

HIF-1 α /Sonic Hedgehog信号通路在大鼠胃黏膜病变演化过程中的动态表达

钱素婷¹ 俞建顺² 邱静¹ 陈芝芸³ 刘庆生^{4*}

(¹浙江中医药大学附属广兴医院, 杭州 310007; ²杭州市丁桥医院消化内科, 杭州 310021;

³浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006; ⁴杭州市中医院科教部, 杭州 310007)

摘要 该文探究了HIF-1 α /Sonic Hedgehog(Shh)信号通路的动态表达与胃黏膜病变演化过程的关系及其意义。选用72只乳鼠(SD大鼠, 8周龄+, 雄性)随机分为正常组、模型组, 予1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG)建立胃癌前病变模型后, 在第4、10、16、22、28、34周末两组分别处死6只, 采用苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色检测胃黏膜组织病理学变化, qRT-PCR法检测HIF-1 α 、VEGF、CTGF、iNOS、ET-1、Shh、Ptch1、Smo、SuFu、Gli1、Cyc-D1、Cyc-E1、c-Myc mRNA的表达, Western blot法检测HIF-1 α 、CTGF、iNOS、ET-1/2/3、Shh、Ptch1、Smo、SuFu、Gli-1、Cyc-D1、p-c-Myc蛋白的表达。结果显示, HE染色可见模型组大鼠胃黏膜随时间推进出现炎症、萎缩、肠化, 甚至异型增生。从第28周开始, 模型组大鼠胃黏膜组织内HIF-1 α 、VEGF、CTGF、iNOS、ET-1、Shh、Smo、Gli1、Cyc-D1、Cyc-E1 mRNA表达随造模时间增长, 均有不同程度的升高, 第34周时两组间的差异有统计学意义($P < 0.05$); SuFu mRNA表达随时间增加略呈下降趋势, 差异在第34周有统计学意义($P < 0.05$), Ptch1 mRNA表达除16周外均呈下降趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 模型组大鼠胃黏膜内HIF-1 α 、CTGF、iNOS、ET-1/2/3、Gli1蛋白表达水平呈升高趋势, 28周开始组间差异有统计学意义($P < 0.05$), Shh、Smo、SuFu蛋白表达无明显差异($P > 0.05$); Ptch1蛋白表达略呈下降趋势, 第4周时差异有统计学意义($P < 0.05$); Gli-1蛋白表达呈下降趋势, 16周时差异有统计学意义($P < 0.05$); Cyc-D1蛋白表达在第16周有减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); p-c-Myc蛋白表达呈上升趋势, 第10周时差异有统计学意义($P < 0.05$)。这提示HIF-1 α /Shh信号通路均参与胃黏膜恶性病变过程, 其关键基因可作为延缓或抑制胃黏膜病变的重要靶点。

关键词 HIF-1 α /Shh信号通路; 胃黏膜病变; 胃癌前病变

Dynamic Expression of HIF-1 α /Sonic Hedgehog Signaling Pathway in the Evolution of Gastric Mucosal Lesions

QIAN Suting¹, YU Jianshun², QIU Jing¹, CHEN Zhiyun³, LIU Qingsheng^{4*}

(¹Guangxing Hospital affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310007, China; ²Department of Gastroenterology, Dingqiao Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310021, China; ³The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China; ⁴Department of Geriatrics, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

收稿日期: 2020-12-09 接受日期: 2021-03-22

浙江省自然科学基金(批准号: LY13H290004)、杭州市科技计划项目(批准号: 20130733Q18)和杭州市医药卫生科技计划重点项目(批准号: 2016Z09)资助的课题*通讯作者。Tel: 13858050422, E-mail: 7394822@qq.com

Received: December 9, 2020 Accepted: March 22, 2021

This work was supported by the Zhejiang Natural Science Foundation of China (Grant No. LY13H290004), Hangzhou Science and Technology Plan Project (Grant No. 20130733Q18), and the Key Project of Hangzhou Medical and Health Science and Technology Plan (Grant No. 2016Z09)

*Corresponding author. Tel: +86-13858050422, E-mail: 7394822@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5535>

