·实验研究·

健脾化瘀解毒方调控 SIRT1/FoxO1 自噬通路逆转胃癌前病变*

陈世龙[1]，黎乐怡[1]，李俊怡[1]，甘海宁[2,3]，黄雪君[2,3]，赵自明[2,3]，曾晓会[2,3]

1. 广州中医药大学第五临床医学院，广东 广州 510095；2. 广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院，广东 广州 510095；3. 广东省中医药研究开发重点实验室，广东 广州 510095

摘要：目的：基于沉默信息调节因子 1（sirtuin 1，SIRT1）/叉头转录因子亚家族 O1（forkhead box O1，FoxO1）通路探讨健脾化瘀解毒方（JPHY）逆转胃癌前病变（gastric precancerous lesions，GPL）的作用机制。方法：将 7 周龄 Atp4a$^{-/-}$ 小鼠随机分为 Atp4a$^{-/-}$ 组、JPHY 高剂量组（9 g·kg^{-1}，JPHY－H）及 JPHY 低剂量组（4.5 g·kg^{-1}，JPHY－L），以同窝野生型小鼠为空白组（WT），连续灌胃 8 周。采用 HE 染色观察胃组织病理形态，Western blot 法检测胃黏膜 SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、B 淋巴细胞瘤－2（B－cell lymphoma－2，Bcl－2）、Bcl－2 相关 X 蛋白（Bcl－2 associated X protein，Bax）、MUC2 蛋白表达水平。GES－1 细胞使用 N－甲基－N－亚硝基脲（500 μmol·L^{-1}）诱导 4 次建立 GPL 模型。将细胞分成正常组（GES－1）、模型组（MTCs）、氯喹组（5 μmol·L^{-1} CQ）、雷帕霉素组（50 nmol·L^{-1} Rapa）、5% 含药血清组（5% JPHY）、10% 含药血清组（10% JPHY）、CQ＋5% JPHY 组、CQ＋10% JPHY 组、Rapa＋5% JPHY 组以及 Rapa＋10% JPHY 组。采用 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移情况，Western blot 法检测细胞 MUC2、CDX2、SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、自噬相关基因 5（autophagy－related gene 5，ATG5）、微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule－associated protein 1 light chain 3，LC3）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）、p－mTOR 蛋白表达水平。结果：HE 染色显示，WT 组小鼠胃黏膜病理形态无明显异常；Atp4a$^{-/-}$ 组小鼠胃黏膜固有层可见巨型空泡样变和异型增生。与 Atp4a$^{-/-}$ 组相比，JPHY－H 组、JPHY－L 组小鼠胃黏膜病变程度减轻。Western blot 显示，与 WT 组比较，Atp4a$^{-/-}$ 组小鼠胃黏膜 MUC2、SIRT1、FoxO1、Bcl－2 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 Atp4a$^{-/-}$ 组比较，JPHY－L 组小鼠胃黏膜 MUC2、FoxO1、Bcl－2/Bax 水平降低（$P<0.05$）。与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞迁移和侵袭数量增加（$P<0.05$）。与 MTCs 组比较，CQ 组、CQ＋5% JPHY 组、CQ＋10% JPHY 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.05$）。与 Rapa 组比较，Rapa＋5% JPHY 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.01$）。与 CQ 组比较，CQ＋5% JPHY 组细胞迁移数量减少（$P<0.01$）。Western blot 显示，与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞 MUC2、SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与 MTCs 组比较，Rapa 组、5% JPHY 组、10% JPHY 组细胞 MUC2、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、ATG5 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。结论：JPHY 可延缓 GPL 恶性进展，其机制可能与调控 SIRT1/FoxO1 自噬通路有关。

关键词：胃癌前病变；健脾化瘀解毒方；SIRT1/FoxO1 通路；自噬

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.04.139

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2025）04－0858－09

Jianpi Huayu Jiedu Formula Reversing Gastric Precancerous Lesions by Regulating SIRT1/FoxO1 Autophagy Pathway

CHEN Shilong[1]，LI Leyi[1]，LI Junyi[1]，GAN Haining[2,3]，HUANG Xuejun[2,3]，ZHAO Ziming[2,3]，ZENG Xiaohui[2,3]

1. The Fifth School of Clinical Medicine，Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou Guangdong China 510095；2. The Second Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province/Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine Engineering and Technology，Guangzhou Guangdong China 510095；3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research and Development，Guangzhou Guangdong China 510095

