

姜黄素对胃黏膜上皮异型增生小鼠的胃组织形态和炎症微环境的影响

夏勇, 曹彬, 徐彩菊, 宋燕华* (浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要:目的 观察姜黄素对胃黏膜上皮异型增生 (gastric epithelia dysplasia, GED) 小鼠的胃组织形态及炎症微环境的影响, 评估姜黄素对 GED 的预防和缓解作用。方法 设正常对照组、模型组、姜黄素低、中、高剂量组和阳性对照组, 除正常对照组外, 其余各组均采用复合因素造模法造模, 诱导 GED 动物模型。造模 8 周后, 姜黄素低、中、高剂量组及阳性对照组分别给予姜黄素 38、75、150 mg · kg⁻¹ 和维霉素 350 mg · kg⁻¹ 进行干预, 持续 8 周。实验期末, 检测各实验组小鼠胃蛋白酶原 (PG I)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 含量及磷酸化酪氨酸激酶 2 (p-JAK2)、信号转导与转录激活因子 3 (p-STAT3)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 相对表达量。苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体免疫组化染色, 观察各组小鼠胃黏膜组织形态及细胞增殖情况, 对 GED 和炎症细胞浸润进行组织病理学评分, 计算细胞增殖指数 (proliferation index, PI)。结果 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清 PG I 浓度下降, 胃组织中 IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6 含量上升 ($P < 0.05$), GED 和胃黏膜炎症细胞浸润评分及 PI 均上升 ($P < 0.01$), 组织病理学观察发现胃黏膜出现异型增生、炎症细胞浸润等改变, 细胞增殖活性增强, p-JAK2、p-STAT3、Cyclin D1 表达上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 姜黄素中、高剂量组血清 PG I 浓度上升, 胃组织中炎症因子 IFN- γ 、IL-6 含量降低 ($P < 0.05$), GED 和胃黏膜炎症细胞浸润评分及 PI 均下降 ($P < 0.05$ 或 0.01), 胃黏膜异型增生、炎症细胞浸润缓解, 细胞增殖活性受到抑制, p-JAK2、p-STAT3、Cyclin D1 表达下调 ($P < 0.05$)。姜黄素低剂量组 p-JAK2 蛋白表达量下调, 高剂量组 IL-1 β 下降 ($P < 0.05$)。结论 姜黄素对小鼠 GED 有预防和缓解作用, 可以改善 GED 小鼠胃黏膜的组织形态, 其作用机制可能与下调 JAK2/STAT3/Cyclin D1 通路的信号转导, 抑制细胞过度增殖有关。

关键词:姜黄素; 胃黏膜上皮异型增生; 炎症因子; 磷酸化酪氨酸激酶 2/信号转导与转录激活因子 3/细胞周期蛋白 D1

doi:10.11669/cpj.2024.13.005 中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)13-1211-08

Effect of Curcumin on Gastric Tissue Morphology and Inflammatory Microenvironment in Mice with Gastric Epithelial Dysplasia

XIA Yong, CAO Bin, XU Caiju, Song Yanhua* (Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of curcumin on the gastric tissue morphology and inflammatory microenvironment in mice with gastric epithelia dysplasia (GED), and to evaluate the preventive and therapeutic effects of curcumin on GED. **METHODS** Normal control group, model group, low, medium, and high dose groups of curcumin, and positive control group were set up. Except for the normal control group, all other groups were induced to establish GED animal models using a compound factor modeling method. After 8 weeks of modeling, the low, medium, and high dose groups of curcumin and the positive control group were respectively given curcumin at doses of 38, 75, 150 mg · kg⁻¹ and vitacoenzyme 350 mg/kg for intervention, continued for 8 weeks. At the end of the experiment, the gastric levels of pepsinogen PG I, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, and the relative expression levels of p-JAK2, p-STAT3, Cyclin D1 in each experimental group were detected. HE staining and PCNA antibody immunohistochemistry were performed to observe the gastric mucosal tissue morphology and cell proliferation in each group. The pathological scores of GED and inflammatory cell infiltration were evaluated, and the proliferation index (PI) was calculated. **RESULTS** Compared with the normal control group, the serum concentration of PG I in mice in the model group decreased, while the levels of IL-1 β , IFN- γ , and IL-6 in gastric tissue increased ($P < 0.05$). The scores of GED and gastric mucosal inflammatory cell infiltration, as well as the proliferation index (PI), all increased ($P < 0.01$). Histopathological observations revealed changes such as epithelial dysplasia and inflammatory cell infiltration in the gastric mucosa, enhanced cell proliferation activity, and upregulation of p-JAK2, p-STAT3, and Cyclin D1 expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, the medium and high dose groups of curcumin showed an increase in serum PG I concentration, a decrease in the inflammatory factors IFN- γ and IL-6 levels in gastric tissue ($P < 0.05$), a decrease in GED and gastric mucosal inflammatory cell infiltration scores, as well as PI ($P < 0.05$ or 0.01). The curcumin treatment alleviated gastric mu-

作者简介:夏勇,男,学士,主任技师 研究方向:毒理学与实验病理学 * 通讯作者:宋燕华,女,硕士,副主任医师 研究方向:毒理学
Tel:(0571)87115254

cosal dysplasia and inflammatory cell infiltration, inhibited cell proliferation activity, and downregulated the expression of p-JAK2, p-STAT3, and Cyclin D1 ($P < 0.05$). In the low dose group of curcumin, the expression of p-JAK2 protein was downregulated, and in the high dose group, IL-1 β decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Curcumin has a preventive and alleviating effect on the epithelial dysplasia of the gastric mucosa in mice, and can improve the tissue morphology of the gastric mucosa in GED mice. Its mechanism of action may be related to the downregulation of the JAK2/STAT3/Cyclin D1 pathway signaling, inhibiting excessive cell proliferation. **KEY WORDS:** curcumin; gastric epithelial dysplasia; inflammatory factor; JAK2/STAT3/Cyclin D1

