,接近阳性对

照组的 CDX2 表达。表明,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDCA 诱导 GES-1 向 IM 细胞转化的作用效果最为显著($P < 0.01$),见表 3~4、图 1。

表 2 CDCA、PPS 对 GES-1 细胞增殖的影响

| 组别 | 浓度 | 相对细胞活性/% |
|-------|-----------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | | 100 \pm 0 |
| CDCA | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 93 \pm 13 |
| CDCA | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 66 \pm 11 ¹⁾ |
| CDCA | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 42 \pm 12 ¹⁾ |
| CDCA | 200 $\mu\text{mol/L}$ | 37 \pm 6 ¹⁾ |
| PPS | 1.0 mg/mL | 105 \pm 8 |
| PPS | 2.5 mg/mL | 112 \pm 15 |
| PPS | 5.0 mg/mL | 107 \pm 13 |
| PPS | 10.0 mg/mL | 25 \pm 3 ¹⁾ |

与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.001$ 。

表 3 不同浓度 CDCA 对 GES-1 中 SOX2、KLF4、CDX2 蛋白表达的影响

| 组别 | SOX2/ β -actin | KLF4/ β -actin | CDX2/ β -actin |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 空白组 | 0.52 \pm 0.02 | 0.33 \pm 0.02 | 0.15 \pm 0.01 |
| 造模组 | | | |
| | CDCA 25 $\mu\text{mol/L}$ | 0.49 \pm 0.06 | 0.60 \pm 0.07 ²⁾ |
| | CDCA 50 $\mu\text{mol/L}$ | 0.35 \pm 0.05 ¹⁾ | 0.48 \pm 0.06 ¹⁾ |
| | CDCA 100 $\mu\text{mol/L}$ | 0.22 \pm 0.03 ²⁾ | 0.70 \pm 0.08 ²⁾ |
| 阳性对照组 | 0.87 \pm 0.03 ²⁾ | 1.01 \pm 0.03 ²⁾ | 1.13 \pm 0.09 ²⁾ |

与空白组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 RT-qPCR 检测 CDX2、KLF4、SOX2 mRNA 的表达情况

| 组别 | | CDX2/2 ^{ΔΔCt} | KLF4/2 ^{ΔΔCt} | SOX2/2 ^{ΔΔCt} |
|-------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组 | | 1.37±0.39 | 1.38±0.36 | 114.22±10.77 |
| 造模组 | CDCA 25 μmol/L | 195.35±27.05 ²⁾ | 26.39±4.14 | 67.15±6.56 |
| | CDCA 50 μmol/L | 657.74±42.84 ²⁾ | 48.60±7.25 ¹⁾ | 23.47±2.57 |
| | CDCA 100 μmol/L | 927.02±45.89 ²⁾ | 394.83±42.36 ²⁾ | 2.83±1.98 ¹⁾ |
| 阳性对照组 | | 1548.24±62.37 ²⁾ | 56.99±3.29 ¹⁾ | 245.45±20.53 ¹⁾ |

与空白组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

2.3 PPS 对 CDCA 诱导 GES-1 的 CDX2、KLF4、SOX2 蛋白表达的影响

与造模组相比,PPS 2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 组细胞中的 SOX2 蛋白水平明显上调($P<0.05$),

同时 CDX2、KLF4 的蛋白水平显著下调($P<0.05$)。表明,PPS 在一定程度上能阻断 CDCA 刺激后的正常胃黏膜细胞转变为 IM 细胞的进程,见图 2、表 5。

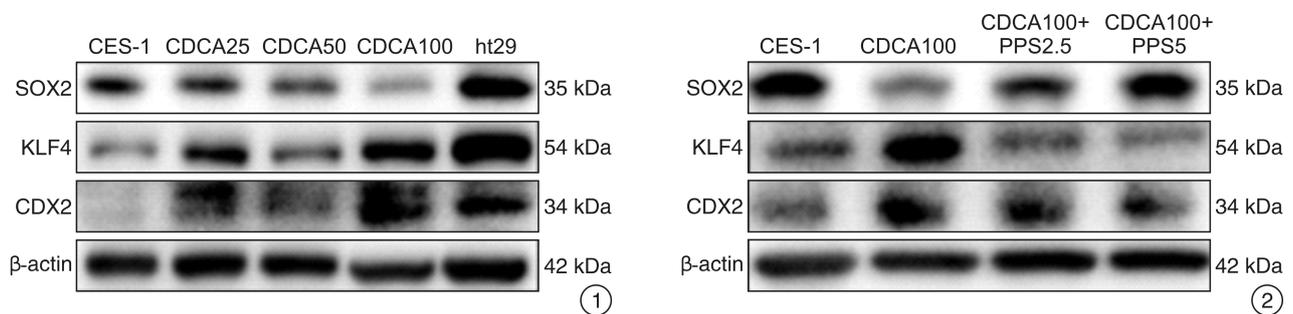


图 1 不同浓度 CDCA 对 GES-1 中 CDX2、KLF4、SOX2 蛋白表达的影响; 图 2 PPS 对 IM 模型的 CDX2、KLF4、SOX2 蛋白表达的影响

