

人参皂昔在治疗因 *CLDN18-ARHGAP26* 表达引起的耐化疗药治疗过程中的抗肿瘤作用

李靖,谢波,汪虎,张晨嵩,贾建光,潘成武,马家驰

摘要 目的 探究胃癌细胞中 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因引起的耐化疗药的作用,并探究人参皂昔在治疗因 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因表达引起的耐化疗药治疗过程中的抗肿瘤作用。方法 采用免疫磁珠抗体标记胃癌细胞系 BGC-823 的侧群 (SP) 细胞和非侧群 (NSP) 细胞,选出 NSP 细胞转染过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因的慢病毒载体。用 qPCR 检测细胞中 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因和三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ABCG2) mRNA 水平的表达。用 Western blot 检测转染上皮-间质转化 (EMT) 相关蛋白 E-Cadherin、Vimentin 的表达。用 CCK-8 检测转染细胞对化疗药奥沙利铂的敏感性。用 CCK-8 检测人参皂昔对转染细胞耐药性的影响。人参皂昔处理转染细胞后 Western blot 检测转染细胞的钙黏蛋白 E (E-Cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的表达。结果 qPCR 检测显示转染过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因慢病毒载体的 NSP 细胞中 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因表达高于未转染组, ABCG2 mRNA 表达高于未转染组 ($P < 0.001$)。Western bolt 显示过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因的 NSP 细胞中 E-Cadherin 蛋白表达低于未转染组 ($P < 0.05$), Vimentin 蛋白表达高于未转染组 ($P < 0.01$), 转染细胞对奥沙利铂的敏感性低于未转染组 ($P < 0.05$)。人参皂昔和奥沙利铂同时处理转染细胞, 细胞存活率低于单纯奥沙利铂处理 ($P < 0.05$)。人参皂昔处理转染细胞后 E-Cadherin 蛋白表达高于未处理组 ($P < 0.01$), Vimentin 蛋白表达低于未处理组 ($P < 0.05$)。结论 人参皂昔能逆转胃癌细胞中 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因表达诱导的细胞 EMT 转化和奥沙利铂的耐药性。

关键词 人参皂昔; *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因; 上皮-间质转化; 耐药性

中图分类号 R 573.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0111-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.021

胃癌 (gastric carcinoma, GC) 是世界上最常见

的恶性肿瘤之一,全球发病率排名第五,病死率排名第三^[1]。虽然手术治疗、放疗和化疗已被应用于胃癌的治疗,但胃癌患者的 5 年生存率仍低于 30%^[2]。基因重组是癌症的一个标志,可导致具有致癌特性的基因融合^[3]。近年来研究^[4]表明,胃癌中有 *CLDN18-ARHGAP26* 融合基因。表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合期的胃癌细胞系上皮表型明显减少,出现上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 表型,从而对目前主要的胃癌化疗相关药物耐药。研究^[5]表明,人参皂昔可以有效抑制胃癌细胞的增殖并促进胃癌细胞的凋亡,在低浓度奥沙利铂 (oxaliplatin, L-OHP) 细胞模型中人参皂昔可以显著提高低浓度的奥沙利铂对胃癌侧群 (side population, SP) 细胞的敏感性,而在耐奥沙利铂胃癌 EMT 模型中,人参皂昔可以有效逆转胃癌耐药细胞株 EMT,从而达到抗肿瘤的效果。该研究中利用人参皂昔干预探究人参皂昔在 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变引起的耐化疗药过程中的抗肿瘤作用。

1 材料与与方法

1.1 主要材料 人胃癌细胞系 BGC-823 购自南京科佰生物科技有限公司。胎牛血清 (FBS)、RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;青链霉素混合液购自美国 Hyclone 公司;过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因的慢病毒载体由上海吉玛基因公司构建;Lipofectamine 2000 转染试剂均购自美国 Thermo 公司;TRIzol 试剂购自上海索莱宝生物科技有限公司;逆转录试剂盒和 SYBR PremixEx Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司;E-Cadherin、Vimentin 抗体均购自美国 Abcam 公司;RAPI 裂解液和 BCA 法蛋白浓度检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂购自美国罗氏公司;PVDF 膜和 ECL 发光液均购自美国 Millipore 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;Hoechst33342 染液购自美国 Sigma 公司。BD FACS-Melody 细胞分选仪购自美国 BD 公司。