* **基金项目**：广东省自然科学基金项目（2022A1515012654，2022A1515012060）

Abstract: Objective: To investigate the mechanism of reversal of gastric precancerous lesions (GPL) by the formula of Strengthening the Spleen, Resolving Blood Stasis and Eliminating Toxins (JPHY) based on the Silent Information Regulator 1 (SIRT1)/Forkhead Transcription Factor Subfamily O1 (FoxO1) pathway. Methods: Seven - week - old Atp4a$^{-/-}$ mice were randomly divided into the Atp4a$^{-/-}$ group, the JPHY high - dose group (9 g · kg^{-1}, JPHY - H) and the JPHY low - dose group (4.5 g · kg^{-1}, JPHY - L), and wild - type mice from the same litter were used as the blank group (WT), and the gastric tissue was gavaged for 8 weeks. HE staining was used to observe the histopathological morphology of the stomach, and Western blot was used to detect the expression levels of SIRT1, FoxO1, FoxO3A, Beclin1, B - cell lymphoma - 2 (Bcl - 2), Bcl - 2 associated X protein (Bax), MUC2, and MUC2 proteins in the gastric mucosa. GES - 1 cells were induced with N - methyl - N - nitrosourea (500 μmol · L^{-1}) for 4 times to establish the GPL model. The cells were divided into normal group (GES - 1), model group (MTCs), chloroquine group (5 μmol · L^{-1} CQ), rapamycin group (50 nmol · L^{-1} Rapa), 5% drug - containing serum group (5% JPHY), 10% drug - containing serum group (10% JPHY), CQ + 5% JPHY group, CQ + 10% JPHY group, Rapa + 5% JPHY group, and Rapa + 10% JPHY group. Transwell assay was used to detect cell invasion and migration, and Western blot was used to detect cell MUC2, CDX2, SIRT1, FoxO1, FoxO3A, Beclin1, autophagy - related gene 5 (ATG5), microtubule - associated protein 1 light chain 3 (microtubule - associated protein 1 light chain 3 (LC3), mammalian target of rapamycin (mTOR), and p - mTOR protein expression levels. Results: HE staining showed that there was no obvious abnormality in the pathologic morphology of the gastric mucosa of mice in the WT group; giant vacuolike changes and heterogeneous hyperplasia could be seen in the lamina propria of the gastric mucosa of mice in the Atp4a$^{-/-}$ group. Compared with the Atp4a$^{-/-}$ group, the degree of gastric mucosal lesions was reduced in the JPHY - H and JPHY - L groups. Western blot showed that the protein expression levels of MUC2, SIRT1, FoxO1, and Bcl - 2 in the gastric mucosa of mice in the Atp4a$^{-/-}$ group were elevated compared with those in the WT group ($P < 0.05$); and the levels of MUC2, FoxO1, and Bcl - 2/Bax in the gastric mucosa of mice in the JPHY - L group were decreased compared with those in the Atp4a$^{-/-}$ group ($P < 0.05$). The number of cell migration and invasion increased in the MTCs group compared with the GES - 1 group ($P < 0.05$). The number of cell migration and invasion decreased in the CQ, CQ + 5% JPHY, and CQ + 10% JPHY groups compared with the MTCs group ($P < 0.05$). The number of cell migration and invasion was reduced in the Rapa + 5% JPHY group compared to the Rapa group ($P < 0.01$). The number of cell migration was reduced in the CQ + 5% JPHY group compared with the CQ group ($P < 0.01$). Western blot showed that the protein expression levels of cellular MUC2, SIRT1, FoxO1, FoxO3A, Beclin1, and LC3B - II/LC3B - Ⅰ were elevated in the MTCs group compared with the GES - 1 group ($P < 0.01$). Compared with the MTCs group, the cellular MUC2, FoxO1, FoxO3A, Beclin1, and ATG5 protein expression levels were decreased in the Rapa group, 5% JPHY group, and 10% JPHY group ($P < 0.05$). Conclusion: JPHY can delay the malignant progression of GPL, and its mechanism may be related to the regulation of SIRT1/FoxO1 autophagy pathway.

Key words: gastric precancerous lesion (GPL); Jianpi Huayu Jiedu Formula (JPHY); SIRT1/FoxO1 pathway; autophagy

胃癌作为全球最常见的五大恶性肿瘤之一，病死率位居第四[1]，其高发病率是亟待解决的公共卫生问题。胃癌的发生发展过程可概括为“正常胃黏膜→慢性炎症→慢性萎缩性胃炎（chronic atrophic gastritis，CAG）→肠上皮化生（intestinal metaplasia，IM）→异型增生（上皮内瘤变）（dysplasia，Dys）→胃癌”的病理阶段[2]。其中，胃癌前病变（gastric precancerous lesions，GPL）是由胃黏膜上皮细胞（gastric mucosal epithelial cells，GECs）恶变引起的病理改变，为胃癌发生的关键阶段[3-4]。因此，从阻断癌前病变向胃癌恶性转化角度出发，探索防治策略是预防胃癌的核心环节。

自噬是机体细胞器更新和代谢动态平衡的必要途径之一。叉头转录因子亚家族 O（forkhead box Os，FoxOs）作为调节自噬的重要因子，通过激活细胞自噬，参与调节细胞代谢、增殖、存活等生理过程。FoxOs 家族成员，如抑癌基因 FoxO1 和 FoxO3A，广泛存在于多种细胞中[5]。FoxO1 的转录活性受到上游转录调节因子如沉默信息调节因子 1（sirtuin 1，SIRT1）的调节[6]。当细胞处于应激条件下，脱乙酰酶 SIRT1 与其底物 FoxO1 解离，上调 FoxO1 的去乙酰化并激活自噬[7]。此外，SIRT1 在应激条件下可降低哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）活性并促进自噬。SIRT1、FoxOs 和 mTOR 的活性平衡可以形成对细胞的保护机制[8]。微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule - associated protein 1 light chain 3，LC3）是自噬体的标记蛋白，包括 LC3 - Ⅰ和 LC3 - Ⅱ两种剪切形式。自噬发生时，LC3 - Ⅰ向 LC3 - Ⅱ转化，后者是自噬活动的标志性蛋白，二者比值与自噬水平有关[9]。Beclin1 有激活自噬的作用，可以诱导自噬蛋白定位在前自噬体膜上，形成自噬体，从而激活自噬[10]。自噬相关基因 5（autophagy - related gene 5，ATG5）也是自噬过程中的一个关键基因，它与 LC3 等蛋白共

同参与自噬小体的延伸,从而推动自噬进程[11]。长期的异常自噬可能与胃黏膜肿瘤的发生有关[12]。目前,针对自噬的药物研究已成为潜在的治疗策略,临床上常用的自噬抑制剂包括氯喹(chloroquine,CQ)和羟氯喹(hydroxychloroquine,HCQ),自噬激活剂如雷帕霉素(rapamycin,Rapa)等[13-14]。

GPL 属中医“胃痞”“胃痛”“胀满”范畴,是中医治疗的优势病种之一。GPL 的基本病机为虚、瘀、毒互结,治宜健脾、化瘀、解毒[15]。健脾化瘀解毒方(JPHY)为四君子汤加味方,有健脾、化瘀、解毒之功,临床治疗 GPL 疗效确切[16]。本研究基于 SIRT1/FoxO1 自噬信号通路探讨 JPYH 治疗 GPL 的作用机制,从而验证健脾化瘀解毒治法的科学性和合理性,为中医药早期干预胃癌前病变提供新思路。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 Atp4a$^{-/-}$C57BL/6J 小鼠及野生型小鼠(No. 20170010009881)由上海南方模式生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0010。动物实验由广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)实验动物伦理委员会审核批准,伦理编号:048879。