表 5 PPS 对 IM 模型的 SOX2、KLF4、CDX2 蛋白表达的影响

| 组别 | | SOX2/β-actin | KLF4/β-actin | CDX2/β-actin |
|-----|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 0.61±0.02 | 0.31±0.02 | 0.24±0.01 |
| 造模组 | 100 μmol/L | 0.25±0.04 | 0.79±0.08 | 0.57±0.07 |
| PPS | 2.5 mg/mL | 0.35±0.05 ¹⁾ | 0.28±0.04 ²⁾ | 0.45±0.05 ¹⁾ |
| | 5.0 mg/mL | 0.56±0.05 ²⁾ | 0.16±0.02 ²⁾ | 0.35±0.04 ²⁾ |

与造模组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3 讨论

现代医学对 PLGC 的防治缺乏靶点明确的有效干预措施,主要治疗方法是定期进行内镜随访和监测,对有症状的患者采用根除 Hp、增加胃黏膜营养及保护、改善胃动力、抑制胆汁反流等^[9]。中医药防治 PLGC 具有显著优势,大量临床研究显示中医药对 PLGC 的治疗具有肯定作用^[10-11],所以从中医治疗角度寻找新的治疗靶点、发掘相关中药的作用机制,是临床上控制和预防 PLGC 的重要举措。

本课题组魏睦新教授多年来运用化痰消痞方治疗 PLGC,前期多项临床研究显示疗效显著,能够改善甚至消除胃痛、胃胀、嗝气、反酸等临床症状^[12],且病理活检结果提示治疗后能在一定程度上有效逆转包括 IM 在内的 PLGC 病理改变^[13]。主要表现在慢性萎缩性胃炎、IM、不典型增生的病变程度呈现不同程度的减轻、好转甚至完全逆转至

正常,其中 IM 改善率在 56.98% 左右^[14]。前期实验研究显示,化痰消痞方的作用机制可能与激活抑癌基因 PTEN,调节 FAK 的去磷酸化,通过 FAK/ Src 信号通路下调 paxillin 来诱导细胞凋亡相关^[15],其他作用机制有待实验进一步明确。根据魏睦新教授多年临床经验用方的用药规律,发现猪苓是化痰消痞方中发挥逆转作用的关键药物之一。猪苓味甘,性淡、平,具有利水渗湿的功效^[16]。PPS 是猪苓中提取的多糖类物质,为猪苓的主要活性物质之一,近年来有研究发现 PPS 具有抗肿瘤、增强免疫调节、抗氧化、抗炎和抗病毒等功效^[17],但在 PLGC 方面尤其是对 IM 的作用尚不清楚。

大量临床和流行病学研究表明,IM 是增加胃癌发病风险的关键因素^[18-19],而胆汁反流是 IM 和胃癌重要的危险因素^[20-21]。胆汁酸是反流胆汁中的重要危险因素,因此近年来,多项实验已能成熟