2020-09-27 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目 (编号:KJ2019A0368)

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科,蚌埠 233004

作者简介:李靖,男,主治医师,硕士;

马家驰,男,主任医师,博士,责任作者, E-mail: tsmjc2013

@163.com

1.2 细胞培养 人胃癌细胞系 BGC-823 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。细胞长到 70% ~ 80% 融合时,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化进行传代。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 细胞分选 选择生长状态良好的对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,取适量细胞悬液收集细胞 1 000 r/min,4 °C,离心 5 min,用含 2% FBS 的 PBS 液洗涤 2 次。调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/ml 细胞,加入终浓度为 5 μg/ml Hoechst33342 染液放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h,孵育结束后,细胞用含 2% FBS 的 PBS 清洗一次终止反应。最后使用 BD FACSMelody 细胞分选仪进行 SP 和 NSP 细胞的检测及分选(355 nm 波长紫外光激发 Hoechst 染色,于 450 nm 收集蓝光荧光信号,650 nm 收集红光荧光信号)。

1.4 细胞转染 取对数生长期的 BGC-823NSP 细胞用胰酶消化,细胞计数将细胞浓度调整为 1 × 10⁵ 个/ml,取 2 ml/孔接种于 6 孔板中,放于培养箱中培养 24 h,第二天,用含有 5 μg/ml polybrene 的新鲜培养基加入适量病毒悬液替换原培养基,37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。Control 组加入对照慢病毒,Lentivirus 组加入过表达 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因的慢病毒。培养 12 h 后,用新鲜培养基替换含有病毒的培养基。继续培养 24 h 后进行后续实验检测步骤。

1.5 总 RNA 提取和 qPCR 将转染 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因 48 h 的 NSP 细胞培养基倒掉,用无菌 PBS 洗涤 2 次,再加入 1 ml 的 TRIzol 裂解液室温裂解 5 min 后转移到 1.5 ml EP 管中,取 200 μl 三氯甲烷加入裂解液中充分混匀后静置 15 min 后,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上层透明的水相并加入等体积的异丙醇后混匀,室温静置 10 min 后,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,所得到的白色沉淀即为细胞总 RNA,用 75% 乙醇将沉淀洗 2 次,用适量的水将 RNA 溶解。用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计测 RNA 浓度,按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。设计合成 CLDN18-ARHGAP26 引物, F: 5'-TGGG TCCAACACCAAAAACAAG-3', R: 5'-GAGTCTGTTTT CCGCCGTGT-3'; ABCG2 引物, F: 5'-TTTACGCACAG AGCAAAGCC-3', R: 5'-GTCAGCGTGGGATCCTCTT C-3'; 内参 GAPDH 引物, F: 5'-TCAGCCGCATCTTC

TTTTGC-3', R: 5'-ATGGTGTCTGAGCCGATGTGG-3'。以 cDNA 作为模板,每组设置 3 个复孔,根据设计好的引物用 ABI SystemStepOnePlus 进行荧光实时定量反应。按照两步法扩增标准程序:95 °C、30 s 预变性;95 °C、5 s,60 °C、30 s 进行 40 个循环的扩增反应。反应结束后得到各孔的循环阈值(threshold cycle, Ct),采用 2^{-ΔΔCt} 法分析各样本数据。

1.6 Western blot 将转染 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因 48 h 的 NSP 细胞培养基倒掉,用无菌 PBS 洗涤 2 次,用细胞裂解液提取细胞总蛋白。分别配制分离胶和浓缩胶,蛋白电泳结束后将蛋白质电转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭,一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 8 min;二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 8 min。滴加适量 ECL 底物显色剂曝光,扫描图像,应用 Image J 软件分析扫描蛋白条带的灰度值,以 β-actin 为内参计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 CCK-8 检测药物敏感性 将 100 μl 细胞接种于 96 孔培养板每孔 5 × 10⁴ 个细胞,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,加入不同浓度梯度的 L-OHP(0.5、1、2、4、8、16、32 μg/ml) 培养 24 h,加入 10 μl CCK-8 溶液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 3 h,读取 490 nm 处吸光度值。计算细胞活力(%) = [A(待测孔) - A(空白孔)]/[A(对照孔) - A(空白孔)] × 100%

