

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.2402007

莪连颗粒调控 JAK2/STAT3 通路治疗慢性萎缩性胃炎的机制

贾庆玲¹, 易志荣², 蒋凯林¹, 顾志坚¹, 蔡 淦¹, 凌江红¹

1. 上海中医药大学附属曙光医院消化内科(上海 200021); 2. 广西医科大学第一附属医院中医科(广西 南宁 530021)

【摘要】 目的 通过转录组测序探讨莪连颗粒对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 Janus 激酶 2(JAK2)/信号转导和转录激活因子 3(STAT3)通路的影响,揭示莪连颗粒治疗 CAG 的机制。**方法** 18 只 6 周龄雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组、模型组和莪连颗粒组。除正常组外,模型组、莪连颗粒组采用 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG)综合法构建 CAG 大鼠模型,莪连颗粒组予莪连颗粒水溶液灌胃(剂量 3.24 g/kg),干预周期均为 40 周。苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠胃窦组织病理;转录组学方法进行建库测序及生物信息学分析;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测各组大鼠胃窦组织 JAK2、磷酸化 Janus 激酶 2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化信号转导和转录激活因子 3(p-STAT3)、细胞因子信号抑制因子 3(SOCS3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因蛋白(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达。**结果** 正常组大鼠胃黏膜上皮结构完整,腺体形态规则,排列整齐规律;模型组大鼠胃黏膜腺体萎缩,排列紊乱;莪连颗粒组大鼠胃黏膜腺体形态尚完整,排列尚规律。与正常组比较,模型组差异基因 3 595 个,其中上调 1 203 个,下调 2 392 个;与模型组比较,莪连颗粒组差异基因 561 个,其中上调 174 个,下调 387 个。京都基因和基因组百科全书数据库(KEGG)富集分析结果显示,莪连颗粒干预 CAG 作用机制可能与趋化因子信号传导途径、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)信号通路、癌症通路等密切相关。Western blot 提示,与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织 p-JAK2、p-STAT3、Bcl-2 蛋白表达显著升高($P<0.01$, $P<0.001$),SOCS3、Bax 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,莪连颗粒组大鼠胃窦组织 p-JAK2、p-STAT3、Bcl-2 蛋白表达显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),SOCS3、Bax 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。**结论** 本研究通过 MNNG 综合法成功复制 CAG 大鼠模型,借助转录组测序发现并经验证表明莪连颗粒可能通过抑制 JAK2/STAT3 通路治疗 CAG。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎;莪连颗粒;作用机制;大鼠模型;中药研究

Mechanism of Elian Granules modulating JAK2/STAT3 pathway for treatment of chronic atrophic gastritis

JIA Qingling¹, YI Zhirong², JIANG Kailin¹, GU Zhijian¹, CAI Gan¹, LING Jianghong¹

1. Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China; 2. Department of Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

Abstract: Objective To explore the effect of Elian Granules on the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) using transcriptomic sequencing, and to elucidate the mechanisms behind its therapeutic action.

Methods Eighteen 6-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats were acclimatized for one week and then divided into three groups: a normal group, a model group, and an Elian Granules group. Apart from the normal control group, the model group and the Elian Granules group were induced with chronic atrophic gastritis using the *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) synthesis method. The Elian Granules group was administered an oral gavage of Elian Granules solution at a dosage of 3.24 g/kg. The intervention lasted for 40 weeks. The pathological morphology of rat gastric tissues

was detected using Hematoxylin-Eosin (HE) staining; transcriptomics was performed for library sequencing and raw signal analysis, and JAK2, phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), STAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3), suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) protein expression were detected using Western blot in each group of rat gastric sinus tissues. **Results** The epithelial structure of the gastric mucosa was intact in the control group of rats,

[基金项目] 国家中医药管理局中医药循证能力建设项目(2019XZZX-XH013);国家中医药管理局国家中医优势专科项目(国中医药医政函[2024]90号,沪卫中管便函[2024]20号)

[作者简介] 贾庆玲,女,博士,医师,主要从事中医药防治脾胃病的临床与基础研究工作

[通信作者] 凌江红,主任医师,教授,博士研究生导师;

E-mail:459183870@qq.com

and the glands had normal morphology and were arranged in a neat and regular manner. In the model group, the gastric mucosal glands of rats were atrophied, with disorderly arrangement. In contrast, in the Elian Granules group, the glandular morphology was maintained relatively intact with regular arrangement. Compared to the normal group, the model group expressed 3,595 differentially regulated genes (DEGs), including 1,203 upregulated and 2,392 downregulated genes. Compared to the model group, the Elian Granules group exhibited 561 DEGs, including 174 upregulated and 387 downregulated genes. Enrichment analysis through Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) suggested that the mechanisms of CAG intervention by Elian Granules might be closely associated with signaling pathways such as chemokine signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, and oncogenic pathways. Western blot results indicated that compared to the control group, the model group had significantly higher expression of p-JAK2, p-STAT3, and Bcl-2 proteins ($P<0.01$, $P<0.001$), and significantly lower SOCS3 and Bax proteins ($P<0.01$). The Elian Granules group showed significant reductions in p-JAK2, p-STAT3, and Bcl-2 protein expressions compared to the model group ($P<0.01$, $P<0.001$), with a significant increase in SOCS3 and Bax protein expressions ($P<0.05$). **Conclusion** In this study, we successfully replicated the CAG rat model using the MNNG synthesis method, and with the help of transcriptomic sequencing and validation, we found and empirically demonstrated that Elian granules may be able to treat CAG by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway.

