

基于 SNAIL 信号通路及肠道菌群研究密点麻蜥抑制胃癌肝转移的作用机制

白 星¹, 程翻娥¹, 杨长沅², 李 铮¹, 李卫强^{1,3*}

1. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏 银川 750004

2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510006

3. 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

摘要:目的 基于 SNAIL 信号通路及肠道菌群研究密点麻蜥 *Eremias multiocellata* 对胃癌肝转移的抑制作用及机制。方法 36 只 BALB/c 裸鼠随机分为对照组和造模组, 造模组脾脏注射 HGC-27 胃癌细胞, 造模 4 周剖腹探查验证造模成功。随后将造模组随机分为模型组、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU, 0.025 g/kg) 组和密点麻蜥 (2.6 g/kg) 组, 每组 8 只。对照组和模型组 ig 生理盐水, 密点麻蜥组 ig 密点麻蜥水煎剂, 5-FU 组 ip 5-FU, 连续干预 4 周后, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组裸鼠肝组织病理变化; 采用 Western blotting 检测各组裸鼠肝组织 SNAIL 及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达; 取末次给药 2 h 后各组裸鼠新鲜粪便进行 16S rRNA 高通量测序检测肠道菌群的变化。**结果** 与对照组比较, 模型组裸鼠肝组织出现肝小叶破坏、肝组织坏死, 中性粒细胞浸润, 癌细胞核大深染; 肝组织 SNAIL、N-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), E-cadherin 蛋白水平显著降低 ($P<0.001$)。与模型组比较, 密点麻蜥组肝细胞排列趋于整齐, 结构完整, 癌组织灶变小; 肝组织中 SNAIL、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$), E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$)。16S rRNA 结果显示, 与对照组比较, 模型组裸鼠肠道菌群失调紊乱, 厚壁菌门/拟杆菌门 (Firmicutes/Bacteroidetes, F/B) 值下降, 经密点麻蜥干预后 F/B 值升高。门水平上, 密点麻蜥主要对厚壁菌门进行调节, 厚壁菌门在对照组中丰度占比 40.9%, 与对照组比较, 模型组中厚壁菌门的丰度降低到 26.4%。经密点麻蜥干预后厚壁菌门丰度提高到 30.2%。属水平上, 密点麻蜥主要对胃癌肝转移裸鼠肠道菌群中差异菌属 (拟杆菌属 *Bacteroides*、梭状芽孢杆菌属 *Clostridia*_UCG-014、副拟杆菌属 *Parabacteroides*、幽门螺旋杆菌 *Helicobacter*) 发挥调节作用。**结论** 密点麻蜥可能通过降低 SNAIL 蛋白表达, 增加 E-cadherin 蛋白表达, 降低 N-cadherin 蛋白表达, 来抑制 EMT 发展进程, 发挥对胃癌肝转移的抑制作用。此外, 密点麻蜥通过调节厚壁菌门丰度, 增加作用于癌细胞表面 G 蛋白偶联受体的短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 含量, 调节机体自身免疫相关菌属 (拟杆菌属、梭状芽孢杆菌属、副拟杆菌属), 降低致病菌幽门螺旋杆菌的丰度, 发挥对胃癌肝转移的抑制作用。

关键词: 密点麻蜥; 胃癌肝转移; 上皮间质转化; SNAIL 信号通路; 肠道菌群

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0825-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.016

Mechanism of *Eremias multiocellata* on inhibiting gastric cancer with liver metastasis based on SNAIL signaling pathway and gut microbiota

BAI Xing¹, CHENG Fan-e¹, YANG Chang-yuan², LI Zheng¹, LI Wei-qiang^{1,3}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. Key Laboratory of Modernization of Ministry of Education of Hui Nationality Medicine, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of *Eremias multiocellata* on inhibiting gastric cancer with liver metastasis based on SNAIL signaling pathway and intestinal flora. **Methods** Thirty-six BALB/c nude mice were randomly divided into control group and model group. The model group was injected HGC-27 gastric cancer cells into spleen, and model was successfully established

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860807); 国家自然科学基金资助项目 (82260916); 宁夏自然科学基金资助项目 (2021A0276)

作者简介: 白 星 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事肝病和脾胃病的基础与临床研究。Tel: (0951)6880501 E-mail: 854108886@qq.com

*通信作者: 李卫强 (1974—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗脾胃病研究, 国家中医药管理局第六批名老中医师承项目继承人。