胃癌(GC)是一种常见的恶性肿瘤,患者的死亡率较高,5年生存率低于30%,晚期预后较差^[1-2]。GC的发生是一个慢性的病理过程,包括慢性胃炎、异型增生和GC等多个阶段^[3]。胃黏膜上皮异型增生(gastric epithelia dysplasia, GED)属于GC前病变,是胃黏膜癌变前的最后一个病理阶段。GED患者的恶变风险很高,GC发生率接近80%^[2]。在GED阶段进行干预、阻止其向恶性转化对于早期预防GC具有重要意义^[4]。然而,阻止从GED到GC的转化至今仍然是一个挑战。炎症微环境和过度增殖是慢性胃炎向GED转化的2个重要特征^[5-6],炎症微环境与GC的发生、发展高度相关^[7-8]。中药用于治疗胃病已有悠久的历史。许多从植物中提取的活性成分对胃肠道疾病显示出良好的治疗效果。姜黄素(curcumin, Cur)是从草本植物中提取的天然多酚类化合物,具有抗炎、抗肿瘤等多种生物活性。本研究采用复合因素造模法,建立小鼠GED疾病模型,用姜黄素进行干预,观察其对GED小鼠的组织形态、细胞过度增殖及炎症微环境的影响,探讨姜黄素对GED的预防作用及潜在机制,以期为临床治疗提供新思路和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级ICR雄性小鼠60只,体质量(21.3 ± 1.3)g,购于浙江维通利华实验动物有限公司。实验动物饲养于屏障环境,温度范围22~25℃,相对湿度范围40%~70%。饲养许可证号SYXK(浙)2023-00420。本研究遵循3R原则并经浙江省疾病预防控制中心伦理委员会批准(2023-001),动物实验遵照ZJPF08-40《实验动物管理程序》进行。

1.2 试剂与仪器

维霉素片(vitacoenzyme, VCE)(规格:每片0.2g,批号:20230715,洛阳伊龙药业有限公司);姜黄素(规格:95%,批号:JH230925,渭南东江天成实业有限公司);增殖细胞核抗原(PCNA)抗体[货号:GM087929,基因科技(上海)股份有限公司];二抗及

DAB显色试剂盒套装(批号:QHL 220322,艾普迪实验器材制造(上海)有限公司);小鼠胃蛋白酶原I(pepsinogen I, PGI)测定试剂盒(批号:JL37198,上海将来实业股份有限公司);辣根过氧化物酶标记IgG抗体(货号:#7074)、抗Cyclin D1抗体(货号:#2978)(美国CST公司);抗p-JAK2抗体(货号:AF3024)、抗p-STAT3抗体(货号:#AF3293)(美国Affinity公司)。免疫组化染色机[Autostainer 720型,艾普迪实验器材制造(上海)有限公司];病理数字切片扫描仪(Pannoramic SCAN型,匈牙利3DHISTECH公司),组织匀浆机(Precellys 24型,法国BERTIN公司),化学发光仪(FluoChem E型,美国Santa Clara公司)。

1.3 分组及给药

设正常对照组、模型组、姜黄素低、中、高剂量组和阳性对照组,采用本实验室开发的完全随机化分组程序进行随机化分组^[9],每组10只动物。采用自由饮用和灌胃法给予相应药液或溶媒,灌胃容量 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。有研究表明,姜黄素在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下,对大鼠胃黏膜损伤有保护作用^[10-11],折算成小鼠的等效剂量约为 $71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,故设中剂量组给药剂量为 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,并以2倍的剂量间距,上、下各设1个剂量组^[12-13]。从实验开始首日起,参照文献[14-15],采用复合因素造模法诱导GED,对各组小鼠(除正常对照组外)进行造模,用 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)溶液^[16]代替饮水供小鼠自由饮用,每次饱食1d后,禁食1d,禁食日早晨撤除饲料,下午灌胃给予 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 去氧胆酸钠溶液(用体积分数30%乙醇溶液配制)灌胃,灌胃后继续禁食,至次日晨给予饲料。正常对照组给予等量的溶媒(蒸馏水),不作给药和禁食处理。自实验开始后第9周起,除继续进行造模处理外,姜黄素低、中、高剂量组每日上午分别灌胃给予38、75和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 姜黄素,阳性对照组每日上午给予 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 维霉素进行干预^[17],模型组给予等量蒸馏水,正常对照组处理同模型组,持续8周。实验期末,各组小鼠禁食过夜,次日眼眶采血法采集血液样本,二氧化碳麻醉箱处

死小鼠,采集胃组织样本进行指标检测及组织病理学检查。

1.4 小鼠血清胃蛋白酶原(PGI)含量测定

血液样本在室温放置2 h后,1 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清,用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定小鼠血清中PGI含量,具体操作按照试剂盒说明书的方法进行。

1.5 小鼠胃组织 HE 染色及组织病理学形态观察

将小鼠胃沿胃大弯对称剖剪开,在解剖板上摊平,生理盐水冲净,滤纸吸干,切取腺胃部胃组织2条(包含病变部位),转移至脱水盒中摊平,固定48 h,包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,参照文献分别对胃组织标本的GED和炎症细胞浸润进行评分^[18-20],GED按严重程度分无、轻微、轻、中、重5级,分别计0、1、2、3、4分,炎症细胞浸润按10个高倍镜视野中炎症细胞数量平均值分5级:≤10、≤25、≤50、≤100、>100分别计0、1、2、3、4分;胃黏膜出现腺体异型增生、慢性炎细胞浸润等病理改变,组织病理学评分高于正常对照组且有统计学意义为模型建立^[15,17,20]。