1.2　细胞　GES-1 细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3　药物与试剂　健脾化瘀解毒方由黄芪、太子参、白术、茯苓、三七、莪术、白花蛇舌草、猴菇菌、守宫组成,均购自广州至信中药饮片有限公司。按原方先加入 10 倍量水,浸泡 30 min,武火煮沸,文火煎煮 1 h,过滤。滤渣采用上述方法重复煎煮 2 次,合并滤液,减压浓缩至稠浸膏,置于冷冻干燥机中冷冻干燥,即得冻干粉。

SIRT1、FoxO3A、mTOR、Beclin1、ATG5、CDX2 抗体(美国 Proteintech 公司,批号:10004593、00055690、10018370、00080987、10008350、10004689);FoxO1 抗体(上海 BBI Life Sciences 公司,批号:F426AD0276);LC3B 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:800vlal);黏蛋白 2(mucin 2,MUC2)抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号:HN0323);tubulin 抗体(美国 Affinity 公司,批号:16e9425);p-mTOR 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体、山羊抗小鼠 IgG 抗体(英国 Abcam 公司,批号:GR3267044-1、GR288027-1、GR221939-1);高糖 DMEM 培养基、4% 组织细胞固定液、1% 结晶紫草酸铵溶液、基底膜基质胶(北京索莱宝科技有限公司,批号:20210121、20210511、20210410、20210511);10% 胎牛血清(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号:20110119ZQA);青霉素-链霉素双抗溶液(美国 Gibco 公司,批号:2321131);Rapa、CQ(美国 MedChemExpress 公司,批号:63777、90907);Transwell 小室(北京 Coring 公司,批号:3422)。

1.4　仪器　Varioskan Flash 型全波长多功能酶标仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司);5418 型小型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);JJ3000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);BSA2245 型电子天平(德国 Sartorius 公司);ini-protean Teral Cell 垂直电泳槽、PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);GenScript eBlot L1 快速湿转仪(广州皇河仪器科技有限公司);Tanon 5200 Multi 多功能成像系统(上海天能生命科学有限公司)。

2　方法

2.1　动物分组、造模及给药　将 7 周龄 Atp4a$^{-/-}$小鼠随机分为 Atp4a$^{-/-}$组、JPHY 高剂量组(9 g·kg^{-1},JPHY-H)及 JPHY 低剂量组(4.5 g·kg^{-1},JPHY-L),以同窝野生型小鼠为空白组(WT),每组 10 只,持续灌胃 8 周。于末次给药前 1 d 小鼠禁食 24 h,末次给药后处死小鼠,剖取胃小弯侧体-窦交界胃窦侧胃黏膜全层组织,10% 中性福尔马林固定用于 HE 染色,OCT 包埋后-80 ℃冰箱保存用于免疫荧光检测;刮取剩余胃黏膜-80 ℃储存,用于 Western blot 检测。

2.2　HE 染色观察小鼠胃组织病理形态　取已固定的胃组织,经石蜡包埋,梯度乙醇脱水,1% 苏木素着色,分化,伊红着色,脱水,透明封片后,在光学显微镜下观察。

2.3　Western blot 法检测小鼠胃黏膜蛋白表达水平　称取 50 mg 冻存的胃黏膜,加入 0.5 mL 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液混匀,冷冻研磨仪器充分研磨后,样品于 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 5 min。取上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,100 ℃反应 5 min。经电泳、转膜后,加入 SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)、MUC2 以及 tubulin 抗体孵育,之后加入相应二抗孵育。采用化学发光凝胶成像系统进行扫描,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以 tubulin 为内参蛋白,计算目的蛋白的相对表达量。

2.4　免疫荧光法检测小鼠胃组织 SIRT1、Beclin1 蛋白表达情况　取胃组织冰冻切片,用预冷的 4%

多聚甲醛在室温下固定 30 min，并在含有 0.1% Triton X－100 的磷酸盐缓冲液（PBS）中室温孵育 30 min。室温封闭 2 h 后，加入 SIRT1 抗体（1∶1 000）4 ℃孵育过夜，次日加入 Beclin1 抗体（1∶200）4 ℃孵育过夜。最后加入山羊抗兔 IgG 抗体（1∶200），室温孵育 2 h 后加入 Hoechst 33342（1∶1 000）室温孵育 30 min 后封片，荧光显微镜观察并拍照。

2.5　JPHY 含药血清制备　成年雄性 SD 大鼠，体质量 180～220 g（No. 44007200090997），以健脾化瘀解毒方（9 g·kg^{-1}）连续灌胃 5 d，取腹主动脉血。取血清 56 ℃灭活 30 min 后，微孔膜过滤，－80 ℃保存即得 JPHY 含药血清。

2.6　恶性转化细胞（MTCs）构建与分组　GES－1 细胞在含高糖 DMEM、10% 胎牛血清、青霉素 100 mg·L^{-1} 和链霉素 100 mg·L^{-1}的完全培养基中，37 ℃、5% CO_2 的环境下培养。当细胞融合度达 80% 左右时，造模细胞用 500 μmol·L^{-1} N－甲基－N－亚硝基脲（N－nitroso－N－methylurea，MNU）（完全培养基配制、含 1‰DMSO）进行诱导，对照细胞用完全培养基（含 1‰DMSO，不含 MNU）进行诱导。诱导 24 h 后，弃去原有培养基，加入完全培养基培养至细胞生长状态良好（长至 80%）开始下一轮诱导，连续使用 MNU 诱导 4 次，最后 1 次诱导后，将细胞分为正常组（GES－1）、模型组（MTCs）、抑制剂 CQ 组（5 μmol·L^{-1} CQ）、激动剂 Rapa 组（50 nmol·L^{-1} Rapa）、5% JPHY 含药血清组（5% JPHY）、10% JPHY 含药血清组（10% JPHY）、抑制剂 CQ＋5% JPHY 含药血清组（5 μmol·L^{-1} CQ＋5% JPHY）、抑制剂 CQ＋10% JPHY 含药血清组（5 μmol·L^{-1} CQ＋10% JPHY）、激动剂 Rapa＋5% JPHY 含药血清组（50 nmol·L^{-1} Rapa＋5% JPHY）、激动剂 Rapa＋10% JPHY 含药血清组（50 nmol·L^{-1} Rapa＋10% JPHY）。