Tel: (0951)6880501 E-mail: lwq200309@163.com

by laparotomy for four weeks. Subsequently, model group was randomly divided into model group, 5-fluorouracil (5-FU, 0.025 g/kg) group and *E. multiocellata* (2.6 g/kg) group with eight rats in each group. Control group and model group were ig normal saline, *E. multiocellata* group was ig *E. multiocellata* water decoction, and 5-FU group was ip 5-FU. After four weeks of continuous intervention, pathological changes of liver tissues of nude mice in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; Western blotting was used to detect the expressions of SNAIL and epithelial mesenchymal transition (EMT) related proteins in liver tissues of nude mice in each group; Two hours after the last administration, fresh feces of nude mice in each group were taken for 16S rRNA high-throughput sequencing to detect the changes of gut microbiota. **Results** Compared with control group, liver tissue of nude mice in model group showed destruction of liver lobule, necrosis of liver tissue, neutrophil infiltration, and large and deep staining of cancer cell nucleus; SNAIL and N-cadherin protein expression levels in liver tissue of model group were significantly increased ($P < 0.001$), and E-cadherin protein expression level was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with model group, liver cells tended to be arranged in order, with complete structure, and tumor focus became smaller in *E. multiocellata* group; SNAIL and N-cadherin protein expression levels of liver tissue in *E. multiocellata* group were significantly decreased ($P < 0.001$), and E-cadherin protein level was significantly increased ($P < 0.001$). 16S rRNA results showed that compared with control group, gut microbiota of nude mice in model group was in disorder, Firmicutes/Bacteroides (F/B) was decreased, and F/B value was increased after the intervention of *E. multiocellata*. At the level of phyla, *E. multiocellata* mainly regulated Firmicutes, abundance of Firmicutes accounted for 40.9% in control group. Compared with control group, abundance of Firmicutes in model group was decreased to 26.4%. The abundance of Firmicutes was increased to 30.2% after the intervention of *E. multiocellata*. At the genus level, *E. multiocellata* mainly played a regulatory role in differential bacteria (*Bacteroides*, *Clostridia*_UCG-014, *Parabacteroides*, *Helicobacter*) in gut microbiota of nude mice with liver metastasis of gastric cancer. **Conclusion** *E. multiocellata* may inhibit the development of EMT and liver metastasis of gastric cancer by decreasing SNAIL protein expression, increasing E-cadherin protein expression and decreasing N-cadherin protein expression. In addition, by regulating the abundance of Firmicutes, *E. multiocellata* can increase the content of short chain fatty acids (SCFAs) acting on G protein coupled receptors on the surface of cancer cells, regulate the autoimmune related bacteria (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Parabacteroides*), reduce the abundance of pathogenic bacteria *Helicobacter pylori*, and play an inhibitory role in liver metastasis of gastric cancer.

Key words: *Eremias multiocellata* Günther; gastric cancer with liver metastasis; epithelial-mesenchymal transition; SNAIL signaling pathway; gut microbiota

胃癌是世界第 4 大恶性肿瘤^[1], 由于其发病隐匿、早期不易诊断且胃癌细胞具有循环扩散性, 大多数患者在确诊时已发展为晚期胃癌或伴有转移。其中, 肝脏是胃癌细胞血行转移最常见的器官, 其临床治疗仍是亟待解决的难题^[2-3]。人类肠道菌群中既包含致癌菌群又包含抑癌菌群, 共同维护肠道黏膜稳态环境, 癌症的发生及转移与肠道菌群失调密切相关^[4]。研究表明, 胃癌肝转移患者肠道菌群存在紊乱现象^[5]。因此, 从浸润转移相关的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及肠道菌群调控等多靶点开展干预胃癌肝转移的作用及机制阐释为中医药抗癌研究提供科学依据具有重要意义。

EMT 是上皮细胞获得间充质细胞表型的过程^[6]。这一生物过程常被癌细胞利用则致使癌细胞具有抗凋亡、获得侵袭等癌细胞特性。EMT 是肿瘤转移的重要标志, SNAIL 是 EMT 的标志物, 能够抑制 E-cadherin 的表达, 促进 EMT 进程^[7]。SNAIL 的异常激活与肿瘤的发生与转移及其预后密切相关^[8]。

密点麻蜥 *Eremias multiocellata* Günther 始载于《中国药用动物志》^[9], 《本草纲目》载蜥蜴有活血化瘀、消癭散结之功。本课题组前期开展了密点麻蜥及其为主组成的复方中药干预胃癌的相关研究, 证实密点麻蜥含药血清能够抑制胃癌 SGC-7091 细胞的增殖, 抑制 Sirt1 表达, 降低 p53 蛋白表达, 促进胃癌细胞的凋亡^[10]; 其复方能够改善癌前病变大鼠病理形态, 降低 p53 和 PUMA 表达, 逆转癌变趋势^[11], 且阐明蜥蜴复方中药能够通过上调 E-cadherin、下调整合素 $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP9) 表达, 阻断 EMT, 抑制胃癌浸润转移^[12]。本课题基于以上前期研究, 进一步探索密点麻蜥基于 SNAIL 信号通路影响 EMT 及肠道菌群调节, 从多途径、多靶点对胃癌肝转移的抑制作用及机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 36 只, 4 周龄, 体质

量(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2021-0006。动物饲养于宁夏医科大学实验动物中心 SPF 级动物房,恒温(22±1)℃,光照昼夜交替各 12 h,自由进食饮水。动物实验经宁夏医科大学实验动物伦理审查委员会批准(批准号 2021-091)。

1.2 细胞株

人胃腺癌 HGC-27 细胞株购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3 药材

密点麻蜥(批号 20180501)购自宁夏医科大学附属中医医院门诊,经宁夏医科大学药学院刘艳华教授鉴定为密点麻蜥 *E. multiocellata* Günther。

1.4 药品与试剂

5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU, 批号 2005181)购自天津金耀药业有限公司;苏木素-伊红(HE)染色液(批号 202010)购自北京博奥拓达科技有限公司;兔抗鼠 β -actin 多克隆抗体(批号 12w2944)、SNAIL 多克隆抗体(批号 78m6660)、E-cadherin 多克隆抗体(批号 32p9942)、N-cadherin 多克隆抗体(批号 12j8872)多克隆抗体购自 Affinity Biosciences;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ATTNO0301)购自亚科因生物技术有限公司;E.Z.N.A.[®] DNA 提取试剂盒(批号 M9636020000J13V)购自美国 Bio-Tek 公司;AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(批号 11214KA1)购自 Axygen Biosciences;Quantus[™] Fluorometer 检测试剂盒(批号 0000302722)购自美国 Promega 公司。

