

基于 TGF- β /smad 信号通路探讨七方胃痛颗粒对 人胃腺癌 AGS 细胞上皮间质转化的影响*

袁铁超¹, 陈国忠², 彭振西¹, 易志忠¹, 欧智海¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023

摘要:目的:基于 TGF- β /smad 信号通路探讨七方胃痛颗粒对人胃腺癌 AGS-EMT 细胞 ZEB2、E-cad 及 Vimentin 的影响及可能的机制。方法:用 TGF- β 1 处理 AGS 细胞建立上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)模型,将细胞分为空白组、七方胃痛颗粒(含药血清+EMT模型)组、LY2109761(TGF- β /Smad 抑制剂+EMT模型)组,用 RT-PCR、Western Blot 法检测 ZEB2、E-cad 及 Vimentin 的表达。结果:与空白组比较,七方胃痛颗粒及 LY2109761 干预后能上调 E-cad 蛋白及其 mRNA 的表达,下调 ZEB2 蛋白及其 mRNA 和 Vimentin 蛋白及其 mRNA 的表达($P < 0.05$),并呈时间依赖性。与七方胃痛颗粒组相比,LY2109761 组 ZEB2 蛋白及其 mRNA 的表达明显下调($P < 0.05$)。结论:七方胃痛颗粒与 LY2109761 作用相似,其可能是通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路,上调 E-cad 表达,下调 ZEB2 及 Vimentin 表达,抑制 EMT 形成,从而抑制人胃腺癌 AGS 细胞的上皮-间质转化。

关键词:七方胃痛颗粒;人胃腺癌细胞;上皮间质转化;ZEB2;E-cad;Vimentin;LY2109761

DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2021.01.028

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-8999(2021)01-0126-06

Effect of Qifang Weitong Granule on Human Gastric Adenocarcinoma AGS-EMT Cells Based on TGF- β /Smad Signaling Pathway

YUAN Tiechao¹, CHEN Guozhong², PENG Zhenxi¹, YI Zhizhong¹, OU Zhihai¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi China 530001; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi China 530023

Abstract: Objective: To investigate the effects of Qifang Weitong Granule on zinc finger E-box-binding protein 2 (ZEB2), E-cadherin (E-cad) and vimentin in human gastric adenocarcinoma ags-emt cells based on TGF- β /smad signaling pathway. Methods: AGS cells were treated with TGF- β 1 to establish EMT model. The cells were divided into blank group, Qifang Weitong Granule (drug containing serum + EMT model) group and LY2109761 (TGF- β /Smad inhibitor + EMT model) group. RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of ZEB2, E-cad and vimentin. Results: Compared with the blank group, Qifang Weitong Granule and LY2109761 could up regulate the expression of E-cad protein and its mRNA, down regulate the expression of ZEB2 protein and its mRNA, vimentin protein and its mRNA in a time-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with Qifang Weitong Granule group, the expression of ZEB2 protein and its mRNA in LY2109761 group was significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion: Qifang Weitong Granule has similar effect as LY2109761. It may inhibit epithelial mesenchymal transition of human gastric adenocarcinoma AGS cells by inhibiting TGF- β 1/Smad signaling pathway, up regulating the expression of E-cad, down regulating the expression of ZEB2 and vimentin, and inhibiting the formation of EMT, thereby inhibiting the epithelial-mesenchymal transition of human gastric adenocarcinoma AGS cells.

Key words: Qifang Weitong Granule; human gastric adenocarcinoma cell; epithelial-mesenchymal transition; zinc finger E-box-binding protein 2 (ZEB2); E-cadherin (E-cad); vimentin; LY2109761

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81560758)