Abstract This paper aimed to study the relationship between the dynamic expression of HIF-1 α /Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway and the evolution of gastric mucosal lesions. 72 rats (SD rats, 8+weeks of age, male) were randomly divided into normal group and model group. After establishing model of precancerous lesions with MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine), six rats in the two groups were killed respectively at the end of the 4th, 10th, 16th, 22nd, 28th and 34th week. The pathological changes of gastric mucosa were detected by HE (Hematoxylin-eosin) staining. The mRNA expressions of *HIF-1 α* , *VEGF*, *CTGF*, *iNOS*, *ET-1*, *Shh*, *Ptch1*, *Smo*, *SuFu*, *Gli1*, *CYC-D1*, *CYC-E1*, and *C-MYC* were detected by qRT-PCR. The proteins expressions of HIF-1 α , CTGF, iNOS, ET-1/2/3, Shh, Ptch1, Smo, SuFu, Gli1, CYC-D1, and P-C-Myc were detected by Western blot. The results showed that HE staining showed the gastric mucosa of the rats in the model group occurred inflammation, atrophy, intestinal metaplasia, and even heteroplasia. From 28th weeks, the model group rats gastric mucosa tissues *HIF-1 α* , *VEGF*, *CTGF*, *iNOS*, *ET-1*, *Shh*, *Smo*, *Gli1*, *Cyc-D1*, *Cyc-E1* mRNA expression had varying degrees of growth. At 34 weeks differences between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). *SuFu* mRNA expression showed a slightly decreasing trend with the increase of time, and the difference was statistically significant at the 34th week ($P < 0.05$). *Ptch1* mRNA expression showed a decreasing trend except for the 16th week, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The protein expression of HIF-1 α , CTGF, iNOS, ET-1/2/3, Gli-1 in the model group showed an increasing trend, and the difference between groups had statistical significance from 28 weeks ($P < 0.05$). There were no significant differences in the protein expression of Shh, Smo and SUFU ($P > 0.05$). The protein expression of Ptch1 showed a slightly decreasing trend, and the difference was statistically significant at the 4th week ($P < 0.05$). The protein expression of Gli-1 showed a downward trend, and the difference was statistically significant at the 16th week ($P < 0.05$). The protein expression of Cyc-D1 decreased at the 16th week, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The protein expression of P-c-Myc showed an upward trend, and the difference was statistically significant at the 10th week ($P < 0.05$). These results suggest that HIF-1 α /Shh signaling pathway is involved in the process of gastric mucosal malignant lesions, whose key genes may serve as important targets to delay or inhibit gastric mucosal lesions.

Keywords HIF-1 α /Shh signaling pathway; gastric mucosal lesions; precancerous lesions of gastric cancer

胃癌是最常见的癌症之一,其发病率居全球癌症第五位(约为8%),死亡率居第三位(约占10%),其中70%的发病及死亡均发生在发展中国家^[1]。受现有医疗水平限制,多数患者在胃癌早期阶段症状不明显,因此胃癌早期发现率较低。胃黏膜病变与胃癌的发生密切相关,慢性非萎缩性胃炎可发展为萎缩性胃炎,进而演变为肠上皮化生、异型增生等癌前病变^[2]。故现在胃癌相关研究的重中之重是针对胃癌早期癌前病变的及时检测与筛查^[3]。

课题组前期研究发现,胃癌前病变的过程中伴随着HIF-1 α /Shh信号通路的激活^[4-5]。Shh信号通路在胃黏膜萎缩、肠化生中均出现异常信号分子的表达,这提示Shh信号通路在胃癌前病变发生早期就有可能被激活^[6]。又有研究发现,低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的增加可以促进shh的自分泌,通过上调Gli1向核的转移而激活

了缺氧微环境中的Shh通路^[7]。故本研究通过检测HIF-1 α /Shh信号通路的关键基因和蛋白的动态表达,探讨两者参与胃黏膜病变进展过程中的关系及变化,为延缓和抑制胃黏膜恶性病变寻找新思路新方法。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年SD大鼠(8周龄+, SPF级),购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号: SCXK(沪) 2012-0002]。雌雄小鼠按照2:1比例配种,取出生3天的乳鼠进行实验。所有动物实验均获得浙江中医药大学伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂

MNNG购自东京化成工业株式会社;总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有

限公司; CHamQ™ SYBR qPCR Master Mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 总蛋白提取试剂盒、BCA定量试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 10% TGX免染快速丙稀酰胺试剂盒购自美国BIO-RAD公司。