1.5 仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CKX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);RM2255 型全自动轮转式石蜡切片机(德国 Leica 公司);MiniProteanTetra 蛋白电泳系统(美国伯乐公司);Amersham Imager 680RGB 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司);NovaSeqpE250 型平台(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 胃癌肝转移模型制备、分组与给药

36 只雄性 BALB/c 裸鼠按照随机数字表法随机分为对照组(9 只)和造模组(27 只)。参考相关文献,采用脾脏注射法^[13]建立胃癌肝转移模型。造模动物苏醒后,隔天对伤口进行碘伏消毒处理。饲养 4 周并对其精神状态、活动度、体质量饮食、皮肤

颜色、肿瘤生长等情况进行隔日观察记录。造模 4 周时,随机取对照组 1 只与造模组 3 只剖腹探查验证造模成功。对照组裸鼠肝组织色泽鲜明、表面光滑;造模组裸鼠肝组织出现肉眼可见白色结节,肝脏受损,部分肝组织被转移性结节代替,表明胃癌肝转移模型构建成功。

造模成功的裸鼠按照随机数字表法随机分为模型组、5-FU(0.025 g/kg)组和密点麻蜥(2.6 g/kg,临床等效剂量)组,每组 8 只,并由第 3 方对实验组进行随机编码,编号为不透明的密封信封以避免选择性偏倚。

取密点麻蜥 5.2 g,加入纯水定容至 600 mL,浸泡 30 min,放入数显恒温加热电热套中 100 ℃煮沸后,将温度调至 80 ℃,煎煮至 300 mL 时滤过,继续 80 ℃加热至 200 mL,制备成终质量浓度为 0.026 g/mL 的水煎剂。密点麻蜥组 ig 水煎剂,2 次/d;5-FU 组 ip 5-FU 原液稀释 10 倍后的溶液,1 次/d,对照组和模型组 ig 生理盐水,连续 4 周。

2.2 样本采集

用无菌 EP 管收集各组裸鼠末次给药 2 h 后的新鲜粪便,迅速转移至-80 ℃保存。各组小鼠 ip 2%戊巴比妥钠麻醉,取一小块肝组织以生理盐水冲洗后,于 4%多聚甲醛中固定 24 h,剩余肝组织于-80 ℃保存备用。

2.3 肝组织病理观察

取固定好的肝组织,冲水后脱水、透明,石蜡包埋,切成 4 μ m 厚的石蜡切片,脱蜡水化后蒸馏水冲洗 5 min,苏木素染色 4 min,水洗多余染液,盐酸酒精分化,水洗 15 min,伊红染色 3 min 后蒸馏水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,滴加中性树胶封片。晾干后用切片扫描仪观察。

2.4 肝组织 SNAIL、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达检测

取各组裸鼠肝组织 100 mg,加入含蛋白酶抑制剂的裂解液 1 mL,用冷冻研磨仪低温研磨至充分裂解,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清。BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入无蛋白快速封闭液封闭 15 min,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入一抗(1:1000),4 ℃孵育过夜;TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入二抗(1:10 000),室温孵育 2 h,TBST 洗涤 5 次,加入 ECL 发光试剂显影,采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.5 裸鼠粪便 DNA 提取及 IlluminaNovaSeq 测序

将每组裸鼠的粪便混合后,用 E.Z.N.A.[®] DNA 提取试剂盒抽提肠道微生物总 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 V3~V4 可变区基因进行 PCR 扩增,95 °C 预变性 3 min,27 个循环 (95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s),72 °C 稳定延伸 10 min,4 °C 进行保存。PCR 反应体系:5×TransStart Fastpfu 缓冲液 4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上游引物 0.8 μL,下游引物 0.8 μL,TransStart Fastpfu DNA 聚合酶 0.4 μL,模板 DNA 10 ng,双蒸水补足至 20 μL。每个样本 6 个重复。

使用 2%琼脂糖凝胶回收同一样本 PCR 产物,利用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒进行回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,用 Quantus[™] Fluorometer 检测试剂盒对回收产物进行检测定量。送由上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。分别用 Ace、Sobs、Shannon 和 Simpson 指数测定 α-多样性。用 Bray-Curtis 计算 β-多样性,主坐标分析

可视化,R 软件绘制结果来比较不同样本菌群丰富度和多样性。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,对定量资料进行正态性检验,符合正态分布的用 $\bar{x} \pm s$ 表示;非正态分布的采用中位数(四分位数)[M(Q1,Q3)]表示。两组间比较方差齐且符合正态分布采用 Student *T* 检验,方差不齐且不符合正态分布用 Wilcoxon 秩和检验。多组间比较采用单因素方差分析单因素方差分析(One-way ANOVA)或 Kruskal-Wallis 秩和检验。

3 结果

3.1 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肝组织病理变化的影响

如图 1 所示,对照组肝组织细胞排列整齐,肝小叶结构完整;模型组癌细胞在肝组织内聚集成灶性,肝小叶破坏,癌细胞核大、固缩、深染,异性明显,肝细胞水肿可见炎细胞浸润,部分可见肝组织坏死;5-FU 组和密点麻蜥组肝组织病灶变小,肝细胞较模型组排列整齐,炎性细胞减少,肝细胞表现出新生性,病变均有改善。