1.6 小鼠胃黏膜组织增殖细胞核抗原表达情况观察

胃组织石蜡切片,经脱蜡、水化,水化后的组织切片经3% H₂O₂孵育、抗原修复、血清封闭、PCNA抗体孵育(1:150稀释)、二抗孵育、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐显色、苏木素复染后,在高倍镜下观察并评分。PCNA抗原表达情况通过计算每个腺体的阳性细胞数来评估,PCNA阳性细胞胞核呈棕褐色,每张切片上随机取20个腺体,在高倍镜视野下,计数每个腺体中的阳性细胞数并计算其平均值,即为细胞增殖指数(proliferation index, PI)^[18]。

1.7 小鼠胃组织中 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 含量测定

将胃组织放至碎冰中冷却,剪碎后按质量与体积1:10比例加入预冷的pH 7.2磷酸缓冲液,匀浆后取上清液测定干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ),白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及白介素-6(interleukin-6, IL-6)含量,结果以每克胃组织中的炎症因子含量表示($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

1.8 Western blot 法测定胃组织中信号转导蛋白表达水平

按100 mg·mL⁻¹的比例,称取胃组织加入预冷的(radio-immunoprecipitation assay buffer, RIPA)裂解液,置碎冰中裂解后匀浆,取上清测蛋白浓度,加入上样缓冲液,置于金属浴变性,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿法转膜后,封闭2 h,一

抗 β -actin抗体、p-JAK2抗体、p-STAT3抗体、Cyclin D1抗体均于4℃下孵育过夜,次日用二抗辣根过氧化物酶标记IgG抗体孵育2 h,经化学发光反应显影后拍摄条带,Alpha View SA 3.30软件分析目标条带的灰度值,结果以目的蛋白相对表达量表示。

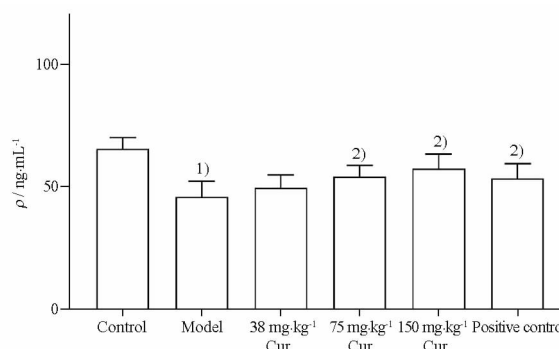
1.9 统计分析

使用SPSS 23.0软件进行统计。计量资料用平均值±标准差描述($\bar{x}\pm s$),采用单因素方差分析统计,实验组间的两两比较采用 Q 检验;等级资料用中位数和四分位数间距表示($M[IQR]$),采用秩和检验统计。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各实验组小鼠血清 PGI 含量比较

各实验组小鼠血清 PGI 含量差异有统计学意义(F 检验, $P<0.01$)。进一步分析发现,与正常对照组比较,模型组小鼠血清 PGI 含量明显降低,差异有统计学意义(Q 检验, $P<0.05$),提示胃黏膜受到损伤;与模型组比较,姜黄素中、高剂量组小鼠血清 PGI 含量有恢复上升趋势(Q 检验, $P<0.05$),阳性对照组小鼠血清 PGI 含量亦有上升(Q 检验, $P<0.05$)。见图1。



与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

¹⁾ $P<0.05$, compared with control group; ²⁾ $P<0.05$, compared with model group.

图1 姜黄素各实验组小鼠血清胃蛋白酶原(PGI)含量酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定结果. $n=10, \bar{x}\pm s$

Fig. 1 The ELISA measurement results of serum PGI content in each experimental group of mice. $n=10, \bar{x}\pm s$

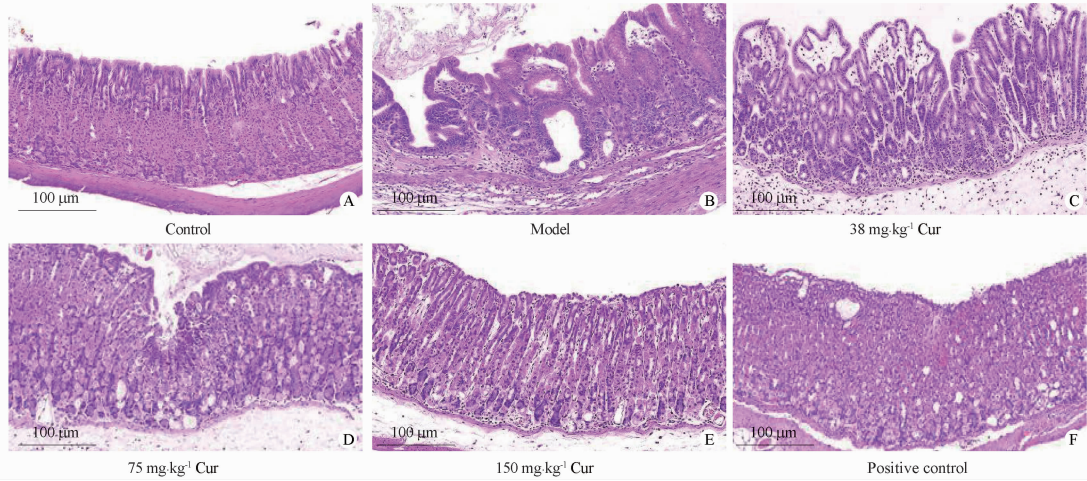
2.2 各实验组小鼠胃组织病理学观察及评分结果

正常对照组小鼠胃黏膜结构完整,胃腺呈高柱状,排列整齐,形态规则。胃黏膜下层可见少量淋巴细胞散在,未见异型增生(图2A);模型组与低剂量组小鼠胃腺异型增生,累及黏膜深层,腺体排列紊乱、腺腔扩张、扭曲或内折叠,细胞假复层多见,黏膜固有层及黏膜下层可见大量炎症细胞浸润,胃黏膜增生、化

