

健脾养正消癥方调控 USP51 抑制低黏附性胃癌进展的机制

林思滢, 刘元杰, 殷艺, 刘沈林, 邹玺*
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨健脾养正消癥方(JPYZXZ)通过调控泛素化特异性蛋白酶51(USP51)治疗低黏附性胃癌(PC-GC)的作用机制。**方法:**体外实验:采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法和平板克隆形成实验检测不同浓度JPYZXZ(2,4,6 g·L⁻¹)对PC-GC细胞系细胞(MKN-45和HGC-27)活力及增殖能力的影响;通过划痕实验和Transwell实验评估细胞迁移能力。利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测细胞中USP51 mRNA及蛋白水平、锌指E盒结合同源异形盒1(ZEB1)和上皮间充质转化(EMT)标志物[上皮钙黏蛋白(E-cadherin)等]的表达。随后,构建USP51敲减(sh-USP51)和过表达(oe-USP51)的MKN-45及HGC-27稳转细胞株,通过划痕、Transwell实验和Western blot评估其迁移能力及EMT相关蛋白的变化。体内实验:建立MKN-45人胃癌裸鼠皮下移植瘤模型。将30只BALB/c裸鼠随机分为6组[空白(NC)、NC+JPYZXZ、sh-USP51、sh-USP51+JPYZXZ、oe-USP51、oe-USP51+JPYZXZ],每组5只。造模成功后,给药组给予JPYZXZ(30 g·kg⁻¹)灌胃干预28 d。期间监测裸鼠体质量及瘤体体积。采用Western blot和免疫组化(IHC)检测瘤组织USP51及EMT相关蛋白表达情况。**结果:**与空白组比较,JPYZXZ各组及5-FU组的MKN-45和HGC-27细胞克隆形成率、划痕愈合率及Transwell穿膜数显著降低($P<0.05$),USP51 mRNA及蛋白表达下降($P<0.05$),ZEB1和间质表型蛋白表达降低(如间质钙黏蛋白,波形蛋白)($P<0.05$),而上皮表型标志物E-cadherin表达明显升高($P<0.05$)。与正常组比较,sh-USP51组USP51的表达下降,oe-USP51组USP51表达明显升高($P<0.05$)。与NC组比较,USP51敲减后,胃癌细胞的迁移和增殖能力显著下降($P<0.01$),ZEB1和EMT相关蛋白的表达减少,E-cadherin表达明显升高($P<0.05$)。体内实验结果表明JPYZXZ干预能有效抑制裸鼠移植瘤生长($P<0.05$),并显著逆转瘤组织中EMT相关蛋白的异常表达($P<0.05$)。**结论:**JPYZXZ治疗低黏附胃癌的机制可能与调控USP51-ZEB1信号抑制EMT进程有关。

[关键词] 健脾养正消癥方;低黏附性胃癌;泛素化特异性蛋白酶51(USP51);锌指E盒结合同源异形盒1(ZEB1);上皮间充质转化

[中图分类号] R256;R735;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)11-0097-15

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251924

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250911.1619.011>

[网络出版日期] 2025-09-12 09:40:04



Mechanisms of Jianpi Yangzheng Xiaozheng Prescription in Regulating USP51 to Inhibit Progression of Poorly Cohesive Gastric Carcinoma

LIN Sitian, LIU Yuanjie, YIN Yi, LIU Shenlin, ZOU Xi*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms by which Jianpi Yangzheng Xiaozheng prescription (JPYZXZ) treats poorly cohesive gastric carcinoma (PC-GC) through regulation of ubiquitin-specific peptidase 51 (USP51). **Methods:** *In vitro* experiments: Cell viability and proliferation of PC-GC cell lines (MKN-45 and HGC-27) treated with different concentrations of JPYZXZ (2, 4, 6 g·L⁻¹) were assessed using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and colony formation assays. Cell migration was evaluated by wound healing (scratch) and Transwell assays. The mRNA and protein expression levels of USP51, zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related markers (e.g., E-cadherin) were detected by quantitative real-time PCR (Real-time PCR) and Western blot, respectively. Subsequently, stable MKN-45 and HGC-27 cell lines

[收稿日期] 2025-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973782);江苏省卫生健康委项目(ZD2022070);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX24_2223)

[第一作者] 林思滢,在读硕士,从事中医药防治肿瘤的临床研究,E-mail:759990548@qq.com

[通信作者] *邹玺,博士,主任中医师,从事中医药防治肿瘤的临床研究,E-mail:fsyy00670@njucm.edu.cn

with USP51 knockdown (sh-USP51) and overexpression (oe-USP51) were constructed. Their migration ability and EMT-related protein expression were further evaluated by scratch assay, Transwell assay, and Western blot. *In vivo* experiments: A subcutaneous xenograft model of MKN-45 human gastric cancer was established in BALB/c nude mice. Thirty mice were randomly divided into six groups (NC, NC + JPYZXZ, sh-USP51, sh-USP51 + JPYZXZ, oe-USP51, and oe-USP51 + JPYZXZ), with five mice in each group. After successful modeling, mice in the treatment groups were administered JPYZXZ (30 g·kg⁻¹) by gavage for 28 days. Body weight and tumor volume were monitored during the experiment. The expression levels of USP51 and EMT-related proteins in tumor tissues were detected by Western blot and immunohistochemistry (IHC). **Results:** Compared with the blank group, the colony formation rate, wound healing rate, and number of migrated cells in MKN-45 and HGC-27 cells were significantly reduced in all JPYZXZ groups and the 5-fluorouracil (5-FU) group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression levels of USP51 were decreased ($P<0.05$). The expression of ZEB1 and mesenchymal phenotype proteins (e.g., N-cadherin and vimentin) was reduced ($P<0.05$), whereas the expression of the epithelial marker E-cadherin was increased ($P<0.05$). Compared with the control group, USP51 expression was decreased in the sh-USP51 group and increased in the oe-USP51 group ($P<0.05$). Compared with the NC group, USP51 knockdown significantly reduced the migration and proliferation of gastric cancer cells ($P<0.01$), decreased the expression of ZEB1 and EMT-related proteins, and increased E-cadherin expression ($P<0.05$). *In vivo* results showed that JPYZXZ significantly inhibited the growth of xenograft tumors in nude mice ($P<0.05$) and markedly reversed the abnormal expression of EMT-related proteins in tumor tissues ($P<0.05$). **Conclusion:** The therapeutic mechanisms of JPYZXZ in PC-GC may be associated with inhibition of the EMT process via regulation of the USP51-ZEB1 signaling pathway.

[Keywords] Jianpi Yangzheng Xiaozheng prescription; poorly cohesive gastric carcinoma; ubiquitin-specific peptidase 51 (USP51); zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1); epithelial-mesenchymal transition (EMT)

胃癌(GC)是全球范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,2020年全球新发病例超100万,死亡近80万例^[1-2]。流行病学显示GC的总体发病率有所下降,但低黏附性胃癌(PC-GC)的相对发病率逐年上升^[3]。PC-GC是一种侵袭性强的GC亚型,以细胞间黏附差和弥漫性浸润生长为特征。这种独特的生物学行为导致其容易向深层播散、发生淋巴结和腹膜转移。因此,患者在诊断时已失去手术机会,导致整体预后不良^[4-5]。尽管GC的治疗近年来取得突破性进展,但PC-GC的治疗手段仍局限,缺乏针对这一特殊亚型的有效治疗策略。因此,探索新的潜在治疗靶点以提高PC-GC患者的生存率至关重要。中医药在胃癌治疗中具有“多成分-多靶点”协同作用的独特优势。全国名中医刘沈林教授通过记载分析胃癌病案,查阅总结医典,提出“脾虚瘀毒”胃癌病机制论并创制具有健脾养正,消癥散结功效的健脾养正消癥方(JPYZXZ)。该方由古方“滋生健脾丸”和“血癥丸”加减化裁而来,并对其不断进行优化。以JPYZXZ干预胃癌的多中心、大样本的临床研究表明,JPYZXZ联合化疗可显著延长晚期GC患者的生存期,降低术后复发转移风险,改善免疫功能和提高患者的生活质量^[6-7]。机制方面,JPYZXZ已被证实可以通过抑制上皮间质转化(EMT)来阻止GC进展^[8]。代通过调节糖酵解等关键通路,逆转胃癌细胞的异常代谢重编程等^[9]。然而JPYZXZ对PC-GC的治疗作用及其干预机制还不明确。现有研究表明PC-GC与细胞黏附分子异常及泛素-蛋白酶体系统调控因子有关^[10]。近年来,

去泛素化酶(DUBs)在肿瘤发生发展中的作用备受关注,特别是泛素化特异性蛋白酶51(USP51),其通过去除底物蛋白的泛素化修饰,影响蛋白质的稳定性和功能^[11]。锌指E盒结合同源异形盒1(ZEB1)作为肿瘤EMT的核心转录调控因子^[12],在肿瘤发生发展中发挥多方面的关键作用。研究显示,USP51与ZEB1在肿瘤微环境中存在直接调控关系,USP51通过去除ZEB1的泛素化修饰稳定其蛋白表达,促进EMT过程,最终增强肿瘤细胞的迁移和侵袭^[13]。本课题组前期研究发现USP51和ZEB1是GC患者预后不良的重要指标。USP51在胃癌组织中高表达,与患者生存期呈负相关。USP51调控ZEB1表达,促进PC-GC的间充质表型和转移潜力^[14]。目前,针对USP51的靶向抑制剂尚在研究中,中药复方对其表达和功能的调控作用尚未明确。基于上述背景,本研究拟探讨JPYZXZ对USP51的调控是否与阻断USP51介导的促癌蛋白ZEB1去泛素化及EMT过程有关。为验证这一假说,我们综合运用细胞分子生物学实验、慢病毒构建、裸鼠移植瘤模型,首次揭示JPYZXZ调控USP51-ZEB1轴在PC-GC中的作用机制,旨在为中医药治疗PC-GC提供新的理论依据和治疗策略。

1 材料

1.1 细胞株和实验动物 在RPMI-1640培养基中常规培养MKN-45细胞(人低黏附性胃癌细胞株)和HGC-27细胞(人弥漫型胃癌细胞株),均购自普诺赛生物科技公司,传代第3~5代后用于实验。健康SPF级BALB/c裸鼠30只,雄性,4周龄,购自斯贝福