胃癌是全世界最常见的消化系统恶性肿瘤之一,由于其发病机制复杂,缺乏有效的治疗措施,导致患者治疗效果不佳,死亡率高^[1]。肿瘤细胞的转移历经上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)、定向侵袭、侵入血液循环等过程^[2]。其中EMT是指上皮细胞转化为间质型细胞的生物过程。该过程中原属上皮型细胞经过形态和骨架结构的改变而逐渐舍去细胞极性及胞间连接,获得间质型细胞的特性,且获得侵袭和迁移能力^[3]。而肿瘤患者致死率高的主要原因则是癌细胞的迁移、侵袭及转移^[4],因此,阻止或抑制EMT的产生,可以克制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,对患者的预后及治疗有着积极作用。七方胃痛颗粒的功效以益气健脾为主,消积导滞、清肝降逆、活血化瘀为辅。前期研究发现,七方胃痛颗粒可以抑制人胃癌细胞增殖并促其凋亡^[5-7],但其能否影响人胃腺癌AGS细胞上皮间质转化有待进一步证实。因此,本研究就七方胃痛颗粒对人胃腺癌AGS-EMT细胞进行干预,观察干预后对胃癌细胞ZEB2、E-cad及Vimentin的影响,以阐明其对入胃腺癌AGS细胞上皮间质转化的干预作用及机制,为七方胃痛颗粒在临床上推广使用提供有力的依据。

1 材料

1.1 人胃腺癌AGS细胞与动物 人胃腺癌AGS细胞系购于上海慧颖生物科技有限公司,贴壁生长,置于37℃和5%CO₂条件的培养箱中培养。雄性SPF级健康Wistar大鼠40只,体质量100~150g,购于湖南省长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物使用许可证:SCXK(湘)2014-0011。在广西中医药大学实验中心(SYXK桂2019-0001)饲养。实验涉及动物的饲养和实验过程严格遵守广西中医药大学实验动物管理与保护的有关准则,并且严格按照实验动物使用的3R原则给予人道主义的关怀照顾,且通过广西中医药大学医学伦理委员会审查,伦理审批号:DW20190920-34。

1.2 药品和试剂 七方胃痛颗粒为江阴天江药业有限公司生产的免煎中药颗粒,由广西中医药大学第一附属医院制剂室提供,其组成为生黄芪30g,白术10g,茯苓10g,炙甘草9g,红参10g,白芍30g,炒鸡内金9g,枳实10g,木香6g,黄连6g,吴茱萸3g,丹参6g,中药颗粒被混合搅匀并按每袋8g的规格灭菌包装。胎牛血清(上海依科赛生物制品有限公司,货号:FCS500);柠檬酸盐缓冲液(10mM

pH 3.0)(深圳欣博盛生物科技有限公司,货号:NP-1510-03);TGF- β 1[美国PeproTech(派普泰克)公司中国代表处,货号:100-21];TGF- β /Smad抑制剂LY2109761[Selleck(中国)公司,货号:S2704];冻存液(北京索莱宝科技有限公司,货号:D8371);胰蛋白酶-EDTA消化液(北京索莱宝科技有限公司,货号:T1300);青链霉素混合液(100X)(北京索莱宝科技有限公司,货号:P1400);DMEM高糖培养基[赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,货号:11965092];PBS缓冲液(凯基生物,货号:KGB5001);Trizol Reagent(CWBIO康为世纪,货号:CW0580S);Ultrapure RNA超纯RNA提取试剂盒(CWBIO康为世纪,货号:CW0581M);HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒(CWBIO康为世纪,货号:CW2569M);UltraSYBR Mixture(CWBIO康为世纪,货号:CW0957M);RIPA裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,货号:C1053);BCA蛋白浓度测定试剂盒(康为世纪,货号:CW0014S);Marker(Thermo,货号:26617);PVDF膜(Millipore,货号:IPVH00010);封闭专用脱脂奶粉(北京普利莱基因技术有限公司,货号:P1622)。引物(苏州金唯智生物科技有限公司)。

1.3 仪器 荧光定量PCR仪(美国ABI公司);5810R台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司);371高温灭菌CO₂培养箱(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 人胃腺癌AGS细胞EMT模型建立 细胞生长密度高达80%时,须分植至新的培养皿或瓶中,一般稀释比例为1:3。当细胞传代达一定数量后,用10 μ g·L⁻¹的TGF- β 1处理AGS细胞,连续培养3代,建立EMT模型^[8]。

2.2 实验分组 将细胞分为3组,空白组(无处理的EMT模型)、七方胃痛颗粒(含药血清+EMT模型)组、LY2109761(TGF- β 1/Smad抑制剂+EMT模型)组。

2.3 药物制备 TGF- β /Smad抑制剂LY2109761,体外实验给药时浓度稀释为10 μ mol·L⁻¹。TGF- β 1,体外实验给药时浓度稀释为10 μ g·L⁻¹。实验前称取七方胃痛颗粒所需的药物。