生,糜烂伴局部充血(图 2B、C);中剂量组小鼠胃黏膜异型增生腺体数量较少,主要累及黏膜浅层和 中层,黏膜固有层及黏膜下层炎症细胞数量减少,局部胃黏膜增生、糜烂、充血,程度较轻(图 2D);高剂量及阳性对照组小鼠胃黏膜腺体异型增生少见或未见,主要累及黏膜浅层。黏膜层及黏膜下层,炎症细胞明显减少,胃黏膜基本完整(图 2E、F)。

各实验组小鼠 GED 及炎症细胞浸润评分结果

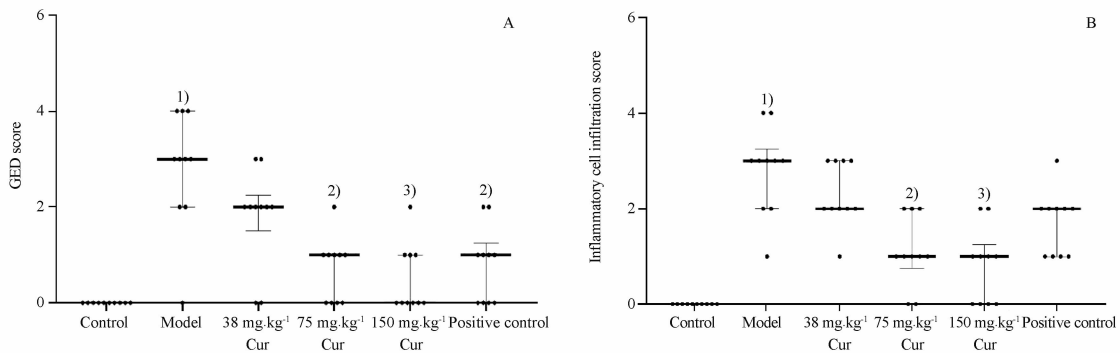
见图 3。图中给出了各组小鼠病理评分分值的散点分布及每组的评分中位数和四分位间距。模型组与阴性对照组比较,小鼠 GED 及炎症细胞浸润评分升高(H 检验, $P < 0.01$);姜黄素中、高剂量组与模型组小鼠比较,GED 及炎症细胞浸润评分均降低,差异有统计学意义(H 检验, $P < 0.01$ 或 0.05);阳性对照组与模型组小鼠比较,GED 评分下降,差异有统计学意义(H 检验, $P < 0.05$)。



A - 正常对照组;B - 模型组;C - 姜黄素低剂量组($38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);D - 姜黄素中剂量组($76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);E - 姜黄素高剂量组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);F - 阳性对照组。
A - normal control group; B - model group; C - curcumin low dose group ($38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); D - curcumin medium dose group ($76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); E - curcumin high dose group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); F - positive control group.

图 2 姜黄素各实验组小鼠胃组织苏木素-伊红(HE)染色结果($\times 200$)

Fig. 2 The observation results of hematoxylin-eosin(HE) staining of gastric tissue in each experimental group of mice($\times 200$)



A - GED 评分散点图; B - 炎症细胞浸润评分散点图;与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

A - GED score scatter plot; B - inflammatory cell infiltration scores scatter plot; ¹⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图 3 姜黄素各实验组小鼠胃黏膜上皮异性增生和炎症细胞增生组织病理学评分结果。 $n = 10$

Fig. 3 Histopathological score results of epithelial dysplasia and inflammatory cell infiltration in the gastric mucosa of mice in each experimental group. $n = 10$

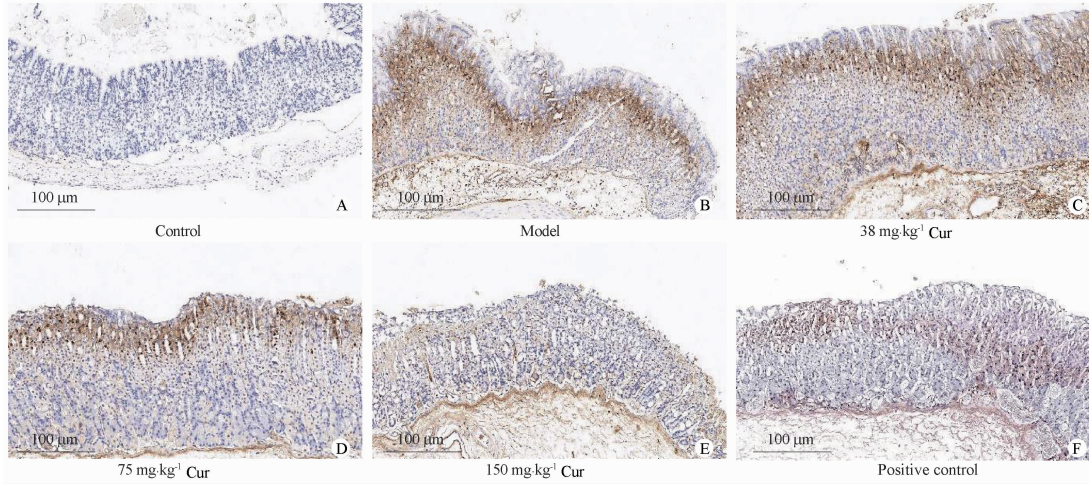
2.3 各实验组小鼠胃黏膜 PCNA 抗原表达情况比较

从图 4A 中可观察到胃黏膜中细胞核被标记成棕褐色的 PCNA 阳性细胞,以正常对照组最为少见,

模型组和低剂量组数量最多(图 4B、C),中剂量组次之(图 4D),高剂量组明显减少(图 4E),阳性对照组 PCNA 阳性细胞数量与中剂量组接近(图 4F)。统计结果表明,与正常对照组比较,模型组小鼠 PI