Keywords: chronic atrophic gastritis; Elian granules; mechanism of action; rat model; traditional Chinese herbal medicine research

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是一种临床常见的难治性疾病。“慢性浅表性胃炎→CAG→肠化→不典型增生→胃癌(gastric cancer, GC)”被认为是胃癌的经典演化模式,CAG伴肠化和异型增生者,GC发病率高达6%。CAG为胃“炎癌转化”的关键环节,有效防治CAG对于降低GC的发生率和病死率具有重要意义^[1-2]。目前,西医治疗CAG短期效果明显,但临床症状容易反复^[3]。中医治疗CAG有较好临床疗效。

慢性萎缩性胃炎可归属于中医“胃脘痛”“胃痞”范畴。首届全国名中医蔡淦教授认为此病具有本虚标实、虚实夹杂的特点,病变以脾胃虚弱为本,痰湿热毒、气滞血瘀为标,故在此基础上,创制了莪连颗粒,功在健脾益气、活血化瘀、清热解毒、祛湿化痰。该方在临床应用已30多年,取得了良好的疗效^[4-5]。早期动物实验研究^[6-8]显示,莪连颗粒能够逆转N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)造模大鼠胃黏膜上皮细胞的异型性。网络药理学研究^[9]揭示莪连颗粒可能通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等干预萎缩性胃炎癌前病变(PLGC)。

转录组学技术有助于研究基因组结构和功能,在建立应对疾病的分子生物标志物、药物作用靶点方面发挥着重要作用^[10-11]。Janus 激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路在CAG等消化系统疾病中发挥着重要作用^[12-14]。JAK2对STAT3表达发挥正反馈调节作用^[15]。STAT3是多条信号通路的交汇点,在多种恶性肿瘤的组织、细胞中存在着过度表达^[16]。研究^[17]发现,浅表性胃炎、CAG伴肠化、不典型增生和GC中磷酸化信号转导和转录激活因子3(p-STAT3)的阳性表达率呈逐步升高趋势。当JAK2/STAT3被过度激活时,其负反馈调节器细胞因子信号抑制因子3(SOCS3)表达增加^[18]。B淋巴细胞瘤-2基因蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)在CAG等消化道疾病发生、发展中扮演了重要角色^[19-22]。Bcl-2可与其他促凋亡蛋白形成异质二聚体,抑制细胞凋亡;Bax可以提高细胞凋

亡的敏感性,促进细胞凋亡。JAK2/STAT3信号通路激活后,p-STAT3可调控Bcl-2、Bax蛋白表达从而抑制细胞凋亡^[23-24]。

本研究通过MNNG综合法构建CAG大鼠模型,苏木精-伊红(HE)染色观察胃窦组织病理,转录组学法进行生物信息学分析,蛋白免疫印迹(Western blot)法检测胃窦组织JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS3、Bcl-2、Bax蛋白表达,以期进一步探讨莪连颗粒治疗CAG的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 18只6周龄无特定病原体(SPF)级雄性SD大鼠由广西医科大学动物实验中心提供。动物生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003。动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004。实验动物饲养于SPF级屏障环境中,相对湿度50%~70%,温度(24±1)℃,明暗交替周期12h/12h。本实验方案获得广西医科大学实验动物管理伦理委员会批准(伦理批准号:202007054)。

1.1.2 药物与试剂 莪连颗粒组成:莪术15g,丹参10g,当归10g,黄连3g,蒲公英30g,白花蛇舌草30g,党参10g,炒白术10g,甘草6g,半夏10g,陈皮6g,茯苓12g;由上海中医药大学附属曙光医院提供。

MNNG(批号:M0527),上海梯希爱化成工业发展有限公司;TRIzol、2'-脱氧尿苷5'-三磷酸盐(dUTP)溶液(批号分别为15596018、R0133),美国Thermo Fisher Scientific公司;逆转录酶(批号:1896649),美国Invitrogen公司;E.coli DNA聚合酶I、核糖核酸酶H(RNase H)、尿嘧啶DNA糖基化(UDG)酶、镁离子打断试剂盒(批号分别为m0209、m0297、m0280、E6150S),美国NEB公司;兔单克隆抗体JAK2、兔单克隆抗体p-JAK2、鼠单克隆抗体STAT3、兔单克隆抗体p-STAT3、兔单克隆抗体SOCS3、羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、马抗鼠HRP标记二抗(批号分别为3230、4406、

9139、9145、52113、7074、7076), 美国 CST 公司; 兔单克隆抗体 Bcl-2、兔单克隆抗体 Bax (批号分别为 T40056、T40051), 上海艾比玛特生物医药有限公司; 二辛可酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、组织细胞裂解液 (RIPA) (批号分别为 P0010、P0013B), 上海碧云天生物技术有限公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 凝胶快速制备试剂盒 (批号: PG113), 上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 生物组织包埋机、摊片机 (型号分别为 KD-BM、KD-P), 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; 轮转切片机 (型号: MICROM HM325), 德国 Thermo Fisher Microm 公司; 光学显微镜 (型号: ECLIPSE 80i), 日本 Nikon 公司; 电泳仪 (型号: 164-5050), 美国 BioRad 公司; 高灵敏电荷耦合器件成像仪 (Amersham ImageQuant, 型号: 800), 上海格莱赛生命科技有限公司; 紫外/核酸蛋白检测仪 (型号: ND-1000), 美国 NanoDrop 公司; 生物分析仪 (型号: Agilent 2100), 美国 Agilent 公司; 因美纳 (illumina) 基因测序仪 (型号: Novaseq 6000), 杭州联川生物技术股份有限公司; 冷冻高速离心机 (型号: Centrifuge5424), 德国 Eppendorf 公司; 摇床 (型号: TS-1000), 海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 分组与造模 18 只 6 周龄雄性 SD 大鼠普通饲料适应性喂养 1 周后, 随机分为正常组、模型组和莪连颗粒组, 每组 6 只。正常组给予 SPF 饲料、清洁饮水, 模型组、莪连颗粒组采用 MNNG 综合法构建大鼠模型^[9]: ① 200 mg/L MNNG 溶液锡箔纸包裹避光自由饮用, 每 24 h 更换 1 次; ② 喂食含体积分数为 0.03% 盐酸雷尼替丁的颗粒状 SPF 级大鼠饲料, 进食 2 d, 禁食 1 d; ③ 禁食当天下午予体积分数为 40% 的乙醇灌胃, 10 mL/kg 体质量。