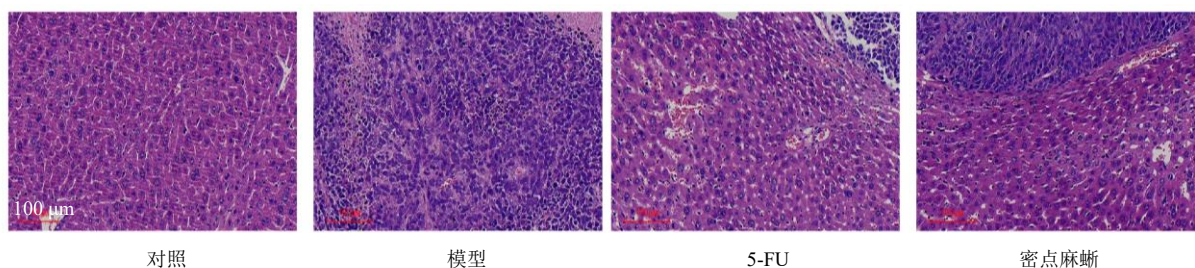


图 1 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of *E. multiocellata* on pathological change of liver tissue in nude mice with gastric cancer of liver metastasis (HE, ×100)

3.2 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肝组织 SNAIL、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响

如图 2 和表 1 所示,与对照组比较,模型组裸鼠肝组织 SNAIL 和 N-cadherin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$),E-cadherin 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,密点麻蜥组 SNAIL 和 N-cadherin 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$),E-cadherin 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。

3.3 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肠道菌群的影响

3.3.1 稀释曲线 Rank-Abundance 曲线用来反映物种的均匀度和丰富度,横坐标宽度代表物种丰度,

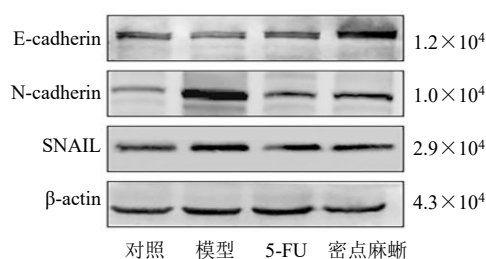


图 2 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肝组织中 SNAIL、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of *E. multiocellata* on SNAIL, E-cadherin and N-cadherin protein expressions in liver tissue of nude mice with gastric cancer of liver metastasis

表 1 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肝组织中 SNAIL、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of *E. multiocellata* on SNAIL, E-cadherin and N-cadherin protein expressions in liver tissue of nude mice with gastric cancer of liver metastasis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	E-cadherin/β-actin	N-cadherin/β-actin	SNAIL/β-actin
对照	—	0.62 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.88 ± 0.02
模型	—	0.41 ± 0.00***	1.27 ± 0.02***	1.05 ± 0.01***
5-FU	0.025	0.49 ± 0.00#	0.57 ± 0.01###	0.68 ± 0.01###
密点麻蜥	2.6	1.12 ± 0.04###	0.75 ± 0.02###	0.87 ± 0.01###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

纵坐标平滑度表示物种均匀度, 曲线平滑下降且水平延伸表示物种丰度高且均匀, 陡然下降则表示优势菌群所占比例较高均匀度较低。如图 3-A 所示, 对照组和密点麻蜥组优势菌群所占比较高, 密点麻蜥组和 5-FU 组物种丰富度较高。

稀释曲线用于评价测序深度能否反映总体所包含的每个样本微生物多样性, 也可以比较相同的测序深度下不同样本操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 数。如图 3-B 所示, 横坐标代表测序量, 纵坐标表示多样性指数。使用 Shannon 算法的稀释曲线测序量在 400 时, Shannon 曲线走向平缓, 曲线较长且集中在平缓, 说明在本实验中

继续增加测序量产生新的物种较少, 测序数据量能够反映样本生物信息。

3.3.2 α 多样性指数组间差异 sob 指数代表物种实际观测丰度, Shannon 指数反映菌落的多样性, Chao 指数反映物种的丰富度, pd 指数反映菌群进化谱系多样性。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 sob 指数和 pd 指数均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 5-FU 组和密点麻蜥组 sob 指数和 pd 指数均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 密点麻蜥组 Shannon 指数显著降低 ($P < 0.05$)。结合多样性指数和均匀丰度, 胃癌肝转移裸鼠肠道菌群与对照组比较表现菌群失调趋向, 经密点麻蜥治疗后更接近对照组。

