

FOXO4 的表达对南蛇藤提取物抑制有氧糖酵解 逆转胃癌前病变的影响

潘子威¹,文俊淞¹,姚雪丹¹,刘延庆²,朱耀东¹

(¹安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科,合肥 230022;²扬州大学医学院,扬州 225009)

摘要 目的 探究叉头框蛋白 O4(FOXO4)的表达对胃癌前病变(GPL)的影响,并阐明其通过调控有氧糖酵解介导南蛇藤提取物(COE)治疗 GPL 的作用机制。方法 参照课题组前期复合造模方案,以 170 μg/mL N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)溶液自由饮水、含 0.03% 盐酸雷尼替丁饲料喂养,结合“饲喂 2 d-禁食 1 d”循环(禁食当日下午按 10 mL/kg 灌胃 2% 水杨酸钠)构建大鼠 GPL 模型;通过尾静脉注射 FOXO4 过表达、沉默质粒(空载质粒为阴性对照)建立 FOXO4 调控模型,将大鼠随机分为 9 组(n=11):对照组、模型组、COE 组、OE-NC 组、OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组、shNC 组、shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组。肉眼观察各组大鼠胃黏膜组织病理情况;阿利新蓝-过碘酸雪夫染色(AB-PAS)观察大鼠胃黏膜组织黏液分泌情况;化学比色法检测 GPL 大鼠胃黏膜组织中的乳酸含量;IHC 检测 GPL 大鼠胃组织中 FOXO4、己糖激酶 2(HK2)、M2 型丙酮酸激酶(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)、乳酸脱氢酶 A(LDHA)的表达情况;RT-PCR 测定上述蛋白基因的 mRNA 水平。结果 与对照组相比,COE 组、OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组 FOXO4 表达增强,胃黏膜病变显著改善,乳酸含量水平降低,有氧糖酵解相关蛋白 PKM2、LDHA、HK2、GLUT1 表达减弱;与 COE 组、OE-FOXO4 组相比,OE-FOXO4+COE 组乳酸含量水平最低,相关蛋白表达降低;与模型组相比,shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组 FOXO4 表达减弱,乳酸产量升高,有氧糖酵解相关蛋白 PKM2、LDHA、HK2、GLUT1 表达增强。结论 FOXO4 参与 COE 对 GPL 的治疗作用,其机制可能与抑制有氧糖酵解过程有关。

关键词 南蛇藤;提取物;胃癌前病变;叉头框蛋白 O4;有氧糖酵解

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0462-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.011

胃癌前病变(gastric precancerous lesions, GPL)是正常胃黏膜向胃癌转化的可逆性关键中间环节,对其实施有效干预可阻断癌变进程,显著降低胃癌发生率。有氧糖酵解(Warburg 效应)的异常激活是 GPL 的重要特征,已成为 GPL 干预的潜在靶点^[1]。叉头框蛋白 O4(forkhead box protein O4, FOXO4)作为叉头框转录因子家族核心成员,可通过调控下游靶基因影响糖酵解与氧化磷酸化的代谢平衡^[2-3],其在 GPL 中的表达特征及对有氧糖酵解的调控作用逐渐成为研究热点。本课题组前期研究^[4]表明,南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)可显著改善 GPL 大鼠胃黏膜病理损伤,抑制胃黏膜组织有氧糖酵解,具体表现为上调 FOXO4 蛋白水平,降低乳酸含量,并下调己糖激酶 2(hexokinase 2,

HK2)、丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase M2, PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1)、乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)等糖酵解关键酶的表达。但 COE 逆转 GPL 恶性进展的具体分子机制尚未阐明,FOXO4 是否参与 COE 对 GPL 的干预过程、能否通过调控有氧糖酵解通路介导该效应仍待验证。基于此,本研究构建 FOXO4 过表达与沉默的 GPL 大鼠模型,旨在明确 FOXO4 对有氧糖酵解的调控作用,深入阐明 COE 是否通过上调 FOXO4 表达,抑制糖酵解关键酶表达及乳酸生成,最终实现对 GPL 的治疗效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 99 只,体质量(210±10)g,安徽医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(皖)2017-001,合格证号:340729220100026214,于安徽医科大学实验动物中心饲养。本实验经大学动物伦理委员会批准,批准号:LLSC20220294。

2025-12-01 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82274355);安徽省高校优秀青年教师培养重点项目(编号:2023-385)

作者简介:潘子威,男,硕士研究生;

朱耀东,男,教授,主任医师,硕士生导师,通信作者,E-mail:zhuyaodong2022@126.com

1.1.2 药物及制备 南蛇藤饮片购自广州致信药业有限公司(批号:070510),参照课题组授权专利(ZL2007100253433)优化提取工艺^[4],先对南蛇藤饮片进行预处理(特定筛目粉碎以提升提取效率),再按比例加入乙醇,控制温度与提取时长进行热回流提取;通过旋转蒸发仪回收溶剂并浓缩至特定状态,复溶后按顺序用不同极性溶剂分步萃取(控制萃取比例以分离有效成分),最终经真空冻干工艺制得COE,后续通过专属检测方法确认其主要活性成分的质量。

1.1.3 试剂 TRIzol 试剂(美国 Solarbio 公司,批号 R1100)、逆转录试剂盒(北京宝日生物有限公司,批号 RR036A)、RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司,批号 A6001)、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)(日本 Kabushiki 公司,货号 ZG4T1-FP,纯度≥98%)、苏木精染色液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号 G1004)、伊红染色液(上海国药集团化学试剂有限公司,批号 71014544)、乳酸试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号 mLsh0715);一抗 HK2(美国 Thermo Fisher 公司,批号 PA5-29326)、PKM2(美国 Thermo Fisher 公司,批号 PA5-28700)、FOXO4(美国 Thermo Fisher 公司,批号 PA5-32385)、LDHA(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 3582S)、GLUT1(美国 Santa 公司,批号 sc-377228),二抗山羊抗兔(美国 Immuno-Way 公司,批号 RS0002);引物由 Primer Premier 5.0 软件设计、上海生工生物工程股份有限公司合成;FOXO4 过表达质粒[载体 pcDNA3.1(+), HindIII/XhoI 酶切位点,插入全长 FOXO4 cDNA 序列 NM_001106331.1,经 Sanger 测序验证],FOXO4 沉默质粒(载体 pLV-shRNA 慢病毒载体,含 3 条靶向 shRNA 序列:5'-GCTGGAGTATCTGCTGTCTT-3'、5'-GATGAGTACATCGTCCTGAT-3'、5'-GCTGACA GATGAGATGCTGT-3',经 Sanger 测序验证)。见表 1。

