

猪苓多糖通过 JAK2-STAT3 通路抑制 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基诱导的 GES-1 细胞上皮间充质转化

武晓艳¹, 魏睦新^{2,3}, 蒋金桃⁴, 冯小可^{2,3*}

1. 扬州大学校医院, 江苏 扬州 225009

2. 南京医科大学第一附属医院 中医科, 江苏 南京 210029

3. 南京医科大学 中西医结合研究所, 江苏 南京 210029

4. 泰兴市第二人民医院, 江苏 泰兴 225411

摘要: 目的 研究猪苓多糖抑制胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 间充质转化的作用和机制。方法 应用 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基 (MNNG, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导 GES-1 细胞间充质转化模型, 造模同时给予猪苓多糖 (1.25、2.50、5.00、10.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 24、48 h 后, CCK-8 法检测细胞增殖能力; 造模同时给予猪苓多糖 (5.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 48 h 后, 实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测猪苓多糖对 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* mRNA 表达的影响; Western blotting 法检测 E-cadherin、N-cadherin、Snail、Twist、Fibronectin、Vimentin、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达。裸鼠分别经 MNNG 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 48 h 后的 GES-1 细胞 ($5\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.2 mL)、胃癌细胞 SGC7901 ($5\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.2 mL, 阳性对照), 1 个月后观察各组成瘤及体质量情况, 注射局部进行 HE 染色后行组织病理学观察, 验证 GES-1 细胞经 MNNG 处理后是否达到肿瘤阶段。**结果** 与模型组比较, 随猪苓多糖浓度的增加, GES-1 细胞增殖能力逐渐上升, 到达 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时增殖能力最高, 差异显著 ($P<0.01, 0.001$); 猪苓多糖组 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* 的 mRNA 表达均显著下降 ($P<0.05, 0.01, 0.001$); 猪苓多糖组 E-cadherin 蛋白表达显著上升 ($P<0.05$), N-cadherin、Snail、Twist、Fibronectin、Vimentin 及通路蛋白 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 表达显著下降 ($P<0.05, 0.01, 0.001$)。对照组和 MNNG 处理的 GES-1 组未见瘤体形成, 阳性对照 SGC7901 组注射后 1 周左右局部出现瘤体, 1 个月瘤体长至 6 cm 左右; MNNG 处理的 GES-1 组裸鼠精神较差, 体质量明显减轻, SGC7901 组裸鼠状态差, 体质量大幅减轻; 对照组和 MNNG 组病理染色显示为正常的皮肤组织, 阳性对照组显示为肿瘤组织。**结论** 猪苓多糖可能通过抑制 JAK2-STAT3 通路干预 MNNG 诱导的 GES-1 细胞上皮间充质转化。

关键词: 猪苓多糖; GES-1 细胞; *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基; 上皮细胞-间充质转化; JAK2-STAT3 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 10-2139-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.009

Mechanism of polyporus polysaccharides inhibiting *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso induced epithelial mesenchymal transformation of GES-1 cells via JAK2-STAT3 pathway

WU Xiaoyan¹, WEI Muxin^{2,3}, JIANG Jintao⁴, FENG Xiaoke^{2,3}

1. Yangzhou University Hospital, Yangzhou 225009, China

1. Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

3. Taixing Second People's Hospital, Taixing 225411, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of polyporus polysaccharides (PPS) on mesenchymal transformation of gastric epithelial cells (GES-1) and its preliminary mechanism. **Methods** GES-1 cell mesenchymal transition model was induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso (MNNG, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The model was established and treated with PPS (1.25, 2.50, 5.00, 10.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for

收稿日期: 2023-05-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81801625)