1.3 实验动物分组及处理

1.3.1 分组方法和模型制备 3日龄雄性乳鼠72只随机分为2组, 其中正常组36只、模型组36只。每日定时禁食2 h后, 正常组乳鼠予生理盐水10 mL/kg灌服, 模型组予800 mg/L的MNNG 10 mL/kg灌服, 连续10天。

1.3.2 标本采集 以造模后次日为实验观察第1天, 分别在实验第4、10、16、22、28、34周末6个检测点, 每组取6只, 禁食水24 h后, 腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉, 离断取全胃, 沿胃大弯切开, 生理盐水冲洗, 肉眼观察胃黏膜大体变化, 取胃小弯胃体至胃窦黏膜组织放入4%甲醛中固定, 并进行组织病理学观察,

大鼠胃黏膜组织-80 °C冰箱冻存, 行相应基因及蛋白质表达检测。

1.4 实验室检测方法

1.4.1 HE染色观察胃黏膜组织病理学及形态学变化 胃黏膜组织经中性甲醛固定, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 常规HE染色, 观察胃黏膜炎症、萎缩、肠化、异型增生、腺瘤等, 诊断标准参考中国慢性胃炎共识^[8]和异型增生病变Pavoda国际分级标准^[9]。

1.4.2 qRT-PCR法检测胃黏膜组织HIF-1 α /Shh信号通路中关键基因的mRNA表达水平 取出造模后的大鼠胃黏膜组织, 加入裂解液, 按说明书进行总RNA的提取, 获得总RNA浓度, 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA。PCR扩增条件: 95 °C预变性3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。以 β -actin作内参, 计算mRNA的相对表达量。特异性基因表达引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成,

表1 引物序列表
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列 Sequence	大小 Size
<i>HIF-1α</i>	Forward 5'-GAA ATG GCC CAG TGA GAA AG-3' Reverse 5'-CTT CCA CGT TGC TGA CTT GA-3'	116 bp
<i>VEGF</i>	Forward 5'-GCA CGT TGG CTC ACT TCC AG-3' Reverse 5'-TGG TCG GAA CCA GAA TCT TTA TCT C-3'	107 bp
<i>CTGF</i>	Forward 5'-GAG TCG TCT CTG CAT GGT CA-3' Reverse 5'-GCA GCC AGA AAG CTC AAA CT-3'	121 bp
<i>iNOS</i>	Forward 5'-GCT ACA CTT CCA ACG CAA CA-3' Reverse 5'-CAT GGT GAA CAC GTT CTT GG-3'	116 bp
<i>ET1</i>	Forward 5'-CTG GAC ATC ATC TGG GTC AA-3' Reverse 5'-CTG TTC CCT TGG TCT GTG GT-3'	122 bp
<i>Shh</i>	Forward 5'-AGG CTG GAT TCG ACT GGG TCT-3' Reverse 5'-AAC TTG GTG CCA CCC TGC TC-3'	142 bp
<i>Ptch1</i>	Forward 5'-ACC CGC CAG AAG ATA GGA GA-3' Reverse 5'-GGA GTG CTG AGT CCA GGT GT-3'	124 bp
<i>Smo</i>	Forward 5'-TGA TGG CTG GAG TAG TGT GG-3' Reverse 5'-CGT GAG CAG GTG GAA ATA GG-3'	199 bp
<i>Gli1</i>	Forward 5'-AAC ATG GCA GTC GGT AAC ATG AG-3' Reverse 5'-CCG CGT GTG TGT AGC CAT TTA G-3'	132 bp
<i>SuFu</i>	Forward 5'-TAA CCT GAG CGG TGT CAG TG-3' Reverse 5'-GTC TTT GCC AGA CAG CCT TC-3'	121 bp
<i>Cyc-D1</i>	Forward 5'-GCG TAC CCT GAC ACC AAT CT-3' Reverse 5'-GAT GGC ACA ATC TCC CTC TG-3'	119 bp
<i>Cyc-E1</i>	Forward 5'-GAC ACG GGA GAA GTG CTG AT-3' Reverse 5'-AGC GAG GAC ACC ATA AGG AA-3'	120 bp
<i>c-Myc</i>	Forward 5'-ATC AAG AGG CCA CAG CAA AC-3' Reverse 5'-TTG GCA GCT GGA TAG TCC TT-3'	120 bp
β -actin	Forward 5'-TGT TGC CCT AGA CTT CGA GCA-3' Reverse 5'-CCA TAC CCA GGA AGG AAG GCT-3'	155 bp

