

和中消痞颗粒调控 Ncln-CHOP 轴抑制内质网应激减轻 胃黏膜细胞凋亡的机制

李洪峥^{1,2}, 王少丽², 商祖诚², 栗梦凡³, 刘震^{2*}

(1. 中国中医科学院 博士后科研流动站, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053;

3. 福建中医药大学 中西医结合研究院, 福州 350122)

[摘要] 目的:探讨和中消痞颗粒(HZXPG)对N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱导的人胃黏膜细胞凋亡的影响,以及对尼卡林(Ncln)-C/EBP同源蛋白(CHOP)轴及其介导的内质网应激作用机制。方法:利用细胞增殖与活性检测法(CCK-8)检测MNNG对GES-1细胞增殖的抑制情况,择选MNNG最优有效剂量。将GES-1人胃黏膜细胞分为空白组,模型组(MNNG 1.562 5 mmol·L⁻¹),HZXPG低、高剂量组(5%、10%含药血清),通过鬼笔环肽染色检测MNNG诱导的人胃黏膜细胞形态变化,通过原位末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况,磷脂结合蛋白V/碘化丙啶(Annexin V/PI)流式细胞术检测人胃黏膜细胞凋亡周期改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡、内质网应激及Ncln/CHOP轴相关蛋白的表达情况。结果:与空白组比较,模型组GES-1细胞表面积显著减少,内质网扩张,胃黏膜细胞早期、晚期凋亡率均显著升高,截短型BH3相互作用结构域死亡激动蛋白(tBid)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、剪切的(cleaved)胱天蛋白酶(Caspase)-3和cleaved Caspase-8蛋白表达水平均显著升高,Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),重链结合蛋白(BiP)、Ncln、CHOP蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),Ncln在内质网表达量升高,CHOP蛋白在细胞核表达量升高。与模型组比较,给药干预后HZXPG高剂量组胃黏膜细胞表面积显著升高,两剂量组胃黏膜细胞的内质网扩张程度被抑制,凋亡率显著降低,早期凋亡率和晚期凋亡率均显著降低($P<0.01$),HZXPG低剂量组tBid、Bax表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2表达显著升高($P<0.01$);HZXPG高剂量组tBid、Bax、cleaved Caspase-3和cleaved Caspase-8表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2表达水平明显升高($P<0.05$)。HZXPG高剂量组BiP、Ncln、CHOP蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),且CHOP入核水平降低。结论:HZXPG可通过抑制Ncln-CHOP轴,减轻MNNG引起内质网应激介导的胃黏膜细胞凋亡,进一步缓解胃癌前病变所致的胃黏膜细胞损伤。

[关键词] 和中消痞颗粒; 慢性萎缩性胃炎; 胃癌前病变; 内质网应激; 细胞凋亡; 尼卡林(Ncln)/C/EBP同源蛋白(CHOP)轴

[中图分类号] R242;R573.3+2;R256.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)19-0129-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260193

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250903.1324.003>

[网络出版日期] 2025-09-03 14:10:37 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Hezhong Xiaopi Granules Regulate Ncln-CHOP Axis to Inhibit Endoplasmic Reticulum Stress and Reduce Gastric Mucosal Cell Apoptosis

LI Hongzheng^{1,2}, WANG Shaoli², SHANG Zucheng², LI Mengfan³, LIU Zhen^{2*}

(1. Postdoctoral Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

3. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine,
Fuzhou 350122, China)

[收稿日期] 2025-07-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174352);中央高水平中医医院临床研究和成果转化能力提升项目——中医药临床循证研究专项(HLCMHPP2023085);国家资助博士后研究人员计划项目(NGZB20250908)

[第一作者] 李洪峥,博士,主治医师,从事中西医结合临床研究,E-mail:20180931809@bucm.edu.cn

[通信作者] *刘震,博士,主任医师,从事中西医结合防治消化系统疾病的研究,E-mail:doctorliuzhen@126.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Hezhongxiaopi granules (HZXPG) on methylnitronitrosoguanidine (MNNG)-mediated gastric mucosal cell apoptosis and the regulatory effects on the Ncln (Ncln)-C/EBP homologous protein (CHOP) axis and endoplasmic reticulum stress (ERS). **Methods:** The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was employed to examine the inhibitory effect of MNNG on the proliferation of GES-1 cells, and the optimal effective dose of MNNG was selected. Human gastric mucosal GES-1 cells were allocated into the control, model (MNNG, $1.562\ 5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), and low/high-dose HZXPG (5% and 10% HZXPG-containing serum) groups. Phalloidin staining was employed to detect MNNG-induced morphological changes in human gastric mucosal cells. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was adopted to assess cell apoptosis. Annexin V/propidium iodide (Annexin V/PI) flow cytometry was utilized to measure the alterations in the apoptotic cycle of human gastric mucosal cells. Western blot was performed to determine the expression levels of proteins related to apoptosis, ERS, and the Ncln/CHOP axis. **Results:** Compared with the control group, the model group exhibited a reduction in the surface area of GES-1 cells, endoplasmic reticulum (ER) dilation, increased early and late apoptosis rates of gastric mucosal cells, upregulated protein levels of truncated Bid (tBid), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved-cysteineyl aspartate-specific proteinase (Caspase)-3, and cleaved-Caspase-8, and downregulated protein level of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ($P<0.01$). In addition, the expression levels of binding immunoglobulin protein (BiP), Ncln, and CHOP were upregulated ($P<0.01$), with enhanced Ncln expression in the ER and elevated CHOP expression in the nucleus. Compared with the model group, the high-dose HZXPG group showed a significant increase in the surface area of gastric mucosal cells. Both dose groups exhibited inhibited ER dilation and reduced early and late apoptosis rates of gastric mucosal cells ($P<0.01$). Low-dose HZXPG decreased the expression of tBid and Bax ($P<0.05$, $P<0.01$) and promoted Bcl-2 expression ($P<0.01$). High-dose HZXPG reduced the expression levels of tBid, Bax, cleaved-Caspase-3, and cleaved-Caspase-8 ($P<0.05$, $P<0.01$) and increased the Bcl-2 expression level ($P<0.05$). Furthermore, high-dose HZXPG downregulated the expression levels of BiP, Ncln, and CHOP ($P<0.05$, $P<0.01$), while decreasing the nuclear translocation of CHOP. **Conclusion:** HZXPG alleviates MNNG-induced ERR-mediated apoptosis of gastric mucosal cells by inhibiting the Ncln-CHOP axis, thereby relieving gastric mucosal cell damage caused by precancerous gastric lesions.