2.4 药物血清制备 将大鼠随机分为药物组、空白组,每组20只。分别给予七方胃痛颗粒(给药剂量=临床常用剂量×动物等剂量系数×培养液内稀释浓度^[9])和生理盐水灌胃。先将药物用生理盐水

稀释,配置成 $2\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物混悬溶液给大鼠灌胃,方案按照 $1\text{ mL} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ 给药,每日给药2次,连续7天。于末次给药后1h腹主动脉采血,血样置于10 mL离心管,静置2h以上,离心半径8 cm, $3\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,无菌分离血清。将血清置于 $56\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴30 min灭活,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。空白组大鼠除给予生理盐水代替七方胃痛颗粒灌胃之外,余同七方胃痛颗粒含药血清制备方法。实验前将EMT模型AGS细胞传代培养,将其接种于含DMEM培养基的96孔板中培养,约12 h后,待细胞贴壁,换上冻融融化的含药血清作用细胞24 h、48 h、72 h后观察其生长情况。

2.5 RT-PCR法检测 ZEB2、E-cad 及 vimentin 的表达 提取细胞的总RNA,遵守操作说明对其进行反转录,合成cDNA,以GAPDH为内参^[10],采取实时荧光定量PCR法检测目的基因mRNA的表达,再进行定量PCR扩增,其反应条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性5 min进入循环, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性45 s, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 退火45 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min,共33个循环后,最终测定不同样本的Ct值,以公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算反映各样品目的基因相对表达量的差异。见表1。

表1 引物信息

引物	序列
ZEB2	F: $5' - \text{AGTCCTCCCCACACGTGAGCC} - 3'$ R: $5' - \text{TGCGGTCTGGATCGTGGCTTC} - 3'$
E-cad	F: $5' - \text{CTTGGAGCCGCAGCCT} - 3'$ R: $5' - \text{AAATTCACCTCTGCCAGGAC} - 3'$
Vimentin	F: $5' - \text{CGGAGAAATTGCAGGAGGA} - 3'$ R: $5' - \text{AAGGTCAAGACGTGCCAGAG} - 3'$
GAPDH	F: $5' - \text{TCCATCACCATCTTCCAG} - 3'$ R: $5' - \text{GGTATCCATCGCCATGCTC} - 3'$

2.6 Western blot法检测 ZEB2、E-cad 及 Vimentin 的表达 提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度, $5 \times \text{SDS-PAGE}$ 蛋白上样缓冲液按1:4比例加入蛋白中煮沸5 min,取 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白在12%的SDS-PAGE凝胶中电泳, 100 mA 恒流电转70 min,将蛋白转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶非特异性封闭1 h,加入一抗抗体 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,加入二抗室温孵育1 h,ECL显影5~10 min。图像结果用Quanty-one分析软件进行分析,以目的蛋白/内参的灰度比值表示相对目的蛋白水平。

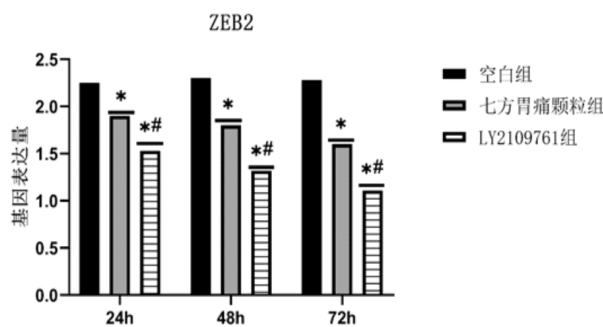
2.7 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行统计分析。数据资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检