引物序列见表1。

1.4.3 Western blot法检测胃黏膜组织HIF-1 α /Shh信号通路中关键基因蛋白表达水平 采用生物总蛋白提取试剂盒提取大鼠胃黏膜组织蛋白, 选用BCA法进行蛋白定量。总蛋白加上样缓冲液充分变性后, SDS-PAGE凝胶电泳, 湿法转膜, 5%脱脂奶粉室温摇床封闭1 h; 加入不同一抗(GAPDH 1:1 000、HIF-1 α 1:1 000、iNOS 1:1 000、VEGF 1:1 000、CTGF 1:1 000、ET1/2/3 1:1 000、Shh 1:1 000、Ptc1 1:500、Smo 1:1 000、Gli1 1:200、SUFU 1:800、Cyc-D1 1:1 000、p-c-Myc 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 1 \times TBST洗膜, 5 min \times 3次; 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG抗体(1:5 000)和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体(1:5 000), 室温孵育1 h; 洗膜后加ECL化学发光底物显影, 放置Odyssey FC双红外成像系统中进行化学发光检测自动曝光。AlphaView SA 3.3.0软件分析灰度值, 用目的蛋白/GAPDH代表目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 统计数据采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 胃黏膜病变动态演化过程

HE染色镜检(图1)发现, 正常组大鼠胃黏膜小凹结构完整, 固有腺体层次清楚, 细胞形态和腺体结

构未见异型, 腺体排列整齐, 细胞核位于基底部, 呈圆形或椭圆形, 胞质未开放, 固有膜内慢性炎细胞少量浸润。模型组4至10周时胃黏膜小凹上皮细胞出现较大异型, 形态、大小不一, 细胞离开基底, 固有膜内淋巴细胞、浆细胞等慢性炎细胞浸润增多, 浸润细胞数量和范围随饲养时间增加而增加; 模型组在第16周时仅个别大鼠的胃黏膜上皮出现萎缩表现, 固有腺体轻度减少; 随实验过程推进, 出现萎缩的大鼠数量增加且萎缩程度加重, 22周时超半数大鼠出现胃黏膜萎缩, 腺体排列紊乱, 极性改变, 少数腺体呈囊状扩张, 细胞核变圆, 并伴有轻度异型增生; 28周时胃黏膜组织出现明显炎性细胞浸润, 腺体紊乱程度加重, 可见复层及背靠背现象, 细胞核颜色加深, 体积增大, 出现异型、极性消失、核分裂等表

象。模型组大鼠4周至10周时胃黏膜出现轻、中度炎症表现, 炎症程度稍高于正常组, 差异无统计学意义($P>0.05$), 16周至34周时胃黏膜几乎都出现轻、中度炎症, 可见重度炎症表现, 差异有统计学意义($P<0.01$)(图2A), 4周至22周胃黏膜出现轻度萎缩, 差异无统计学意义($P>0.05$), 28周至34周时胃黏膜几乎均出现轻中度萎缩及异型增生, 出现1例高分化腺癌, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)(图2B)。