2.7　Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移情况　迁移实验：药物干预 24 h 后，根据不同组别在 Transwell 小室的上室中加入 200 μL 细胞悬液（5×10^5 mL^{-1}），下室中加入对应组别的 600 μL 培养基。24 h 后用 4% 组织细胞固定液固定细胞，1% 结晶紫草酸铵溶液常规染色，最后在光学显微镜下观察。每组随机选取 5 张图片对染色区域、空白区域进行量化以反映细胞迁移数量。

侵袭实验：提前 2 h 用高糖 DEME 培养基溶解 Matrigel 基底膜基质（400 mg·L^{-1}），然后在 Transwell 室间聚碳酸酯膜上均匀覆盖，余操作同迁移实验。

2.8　Western blot 法检测细胞中自噬蛋白表达情况　各组细胞每孔加入 100 μL 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，于冰上裂解 10 min，使用细胞刮刀刮下贴壁细胞，收集蛋白液，12 000 r·min^{-1}离心 5 min 后取上清，后续实验步骤同“2.3”，用于检测细胞 SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、mTOR、p－mTOR、ATG5、LC3B－Ⅱ、LC3B－Ⅰ、MUC2、CDX2 蛋白表达水平。

2.9　统计学方法　采用 SPSS 26.0 统计软件和 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析和绘图。计量数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，组间比较若方差齐者采用 *SNK* 检验，方差不齐者采用 *Dunnett's T3* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

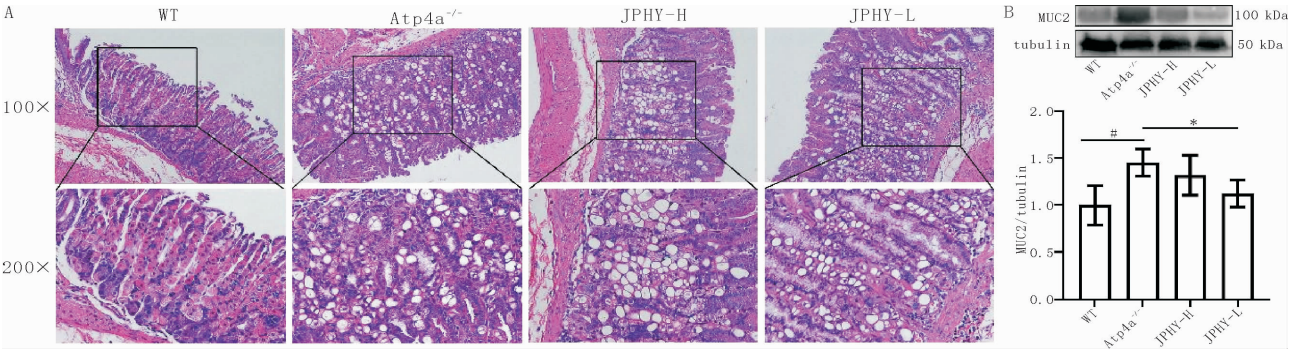
3　结果

3.1　JPHY 改善 Atp4a$^{-/-}$小鼠胃组织病理形态　HE 染色显示，WT 组小鼠胃黏膜呈淡红色，表面光滑，无颗粒感，黏膜完整，厚度适中；胃黏膜组织腺体结构正常，形态规则，上皮细胞排列有序，细胞核呈卵圆形，具有完整的细胞核极性。与 WT 组比较，Atp4a$^{-/-}$组小鼠胃黏膜屏障缺损，腺体排列紊乱，间隙增大，开口加深，可见腺体锯齿样变；固有层内可见大量巨型空泡样变，少量异型增生；基底膜明显增厚，两侧弥漫分布大量炎症细胞。与 Atp4a$^{-/-}$组比较，JPHY－H 组、JPHY－L 组小鼠胃黏膜病变程度减轻，基底膜增厚减轻，巨型空泡样变范围缩小，异型增生灶减少，炎症细胞明显减少，见图 1A。

Western blot 显示，与 WT 组比较，Atp4a$^{-/-}$组小鼠胃黏膜 MUC2 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 Atp4a$^{-/-}$组比较，JPHY－L 组小鼠胃黏膜 MUC2 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），见图 1B。