[Keywords] Hezhongxiaopi granules; chronic atrophic gastritis; gastric precancerous lesion; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; Nicalin (Ncln)-C/EBP homologous protein (CHOP) axis

慢性萎缩性胃炎(CAG)是常见的消化系统疾病,多因慢性炎症引发的结缔组织(化生性萎缩)或不同的非天然上皮(化生性萎缩)替换适当的胃腺结构引起,通常无症状或伴胃痛、痞满、嗳气等临床表现,受到患者自身体质、饮食习惯、幽门螺杆菌(Hp)感染等因素的影响,属胃癌前病变(PLGC),是多步骤胃癌(GC)癌前级联反应中的第一步。CAG的发病率、患病率高,当前全球患病率高达25%^[1],美国人群的估计患病率约为15%^[2],我国作为胃癌高发国家,当前缺乏CAG的流行病学数据,一项大规模横断面调查结果提示我国组织学诊断为CAG的比例高达25.8%^[3]。因此,作为我国的常见病与高发病,CAG及PLGC的中西医结合防治势在必行。

当前临床对于CAG的治疗以针对病因,个体化治疗为主要原则,除四联治疗方法外,叶酸等补充剂在治疗CAG方面也发挥着重要作用^[4-5]。但其治疗具有一定局限性,且缺乏高质量的循证证据支撑,临床获益有限^[6]。在2020—2024年期间,我国仅开展了不足10余项有关PLGC的临床注册试验,一些临床前新药研发在近5年也无进展——囿于既往治疗手段有限,药物品种缺乏,PLGC的治疗举步维艰,亟需新型改善、甚则逆转PLGC的药物。有鉴

于此,迫切需要多组分、多靶点药物来多维度干预CAG,抑制PLGC进展,并且明确其作用机制,为临床应用提供进一步的证据。CAG属中医“痞满”“胃痛”等疾病范畴,病变全程存在“虚、滞、痰、瘀、毒”等多种因素夹杂的情况,迁延难愈。中国中医科学院广安门医院刘震主任医师团队研制的中药复方和中消痞颗粒(HZXPG),可减轻萎缩性胃炎痞满、胃痛、纳呆等症状,改善胃镜下黏膜变薄、凹陷等病变,降低胃黏膜损伤程度^[7]。方中以党参为君,健脾益气生津,恢复脾胃的运化功能和受纳腐熟功能,针对脾胃气虚这一CAG发生的根本内因进行治疗。面对中焦气机壅滞、升降失司的病机,HZXPG以香附、茯苓为臣,疏肝理气解郁,健脾渗湿,使湿浊下行,以通气机,辅助君药的同时,直击CAG“气滞湿阻”的核心病机。为了兼顾CAG的常见病理产物,方中选用了活血化瘀的丹参与清热解毒、祛风利湿的藤梨根,改善因气滞湿阻导致的血行不畅、湿浊郁久出现的化热生毒。方药以干姜、黄连、法半夏、炒白术为佐,发挥干姜、黄连、法半夏角药之“辛开苦降”,佐助中焦气机升降平衡的恢复,并以炒白术佐助君药健脾燥湿,增强运化之力。最后以炙甘草为使药,调和诸药,使药力协同,共护中州。以此,共奏健脾和胃、理气活血、化湿解毒之效。但是,

HZXP对胃黏膜上皮细胞的具体作用机制尚不明确,有待进一步探索。

近年来,多项临床、基础研究指出,内质网应激(ERS)与PLGC的发生发展密切相关——PLGC患者胃组织中的肠道化生细胞ERS水平显著升高,PLGC动物胃组织匀浆磷酸化蛋白激酶R样内质网激酶(p-PERK)、活性转录因子6(ATF6)等ERS相关蛋白表达升高^[8-9]。其中,尼卡林(Ncln)在促进多通道膜蛋白易位到内质网膜方面起着至关重要的作用^[10],被认为是多种恶性肿瘤、烈性传染病的重要生物标志物^[11-12]。Ncln推动多通道膜蛋白易位到内质网膜后,在分子伴侣协助下实现氨基酸到蛋白质的折叠、翻译后修饰、正确折叠后蛋白的运输,以及处理错误折叠蛋白。在外界条件刺激下,如果蛋白无法正确折叠,就会触发未折叠蛋白反应(UPR),诱发ERS的发生,同时导致C/EBP同源蛋白(CHOP)表达增强并入核,阻碍细胞从G₁期向S期的正常过渡,并促进细胞程序性死亡。由此可见,抑制Ncln-CHOP轴或可成为干预PLGC的重要途径之一。

有鉴于此,本研究通过体外培养GES-1人胃黏膜细胞,以N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱导为造模方式模拟PLGC的病理过程。利用不同浓度HZXP含药血清干预,观察HZXP含药血清对MNNG诱导的GES-1细胞形态和凋亡情况,以明确HZXP含药血清对MNNG诱导的人胃黏膜细胞损伤的干预效果。通过检测ERS及Ncln/CHOP轴相关蛋白,明确HZXP含药血清调控ERS的具体作用机制,以期为HZXP干预PLGC提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 12只SPF级,雄性,体质量为200~220 g的SD大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号SCXK(京)2021-0011]。饲养于了未元(北京)医药科技有限公司SPF级动物房[许可证号SYXK(京)-2022-0007],饲养过程中,温度维持在22~24℃,湿度维持在40%~60%,光照和黑暗环境昼夜交替各12 h模式。本研究使用的GES-1人胃黏膜细胞,购自海星生物科技有限公司(货号TCH-C410),传至第8代备用。

1.2 伦理 动物实验全程严格遵守“实验动物管理与使用指南”相关要求。本动物实验得到了中国中医科学院广安门医院实验动物伦理委员会的正式批准(批准文号IACUC-GAMH-2025-015)。

1.3 药品与试剂 HZXP由中国中医科学院广安门医院药剂科提供,由党参15 g(批号24080121,规

格2.5 g中药颗粒)、炒白术10 g(批号24090351,规格1.4 g中药颗粒)、法半夏9 g(批号24090305,规格0.5 g中药颗粒)、黄连6 g(批号23010323,规格0.5 g中药颗粒)、茯苓10 g(批号24010153,规格0.6 g中药颗粒)、丹参15 g(批号24070142,规格1.4 g中药颗粒)、干姜6 g(批号24040081,规格0.3 g中药颗粒)、香附10 g(批号24120365,规格0.5 g中药颗粒)、藤梨根10 g(批号21100760,规格0.9 g中药颗粒)、炙甘草3 g(批号24070177,规格0.4 g中药颗粒)组成,中药配方颗粒均购自华润三九医药股份有限公司,室温储存于阴凉干燥处,灌胃前加入适量热水搅拌均匀使其充分溶解。大鼠灌胃给药剂量按照成人与大鼠等效剂量换算公式计算^[13],即大鼠给药剂量是人临床剂量的6.3倍,HZXP中药配方颗粒临床使用剂量为9 g·d⁻¹,按照成人体质量70 kg计算大鼠临床等效剂量:每只大鼠剂量=9 g·d⁻¹(HZXP临床用量)/70 kg×6.3=0.81 g·kg·d⁻¹。用高压过的双蒸水配制为所需浓度,分装保存于-80℃冰箱。