(苏州) 生物技术有限公司, 实验动物许可证号 SYXK(苏)2022-0070。

1.2 伦理 本实验经江苏省中医院实验动物伦理委员会批准(实验动物伦理号 2024DW-102-01)。

1.3 药物 JPYZXZ 组成: 黄芪 60 g、党参 30 g、麸炒白术 10 g、当归 10 g、炒白芍 10 g、三棱 30 g、莪术 30 g、陈皮 6 g、木香 10 g、白花蛇舌草 15 g、石见穿 15 g、甘草 3 g。所有中药均购自江苏省中医院药房, 由南京中医药大学附属医院主管中药师刘志辉鉴定均为正品。将中药在双蒸水 1 000 mL 中浸泡 0.5 h, 大火煮沸, 再转文火煮 0.5 h, 倒出药液, 在药渣中加入双蒸水 1 000 mL 再次煎煮, 弃药渣, 收集 2 次药液混匀煎煮浓缩至约 1 000 mL。将煎煮冷却的药液分装于无菌玻璃瓶内, 密封后放入 -80 °C 冰箱中冷冻 24 h, 用液氮冷冻干燥机干燥药液, 待干燥完毕后, 即得 JPYZXZ 冻干粉, 平均得率为 17.5%, 收集冻干粉并密封。配制时称取 JPYZXZ 冻干粉 10 g, 加入 10 mL 含 3% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 震荡混匀, 配制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤器过滤除菌后, 存放在 -20 °C 冰箱备用。氟尿嘧啶注射液(5-FU)(天津金耀药业有限公司, 批号 2311151, 10 mL/0.25 g)。

1.4 试剂 RPMI-1640 培养基、双抗(Penicillin-Streptomycin)、胰酶消化液[含乙二胺四乙酸(EDTA)](美国 Gibco 公司, 批号分别为 6124537、2585645、2997933); 胎牛血清(中国四季青生物工程材料有限公司, 批号 23090702); 细胞增殖与活性检测(CCK-8)(美国 APEXBio 公司, 批号 K1018); 结晶紫染色液(中国碧云天生物技术有限公司, 批号 C0121-500mL); Omni-Easy™ 即用型二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、三色预染蛋白 Marker(上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号分别为 ZJ102、WJ106); USP51 慢病毒颗粒(过表达质粒、ShRNA 质粒及对照质粒)(中国吉凯基因公司, 批号分别为 GCPL5002762, GCPL5004184); 山羊抗兔、鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Li-Cor 公司, 批号分别为 D40416-05、D40508-15); 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国 Millipore 公司, 批号 0000318781); ZEB1(英国 Abcam 公司, 批号 ab124512); USP51(英国 Affinity 公司, 批号 DF9994); 基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)(美国 CST 公司, 批号分别为 40994S、5741S、13667S); β -肌动蛋白(β -actin)抗体、钙黏蛋白(E-cadherin)、间质钙黏蛋白(N-cadherin)(武汉三

鹰生物技术有限公司, 批号分别为 66009-1-Ig、20874-1-AP、22018-1-AP)。逆转录聚合酶链式反应(PCR)试剂、RNA 提取试剂、实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 批号分别为 R333-01、RC113-01、Q711-02)。

1.5 仪器 HERAcell1501 型 CO₂ 培养箱、-80 °C 超低温冰箱、Fresco™ 17 型低温冷冻离心机、7500 FAST ABI 型 Real-time PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司); AC2-4S1 型超净工作台(新加坡 ESCO 公司); 800TS-SN 型酶标仪(美国 Agilent 公司); ICC control pro 12 型恒温水浴锅(德国 IKA 公司); CKX51 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); LYOQUEST-55 型冷冻干燥器(西班牙 TELSTAR 公司); PowerPac™ Basic 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 双色型红外激光成像系统(美国 Li-Cor 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 人低黏附性胃癌细胞 MKN-45 和 HGC-27 均使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 细胞培养箱环境设定为 37 °C 恒温, 含 5% CO₂ 及完全饱和湿度。当观察到培养皿底细胞生长至致密单层时进行传代。

2.2 CCK-8 法和克隆形成检测 JPYZXZ 对胃癌细胞活力及增殖能力的影响 对处于对数生长期的人胃癌细胞株 MKN-45 和 HGC-27 进行消化、重选、计数。将细胞以每孔 10 000 个的密度均匀铺展于 96 孔板中, 边缘孔填充无菌磷酸盐缓冲液(PBS)。待细胞完全贴壁后, 分别用不同浓度(0、1、2、3、4、5、6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 JPYZXZ 处理, 每个浓度设置 3 个复孔, 并作用 24 h。之后, 移除孔内液体, 每孔加入 100 μL 的 10% CCK-8 工作液, 于 37 °C 下培养 1~2 h。最后, 将 96 孔板置于酶标仪中, 以 450 nm 波长测定各孔的吸光度值, 并据此计算细胞存活率。

选取对数生长期的 MKN-45 和 HGC-27 人胃癌细胞系, 经胰酶消化后制备单细胞悬液, 调整密度至 1 000 个细胞/孔进行均匀接种。待细胞在 6 孔板中完成贴壁后, 更换按照 2.2 结果分组的不同浓度含药新鲜完全培养基, 培养 24 h 后更换为完全培养基维持培养。每 48 h 观察细胞团形成情况并更换培养基, 待形成明显肉眼可见的细胞克隆集落后, 弃除上清, 使用 PBS 缓冲液小心清洗 2 次。采用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 结晶紫染色液染色 30 min, 双蒸水小心洗涤细胞 2 次, 自然风干后进行拍照。

2.3 细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 JPYZXZ 对胃癌细胞迁移能力的影响 在培养至对数生长期的胃癌细胞中加入胰蛋白酶消化,重悬和计数。用马克笔在6孔板板底均匀画3~5条水平直线,再将细胞以每孔 5×10^5 个的密度均匀铺展于6孔板中。显微镜下观察细胞生长至融合率达到90%以上时,用10 μ L 移液器枪头垂直于板底横线划痕。用PBS小心冲洗脱落的细胞,按照2.2项结果分组分别加入不同浓度的新鲜含药无血清培养基。分别于划痕后0、24、36 h至显微镜下观察并拍照。

在培养至对数生长期的胃癌细胞中加入胰蛋白酶消化,重悬和计数。将Transwell小室放于24孔板孔内,下室加入500 μ L含10%胎牛血清的完全培养基。用无血清培养基调整细胞悬液浓度至 $(2\sim 3) \times 10^5$ 个/mL,取100 μ L按照2.2分组结果不同浓度的含药无血清培养基及100 μ L细胞悬液混合后加入Transwell上室中。在培养箱中培养24 h后弃去上室液体,取出Transwell小室,PBS小心清洗,用4%多聚甲醛固定15 min,PBS清洗2遍,结晶紫染液染色20 min,PBS小心清洗。用棉签将上室未迁移的细胞轻轻擦除,于通风处晾干并拍照。

2.4 Real-time PCR 检测 USP51 mRNA 表达 按2.2结果分组,加入不同浓度的JPYZXZ干预48 h,收集各组细胞。采用Real-time PCR法检测MKN-45、HGC-27细胞中USP51 mRNA的表达水平,按照说明书提取总RNA,检测RNA纯度后逆转录为cDNA,然后以cDNA为模板进行Real-time PCR扩增目的基因。参考SYBR Green说明书的扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火与延伸30 s,扩增设定为40个循环。以 β -actin作为Real-time PCR的内参基因,设计USP51引物。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算USP51的相对表达水平,重复3次。引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CTCGCCTTGGCCGATCC	201
	下游 ATCCTTCTGACCCATGCC	
USP51	上游 GAGGTCGAGTTTGGTCAGGG	113
	下游 CCACTCCAAACGAAACGCTG	

2.5 Western blot 检测 EMT 相关蛋白及 USP51/ZEB1 信号通路蛋白表达水平 在提取细胞蛋白时,

首先对MKN-45和HGC-27细胞进行24 h的药物处理,随后加入适当的裂解液并进行超声波裂解;而在提取动物蛋白时,将肿瘤组织剪碎,转移到离心管中,加入裂解液后使用匀浆器进行匀浆处理。接着在4 $^{\circ}$ C条件下进行提取蛋白,并利用BCA法测定蛋白浓度。之后,将上清液按比例混合上样缓冲液,并在100 $^{\circ}$ C下煮沸10 min。将处理好的蛋白样品上样,依次执行电泳和转膜操作。转膜完成后,将PVDF膜置于快速封闭液中,室温下封闭30 min。根据抗体说明书进行一抗的稀释,将PVDF膜浸入稀释后的一抗溶液(1:1 000),并置于4 $^{\circ}$ C环境下孵育过夜。使用TBST缓冲液洗涤膜3次,每次10 min;再将膜放入相应的二抗溶液(1:50 000)中,在室温下摇床孵育1 h。最后进行曝光和显影。

2.6 建立 USP51 过表达及敲减的胃癌稳转细胞株

在培养至对数生长期的胃癌细胞中加入胰蛋白酶消化,重悬和计数。根据细胞计数结果调整细胞悬液密度至约 3×10^4 个/mL,将制备好的细胞悬液均匀铺于12孔板中,培养24 h。根据预实验结果选择最佳感染复数(MOI)为10,由此计算出shRNA-USP51质粒(sh-USP51)、过表达质粒(oe-USP51)和对照非靶向质粒(NC)所需体积。按照GeneChem(中国上海)提供慢病毒转染说明书,将感染增强液加入无双抗完全培养基。弃去上清,加入含感染增强液的无青-链霉素完全培养基,并分别加入对应sh-USP51、oe-USP51及NC病毒量。慢病毒转染24 h后,撤出含慢病毒培养基,加入普通新鲜完全培养基,继续培养24 h。加入嘌呤霉素筛选未转染成功不含绿色荧光蛋白(GFP)抗性的细胞。倒置荧光显微镜下观察荧光强度。

2.7 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 BALB/c裸鼠在适应性喂养3 d后,将慢病毒成功转染构建的sh-USP51、oe-USP51和NC稳转MKN-45细胞(4×10^6 个细胞/小鼠)皮下注射至右腋窝区域^[15]。当皮下观察到直径8~10 mm的肿瘤时,提示造模成功。成瘤后的裸鼠分为NC组、NC+JPYZXZ组、sh-USP51组、sh-USP51+JPYZXZ组、oe-USP51组、oe-USP51+JPYZXZ组。参考《中国动物实验信息网》,依照“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”中的比值为0.002 6^[16],JPYZXZ人日用剂量231 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。小鼠实验用药等效剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)=人日用剂量 $\times 0.002 6/0.02$ (小鼠体质量)($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。计算小鼠实验用药为 $231 \times 0.002 6/0.02 = 30.03(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ 。据此,给药组JPYZXZ中剂量以