第一作者: 武晓艳 (1982—), 女, 主治医师, 研究方向为中西医结合消化病的临床与基础研究。E-mail: 84461460@qq.com

*通信作者: 冯小可, 主治医师, 研究方向为中西医结合消化病的临床与基础研究。E-mail: fengxiaoke@njmu.edu.cn

24 and 48 h. The cell proliferation ability was measured using the CCK8 method. After 48 hours of treatment with PPS (5.00 mg·mL⁻¹), the effects of PPS on *N-cadherin*, *Snail*, *Twist*, *Fibronectin*, and *Vimentin* mRNA expression were detected using real-time quantitative PCR (qRT-PCR), and Western blotting was used to detect the expression of E-cadherin, N-cadherin, Snail, Twist, Fibronectin, Vimentin, STAT3, p-STAT3, JAK2, and p-JAK2 proteins. Nude mice were subjected to GES-1 cells (5×10⁷·mL⁻¹, 0.2 mL) treated with MNNG 40 μmol·L⁻¹ for 48 hours and gastric cancer cells SGC7901 (5×10⁷·mL⁻¹, 0.2 mL, positive control), after one month, observed the tumor and body mass of each component, and observed the histopathological changes after HE staining at the injection site to verify whether GES-1 cells had reached the tumor stage after MNNG treatment. **Results** Compared with the model group, as the concentration of PPS increased, the proliferation ability of GES-1 cells gradually increased, reaching the highest proliferation ability at 5 mg·mL⁻¹, with significant differences ($P < 0.01, 0.001$); The mRNA expression of *N-cadherin*, *Snail*, *Twist*, *Fibronectin*, and *Vimentin* in the PPS group was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); The expression of E-cadherin protein was significantly increased in the polysaccharides group ($P < 0.05$), while the expression of *N-cadherin*, *Snail*, *Twist*, *Fibronectin*, *Vimentin*, and pathway proteins STAT3, p-STAT3, JAK2, and p-JAK2 were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The control group and MNNG treated GES-1 group showed no tumor formation, while the positive control SGC7901 group showed local tumor formation around one week after injection, and the tumor grew to about 6 cm in length after one month; The GES-1 group of nude mice treated with MNNG showed poor mental state and significantly reduced body mass, while the SGC7901 group showed poor state and significantly reduced body weight. The pathological staining of the control group and MNNG group showed normal skin tissue, while the positive control group showed tumor tissue. **Conclusion** PPS may interfere with MNNG-induced epithelial mesenchymal transition of GES-1 cells by inhibiting JAK2-STAT3 pathway.

Key words: polysaccharides; GES-1 cells; *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso; epithelial mesenchymal transition; JAK2-STAT3 pathway

中国胃癌(GC)的死亡率在恶性肿瘤中排名第3^[1],胃癌前病变(PLGC)时期的干预和治疗对降低胃癌的发生率和病死率至关重要,也是胃癌二级预防的重要手段。现代医学对于PLGC大多采取抑酸、促进胃动力、保护胃黏膜等对症治疗,定期进行电子胃镜检查随访观察,重度不典型增生阶段行内镜下切除,除此之外缺少更多、更早期的积极干预措施。近年来多项研究显示上皮-间质转化(EMT)能通过多种机制影响胃癌的发生和发展,包括促进恶变胃黏膜上皮细胞的迁移和侵袭,同时涉及多个信号通路,近年来的研究均显示其有望成为侵袭性胃癌的新靶标,积极寻找干预该阶段的治疗措施在阻断PLGC的进展中具有积极意义。

2003年专家共识《慢性胃炎的中西医结合诊治方案》制定,中国中西医结合消化系统疾病专业委员会专家将慢性萎缩性胃炎(CAG)归为“胃癌”“虚痞”“痞满”“胃痛”“嘈杂”等范畴。课题组前期多年临床观察证实魏睦新教授自拟化痰消痞方能有效逆转PLGC^[2-3],并在体外利用*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG)模拟亚硝酸盐致癌,构建PLGC体外细胞模型^[4-5],进行相关作用机制的实验研究,但其对EMT的作用尚不得知。猪苓是化痰消痞方中的关键药材之一,本研究选用猪苓的核心活性成分猪苓多糖,观察其对MNNG诱导的胃黏膜上皮细胞

系(GES-1)间充质转化的逆转作用,且初步探索其作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

胃黏膜上皮细胞GES-1及胃癌细胞SGC7901来自于本课题组储备。

1.2 实验动物

SPF级BALB/c雄性裸鼠,4~5周龄,体质量17~21 g,购于南京医科大学动物饲养基地,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2021-0001。饲养在南京医科大学SPF级动物饲养中心,动物实验经南京医科大学伦理委员会批准,伦理批号IACUC-2108011。