1.3 干预 莪连颗粒组大鼠予莪连颗粒水溶液灌胃, 灌胃剂量 3.24 g/kg^[9], 每日 1 次, 每次每只 10 mL/kg。正常组、模型组大鼠均予等体积蒸馏水灌胃, 每日 1 次, 每次每只 10 mL/kg。各组干预周期均为 40 周。

各组大鼠末次干预后, 禁食、水 12 h。体积分数为 1.5% 的戊巴比妥钠 (3 mL/kg) 麻醉, 腹腔注射, 体积分数为 75% 的乙醇喷洒腹部后, 迅速开腹剖取全胃, 沿胃大弯侧剖开, 取胃窦部组织固定于 20 mL 多聚甲醛溶液 (40 g/L), 以备后续石蜡切片。剩余胃窦组织置于 -80 °C 冰箱, 以备后续检测。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠胃窦组织病理情况 采用 HE 染色检测大鼠胃窦组织病理形态。胃窦组织切片脱蜡, 苏木精染色 2 min 后予流水冲洗 5 min, 伊红染色 90 s 后予流水冲洗 10 min, 60 °C 烘箱 30 min, 中性树脂封片, 电子显微镜下观察各组大鼠胃窦组织病理。

1.4.2 RNA 提取与建库测序 对各组大鼠胃窦组织样品 RNA 分离纯化。总 RNA 量及纯度由 NanoDrop ND-1000 质控, 符合浓度 >50 μg/L、RIN 值 >7.0、total RNA >

1 μg 则开展下游实验。在高温条件下通过镁离子打断试剂盒对带有 PolyA 的 mRNA 进行片段化 (94 °C, 5 ~ 7 min) 处理, 片段化 RNA 在逆转录酶作用下合成 cDNA, 通过 E.coli DNA 聚合酶 I 与 RNase H 完成二链合成, 掺入 dUTP 溶液使双链 DNA 末端被补齐为平末端。随后, 通过在其两端各加入一个 A 碱基的方式使其与末端带有 T 碱基的接头连接。UDG 酶消化二链后通过 PCR (预变性 95 °C, 3 min, 98 °C 变性, 8 个循环, 各 15 s; 退火到 60 °C, 15 s; 72 °C, 延伸 30 s; 最后延伸 72 °C, 5 min) 生成文库 (片段大小 300 bp±50 bp), Illumina Novaseq™ 6000 完成双端测序 (模式 PE150)。

1.4.3 生物信息学分析 采用 fastQC (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 软件质控原始数据 (raw data), 参数为 $|\log_2 FC| \geq 1.5, P < 0.05$, 获得高质量的测序数据后通过 HISAT2 进行基因序列比对, 并进行基因表达定量、基因差异分析、富集分析等。

1.4.4 交集靶标富集分析 通过注释、可视化、集成探索 (DAVID) 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 对交集基因进行基因功能注释 (GO) 功能分析和京都基因和基因组百科全书数据库 (KEGG) 分析, 以 $P < 0.05$ 为显著功能和通路的临界值, 获取相应数据以绘图。

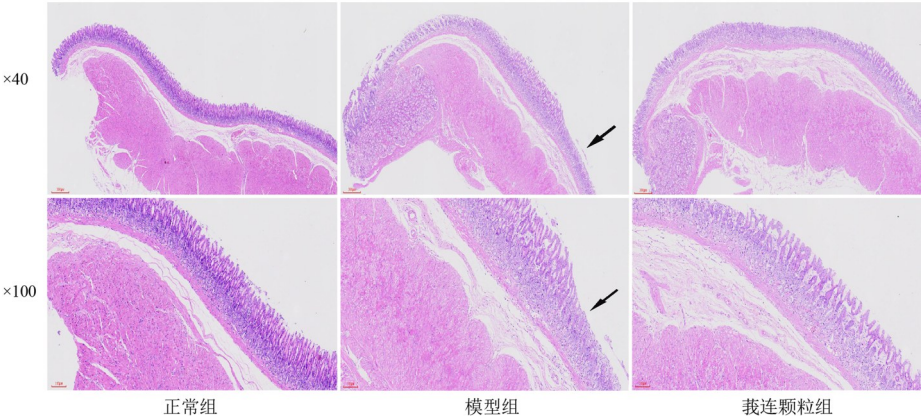
1.4.5 大鼠胃窦组织相关蛋白表达 采用 Western blot 法检测各组大鼠胃窦组织 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS3、Bcl-2、Bax 蛋白表达。提取大鼠胃窦组织后, 各组别依次加入 10 μL 蛋白, 80 V 电压 30 min 后转 120 V 电压 80 min, 湿转法 270 ~ 300 mA 转膜 90 ~ 120 min, 1 倍快速封闭液室温摇床 15 min 后加入一抗 (稀释比例均为 1:1 000), 4 °C 冰箱摇床孵育过夜, 封闭洗涤缓冲液 (TBST) 室温摇床漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的对应种属二抗 (稀释比例均为 1:1 000), 室温孵育 60 min, TBST 室温摇床漂洗 3 次, 每次 10 min, 超敏增强型化学发光 (ECL) 液显影, ImageJ 分析条带灰度值, 以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值反映目的蛋白相对水平。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 27.0 软件统计分析实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 采用 LSD 法组间两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 9 等软件绘图。