30 g·kg⁻¹灌胃,1次/d。给药当天用游尺测量腋下肿瘤大小,并计算瘤体积。此后每隔2 d进行称质量和肿瘤大小测量。瘤体积计算公式=长径×短径²/2。

2.8 免疫组化检测动物瘤体组织EMT相关蛋白及USP51、ZEB1表达情况 首先,将瘤体组织经4%多聚甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,制备4~5 μm切片。切片经脱蜡、水化后,采用柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)或EDTA缓冲液(pH 9.0)进行高温高压抗原修复,以充分暴露抗原表位;随后用3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性10 min,5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭30 min以减少非特异性结合。一抗孵育采用经预实验验证的兔抗E-cadherin(1:200)、鼠抗N-cadherin(1:300)、兔抗Vimentin(1:400)、兔抗USP51(1:500)及兔抗ZEB1(1:300)抗体,4℃过夜;阴性对照以PBS替代一抗或使用同型免疫球蛋白(Ig)G。次日切片经PBS洗涤后,滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(抗兔/鼠IgG,1:200)室温孵育1 h,使用二氨基联苯胺(DAB)显色液显示染色结果,同时苏木素重新染色细胞核。载玻片脱水和封片后,在显微镜下成像。

2.9 统计学分析 Western blot结果采用Image Studio软件分析灰度值,划痕实验面积、Transwell实验细胞数目、荧光划痕实验划痕荧光强度变化、免疫组化图片采用Image J软件分析,数据采用Graph Pad Prism8.0软件分析。计数资料组间比较行χ²检验,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本t检验,采用单因素方差分析进行多组之间的比较。检验

水准=0.05,若P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

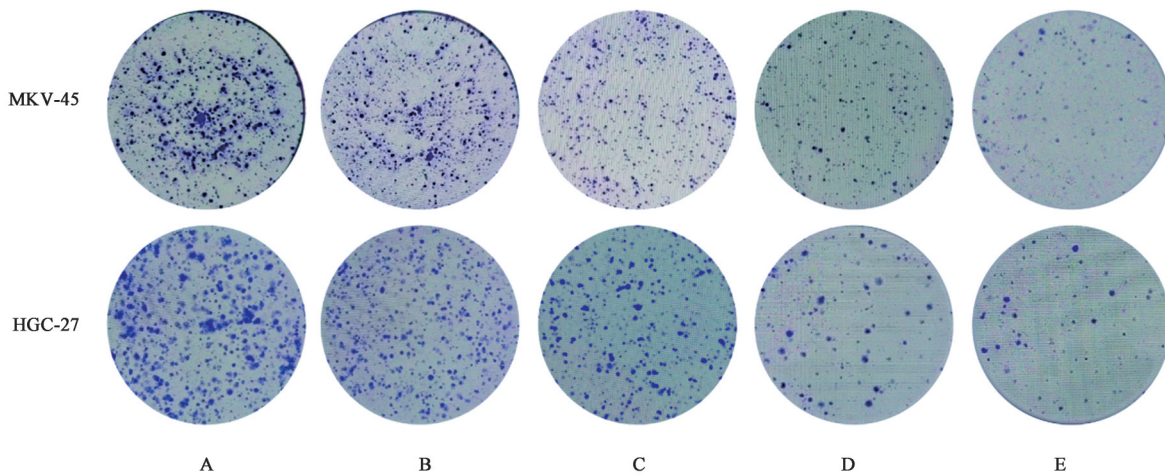
3.1 JPYZXZ对胃癌细胞MKN-45和HGC-27增殖能力的影响 空白组比较,JPYZXZ各组明显抑制MKN-45和HGC-27细胞的活力并呈浓度依赖性(P<0.05)。见表2。JPYZXZ作用于MKN-45和HGC-27细胞24 h的半抑制浓度(IC₅₀)值分别为4.659、4.145 g·L⁻¹,因此后续实验以2、4、6 g·L⁻¹为JPYZXZ低(JPYZXZ-L)、中(JPYZXZ-M)、高(JPYZXZ-H)质量浓度分组。平板克隆形成实验结果显示,与空白组比较,JPYZXZ各组对胃癌细胞增殖能力产生抑制作用(图1),其中JPYZXZ-H组的抑制作用最为显著,与阳性对照药5-FU组的抑制效果相近。

表2 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of JPYZXZ on cell viability of MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞活力/%	
		MKN-45	HGC-27
空白组		100.00±1.18	100.00±2.20
JPYZXZ组	1	94.11±2.74 ¹⁾	92.41±1.63 ²⁾
	2	85.21±2.26 ²⁾	79.99±1.25 ²⁾
	3	77.90±0.65 ²⁾	62.18±3.05 ²⁾
	4	67.30±3.64 ²⁾	55.49±2.51 ²⁾
	5	51.17±2.15 ²⁾	44.42±2.41 ²⁾
	6	21.38±1.49 ²⁾	28.40±1.43 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01



注:A.空白组;B.JPYZXZ-L组;C.JPYZXZ-M组;D.JPYZXZ-H组;E.5-FU组(图2-图4、图6同)

图1 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27细胞增殖能力的影响

Fig. 1 Effect of JPYZXZ on proliferation of MKN-45 and HGC-27 cells

3.2 JPYZXZ对胃癌细胞MKN-45和HGC-27迁移能力的影响 与空白组比较,JPYZXZ各组及5-FU组

胃癌细胞的迁移能力显著减弱(P<0.01),在6 g·L⁻¹的干预下抑制作用尤为明显,见图2、表3。Transwell实

验的结果显示,与空白组比较,MKN-45、HGC-27细胞在JPYZXZ干预24 h后穿膜细胞显著减少($P<0.01$),

见图3、表4。这些结果表明JPYZXZ可以显著抑制MKN-45、HGC-27细胞的迁移和侵袭($P<0.01$)。

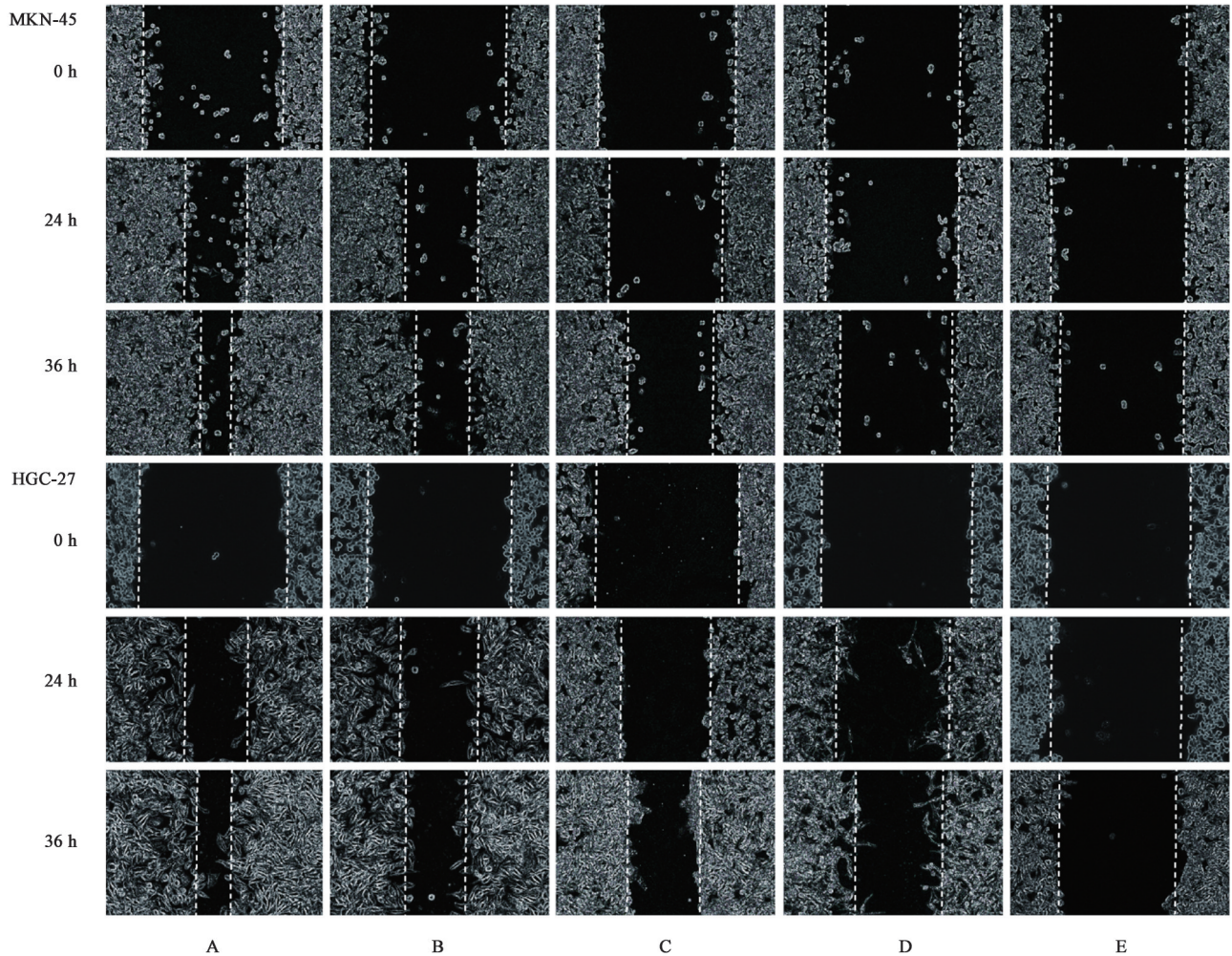


图2 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27迁移能力的影响($\times 20$)

Fig. 2 Effect of JPYZXZ on MKN-45 and HGC-27 migratory capacity ($\times 20$)