1.1.4 主要仪器 TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)用于胃黏膜组织形态初步观察,放大倍数设定为×100(观察整体结构)与×200(观察局部病变);CFX96 型 Touch PCR 仪(美国 BioRad 公司)用于 RT-PCR 检测,反应程序设定为:95℃预变性 3 min,95℃变性 15 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 30 s,共 40 个循环,溶解曲线分析范围 65~95℃(验证引物特异性);KZ-II 型号匀浆仪(武汉 Servicebio 公

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Primer sequences (5'-3')
FOXO4	F: GGACTGTGACGAAGACGAC R: CTCTCTCTGCTCTCTCTCTCTG
GLUT1	F: GCTGGCTGTTGCTGCTCTT R: CAGGTAGGTGATGGTGATGGT
LDHA	F: ACGCAGACAAGGAGCAGTGGA R: ATGCTCTCAGCCAAGTCTGCCA
HK2	F: TGGACGACCTGGACGACCT R: GCCACAGTCTGTCTCTTCT
PKM2	F: GGAGCTGCTGCTGCTGCTG R: TCCAGTCCAGTCCAGTCCAG
GAPDH	F: CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA R: GCGGCACGTCAGATCCA

司)用于胃黏膜组织匀浆,转速设定为 3 000 r/min,每次匀浆 30 s,间隔 10 s,重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 GPL 大鼠模型构建 SPF 级雄性 SD 大鼠饲养于安徽医科大学实验动物中心,饲养环境控制为温度(23±1)℃、相对湿度(50±5)%、12 h 光照/12 h 黑暗,每笼 3 只,自由摄食无干扰成分的标准饲料及无菌饮水,每周更换垫料 2 次。适应性饲养 1 周,每日观察活动及进食情况,排除健康异常个体后,按随机数字表分为 9 组($n=11$):对照组、模型组、COE 组、OE-NC 组、OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组、shNC 组、shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组。除对照组外,其余组均给予 170 μg/mL MNNG 无菌生理盐水溶液(每周更换 1 次)自由饮水,饲喂含 0.03% 盐酸雷尼替丁的标准饲料,采用“饲喂 2 d-禁食 1 d”循环,禁食当日下午按 10 mL/kg 灌胃 2% 水杨酸钠溶液,造模 6 周。造模期间每周以酚红排空法记录胃排空时间(模型组需≥60 min),确保病理进程稳定。造模结束后每组随机处死 1 只大鼠,取胃黏膜组织经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、4 μm 切片及 HE 染色,由 2 名病理科医师双盲阅片,参照《胃癌前病变诊断与治疗共识》判定:出现胃黏膜肠上皮化生或中-重度异型增生且无明显癌变特征为造模成功,未达标则延长造模 1 周后复检。

1.2.2 质粒构建 大鼠 FOXO4 过表达质粒以 pcDNA3.1(+) 为载体,通过 HindIII/XhoI 双酶切位点插入 FOXO4 全长 cDNA(NM_001106331.1),Sanger 测序验证序列正确性;沉默质粒选用 pLV-shRNA 慢病毒载体,设计 3 条靶向 FOXO4 的 shRNA 序列(5'-GCTGGAGTATCTGCTGTCTT-3'、5'-GATGAGTACATCGTCCTGAT-3'、5'-GCTGACA

GATGAGATGCTGT-3'),经 Sanger 测序验证后,通过 Western blot 筛选敲低效率最优序列用于后续实验,参照杨劭劼^[5]的检测条件:蛋白电泳电压 80 V(浓缩胶)、120 V(分离胶),转膜采用 90 V 恒压(按目标条带分子量调整时间),孵育二抗时加入内参蛋白 GAPDH,确保蛋白上样量一致。构建完成后,通过 Western blot 和 RT-PCR 验证 FOXO4 过表达和沉默效率,选择过表达效果稳定、敲低效率最佳的序列进行后续实验。

1.2.3 质粒转染 GPL 造模起始时,OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组大鼠尾静脉注射浓缩 OE-FOXO4 质粒(无菌林格氏液稀释,1 mL/100 g 体质量,室温),OE-NC 组注射等量 GFP 过表达质粒作为阴性对照;shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组注射浓缩 shFOXO4 质粒(同前稀释条件),shNC 组注射等量乱序 shRNA 质粒作为阴性对照。造模第 1、3、5 周各注射 1 次,共 3 次。预实验确定最优质粒浓度:大鼠注射不同浓度 FOXO4 过表达质粒,72 h 后检测胃黏膜 FOXO4 mRNA,选取升高 2 倍以上的最低浓度用于正式实验;正式注射时,质粒稀释至目标浓度后,于尾静脉近心端缓慢注射(≥ 30 s,避免外渗),注射后观察尾静脉有无红肿。转染结束后通过 qPCR 验证效率:过表达组 mRNA 升高 ≥ 2 倍、沉默组降低 $\geq 50\%$ 为合格。

1.2.4 COE 给药治疗 本实验药物剂量选择给予 COE 给药组 COE 50 mg/kg 灌胃处理,该剂量基于预实验数据筛选:设置 25、50、100 mg/kg 三组,干预 4 周后,50 mg/kg 组胃黏膜损伤评分降低 42%(显著高于其他两组),且血清 ALT 水平(28.5 ± 3.2) U/L 与对照组(26.1 ± 2.8) U/L 相比,差异无统计学意义,排除肝毒性风险。COE 组、OE-FOXO4+COE 组、shFOXO4+COE 组在造模开始 2 周后,给予 COE 50 mg/kg 灌胃,其余组给予等量 0.9% 的氯化钠溶液灌胃,1 次/d,干预 4 周后处死。