2 结果

2.1 对大鼠胃窦组织病理的影响 正常组大鼠胃黏膜上皮结构完整, 腺体形态规则, 排列整齐; 模型组大鼠胃黏膜腺体萎缩, 形态不规则, 排列紊乱; 莪连颗粒组大鼠胃黏膜腺体形态尚完整, 排列尚规律。见图 1。

2.2 样本相关性分析 通过 Pearson 相关系数确定样本间重复性情况以辅助排除离群样本, 结果显示正常组 1 和其他组相关性系数偏低, 这可能是个体差异造成



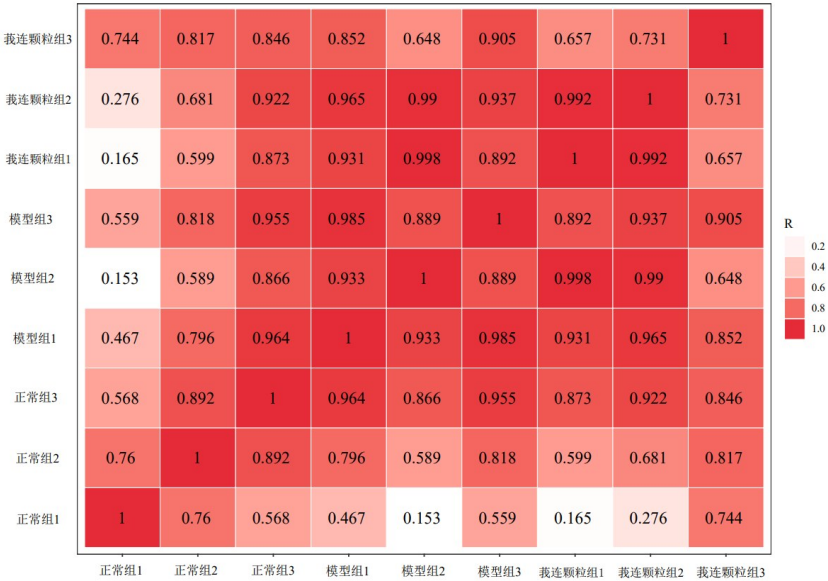
注:黑色箭头提示大鼠胃黏膜腺体萎缩。

图1 各组大鼠胃窦组织病理(苏木精-伊红染色,×40或×100)

的;但是经过造模后,模型组内相关性系数非常接近,表明造模成功;经莪连颗粒干预后,与同组其他样本比较,莪连颗粒组3和正常组相关性更高,表明其经莪连颗粒治疗后基本恢复正常水平。见图2。

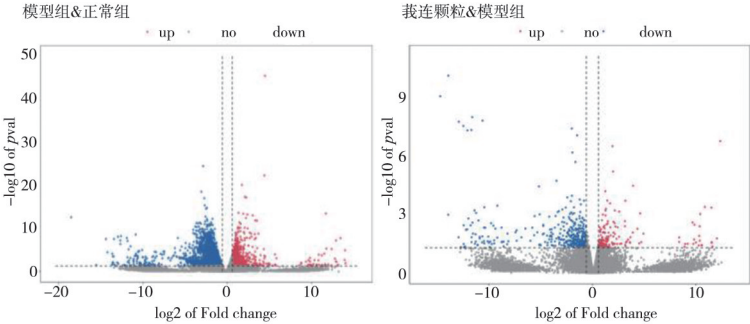
2.3 差异基因分析

2.3.1 差异基因数量 与正常组比较,模型组差异基因有3 595个,其中上调基因有1 203个,下调基因有2 392个;与模型组比较,莪连颗粒组差异基因有561个,其中上调基因有174个,下调基因有387个。见图3、图4。