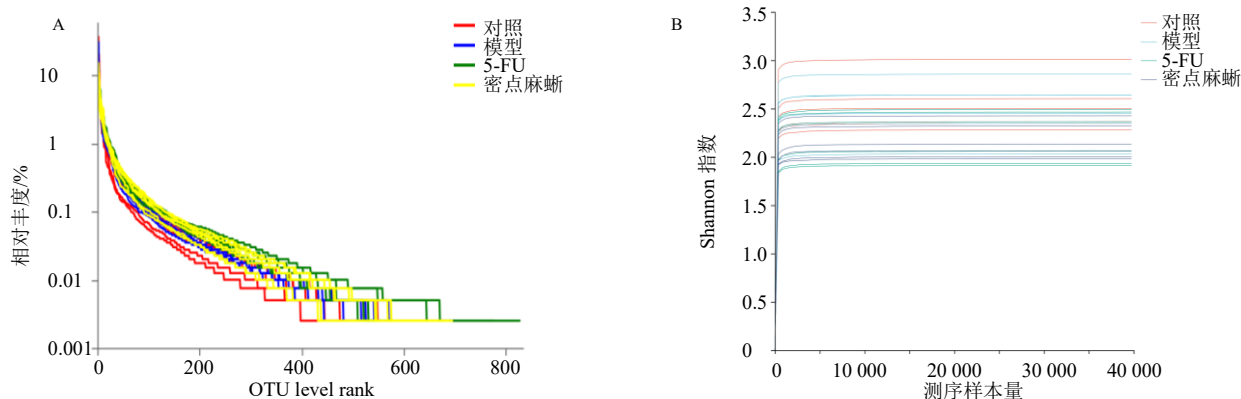
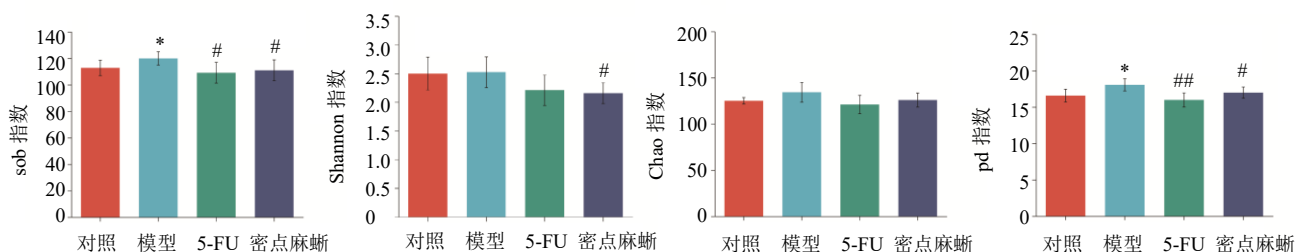


图 3 物种等级丰度图 (A) 和 Shannon 稀释曲线图 (B)

Fig. 3 Species Rank-abundance curve (A) and Shannon dilution curve (B)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group

图 4 各组肠道菌群的 α 多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 α Diversity analysis of gut microbiota in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3.3 β 多样性分析 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 将多组数据间差异反映在坐标中, 坐标中样品的距离越接近, 表明其样品结构相似性越高, 反之差异性越显著。如图 5 所示, 模型组与对照组肠道菌群

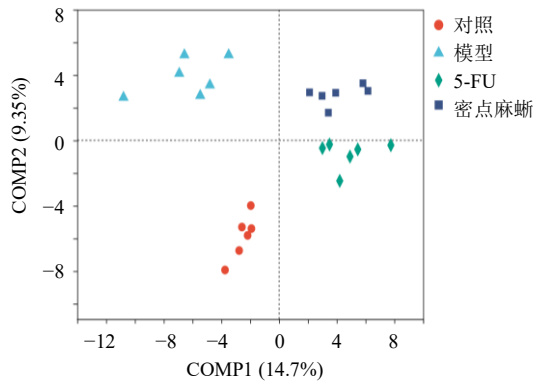


图 5 各组肠道菌群 β 多样性的 PLS-DA

Fig. 5 PLS-DA of β diversity of gut microbiota in each group

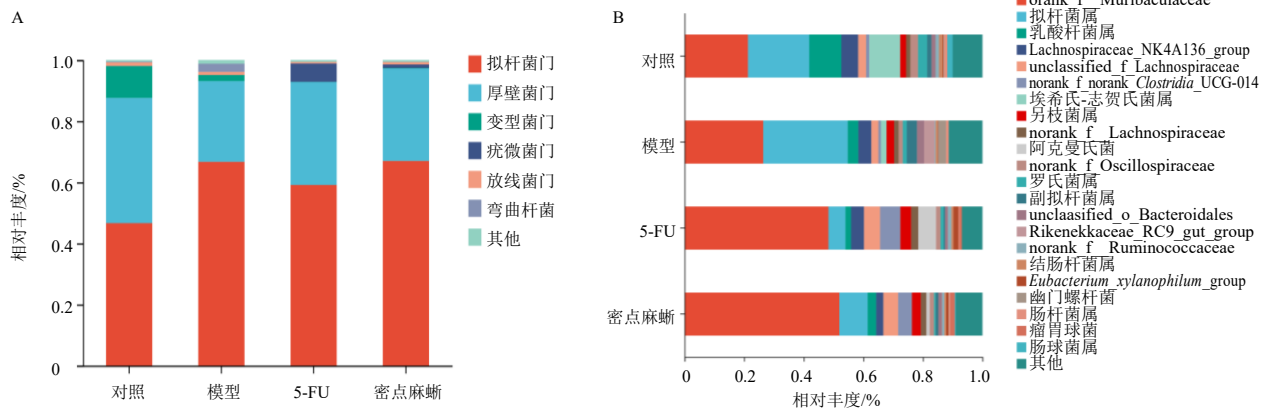


图 6 门 (A) 和属 (B) 水平肠道菌群物种组成分析

Fig. 6 Species composition analysis of intestinal flora at phyla (A) and genus (B) levels