1.3 药物及主要试剂

猪苓多糖(上海源叶生物科技,批号S25309-1 g,质量分数60%);MNNG(日本东京化成工业株式会社);兔抗人*N-cadherin*、*Twist*、*Snail*、STAT3、p-STAT3抗体以及兔抗二抗(美国CST公司);兔抗人GAPDH抗体(美国Proteintech公司);PCR引物(南京Invitrogen公司);PBS缓冲液(武汉谷歌生物科技);DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国ABI公司);逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所);BCA蛋白定量检测试剂盒(Thermo公司);Western blotting曝光液(杭州弗德生物科技)。

1.4 主要仪器

酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置光学显微镜(尼康株式会社);正倒置显微镜(德国蔡司公司);7900HT Fast Real-Time PCR System(美国 ABI 公司);Transwell 小室(美国康宁公司)。

2 方法

2.1 GES-1 和胃癌 SGC7901 细胞常规培养

GES-1 细胞和胃癌 SGC7901 细胞均采用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。每 2 天换 1 次培养液,1 周传代 2~3 次,大约 80%~90% 融合时使用含 1% 胎牛血清的 DMEM 平衡 4 h,加入 MNNG 或猪苓多糖进行处理。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖能力

将 GES-1 细胞常规培养后,按每孔 8 000 个均匀铺入 96 孔板中,分为对照组、模型(MNNG 40 μmol·L⁻¹,前期实验浓度^[4])组、猪苓多糖(1.25、2.50、5.00、10.00 mg·mL⁻¹)组,每组至少 6 个重复孔。待细胞完全贴壁后换液,模型组更换含 MNNG(40 μmol·L⁻¹)的培养基,猪苓多糖组更换含 MNNG+猪苓多糖的培养基,对照组不加药。处理 24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 0.5 h。酶标仪上读取 450 nm 波长下吸光度(A)值。

2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验

取对数生长期的 GES-1 细胞,胰酶消化并制备成单细胞悬液,细胞计数后按每孔 2×10⁵ 接种于 6 孔板。实验分为对照组、模型(MNNG 40 μmol·L⁻¹)组、猪苓多糖(5.00 mg·mL⁻¹)组。药物处理 48 h 后,用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后采用两步法 qRT-PCR 分析各组样本中相关 RNA 的表达水平。引物序列见表 1。

2.4 Western blotting 实验

细胞接种、造模及给药操作同“2.3”项。弃去培养基,使用 PBS 洗 2 次,加入适量的 Lysis Buffer 裂解液。集细胞裂解总蛋白。细胞总蛋白使用 BCA

试剂盒定量后进行 Western blotting 实验检测相关蛋白的变化。配制 SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶,蛋白上样,按设置条件(80 V、30 min;120 V、45~60 min)电泳,再转膜,PVDF 膜浸入 TBST 配制的 5% BSA 封闭液中,室温条件下慢摇床轻轻震荡封闭 2 h 或者 4 °C 慢摇床封闭过夜,孵育完一抗二抗,将 ECL 发光液 A 液 B 液按照 1:1 体积混合,PVDF 膜置于曝光机器中经 ECL 化学发光显影,用 Image Lab 软件对曝光条带灰度值进行分析。

2.5 荷瘤实验

BALB/c 雄性裸鼠分为 3 组,每组 6 只,对照组裸鼠 sc 0.9% 氯化钠溶液,MNNG 处理的 GES-1 组 sc 经 MNNG 40 μmol·L⁻¹ 处理 48 h 后的 GES-1 细胞(5×10⁷·mL⁻¹,0.2 mL),SGC7901 组(阳性对照)sc 胃癌细胞 SGC7901(5×10⁷·mL⁻¹,0.2 mL)^[6]。1 个月后观察各组成瘤及体质量情况,末次测量后颈椎脱臼处死,注射局部 HE 染色后进行组织病理学观察。