1.2.5 样本收集 给药期结束后,大鼠禁食 12 h(自由饮水),经颈椎脱臼法处死。迅速完整剥离贲门至幽门的胃组织(避免黏膜损伤),置于预冷无菌 DPBS(含 1% 青霉素-链霉素,4 °C)中;超净工作台内剔除胃壁脂肪及结缔组织,沿胃大弯剪开,冷 DPBS 轻柔冲洗胃腔,无菌载玻片单向均匀刮取约 0.5 mm 厚胃黏膜。黏膜组织分 2 份:1 份放入 4% 多聚甲醛固定液(用于病理检测),1 份置于无酶 EP 管(加 1 mL TRIzol 试剂,-80 °C 冻存用于分子检测),每

份样本清晰标记组别、编号及取样时间。

1.2.6 IHC 实验 免疫组化染色参照 EnVision 二步法:组织切片脱蜡水化后,用枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复(中火 5 min、小火 10 min,自然冷却),3% 过氧化氢室温孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶活性;5% 山羊血清 37 °C 孵育 30 min 封闭;一抗置于湿盒 4 °C 孵育过夜,PBS 缓冲液(含 0.05% Tween-20)轻柔冲洗 3 次(每次 5 min)。结果用 Image-Pro Plus 6.0 软件判读, $\times 200$ 视野随机选取 5 个非重叠区域,测定吸光度 A 值,数值越大表示蛋白表达越强。

1.2.7 免疫荧光实验 (immunofluorescence, IF) 切片经 5% BSA 封闭后,加入 1:200 稀释的一抗(4 °C 孵育过夜),洗涤后滴加 1:400 稀释的荧光标记二抗(山羊抗兔 IgG Alexa Fluor 488/594,37 °C 避光孵育 30 min),DAPI 核染色 5 min,使用含抗荧光淬灭剂进行封片处理。在共聚焦显微镜下对应激发波长通道(488、594、358 nm)采集图像,每个样本取 5 个 $\times 400$ 视野,确保曝光条件一致。

1.2.8 RT-PCR 实验 取 100 mg 组织样本放入匀浆管中,加入 1 mL TRIzol 试剂后,使用匀浆仪对组织进行充分研磨。按照试剂盒的操作要求提取总 RNA,随后检测总 RNA 的纯度与浓度。接着,依据逆转录试剂盒的操作流程将 RNA 逆转录。PCR 扩增操作按试剂盒说明进行。以 GAPDH 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相关数据,并利用 GraphPad Prism 8.4.0 软件完成统计绘图。RT-PCR 的引物序列详见表 1。

1.2.9 化学比色法 乳酸含量检测采用乳酸脱氢酶催化法(试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司),原理为:乳酸脱氢酶能够将乳酸与 NAD^+ 进行反应,生成丙酮酸和 NADH,NADH 在 340 nm 处有特征吸收峰,A 值与乳酸浓度呈正相关;操作时严格按试剂盒说明书设定反应体系(200 μ L/孔,含样本 10 μ L、酶试剂 190 μ L),37 °C 孵育 15 min 后用酶标仪检测 340 nm 处 A 值,每个样本设置 3 个平行孔,取均值代入标准曲线(用已知浓度的乳酸标准品绘制)计算乳酸含量,检测前用试剂盒自带的质控品验证检测准确性(质控品检测值在说明书参考范围内视为合格)。

1.3 统计学处理 数据分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件,所有数据结果均以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式呈现。在统计学检验方面,两组数据的比较采

用独立样本 t 检验;多组数据间的均值比较则运用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染后 FOXO4 蛋白和 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,各组大鼠胃黏膜 FOXO4 mRNA 表达差异有统计学意义(单因素方差分析: $F = 1\ 862, P < 0.000\ 1$)。对照组 FOXO4 mRNA 表达为基准水平,模型组较对照组显著降低($P < 0.000\ 1$); OE-NC 组、shNC 组与模型组差异无统计学意义; OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组较模型组显著升高(均 $P < 0.000\ 1$),且 OE-FOXO4+COE 组高于 OE-FOXO4 组; shFOXO4 组较模型组显著降低($P < 0.000\ 1$),shFOXO4+COE 组较 shFOXO4 组显著升高、与模型组比较差异无统计学意义,提示 COE 可部分逆转 FOXO4 沉默效应。见图 1A。免疫荧光结果显示,模型组 FOXO4 蛋白表达较对照组下降; OE-NC 组、shNC 组与模型组差异无统计学意义; OE-FOXO4+COE 组表达增加且高于 OE-FOXO4 组, shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组表达降低。该结果与 RT-PCR 结果一致。见图 1B。

2.2 FOXO4 的表达影响 COE 对 GPL 大鼠治疗作用 与对照组相比,模型组大鼠胃黏膜皱襞结构紊乱,表面欠平整且光泽度降低,黏膜表面可见散在分布的点状或斑片状出血灶。相较于模型组,OE-

NC 组、shNC 组大鼠胃黏膜无明显变化; COE 组、OE-FOXO4 组以及 OE-FOXO4+COE 组的胃黏膜皱襞呈现较为平滑的状态,其表面未出现糜烂及出血点;而 shFOXO4 组与 shFOXO4+COE 组的胃黏膜皱襞则显得粗糙,光泽度欠佳,能观察到糜烂和出血点,见图 2A。阿利新蓝-过碘酸雪夫染色(alcian blue-periodic acid-schiff staining, AB-PAS)染色显示,模型组大鼠黏液层明显变薄、附着量减少。与模型组相比,OE-NC 组、shNC 组大鼠胃黏膜黏液层及黏液附着量变化无明显变化; COE 组、OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组胃黏膜黏液层增厚,表面黏液附着量增加,且 OE-FOXO4+COE 组胃黏膜更接近正常组大鼠胃黏膜;与模型组相比,shFOXO4 组、shFOXO4+COE 组胃黏膜黏膜层变薄,表面黏液附着量减少,见图 2B。