MNNG(纯度99.96%,上海皓元生物医药科技有限公司,目录号HY-128612);剪切的(cleaved)胱天蛋白酶(Caspase)-3、cleaved Caspase-8、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、BH3结构域凋亡诱导蛋白(Bid)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、ATF4、CHOP、Ncln、 β -肌动蛋白(β -actin)、羊抗兔二抗抗体(中国江苏亲科生物研究中心有限公司,货号分别为AF7022、AF5267、AF6139、AF0120、DF6016、AF5366、DF6008、AF6277、AF9130、AF7018、S0001);AF488标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)、AF647标记山羊抗兔IgG(H+L)、抗荧光淬灭封片液[含4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)]、一步法原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒、Hanks'平衡盐溶液(HBSS)试剂、内质网绿色荧光探针(ER-Tracker Green)试剂盒、Hoechst 33342活细胞染色液(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为A0423、A0468、P0131、C1086、C0218、C1042S、C1029);二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号23225);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、AbFluor594-鬼笔环肽、磷脂结合蛋白V/碘化丙啶(Annexin V/PI)试剂盒(美国Abbkine公司,货号分别为KTA1020、BMD0084、KTA0004)。

1.4 仪器 ZEISS primo star型正置生物显微镜[卡尔蔡司光学(中国)有限公司];DM 6000 B型倒置显微镜、STELLARIS型共聚焦显微镜平台[徕卡显微

系统(上海)贸易有限公司];NEO 15R型4℃高速离心机(中国上海力申科学仪器有限公司);FACSymphony™ A1型流式细胞仪(美国BD公司);Bio-Rad 19型凝胶成像系统、Mini-PRO TEAN Tetra Cell型电泳仪、小型转印槽(半干转印)、PowerPac Basic Power Supply基础型电泳电源[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 含药血清制备 将实验大鼠采用随机数字表法随机分为空白组(等体积0.9%双蒸水灌胃,2 mL/只)、HZXPG组(HZXPG灌胃,2 mL/只),每组6只。经过1周适应性喂养后,禁食12 h,根据既定分组方案给予大鼠双蒸水或药物灌胃处理。每12 h通过灌胃方式给药1次,共计7次。在最后1次给药前予大鼠禁食不禁水处理12 h,灌胃结束1 h后,使用3%戊巴比妥钠溶液($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)对大鼠进行腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,在4℃条件下,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径10 cm,下同),收集上清,在56℃条件下灭活补体30 min,并使用0.22 μm 超滤除菌后,分装至15 mL离心管中,存于-80℃冰箱备用。

2.2 细胞系及细胞培养 GES-1细胞株培养于 T_{75} 培养瓶中,用RPMI-1640完全培养基培养[含10%胎牛血清(FBS), $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素],将状态良好的细胞置于37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中,待细胞汇合度达到80%~90%时,弃去DMEM完全培养基,加入磷酸盐缓冲液(PBS)5 mL清洗,弃去PBS,加入含0.25%乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶2 mL进行细胞消化,待细胞从培养皿上完全脱落时,加入DMEM完全培养基4 mL终止消化, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃去上清液,加入RPMI-1640完全培养基4 mL重悬细胞。按1:4~1:3比例,传至 T_{75} 培养瓶中培养,每2~3 d更换1次培养基。

2.3 细胞分组与干预 细胞分为空白组(10%空白血清+RPMI 1640空白培养基)、模型组(MNNG+10%空白血清+RPMI 1640空白培养基)、HZXPG低剂量组(5%HZXPG含药血清+5%空白血清+RPMI-1640空白培养基)、HZXPG高剂量组(10%HZXPG含药血清+RPMI-1640空白培养基),共计4组,干预24 h。

2.4 CCK-8法检测MNNG对GES-1人胃黏膜细胞活力影响 将生长状态良好的GES-1人胃黏膜细胞消化,重悬,按每孔100 μL 的体系接种于96孔板中(0.2×10^4 个/孔),放置于37℃、5% CO_2 条件的培养

箱培养,每孔细胞汇合度为80%左右时,小心吸出培养基,PBS清洗2次后,分别加入0(空白组)、0.781 25、1.562 5、3.125、6.25、12.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的MNNG,每组6个平行孔,放入培养箱继续培养24 h后每孔加入CCK-8溶液10 μL (避光),继续在37℃培养箱中孵育2 h,随后采用酶标仪检测各孔在50 nm波长处的吸光度 A ,根据 A 计算细胞的活力,以第1天 A 值为1,计算随后24 h细胞的相对活力,并绘制细胞的生长曲线,根据细胞的相对活力评价细胞的增殖情况。细胞活力计算公式:细胞活力改变倍数=第 n 天 A /第1天 A 。

2.5 鬼笔环肽染色检测HZXPG缓解MNNG诱导的GES-1人胃黏膜细胞表面积情况 将状态良好的GES-1人胃黏膜细胞从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个/皿的数量种在激光共聚焦小皿中,经MNNG与不同浓度HZXPG含药血清干预后,弃去培养基,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。而后使用免疫染色固定液固定细胞20 min,弃去免疫染色固定液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。使用PBS稀释的0.1%Triton进行细胞膜通透10 min,弃去通透液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。将100 $\times$ 鬼笔环肽检测液用二甲基亚砜(DMSO)溶解为1 $\times$ 后,分装,保存于-20℃冰箱,将1 $\times$ 鬼笔环肽检测液用PBS以1:100浓度稀释,室温避光孵育30 min,弃去鬼笔环肽工作液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。滴加抗荧光淬灭封片液后,使用荧光显微镜拍摄。

2.6 TUNEL荧光检测GES-1人胃黏膜细胞凋亡情况 将状态良好的GES-1人胃黏膜细胞从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个/皿的数量种在共聚焦小皿中,经MNNG与不同浓度HZXPG含药血清干预后,弃去培养基,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。而后使用免疫染色固定液固定细胞20 min,弃去免疫染色固定液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。使用免疫染色通透液10 min,弃去免疫染色通透液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。配制TUNEL检测液,按照3:1的比例用TdT酶稀释液将TdT酶稀释,而后与荧光标记液以1:9的比例配制混匀,50 μL /皿进行避光孵育,37℃培养箱中,1 h后弃掉荧光标记液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。用含DAPI荧光封片剂封片后,使用荧光显微镜进行拍摄。