表 2 密点麻蜥对胃癌肝转移裸鼠肠道菌群拟杆菌门和厚壁菌门的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of *E. multiocellata* on Firmicutes and Bacteroidota in gut microbiota of nude mice with liver metastasis of gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	拟杆菌门相对丰度/%	厚壁菌门相对丰度/%	F/B
对照	—	46.66 ± 3.83	40.99 ± 15.01	0.88 ± 3.92
模型	—	66.74 ± 10.69	6.42 ± 7.78	0.40 ± 0.73
5-FU	0.025	59.14 ± 5.22	33.71 ± 7.62	0.57 ± 1.46
密点麻蜥	2.6	67.02 ± 7.01	30.29 ± 7.10	0.45 ± 1.01

3.3.5 属水平物种差异分析 如图 7 所示, 属水平各组间差异显著的菌群主要有 norank_f_Muribaculaceae、拟杆菌属、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、梭状芽孢杆菌属 *Clostridia_UCG-014*、副拟杆菌属 *Parabacteroides*、幽门螺旋杆菌 *Helicobacter*。其中 norank_f_Muribaculaceae 在模

型组表现出差异; 5-FU 组与密点麻蜥组结构接近, 与模型组有一定的距离, 更接近对照组, 表明密点麻蜥可以调节胃癌肝转移裸鼠肠道菌群的结构。

3.3.4 肠道菌落物种组成分析 如图 6-A 和表 2 所示, 在门水平上各组胃癌肝转移裸鼠肠道菌群相对丰度 >1% 的菌群有厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、放线菌门 (Actinobacteriota)。与对照组比较, 模型组厚壁菌门丰度降低, 拟杆菌门丰度升高; 与模型组比较, 密点麻蜥组厚壁菌门丰度升高。厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 可反映胃肠整体健康状况, 与对照组比较, 模型组 F/B 值下降; 经 5-FU 和密点麻蜥干预后 F/B 值均升高。如图 6-B 所示, 在属水平各组占比差异较大的菌属为拟杆菌属 *Bacteroides*, 各组在拟杆菌属的丰度比例为对照组 20.57%、模型组 28.39%、5-FU 组 5.71%、密点麻蜥组 9.49%。

型组较对照组丰度增加, 经 5-FU 和密点麻蜥治疗后为表现出下降趋势; 拟杆菌属在各组间丰度差异显著, 与对照组相比模型组中显著富集 ($P < 0.05$), 经密点麻蜥治疗后丰度显著下降 ($P < 0.01$); 与对照组相比模型组中乳酸杆菌属丰度降低, 经药物治疗后未见显著调节作用; 与对照组相比, *Clostridia_*

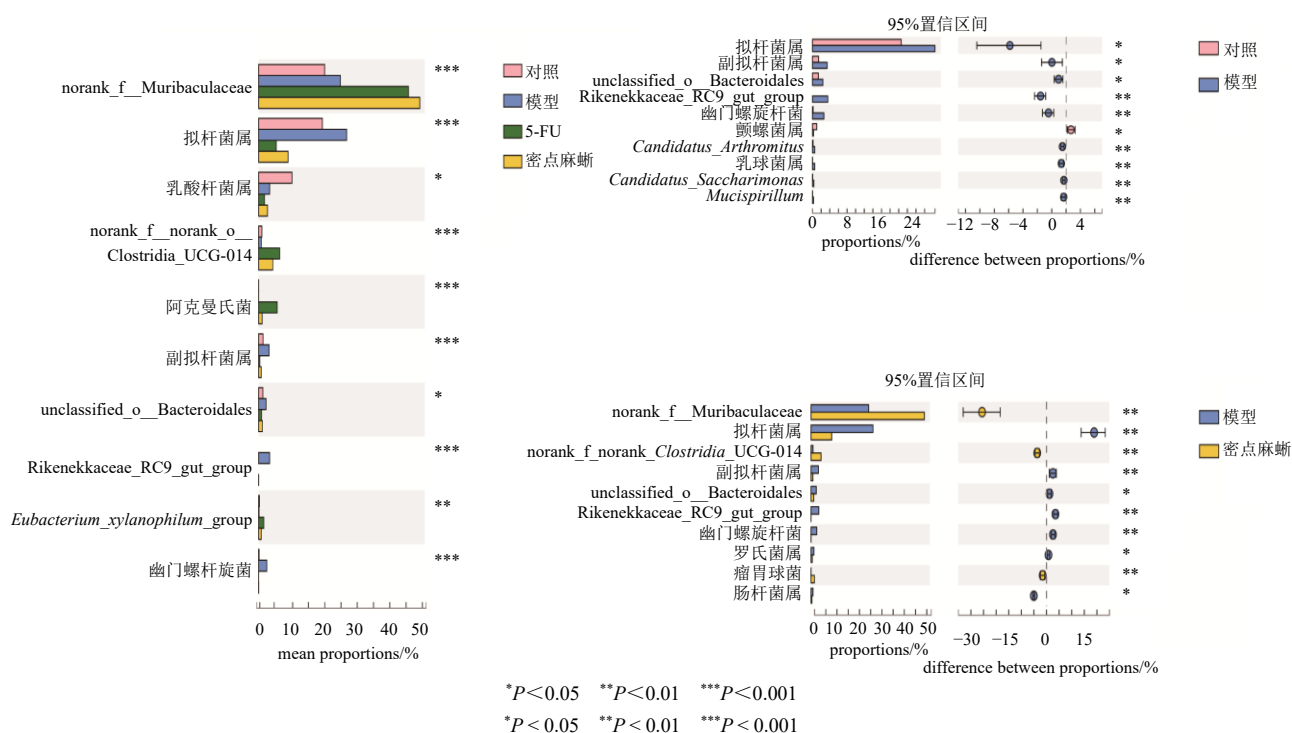


图 7 属水平物种差异分析

Fig. 7 Analysis of species differences at genus level

UCG-014 在模型组中占比下降, 经密点麻蜥干预后显著提高, 各组间差异显著 ($P < 0.001$)。副拟杆菌属在模型组中较对照组显著提高 ($P < 0.05$), 经药物治疗后丰度下降接近对照组 ($P < 0.001$)。幽门螺旋杆菌在模型组中的丰度明显增加 ($P < 0.01$), 经药物干预后恢复生理水平 ($P < 0.01$)。密点麻蜥主要对胃癌肝转移裸鼠肠道中拟杆菌属、梭状芽孢杆菌属、副拟杆菌属、幽门螺旋杆菌进行调节。