2.3 FOXO4 介导 COE 对 GPL 大鼠胃黏膜乳酸生成的影响 采用化学比色法检测 GPL 大鼠胃黏膜乳酸含量,各组差异有统计学意义(单因素方差分析: $F = 880.9, P < 0.000\ 1$)。对照组乳酸含量为基准水平,模型组较对照组显著上升($P < 0.000\ 1$)。与模型组相比: OE-FOXO4 组、OE-FOXO4+COE 组乳酸含量均显著下降($P < 0.000\ 1$),且 OE-FOXO4+COE 组更接近对照组水平; shFOXO4 组乳酸含量显著上升($P < 0.000\ 1$); shFOXO4+COE 组乳酸含量降低($P < 0.000\ 1$)。见图 3。

2.4 FOXO4 对 GPL 有氧糖酵解关键酶的调控作

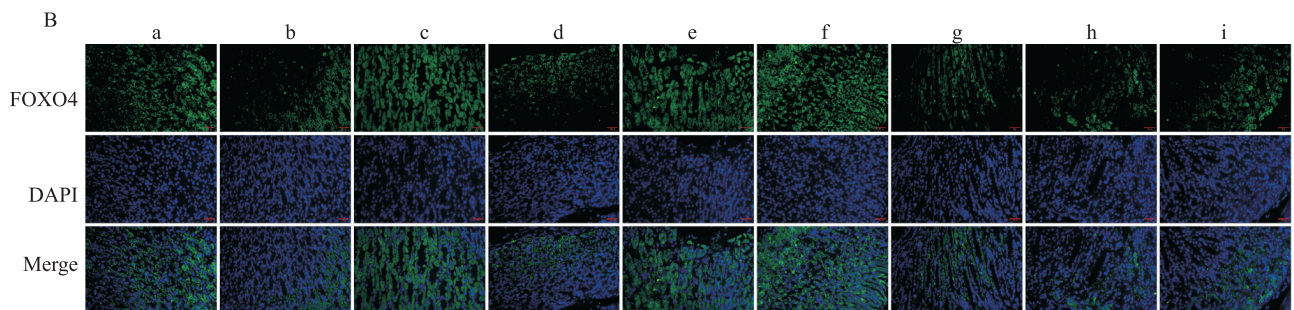
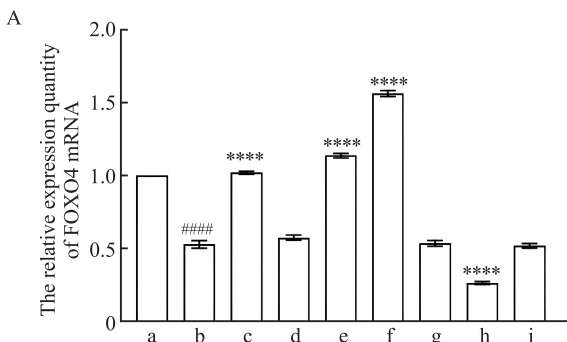


图1 各组大鼠 FOXO4 的表达情况

Fig. 1 FOXO4 expression in rats in each group

A: FOXO4 mRNA expression in rats in each group detected by RT-PCR; B: FOXO4 protein expression in rats in each group detected by immunofluorescence assay $\times 400$; a: Control group; b: Model group; c: COE group; d: OE-NC group; e: OE-FOXO4 group; f: OE-FOXO4+COE group; g: shNC group; h: shFOXO4 group; i: shFOXO4+COE group; **** $P < 0.000\ 1$ vs Control group; **** $P < 0.000\ 1$ vs Model group.