2.7 Annexin V/PI流式细胞术检测GES-1人胃黏膜细胞凋亡周期 将状态良好的GES-1人胃黏膜

细胞从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个/孔的数量种在6孔板中,经MNNG与不同浓度HZXPG含药血清干预后,弃去培养基,使用PBS清洗细胞,后将干预好的细胞从6孔板中使用胰酶(不含EDTA)消化下来,收集细胞,用 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心5 min,用预冷的PBS清洗2次细胞后再用Annexin V Binding Buffer 100 μL 重悬细胞,加入Annexin V -AbFluor™ 647液5 μL 和PI 2 μL ,轻柔混匀,室温避光孵育15 min。孵育结束后加入1 $\times$ Annexin V Binding Buffer 400 μL ,轻柔混匀后置于冰上。染色后30 min内,通过流式细胞仪分析细胞。

2.8 内质网探针检测内质网肿胀情况 将状态良好的GES-1人胃黏膜细胞从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个/皿的数量种在共聚焦小皿中,经MNNG与不同浓度HZXPG含药血清干预后,弃去培养基,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。取少量ER-Tracker Green按照1:1 000的比例加入ER-Tracker Green稀释液中,制成工作液,并放于37 $^{\circ}\text{C}$ 预温育。用适量HBSS洗涤细胞,弃液后,加入ER-Tracker Green染色工作液,与GES-1细胞37 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育30 min。而后用RPMI-1640空白培养基洗涤细胞2次,按照1:100的比例加入Hoechst 33342活细胞染色液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育10 min后,用激光共聚焦显微镜进行观察。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GES-1人胃黏膜细胞凋亡、ERS及Ncln/CHOP轴相关蛋白表达情况 将GES-1人胃黏膜细胞以 1.0×10^5 的密度接种于6孔板,MNNG及HZXPG含药血清干预后,收集细胞。每管加入适量的裂解液(1 mL裂解液中添加100 $\times$ Cocktail 10 μL 、100 $\times$ PMSF 10 μL 、10 $\times$ Phosstop 100 μL 、Western及IP裂解液880 μL),置于冰上裂解细胞,每间隔5 min涡旋振荡,待30 min后细胞充分裂解,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心机14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,随后收集上清液于新的离心管中,以用于后续浓度测量及相关蛋白检测。根据BCA试剂盒说明书测取提取的蛋白浓度,随后加入十二烷基硫酸钠(SDS)置于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅变性5 min。采用8%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离相等分子量的蛋白,并通过电转仪转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液室温(15~30 $^{\circ}\text{C}$)封闭2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、Bax、Bcl-2、Bid、重链结合蛋白(BiP)、Ncln、CHOP(1:1 000), β -actin(1:5 000)后,用含0.2%Tween的TBST洗膜

3次,每次5 min,室温(15~30 $^{\circ}\text{C}$)孵育相对应的二抗(1:10 000)2 h后,TBST清洗3次,将PVDF膜置于Bio-Rad 19凝胶成像系统中,均匀滴入1:1的增强化学发光法(ECL)显影液,进行扫描和数据分析。

2.10 免疫荧光检测Ncln/CHOP轴相关蛋白表达情况 将状态良好的GES-1人胃黏膜细胞从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个/皿的数量种在共聚焦小皿中,经MNNG与不同浓度HZXPG含药血清干预后,弃去培养基,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。而后使用免疫染色固定液固定细胞20 min,弃去免疫染色固定液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。使用免疫染色通透液10 min,弃去免疫染色通透液,使用PBS清洗细胞3次,每次5 min。以1:200配制CHOP抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,后弃掉一抗,用PBS清洗细胞3次,每次5 min,而后加入以PBS配制的AF488标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗(1:500),室温条件下避光孵育2 h。弃掉荧光二抗,在避光条件下,用PBS清洗细胞3次,每次5 min,而后加入1:200配制的Ncln抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,后弃掉一抗,用PBS清洗细胞3次,每次5 min,而后加入以PBS配制的AF647标记山羊抗兔IgG(H+L)(1:500),室温条件下避光孵育2 h。弃掉荧光二抗,在避光条件下,用PBS清洗细胞3次,每次5 min,加入含DAPI的抗荧光淬灭封片液,用激光共聚焦显微镜观察,用Image J统计荧光量。

2.11 统计学处理 使用SPSS 27.0版本软件对数据进行统计与分析,数据符合正态分布进行单因素方差分析(ANOVA),并行方差齐性检验,方差齐的数据使用Bonferroni检验,方差不齐的数据使用Dunnett检验进行非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MNNG对GES-1人胃黏膜细胞活力影响 与空白组比较,在MNNG干预24 h后,在0~12.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,细胞活力显著降低($P < 0.01$),随MNNG剂量增加,GES-1细胞增殖受抑制呈浓度依赖性。本研究后续实验采用1.562 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为实验的建模浓度。见表1。

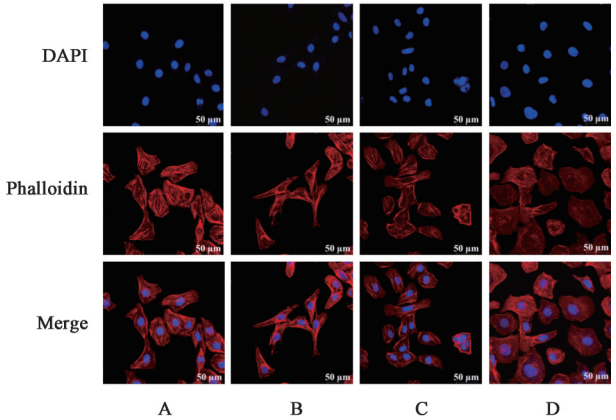
3.2 HZXPG对GES-1人胃黏膜细胞形态的影响 与空白组比较,模型组GES-1细胞表面积显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,给药干预后HZXPG高剂量组显著抑制了MNNG诱导的胃黏膜细胞表面积的降低($P < 0.01$),而HZXPG低剂量组细胞的表面积中位数有所升高,但是差异无统计学意义。

表1 MNNG对GES-1人胃黏膜细胞活力影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 1 Effect of MNNG on GES-1 human gastric mucosal cells viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力/%
空白组		100.17 $\pm$ 2.20
MNNG组	0.781 25	93.70 $\pm$ 2.19 ¹⁾
	1.562 5	92.91 $\pm$ 2.25 ¹⁾
	3.125	82.16 $\pm$ 3.93 ¹⁾
	6.25	61.79 $\pm$ 1.64 ¹⁾
	12.5	45.75 $\pm$ 3.22 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

高剂量 HZXPB 干预可以抑制 MNNG 刺激引起的胃黏膜细胞形态改变。见图 1、表 2。



注:A.空白组;B.模型组;C.HZXPB低剂量组;D.HZXPB高剂量组(图2-图6同)