验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

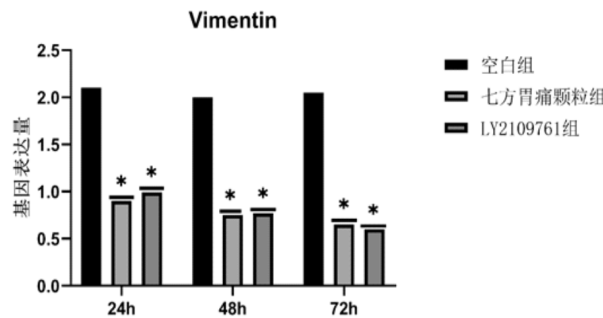
3.1 七方胃痛颗粒对 EMT 模型中 ZEB2 mRNA、Vimentin mRNA 表达的影响 与空白组比较,七方胃痛颗粒组和LY2109761组作用24 h、48 h、72 h后均能明显下调ZEB2 mRNA、Vimentin mRNA表达 ($P < 0.05$);与七方胃痛颗粒组相比,LY2109761组ZEB2 mRNA的表达明显下调 ($P < 0.05$),而Vimentin mRNA下调在相同时间下相近 ($P > 0.05$)。该结果提示七方胃痛颗粒中药血清具有抑制EMT模型AGS-EMT细胞ZEB2 mRNA、Vimentin mRNA的表达,且其抑制ZEB2作用不如TGF- β 1的抑制剂LY2109761。见图1、图2。

3.2 七方胃痛颗粒对 EMT 模型中 E-cad mRNA 表达的影响 与空白组比较,七方胃痛颗粒组和LY2109761组作用24 h、48 h、72 h后均能明显上调E-cad mRNA表达 ($P < 0.05$);随着干预时间延长,其表达有差异,在48 h、72 h时间段均出现促进。与七方胃痛颗粒组相比,LY2109761组在24 h、48 h、72 h均能明显上调E-cad mRNA表达 ($P < 0.05$)。该结果提示七方胃痛颗粒中药血清具有促进AGS-EMT细胞E-cad mRNA的表达,但其促进作用不如TGF- β 1抑制剂LY2109761。见图3。



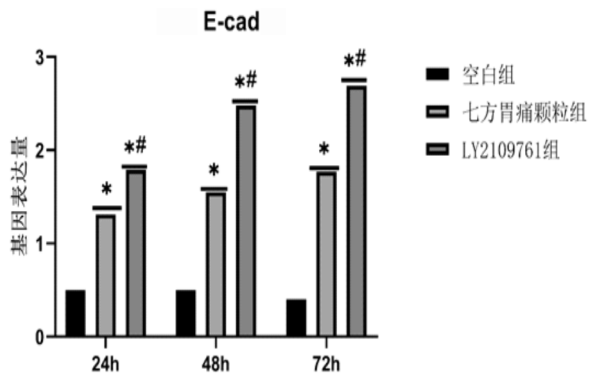
注:与空白组对比,* $P < 0.05$;与七方胃痛颗粒组对比,# $P < 0.05$

图1 七方胃痛颗粒对EMT模型中ZEB2 mRNA表达的影响

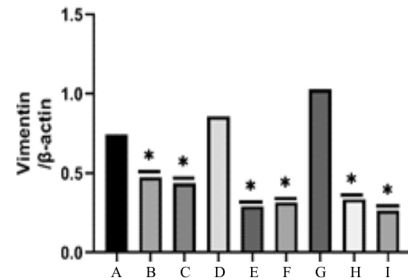
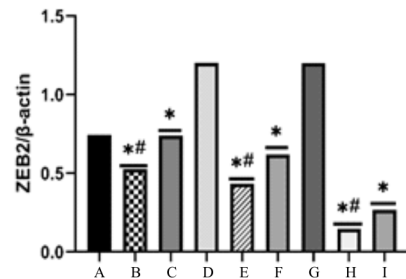
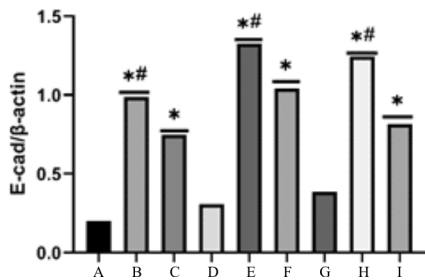
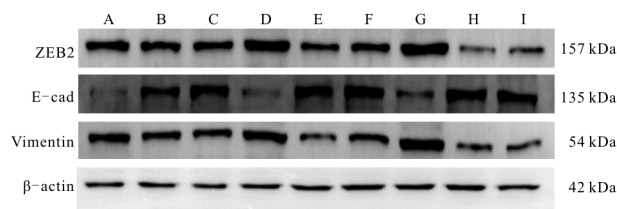