表3 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27迁移能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of JPYZXZ on MKN-45 and HGC-27 cell migration capabilities ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞迁移率/%	
			24 h	36 h
MKN-45	空白组		60.93 \pm 2.01	69.91 \pm 0.52
	JPYZXZ组	2	44.23 \pm 0.71 ²⁾	55.99 \pm 1.42 ²⁾
		4	38.90 \pm 1.41 ²⁾	44.46 \pm 0.58 ²⁾
		6	18.78 \pm 1.78 ²⁾	24.75 \pm 1.38 ²⁾
5-FU组	0.5	10.91 \pm 1.58 ²⁾	12.75 \pm 1.66 ²⁾	
HGC-27	空白组		62.69 \pm 0.88	77.58 \pm 1.62
	JPYZXZ组	2	49.07 \pm 0.30 ²⁾	60.14 \pm 0.12 ²⁾
		4	37.52 \pm 2.17 ²⁾	55.40 \pm 4.36 ²⁾
		6	20.70 \pm 2.10 ²⁾	42.90 \pm 1.23 ²⁾
5-FU组	0.5	9.43 \pm 1.09 ²⁾	20.66 \pm 2.30 ²⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表4-表6同)

3.3 JPYZXZ对USP51 mRNA的表达影响

MKN-45和HGC-27细胞中USP51 mRNA高表达,加入JPYZXZ后,随着药物浓度升高,USP51 mRNA表达下降。与空白组比较,JPYZXZ各质量浓度组培养液中USP51 mRNA表达均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),表明JPYZXZ可以下调USP51 mRNA水平。见表5。

3.4 JPYZXZ对MKN-45和HGC-27细胞EMT相关蛋白表达的影响

与空白组比较,JPYZXZ干预组和5-FU组中EMT相关蛋白N-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-2表达均明显下降,而E-cadherin的表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),提示JPYZXZ可以逆转低黏附性胃癌EMT过程。见图4、表6。

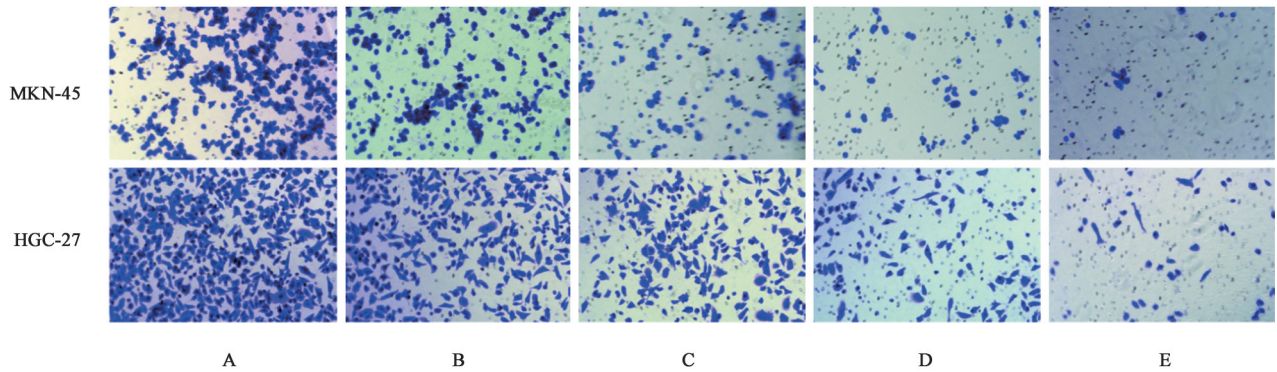


图3 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27侵袭能力的影响(×20)

Fig. 3 Effect of JPYZXZ on invasion capabilities of MKN-45 and HGC-27 cells (×20)

表4 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of JPYZXZ on invasion ability of MKN-45 and HGC-27 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	迁移细胞数/个
MKN-45	空白组		332.30±10.12
	JPYZXZ组	2	225.00±18.08 ²⁾
		4	113.30±12.01 ²⁾
		6	67.67±10.26 ²⁾
	5-FU组	0.5	28.33±9.50 ²⁾
HGC-27	空白组		509.70±23.86
	JPYZXZ组	2	319.70±4.933 ²⁾
		4	231.00±18.52 ²⁾
		6	105.70±14.57 ²⁾
	5-FU组	0.5	56.33±12.06 ²⁾

表5 JPYZXZ对MKN-45和HGC-27细胞USP51 mRNA的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of JPYZXZ on USP51 mRNA in MKN-45 and HGC-27 Cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	USP51 mRNA	
		MKN-45	HGC-27
空白组		1.02±0.14	1.01±0.03
JPYZXZ组	2	0.59±0.23 ¹⁾	0.47±0.17 ¹⁾
	4	0.41±0.16 ²⁾	0.39±0.19 ¹⁾
	6	0.17±0.07 ²⁾	0.23±0.30 ²⁾
5-FU组	0.5	0.10±0.02 ²⁾	0.19±0.31 ²⁾

3.5 USP51、ZEB1蛋白在不同细胞系的表达水平及JPYZXZ对MKN-45和HGC-27细胞中USP51/ZEB1蛋白表达的影响 与HGC-27组比较, MKN-45中USP51、ZEB1表达水平显著升高($P<0.01$)。给药不同浓度后对USP51/ZEB1蛋白进行检测,结果显示,与空白组比较,JPYZXZ-L、JPYZXZ-M、JPYZXZ-H组USP51、ZEB1表达明显

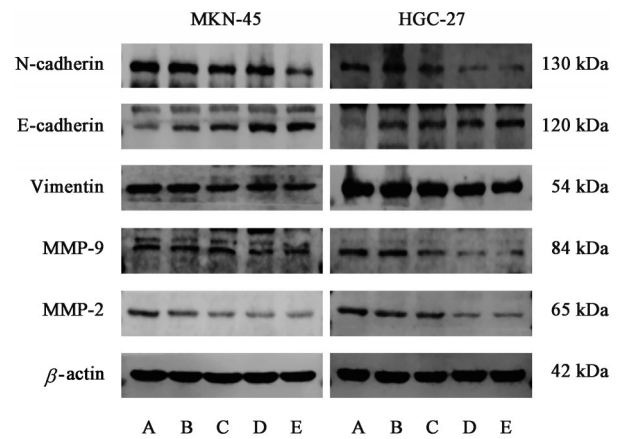


图4 MKN-45、HGC-27细胞EMT相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of EMT-related proteins in MKN-45 and HGC-27 cell

下降($P<0.05, P<0.01$)。见图5、表7及图6、表8。

3.6 USP51转染效率验证 成功转染sh-USP51、oe-USP51及NC质粒后的胃癌细胞表达GFP,倒置荧光显微镜下观察到细胞带有绿色荧光,见图7。与正常组比较,sh-USP51组蛋白表达明显下降($P<0.05, P<0.01$),oe-USP51组明显上升($P<0.05, P<0.01$)。见图8、表9。

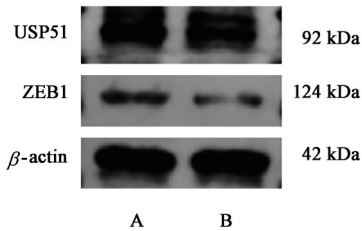
3.7 JPYZXZ通过调控USP51抑制胃癌细胞的迁移和侵袭 通过细胞划痕实验及Transwell实验评估JPYZXZ干预前后各组胃癌细胞迁移和侵袭能力的变化。与NC组比较,USP51敲减后,各胃癌细胞系的迁移和侵袭能力显著下降($P<0.01$),过表达组细胞的迁移和侵袭能力显著增强($P<0.01$),见图9、图10、表10、表11。加入JPYZXZ处理后,胃癌细胞迁移能力进一步下降,即细胞划痕愈合速度减缓,且穿过小室膜的细胞数量显著减少($P<0.01$)。而USP51过表达逆转了JPYZXZ对胃癌细胞迁移能力的抑制作用。以上说明JPYZXZ可能通过调控USP51抑制PC-GC的EMT表型。

表6 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27细胞内EMT相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of JPYZXZ on expression of EMT-related proteins in MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	N-cadherin/ β -actin		E-cadherin/ β -actin		Vimentin/ β -actin	
		MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27
空白组		1.00±0.17	1.00±0.09	1.00±0.26	1.00±0.01	1.00±0.15	1.00±0.10
JPYZXZ组	2	0.69±0.10 ¹⁾	0.61±0.11 ²⁾	1.70±0.16 ¹⁾	1.40±0.08 ²⁾	0.43±0.25 ¹⁾	0.76±0.12 ¹⁾
	4	0.54±0.11 ²⁾	0.58±0.11 ²⁾	2.23±0.24 ²⁾	1.60±0.11 ²⁾	0.37±0.29 ¹⁾	0.75±0.11 ¹⁾
	6	0.43±0.07 ²⁾	0.44±0.12 ²⁾	2.70±0.28 ²⁾	1.86±0.06 ²⁾	0.23±0.27 ²⁾	0.69±0.06 ²⁾
5-FU组	0.5	0.30±0.06 ²⁾	0.34±0.16 ²⁾	4.21±0.15 ²⁾	3.10±0.14 ²⁾	0.15±0.21 ²⁾	0.67±0.08 ²⁾

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	MMP-9/ β -actin		MMP-2/ β -actin	
		MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27
空白组		1.00±0.49	1.00±0.04	1.00±0.19	1.00±0.09
JPYZXZ组	2	0.87±0.42 ¹⁾	0.62±0.06 ²⁾	0.58±0.10 ¹⁾	0.65±0.13 ¹⁾
	4	0.63±0.40 ²⁾	0.56±0.15 ²⁾	0.47±0.21 ¹⁾	0.52±0.13 ²⁾
	6	0.52±0.31 ²⁾	0.40±0.06 ²⁾	0.43±0.19 ²⁾	0.31±0.14 ²⁾
5-FU组	0.5	0.29±0.16 ²⁾	0.25±0.08 ²⁾	0.37±0.18 ²⁾	0.28±0.13 ²⁾



注:A.MKN-45细胞系;B.HGC-27细胞系(图7同)

图5 MKN-45、HGC-27细胞USP51/ZEB1蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of USP51/ZEB1 proteins in MKN-45 and HGC-27 cell

表7 MKN-45、HGC-27细胞USP51/ZEB1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of USP51/ZEB1 protein expression in MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	USP51/ β -actin	ZEB1/ β -actin
MKN-45组	1.00±0.19	1.00±0.04
HGC-27组	0.31±0.11 ²⁾	0.55±0.07 ²⁾