图1 HZXPB对GES-1细胞形态影响(鬼笔环肽,×400)
Fig. 1 Effect of HZXPB on morphology of GES-1 cells (phalloidin, ×400)

表2 HZXPB对GES-1细胞表面积的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Effect of HZXPB on surface area of GES-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	胃黏膜细胞表面积	中位数
空白组		3 733.40 $\pm$ 235.48	3 780.48
模型组		1 887.75 $\pm$ 139.13 ¹⁾	1 893.00
HZXPB低剂量组	5	2 243.90 $\pm$ 436.36	2 345.87
HZXPB高剂量组	10	2 525.19 $\pm$ 226.61 ³⁾	2 528.73

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表3-表8同)

3.3 HZXPB对GES-1细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组GES-1人胃黏膜细胞凋亡阳性标记率显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,给药干预后HZXPB各剂量组GES-1细胞凋亡率均显著降低($P<0.01$)。HZXPB可显著改善MNNG诱导的

GES-1胃黏膜细胞的凋亡情况。见图2、表3。

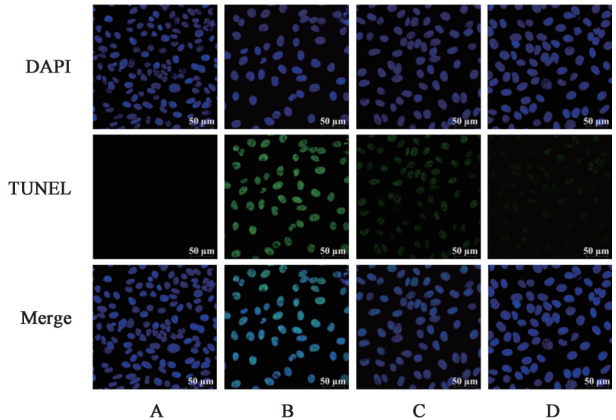


图2 HZXPB对GES-1细胞凋亡的影响(TUNEL,×400)
Fig. 2 Effect of HZXPB on apoptosis of GES-1 cells (TUNEL, ×400)

表3 HZXPB对GES-1细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Effect of HZXPB on apoptosis of GES-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	TUNEL染色阳性率/%
空白组		0.02 $\pm$ 0.00
模型组		62.60 $\pm$ 1.53 ¹⁾
HZXPB低剂量组	5	7.76 $\pm$ 1.60 ³⁾
HZXPB高剂量组	10	2.75 $\pm$ 0.21 ³⁾

3.4 HZXPB对GES-1细胞各期凋亡的影响 与空白组比较,模型组MNNG刺激后GES-1细胞出现凋亡,早期凋亡率和晚期凋亡率均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,给药干预后HZXPB各剂量组胃黏膜细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率均显著降低($P<0.01$)。见表4和增强出版附加材料。

表4 HZXPB对MNNG诱导的GES-1细胞凋亡的凋亡周期的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of HZXPB on MNNG induced apoptotic cycle of apoptosis in GES-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	早期凋亡率	晚期凋亡率
空白组		0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组		32.27 $\pm$ 0.38 ¹⁾	10.90 $\pm$ 0.36 ¹⁾
HZXPB低剂量组	5	20.10 $\pm$ 1.28 ³⁾	5.40 $\pm$ 0.17 ³⁾
HZXPB高剂量组	10	21.20 $\pm$ 0.66 ³⁾	4.27 $\pm$ 0.15 ³⁾

3.5 HZXPB对GES-1细胞凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较,模型组凋亡诱导因子同源结构域相互作用蛋白激酶2抑制剂(tBid)、促凋亡因子Bax、活化后的凋亡信号执行蛋白cleaved Caspase-3和活化后的细胞凋亡信号传导途中的启动蛋白cleaved Caspase-8表达水平均显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),抑凋亡因子Bcl-2表达水平显

著降低($P<0.01$)。与模型组比较,HZXPG低剂量组 tBid、Bax 表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),抗凋亡因子 Bcl-2 的表达显著升高($P<0.01$);HZXPG 高剂量组 tBid、Bax、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-8 表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见表 5、图 3。

表 5 HZXPG 对 GES-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 5 Effect of HZXPG on expression of apoptosis-related protein in GES-1 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数/%	cleaved Caspase-8/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	tBid/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
空白组		0.72 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.20	0.35 $\pm$ 0.16	0.44 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.10
模型组		1.41 $\pm$ 0.14 ¹⁾	1.33 $\pm$ 0.12 ¹⁾	0.81 $\pm$ 0.10 ¹⁾	0.94 $\pm$ 0.05 ¹⁾	0.57 $\pm$ 0.02 ¹⁾
HZXPG 低剂量组	5	1.31 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.09	0.60 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.62 $\pm$ 0.10 ³⁾	1.00 $\pm$ 0.19 ³⁾
HZXPG 高剂量组	10	1.05 $\pm$ 0.15 ³⁾	0.77 $\pm$ 0.14 ³⁾	0.59 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.37 $\pm$ 0.12 ²⁾	0.84 $\pm$ 0.02 ²⁾

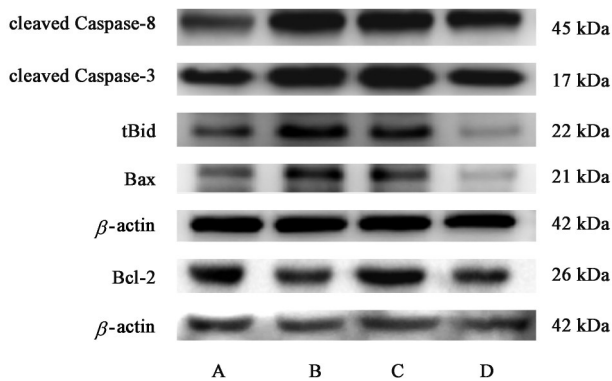


图 3 GES-1 细胞凋亡相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of apoptosis-related protein expression in GES-1 cells

3.6 HZXPG 对 GES-1 细胞 ER 形态影响 与空白组比较,模型组中内质网探针染色面积显著扩大($P<0.01$),提示细胞出现内质网扩张。与模型组比较,HZXPG 两剂量组内质网探针染色面积显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),提示 HZXPG 可显著改善 ERS 带来的内质网扩张情况。见图 4、表 6。