明显升高,差异有统计学意义(H 检验, $P < 0.01$),与模型组比较,姜黄素中、高剂量组小鼠PI降低,差异有统计学意义(H 检验, $P < 0.05$ 或 0.01),阳性

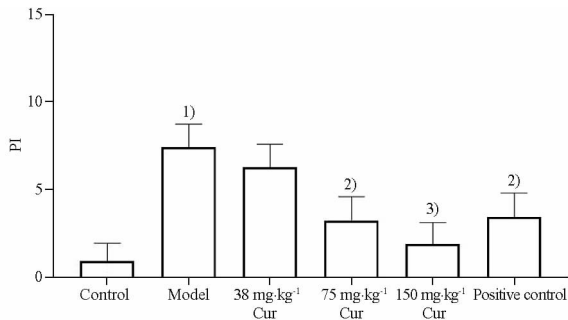
对照组小鼠PI降低,差异有统计学意义(H 检验, $P < 0.05$)。提示姜黄素对胃黏膜腺上皮细胞的过度增殖有一定的抑制作用,见图5。



A - 正常对照组; B - 模型组; C - 姜黄素低剂量组($38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); D - 姜黄素中剂量组($76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); E - 姜黄素高剂量组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); F - 阳性对照组。
A - normal control group; B - model group; C - curcumin low dose group($38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); D - curcumin medium dose group ($76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); E - curcumin high dose group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); F - positive control group.

图4 姜黄素各实验组小鼠胃黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化染色($\times 200$)

Fig. 4 The observation results of immunohistochemical staining of PCNA in gastric mucosa of mice in each experimental group($\times 200$)



与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。
¹⁾ $P < 0.01$, compared with control group;²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图5 姜黄素各实验组小鼠胃黏膜细胞增殖指数比较。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Comparison of gastric mucosal cell proliferation index among different experimental groups of mice. $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.4 各实验组小鼠胃组织中IFN- γ 、IL-1 β 及IL-6含量的比较

各实验组小鼠胃组织中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6含量差异有统计学意义(F 检验, $P < 0.01$)。与正常对照组比较,模型组小鼠IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6含量均升高(Q 检验, $P < 0.05$);与模型组小鼠比较,姜黄素高剂量组小鼠IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6含量均降低,姜黄素中剂量组小鼠IFN- γ 、IL-6含量降低,差异均有统

计学意义(Q 检验, $P < 0.05$);阳性对照组与模型组小鼠比较,IL-1 β 含量降低(Q 检验, $P < 0.05$),见表1。

表1 姜黄素各实验组小鼠胃组织中干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)含量的比较。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Comparison of IFN- γ , IL-1 β and IL-6 levels in gastric tissues of mice in each experimental group. $n = 10, \bar{x} \pm s$

Group	$c(\text{IFN-}\gamma)$ $/ \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$c(\text{IL-1}\beta)$ $/ \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$c(\text{IL-6})$ $/ \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Control	325 ± 27	471 ± 83	738 ± 167
Model	$477 \pm 50^{1)}$	$1\ 132 \pm 122^{1)}$	$1\ 639 \pm 273^{1)}$
$38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CUR	475 ± 49	$1\ 142 \pm 103$	$1\ 498 \pm 266$
$75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CUR	$407 \pm 43^{2)}$	$1\ 046 \pm 112$	$1\ 193 \pm 325^{2)}$
$150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CUR	$383 \pm 37^{2)}$	$778 \pm 108^{2)}$	$987 \pm 252^{2)}$
Positive control	450 ± 52	$929 \pm 120^{2)}$	$1\ 431 \pm 239$

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note:¹⁾ $P < 0.05$, compared with control group;²⁾ $P < 0.05$, compared with model group.

2.5 各实验组小鼠p-JAK2、p-STAT3、Cyclin D1蛋白相对表达量比较

各实验组小鼠p-JAK2、p-STAT3、Cyclin D1蛋白相对表达量差异有统计学意义(F 检验, $P < 0.01$),与正常对照组比较,模型组小鼠p-JAK2、p-STAT3、Cyclin D1蛋白相对表达量均上调(Q 检

验, $P < 0.05$), 与模型组小鼠比较, 姜黄素中、高剂量组小鼠磷酸化酪氨酸激酶 2 (p-JAK2)、信号转导与转录激活因子 3 (p-STAT3)、细胞周期蛋白 D1

(Cyclin D1) 相对表达水平均下调 (Q 检验, $P < 0.05$), 姜黄素低剂量组小鼠 p-JAK2 蛋白相对表达水平均下调 (Q 检验, $P < 0.05$), 见图 6 ~ 7。

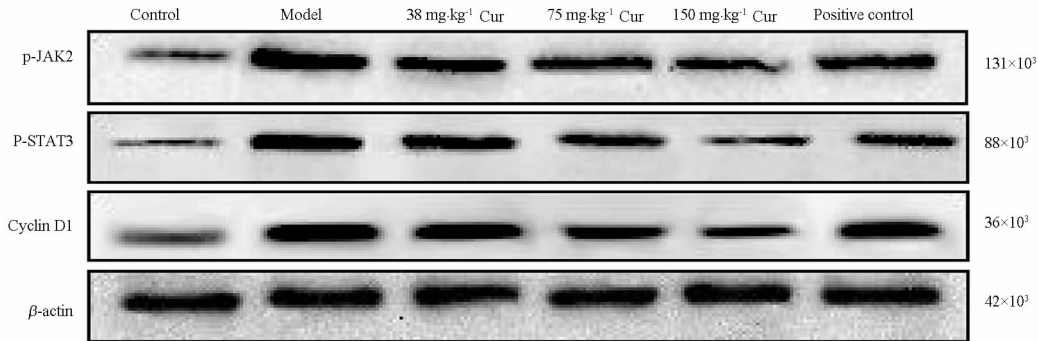


图 6 姜黄素各实验组小鼠胃组织中信号转导蛋白 p-JAK2、p-STAT3、cyclin D1 表达条带

Fig. 6 Bands of signal transduction proteins p-JAK2, p-STAT3, and cyclin D1 expression in gastric tissues of mice in each experimental group