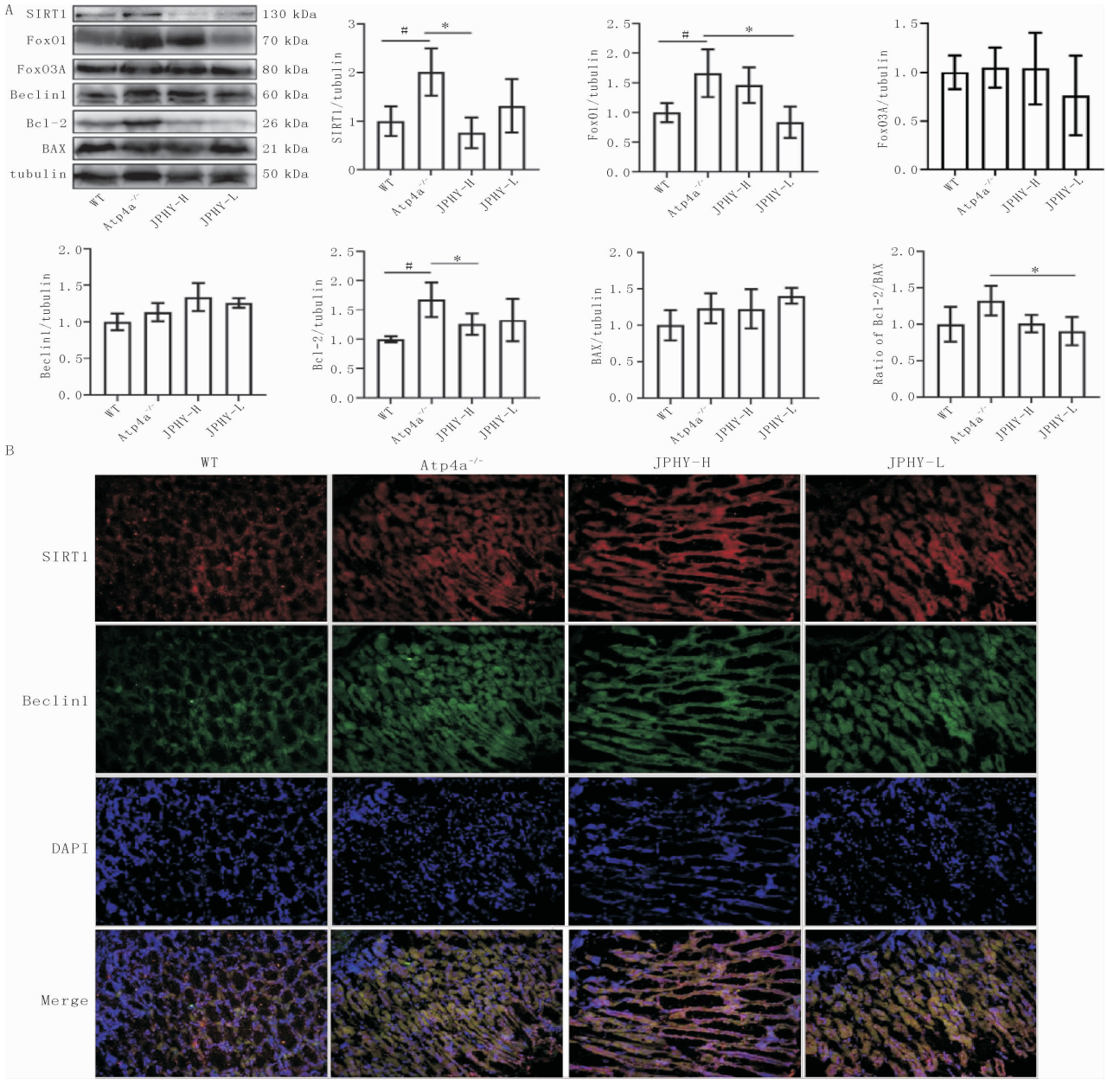
3.2　JPHY 对 Atp4a$^{-/-}$小鼠胃黏膜自噬蛋白的调节作用　Western blot 显示，与 WT 组比较，Atp4a$^{-/-}$组小鼠胃黏膜 SIRT1、FoxO1、Bcl－2 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 Atp4a$^{-/-}$组比较，JPHY－H 组小鼠胃黏膜 SIRT1、Bcl－2 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），JPHY－L 组小鼠胃黏膜 FoxO1、Bcl－2/Bax 水平降低（$P<0.05$），见图 2A。

免疫荧光染色显示，SIRT1 蛋白主要在细胞核中表达，Beclin1 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达。与 WT 组比较，Atp4a$^{-/-}$组小鼠胃组织 SIRT1、Beclin1 蛋白表达增加；与 Atp4a$^{-/-}$组比较，JPHY－H 组、JPHY－L 组小鼠胃组织 SIRT1、Beclin1 蛋白表达减少，见图 2B。



注：A：胃组织 HE 染色图；B：胃黏膜 MUC2 蛋白表达水平；与 WT 组比较，#$P<0.05$；与 Atp4a$^{-/-}$组比较，*$P<0.05$。

图 1　各组小鼠胃黏膜病理形态及 MUC2 蛋白表达水平比较



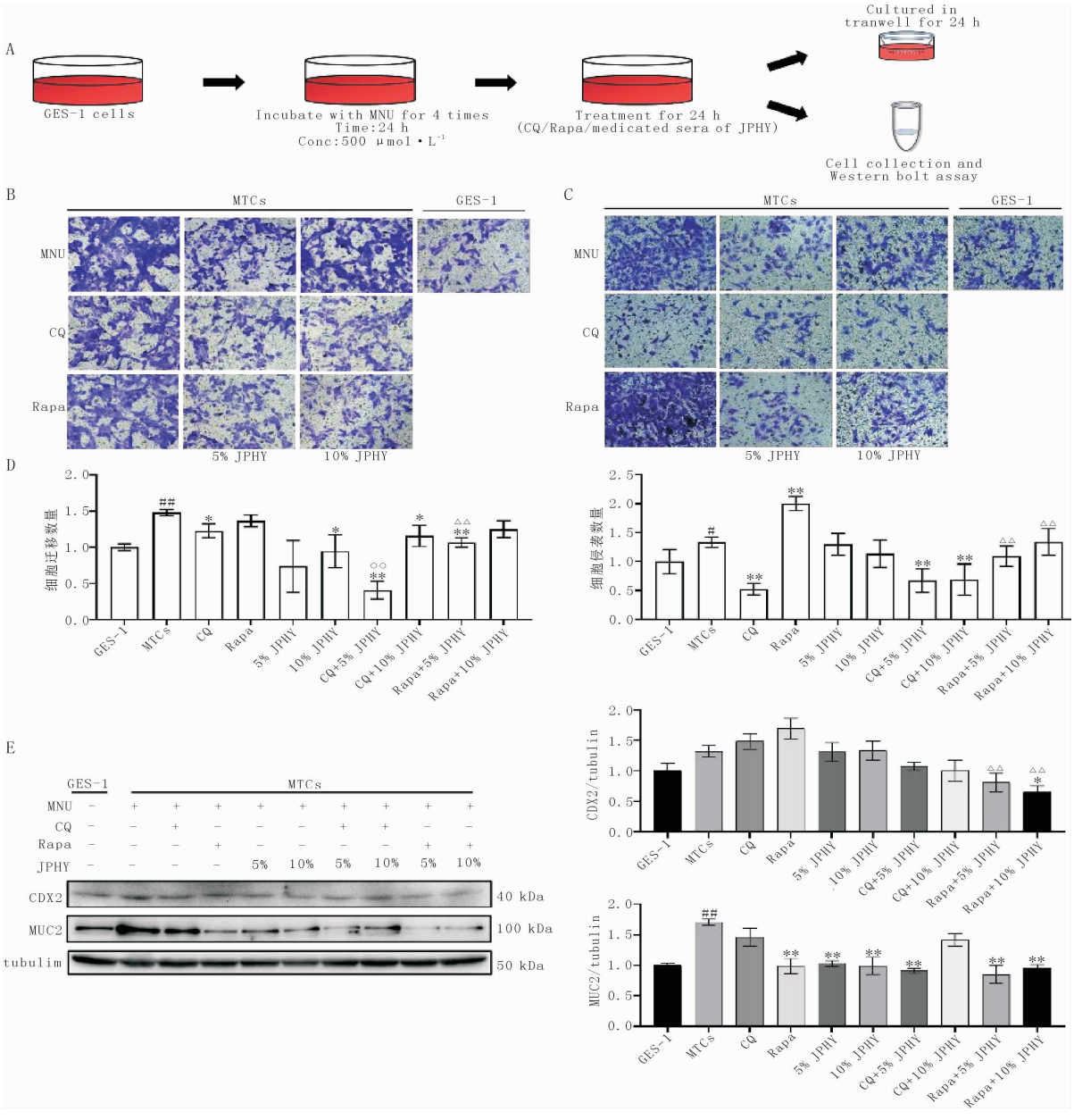
注：A：Western blot 法检测小鼠胃黏膜自噬相关蛋白表达；B：免疫荧光法检测小鼠胃组织 SIRT1、Beclin1 表达；与 WT 组比较，#$P<0.05$；与 Atp4a$^{-/-}$组比较，*$P<0.05$。