1.8 统计学处理 用 SPSS21.0 进行统计学分析,数据用 Graphpad 7.0 进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,Western blot 数据用单向方差分析(ANOVA)。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSP 细胞过表达 CLDN18-ARHGAP26 突变基因后 ABCG2 蛋白的表达 流式细胞术分选胃癌细胞系 BGC-823 的 SP(1.3%) 和 NSP(98.7%) 细胞(图 1A),将得到 NSP 用于本研究。以慢病毒为载体携带过表达 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因于 NSP 细胞中,用 qPCR 检测 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因和 ABCG2 的 mRNA 表达,结果显示 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因的表达增加(图 1B)。细胞过表达 CLDN18-ARHGAP26 融合突变基因后 ABCG2 mRNA 的表达高于未转染细胞(图 1C)。

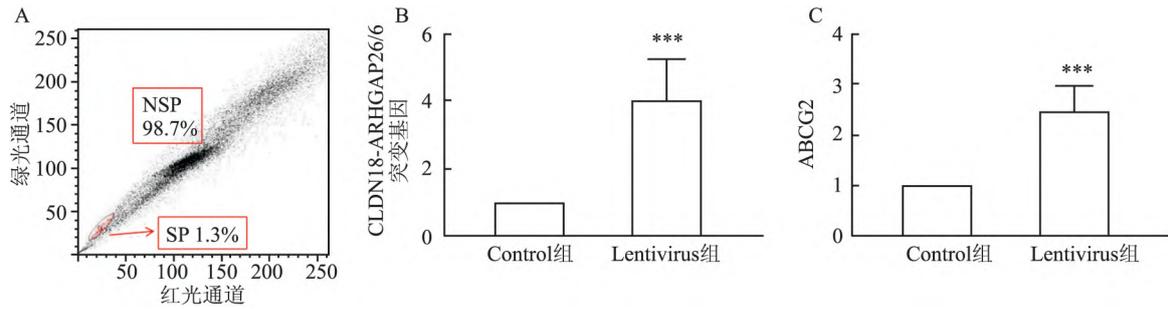


图1 NSP细胞转染过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因的效率 and *ABCG2* 的表达

A:细胞分选仪分选 BGC-823 细胞 SP 和 NSP 细胞;B:qPCR 检测 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因;C:*ABCG2* 的 mRNA 表达;Control 组:转染阴性对照慢病毒;Lentivirus 组:转染过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因的慢病毒;与 Control 组比较:*** $P < 0.001$

2.2 NSP 细胞过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因后 E-Cadherin、Vimentin 蛋白的表达

Western bolt 检测 EMT 相关蛋白 E-Cadherin、Vimentin 蛋白的表达,结果显示,Control 组细胞 E-Cadherin 蛋白表达高于 Lentivirus 组细胞 E-Cadherin 蛋白表达 ($t = 4.372, P < 0.01$),Lentivirus 组细胞 Vimentin 蛋白表达高于 Control 组 ($t = 6.674, P < 0.01$)。见图 2。

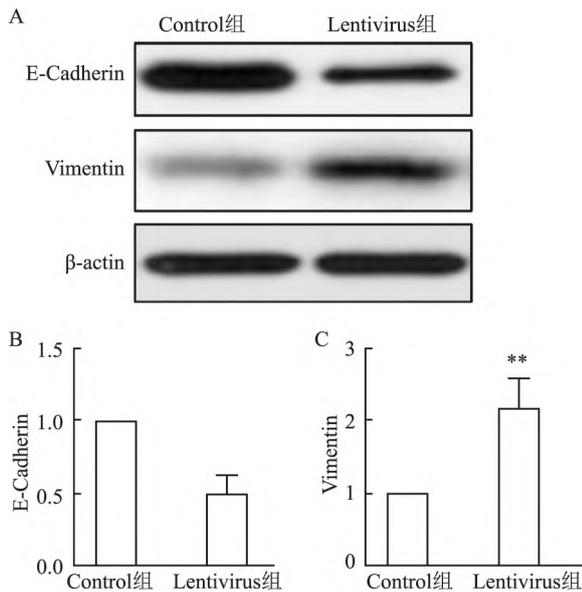


图2 过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合基因的 NSP 细胞发生 EMT

A:Western bolt 检测 E-Cadherin、Vimentin 蛋白表达;B:统计学分析 E-Cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量;与 Control 组比较:*** $P < 0.01$