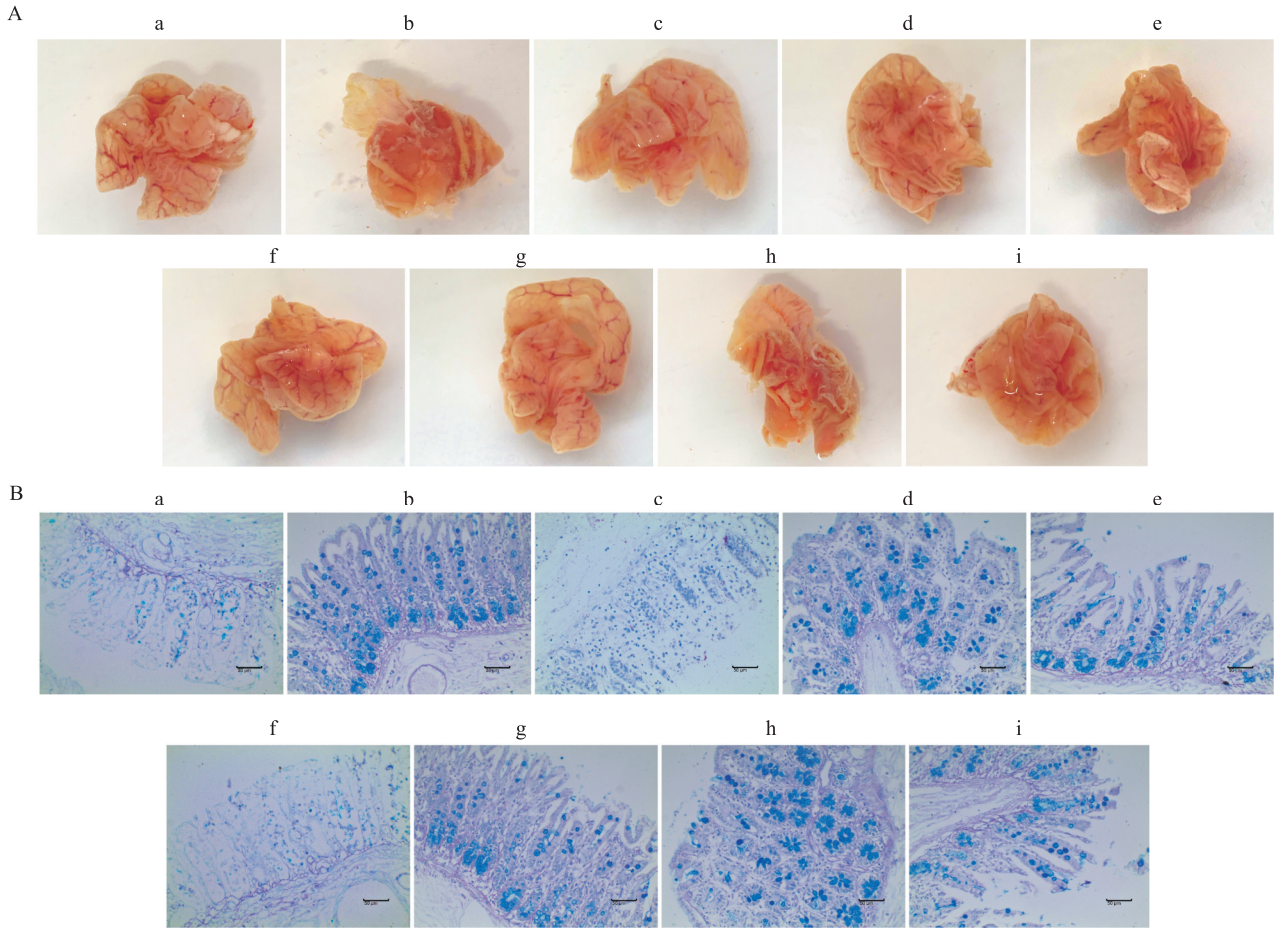


图2 FOXO4在COE治疗GPL大鼠过程中的影响

Fig. 2 The effects of FOXO4 during the treatment of GPL rats with COE

A: The effects of COE on gastric mucosa morphology in rats with GPL (macroscopic view $\times 1$); B: The effects of COE on pathological changes of gastric mucosa in GPL rats (AB-PAS staining $\times 200$); a: Control group; b: Model group; c: COE group; d: OE-NC group; e: OE-FOXO4 group; f: OE-FOXO4+COE group; g: shNC group; h: shFOXO4 group; i: shFOXO4+COE group.

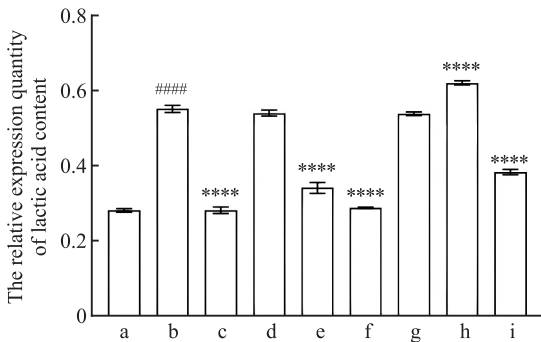


图3 FOXO4的表达对GPL大鼠胃黏膜组织中乳酸含量的影响

Fig. 3 The effects of FOXO4 expression on lactate content in gastric mucosal tissues of GPL rats

a: Control group; b: Model group; c: COE group; d: OE-NC group; e: OE-FOXO4 group; f: OE-FOXO4+COE group; g: shNC group; h: shFOXO4 group; i: shFOXO4+COE group; #### $P < 0.0001$ vs Control group; **** $P < 0.0001$ vs Model group.

用 免疫组化结果(图4)显示:LDHA、GLUT1、HK2、PKM2蛋白定位于胃黏膜细胞胞质。模型

组4种蛋白表达较对照组显著增加;COE组、OE-FOXO4组、OE-FOXO4+COE组表达显著降低,联合组抑制效果最显著。shFOXO4组LDHA、GLUT1、HK2表达较模型组进一步增加,PKM2差异无统计学意义;shFOXO4+COE组表达较shFOXO4组显著减少,4种蛋白表达均有逆转。mRNA定量分析显示(图5),各组LDHA、GLUT1、HK2、PKM2 mRNA表达差异有统计学意义(单因素方差分析:LDHA: $F=233.6, P < 0.0001$; GLUT1: $F=268.3, P < 0.0001$; HK2: $F=781.2, P < 0.0001$; PKM2: $F=350.9, P < 0.0001$)。模型组mRNA较对照组显著升高($P < 0.0001$);COE组、OE-FOXO4组、OE-FOXO4+COE组呈梯度降低(均 $P < 0.0001$),联合组抑制效果最显著。shFOXO4组GLUT1、LDHA、HK2 mRNA较模型组升高($P < 0.0001, P < 0.01, P < 0.001$),PKM2差异无统计学意义;与模型组相比,shFOXO4+COE组

LDHA、HK2、PKM2 mRNA 降低 ($P<0.0001$ 、 $P<0.0001$ 、 $P<0.05$), GLUT1 差异无统计学意义。

3 讨论

南蛇藤为传统中草药,藤茎、根、果实及叶均可入药,具有祛风除湿、活血解毒、消肿抗炎等功效^[6-7],现代药理研究表明其提取物含萜类、脂肪类、苷类等多种活性成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等

广泛药理作用。课题组前期研究^[4,6]表明,COE可通过抑制有氧糖酵解逆转GPL进展,但COE对FOXO4的调控作用及二者在糖酵解中的关联尚未明确。本研究进一步表明,COE可上调GPL大鼠胃黏膜FOXO4表达,且FOXO4过表达与COE联合干预时,胃黏膜乳酸生成量及HK2、PKM2等糖酵解关键酶表达的抑制效应更显著,提示FOXO4可能是COE调控GPL代谢重编程的核心靶点,其上调可能是COE

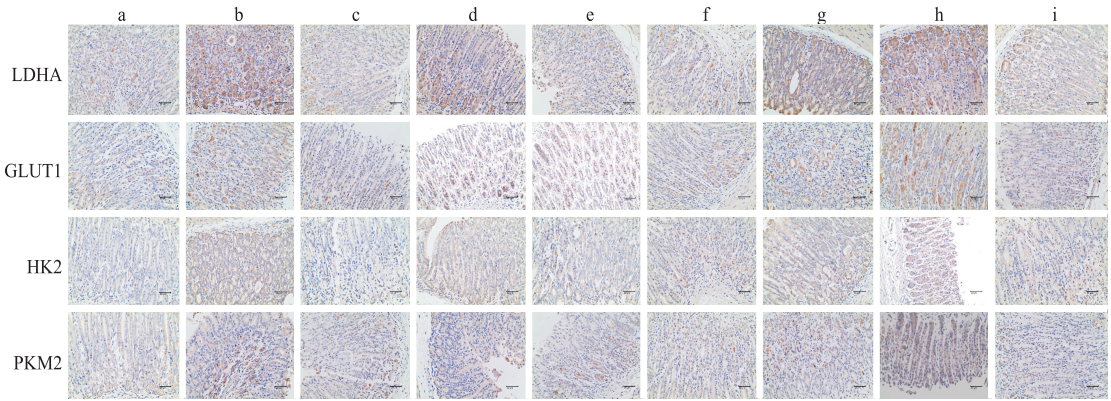


图4 GPL大鼠胃黏膜组织中LDHA、GLUT1、HK2、PKM2蛋白表达情况及COE、FOXO4在其中的作用 ×200

Fig. 4 Immunohistochemical detection of LDHA, GLUT1, HK2, PKM2 expression in gastric mucosal tissues of GPL rats and the roles of COE and FOXO4 ×200