2.6 数据处理

图表采用 Graphpad 5.0 进行绘制,采用 SPSS 19.0 统计学软件分析实验数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据均先进行正态性检验和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验。

3 结果

3.1 CCK8 检测猪苓多糖对 GES-1 细胞增殖的影响

与对照组比较,模型组细胞的增殖能力显著下降;与模型组比较,随猪苓多糖浓度的增加,细胞增殖能力逐渐上升,到达 5 mg·mL⁻¹ 时增殖能力最高,差异显著($P < 0.01, 0.001$)。因此后续选择 5 mg·mL⁻¹ 作为实验浓度,作用时间选择 48 h(图 1)。

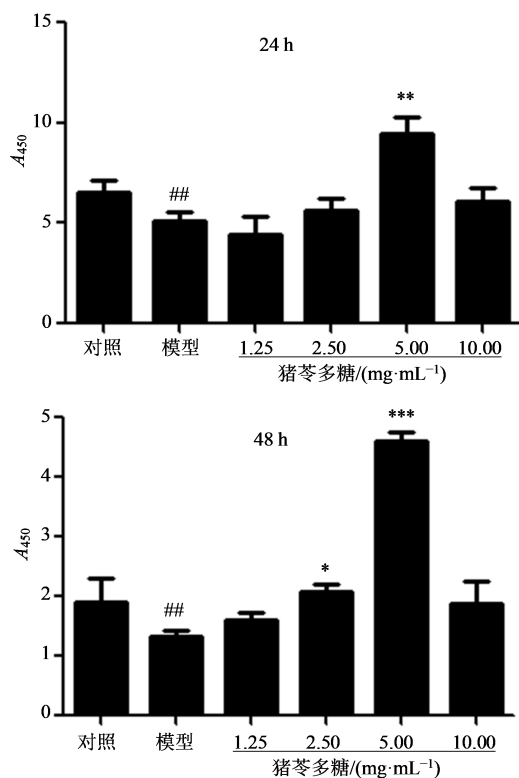
3.2 qRT-PCR 检测猪苓多糖对 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* mRNA 表达的影响

模型组 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* 的 mRNA 表达水平较对照组显著升高($P <$

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
<i>N-cadherin</i>	TGCGGTACAGTGTAACTGGG	GAAACCGGGCTATCTGCTCG
<i>Snail</i>	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
<i>Twist</i>	GCTGTGCTTACTCTAGCCATC	TGAGGCATTGTGCTCACATCAC
<i>Fibronectin</i>	TCTGTGCCTCCTATCTATGTGC	GAGGGACCACGACAACCTCTTC
<i>Vimentin</i>	TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA	AGACATGGTTGGGTGGATACC
<i>β-action</i>	CCACACTGTGCCCATCTACG	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG



与对照组比较: $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$
 $^{###}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group

图1 CCK-8法检测各组细胞增殖水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 CCK-8 detection of cell proliferation in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

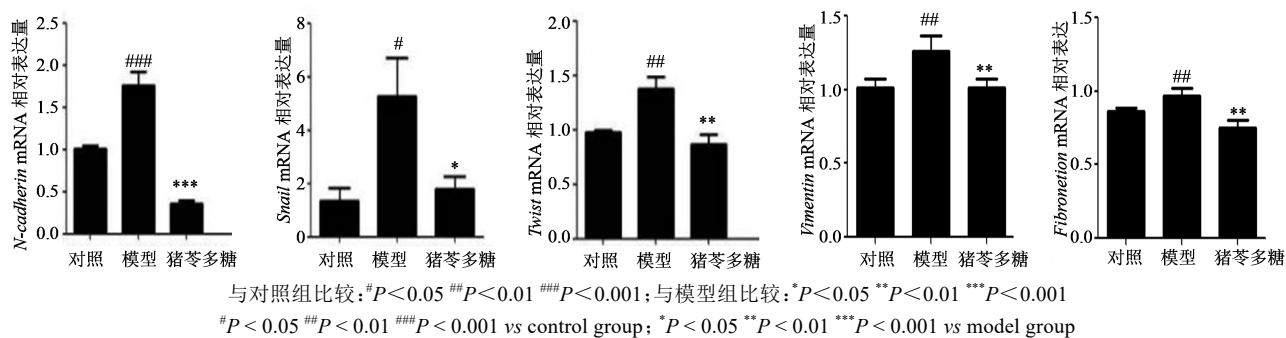


图2 各组 GES-1 细胞 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* 的 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 mRNA expression of *N-cadherin*, *Snail*, *Twist*, *Fibronectin* and *Vimentin* in GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