注:颜色深浅代表相关性系数大小。越接近白色、越接近红色分别代表相关性越小、相关性越大。

图2 样本相关性分析

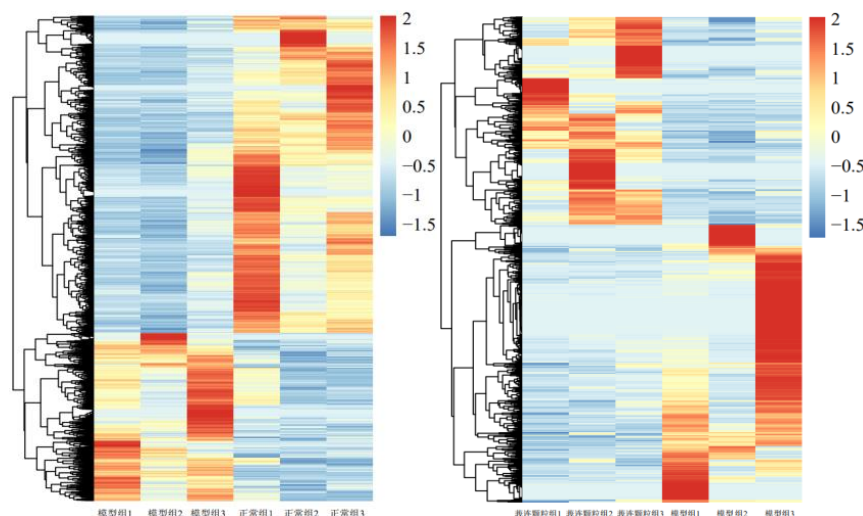


注:红色、蓝色、灰色分别代表上调、下调显著及非显著性差异的表达基因。

图3 差异基因火山图

2.3.2 GO 功能分析 GO 功能分析主要包括生物学过程(BP)、细胞成分(CC)、分子功能(MF)。其中,GO-BP

分类主要涉及炎症反应(inflammatory response)、免疫反应(immune response)、调节信号受体活性(regulation

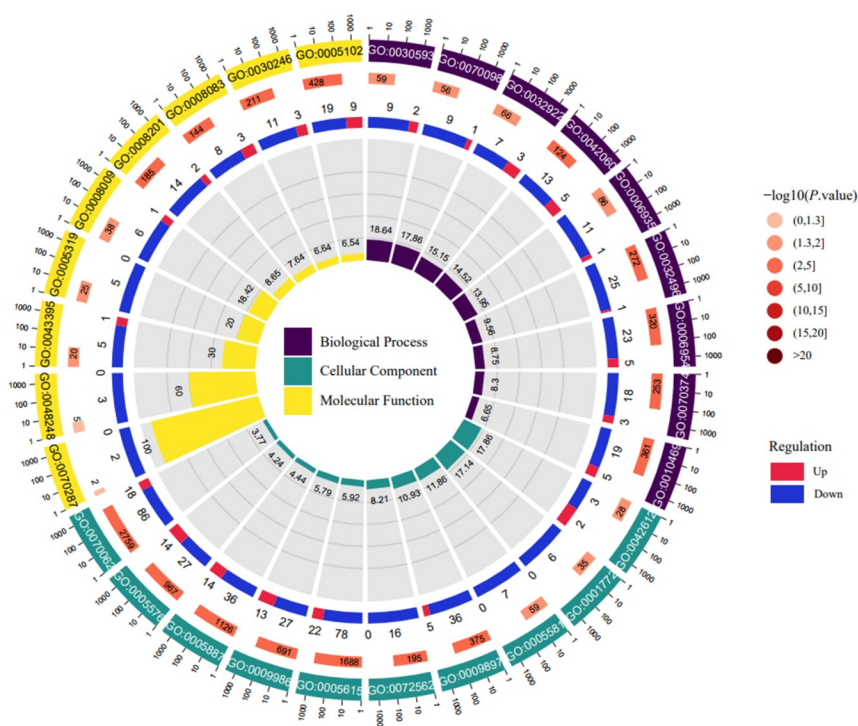


注:红色、蓝色分别表示高表达基因、低表达基因。

图4 差异基因聚类热图

of signaling receptor activity)等;GO-CC分类主要涉及细胞质(cytoplasm)、细胞核(nucleus)、细胞膜(membrane)等;GO-MF分类主要涉及蛋白质结合(protein binding)、

信号受体结合(signaling receptor binding)、ATP结合(ATP binding)等。见图5。



注:第1圈(从外到内)为基因功能注释(GO)条目;第2圈代表基因数目;第3圈红色、蓝色代表上、下调,数字代表基因数;第4圈表示富集因子的百分数。

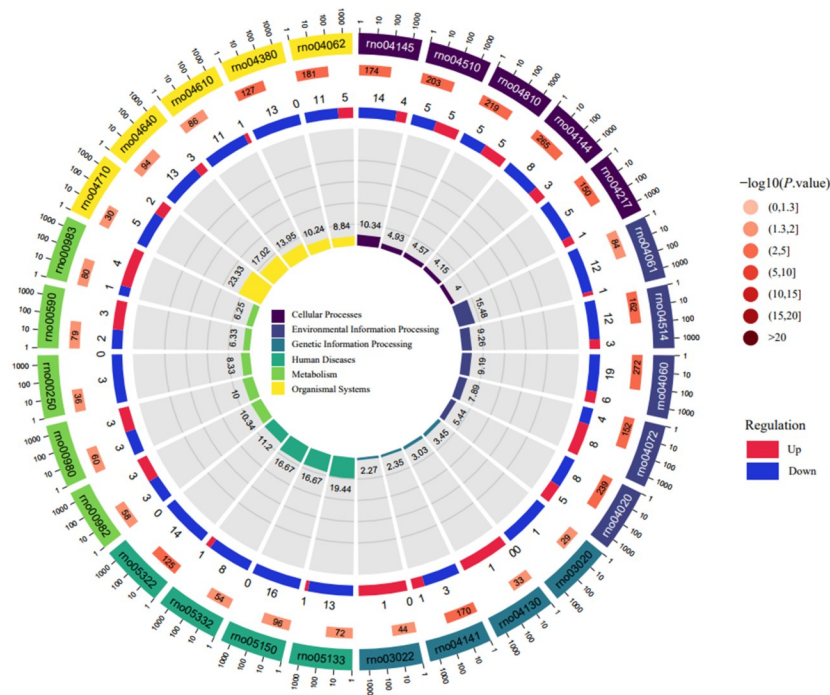
图5 GO富集圈图

2.3.3 KEGG 通路分析 KEGG通路分析分为以下6类:细胞过程主要包括吞噬体(rno04145)、内吞(rno04144)、焦点黏附(rno04510)等;环境信息处理主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用(rno04060)、PI3K-Akt 信号通路(rno04051)、细胞黏附分子(rno04514)等;遗传信息处理主要包括内质网中的蛋白质加工(rno04141)、核糖体(rno03010)、泛素介导的蛋白质降解(rno04120)等;人类疾病主要包括癌症通路(rno05200)、冠状病毒病-新冠状

病毒感染(rno05171)、金黄色葡萄球菌感染(rno05150)等;代谢主要包括代谢通路(rno01100)、药物代谢-细胞色素 P450(rno00982)、细胞色素 P450 对异种生物的代谢作用(rno00980)等;有机体系统主要包括造血细胞谱系(rno04640)、趋化因子信号传导途径(rno04062)、成骨细胞的分化(rno04380)等。见图6。