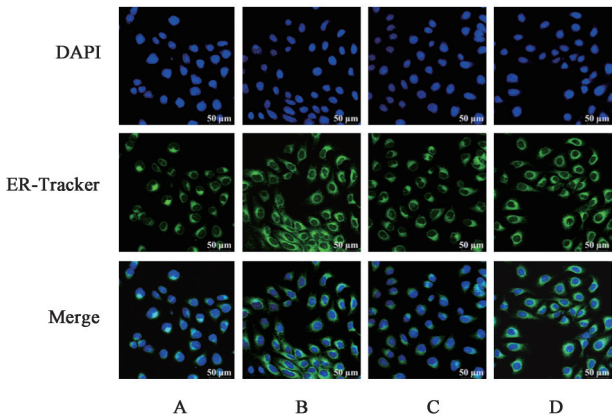


图 4 HZXPG 对 MNNG 诱导的 GES-1 细胞内质网形态的影响 (内质网荧光探针,×400)
Fig. 4 Effect of HZXPG on endoplasmic reticulum morphology of GES-1 cells induced by MNNG(ER-tracker green,×400)

表 6 HZXPG 对 MNNG 诱导的 GES-1 细胞内质网面积的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 6 Effect of HZXPG on endoplasmic reticulum area of GES-1 cells induced by MNNG ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数/%	内质网面积/DAPI 面积/%
空白组		5.24 $\pm$ 1.06
模型组		18.07 $\pm$ 2.17 ¹⁾
HZXPG 低剂量	5	10.05 $\pm$ 1.02 ³⁾
HZXPG 高剂量	10	11.63 $\pm$ 0.49 ³⁾

3.7 HZXPG 对 GES-1 细胞 ERS 及 Ncln/CHOP 轴相关蛋白表达影响 与空白组比较,模型组中 BiP、Ncln、CHOP 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,HZXPG 高剂量组 BiP、Ncln、CHOP 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 5、表 7。

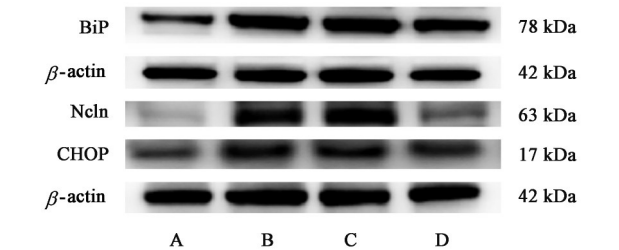


图 5 GES-1 细胞 ERS 及 Ncln/CHOP 轴相关蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of ERS and Ncln/CHOP signaling pathway-related protein expression in GES-1 cells

表 7 HZXPG 对 GES-1 细胞 ERS 及 Ncln/CHOP 轴相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 7 Effect of HZXPG on ERS and Ncln/CHOP signaling pathway-related protein expression in GES-1 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数/%	BiP/ β -actin	Ncln/ β -actin	CHOP/ β -actin
空白组		0.87 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.15	0.47 $\pm$ 0.26
模型组		1.51 $\pm$ 0.04 ¹⁾	1.35 $\pm$ 0.05 ¹⁾	1.30 $\pm$ 0.05 ¹⁾
HZXPG 低剂量组	5	1.37 $\pm$ 0.07	1.35 $\pm$ 0.11	1.17 $\pm$ 0.11
HZXPG 高剂量组	10	1.27 $\pm$ 0.10 ²⁾	0.80 $\pm$ 0.14 ³⁾	0.72 $\pm$ 0.30 ³⁾

3.8 HZXPG对GES-1细胞Ncln/CHOP轴蛋白表达位置的影响 与空白组比较,模型组中Ncln、CHOP蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),且CHOP蛋白在细胞质和细胞核均有表达。与模型组比较,HZXPG低、高剂量组Ncln、CHOP蛋白水平平均显著降低($P<0.01$)。见图6、表8。

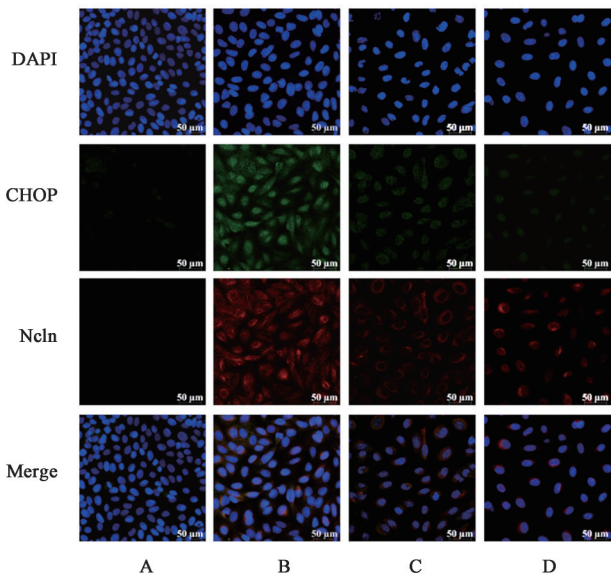


图6 GES-1细胞Ncln/CHOP轴相关蛋白表达情况
Fig. 6 Expression of Ncln/CHOP axial-related proteins in GES-1 cells

表8 HZXPG对GES-1细胞Ncln/CHOP轴相关蛋白表达影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of HZXPG on Ncln/CHOP signaling pathway-related protein expression in GES-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %			
组别	体积分数/%	Ncln面积/DAPI面积	CHOP面积/DAPI面积
空白组		22.46±2.83	4.68±1.17
模型组		1.51±0.11 ¹⁾	23.17±3.10 ¹⁾
HZXPG低剂量组	5	6.34±1.30 ³⁾	5.36±0.67 ³⁾
HZXPG高剂量组	10	13.04±1.62 ³⁾	1.91±0.47 ³⁾

4 讨论

CAG是胃癌前病变的关键阶段,属临床常见病,随着胃镜检查的普及、民众对消化系统疾病关注度的提高,以及老龄化社会进程的加快,其患病率及检出率逐年增长^[14]。因此,美国胃肠病协会将内镜筛查和PLGC监测作为胃癌的二级预防,以降低高危人群中GC的发病率和死亡率^[15]。通常情况下,CAG进展相对缓慢,但仍有1.09%的概率发展为低级别或高级别上皮内瘤变,0.14%的概率发展为GC^[16]。有鉴于此,深入研究CAG发病机制,充分发挥中医药特色,实现GC的早期识别、早期干预、

早期防复,对降低胃癌病死率大有裨益。

本研究选用的HZXPG是中国中医科学院广安门医院刘震主任医师团队针对CAG病因病机研制的中药复方。该方以健脾和胃、理气活血、化湿解毒为基本治法,针对CAG对应的中医“痞满”病核心病机——脾胃气虚为本,中焦气机壅滞、升降失常、寒热错杂、湿瘀互结为标,一一对应治疗。方中以党参为君药,大补脾胃之气,健运中焦,奠定恢复升降功能之基础。臣药以茯苓健脾渗湿、香附疏肝理气,共畅中焦气机、祛除湿浊之效,丹参活血化瘀通络、藤梨根清热解毒化湿,针对气滞湿阻产生的瘀血与郁热、郁毒进行干预。佐药由辛开散寒之干姜、辛开降逆燥湿之法半夏与苦降清热燥湿之黄连相配,构成辛开苦降之核心组合,直接疏通壅滞、调和寒热以消痞满,加以炒白术助君健脾燥湿,合以炙甘草为使,益气和中,调和诸药。全方标本兼顾,补泻同施,寒热并用,共奏健脾和胃以复运化、理气活血以畅郁滞、化湿解毒以清浊邪、辛开苦降以调升降之效,使中焦气机调畅,痞满自除,契合中医脾胃学说在治疗复杂痞满病证中的整体观和辨证论治精髓。本研究,以HZXPG含药血清干预MNNG诱导的GES-1细胞,探索HZXPG干预CAG的具体机制。