照(SGC7901)组裸鼠状态差,体质量大幅减轻(图6)。处死后各组裸鼠局部皮肤或瘤体进行HE染色(图7),对照组和MNNG组病理染色显示为正常的皮肤组织,阳性对照组显示为肿瘤组织。结果表明,以MNNG刺激GES-1细胞构建的上皮间充质转化细胞模型尚未到达肿瘤阶段,可以用于研究。

4 讨论

中药成分繁多且复杂,发挥作用时具有多靶点

0.05、0.01、0.001);而猪苓多糖组较模型组 *N-cadherin*、*Snail*、*Twist*、*Fibronectin* 及 *Vimentin* 的 mRNA 表达均显著下降($P < 0.05$ 、0.01、0.001),结果见图2。

3.3 E-cadherin、N-cadherin、Snail、Twist、Fibronectin、Vimentin、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达

与对照组比较,模型组 E-cadherin 蛋白表达显著下降($P < 0.01$), N-cadherin、Snail、Twist、Fibronectin 及 Vimentin 蛋白表达均显著上升($P < 0.05$ 、0.01),通路蛋白 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达亦显著上升($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较,猪苓多糖组 E-cadherin 蛋白表达显著上升($P < 0.05$), N-cadherin、Snail、Twist、Fibronectin、Vimentin 及通路蛋白 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 表达显著下降($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果见图3、4。

3.4 荷瘤实验

各组饲养1个月后,对照组和MNNG处理的GES-1组未见瘤体形成,阳性对照SGC7901组注射后1周左右局部出现瘤体,1个月瘤体长至6 cm左右,体内的肝脏见多处转移灶,且脾脏较对照组和MNNG处理的GES-1组明显增大(图5)。对照组裸鼠精神佳,体质量增长正常;MNNG处理的GES-1组裸鼠精神较差,体质量明显减轻;阳性对

多途径的特征,魏睦新教授带领团队经过多年的实践和实验,牢牢把握整体观念,时刻强调辨证与辨病并举,注重四诊合参,在辨证论治的基础上立法选方用药,认为PLGC患者多数先天或者后天脾胃虚弱,气血生化无源,痰瘀互结于中焦,故治疗上以理气健脾化痰及活血化瘀为基本治法。经过对多年临床经验的总结,魏教授认为化痰消瘀方中关键药物之一是猪苓,猪苓为多孔菌科真菌猪苓的菌