a: Control group; b: Model group; c: COE group; d: OE-NC group; e: OE-FOXO4 group; f: OE-FOXO4+COE group; g: shNC group; h: shFOXO4 group; i: shFOXO4+COE group.

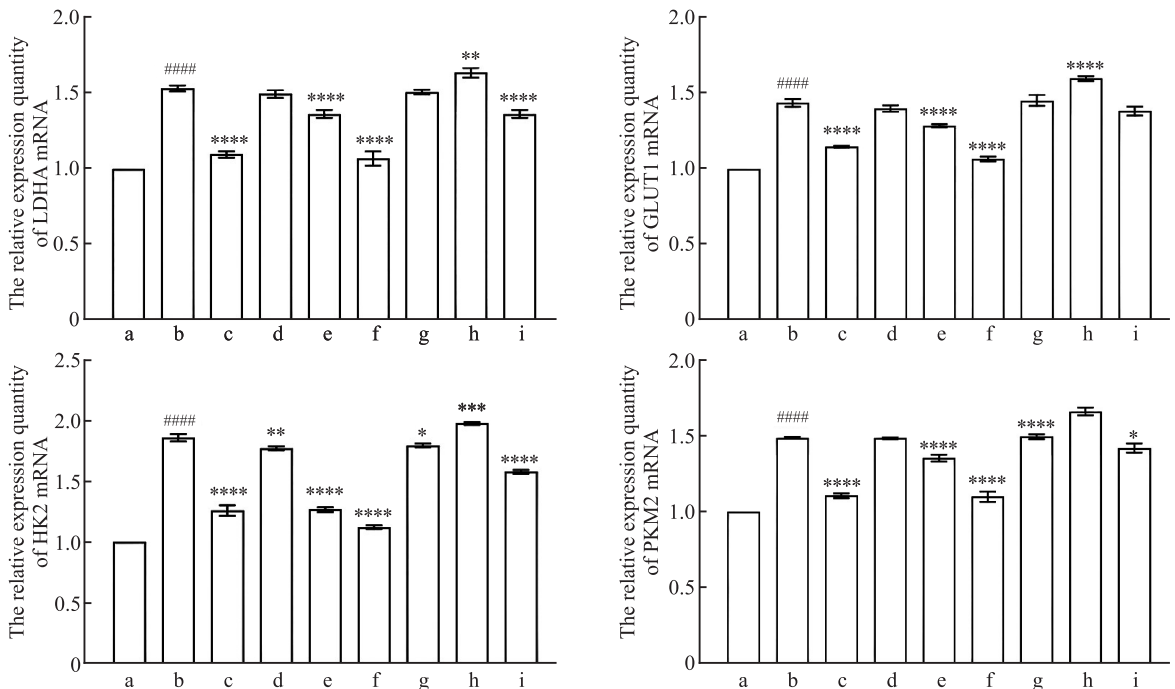


图5 COE对FOXO4质粒转染后GPL大鼠胃黏膜组织中LDHA、GLUT1、HK2、PKM2 mRNA表达的影响

Fig. 5 The effects of COE on the mRNA Expressions of LDHA, GLUT1, HK2 and PKM2 in gastric mucosal tissues of GPL rats after FOXO4 plasmid transfection

a: Control group; b: Model group; c: COE group; d: OE-NC group; e: OE-FOXO4 group; f: OE-FOXO4+COE group; g: shNC group; h: shFOXO4 group; i: shFOXO4+COE group; #### $P<0.0001$ vs Control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Model group.

抑制糖酵解的关键起始步骤。

FOXO4是调控细胞能量代谢的核心转录调控蛋白,但其在GPL异常激活的有氧糖酵解中扮演的角色及具体调控机制尚未完全明晰。课题组前期实验^[4]已表明,FOXO4蛋白在GPL大鼠模型中表达降低,而在COE用药组中表达升高且呈剂量依赖性。本研究聚焦FOXO4分子功能,通过复合模型法构建GPL大鼠模型,结合分子生物学与代谢组学技术显示,GPL状态下胃黏膜组织中FOXO4表达水平显著降低,与前期研究结果一致;外源性过表达FOXO4后,LDHA、GLUT1等糖酵解关键酶的转录活性及蛋白合成受抑,而沉默FOXO4则会加重GPL状态下有氧糖酵解进展,初步揭示FOXO4作为糖酵解负调控因子的潜在作用。

有氧糖酵解亢进是因为GPL的核心代谢异常。本实验中,模型组大鼠胃黏膜乳酸含量显著升高,LDHA、PKM2、HK2、GLUT1等糖酵解关键酶表达异常上调,与已有研究报道的GPL有氧糖酵解亢进特征一致。COE干预可通过升高FOXO4表达逆转这一过程,使胃黏膜乳酸含量逐步降低、糖酵解关键酶表达下降,尤其FOXO4过表达与COE联用组乳酸水平可恢复至正常范围,酶表达抑制更为显著。需说明的是,PKM2与其他糖酵解酶表达存在不同步现象,这源于其核心转录调控更多依赖HIF-1 α 、c-Myc,且功能活性主要依赖翻译后修饰,FOXO4对其直接转录影响较弱,但不影响核心机制成立。既往研究^[8]表明,FOXO4可与LDHA启动子结合并抑制其活性,进而减轻糖代谢紊乱,本研究进一步证实COE通过提高FOXO4表达增强其转录调控作用,显著下调LDHA、GLUT1、HK2等酶表达;而shFOXO4+COE组部分FOXO4表达与糖酵解酶表达存在差别,可能因部分糖酵解酶表达通过非FOXO4依赖途径,是COE作为多成分提取物多靶点协同作用的结果,体现中药整体调控特性。此外,FOXO4介导的代谢调控还伴随胃黏膜功能改善,如OE-FOXO4+COE组大鼠胃黏膜黏液层结构恢复更显著,提示COE上调FOXO4后,不仅通过抑制有氧糖酵解阻断GPL进展,还可能通过改善黏膜屏障功能增强胃黏膜防御能力,各酶表达的局部差异也反映了糖代谢调控网络的复杂性。