运用胆汁酸建立 IM 的细胞模型,以研究相关发病机制,故本实验亦运用该模型,探讨 PPS 对 IM 的作用以及其相关的作用机制。相关研究显示,胆汁酸诱导正常胃上皮细胞向肠上皮细胞转化的过程中,CDX2 及其下游分子的表达发生了明显的变化^[22]。CDX2 是一种肠道特异性的核转录因子,在调控肠道上皮发育、分化、表型维持和功能中发挥重要作用^[23]。CDX2 在正常胃黏膜中不表达,但在 IM 组织中异常活化^[24],起到促进胃癌发生的作用,细胞实验和转基因鼠研究均证实 CDX2 可以通过直接调控相关肠特异性分子的转录诱导 IM 的发生^[25-26]。国内外研究均提示其表达量与 IM 分级程度呈正相关^[27-29]。目前胃黏膜 IM 细胞模型尚未明确,由于 CDX2 的异位表达和活化是 IM 发生的关键事件,大部分细胞模型实验将此作为验证模型成功的关键指标,因此也是本实验观察药物作用的重点指标。本实验结果表明,PPS 能有效抑制胆汁酸诱导的胃黏膜上皮细胞表达 CDX2,提示这可能是其控制 IM 的机制之一。同样是转录因子的 SOX2 在胃癌的发生、发展中也可能具有重要作用^[30],且随着 IM 进展,CDX2 的表达逐渐上调,SOX2 的表达逐渐下调,二者呈负相关($r < 0$)^[31-32]。SOX2 和 CDX2 mRNA 表达与其启动子区甲基化状态亦呈负相关($r < 0$),且两者存在相互负调控机制^[33],提示 SOX2 在维持胃黏膜上皮细胞表型上具有重要作用。因此 SOX2 也可作为本实验的观察指标,用于观察 PPS 对胃黏膜上皮细胞的保护作用。本实验结果显示,CDCA 作用后,GES-1 中 SOX2 的表达下降,PPS 干预后可维持 SOX2 的表达,提示其可能是 PPS 保护胃黏膜细胞功能的机制之一。KLF4 是胃癌发展过程中的一个抑癌因子,其表达与胃癌的发生、淋巴结转移、分化程度、TNM 分期及浸润程度密切相关^[34-35]。但其在 PLGC 的发展过程中可能起到促进作用。有研究显示,KLF4 在 Barrett 食管中表达强烈,并且胆汁酸作用食管鳞状上皮细胞后能促进 KLF4 的表达^[36]。在 IM 组织中亦检测到 KLF4 的高表达^[37]。以上结果提示,KLF4 与 SOX2 同样在维持胃黏膜上皮细胞的功能表型上具有重要作用。本实验结果显示,CDCA 诱导的细胞模型中,SOX2 表达明显下降,KLF4 表达量显著升高,而 PPS 作用后能显著提高模型细胞 SOX2 的表达量和下调 KLF4,提示维持 SOX2 和 KLF4 的表达可能是 PPS 发挥胃黏膜上皮细胞保护功能的机制之一。

综上所述,本实验初步探索了在治疗 PLGC 中具有重要作用的猪苓的有效成分——PPS,对 CDCA 诱导 GES-1 细胞系建立的胃肠上皮化生的细胞模型的作用及相关机制,结果提示 PPS 能同时通过抑制 CDX2 的表达和维持 SOX2、KLF4 的表

达,发挥其保护胃黏膜上皮细胞,阻止其向 IM 转化的作用。胃肠上皮化生机制较为复杂,影响因素众多,PPS 是否还具有其他的调节机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈宏达,郑荣寿,王乐,等. 2019 年中国肿瘤流行病学研究进展[J]. 中华疾病控制杂志,2020,24(4):373-379.
- [2] Koulis A, Buckle A, Boussioutas A. Premalignant lesions and gastric cancer: Current understanding[J]. World J Gastrointest Oncol,2019,11(9):665-678.
- [3] 张海山,郑红刚,花宝金. 胃癌前病变的中医病因研究进展[J]. 医学综述,2020,26(3):475-479.
- [4] Kinoshita H, Hayakawa Y, Koike K. Metaplasia in the Stomach-Precursor of Gastric Cancer[J]? Int J Mol Sci,2017,18(10):2063.
- [5] Song JH, Kim SG, Jin EH, et al. Risk Factors for Gastric Tumorigenesis in Underlying Gastric Mucosal Atrophy[J]. Gut Liver,2017,11(5):612-619.
- [6] Kameoka Y, Kitazawa R, Ariasu K, et al. Reactivation of CDX2 in Gastric Cancer as Mark for Gene Silencing Memory[J]. Acta Histochem Cytochem,2015,48(4):115-124.
- [7] 刘梦静,姜葵,王邦茂. 胃黏膜肠上皮化生的研究进展[J]. 国际消化病杂志,2017,37(2):73-76.
- [8] Yang L, Li J, Hu Z, et al. A Systematic Review of the Mechanisms Underlying Treatment of Gastric Precancerous Lesions by Traditional Chinese Medicine[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2020,2020:9154738.
- [9] 于存国,徐扬,周超,等. 中西医防治胃癌前病变的临床研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2017,12(7):897-900.
- [10] 谢晶日,刘金狄,梁国英. 益气养阴化痰解毒方治疗胃癌前病变临床疗效观察[J]. 四川中医,2017,35(6):88-90.
- [11] 宋扬,刘力,王捷虹,等. 脾胃虚弱型胃癌前病变的中医药研究进展[J]. 现代中医药,2018,38(2):93-95,100-100.
- [12] 张丹,曾志,魏睦新. 化痰消痰方加减治疗萎缩性胃炎伴胆汁反流疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志,2016,24(5):383-386.
- [13] 刘妮玉,魏睦新. 化痰消痰方治疗慢性萎缩性胃炎临床研究[J]. 中医学报,2017,32(12):2485-2488.
- [14] 徐雪莲,魏睦新. 炮山甲联合化痰消痰方治疗慢性萎缩性胃炎伴异型增生疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志,2019,27(9):649-652,661-661.
- [15] 吴佳慧,刘皓,郭亚云,等. 化痰消痰方对胃癌前病变大鼠 PTEN、FAK 及 paxillin 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2016,5,25(15):1611-1616.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:318-319.
- [17] 王天媛,张飞飞,任跃英,等. 猪苓化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2017,51(4):109-