注:与空白组对比,* $P < 0.05$;与七方胃痛颗粒组对比,# $P < 0.05$

图2 七方胃痛颗粒对EMT模型中Vimentin mRNA表达的影响



注:与空白组对比,* $P < 0.05$;与七方胃痛颗粒组对比,# $P < 0.05$
图3 七方胃痛颗粒对 EMT 模型中 E-cad mRNA 表达的影响



注:A为干预24h空白组;B为干预24h LY2109761组;C为干预24h含药血清组;D为干预48h空白组;E为干预48h LY2109761组;F为干预48h含药血清组;G为干预72h空白组;H为干预72h LY2109761组;I为干预72h含药血清组

图4 七方胃痛颗粒对 EMT 模型中 ZEB2、vimentin、E-cad 的蛋白表达的影响

4 讨论

胃癌在我国引起的死亡约占全球的一半,对人民的身体健康造成极大危害^[11]。其发病机制尚不明确,研究表明其发生涉及多信号、多基因的复杂过程^[12]。胃癌细胞的侵袭转移是影响胃癌疗效的主要原因^[13],而在肿瘤细胞的迁移及侵袭过程中,EMT 这一过程则起着不容忽视的关键作用。研究发现,EMT 的形成与 TGF- β /smad 信号通路的 ZEB2、E-cad、Vimentin 等因子关系密切,它们与胃癌的侵袭深度、淋巴转移及分期密切相关。TGF- β 1 作为 TGF- β 主要存在形式在肿瘤发生发展中起重要作用^[14]。TGF- β 可抑制 E-cad 的表达并促发 EMT^[15],也可促进肿瘤 EMT 发生,增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力,促进肿瘤转移^[16]。研究证实

3.3 七方胃痛颗粒对 EMT 模型中 ZEB2、vimentin、E-cad 的蛋白表达的影响 与空白组相比,七方胃痛颗粒和 LY2109761 组分别干预 AGS-EMT 细胞 24 h、48 h、72 h 后,ZEB2、Vimentin 的蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),E-cad 的蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与七方胃痛颗粒组相比,LY2109761 组在 24 h、48 h、72 h 均能明显下调 ZEB2 表达($P < 0.05$)。提示七方胃痛颗粒与 LY2109761 作用相近,且随之干预时间增加对于 E-cad 作用更明显,进一步确认了七方胃痛颗粒在调控 EMT 方面的作用。见图 4。

TGF- β 1 可诱导人胃癌细胞发生 EMT,并增强其侵袭和迁移能力^[17]。而 TGF- β /smad 为 TGF- β 促进肿瘤 EMT 发生的重要信号通路,TGF- β /smad 信号通路可诱导 snail、slug、ZEB1、ZEB2、Twist 等与 EMT 密切相关的转录因子表达,从而抑制 E-cad 表达,促进 EMT 发生^[18]。E-cad 是 EMT 过程中的重要分子,E-cad 在 EMT 过程中表达降低,使细胞间黏附破坏,增加细胞能动性和推进癌症向晚期进展。在肿瘤中,E-cad 的低表达可以活化诱导致癌因子,激活 TGF- β 、EGF、NF- κ B、Wnt、HIF-1 α 等传导途径,从而促进 EMT 的形成^[19]。ZEB2 作为 Snail 超家族的重要成员可直接或间接下调 E-cad 表达并诱导 EMT,ZEB2 直接结合并抑制近端 CDH1 启动子处的 E-cad 并重塑细胞间粘附^[20]。有报告显示,ZEB2 除了能抑制其他上皮标志物,激活间充

质基因^[21],还能重组上皮极性分子,阻碍基底膜形成以促进侵入性^[22-24]。有研究显示 ZEB 与临床预后有关,靶向调节胃癌组织中 ZEB2 的表达可以增强 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的敏感性,提示 ZEB2 高表达与人类癌症的较差预后密切相关^[25]。Vimentin 在胃癌中的表达已被作为胃癌预后价值评定标准多年,其表达量的上调,可使细胞失去细胞极性,细胞间连接被破坏,细胞粘附能力下降,运动能力增加,从而使细胞的迁移和侵袭能力增强^[26]。最新的涉及 1 598 例样本的荟萃分析显示,Vimentin 阳性表达与胃癌患者较差的整体存活率显著相关,且亚组分析显示 Vimentin 对中国患者的整体存活率有不利影响。