中医药在慢性胃病及癌前病变防治中具有悠久历史和独特优势,通过多成分、多靶点、多通路整体调节发挥作用。有研究^[9]表明,多种中草药及其

活性成分在GPL干预中展现良好潜力,可通过改善胃黏膜微环境、抑制炎症反应、调节细胞增殖与凋亡平衡等途径延缓或逆转GPL进展。例如,白藜芦醇可通过激活AMPK通路抑制结肠癌细胞有氧糖酵解^[10];黄芪甲苷IV可抑制肝癌细胞增殖、侵袭和抗凋亡,诱导细胞毒性和凋亡效应并触发G₁期阻滞,降低抗凋亡蛋白表达^[11]。在GPL领域,加味柴芍六君子汤通过调控PI3K/AKT/mTOR通路改善胃黏膜代谢紊乱^[12],左金丸可能通过调控MAPK等信号通路发挥抗炎及免疫调节作用,改善溃疡性结肠炎炎症状态^[13]。同时,关于中草药对FOXO4的调控作用也有相关报道^[14],部分中草药成分可通过上调或下调FOXO4表达影响下游信号通路,在肿瘤、代谢性疾病等多种疾病模型中发挥治疗效应,如部分抗肿瘤中药成分可通过激活FOXO4抑制肿瘤细胞糖酵解,进而抑制肿瘤生长。

参考文献

- [1] 张家祥,周永学,闫曙光,等. 缺氧诱导的线粒体自噬与糖代谢重编程对胃癌前病变影响的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2022, 32(10): 1007-15. doi: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.10.009.
- [1] Zhang J X, Zhou Y X, Yan S G, et al. Research progress of hypoxia-induced mitochondrial autophagy and glucose metabolism reprogramming in gastric precancerous lesions[J]. China Oncol, 2022, 32(10): 1007-15. doi: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.10.009.
- [2] Chen Y H, Li C L, Chen W J, et al. Diverse roles of FOXO family members in gastric cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2021, 13(10): 1367-82. doi:10.4251/wjgo.v13.i10.1367.
- [3] Fontana F, Giannitti G, Marchesi S, et al. The PI3K/Akt pathway and glucose metabolism: a dangerous liaison in cancer [J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(8): 3113-25. doi: 10.7150/ijbs.89942.
- [4] 张效泽,朱方圆,刘延庆,等. 南蛇藤提取物通过抑制有氧糖酵解对大鼠胃癌前病变的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(11): 1487-94. doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.11.001.
- [4] Zhang X Z, Zhu F Y, Liu Y Q, et al. Effects of *Celastrus orbiculatus* extract on precancerous lesions of gastric cancer in rats by inhibiting aerobic glycolysis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(11): 1487-94. doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.11.001.
- [5] 杨劭劭. 叉头框蛋白O4通过协同组蛋白赖氨酸特异性去甲基酶4A调控I型胶原蛋白 $\alpha 2$ 近端启动子H3K9三甲基化影响肝纤维化发病过程的分子机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023. doi:10.27652/d.cnki.gzyku.2023.001985.

- [5] Yang S J. The molecular mechanisms of FOXO4 coordination with KDM4A regulating the recruitment of H3K9me3 in the proximal promoter of COL1A2 to effect the pathogenesis of hepatic fibrosis [D]. Shenyang: China Medical University, 2023. doi: 10.27652/d.cnki.gzyku.2023.001985.
- [6] 文俊淞, 潘子威, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物通过调控 Notch-1 信号通路对胃癌前病变的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60 (2): 313-20. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.018.
- [6] Wen J S, Pan Z W, Liu Y Q, et al. Effect of *Celastrus orbiculatus* extract on gastric precancerous lesions through the regulation of the Notch-1 signaling pathway [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(2): 313-20. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.018.
- [7] 黄泰康. 现代本草纲目 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 1859.
- [7] Huang T K. Compendium of modern materia *Medica* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2001: 1859.
- [8] Wang X H, Jiang Z H, Yang H M, et al. Hypoxia-induced FOXO4/LDHA axis modulates gastric cancer cell glycolysis and progression [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11 (1): e279. doi: 10.1002/ctm2.279.
- [9] Xu W, Li B, Xu M, et al. Traditional Chinese medicine for precancerous lesions of gastric cancer: a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112542. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112542.
- [10] Zhan L, Su F, Li Q, et al. Phytochemicals targeting glycolysis in colorectal cancer therapy: effects and mechanisms of action [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1257450. doi: 10.3389/fphar.2023.1257450.
- [11] Su C M, Wang H C, Hsu F T, et al. Astragaloside IV induces apoptosis, G₁-phase arrest and inhibits anti-apoptotic signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *In Vivo*, 2020, 34 (2): 631-8. doi:10.21873/invivo.11817.
- [12] Sun Z, Liu Y, Deng H, et al. Modified Chaishao Liujunzi Decoction inhibits bile acid-induced gastric intestinal *Metaplasia*: from network prediction to experimental verification [J]. *Aging*, 2023, 15(23): 13998-4018. doi:10.18632/aging.205285.
- [13] Wei Y, Ren S, Wang R, et al. Based on network pharmacology to explore the potential bioactive compounds and mechanisms of Zuojin pill for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 7567025. doi:10.1155/2021/7567025.
- [14] Yu C, Chen D Q, Liu H X, et al. Rosmarinic acid reduces the resistance of gastric carcinoma cells to 5-fluorouracil by downregulating FOXO4-targeting miR-6785-5p [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109: 2327-34. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.061.