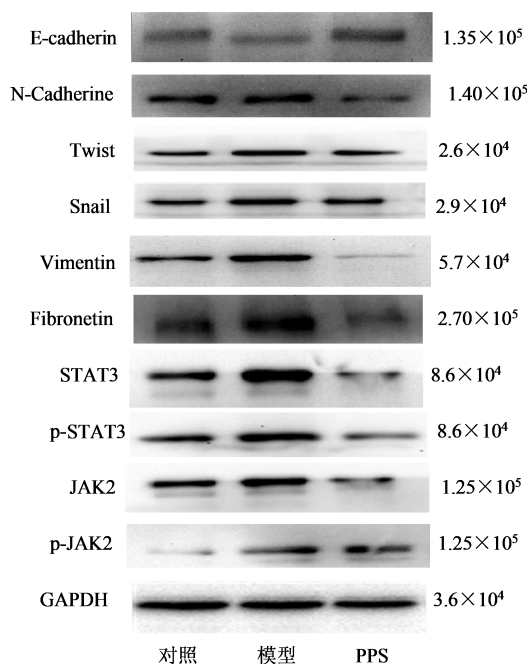
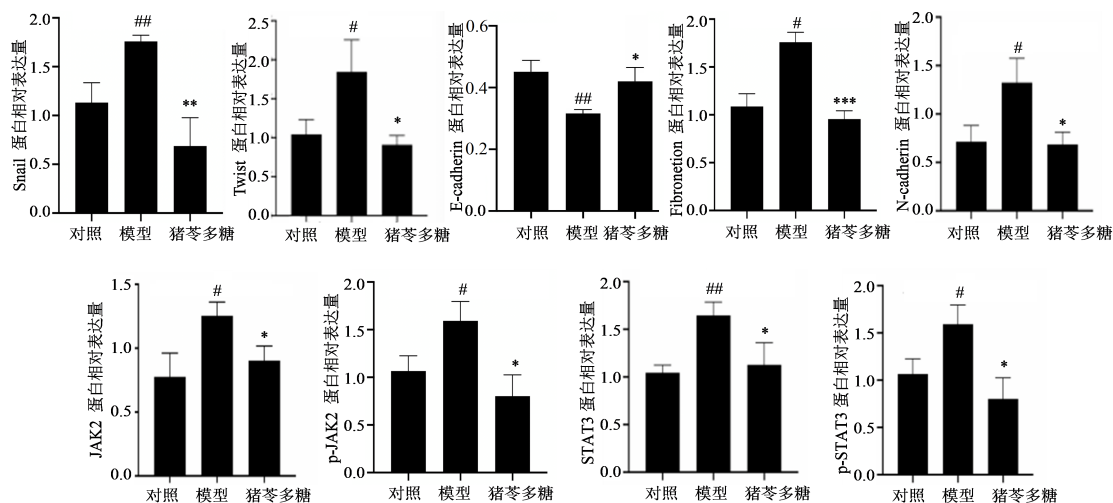


图3 各组 GES-1 细胞 EMT 相关分子蛋白的表达水平
Fig. 3 Expression levels of EMT related molecular proteins in GES-1 cells of each group



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图4 各组 GES-1 细胞 EMT 相关分子蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Comparison of expression of target genes and control histones ($\bar{x} \pm s, n=6$)



图5 荷瘤实验各组小鼠外观大体图

Fig. 5 Appearance of mice for each group in tumor-bearing experiment

核,性平味甘淡,具有利水渗湿作用,其主要有效成分是猪苓多糖。现代药理学研究显示,猪苓多糖具有抗病毒、抗衰老、抗肿瘤、降血糖、免疫调节等作用^[7-8],本课题组前期研究显示^[9],猪苓多糖具有保护幽门螺旋杆菌诱导的胃黏膜上皮细胞炎症的作用,还可以在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,但其对胃黏膜上皮细胞的间充质转化作用尚未得知。故本实验用猪苓多糖体外处理 MNNG 诱导的细胞模型,检测 EMT 相关蛋白及转录因子的表达,发现细胞 EMT 表型相关分子基因和蛋白水平表达均有逆转,提示猪苓多糖能够抑制 MNNG 诱导的 GES-1 细胞的 EMT,这可能也是猪苓多糖发挥保护胃黏膜和逆转 PLGC 的作用机制之一。

Correa 等^[10]早在 1975 年就提出的胃癌发生经典模式即正常胃黏膜-慢性非萎缩性胃炎-多灶性萎缩性胃炎-完全性(小肠型)肠上皮化生-不完全性(大肠型)肠上皮化生-轻度异型增生-重度异型增生-侵袭性腺癌,据此有学者认为 EMT 可能是胃炎

与胃癌之间的桥梁^[11]。EMT 指上皮细胞在特定条件下(生理或病理)转化为间质细胞的过程^[12],是癌细胞转移的关键过程,在此过程中上皮细胞获得间充质细胞的特征,主要表现为细胞的运动性和迁移力明显增强。上皮细胞和间充质细胞可以被认为是转变过程中的起点,产生的中间表型可能对应于部分 EMT,即 EMT 化。因此干预胃癌发展过程中的胃黏膜上皮细胞 EMT 化对预防胃癌的发生至关重要,并且使得这个过程可能成为治疗 PLGC 的重