2.3 NSP 细胞过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因后对 L-OHP 耐药性的影响

不同浓度 L-OHP 处理转染慢病毒的 NSP 细胞 24 h 后,用 CCK-8 检测其对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合基因细胞生

长的抑制作用。结果显示,不同浓度 L-OHP 对 NSP 细胞增殖均有抑制作用,IC₅₀ 为 4.28 μg/ml。过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合基因后,L-OHP 对细胞增殖的抑制作用减弱,IC₅₀ 为 15.87 μg/ml。见图 3。

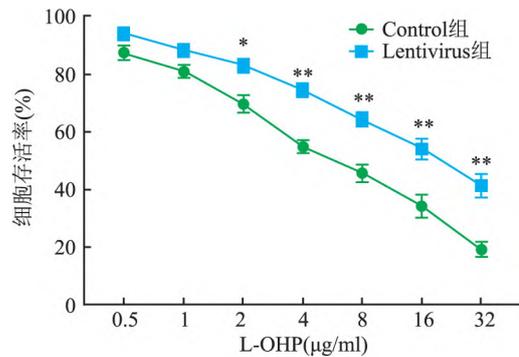


图3 NSP 细胞过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因后对 L-OHP 耐药性的影响

与 Control 组比较:*** $P < 0.01$

2.4 人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞耐药性的影响

为了研究人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞耐药性的影响。先用不同浓度 (0、10、30、50、100 μg/ml) 人参皂苷处理 NSP 细胞,结果显示,50、100 μg/ml 人参皂苷明显抑制 NSP 细胞增殖,10 μg/ml 人参皂苷对 NSP 细胞增殖没有明显作用,因此选用 30 μg/ml 作为人参皂苷刺激 NSP 的有效浓度 (图 4A)。进一步检测 30 μg/ml 人参皂苷和不同浓度 L-OHP 对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞活力的影响。结果显示人参皂苷和 L-OHP 联合用药降低了转染细胞的活力。提示人参皂苷能逆转过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因引起的对 L-OHP 的耐药作用。见图 4B。

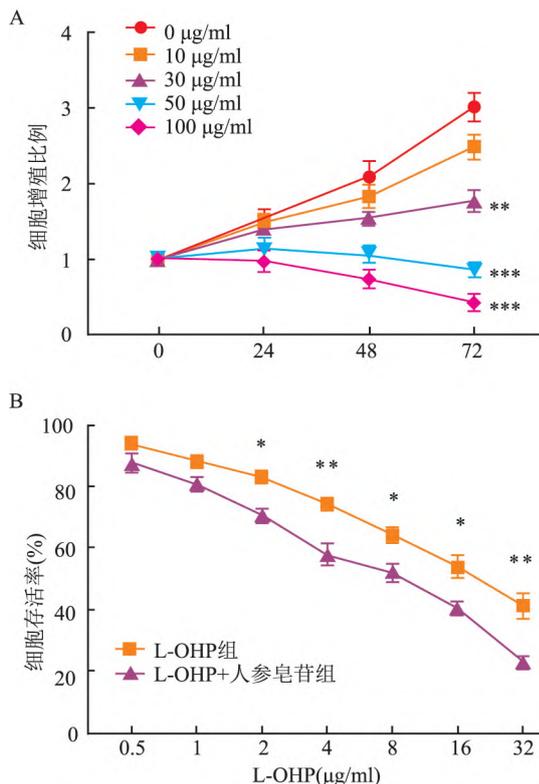


图4 人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞耐药性的影响
与 L-OHP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞 EMT 的逆转作用 Western bolt 检测人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞 EMT 相关蛋白的表达。结果显示, 人参皂苷处理的转染组细胞的 E-Cadherin 蛋白表达高于单纯转染组 ($t = 18.063, P < 0.01$), Vimentin 蛋白的表达为 (0.37 ± 0.12) , 低于单纯转染组 ($t = 4.011, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

有研究^[6]表明 100 个胃癌患者中有 3 个 *CLDN18*(一个使细胞间紧密结合的基因)和 *ARHGAP26*(一个编码 RHOA 抑制剂的基因)发生突变, 融合形成了 *CLDN18-ARHGAP26*, 细胞和细胞及细胞和细胞外基质的附着力降低, 表现出 EMT, 这种突变可能导致癌细胞转移。2018 年 Yang et al^[7]利用高通量测序发现了 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变与胃印戒细胞癌临床诊断/预后指标和化疗耐药显著相关, 该研究表明目前的化疗方式对肿瘤中存在该融合基因的患者效果不好。该研究利用慢病毒转染过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因, 在细胞