注:与MKN-45组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

表8 JPYZXZ对MKN-45、HGC-27细胞USP51/ZEB1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of JPYZXZ on expression of USP51/ZEB1 proteins in MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	USP51/ β -actin		ZEB1/ β -actin	
		MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27
空白组		1.00±0.11	1.00±0.28	1.00±0.17	1.00±0.39
JPYZXZ组	2	0.80±0.03 ¹⁾	0.62±0.23 ¹⁾	0.69±0.10 ¹⁾	0.46±0.20 ¹⁾
	4	0.63±0.05 ²⁾	0.53±0.15 ¹⁾	0.54±0.11 ²⁾	0.34±0.20 ¹⁾
	6	0.38±0.11 ²⁾	0.34±0.06 ²⁾	0.43±0.07 ²⁾	0.24±0.15 ²⁾
5-FU组	0.5	0.30±0.08 ²⁾	0.18±0.10 ²⁾	0.30±0.06 ²⁾	0.08±0.07 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

3.9 JPYZXZ对稳定转染USP51荷瘤裸鼠皮下移植瘤的影响 皮下接种1周左右,在裸鼠皮下形成约绿豆大小的移植瘤,即造模成功。定期对裸鼠瘤体

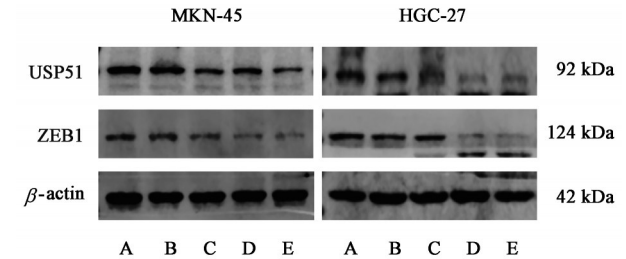


图6 MKN-45、HGC-27细胞USP51/ZEB1蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of USP51/ZEB1 proteins in MKN-45 and HGC-27 cell

3.8 JPYZXZ通过调控USP51影响胃癌细胞EMT及ZEB1蛋白表达 与NC组比较,oe-USP51组胃癌细胞中N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9、ZEB1蛋白表达明显上调,差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$),E-cadherin表达明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。加入JPYZXZ后可以逆转上述现象($P<0.05$ 、 $P<0.01$),见图11、表12。

进行测量,裸鼠皮下移植瘤大小及瘤质量见表13、表14。各组裸鼠皮下瘤均逐渐增加,与NC组比较,USP51过表达组小鼠瘤质量和体积增长速度均明显

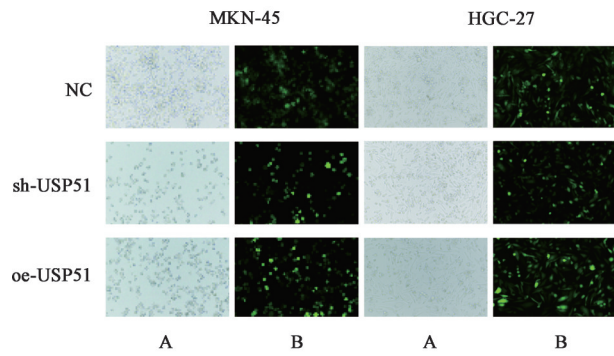
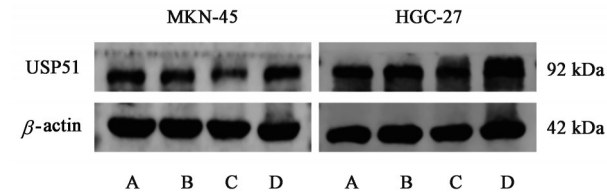


图7 USP51慢病毒转染后胃癌细胞GFP表达情况(荧光显微镜, ×20)

Fig. 7 GFP expression in gastric cancer cells after USP51 lentivirus transfection (fluorescence microscope, ×20)



注:A.正常组;B.NC组;C.sh-USP51组;D.oe-USP51组

图8 USP51慢病毒转染效率验证

Fig. 8 Validation of USP51 lentiviral transfection efficiency

表9 USP51慢病毒转染后对MKN-45、HGC-27细胞USP51蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

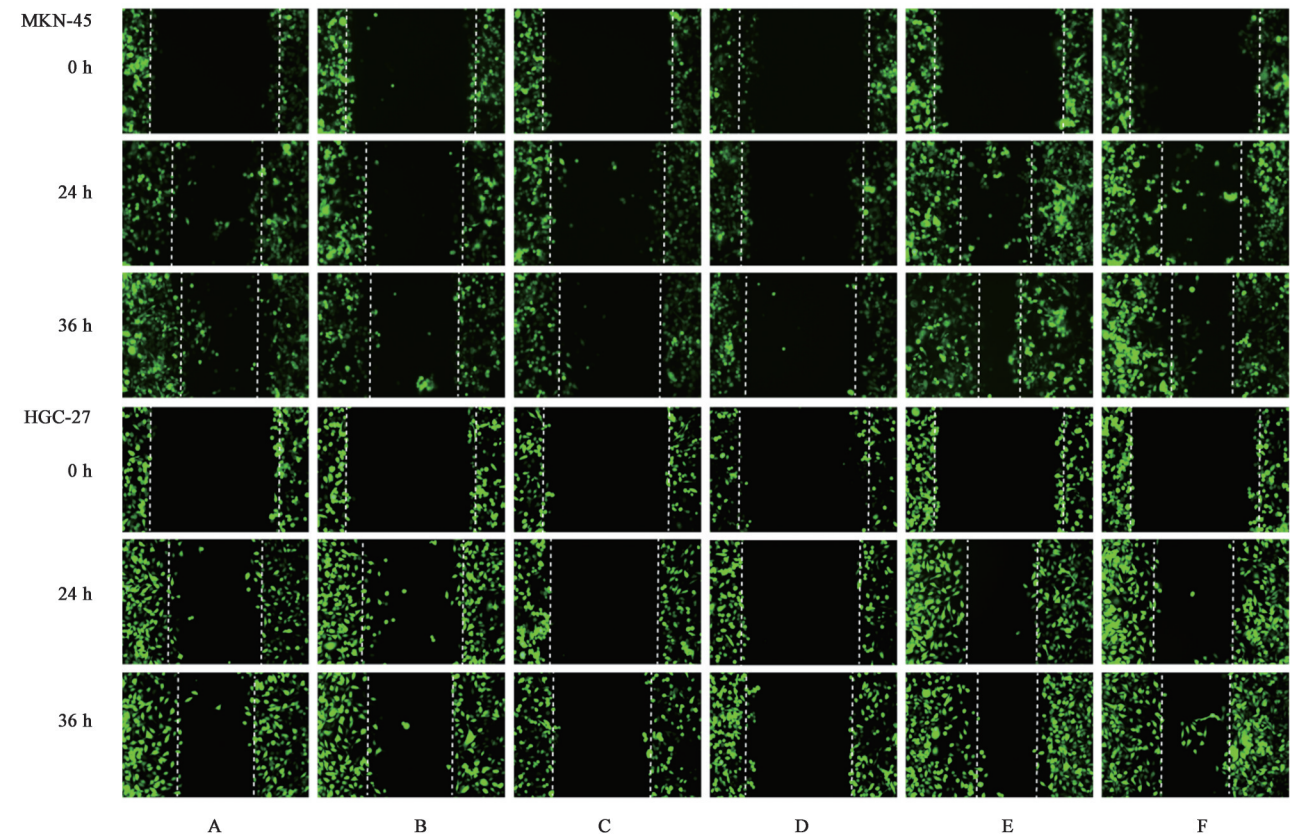
Table 9 Effect of USP51 lentiviral transfection on USP51 protein expression in MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	USP51/ β -actin	
	MKN-45	HGC-27
正常组	1.00±0.10	1.00±0.01
NC组	0.82±0.07	1.23±0.58
sh-USP51组	0.16±0.03 ²⁾	0.21±0.01 ¹⁾
oe-USP51组	1.56±0.21 ²⁾	2.10±0.29 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

升高($P<0.05, P<0.01$), USP51敲低组小鼠瘤重和瘤体积均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。JPYZXZ干预组小鼠瘤质量和体积均显著降低($P<0.01$), 见图12。

3.10 JPYZXZ对荷胃癌裸鼠瘤体EMT相关蛋白及USP51/ZEB1表达的影响 与NC组比较, USP51过表达后, E-cadherin表达明显降低($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin、MMP-2及MMP-9的表达均明显升高($P<0.05$)。USP51被敲低后蛋白表达趋势与之相反。JPYZXZ进一步下调敲低组蛋白表达, 逆转过表达组蛋白($P<0.05$)。见图13、表15。



注:A.NC组;B.NC+JPYZXZ组;C.sh-USP51组;D.sh-USP51+JPYZXZ组;E.oe-USP51组;F.oe-USP51+JPYZXZ组(图10、图11同)

图9 JPYZXZ干预前后对NC、sh-USP51、oe-USP51稳转MKN-45、HGC-27迁移能力的影响(×20)

Fig. 9 Effect of JPYZXZ intervention on migratory ability of MKN-45 and HGC-27 cells stably transfected with NC, sh-USP51, and oe-USP51, both before and after treatment (×20)

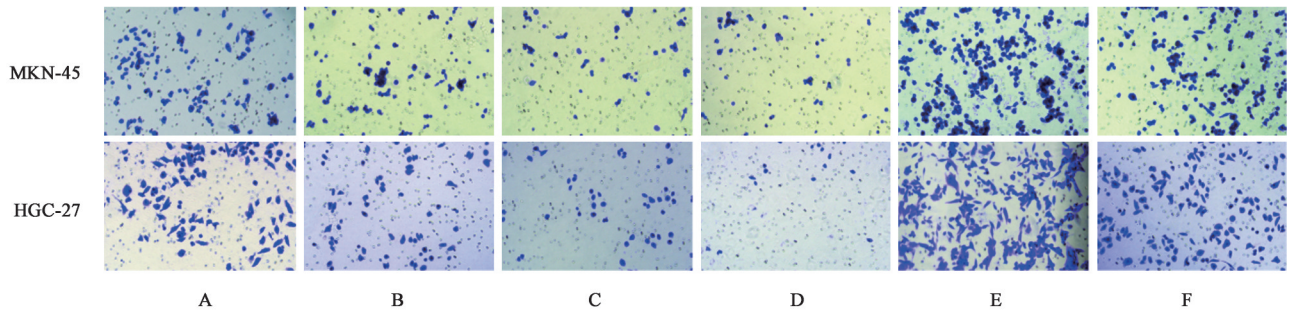


图 10 JPYZXZ 干预前后对 NC、sh-USP51、oe-USP51 稳转 MKN-45、HGC-27 的侵袭能力的影响 (×20)