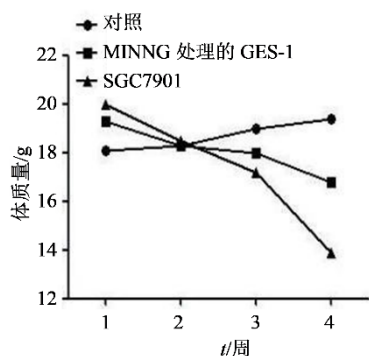
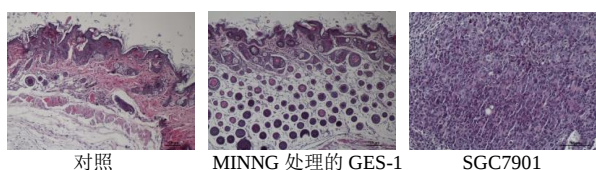
图6 荷瘤实验各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 6 Changes of body weight for each group in tumor-bearing experiment ($\bar{x} \pm s, n=6$)

图7 荷瘤实验各组小鼠注射部位组织 HE 染色

Fig. 7 HE staining of tissue at injection site of mice in each group of tumor-bearing experiment

要靶标之一。

EMT 过程中细胞黏合分子受体——钙黏蛋白(cadherin)起着重要的作用,并以 E-cadherin 和 N-cadherin 的作用最具代表性^[11]。Cadherin 是 Ca^{2+} 依赖性跨膜糖蛋白,在细胞黏合连接中起着黏合配体与受体的双重作用^[13]。在 EMT 期间可以观察到 E-cadherin 的下调表达和 N-cadherin 的上调表达,两者都可以被鉴定为 EMT 的生物标志物^[14],这个过程包括紧密黏附连接蛋白表达的显著减少或重新分布,并且伴随着间质细胞蛋白(如 N-cadherin、Vimentin、Snail)的表达上调,因此上述指标成为本研究中的重点观察内容。本实验结果显示,猪苓多糖干预细胞后, E-cadherin 的表达高于模型组, N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达较模型组降低,符合细胞的 EMT 过程被抑制的表现。另一方面, EMT 的共同特征是细胞之间的黏附连接和细胞极性丧失,这种丧失发生在 EMT 诱导物的转录因子激活之后,随后 E-cadherin 转录被抑制^[12]; Snail 及 Twist 被认为是调节 EMT 过程的两类重要的转录因子^[15], Snail 被发现能够上调 EMT 期间的间充质标志物包括 Fibronectin 和 Vimentin,而 Fibronectin 和 Vimentin 与 EMT 密切相关^[16]。本次实验结果显示,上述转录因子的表达均能在一定程度上被猪苓多糖抑制,同样提示细胞的 EMT 过程被抑制。Janus(JAK)蛋白酪

氨酸激酶家族的成员包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2,在肿瘤微环境的细胞被过度活化的 JAK-STAT 信号传导支撑着,利于血管生成和新血管的转录程序,该通路也被证实与 EMT 关系密切; Sullivan 等^[17]研究发现, IL-6 介导的 STAT3 激活并且促进上皮-间充质转化和转移。胃泌素可通过 JAK2/STAT3 途径诱导结直肠癌中的 EMT^[18],因此本实验重点观察了上述信号通路的表达情况。实验结果显示, MNNG 模型组细胞 JAK-STAT 信号通路蛋白 STAT、p-STAT3、JAK2 和 p-JAK2 蛋白表达亦明显上升,通路蛋白磷酸化,细胞呈现 EMT 化改变,猪苓多糖干预后上述信号通路相关蛋白的表达降低,提示猪苓多糖可能通过干预上述信号通路发挥抑制细胞 EMT 的作用。裸鼠体内荷瘤实验说明该细胞经 MNNG 处理后尚未到肿瘤阶段,结合 MNNG 组裸鼠精神状态、体质量的下降,另外 mRNA 及蛋白层面 EMT 化改变说明该细胞模型仍属于 PLGC 阶段,符合临床在 PLGC 阶段干预的目标。

祖国医学早在《黄帝内经》就提出“治未病”的重要中医预防疾病的思想,主要内涵之一即为“未病先防”,在 PLGC 阶段即进行积极的干预与治疗,就充分地体现了“治未病”的思想。