图 2　各组小鼠胃黏膜自噬相关蛋白表达水平比较

3.3　JPHY 对 MTCs 侵袭和迁移的调控作用　与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞迁移数量增加（$P<0.01$）。与 MTCs 组比较，CQ 组、10% JPHY 组、CQ＋5% JPHY 组、CQ＋10% JPHY 组、Rapa＋5% JPHY 组细胞迁移数量减少（$P<0.05$）。与 Rapa 组比较，Rapa＋5% JPHY 组细胞迁移数量减少（$P<0.01$）。与 CQ 组比较，CQ＋5% JPHY 组细胞迁移数量减少（$P<0.01$），见图 3B、3D。

与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞侵袭数量增加（$P<0.05$）。与 MTCs 组比较，CQ 组、CQ＋5% JPHY 组、CQ＋10% JPHY 组细胞侵袭数量减少（$P<0.01$），Rapa 组细胞侵袭数量增加（$P<0.01$）。与 Rapa 组比较，Rapa＋5% JPHY 组和 Rapa＋10% JPHY 组细胞侵袭数量减少（$P<0.01$），见图 3C、3D。

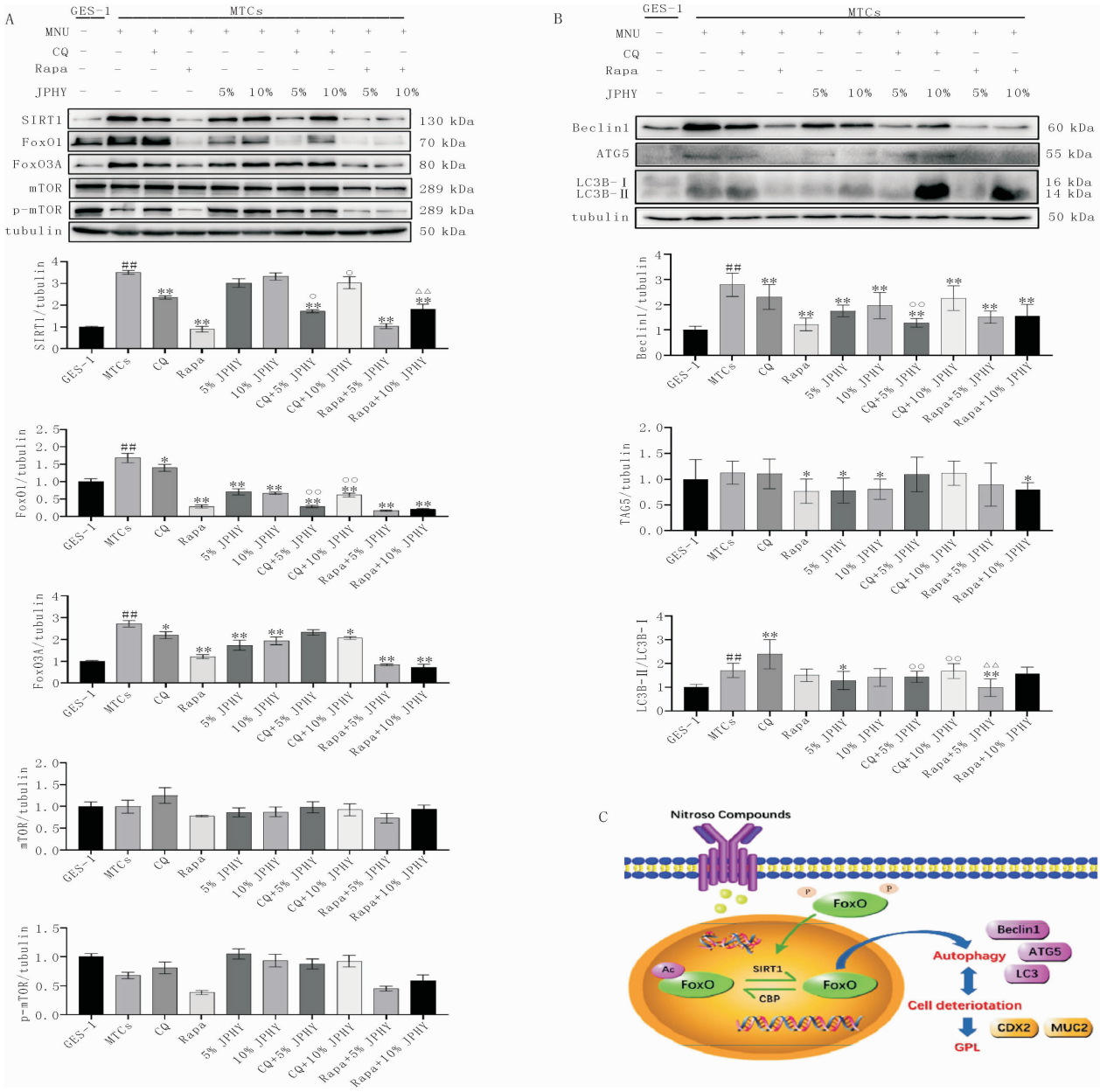
Western blot 显示，与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞 MUC2 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与 MTCs 组比较，Rapa 组、5% JPHY 组、10% JPHY 组、CQ＋5% JPHY 组、Rapa＋5% JPHY 组、Rapa＋10% JPHY 组细胞 MUC2 蛋白表达水平降低（$P<0.01$），见图 3E。