LY2109761 是一种临床前研究阶段的新型 ALK5/TGFBR2 双靶点抑制剂^[27],虽然其在细胞研究阶段能显著抑制 TGF- β 1 诱导的 L3.6pl/GLT 细胞迁移、侵袭和细胞中 Smad2 蛋白磷酸化水平。但在体外研究中,LY2109761 目前只有在与其它药物联用或者联合放、化疗时才能减小肿瘤体积、降低肿瘤转移、抑制肿瘤微血管形成,增强放、化疗效果,且不良反应明显。

七方胃痛颗粒是广西中医药大学罗伟生教授在中医经典中溯本追源以探寻胃癌之病机后,结合长期的临床实践,取四君子汤、丹参饮、左金丸、逍遥散、枳实芍药散、枳术丸、木香槟榔丸等 7 个不同功效的经典方剂加减而成,其健脾益气针对胃癌之根本病机,扶助脾胃,助其抗邪。用活血化瘀之法消散积瘤瘀滞,促其气血运行;清热解毒之法可清散郁热,攻伐毒邪;理气化痰和中之法则可助脾胃之升降、运化,促进机体恢复之功效。

近年来,在防治胃癌及癌前病变的研究上,传统中医药发挥其特色,已经在临床研究上取得一定的成果以及较好的疗效。中医对于肿瘤的认识在古籍里早有描述,大多可归为“癥瘕”“积聚”之类,同属于“邪气”这一范畴。《黄帝内经》云:“正气存内,邪不可干……邪之所凑,其气必虚。”《医宗必读·积聚》曰:“积之成者,正气不足,而后邪气踞之。”这提示肿瘤的形成与人的正气密切相关,人体正气不足,无力御邪,使得邪气独居,以致“寒”“湿”“痰”“瘀”等病理产物形成,阻碍气血运行,以致气滞血瘀、痰湿搏结、寒凝血瘀,聚而成积,其积瘤之形

成,阻碍气机,郁而化热。“壮火散气”,郁热进一步损耗元气,耗伤津血,气血津液不能濡养脾胃,从而使脾胃虚损,运化失司。胃为“水谷之海”,气血生化之源,胃气受损,后天之本无以生化正气,正气亏虚不能抑制肿瘤生长及转移,从而形成恶性循环。因此,中医治疗肿瘤,首当扶助正气,恢复人体抗邪的自卫能力。人之正气充足,则五脏功能协调,气机调畅不相失宜,“寒湿痰瘀”等病理产物自然祛除,积瘤自消矣。唯有正气充足,方能抗邪,故而“正虚邪积”为肿瘤之病机,而胃癌的病因主要为“脾胃虚弱”,后天之本生化失司,故“健脾益气”之法即为胃癌之治则。

本课题组前期动物实验研究显示,七方胃痛颗粒可阻断慢性萎缩性胃炎癌前病变的进一步发展,对防治慢性萎缩性胃炎癌前病变有明显效果^[28-29],并且可以抑制人胃腺癌细胞增殖并促进其凋亡。本研究显示含七方胃痛颗粒中药血清可以抑制 AGS 细胞上皮-间质转化,上调 E-cad 表达,下调 ZEB2 及 Vimentin 表达,且随着作用时间的延长,中药血清作用于 AGS-EMT 细胞的效果与 TGF- β /Smad 抑制剂作用相似。提示七方胃痛颗粒与 TGF- β /smad 信号通路抑制剂作用一致,能抑制 TGF- β /smad 信号通路,下调 ZEB2、Vimentin,上调 E-cad,增加细胞黏附,减少细胞破坏,减少细胞迁移和侵袭,且作用效果与时间呈正相关性。综上所述,七方胃痛颗粒对人胃腺癌 AGS 细胞具有抑制作用,其机制可能为抑制 TGF- β /smad 信号通路,从而抑制胃黏膜上皮的 EMT。这体现了七方胃痛颗粒在防治胃癌方面的重大协同作用。

参考文献:

- [1] 邹文斌,李兆申.中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J].中国实用内科杂志,2014,34(4):408-415.
- [2] 张青云,傅俊江,陈汉春.上皮间质转化介导肿瘤转移的分子机制[J].生命科学研究,2018,22(6):503-510.
- [3] TIWARI N, GHELDOLF A, TATARI M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3):194-207.
- [4] 李春雨,王琪,申坤,等.中药单体成分抗肿瘤侵袭转移的作用机制研究[J].药物评价研究,2017,40(8):1168-1172.
- [5] 黄丽萍,陈国忠,刘锐荣,等.基于 TFF3、ERK/NF- κ B 信号通路探讨加味七方胃痛颗粒对人胃腺癌细胞株 SGC7901 增殖凋亡的影响[J].辽宁中医杂志,2018,45(7):1516-1521.