实验结果可得出初步结论,猪苓多糖可能通过干预 JAK2-STAT3 信号通路抑制 MNNG 诱导的胃黏膜上皮细胞 EMT 过程,为猪苓多糖治疗 PLGC 提供了一定的理论依据,也为研究 PLGC 阶段的 EMT 分子机制提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen W Q, Zhen G R S, Baade P D, et al. Cancer statistic in China, 2015 [J]. Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 徐雪莲, 魏睦新. 化痰消癥加减方与西药常规方案治疗胃癌前期病变的对照研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(17): 92-96.
Xu X L, Wei M X. Comparative study of modified Huatan Xiaoyu Recipe and western medicine in the treatment of precancerous lesions of gastric cancer [J]. J Clin Med Pract, 2021, 25(17): 92-96.
- [3] 郭亚云, 冷秀梅, 魏睦新. 化痰消癥方用于胃癌癌前病变的疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(33): 3663-3665.
Guo Y Y, Leng X M, Wei M X. Efficacy observation of "Xiaoyu Huatan Chinese Medicine" on precancerous

- lesions of gastric cancer [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2013, 22(33): 3663-3665.
- [4] 武晓艳, 冯小可, 崔国良, 等. 以MNNG刺激GES-1细胞构建上皮间充质化细胞模型[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(4): 272-279.
- Wu X Y, Feng X K, Cui G L, et al. Establishment of cell model of the epithelial-mesenchymal transition by stimulating GES-1 cells with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2019, 27(4): 272-279.
- [5] 林贞妍, 冯小可, 崔国良, 等. 猪苓多糖对胃肠上皮化生细胞模型的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(1): 8-13.
- Lin Z Y, Feng X K, Cui G L, et al. Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on gastrointestinal metaplasia cell model induced *in vitro* [J]. China Ind Econ, 2021, 29(1): 8-13.
- [6] 侯佳宁, 李粤, 吕国庆. HOXC10对胃癌细胞增值和转移的调控作用及机制研究[J]. 消化肿瘤杂志, 2021, 9(13): 184-191.
- Hou J N, Li Y, Lv G Q. The regulatory effect and mechanism of HOXC10 on gastric cancer cell proliferation and metastasis [J] J Digest Oncol, 2021, 9(13): 184-191.
- [7] Gao X R, Liu P X. Reviews on the structure-activity relationships of polysaccharide [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2004, 35(2): 229-231.
- [8] 王延涛, 孔令梅, 程杰, 等. 经典名方猪苓汤基准样品质量评价方法研究[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3643-3652.
- Wang Y T, Kong L M, Cheng J, et al. Study on quality evaluation method of classical prescription Zhuling Decoction primary standard substances [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(12): 3643-3652.
- [9] 刘璇, 耿乐, 冯小可, 等. 猪苓多糖在幽门螺杆菌相关胃炎中的保护作用及机制研究[J]. 药物评价研究, 2022, 45(6): 1039-1045.
- Liu X, Geng L, Feng X k, et al. Study on protective mechanism of *Polyporus polysaccharide* in *Helicobacter pylori* associated gastritis [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(6): 1039-1045.
- [10] Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. A model for gastric cancer epidemiology [J]. Lancet, 1975, 306: 58-60.
- [11] Gumbiner B M. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis [J]. Cell, 1996, 84(3): 345-357.
- [12] Fuxe J, Karlsson M C. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(5/6): 455-461.
- [13] Qiao Y Y, Jiang X, Lee S T, et al. FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers [J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 3076-3086.
- [14] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype ? [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6): 415-428.
- [15] Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer [J]. Am J Pathol, 2002, 161(5): 1881-1891.
- [16] Wushou A, Hou J, Zhao Y J, et al. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 21621-21630.
- [17] Sullivan N J, Sasser A K, Axel A E, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells [J]. Oncogene, 2009, 28(33): 2940-2947.
- [18] Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, et al. Involvement of JAK2 upstream of the PI3-kinase in cell-cell adhesion regulation by gastrin [J]. Exp Cell Res, 2004, 301(2): 128-138.

[责任编辑 兰新新]