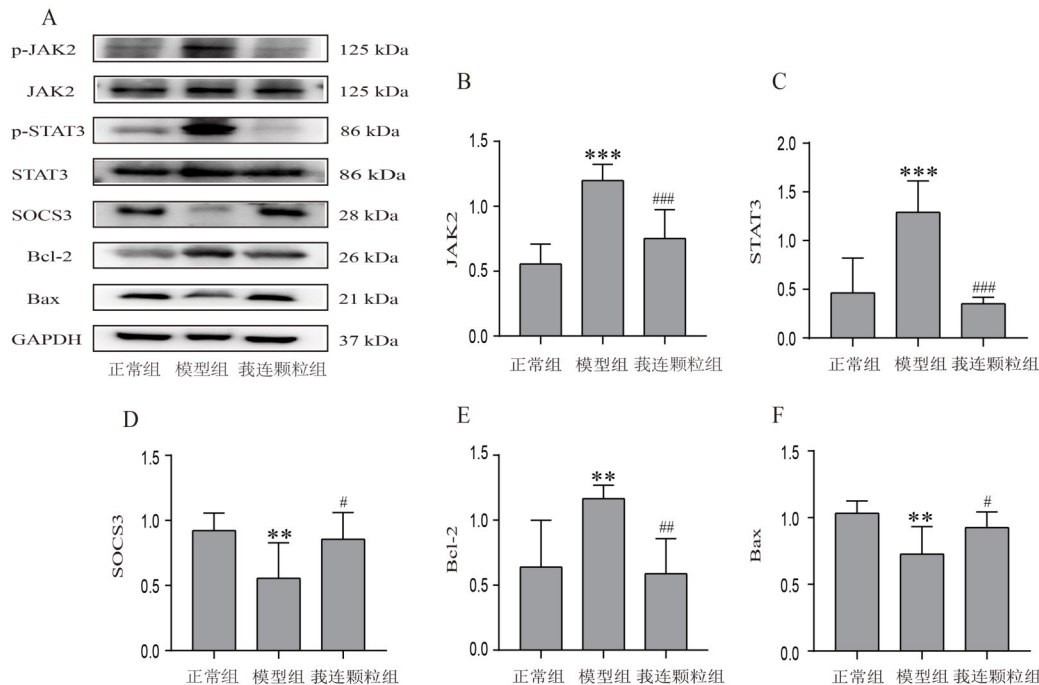
2.4 对大鼠胃窦组织相关蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 p-JAK2、p-STAT3、Bcl-2 蛋白表达显著升

高 ($P<0.01$, $P<0.001$), SOCS3、Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 莪连颗粒组 p-JAK2、p-STAT3、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$, $P<0.001$), SOCS3、Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。见图 7。



注: 第 1 圈 (从外到内) 为京都基因和基因组百科全书数据库 (KEGG) 通路; 第 2 圈代表基因数目; 第 3 圈红色、蓝色代表上、下调, 数字代表基因数; 第 4 圈表示富集因子的百分数。

图 6 KEGG 富集圈图



注: JAK2 为 Janus 激酶 2, STAT3 为信号转导和转录激活因子 3, p 为磷酸化, SOCS3 为细胞因子信号抑制因子 3, Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2 基因蛋白, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白。A 为各组相关蛋白电泳条带图, B ~ F 为各组相关蛋白相对表达量统计图。与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 7 各组大鼠胃窦组织 JAK2、STAT3、SOCS3、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

3 讨论

莪连颗粒由党参、莪术、白花蛇舌草、白术、茯苓、

蒲公英、黄连、当归、丹参、半夏、陈皮、甘草组成。其中, 党参、莪术、白花蛇舌草健脾、活血、清热解毒为主药; 白术、茯苓、蒲公英、黄连、当归和丹参为辅药; 佐以

半夏、陈皮、甘草。方以四君子汤益气健脾,党参易人参,意在久服缓图,脾气健运则气行湿化。佐以半夏、陈皮健脾燥湿化痰以绝痰湿之源。蒲公英、白花蛇舌草清热解毒,配伍四君子汤驱毒而不伤正。丹参、当归辅助莪术活血化瘀,有效改善胃黏膜血供。莪术得党参、白术补气之资,通络不损气,破血不伤血,丹参、白术得莪术之助,补气而不壅。全方虚实兼顾、攻补兼施、寒温并用、辛开苦降、气血同调,主治 CAG 伴肠化和(或)异型增生者。

CAG 动物模型是研究胃炎癌转化进程中的重要环节,目前 CAG 造模方法仍存在一定争议,也没有形成统一标准。本次实验采用 MNNG 自由饮+体积分数为 40% 的乙醇灌胃+饥饿失常+体积分数为 0.03% 的雷尼替丁饲料喂饲的 MNNG 综合法复制 CAG 模型,HE 染色结果显示模型组大鼠胃窦部黏膜腺体萎缩、形态不规则、排列紊乱,表明 CAG 模型复制成功。

借助转录组测序技术,我们对大鼠胃窦组织样本进行基因表达谱比较分析,并且鉴定了差异表达基因和功能性富集通路。首先,进行各样本基因表达值分布统计及样本相关性分析,了解样本间重复性,辅助排除了离群样本。随后,差异基因火山图以及聚类热图结果显示,较之正常组,模型组差异基因有 3 595 个,其中上调基因有 1 203 个,下调基因有 2 392 个;与模型组比较,莪连颗粒组差异基因有 561 个,其中上调基因有 174 个,下调基因有 387 个,提示莪连颗粒可能通过多靶点发挥治疗 CAG 作用。接下来,进行差异基因 GO 及 KEGG 分析。GO-BP 分类主要涉及炎症反应、免疫反应、调节信号受体活性等;GO-CC 分类主要涉及细胞质、细胞核、细胞膜等;GO-MF 分类主要涉及蛋白质结合、信号受体结合、ATP 结合等。KEGG 通路分析提示莪连颗粒抗 CAG 作用机制可能与炎症反应、信号转导、免疫应答等途径密切相关,与趋化因子信号传导途径(rno04062)、PI3K-Akt 信号通路(rno04051)、癌症通路(rno05200)等密切相关。其中,趋化因子信号传导途径(rno04062) *P* 值显著, JAK2/STAT3 通路在趋化因子信号传导途径(rno04062)中发挥着重要作用。因此,课题组选择 JAK2/STAT3 通路进行后续实验。