- 112.
- [18] Li D, Bautista MC, Jiang SF, et al. Risks and Predictors of Gastric Adenocarcinoma in Patients with Gastric Intestinal Metaplasia and Dysplasia: A Population-Based Study[J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(8): 1104-1113.
- [19] Song H, Ekhedden IG, Zheng Z, et al. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk Western population[J]. *BMJ*, 2015, 351: h3867.
- [20] Jiang JX, Liu Q, Zhao B, et al. Risk factors for intestinal metaplasia in a southeastern Chinese population: an analysis of 28,745 cases[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(3): 409-418.
- [21] Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. *Prz Gastroenterol*, 2019, 14(1): 26-38.
- [22] Li S, Chen X, Zhou L, et al. Farnesoid X receptor signal is involved in deoxycholic acid-induced intestinal metaplasia of normal human gastric epithelial cells [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5): 2674-2682.
- [23] Sun X, Yang Q, Rogers CJ, et al. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(5): 819-831.
- [24] 王见璋,李炜霞,何志明,等. CDX2 和 Villin 在胃黏膜病变中的表达及其临床病理意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1821-1824.
- [25] Yu JH, Zheng JB, Qi J, et al. Bile acids promote gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 and MUC2 expression via the FXR/NF- κ B signalling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 879-892.
- [26] Chawengsaksophak K. Cdx2 Animal Models Reveal Developmental Origins of Cancers[J]. *Genes(Basel)*, 2019, 10(11): 928-934.
- [27] 闵亚莉,倪阵,雷超,等. 肝细胞核因子 4 α 在胆汁酸诱导的胃黏膜肠上皮化生中的作用及其机制[J]. *中华消化杂志*, 2018, 38(3): 165-170.
- [28] Lee BH, Kim N, Lee HS, et al. The Role of CDX2 in Intestinal Metaplasia Evaluated Using Immunohistochemistry[J]. *Gut Liver*, 2012, 6(1): 71-77.
- [29] 石淼,孙妮娜,刘彩芳,等. FXR 和 CDX2 在胃黏膜肠化生及胃癌中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(6): 967-972.
- [30] 何甚楠,鲁明骞. SOX2 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *海南医学*, 2017, 28(4): 618-620.
- [31] 牛海静,陈鑫,王邦茂. 胃黏膜肠化生中 Sox2 调节 Cdx2 和 Muc2 的表达[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(4): 394-397.
- [32] 孙丹,武洋,辛彦. Sox2 和 Cdx2 基因编码蛋白在胃癌及其癌前病变中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(10): 1585-1591.
- [33] Niu H, Jia Y, Li T, et al. SOX2 Inhibition Promotes Promoter Demethylation of CDX2 to Facilitate Gastric Intestinal Metaplasia[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(1): 124-132.
- [34] 杜正平,王转兄,宋耀辉,等. KLF4 在胃癌组织中的表达与临床病理特征相关性的 Meta 分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(5): 23-27.
- [35] 于伟勇,何敬东,陈小飞,等. 胃癌组织 Klf4 表达变化及其临床意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(24): 49-50.
- [36] Chen M, Ye A, Wei J, et al. Deoxycholic Acid Upregulates the Reprogramming Factors KLF4 and OCT4 Through the IL-6/STAT3 Pathway in Esophageal Adenocarcinoma Cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820945302.
- [37] Chen BJ, Zeng S, Xie R, et al. hTERT promotes gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 via NF- κ B signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26969-26978.

(收稿日期:2020-09-03)