4 讨论

目前胃癌的治疗手段主要是手术切除、围术期放化疗及分子靶向治疗。但肿瘤的远处转移常常影响手术的可行性, 且一部分病人对于化疗药物表现为不耐受以及耐药等一系列问题仍亟待解决。研究发现中医药通过多途径多靶点对肿瘤具有较好的治疗作用^[14]。因此探究中药抗癌机制为临床提供科学依据、促进药物研发具有重要意义。

在肿瘤形成中 SNAIL 可抑制 E-cadherin 的转录从而诱导 EMT 发生, 促进癌细胞增殖、抗凋亡及转移^[15]。另外 SNAIL 诱导的 EMT 可以通过抑制宿主的免疫监视能力促进肿瘤的转移及复发^[16]。本研究发现, 与对照组比较, 模型组 SNAIL 和 N-cadherin 蛋白表达上调, E-cadherin 表达下调, 蛋白表达上调; 与模型组比较, 密点麻蜥上调 E-cadherin 表达,

下调 SNAIL、N-cadherin 的表达, 表明密点麻蜥可能通过抑制转录因子 SNAIL 的表达, 增加 E-cadherin 表达调控 EMT 的进程, 对胃癌肝转移裸鼠模型具有较好的抑制作用。

近年研究表明, 肠道菌群成分与癌症发生有关。其中肠道菌群产生的短链脂肪酸 (short-chain fattyacids, SCFAs) 在细胞稳态中至关重要, 它们有助于调节组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC), 从而影响细胞附着、免疫细胞迁移、细胞因子产生、趋化性和程序性细胞死亡^[17]。SCFAs 能够作用于乳腺癌细胞表面的 G 蛋白偶联受体, 调节肿瘤抑制基因, 使癌细胞 E-cadherin 表达升高、应力纤维含量降低, 阻断 EMT 进展^[18]。因此, 通过改变肠道菌群结构来控制 SCFAs 水平亦可抑制肿瘤。

机体 SCFAs 中的丁酸主要由厚壁菌门产生^[19]。本研究中胃癌肝转移裸鼠肠道菌群中厚壁菌门在对照组丰度占比 40.9%, 模型组中厚壁菌门的丰度为 26.4%。经密点麻蜥干预后厚壁菌门的丰度提高到 30.2%。与对照组比较, 拟杆菌门在模型组中丰度显著提高, 经 5-FU 治疗后丰度下降, 密点麻蜥干预后未见改变。F/B 值可反映胃肠整体健康状况, 是诊断菌群紊乱的标志, 与对照组比较, 模型组 F/B 值下降, 表明胃癌肝转移发生后裸鼠肠道菌群发生紊

乱,经 5-FU 和密点麻蜥干预后 F/B 值均提高,因此证实密点麻蜥可调节菌群失调。本课题组前期研究发现胃癌肝转移裸鼠肠道中厚壁菌门丰度下降,且以密点麻蜥为主药的复方表现出提高胃癌肝转移裸鼠肠道厚壁菌门丰度的作用,因此表明密点麻蜥可通过增加厚壁菌门的丰度,补充机体 SCFAs 的缺失来抑制胃癌^[20]。

属水平上,密点麻蜥主要对胃癌肝转移裸鼠肠道中拟杆菌属、梭状芽孢杆菌属、副细菌属、幽门螺旋杆菌属进行调节。其中拟杆菌属和副细菌属的生理功能相似,均可代谢碳水化合物和产生 SCFAs,对宿主健康和免疫调节有益^[21]。副细菌属还表现锁定肿瘤坏死因子的释放发挥对肿瘤的抑制作用^[22]。梭状芽孢杆菌能够诱导宿主肠道 T 细胞反应表型从而发挥对人体免疫调节的作用^[23]。幽门螺旋杆菌属是胃癌发生的主要原因,根除幽门螺旋杆菌可降低 SNAIL 的表达,增加 E-cadherin 从而抑制 EMT 的发生^[24]。同时幽门螺杆菌影响成纤维细胞向具有肿瘤相关成纤维细胞特征的细胞方向分化,可能在上皮 RGM-1 细胞中启动 EMT 过程,表明幽门螺旋杆菌属具有诱导胃癌发生且影响转移^[25]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组中幽门螺旋杆菌属丰度增加,经密点麻蜥干预后幽门螺旋杆菌属丰度降低,表明密点麻蜥可降低幽门螺旋杆菌属而抑制胃癌。