既往研究指出,CAG的发生发展常伴随氧化应激平衡的持续破坏^[17-18]。氧化应激刺激活性氧(ROS)产生与积累,可启动下游信号转导级联反应,形成炎症-氧化应激恶性循环,并导致细胞损伤。此外,氧化应激与慢性炎症密切相关,细胞内氧化应激的发生亦能通过NF-κB等信号通路激活下游炎症反应,进而促进癌变^[19]。在胃组织中,由慢性炎症引发的氧化应激主要源自免疫细胞和胃黏膜细胞,是诱发细胞DNA损伤、凋亡及癌变的关键因素^[20]。由此可见,炎症与氧化应激的相互作用构成了细胞癌变的重要基础^[21]。细胞内质网在代谢中发挥核心作用,ERS为代表的功能紊乱可导致蛋白质合成失控,腔内未折叠/错误折叠蛋白聚集,从而激活UPR。慢性ERS造成的细胞损伤会进一步激活UPR,引发细胞内钙稳态与氧化还原平衡失调,加剧内质网中有毒物质累积,最终破坏基本细胞器功能及细胞骨架结构,参与肿瘤的发生和发展^[22-23]。值得注意的是,UPR并非完全有害——他能识别ER中未折叠蛋白的积聚,并通过促进Ncln介导的多通道膜蛋白易位至内质网膜,增强ER的蛋白质折叠能力,形成ER适应性反应^[24]。为应对此信号,

细胞加速葡萄糖分解,释放BiP蛋白(GRP78),激活ERS下游通路^[25]。若ERS得以缓解、ER稳态恢复,则UPR被终止;反之,若功能持续失调,UPR则难以有效控制ERS程度,导致其主要效应蛋白CHOP表达上调。CHOP蛋白大量入核后,可抑制DNA与组蛋白合成,下调抗凋亡蛋白Bcl-2表达,引起细胞周期阻滞并促进细胞凋亡^[26]。当前研究指出,瑞巴派特为代表的胃黏膜保护剂可通过抑制ERS,并激活自噬相关蛋白来减轻胃上皮细胞损伤^[27],而安胃汤为代表的复方却可通过miRNA途径调控ERS途径改善胃黏膜肠上皮化生^[28],中药沉香的提取物则通过调控ERS经典通路PERK/真核细胞起始因子2 α (eIF2 α)/CHOP信号通路,抑制胆汁反流性胃炎模型的胃黏膜上皮细胞凋亡^[29],但对于药物防治CAG模型诱发的胃黏膜上皮细胞ERS的研究仍旧较少。

本研究通过MNNG刺激GES-1人胃黏膜细胞在体外模拟CAG的疾病模型,通过鬼笔环肽染色、TUNEL染色、Annexin V/PI染色证实在MNNG刺激作用下,GES-1人胃黏膜细胞出现明显的萎缩和凋亡,Western blot结果证实,GES-1人胃黏膜细胞在MNNG刺激下可启动ERS程序,活化Ncln-CHOP轴,并诱发细胞凋亡。而经HZXPG含药血清干预后,可显著改善人胃黏膜细胞萎缩和凋亡情况,尤其对于人胃黏膜细胞早期和晚期凋亡的干预效果最为明显。Western blot进一步证实,HZXPG含药血清可显著下调人胃黏膜细胞凋亡诱导因子Bid,促凋亡因子Bax,活化后的凋亡信号执行蛋白cleaved Caspase-3及凋亡信号启动蛋白cleaved Caspase-8蛋白的表达,上调抑凋亡因子Bcl-2,抑制人胃黏膜细胞凋亡。此外,本研究通过Western blot对ERS关键蛋白BiP和Ncln-CHOP轴的相关蛋白进行检测,并利用免疫荧光共定位观察Ncln-CHOP轴的相关蛋白的表达位置,指出MNNG刺激可以通过活化下游Ncln-CHOP轴,激活ERS,即ERS产生的凋亡信号是通过Ncln-CHOP轴传递。而HZXPG含药血清则可通过抑制Ncln的表达和CHOP蛋白的入核情况,改善MNNG对ERS下游Ncln-CHOP轴的活化的影响。由此可知,HZXPG通过抑制ERS下游Ncln-CHOP轴的活化,减轻胃黏膜细胞ERS水平,抑制细胞凋亡。

本研究为HZXPG干预CAG及ERS的相关性提供了实验基础,并初步探索了HZXPG通过改善ERS,抑制胃黏膜上皮细胞凋亡,对胃黏膜细胞的保护机制。与常规三大经典UPR支路不同,本研究探

索的Ncln-CHOP轴并非独立于三大经典支路外的通路,而是经典UPR三大分支下游的重要功能执行者。具体而言,Ncln作为ER膜通道蛋白^[30],促进错误折叠蛋白的逆向转运,以减轻ER蛋白负荷。同时,增强ER相关降解效率,加速毒性蛋白清除,以促进ER稳态的恢复,是UPR适应性反应的关键蛋白。而CHOP作为PERK支路的终末效应蛋白,可通过上调促凋亡因子来抑制抗凋亡蛋白表达,触发线粒体凋亡途径,并通过下调抗氧化酶等途径促进氧化应激,放大ERS损伤。可知CHOP是UPR促凋亡效应的核心执行者,Ncln是促生存的关键媒介,Ncln-CHOP轴在UPR信号网络中形成动态平衡,共同决定细胞命运。但仍需进一步探索,Ncln-CHOP轴与ERS三大经典通路之间的具体作用途径,通过质粒转染或慢病毒感染的方式,敲低或敲除Ncln,观察肌醇需求酶1 α (IRE1 α)、PERK、ATF6三大分支下游通路的改变情况,明确HZXPG借由Ncln/CHOP轴调控ERS保护胃黏膜的具体作用通路。

综上所述,HZXPG含药血清的干预,能够有效缓解MNNG诱导的GES-1细胞损伤,抑制细胞凋亡,其机制可能与调节Ncln-CHOP轴活化,降低胃黏膜细胞ERS水平相关。