3 讨论

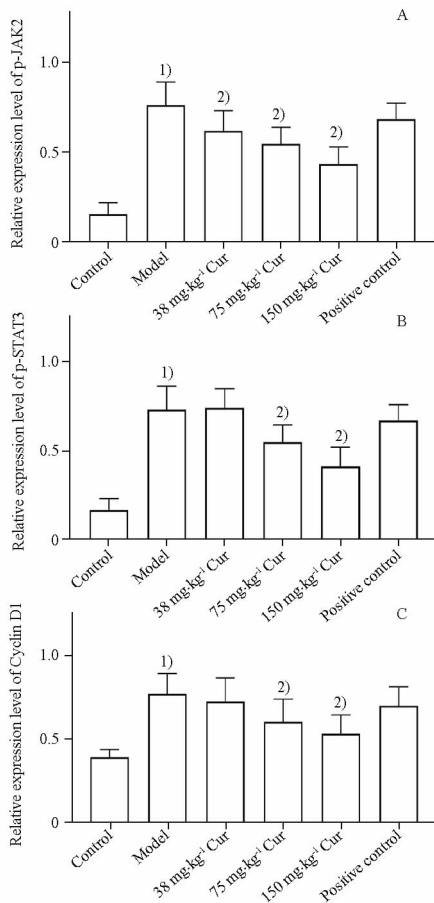
GC 的发生机制复杂, 实施一级预防十分困难, GED 是 GC 发展的前期病变, 如能早期预防或干预治疗, 可以有效降低恶变风险。探索干预 GED 的有效方法可能是预防 GC 的关键^[6]。构建动物模型是开展 GED 研究的基础。为模拟人类的发病机制, 本研究采用了 MNNG + 脱氧胆酸钠 + 乙醇 + 饥饱失常复合因素造模法。MNNG 是一种化学诱变剂, 其作用是模拟通过食物过量摄入亚硝酸盐引起的致癌作用, MNNG 能够直接作用于 DNA, 形成烷基化 DNA 加合物, 诱发癌症^[21-22]。胆汁反流也是引起 GED 的重要原因之一, 给予小鼠脱氧胆酸钠是为了模拟胆汁反流造成胃黏膜损伤。脱氧胆酸钠是一种阴离子去垢剂, 能破坏细胞膜结构, 诱发炎症反应, 引起胃黏膜慢性炎症^[23]。乙醇的作用是模拟过量饮酒对胃黏膜的损害, 乙醇可破坏黏液屏障和黏膜细胞, 引起胃黏膜充血、水肿、糜烂, 诱导炎症细胞的聚集和活化, 引发炎症反应, 乙醇是 GC 的独立危险因素, 能促进其他致癌物更有效地渗透组织。乙醇可代谢转化成乙醛, 具有致癌性^[24]。饥饱失常可导致胃肠功能紊乱, 加重胃黏膜损伤。

GED 与细胞的过度增殖高度相关, PCNA 含量变化有明显的周期性, 在静止期很少, S 期达高峰, 其表达水平越高, 表明增殖活性越强, 增殖越快, 恶变风险越高^[25]。抑制细胞过度增殖有望阻断 GED 的进展^[20]。PG I 主要由胃黏膜腺体的主细胞和黏液细胞分泌, 胃黏膜受损时, PG I 的分泌量发生变

化, 血液中的 PG I 浓度随之改变, 与胃黏膜的损伤程度基本一致, 在 GC 前病变研究中, 血清 PG I 常被用作血清学观察指标^[26]。

在持续造模 16 周后, 血清学检测发现模型组小鼠 PG I 水平降低, 提示小鼠胃黏膜受到损伤, 免疫组化染色观察发现模型组小鼠胃黏膜 PCNA 阳性细胞明显增加, 处于 S 期的细胞数远高于正常对照组, 呈现过度增殖状态。HE 染色观察发现模型小鼠胃黏膜出现异型增生、化生、糜烂、充血等改变, 并伴有大量炎症细胞浸润, 模型组 GED 及炎症细胞浸润评分高于正常对照组, 且有统计学意义, 说明 GED 模型建立^[3, 27]。

GED 是 GC 前病变的主要病理阶段, 也是进展为 GC 之前的最后一个阶段。一旦达到这个阶段, GC 的概率至少增加 10 倍^[28-29]。预防或干预 GED 对于防止胃黏膜病变的恶性转化有重要意义。大量流行病学证据表明, 胃黏膜上皮的慢性炎症在 GED 及 GC 中普遍存在。炎症微环境的持续存在对于启动、维持和促进 GED 转化起着重要作用^[30]。炎症因子和炎症细胞是炎症微环境的主要成分。炎症因子高表达可诱导炎症细胞的活化, 介导炎症细胞向胃组织损伤部位迁移, 启动和放大胃黏膜炎症反应, 加重胃黏膜损伤, 刺激细胞增殖、增加变异细胞过度增殖的风险^[31]。多项研究表明: IFN- γ 高表达可导致小鼠胃黏膜自发性炎症、壁细胞和主细胞丢失及化生和异型增生^[7]; IL-1 β 可与其他炎症因子协同, 促进炎症反应, 引起胃黏膜炎症、糜烂、溃疡, 高表达



A - p-JAK2 相对表达量比较; B - p-STAT3 相对表达量比较; C - Cyclin D1 相对表达量比较; 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。
A - comparison of relative expression levels of p-JAK2; B - comparison of relative expression levels of p-STAT3; C - comparison of relative expression levels of Cyclin D1; ¹⁾ $P < 0.05$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with model group.