以上研究表明,密点麻蜥能够通过降低转录因子 SNAIL 蛋白表达,增加 E-cadherin 蛋白表达,降低 N-cadherin 蛋白表达而改变 EMT 进程,发挥对胃癌肝转移的抑制作用。同时可能通过调节肠道菌群稳态平衡,增加产生 SCFAs 菌群厚壁菌门丰度,降低致癌菌属幽门螺杆菌丰度,调节机体免疫和 SCFAs 相关菌属(拟杆菌属、梭状芽孢杆菌属、副细菌属)的丰度,发挥对胃癌的抑制作用。

本研究基于 SNAIL 信号通路影响 EMT 及调节肠道菌群,阐释了密点麻蜥从多途径多靶点对胃癌肝转移的抑制作用及机制,为密点麻蜥治疗胃癌肝转移提供一定的实验证据,下一步将从通路-SCFAs-SCFAs 相关菌群,宏基因层面进一步揭示密点麻蜥多途径、多靶点治疗胃癌的作用机制。此外,密点麻蜥作为蜥蜴科的动物药,目前药物提取和成分鉴定一直是一个难题。本课题组前期与南京中医药大学段金廛教授合作对复方蜥蜴散在动物体内的代谢产物进行初步鉴定,由于相关药物研究较少尚未查

询到可以做质谱的对照品,具体蜥蜴成分仍未明确。目前课题组仍在进行密点麻蜥单味提取及成分鉴定工作。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [2] Tanaka H, Kanda M, Miwa T, et al. G-protein subunit gamma-4 expression has potential for detection, prediction and therapeutic targeting in liver metastasis of gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(2): 220-228.
- [3] Marte G, Tufo A, Steccanella F, et al. Efficacy of surgery for the treatment of gastric cancer liver metastases: A systematic review of the literature and meta-analysis of prognostic factors [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(5): 1141.
- [4] Wong S H, Kwong T N Y, Wu C Y, et al. Clinical applications of gut microbiota in cancer biology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 28-36.
- [5] Yu D D, Yang J R, Jin M, et al. Fecal *Streptococcus* alteration is associated with gastric cancer occurrence and liver metastasis [J]. *mBio*, 2021, 12(6): e0299421.
- [6] 李俊. EBV 相关胃癌中 SNAIL 生物学作用及调控机制的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [7] Bao Z, Zeng W, Zhang D, et al. SNAIL induces EMT and lung metastasis of tumours secreting CXCL2 to promote the invasion of M2-type immunosuppressed macrophages in colorectal cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(7): 2867-2881.
- [8] Ren B X, Li Y, Li H M, et al. The antibiotic drug trimethoprim suppresses tumour growth and metastasis via targeting Snail [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(11): 2659-2677.
- [9] 中国药用动物志协作组. 中国药用动物志 [M]. 天津: 天津科技出版社, 1983: 307-308.
- [10] 李卫强, 王骄, 关芳, 等. 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对人胃癌细胞凋亡的影响研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(8): 1447-1451.
- [11] 李卫强, 侯卓成, 甘德军. 宁夏密点麻蜥对胃癌前病变模型大鼠 P53 及 PUMA 表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(3): 525-528.
- [12] 景燕燕, 白星, 李卫强. 蜥蜴胃康方对胃癌浸润转移的干预作用及机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(4): 783-786.
- [13] 李宁, 段广才, 李苏宜, 等. 实验性小鼠前胃癌肝转移模型的建立 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2003, 22(5):

- 313-315.
- [14] 雷令, 姜秀星, 王雁, 等. 粉防己碱增敏长春新碱通过 MAPK 信号通路诱导 SGC-7901/VCR 细胞凋亡的分子机制研究 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(7): 691-699.
- [15] Campbell K, Lebreton G, Franch-Marro X, *et al.* Differential roles of the *Drosophila* EMT-inducing transcription factors Snail and Serpent in driving primary tumour growth [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(2): e1007167.
- [16] Skrzypek K, Majka M. Interplay among SNAIL transcription factor, microRNAs, long non-coding RNAs, and circular RNAs in the regulation of tumor growth and metastasis [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 209.
- [17] Mirzaei R, Afaghi A, Babakhani S, *et al.* Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111619.
- [18] Thirunavukkarasan M, Wang C, Rao A, *et al.* Short-chain fatty acid receptors inhibit invasive phenotypes in breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186334.
- [19] González-Bosch C, Boorman E, Zunszain P A, *et al.* Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease [J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102165.
- [20] 白星, 景燕燕, 程翻娥, 等. 基于 16S rRNA 基因测序研究蜥蜴胃康方对胃癌肝转移裸鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(8): 877-884.
- [21] Cui Y L, Zhang L S, Wang X, *et al.* Roles of intestinal *Parabacteroides* in human health and diseases [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2022, 369(1): fnac072.
- [22] Koh G Y, Kane A, Lee K, *et al.* *Parabacteroides distasonis* attenuates toll-like receptor 4 signaling and Akt activation and blocks colon tumor formation in high-fat diet-fed azoxymethane-treated mice [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(7): 1797-1805.
- [23] Chiba T, Seno H. Indigenous *Clostridium* species regulate systemic immune responses by induction of colonic regulatory T cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3): 1114-1116.
- [24] Tania M, Khan M A, Fu J J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(8): 7335-7342.
- [25] Krzysiek-Maczka G, Targosz A, Szczyrk U, *et al.* Role of *Helicobacter pylori* infection in cancer-associated fibroblast-induced epithelial-mesenchymal transition *in vitro* [J]. *Helicobacter*, 2018, 23(6): e12538.

[责任编辑 李亚楠]