已有研究揭示, JAK2/STAT3 信号通路在 CAG、胃肠道肿瘤等消化系统疾病中发挥着重要作用^[25-26]。JAK2 是一种酪氨酸激酶,在生物体各组织内广泛表达,对 STAT3 发挥正反馈调节作用^[15]。激活 STAT3 可调节细胞增殖、凋亡、肿瘤侵袭等^[27]。若 STAT3 功能失调,可引起癌细胞增殖和凋亡进程受损^[28]。当 JAK2 受到细胞外信号刺激,可与细胞受体结合从而发生磷酸化,而后通过磷酸化转录因子 STAT3 将上游信号传递到细胞核,诱导炎症反应^[29]。然而, JAK2 抑制剂 AG490 可抑制 IL-6 诱导的 STAT3 表达^[30]。JAK2 抑制剂 ruxolitinib 亦可抑

制 JAK2 下游靶点 STAT3 和(或)SOCS3 表达^[31]。SOCS3 具有极强的蛋白抑制作用,是各种信号通路的抑制剂,被形象地称作“分子刹车”。研究^[18,32]表明,当 JAK2/STAT3 被过度激活时,它们的负反馈调节器 SOCS3 也会增加。而 SOCS3 启动子甲基化沉默则会使 JAK2/STAT3 通路高表达,从而导致细胞增殖,反之, SOCS3 高表达可抑制 JAK2/STAT3 通路,增加细胞凋亡^[33]。

细胞凋亡在维持组织平衡方面作用显著,包括 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 等在内的 Bcl-2 家族已被证明是调节细胞凋亡的重要因素。Bcl-2 蛋白可与其他促凋亡蛋白形成异质二聚体,抑制细胞凋亡; Bax 可以提高细胞凋亡的敏感性,促进细胞凋亡。随着“慢性浅表性胃炎→CAG→肠化→不典型增生→GC”病情进展, Bcl-2 蛋白阳性表达逐渐增高^[34]。正常胃黏膜 Bax 表达率高达 88.2%,随着疾病进展,其表达率逐渐降低,在胃癌中的表达率已低至 43.6%^[35]。CAG 大鼠 Bcl-2 蛋白表达升高,而 Bax 蛋白表达在一定程度上降低^[22]。在 GC 患者中,抗凋亡基因 *Bcl-2* 的上调可抵消 Bax 的促凋亡作用,导致凋亡相关的基因表达失调,从而促进细胞增殖^[36]。因此, Bcl-2 与 Bax 异常表达在介导细胞凋亡、参与胃黏膜萎缩中起着重要作用。STAT3 作为多条致癌信号通路的交汇基因,可介导下游信号分子 Bcl-2 参与细胞生长^[23,37]。JAK2/STAT3 信号通路被激活后, p-STAT3 调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达从而抑制细胞凋亡^[24,38]。

本研究结果表明,在 CAG 大鼠胃窦组织中, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达明显升高,表明 JAK2/STAT3 通路被激活, SOCS3 蛋白表达降低,导致 JAK2/STAT3 通路过度活化, Bcl-2 蛋白表达升高而 Bax 蛋白表达下降,凋亡受到抑制,促进了 CAG 的发生、发展。经莪连颗粒干预后,胃窦组织 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达明显降低,提示莪连颗粒可抑制 CAG 大鼠胃窦组织 JAK2、STAT3 磷酸化,从而抑制 JAK2/STAT3 通路激活, SOCS3 蛋白表达升高,进一步提示 JAK2/STAT3 通路的抑制, Bcl-2 蛋白表达显著降低而 Bax 蛋白表达显著升高,表明莪连颗粒可通过降低 JAK2/STAT3 通路下游信号因子 Bcl-2/Bax 的比值来发挥促凋亡作用。综上,莪连颗粒可能通过调控 JAK2/STAT3 通路治疗 CAG。

参考文献:

- [1] DE VRIES A C, VAN GRIEKEN N C, LOOMAN C W, et al. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4): 945-952.
- [2] YAMAGUCHI N, SAKAGUCHI T, TAIRA M, et al. Autophagy-related gene *ATG7* polymorphism could potentially serve as a biomarker of the progression of atrophic gastritis[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(2): 629.
- [3] 索卓群, 李慧臻, 马佳乐, 等. 中医治疗慢性萎缩性胃炎的实验机制研究进展[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32(7): 627-631, 638.