Fig. 10 Effect of JPYZXZ on invasion capabilities of MKN-45 and HGC-27 cells stably transfected with NC, sh-USP51, and oe-USP51, both before and after treatment (×20)

表 10 JPYZXZ 干预前后对 NC、sh-USP51、oe-USP51 稳转 MKN-45、HGC-27 迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of JPYZXZ intervention on migratory ability of MKN-45 and HGC-27 cells stably transfected with NC, sh-USP51, and oe-USP51, both before and after treatment ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/ g·L ⁻¹	GFP 相对荧光强度	
			24 h	36 h
MKN-45	NC 组		54.87±4.78	71.83±2.05
	NC+JPYZXZ 组	4	31.86±1.67 ²⁾	48.10±1.72 ²⁾
	sh-USP51 组		26.73±2.74 ²⁾	35.64±1.77 ²⁾
	sh-USP51+JPYZXZ 组	4	16.70±3.50 ⁴⁾	23.54±1.87 ⁴⁾
	oe-USP51 组		77.78±1.42 ²⁾	98.38±2.90 ²⁾
	oe-USP51+JPYZXZ 组	4	63.76±4.27 ⁶⁾	76.86±2.66 ⁶⁾
HGC-27	NC 组		68.07±1.50	80.07±2.45
	NC+JPYZXZ 组	4	44.32±2.15 ²⁾	61.24±4.55 ²⁾
	sh-USP51 组		21.33±3.51 ²⁾	38.93±4.02 ²⁾
	sh-USP51+JPYZXZ 组	4	10.34±4.01 ⁴⁾	20.52±2.50 ⁴⁾
	oe-USP51 组		91.13±5.79 ²⁾	121.23±1.34 ²⁾
	oe-USP51+JPYZXZ 组	4	78.20±4.16 ⁶⁾	108.60±4.21 ⁶⁾

注:与 NC 组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与 sh-USP51 组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与 oe-USP51 组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表 11 同)

3.11 JPYZXZ 对荷胃癌裸鼠瘤体组织 USP51/ZEB1 蛋白的影响 与 NC 组比较, USP51 过表达后, E-cadherin 表达明显降低 ($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin、USP51 和 ZEB1 的表达均明显升高 ($P<0.05$)。USP51 被敲低后蛋白表达趋势与之相反。JPYZXZ 灌胃后, 各组瘤体组织中除 E-cadherin 表达明显升高 ($P<0.05$), 其余蛋白较前均明显下降 ($P<0.05$)。见表 16、图 14。

4 讨论

PC-GC 是胃癌特殊组织学分型, 病理表现为游离或松散聚集的恶性细胞, 细胞间黏附力低, 侵袭转移潜能高、分化程度差, 对放疗、化疗、靶向药物及免疫检查点抑制剂等现代治疗手段均不敏

表 11 JPYZXZ 干预前后对 NC、sh-USP51、oe-USP51 稳转 MKN-45、HGC-27 迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of JPYZXZ on migration ability of MKN-45 and HGC-27 cells stably transfected with NC, sh-USP51, and oe-USP51, both before and after treatment ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/ g·L ⁻¹	迁移细胞数/个
MKN-45	NC 组		122.00±12.00
	NC+JPYZXZ 组	4	225.00±18.08 ²⁾
	sh-USP51 组		59.00±7.94 ²⁾
	sh-USP51+JPYZXZ 组	4	26.33±3.06 ⁴⁾
	oe-USP51 组		258.00±10.82 ²⁾
	oe-USP51+JPYZXZ 组	4	156.70±4.04 ⁶⁾
HGC-27	NC 组		168.70±11.50
	NC+JPYZXZ 组	4	80.00±10.15 ²⁾
	sh-USP51 组		46.33±3.51 ²⁾
	sh-USP51+JPYZXZ 组	4	18.00±2.00 ⁴⁾
	oe-USP51 组		291.00±11.79 ²⁾
	oe-USP51+JPYZXZ 组	4	228.00±15.10 ⁶⁾

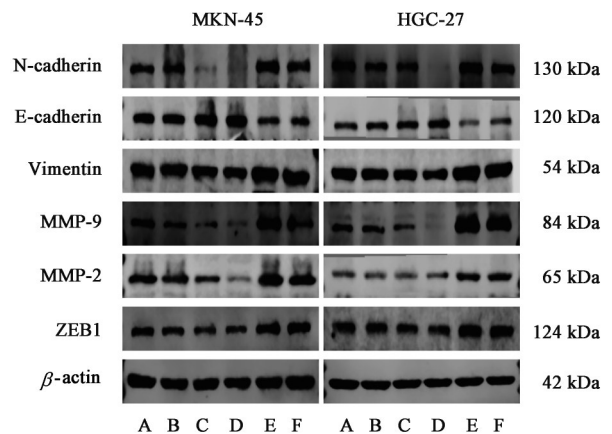


图 11 JPYZXZ 干预前后 NC、sh-USP51、oe-USP51 稳转 MKN-45、HGC-27 细胞 EMT 相关蛋白及 ZEB1 蛋白表达电泳

Fig. 11 Electrophoresis of EMT-related protein and ZEB1 protein expression in NC, sh-USP51 and oe-USP51 stably transfected MKN-45 and HGC-27 cells before and after JPYZXZ intervention

表 12 JPYZXZ 干预前后对 NC、sh-USP51、oe-USP51 稳转 MKN-45、HGC-27 细胞 EMT 相关蛋白及 ZEB1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of JPYZXZ intervention before and after on expression of EMT-related proteins and ZEB1 protein in NC, sh-USP51, and oe-USP51 stably transfected MKN-45 and HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	N-cadherin/ β -actin		E-cadherin/ β -actin		Vimentin/ β -actin	
		MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27
NC 组		1.00±0.14	1.00±0.13	1.00±0.05	1.00±0.06	1.00±0.02	1.00±0.03
NC+JPYZXZ 组	4	0.67±0.03 ²⁾	0.48±0.16 ²⁾	1.50±0.19 ²⁾	1.38±0.08 ¹⁾	0.71±0.03 ²⁾	0.67±0.02 ²⁾
sh-USP51 组		0.19±0.06 ²⁾	0.35±0.08 ²⁾	1.93±0.20 ²⁾	1.45±0.12 ¹⁾	0.67±0.01 ²⁾	0.57±0.10 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ 组	4	0.03±0.01 ⁴⁾	0.09±0.07 ³⁾	2.59±0.06 ⁴⁾	1.75±0.12 ³⁾	0.34±0.06 ⁴⁾	0.32±0.08 ³⁾
oe-USP51 组		1.54±0.07 ²⁾	1.37±0.10 ²⁾	0.54±0.01 ²⁾	0.40±0.14 ²⁾	1.21±0.07 ²⁾	1.48±0.08 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ 组	4	1.11±0.08 ⁶⁾	1.09±0.02 ⁶⁾	0.83±0.09 ⁶⁾	0.74±0.11 ⁵⁾	1.05±0.02 ⁶⁾	1.08±0.01 ⁶⁾

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	MMP-9/ β -actin		MMP-2/ β -actin		ZEB1/ β -actin	
		MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27	MKN-45	HGC-27
NC 组		1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.14	1.00±0.09	1.00±0.06	1.00±0.21
NC+JPYZXZ 组	4	0.58±0.01 ²⁾	0.62±0.01 ²⁾	0.66±0.01 ²⁾	0.59±0.06 ²⁾	0.55±0.09 ²⁾	0.54±0.05 ²⁾
sh-USP51 组		0.57±0.01 ²⁾	0.36±0.06 ²⁾	0.41±0.05 ²⁾	0.55±0.03 ¹⁾	0.45±0.04 ²⁾	0.45±0.06 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ 组	4	0.10±0.11 ⁴⁾	0.07±0.03 ⁴⁾	0.10±0.03 ⁴⁾	0.21±0.07 ⁴⁾	0.24±0.01 ⁴⁾	0.22±0.05 ⁴⁾
oe-USP51 组		2.84±0.24 ²⁾	2.13±0.53 ²⁾	1.58±0.08 ²⁾	1.34±0.07 ²⁾	1.42±0.06 ²⁾	1.65±0.08 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ 组	4	1.95±0.10 ⁶⁾	1.78±0.08 ⁶⁾	1.30±0.05 ⁶⁾	1.01±0.09 ⁶⁾	1.14±0.06 ⁶⁾	1.18±0.11 ⁶⁾

注:与 NC 组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与 oe-USP51 比较 ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$;与 sh-USP51 组比较 ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$ (表 13-表 16 同)

表 13 JPYZXZ 对裸鼠皮下移植瘤体积变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 13 Effect of JPYZXZ intervention on volume changes of subcutaneous transplanted tumors in nude mice ($\bar{x}\pm s, n=5$) mm³

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天
NC 组		81.21±1.36	148.50±3.69	239.20±12.52	368.30±19.31	453.50±17.78	606.5±25.64	740.00±27.72	925.80±41.16
NC+JPYZXZ 组	30	82.24±0.71	125.30±15.35 ¹⁾	173.40±14.35 ²⁾	297.10±19.54 ²⁾	410.50±10.66 ¹⁾	539.80±19.38 ²⁾	665.50±29.41 ¹⁾	801.70±26.06 ¹⁾
oe-USP51 组		88.87±1.04	237.60±21.54 ²⁾	365.50±18.39 ²⁾	633.10±34.95 ²⁾	819.50±16.89 ²⁾	956.20±13.38 ²⁾	110.00±82.23 ²⁾	1371.00±120.40 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ 组	30	89.72±0.93	177.30±12.28 ⁴⁾	287.10±22.79 ⁴⁾	425.90±29.71 ⁴⁾	575.70±25.32 ⁴⁾	667.10±39.95 ⁴⁾	769.40±31.27 ⁴⁾	1033.00±69.31 ⁴⁾
sh-USP51 组		71.26±2.07	117.90±5.57 ²⁾	164.30±20.84 ²⁾	222.70±14.26 ²⁾	267.40±11.64 ²⁾	324.10±15.38 ²⁾	383.20±9.19 ²⁾	428.30±14.88 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ 组	30	71.93±1.08	89.63±6.24 ⁶⁾	124.40±14.45 ⁶⁾	172.10±8.95 ⁶⁾	213.10±9.00 ⁶⁾	259.80±11.40 ⁶⁾	313.90±9.63 ⁶⁾	363.60±6.80 ⁶⁾