图 7 姜黄素各实验组小鼠胃组织中信号转导蛋白相对表达量。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Relative expression levels of signal transduction proteins in gastric tissues of mice in each experimental group. $n = 10, \bar{x} \pm s$

的 IL-1 β 可引起腺体萎缩^[32]; IL-6 能够促进炎症细胞的活化和炎症因子的释放, 加剧胃黏膜的炎症反应, 高表达的 IL-6 可能导致细胞增殖异常, IL-6 异常升高对于评估胃黏膜损伤具有重要的参考价值^[33]。炎症因子 INF- γ 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平, 与胃黏膜的病变相关, 常用于评估胃黏膜损伤的严重程度^[34]。

在本研究中, 模型组小鼠胃组织中可见大量炎症细胞浸润, 炎症因子水平明显增高, 提示存在炎症反应和胃黏膜损伤, 相较于模型组, 姜黄素干预组小鼠胃组织中 INF- γ 、IL-1 β 、IL-6 均降低, 血清 PG1 水平有所恢复, 胃黏膜的 GED、糜烂、充血等病理改变减轻, 炎症细胞浸润评分降低, 细胞过

度增殖受到抑制。提示姜黄素能改善小鼠胃黏膜炎症微环境, 对胃黏膜的炎症反应和黏膜损伤有缓解作用。

胃黏膜上皮细胞的过度增殖是导致 GED 的重要机制, 胃黏膜上皮细胞的增殖受到多种因素的调控, 包括细胞周期调控蛋白、信号通路、炎症因子等。当这些调控因素异常时, 可能导致胃黏膜上皮细胞的增殖异常。JAK2/STAT3/Cyclin D1 信号通路可调控细胞周期调节蛋白, IL-6、INF- γ 是该信号通路的激活因子, 在 GED 的炎症微环境中常呈高表达状态, 因此, JAK2/STAT3/Cyclin D1 可能是调控 GED 的重要通路之一^[35]。

炎症因子 IL-6、INF- γ 可通过活化 JAK2, 促进 STAT3 磷酸化并进入胞核, 调控基因转录, 上调 Cyclin D1 的表达, Cyclin D1 促进细胞从 G1 期进入 S 期, 加速细胞增殖^[36]。Cyclin D1 还可通过调控 PCNA 的磷酸化状态, 加快细胞增殖过程。PCNA 量的变化与 DNA 合成一致, 可客观反映细胞的增殖活性及增殖速度。

本研究结果显示, GED 小鼠胃组织中 JAK2、STAT3 及 Cyclin D1 蛋白相对表达量均明显升高, 提示 JAK2/STAT3/Cyclin D1 信号通路被激活, 上调了细胞周期调节蛋白 Cyclin D1 的表达水平, 胃黏膜中 PCNA 阳性细胞数量增加, PI 指数上升, 说明 Cyclin D1 表达上调, 促进细胞周期进程, 加快 G1/S 期转换, 提高了细胞的增殖速度。而在姜黄素干预组小鼠胃组织中 JAK2、STAT3、Cyclin D1 蛋白相对表达量均有所下调, 提示姜黄素对胃黏膜上皮细胞的过度增殖有抑制作用。

综上所述, 姜黄素对小鼠胃黏膜上皮异型增生有预防和缓解作用, 可以改善 GED 小鼠胃黏膜的组织形态及炎症微环境, 降低炎症因子水平。其作用机制可能与其降低胃组织中的炎症因子 INF- γ 、IL-6 水平, 通过 JAK2/STAT3/Cyclin D1 通路的信号转导, 下调周期调节蛋白的表达, 抑制细胞过度增殖有关。

REFERENCES

- [1] GOETZE O T, AL-BATRAN S E, CHEVALLA M, *et al.* Multimodal treatment in locally advanced gastric cancer[J]. *Updates Surgery*, 2018, 70(2): 173-179.
- [2] MAHAWONGKAJIT P, TOMITICHONG P. A survey of early and advanced gastric cancer treatment by surgeons in Thailand[J]. *Oncol Rev*, 2018, 12(2): 369-375.
- [3] ZHU F, XU Y, PAN J, *et al.* Epigallocatechin Gallate protects against MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma in rats via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Evid Based Comple-*