- [6] 夏李明, 陈国忠, 曾光, 等. 七方胃痛颗粒对胃癌前病变 TFF1 和 Ki-67 抗原表达的影响[J]. 河南中医, 2014, 34(11): 2166-2167.
- [7] 廖伟琳, 陈国忠, 苏洪佳, 等. 七方胃痛颗粒对胃癌细胞中 Fas/FasL 通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 1804-1807.
- [8] 杨帆, 姜蕊, 韩俊庆, 等. TGF- β 1 对 AGS 细胞上皮-间充质转化及体外侵袭的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(2): 160-164.
- [9] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科技出版社, 2006: 51.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method[J]. Methods San Diego Calif, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58.
- [12] 石岩岩, 丁士刚. 胃癌病因及发病机制的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(17): 7941-7944.
- [13] 李炜伟, 唐岱, 王振冉. 胃癌侵袭转移机制的研究现状及进展[J]. 当代医学, 2018, 24(36): 190-193.
- [14] 顾红兵, 李继坤. TGF- β /Smads 信号通路 with 胃癌关系研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(3): 574-577.
- [15] YU H, SHEN Y, HONG J, et al. The contribution of TGF- β in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail[J]. Neoplasma, 2015, 62(1): 1-15.
- [16] KATSUNO Y, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1): 76-84.
- [17] 梁巍, 孙文广, 姜佳佳, 等. TGF- β 1 诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞建立 EMT 模型[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 37-41.
- [18] WENDT M K, ALLINGTON T M, SCHIEMANN W P. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF- β [J]. Futur Oncol, 2009, 5(8): 1145-1168.
- [19] SONG Y, YE M, ZHOU J, et al. Targeting E-cadherin expression with small molecules for digestive cancer treatment[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 3932-3944.
- [20] DE CRAENE B, BERX G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 97-110.
- [21] SANCHEZ-TILLO E, LIU Y Q, BARRIOS O, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(20): 3429-3456.
- [22] AIGNER K, DAMPIER B, DESCOVICH L, et al. The transcription factor ZEB1 (Δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity[J]. Oncogene, 2007, 26(49): 6979-6988.
- [23] SPADERNA S, SCHMALHOFER O, WAHLBUHL M, et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 537-544.
- [24] SPADERNA S, SCHMALHOFER O, HLUBEK F, et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2006, 131(3): 830-840.
- [25] JIANG T, DONG P, LI L, et al. MicroRNA-200c regulates cisplatin resistance by targeting ZEB2 in human gastric cancer cells[J]. Oncol Rep, 2017, 38(1): 151-158.
- [26] 刘记红, 胡建明, 江瑰丽, 等. E-cadherin、Vimentin 在哈萨克族食管癌组织中的表达及其临床病理学意义[J]. 农垦医学, 2017, 39(2): 97-101.
- [27] 桑晓宏, 王昊, 游雪甫, 等. 靶向 TGF- β 及受体的小分子抑制剂研究进展[J]. 药理学报, 2019, 54(9): 1538-1546.
- [28] 褚传凤, 罗伟生, 康毅, 等. 七方胃痛中药复方的药效研究及临床应用[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(7): 584-588.
- [29] 杨薛萍. 加味七方胃痛颗粒治疗慢性萎缩性胃炎临床疗效研究[J]. 基层医学论坛, 2014, 18(35): 4842-4843.

收稿日期: 2020-07-23

作者简介: 袁铁超(1994-), 男, 浙江嘉兴人, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治脾胃病。

通信作者: 陈国忠(1970-), 男, 江西丰城人, 医学博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治脾胃病。E-mail: cheninj@163.com

编辑: 李艳