注：A：MTCs 造模及给药流程图；B：细胞迁移图；C：细胞侵袭图；D：细胞迁移和侵袭数量比较；E：Western blot 法检测细胞 MUC2、CDX2 蛋白表达水平；与 GES－1 组比较，##$P<0.01$，#$P<0.05$；与 MTCs 组比较，＊＊$P<0.01$，＊$P<0.05$；与 Rapa 组比较，△△$P<0.01$，△$P<0.05$；与 CQ 组比较，○○$P<0.01$，○$P<0.05$。

图 3　各组细胞侵袭与迁移能力及 CDX2、MUC2 蛋白表达水平比较

3.4　JPHY 对 MTCs 自噬蛋白表达的影响　与 GES－1 组比较，MTCs 组细胞 SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平升高（$P<0.01$）。与 MTCs 组比较，CQ 组细胞 SIRT1、FoxO1、FOXO3A、Beclin1 蛋白表达水平降低且 LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平升高（$P<0.05$）；Rapa 组细胞 SIRT1、FoxO1、FoxO3A、Beclin1、ATG5 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；5% JPHY 组细胞 FoxO1、FoxO3A、Beclin1、ATG5 及 LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平降低（$P<0.05$）；10% JPHY 组 FoxO1、FoxO3A、Beclin1、ATG5 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 Rapa 组比较，Rapa＋10% JPHY 组细胞 SIRT1 蛋白表达水平升高，Rapa＋5% JPHY 组细胞 LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平降低（$P<0.01$）。与 CQ 组比较，CQ＋5% JPHY 组细胞 SIRT1、FoxO1、Beclin1、LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平降低（$P<0.05$）；CQ＋10% JPHY 组细胞 FoxO1、LC3B－Ⅱ/LC3B－Ⅰ水平降低（$P<0.01$），SIRT1 蛋白表达水平升高（$P<0.05$），见图 4A、4B。



注：A、B：Western blot 法检测细胞自噬相关蛋白表达水平；C：SIRT1/FoxO1 自噬通路参与 GPL 恶变机制图；与 GES－1 组比较，##$P<0.01$，#$P<0.05$；与 MTCs 组比较，＊＊$P<0.01$，＊$P<0.05$；与 Rapa 组比较，△△$P<0.01$，△$P<0.05$；与 CQ 组比较，○○$P<0.01$，○$P<0.05$。

图 4　各组细胞自噬相关蛋白表达水平及 GPL 恶化的调控机制图

4　讨论

GPL 是胃癌发生的高危因素之一[17]。探索延缓、阻断甚至逆转 GPL 进展的策略，是降低胃癌发病率的关键。中医学不仅强调整体观念与辨证论治，而且注重疾病全过程的动态管理和多靶点干预，对 GPL 的防治具有不可替代的作用[18]。

Apt4a$^{-/-}$小鼠通过敲除 *Apt4a* 基因，导致胃黏膜壁细胞缺乏分泌微管和管状囊泡，壁细胞数量减少并伴随功能障碍，在 10 周龄时出现胃黏膜肠上皮化生等亚恶性病变，可较好地模拟 GPL 的病变过程[19]。病理染色结果显示，自发性 GPL 动物模型 Atp4a$^{-/-}$小鼠出现肠上皮化生、异型增生性病变，同时 MUC2 表达增加，证明小鼠模型构建成功。此外，在低剂量 MNU 反复刺激下诱导 GES－1 细胞，迁移和侵袭实验表明 MTCs 的转移活性增强，MUC2 蛋白表达增加，提示细胞发生恶性转化，模型构建成功。

在微环境和病理因素的调控下，SIRT1 参与肿瘤发生、能量稳态维持、自噬以及 DNA 损伤修复等重要细胞过程[20]。SIRT1 可以激活 AKT/mTOR 信号通路，进而调控关键的自噬调节因子 Beclin1[21]。本研究发现，Atp4a$^{-/-}$小鼠自噬相关蛋白如 SIRT1、FoxO1 和 Beclin1 表达增加，健脾化瘀解毒方可降低模型小鼠胃组织 SIRT1、FoxO1 和 Beclin1 自噬相关蛋白表达。由此提示，在 GPL 小鼠和细胞模型中，自噬被激活。Beclin1、ATG5 和 LC3 的水平可以共同反映自噬的程度。SIRT1 在细胞自噬、侵袭和迁移，甚至 GPL 的恶性转化中发挥作用。SIRT1 可降低 mTOR 活性并促进自噬活性，这与 FoxOs 有关。在细胞核中，FoxO1 和 FoxO3A 的转录活性被上游转录调节因子如 SIRT1 激活[22]。FoxOs 转录因子是自噬的关键调节因子，可以正向调节自噬，从而影响细胞生命活动过程[23]。此外，自噬与细胞凋亡之间存在着相互关联且动态平衡的关系[24]。抗凋亡蛋白 Bcl－2 与促凋亡蛋白 Bax 是凋亡家族的代表性蛋白，Bcl－2 与 Bax 的比例可以反映细胞凋亡程度[25]。据研究，FoxOs 可从增殖、自噬、侵袭、迁移等多方面促进胃癌的进展[26]。本研究发现，FoxO1 可被上游转录调节因子 SIRT1 激活，进而促进 GPL 的细胞凋亡。

机体稳态和快速适应环境变化是维持健康和生存的关键，反之则可能导致肿瘤的发生。这与中医调节身体平衡的理念不谋而合。从中医角度来看，GPL 主要表现为气滞、湿热、血瘀[27]。脾虚、血瘀、毒是其基本病机，其中“脾虚”为本，“血瘀”“毒”为靶，符合 GPL 患者“久病则虚瘀”的临床特点[28]。JPHY 方可改善 GPL 胃黏膜病理变化，减少体外和体内模型的发育异常细胞，这可能与调节自噬有关。本研究为 JPHY 在 GPL 转化关键阶段调节自噬的潜在作用提供了新思路。

参考文献：

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209－249.