- ment *Alternat Med*, 2021; 8846813. DOI: 10.1155/2021/8846813.
- [4] MALIK T H, SAYAHAN M Y, A L AHMED H A, *et al.* Gastric intestinal metaplasia: an intermediate precancerous lesion in the cascade of gastric carcinogenesis [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2017, 27(3):166-172.
- [5] ZHONG Y L, WANG P Q, HAO D L, *et al.* Traditional chinese medicine for transformation of gastric precancerous lesions to gastric cancer; A critical review [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2023, 15(1):36-54.
- [6] ZHENG J, CAI W, LU X, *et al.* Chronic stress accelerates the process of gastric precancerous lesions in rats [J]. *J Cancer*, 2021, 12(14):4121-4133.
- [7] BOCKERSTETT K A, DIPALO R J. Regulation of gastric carcinogenesis by inflammatory cytokines [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 4(1):47-53.
- [8] BIAN Y, CHEN X, CAO H, *et al.* A correlational study of Weifuchun and its clinical effect on intestinal flora in precancerous lesions of gastric cancer [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1):120. DOI: 10.1186/s13020-021-00529-9.
- [9] XIA Y, XU C J, FU J Y. Several applications of FOXPRO command files in toxicological experimental design [J]. *J Math Med (数理医学杂志)*, 1998, 11(4):343-344.
- [10] CZEKAJ R, MAJKA J, MAGIEROWSKA K, *et al.* Mechanisms of curcumin-induced gastroprotection against ethanol-induced gastric mucosal lesions [J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(5):618-630.
- [11] CZEKAJ R, MAJKA J, PTAK-BELOWSKA A, *et al.* Role of curcumin in protection of gastric mucosa against stress-induced gastric mucosal damage. involvement of hypoacidity, vasoactive mediators and sensory neuropeptides [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2016, 67(2):261-275.
- [12] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological experimental methodology (3rd Ed)(药理学实验方法) [M]. Beijing: *People's Medical Publishing House*, 2002:202-204.
- [13] HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, *et al.* Conversion of equivalent doses between animals and between animals and humans in pharmacological experiments [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学)*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [14] CAI T, ZHANG C, ZHAO Z, *et al.* The gastric mucosal protective effects of astragaloside IV in MNNG-induced GPL rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104:291-299.
- [15] LIN L, HAN T, LU L, *et al.* Chronic atrophic gastritis and animal models of gastric cancer precancerous lesions: summary, application, and review [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(2):220-227.
- [16] LI D, ZHAO L, LI Y, *et al.* Gastro-protective effects of calycosin against precancerous lesions of gastric carcinoma in rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:2207-2219.
- [17] LI X Y, KANG W N, WEN J P, *et al.* Protective effect and mechanism of paeoniflorin on gastric mucosa in rats with chronic atrophic gastritis [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志)*, 2023, 32(12):1638-1644.
- [18] ROGERS A B. Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 921:189-203.
- [19] OHNO T, OHTANI M, SUTO H, *et al.* Effect of green tea catechins on gastric mucosal dysplasia in insulin-gastrin mice [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6):3241-3247.
- [20] SUNG J K. Diagnosis and management of gastric dysplasia [J]. *Korean J Intern Med*, 2016, 31(2):201-209.
- [21] ZHAO Y, LI B, WANG G, *et al.* Dendrobium officinale Polysaccharides Inhibit 1-Methyl-2-Nitro-1-Nitrosoguanidine induced precancerous lesions of gastric cancer in rats through regulating wnt/ β -catenin pathway and altering serum endogenous metabolites [J]. *Molecules*, 2019, 24(14):2660-2674.
- [22] JIANG W, LU W, LIU J, *et al.* miR-520f-3p blocks MNNG-induced gastric precancerous lesions via the KLF7/NF κ B pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2024, 392:64-74.
- [23] JIN D, HUANG K, XU M, *et al.* Deoxycholic acid induces gastric intestinal metaplasia by activating STAT3 signaling and disturbing gastric bile acids metabolism and microbiota [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1):2120744. DOI: 10.1080/19490976.2022.2120744.
- [24] JAROENLAPNOPPARAT A, BHATIA K, COBAN S. Inflammation and gastric cancer [J]. *Diseases*, 2022, 10(3):35-60.
- [25] RESCHKE L, AFRIN S, EL SABAH M, *et al.* Leptin induces leiomyoma cell proliferation and extracellular matrix deposition via JAK2/STAT3 and MAPK/ERK pathways [J]. *F S Sci*, 2022(4):383-391.
- [26] ZHOU X Y, PENG P L. The influence of intestinal formula combined with Lao Shi acupuncture on the histopathology of gastric mucosa and serum IL-23, PGI in patients with chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志)*, 2017, 26(30):3338-3340.
- [27] YE J Y, ZHU X J, WANG R, *et al.* Effects of compound gecko powder with different particle combinations on the expression of C-Myc and Cyclin-D1 proteins downstream of the wnt signaling pathway in a rat model of gastric cancer precancerous lesions [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2016, 27(7):1572-1575.
- [28] KIM Y I, PARK J Y, KIM B J, *et al.* Risk of metachronous gastric neoplasm occurrence during intermediate-term follow-up period after endoscopic submucosal dissection for gastric dysplasia [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):6747. DOI:10.1038/s41598-020-63722-0.
- [29] LIN Z, LUO M, CHEN X, *et al.* Combined detection of plasma ZIC1, HOXD10 and RUNX3 methylation is a promising strategy for early detection of gastric cancer and precancerous lesions [J]. *J Cancer*, 2017, 8(6):1038-1044.
- [30] ZHANG S, SHEN Y, LIU H, *et al.* Inflammatory microenvironment in gastric premalignant lesions: implication and application [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1297101. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1297101.
- [31] NA H K, LEE J Y. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6):1116. DOI: 10.3390/ijms18061116.
- [32] VERMA S, KUMAR V L. Artesunate affords protection against aspirin-induced gastric injury by targeting oxidative stress and proinflammatory signaling [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(2):390-397.
- [33] CHU F, LI Y, MENG X, *et al.* Gut microbial dysbiosis and changes in fecal metabolic phenotype in precancerous lesions of gastric cancer induced with N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine, sodium salicylate, ranitidine, and irregular diet [J]. *Front Physiol*, 2021, 12:733979. DOI: 10.3389/fphys.2021.733979.
- [34] MICHALKIEWICZ J, HELMIN-BASA A, GRZYWA R, *et al.* Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015:176726. DOI:10.1155/2015/176726.
- [35] ZHUANG M, DING X, SONG W, *et al.* Correlation of IL-6 and JAK2/STAT3 signaling pathway with prognosis of nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Aging*, 2021, 13(12):16667-16683.
- [36] ZHAO L, ZHU Z, YAO C, *et al.* VEGFC/VEGFR3 signaling regulates mouse spermatogonial cell proliferation via the activation of AKT/MAPK and cyclin D1 pathway and mediates the apoptosis by affecting caspase 3/9 and Bcl-2 [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(2):225-239.

(收稿日期:2023-02-28)