表 14 JPYZXZ 干预后裸鼠皮下移植瘤质量情况 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

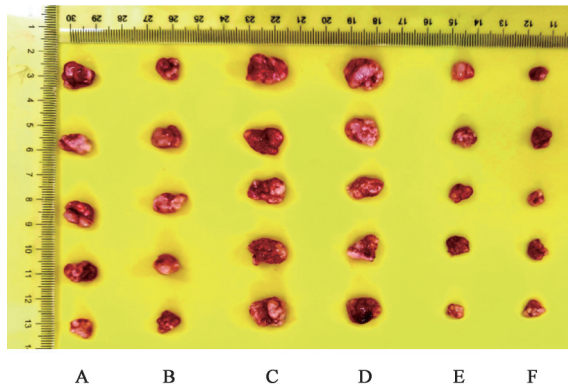
Table 14 Weight of subcutaneous transplanted tumors in nude mice after JPYZXZ intervention ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肿瘤质量/g
NC 组		1.34±0.03
NC+JPYZXZ 组	30	1.15±0.02 ²⁾
oe-USP51 组		1.83±0.03 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ 组	30	1.58±0.04 ⁴⁾
sh-USP51 组		0.93±0.03 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ 组	30	0.65±0.04 ⁶⁾

感^[17-18]。因此,探寻高效安全的治疗药物迫在眉睫。中医药凭借其在增效减毒、改善症状、调节免疫等

多方面的独特优势,为破解这一治疗困境提供了新的思路和方法。

全国名中医刘沈林教授基于对中医经典理论的系统阐释,结合数十年临床实践及学术传承,首次系统提出胃癌“脾虚瘀毒”病机理论^[19]。该理论阐明胃癌的核心病理基础为“本虚标实”:脾虚气弱为发病之本,导致气血生化乏源;痰瘀互结、癌毒蕴结为致病之标,三者互为因果形成恶性病理循环,构成肿瘤发生、进展及转移的核心病机^[20]。基于此理论框架,确立了“益气健脾为主,化痰解毒为辅”治疗原则,科学配伍具有解毒散结功能的中药,并针对胃癌 I~III 期与 IV 期的不同病理阶段进行精准



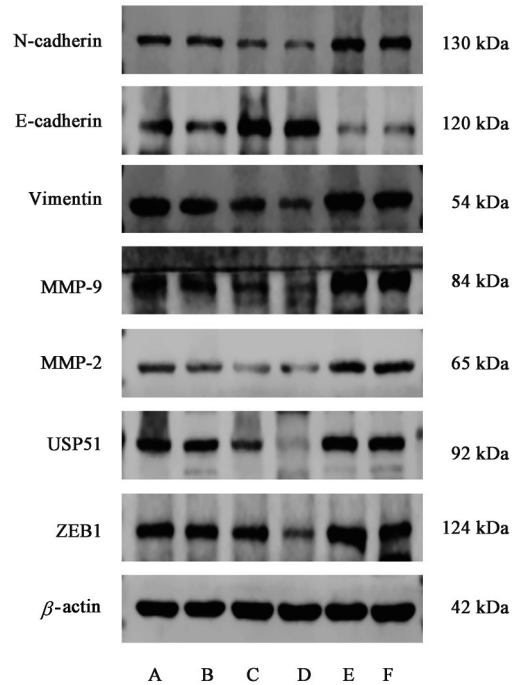
注: A.NC组; B.NC+JPYZXZ组; C.oe-USP51组; D.oe-USP51+JPYZXZ组; E.sh-USP51组; F.sh-USP51+JPYZXZ组

图12 JPYZXZ干预前后对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

Fig. 12 Effect of JPYZXZ intervention before and after on growth of subcutaneous transplanted tumors in nude mice

化裁,创制JPYZXZ^[21-22]。围绕该方开展的多项临床研究均取得突破性进展^[23-24],并且课题组前期研究证实JPYZXZ可有效阻断胃癌细胞发生EMT^[25],但其深入的疗效机制仍有待系统阐释。

USP51作为去泛素化酶(DUB)家族成员,在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用,然而,其在PC-GC中的作用机制尚未得到充分阐释,需进一步深入研究。EMT作为恶性肿瘤侵袭转移的核心生物学进程,其关键特征在于细胞稳态调控网络失衡引发的上皮-间质表型动态平衡破坏^[26]。具体表现为上皮标志物E-cadherin呈现系统性下调,而间质标志物N-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-2则呈现级联式上调^[27]。作为EMT调控网络的核心枢纽,ZEB1通过响应转化生长因子-β信号通路的精密调控,促使ZEB1在特定微环境中形成正反馈环路,进而触发EMT级联反应,显著提升恶性肿瘤的侵袭转移能力^[28-29]。已有研究揭示,USP51与ZEB1形成精密的功能耦合物,前者通过去泛素化修饰工程,有



注: A.NC组; B.NC+JPYZXZ组; C.sh-USP51组; D.sh-USP51+JPYZXZ组; E.oe-USP51组; F.oe-USP51+JPYZXZ组(图14同)

图13 荷胃癌裸鼠瘤体EMT相关蛋白及USP51/ZEB1蛋白表达电泳($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Electrophoresis of EMT-related proteins and USP51/ZEB1 protein expression in tumor tissues of nude mice with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=3$)

效阻断ZEB1的泛素-蛋白酶体降解通道,显著提升转录激活效率,从而促进EMT发生^[30]。本课题组前期开展的深入机制研究发现,USP51调控的ZEB1是一个主要的PCC相关因子,USP51-ZEB1轴可以调节EMT相关蛋白表达,形成正向反馈环路,放大EMT信号网络对肿瘤进展的促进作用。此外,USP51信号异常活化可能同时增强胃癌免疫逃逸倾向并降低免疫治疗应答^[14]。本研究发现USP51在低黏附性胃癌中高表达,并且可以稳定ZEB1的表达进而促进EMT,进而加速PC-GC的侵袭与转

表15 JPYZXZ对荷胃癌裸鼠瘤体EMT相关蛋白及USP51/ZEB1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 15 Effect of JPYZXZ on expression of EMT-related proteins and USP51/ZEB1 in tumor tissues of nude mice with gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	N-cadherin /β-actin	E-cadherin /β-actin	Vimentin /β-actin	MMP-9 /β-actin	MMP-2 /β-actin	USP51 /β-actin	ZEB1 /β-actin
NC组		1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.16	1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.02	1.00±0.26
NC+JPYZXZ组	30	0.68±0.12 ²⁾	1.57±0.12 ²⁾	0.53±0.13 ²⁾	0.68±0.04 ¹⁾	0.66±0.12 ¹⁾	0.75±0.05 ¹⁾	0.50±0.19 ¹⁾
sh-USP51组		0.62±0.03 ²⁾	1.72±0.13 ²⁾	0.45±0.18 ²⁾	0.50±0.18 ²⁾	0.44±0.15 ²⁾	0.58±0.10 ²⁾	0.38±0.08 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ组	30	0.32±0.08 ⁴⁾	2.23±0.27 ³⁾	0.18±0.07 ³⁾	0.15±0.06 ³⁾	0.15±0.07 ³⁾	0.21±0.06 ⁴⁾	0.10±0.10 ³⁾
oe-USP51组		1.43±0.08 ²⁾	0.29±0.09 ²⁾	1.90±0.13 ²⁾	2.05±0.15 ²⁾	1.57±0.22 ²⁾	1.89±0.17 ²⁾	1.64±0.14 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ组	30	1.08±0.03 ⁶⁾	0.65±0.18 ⁵⁾	1.49±0.09 ⁵⁾	1.39±0.15 ⁶⁾	1.10±0.13 ⁵⁾	1.55±0.13 ⁵⁾	1.12±0.23 ⁵⁾

表 16 JPYZXZ 对荷胃癌裸鼠瘤体 EMT 相关蛋白及 USP51/ZEB1 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 16 Effect of JPYZXZ on EMT-related proteins and USP51/ZEB1 in tumor tissues of nude mice with gastric carcinoma ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	吸光度 A/%				
		N-cadherin	E-cadherin	Vimentin	USP51	ZEB1
NC 组		56.89±3.77	25.45±3.94	77.43±3.67	61.89±8.68	43.34±3.88
NC+JPYZXZ 组	30	36.05±4.43 ²⁾	40.89±1.24 ²⁾	62.52±5.94 ¹⁾	42.76±3.49 ²⁾	30.13±2.19 ²⁾
sh-USP51 组		27.35±2.15 ²⁾	57.76±1.11 ²⁾	47.77±5.20 ²⁾	31.25±3.52 ²⁾	23.11±2.25 ²⁾
sh-USP51+JPYZXZ 组	30	16.11±1.82 ⁴⁾	70.56±4.80 ³⁾	26.38±3.28 ⁴⁾	20.91±3.72 ³⁾	16.11±1.41 ³⁾
oe-USP51 组		93.25±4.77 ²⁾	7.833±2.23 ²⁾	114.5±5.96 ²⁾	93.72±4.35 ²⁾	78.85±4.72 ²⁾
oe-USP51+JPYZXZ 组	30	72.70±3.19 ⁶⁾	14.54±2.10 ⁵⁾	91.76±5.18 ⁶⁾	76.91±5.66 ⁵⁾	57.88±3.59 ⁶⁾