- [4] 顾志坚, 唐人彦, 林江, 等. 莪连颗粒治疗脾虚瘀热型慢性萎缩性胃炎伴肠化生临床随机对照研究[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(4): 40-43.
- [5] 丛军, 凌江红, 李莉, 等. 莪连颗粒治疗慢性萎缩性胃炎伴癌前病变的随机多中心双盲双模拟平行对照研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(5): 340-345.
- [6] 蔡淦, 王松坡, 窦丹波, 等. 乐胃煎对胃癌前病变大鼠胃粘膜上皮细胞动力学的影响[J]. 新中医, 2000, 32(2): 35-37.
- [7] 王松坡, 蔡淦, 窦丹波, 等. 乐胃煎对大鼠胃癌前病变胃粘膜异型性的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(3): 145-147.
- [8] 崔儒涛, 蔡淦, 程勇, 等. 乐胃煎对大鼠胃粘膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因的影响[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(2): 67-69.
- [9] YI Z R, JIA Q L, LIN Y L, et al. Mechanism of Elian granules in the treatment of precancerous lesions of gastric cancer in rats through the MAPK signalling pathway based on network pharmacology[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 87-95.
- [10] LAMAS A, REGAL P, VÁZQUEZ B, et al. Transcriptomics: A powerful tool to evaluate the behavior of foodborne pathogens in the food production chain[J]. Food Res Int, 2019, 125: 108543.
- [11] KASOJU N, WANG H, ZHANG B, et al. Transcriptomics of human multipotent mesenchymal stromal cells: Retrospective analysis and future prospects[J]. Biotechnol Adv, 2017, 35(4): 407-418.
- [12] 郑晓佳, 刘阳, 孙建慧, 等. 加味当归芍药散对慢性萎缩性胃炎大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(5): 580-587.
- [13] WU X, TAO P, ZHOU Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20741-20750.
- [14] WANG X, DAI C, YIN Y, et al. Blocking the JAK2/STAT3 and ERK pathways suppresses the proliferation of gastrointestinal cancers by inducing apoptosis[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22(6): 492-503.
- [15] LIANG X, WANG P, YANG C, et al. Galangin inhibits gastric cancer growth through enhancing STAT3 mediated ROS production[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 646628.
- [16] LIU Y, LIAO S, BENNETT S, et al. STAT3 and its targeting inhibitors in osteosarcoma[J]. Cell Prolif, 2021, 54(2): e12974.
- [17] 乔燕燕, 贾弋泽, 马秀梅, 等. JAK1、p-STAT3 和 bcl-2 在胃癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(8): 657-661.
- [18] WANG H, ZHAN M, LIU Q, et al. Glycochenodeoxycholate promotes the metastasis of gallbladder cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition via activation of SOCS3/JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 1615-1623.
- [19] WU Y, LI Y, JIN X M, et al. Effects of Granule Dendrobii on chronic atrophic gastritis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(32): 4668-4680.
- [20] QU Y, MA X, XUAN Z. Exploration of Tuina effect and mechanism in chronic atrophic gastritis rats[J]. Turk J Gastroenterol, 2022, 33(6): 477-484.
- [21] MIWA T, KANDA M, SHIMIZU D, et al. Hepatic metastasis of gastric cancer is associated with enhanced expression of ethanolamine kinase 2 via the p53-Bcl-2 intrinsic apoptosis pathway[J]. Br J Cancer, 2021, 124(8): 1449-1460.
- [22] ZHANG J, WANG H. Morroniside protects against chronic atrophic gastritis in rat via inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 6016-6023.
- [23] TANG H, GAMDZYK M, HUANG L, et al. Delayed recanalization after MCAO ameliorates ischemic stroke by inhibiting apoptosis via HGF/c-Met/STAT3/Bcl-2 pathway in rats[J]. Exp Neurol, 2020, 330: 113359.
- [24] LIANG Z W, GUO B F, LI Y, et al. Plasmid-based Stat3 siRNA delivered by hydroxyapatite nanoparticles suppresses mouse prostate tumour growth in vivo[J]. Asian J Androl, 2011, 13(3): 481-486.
- [25] COCKRUM C, KANESHIRO K R, RECHTSTEINER A, et al. A primer for generating and using transcriptome data and gene sets[J]. Development, 2020, 147(24): dev193854.
- [26] PIAO X, SUI X, LIU B, et al. Picroside II improves severe acute pancreatitis-induced hepatocellular injury in rats by affecting JAK2/STAT3 phosphorylation signaling[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 9945149.
- [27] KANDA N, SENO H, KONDA Y, et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4921-4929.
- [28] LIANG J R, YANG H. Ginkgolic Acid (GA) suppresses gastric cancer growth by inducing apoptosis and suppressing STAT3/JAK2 signaling regulated by ROS[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109585.
- [29] LI C H, XU L L, ZHAO J X, et al. CXCL16 upregulates RANKL expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the JAK2/STAT3 and p38/MAPK signaling pathway[J]. Inflamm Res, 2016, 65(3): 193-202.
- [30] DE VOS J, JOURDAN M, TARTE K, et al. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells[J]. Br J Haematol, 2000, 109(4): 823-828.
- [31] YANG X, JIA J, YU Z, et al. Inhibition of JAK2/STAT3/SOCS3 signaling attenuates atherosclerosis in rabbit[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2020, 20(1): 133.
- [32] KIM M, SONG K, KIM Y S. Alantolactone improves prolonged exposure of interleukin-6-induced skeletal muscle inflammation associated glucose intolerance and insulin resistance[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 405.
- [33] LIU Z, GAN L, ZHOU Z J, et al. SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte[J]. Immunobiology, 2015, 220(8): 947-953.
- [34] 刘爱群, 葛莲英, 罗元, 等. 胃癌变过程中 Hp 感染与凋亡基因 Bcl-2 表达相关性研究[J]. 广东医学, 2011, 32(4): 444-446.
- [35] 邓俭, 刘云鹏. Bcl-2 Bax 在胃癌中的研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(11): 101-102.
- [36] BARTCHEWSKY W Jr, MARTINI M R, SQUASSONI A C, et al. Effects of Helicobacter pylori infection on the expressions of Bax and Bcl-2 in patients with chronic gastritis and gastric cancer[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(1): 111-116.
- [37] LIU K, REN T, HUANG Y, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3015.
- [38] 孙绍娟. STAT3 及 Bcl-xL 与肺癌分化程度的研究[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(22): 117-118.

编辑:季春来

收稿日期:2024-02-02