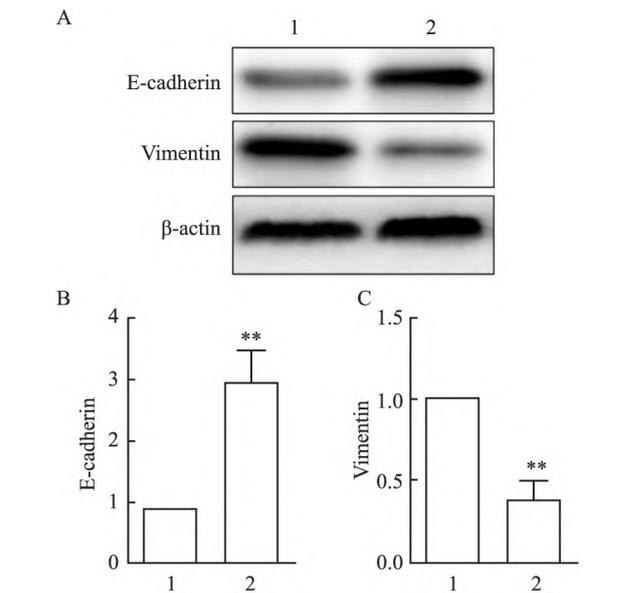


图5 人参皂苷对过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 突变基因的 NSP 细胞 EMT 的逆转作用

A: Western bolt 检测 E-Cadherin、Vimentin 蛋白表达; B: 统计学分析 E-Cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量; 1: Lentivirus 组; 2: Lentivirus + 人参皂苷组; 与 Lentivirus 组比较: ** $P < 0.01$

水平上探索其对肿瘤细胞耐药性和侵袭性的影响。

有研究^[8]对胃癌细胞进行流式细胞分选时发现, 不同分化程度的胃癌细胞株中均有少量侧群 (SP) 细胞, 比例大约在 1% ~ 4% 之间。ABCG2 是与肿瘤多药耐药性密切相关的多药耐药跨膜蛋白, SP 细胞表现出高表达 ABCG2 的特点, SP 细胞 ABCG2 的表达比 NSP 细胞高 3 倍。而对于未分选细胞 (SP + NSP) 来说, ABCG2 的表达并不高, 但是在进行诱导耐药后 ABCG2 的表达明显升高^[9]。该研究利用流式细胞分选仪分选出 BGC-823 细胞中的 NSP 细胞, 显示 NSP 细胞中过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因能使 ABCG2 表达明显升高。

EMT 是指具有极性的上皮细胞丧失极性和细胞间接触等上皮细胞样表型, 转化成具有迁移能力的间质细胞的过程。在肺癌细胞中, EMT 的发生与肿瘤的侵袭性和耐药性有关^[10]。E-Cadherin 是参与细胞之间黏附连接的主要蛋白分子, 主要分布于上皮细胞中, 发挥着维持细胞极性和组织结构完整性的功能^[11]。波形蛋白 (Vimentin) 是间充质细胞的主要骨架成分。因此, Vimentin 常被用作 EMT 的细胞标记物^[12]。一般情况下, E-Cadherin 蛋白表达降低和 Vimentin 蛋白表达增加提示发生了 EMT。过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 基因的 NSP 细胞 E-Cadherin 蛋白表达显著降低, 而 Vimentin 蛋白表达显著