Mechanistic investigation of FOXO4 in *Celastrus orbiculatus* extract-mediated inhibition of aerobic glycolysis in the therapy of gastric precancerous lesions

Pan Ziwei¹, Wen Junsong¹, Yao Xuedan¹, Liu Yanqing², Zhu Yaodong¹

(¹ Department of Integrative Medicine and Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ² The Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract Objective To investigate the effects of forkhead box protein O4 (FOXO4) expression on gastric precancerous lesions (GPL), and to clarify its mechanism in mediating the therapeutic effect of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) on GPL by regulating aerobic glycolysis. **Methods** Referring to the previously established combined modeling protocol in our research group, a rat model of gastric precancerous lesions (GPL) was constructed through the following procedures: rats were given free access to 170 µg/mL N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) solution for ad libitum drinking, fed with a diet supplemented with 0.03% ranitidine hydrochloride, and treated with a cycling regimen of "2-day feeding followed by 1-day fasting". Specifically, on the afternoon of each fasting day, the rats received intragastric administration of 2% sodium salicylate at a dose of 10 mL/kg body weight. FOXO4-silenced and overexpression model rats were constructed by tail vein injection of plasmids. The rats were randomly divided into control, model, COE, overexpression negative control (OE-NC), FOXO4 overexpression (OE-FOXO4), OE-FOXO4+COE, silencing negative control (shNC), FOXO4 silencing (shFOXO4) and shFOXO4+COE groups. Gastric mucosal histopathological changes were observed in each group. Lactic acid content in gastric mucosal tissues was detected by colorimetry. The expression levels of FOXO4, HK2, PKM2, LDHA and GLUT1 were evaluated by immunohistochemistry (IHC), and their mRNA levels were determined by

转录因子 *ZEB1* 对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭作用机制的研究

赵云¹, 马贝贝¹, 幸化学¹, 黄绍峰¹, 张张伟², 凌博¹

(右江民族医学院¹基础医学院、²药学院, 百色 533000)

摘要 目的 探讨锌指 E 盒结合同源盒 1 (*ZEB1*) 对肺腺癌 H322 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制。方法 基于 GEO 和 TCGA 公共数据库分析转录因子 *ZEB1* 在肺腺癌中的基因表达特征; 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测肺腺癌细胞系 (H322、A549、95-D) 和正常肺上皮细胞 (BEAS-2B) 中 *ZEB1* 的 mRNA 和蛋白表达水平; 进一步构建慢病毒稳定转染 *ZEB1* 过表达 (Oe-*ZEB1*) 和过表达对照 (Oe-NC) H322 细胞株; 利用 CCK-8、平板克隆、EdU、Hoechst33258/PI 双染检测细胞的增殖和凋亡水平; 划痕实验和 Transwell 检测细胞的迁移和侵袭能力; 流式细胞术分析细胞的周期水平; Western blot 检测相关通路的蛋白表达。结果 GEO 和 TCGA 结果显示, *ZEB1* 在肺腺癌中的表达特征与肿瘤恶性程度差异有统计学意义; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, *ZEB1* 在肺腺癌细胞系中的表达均高于 BEAS-2B ($P < 0.05$); CCK-8、平板克隆、EdU、划痕和 Transwell 结果显示, 与未转染的空白对照 (Control) 组相比, Oe-*ZEB1* 肺腺癌 H322 细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$); Hoechst33258/PI 双染和流式细胞术结果显示, 与 Control 组相比, Oe-*ZEB1* 肺腺癌 H322 细胞凋亡水平降低 ($P < 0.05$), 且 Oe-*ZEB1* 肺腺癌 H322 细胞的 G₁ 期比例减少, S 期比例增加, 从而细胞周期加快; Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, Oe-*ZEB1* 肺腺癌 H322 细胞 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、突变型 p53 (mutp53) 蛋白和细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) ($P < 0.05$) 表达水平升高; 与 Control 组相比, Oe-*ZEB1* 肺腺癌 H322 细胞 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、鼠双微体 2 (MDM2) 蛋白和 p21 ($P < 0.05$) 表达水平降低。结论 过表达 *ZEB1* 可以促进肺腺癌 H322 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并可能通过调控 MDM2/mutp53/p21 通路促使细胞从 G₀/G₁ 进入 S 期, 从而加快 H322 细胞周期进程。

关键词 *ZEB1*; 肺腺癌; 转移; 增殖; 侵袭; 细胞周期

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2026)03-0470-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.012

2025-12-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82060540); 广西自然科学基金项目 (编号: 2025GXNSFHA069028)

作者简介: 赵云, 女, 硕士研究生;

凌博, 男, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: lingbo268@163.com

根据国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 的统计数据, 2022 年全球新增肺癌患者 2 480 308 例, 有 1 817 131 例因肺癌死亡^[1]。肺腺癌作为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的主要亚型, 其侵袭性和

RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the COE, OE-FOXO4 and OE-FOXO4+COE groups exhibited significantly improved gastric mucosal lesions, reduced lactic acid levels, weakened expression of aerobic glycolysis-related proteins (PKM2, HK2, LDHA, GLUT1), and enhanced FOXO4 expression. The OE-FOXO4+COE group showed the lowest lactic acid level and more pronounced changes in related protein expression compared with the COE and OE-FOXO4 groups. In contrast, the shFOXO4 and shFOXO4+COE groups displayed increased lactic acid levels, enhanced expression of aerobic glycolysis-related proteins, and reduced FOXO4 expression compared with the model group. **Conclusion** FOXO4 expression is involved in the inhibitory effect of COE on GPL, possibly by regulating the aerobic glycolysis process.

Key words *Celastrus orbiculatus thunb*; extract; gastric precancerous lesions; forkhead box O4; aerobic glycolysis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82274355); Key Project for the Cultivation of Outstanding Young Teachers in Colleges and Universities in Anhui Province (No. 2023-385)

Corresponding author Zhu Yaodong, E-mail: zhuyaodong2022@126.com