[2] ZHAO M Y, WEN Y Q, YANG Y, et al. (－)－Asarinin alleviates gastric precancerous lesions by promoting mitochondrial ROS accumulation and inhibiting the STAT3 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155348.

[3] YIN J, YI J Y, YANG C, et al. Chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia induced by high－salt and N－methyl－N′－nitro－N－nitrosoguanidine intake in rats[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4): 315.

[4] CHAPELLE N, PERON M, MOSNIER J F, et al. Prevalence, characteristics and endoscopic management of gastric premalignant lesions in France[J]. Dig Dis, 2020, 38(4): 286－292.

[5] 辛彩虹，李峥，苏麒麟，等. 益气解毒活络方对糖尿病肾病大鼠 Sirt1－FoxO 通路及自噬的影响[J]. 中华中医药学刊，2023，41(10)：30－33，262.

[6] 姜花，沈延梅，马驯凯. 扶正解毒方对病毒性心肌炎大鼠氧化应激及 Sirt1/FoxO3a 通路的影响[J]. 中成药，2024，46(3)：992－997.

[7] ZHU M K, WEI C, WANG H J, et al. SIRT1 mediated gastric cancer progression under glucose deprivation through the FoxO1－Rab7－autophagy axis[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1175151.

[8] MAIESE K. Targeting the core of neurodegeneration: FoxO, mTOR, and SIRT1[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(3): 448－455.

[9] 晏玲，牛晓静，张利芳. 糖肾煎通过促进 SIRT1 介导的自噬对糖尿病肾病大鼠的治疗作用[J]. 山西医科大学学报，2022，53(2)：209－214.

[10] 朱海洋，孙会卿，张淑凤，等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究双氢青蒿素对人肝癌 SMMC－7721 细胞自噬的影响[J]. 中医学报，2022，37(4)：830－836.

[11] 邓琳，先梦麟，杨玉有，等. ATG5 通过细胞自噬调控Ⅱ型胶原表达的实验研究[J]. 陆军军医大学学报，2023，45(17)：1828－1837.

[12]NABAVI - RAD A, YADEGAR A, SADEGHI A, et al. The interaction between autophagy, Helicobacter pylori, and gut microbiota in gastric carcinogenesis[J]. Trends Microbiol, 2023, 31(10): 1024 - 1043.
[13]FERREIRA P M P, SOUSA R W R, FERREIRA J R O, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy - related mechanisms[J]. Pharmacol Res, 2021, 168: 105582.
[14]王雅雯,程亚楠,杨宾,等. 雷帕霉素上调人脐静脉内皮细胞自噬活性抑制细胞增殖[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 605 - 610.
[15]黎乐怡,卓俊城,谢凯枫,等. 健脾化瘀解毒方调控 PI3K/AKT/HIF - 1α 通路干预胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞自噬及凋亡[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1444 - 1451.
[16]曾晓会,陈世龙,欧阳亚楠,等. 健脾化瘀解毒法治疗胃癌前病变临床疗效的随机对照试验 Meta 分析[J]. 按摩与康复医学, 2022, 13(24): 89 - 96.
[17]盖佳桢,杨佩颖,刘添,等. 既病防变思想在胃癌癌前病变中的应用探析[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(7): 111 - 114.
[18]代露,张玉书,李吉彦,等. 经方治疗胃癌前病变研究进展[J]. 世界科学技术:中医药现代化, 2023, 25(5): 1554 - 1560.
[19]HONG X X, LI H W, LIN Y D, et al. Efficacy and potential therapeutic mechanism of Weiwei decoction on spasmolytic polypeptide - expressing metaplasia in Helicobacter pylori - infected and Atp4a - knockout mice[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117062.
[20]DING X Q, ZHU C Y, WANG W H, et al. SIRT1 is a regulator of autophagy: implications for the progression and treatment of myocardial ischemia - reperfusion[J]. Pharmacol Res, 2024, 199: 106957.
[21]WANG J L, SONG X Q, TAN G J, et al. NAD + improved experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating SIRT1 to inhibit PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Aging, 2021, 13(24): 25931 - 25943.
[22]LI X D, ZHAO C, MAO C Y, et al. Oleic and linoleic acids promote chondrocyte apoptosis by inhibiting autophagy via downregulation of SIRT1/FOXO1 signaling[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870(4): 167090.
[23]张仙宏,魏萌萌,袁冬冬,等. 转录因子 FOXOs 家族调控肿瘤生物学功能的研究进展[J]. 生理学报, 2022, 74(5): 843 - 855.
[24]吴巍芸,陈晓玲,何焕金,等. lncRNA DRAIC 通过调控自噬影响结直肠癌细胞增殖与凋亡[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(10): 1773 - 1780.
[25]DEVIS - JAUREGUI L, ERITJA N, DAVIS M L, et al. Autophagy in the physiological endometrium and cancer[J]. Autophagy, 2021, 17(5): 1077 - 1095.
[26]CHEN Y H, LI C L, CHEN W J, et al. Diverse roles of FOXO family members in gastric cancer[J]. World J Gastrointest Oncol, 2021, 13(10): 1367 - 1382.
[27]XU W C, LI B L, XU M C, et al. Traditional Chinese medicine for precancerous lesions of gastric cancer: a review[J]. Biomedecine Pharmacother, 2022, 146: 112542.
[28]YANG P H, YANG H M, ZHOU H L, et al. Weipiling decoction alleviates N - methyl - N - nitro - N′ - nitrosoguanidine - induced gastric precancerous lesions via NF - κB signalling pathway inhibition[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 104.

收稿日期:2024 - 11 - 15
作者简介:陈世龙(2000 -),男,河北邢台人,硕士研究生,主要从事中药药理学研究。
通信作者:曾晓会(1978 -),女,重庆人,医学博士,主任药师,主要从事胃癌前病变研究。E - mail: 277050896@qq.com

编辑:刘凯歌