增加,表明细胞发生了 EMT。为了研究 *CLDN18-ARHGAP26* 融合突变基因对癌细胞耐药性的影响,该研究利用化疗药 L-OHP 对分选的 BGC-823 NSP 细胞进行耐药测试。该研究用 CCK-8 检测细胞存活率,结果表明,与对照组相比,过表达 *CLDN18-ARHGAP26* 基因的 NSP 细胞对 L-OHP 产生了耐药。人参的主要成分是人参皂苷,人参皂苷能通过调控 NF- κ B、ERK、Akt 信号通路等抑制癌细胞的 EMT,从而抑制癌细胞的迁移和侵袭过程^[13]。为探究人参皂苷干预对 *CLDN18-ARHGAP26* 基因融合引起的 EMT 和耐药性的影响,该研究首先确定了人参皂苷对 BGC-823 NSP 细胞的有效作用浓度为 30 μ g/ml。NSP 细胞转染过表达慢病毒之后给予人参皂苷和 L-OHP 干预,只用 L-OHP 的细胞存活率明显低于同时给予人参皂苷和 L-OHP 的细胞,提示人参皂苷能逆转 *CLDN18-ARHGAP26* 基因融合引起的耐药。同时检测了两组细胞的 EMT 相关蛋白,结果表明,人参皂苷也能逆转 *CLDN18-ARHGAP26* 基因融合引起的 EMT 作用。

综上,人参皂苷干预能逆转 *CLDN18-ARHGAP26* 过表达引起的 EMT 和耐药,从而发挥抗肿瘤作用。该研究对肿瘤化疗药物的研究及临床转化应用有指导意义。

参考文献

- [1] Zhong B, Wang Q, He J, et al. LncRNA LOC285194 modulates gastric carcinoma progression through activating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cancer Med, 2020, 9(6): 2181-9.
- [2] Hou J, Tan Y, Su C, et al. Inhibition of protein FAK enhances 5-FU chemosensitivity to gastric carcinoma p53 signaling pathways

- [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2020, 18(7): 125-36.
- [3] Tsuda H. Gene and chromosomal alterations in sporadic breast cancer: correlation with histopathological features and implications for genesis and progression[J]. Breast Cancer, 2009, 16(3): 186-201.
- [4] Shu Y, Zhang W, Hou Q, et al. Prognostic significance of frequent *CLDN18-ARHGAP26* fusion in gastric signet-ring cell cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2447.
- [5] 李靖, 郑旭薇, 贾建光, 等. 人参皂苷 Rh2 对低浓度的奥沙利铂诱导人胃癌 SGC-7901 侧群细胞凋亡的增敏作用[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(5): 561-6, 572.
- [6] Yao F, Kausalya J P, Sia Y Y, et al. Recurrent fusion genes in gastric cancer: *CLDN18-ARHGAP26* induces loss of epithelial integrity[J]. Cell Rep, 2015, 12(2): 272-85.
- [7] Yang H, Hong D, Cho S Y, et al. RhoGAP domain-containing fusions and PPAPDC1A fusions are recurrent and prognostic in diffuse gastric cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4439.
- [8] Jia J, Qin Y, Zhang L, et al. Sijunzi decoction-treated rat serum induces apoptosis of side population cells in gastric carcinoma[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1718-27.
- [9] Yan B L, Li X L. MicroRNA-328 acts as an anti-oncogene by targeting ABCG2 in gastric carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6148-59.
- [10] Jiao J. Long noncoding RNA MEG3 suppresses gastric carcinoma cell growth, invasion and migration via EMT regulation[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(3): 2685-93.
- [11] Feldkoren B, Hutchinson R, Rapoport Y, et al. Integrin signaling potentiates transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) dependent down-regulation of E-Cadherin expression - Important implications for epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal cell carcinoma[J]. Exp Cell Res, 2017, 355(2): 57-66.
- [12] Fritsch R. Oxaliplatin in perioperative chemotherapy for gastric and gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(4): 285-91.
- [13] 彭文婷, 孙妮弋, 孙家昌, 等. 人参皂苷 CK 对人肝癌细胞 HepG2 迁移及侵袭的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 27-32.

Anti-tumor effect of ginsenosides in the treatment of chemotherapeutic drugs resistance induced by the expression of *CLDN18-ARHGAP26* fusion

Li Jing, Xie Bo, Wang Hu, Zhang Chensong, Jia Jianguang, Pan Chengwu, Ma Jiachi
(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004)

Abstract Objective To investigate the effect of chemotherapeutic drug resistance induced by *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutation gene in gastric cancer cells, and to investigate the sensitization effect of ginsenoside in the treatment of chemotherapeutic drug resistance caused by the expression of *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutation gene. **Methods** The side population (SP) cells and non-side population (NSP) cells of gastric cancer cell line BGC-823 were labeled with immunomagnetic bead antibody, and the lentiviral vector with overexpression of *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutation gene was selected for transfection with NSP cells. qPCR was used to detect the mRNA levels of *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutation and ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (ABCG2). The expression of EMT-related proteins E-Cadherin and Vimentin was detected by Western blot. The sensitivity of transfected cells to oxaliplatin was detected by CCK-8. The effect of ginsenoside on drug resistance of transfected cells was detected by CCK-8. The expression of E-Cadherin and Vimentin in transfected cells was detected by