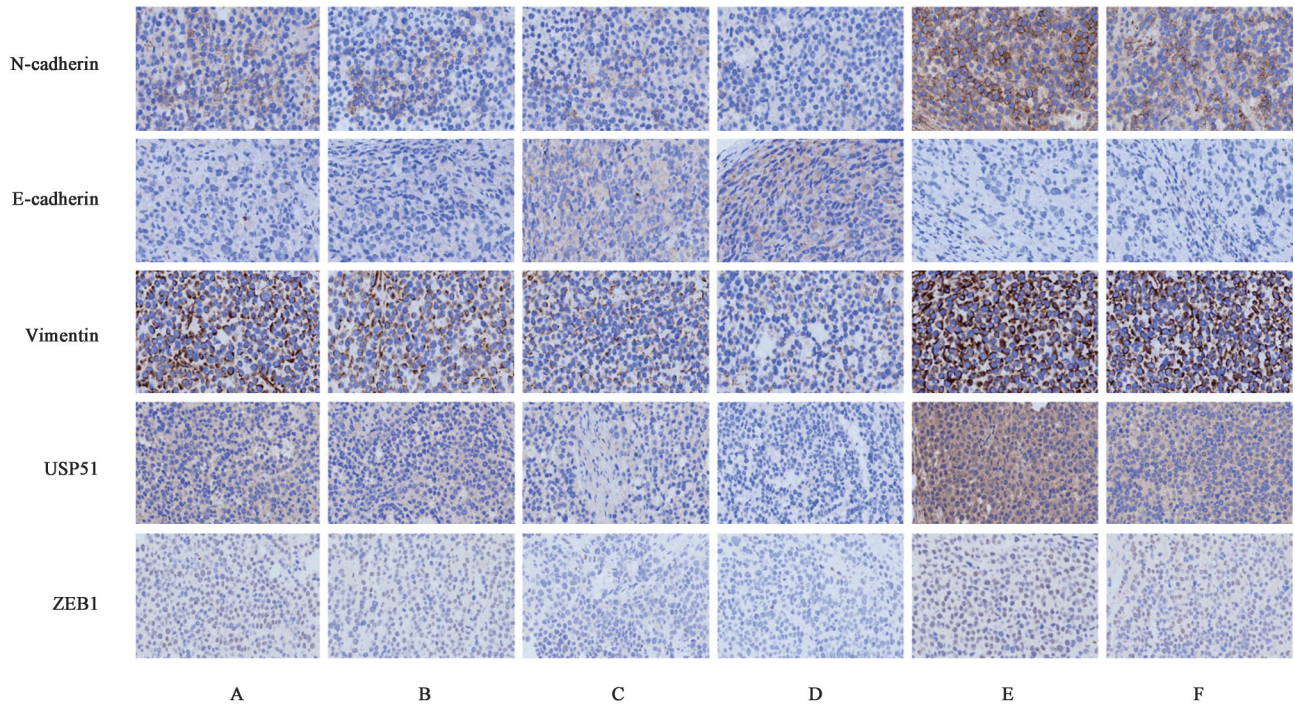


图 14 JPYZXZ 对荷胃癌裸鼠瘤体组织 EMT 相关蛋白及 USP51/ZEB1 的影响 (免疫组化, ×20)

Fig. 14 Effect of JPYZXZ on EMT-related proteins and USP51/ZEB1 in tumor tissues of nude mice with gastric carcinoma (IHC, ×20)

移。因此,本研究认为 USP51 可以作为 PC-GC 的潜在治疗靶点。

本研究系统性地探讨了 JPYZXZ 对 PC-GC 的作用机制。首先,体外研究发现 JPYZXZ 可以降低 MKN-45、HGC-27 细胞生存比率,抑制其迁移侵袭。其次,JPYZXZ 干预后 USP51 表达降低,并有效抑制了 ZEB1 的表达及其介导的 EMT 过程,慢病毒实验则逆向验证这一结论。最后,我们通过在裸鼠体内构建移植瘤模型,进一步验证了 JPYZXZ 对 PC-GC 肿瘤生长的显著抑制作用。结果发现 JPYZXZ 组明显抑制瘤体生长,USP51 过表达组的 ZEB1、N-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 表达明显增高,E-cadherin 明显降低,USP51 敲低组则与其相反。因此,本研究认为 JPYZXZ 抑制低黏附性胃癌

细胞进展,可能是通过降低 USP51 表达,并进一步阻断 ZEB1 活化及 EMT 进程。

综上所述,本研究通过体内外实验阐明了 JPYZXZ 调控 USP51-ZEB1 表达逆转 EMT 进程,从而抑制 PC-GC 侵袭转移的作用机制。该机制的阐明不仅提示靶向调控 USP51-ZEB1 可协同增强常规化疗药物的抗肿瘤效应,为 USP51 作为新型抗癌治疗靶点提供了实验依据,同时也丰富了中医药治疗 PC-GC 的现代科学内涵,并为构建基于 EMT 调控网络的肿瘤精准治疗体系奠定了关键分子生物学基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WADLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1):17-48.

- [2] 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.
- [3] NAGTEGAAL I D, ODZE R D, KLIMSTRA D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system [J]. *Histopathology*, 2020, 76(2):182-188.
- [4] DRUBAY V, NUYTENS F, RENAUD F, et al. Poorly cohesive cells gastric carcinoma including signet-ring cell cancer: Updated review of definition, classification and therapeutic management [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(8):1406-1428.
- [5] NAKAMURA K, ETO K, IWAGAMI S, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of poorly cohesive cell subtype of gastric cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2022, 27(3):512-519.
- [6] PAN X, TAO H, NIE M, et al. A clinical study of traditional Chinese medicine prolonging the survival of advanced gastric cancer patients by regulating the immunosuppressive cell population: A study protocol for a multicenter, randomized controlled trial [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(16):e19757.
- [7] 肖作鹏,张莹,刘沈林,等. 健脾养正消癥方配合紫杉醇类化疗对脾虚瘀毒型进展期胃癌预后生存的临床研究[J]. *中医药信息*, 2023, 40(2):61-65.
- XIAO Z P, ZHANG Y, LIU S L, et al. Clinical study on prognosis and survival of advanced gastric cancer treated with Jianpi Yangzheng Xiaozheng formula combined with paclitaxel chemotherapy [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2023, 40(2):61-65.
- [8] WU J, ZHANG X X, ZOU X, et al. The effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction and its components on gastric cancer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 235:56-64.
- [9] HOU C, CHU H J, DAI X J, et al. Metabolomic study on the therapeutic effect of the Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on gastric cancer treated with chemotherapy based on GC-TOFMS analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:8832996.
- [10] GUO W, GIANCOTTI F G. Integrin signalling during tumour progression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10):816-826.
- [11] AL-KHATEEB F N, YOUSIF A Y, AL-SHAWI S G, et al. Molecular regulation by ubiquitin-specific proteases (USPs) in HCC: Cell cycle, oncogenic signaling, and beyond [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2025, 398(12):16923-16950.
- [12] SAKAMOTO Y, TAKAHASHI M, NISHIMURA H, et al. Regulation of divergent epithelial-to-mesenchymal transition responses via the CDK4/6-USP51 pathway through ZEB1 protein stabilization[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1):31802.
- [13] ZHOU Z, ZHANG P, HU X, et al. USP51 promotes deubiquitination and stabilization of ZEB1 [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(10):2020-2031.
- [14] LIU Y J, ZENG S H, ZHANG W, et al. USP51/ZEB1/ACTA2 axis promotes mesenchymal phenotype in gastric cancer and is associated with low cohesion characteristics [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 188:106644.
- [15] HOJO Y, KISHI S, MORI S, et al. Sunitinib and pterostilbene combination treatment exerts antitumor effects in gastric cancer via suppression of PDZD8 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7):4002.
- [16] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982.
- XU S Y. *Methodology of Pharmacological Experiments* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.
- [17] BAEK J H, KANG B W, KANG H, et al. Clinical implications and chemo-sensitivity of adjuvant chemotherapy in patients with poorly cohesive cells-gastric cancer [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2023, 92(4):279-290.
- [18] KANG S H, KIM J S, MOON H S, et al. Signet ring cell carcinoma of early gastric cancer, is endoscopic treatment really risky? [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(33):e7532.
- [19] 裘怡婷,卞泽人,邹玺. 胃癌脾虚瘀毒病机理论[J]. *光明中医*, 2024, 39(20):4105-4108.
- QIU Y T, BIAN Z R, ZOU X. Pathogenesis theory of spleen deficiency and blood stasis toxin in gastric cancer [J]. *Guangming Tradit Chin Med*, 2024, 39(20):4105-4108.
- [20] 卞泽人. 胃癌脾虚瘀毒病机理论探析及临床病证观察[D]. 南京:南京中医药大学, 2024.
- BIAN Z R. Analysis on the pathogenesis of gastric cancer spleen deficiency and stasis toxin and clinical observation [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2024.
- [21] 杨文娟,戴安伟,邹玺,等. 刘沈林教授辨治中晚期胃癌的经验探析[J]. *现代中医临床*, 2023, 30(3):113-116.
- YANG W J, DAI A W, ZOU X, et al. Professor LIU Shenlin's experience in treating advanced gastric cancer [J]. *Mod Chin Clin Med*, 2023, 30(3):113-116.
- [22] 强永虎,刘沈林. 刘沈林运用健脾养正、消癥散结法治疗晚期胃癌经验述要[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2022, 4(1):64-68.
- QIANG Y H, LIU S L. Summary of LIU Shenlin's experience in treating advanced gastric cancer by using therapy of invigorating spleen and supporting healthy Qi, and eliminating abdominal mass [J]. *J Oncol Chin Med*, 2022, 4(1):64-68.
- [23] 邹玺,陈玉超,胡守友,等. 健脾养正消癥方对胃癌患者晚期生存期和生活质量的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(3):201-205.
- ZOU X, CHEN Y C, HU S Y, et al. Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng Fang on survival and life quality of cases with late stage gastric cancer [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2015, 31(3):201-205.
- [24] 陈玉超,刘沈林,王瑞平,等. “健脾养正消癥汤”改善晚期胃癌患者化疗后生活质量 84 例临床研究[J]. *江苏中医药*,

- 2013,45(6):18-20.
- CHEN Y C, LIU S L, WANG R P, et al. Clinical study on the improvement of quality of life in 84 patients with advanced gastric cancer after chemotherapy by Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction[J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2013, 45(6):18-20.
- [25] 刘元杰, 叶茜文, 邹玺. 健脾养正消癥方通过干预 CAFs 中 DZIP1 表达影响弥漫型胃癌间充质特征[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(21):90-101.
- LIU Y J, YE Q W, ZOU X. Jianpi Yangzheng Xiaozheng recipe can affect the mesenchymal characteristics of diffuse gastric cancer by regulating the expression of DZIP1 in CAFs [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(21):90-101.
- [26] FONTANA R, MESTRE-FARRERA A, YANG J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression [J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19:133-156.
- [27] KANG E, SEO J, YOON H, et al. The post-translational regulation of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in cancer metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):3591.
- [28] GOSTOMCZYK K, DROZD M, MARSOOL M D, et al. Biomarkers for the detection of circulating tumor cells [J]. *Exp Cell Res*, 2025, 448(1):114555.
- [29] GHAFOR S, GARCIA E, JAY D J, et al. Molecular mechanisms regulating epithelial mesenchymal transition (EMT) to promote cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(9):4364.
- [30] ZHANG Z, LI J, OU Y, et al. CDK4/6 inhibition blocks cancer metastasis through a USP51-ZEB1-dependent deubiquitination mechanism [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):25.

[责任编辑 张丰丰]