〔利益冲突〕 本文不存在任何利益冲突。

〔参考文献〕

- [1] YIN Y, LIANG H, WEI N, et al. Prevalence of chronic atrophic gastritis worldwide from 2010 to 2020: An updated systematic review and Meta-analysis[J]. Ann Palliat Med, 2022, 11(12): 3697-3703.
- [2] SHAH S C, PIAZUELO M B, KUIPERS E J, et al. AGA clinical practice update on the diagnosis and management of atrophic gastritis: Expert review[J]. Gastroenterology, 2021, 161(4): 1325-1332.
- [3] DU Y, BAI Y, XIE P, et al. Chronic gastritis in China: A national multi-center survey[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 21.
- [4] LI H, LI J, LAI M. Efficacy analysis of folic acid in chronic atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and Meta-analysis [J]. BMC Gastroenterol, 2025, 25(1): 69.
- [5] LEI J, REN F, LI W, et al. Use of folic acid supplementation to halt and even reverse the progression of gastric precancerous conditions: A meta-analysis[J]. BMC Gastroenterol, 2022, 22(1): 370.
- [6] CAO D Z, SUN W H, OU X L, et al. Effects of folic acid on epithelial apoptosis and expression of Bcl-2 and p53 in premalignant gastric lesions[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(11): 1571-1576.
- [7] 罗楠,李萌,夏晨曦,等. 基于网络药理学的健脾通络解毒方治疗慢性萎缩性胃炎作用机制研究[J]. 中国医院用药评价与分

- 析, 2023, 23(10): 1156-1162.
- LUO N, LI M, XIA C X, et al. Mechanism of Jianpi Tongluo Jiedu recipe in the treatment of chronic atrophic gastritis based on network pharmacology[J]. Eval Anal Drug-Use Hosp China, 2023, 23(10): 1156-1162.
- [8] PARK J M, HAN Y M, OH J Y, et al. Fermented kimchi rejuvenated precancerous atrophic gastritis via mitigating *Helicobacter pylori*-associated endoplasmic reticulum and oxidative stress[J]. J Clin Biochem Nutr, 2021, 69(2): 158-170.
- [9] MOMMERSTEEG M C, SIMOVIC I, YU B, et al. Autophagy mediates ER stress and inflammation in *Helicobacter pylori*-related gastric cancer[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2015238.
- [10] LUO H J, ZHU L T, DAI Y, et al. NCLN as a potential prognosis biomarker in endometrial cancer[J]. Heliyon, 2024, 10(20): e38720.
- [11] GOMEZ R S, EL MOUATANIA A, DUARTE-ANDRADE F F, et al. Comprehensive genomic analysis of cemento-ossifying fibroma[J]. Mod Pathol, 2024, 37(2): 100388.
- [12] MWANZA J C, KAHINDO A K, MBUSA-KOMBI J, et al. Ophthalmological manifestations and plasma markers of inflammation in Ebola survivors in post-treatment era[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 14966.
- [13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1937.
- XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Methodology of Pharmacological Experiment[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1937.
- [14] 吕宾, 王彦刚, 胡玥, 等. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗专家共识(2025年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2025, 33(3): 230-241.
- LYU B, WANG Y G, HU Y, et al. Expert consensus on integrated traditional Chinese and western medicine diagnosis and treatment of chronic atrophic gastritis (2025)[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2025, 33(3): 230-241.
- [15] SHAH S C, WANG A Y, WALLACE M B, et al. AGA clinical practice update on screening and surveillance in individuals at increased risk for gastric cancer in the United States: Expert review[J]. Gastroenterology, 2025, 168(2): 405-416.
- [16] PIAZUELO M B, BRAVO L E, MERA R M, et al. The Colombian chemoprevention trial: 20-year follow-up of a cohort of patients with gastric precancerous lesions [J]. Gastroenterology, 2021, 160(4): 1106-1117.
- [17] CHEN C, FU Y H, LI M H, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics approach to evaluate preventive and therapeutic effects of *Gastrodia elata* Blume on chronic atrophic gastritis[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 164: 231-240.
- [18] LI L, DU Y, WANG Y, et al. Atractylone alleviates ethanol-induced gastric ulcer in rat with altered gut microbiota and metabolites[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 4709-4723.
- [19] REUTER S, GUPTA S C, CHATURVEDI M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [20] HARDBOWER D M, DE SABLET T, CHATURVEDI R, et al. Chronic inflammation and oxidative stress: The smoking gun for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer?[J]. Gut Microbes, 2013, 4(6): 475-481.
- [21] CHEN Z, FAN J, CHEN X, et al. Oxidative stress and redox signaling in gastric cancer: From mechanisms to therapeutic implications[J]. Antioxidants (Basel), 2025, 14(3): 258.
- [22] ZHANG W, SHI Y, OYANG L, et al. Endoplasmic reticulum stress-a key guardian in cancer[J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1): 343.
- [23] 彭孟凡, 苗晋鑫, 田硕, 等. 内质网应激对肿瘤发生发展的影响及中医药的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 215-221.
- PENG M F, MIAO J X, TIAN S, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress on tumorigenesis and development and intervention of traditional Chinese medicine: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(22): 215-221.
- [24] BONSIGNORE G, MARTINOTTI S, RANZATO E. Endoplasmic reticulum stress and cancer: Could unfolded protein response be a druggable target for cancer therapy?[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1566.
- [25] POBRE K F R, POET G J, HENDERSHOT L M. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends [J]. J Biol Chem, 2019, 294(6): 2098-2108.
- [26] LIN Y, JIANG M, CHEN W, et al. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109249.
- [27] HE Q, LIU M, RONG Z, et al. Rebamipide attenuates alcohol-induced gastric epithelial cell injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and activating autophagy-related proteins[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 922: 174891.
- [28] 梁柳观, 唐友明, 郑景辉, 等. 基于 miR-584 调控内质网应激途径安胃汤干预胃黏膜肠上皮化生作用机制研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(11): 2570-2576.
- LIANG L G, TANG Y M, ZHENG J H, et al. Exploring the mechanism of An-Wei decoction intervention on gastric intestinal epithelial metaplasia through miR-584 regulation of endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(11): 2570-2576.
- [29] 马家乐, 王鑫玉, 靳凤玉, 等. 沉香提取物保护胆汁酸诱导胃黏膜损伤的药理机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 793-794.
- MA J L, WANG X Y, JIN F Y, et al. Pharmacological mechanism by which agarwood extract protects against bile acid-induced gastric mucosal injury[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(10): 793-794.
- [30] HAFFNER C, DETTMER U, WEILER T, et al. The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-Nodal modulator (NOMO) membrane protein complex [J]. J Biol Chem, 2007, 282(14): 10632-10638.

[责任编辑 王鑫]