内毒素血症大鼠肝脏 RAS 表达与肝功能损伤的关系

李晶铃¹, 阴赫宏²

摘要 目的 探讨内毒素血症大鼠肝脏肾素-血管紧张素系统(RAS)的表达特点及其与肝功能损伤的关系。方法 将90只大鼠随机分为对照组和注射后2、4、8、12、24、48、72 h及7 d组。除对照组以外,均腹腔注射脂多糖(LPS)制备脓毒症模型。分别于注射2、4、8、12、24、48、72 h及7 d取10只,取心脏血,测肝功能标志物丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH),循环RAS标志物肾素(PRA)、血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ);取肝脏组织,观察肝组织病理,测组织RAS标志物PRA、ACE、Ang Ⅱ及血管紧张素1型受体(AT1R)mRNA表达。结果 模型组大鼠的循环AST、ALT及LDH水平在LPS注射后逐渐升高,8 h达峰,AST与LDH在4~48 h均高于对照组,ALT在2~48 h均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组大鼠的循环和肝脏PRA在注射后迅速升高,2 h达峰,48 h降至正常水平,中间时间段均高于对照组($P < 0.05$);ACE和Ang Ⅱ在注射后逐渐升高,8 h达峰,ACE在2~24 h高于对照组,Ang Ⅱ在2~48 h高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组大鼠AT1R

mRNA表达在注射后逐渐升高,4~48 h均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 内毒素血症所致肝功能损伤可能与肝脏局部RAS激活有关系。

关键词 内毒素血症;肝脏;肾素-血管紧张素系统;炎症反应;应激反应

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0116-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.022

内毒素血症是由于病原菌释放大量的内毒素至血液而引起的,以多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)为主要病理特征的一系列综合征^[1-2]。肝脏是人体内最大的解毒器官,也是内毒素代谢的主要场所,极易受到内毒素攻击,这也是内毒素血症常常并发肝功能障碍的主要原因^[3]。既往研究^[4-5]表明,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在脓毒症导致的器官损伤中介导重要机制。在脓毒症动物模型中,有学者发现肝脏亦存在着局部RAS系统,该系统以血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)为主要效应分子,通过与肝细胞膜的血管紧张素1型受体(angiotensin type 1 receptor, AT1R)结合而增加血管紧张素原的转录与翻译,从而形成自身反馈机制,引起恶性循环和不断放大的炎症级联反应^[6]。该研究

2021-11-02 接收

基金项目:北京市自然科学基金(编号:7032017)

作者单位:¹清华大学医院内科,北京 100086

²北京妇产医院内科,北京 100026

作者简介:李晶铃,女,硕士,主治医师;

阴赫宏,男,博士,教授,博士生导师,主任医师,责任作者,

E-mail:waijjwajjjwajjj@163.com

Western blot after ginsenoside treatment. **Results** qPCR detection showed that the expression of *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutant gene in NSP cells transfected with overexpressed *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutant gene was significantly higher than that of the non-transfected group, and the expression of *ABCG2* mRNA was significantly higher than that of the non-transfected group. Western blot showed that the expression of E-Cadherin protein in NSP cells with over-expressed *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutation gene was lower than that in the non-transfected group, the expression of Vimentin protein was higher than that in the non-transfected group, and the sensitivity of transfected cells to oxaliplatin was lower than that in the non-transfected group. The survival rate of transfected cells treated with ginsenoside and oxaliplatin was significantly lower than that treated with oxaliplatin alone. The expression of E-Cadherin protein in the transfected cells treated with ginsenoside was higher than that in the untreated group, and the expression of Vimentin protein was lower than that in the untreated group. **Conclusion** Ginsenoside can reverse cell EMT transformation and oxaliplatin resistance induced by *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutated gene expression in gastric cancer tissues.

Key words ginsenoside; *CLDN18-ARHGAP26* fusion mutated gene; epithelial-mesenchymal transition; drug resistance