2.2 胃黏膜病变演化过程中HIF-1 α /Shh信号通路关键基因mRNA表达的变化

模型组大鼠HIF-1 α 、血管内皮生长因子(vascular

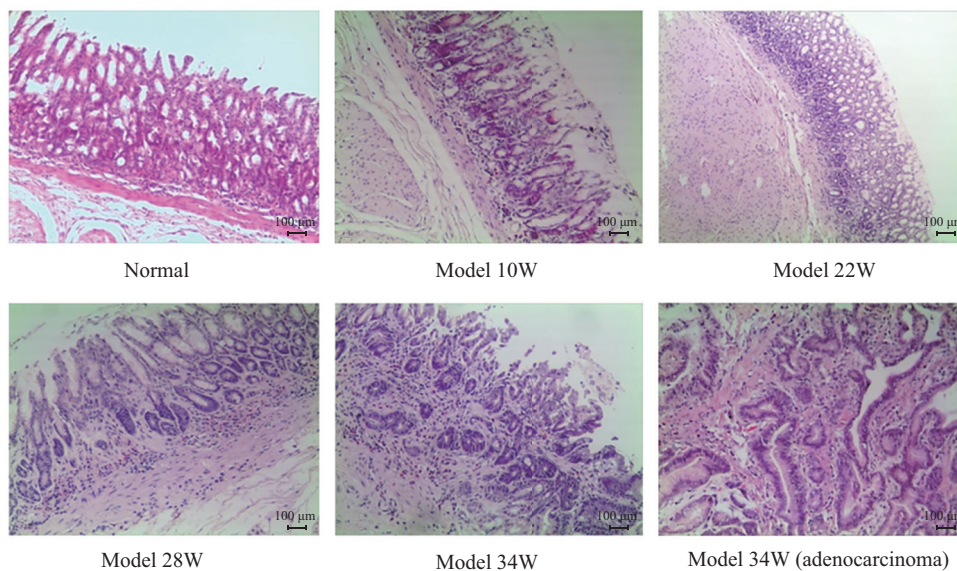
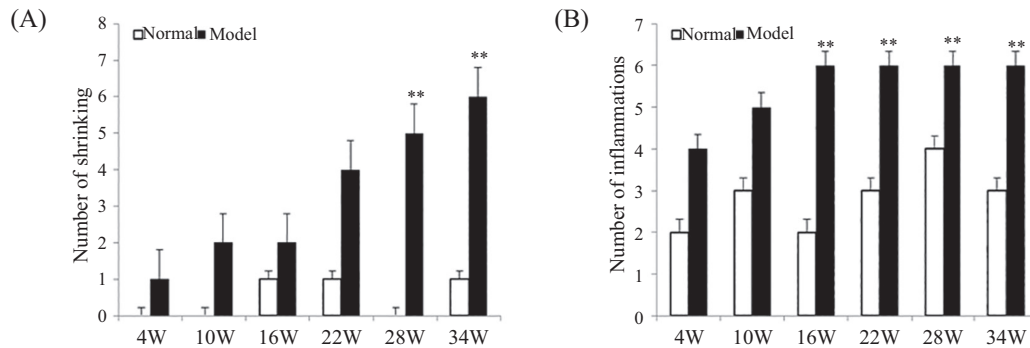


图1 大鼠胃黏膜病理学变化

Fig.1 Histological changes of the gastric mucosa of rats



A: 大鼠胃黏膜炎症变化; B: 大鼠胃黏膜萎缩变化; $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ** $P<0.01$, 与正常组比。

A: changes of gastric mucosa inflammation in rats; B: changes of gastric mucosa atrophy in rats; $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ** $P<0.01$ compared with the normal group.

图2 大鼠胃黏膜炎症及萎缩的动态变化

Fig.2 Dynamic changes of inflammation and atrophy in the gastric mucosa of the rats

endothelial growth factor, *VEGF*)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, *CTGF*)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)、内皮素-1(endothelin-1, *ET-1*)、*Shh*、*Smo*、*Gli-1*、*Cyc-D1*、*Cyc-E1* mRNA表达随造模时间增长均呈上升趋势, 34周时差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 其中 *Cyc-E1* 除4周外差异均有统计学意义($P<0.05$), *iNOS*、*Smo*、*Cyc-D1* 在实验中后期即22、28、34周时差异有统计学意义($P<0.05$), *HIF-1 α* 、*Shh*、*Gli-1* 在实验后期即28、34周时差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组 *SuFu* mRNA总体上较正常组有下降趋势, 34周时差异有统计学意义($P<0.01$)。而模型组 *Ptch1* 总体上呈下降趋势, 但差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。

2.3 胃黏膜病变演化过程中HIF-1 α /Shh信号通路关键基因蛋白表达的变化

模型组大鼠胃黏膜内HIF-1 α 、CTGF、iNOS、ET1/2/3蛋白的表达在各个实验观察节点较正常组均明显升高, 在后期28周差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。而模型组Shh、Smo、Gli-1、Cyc-D1蛋白及p-c-Myc蛋白的相对表达量在实验早中期大多数阶段表达均有升高趋势, 部分呈下降趋势, 但在造模的终末阶段均为上升趋势, 差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组Ptch1蛋白的表达除16周时较正常组有上升趋势外, 其余各时间点较正常组均呈下降趋势, 其中4周时有统计学差异($P<0.05$)。SuFu的表达在早中期模型组均较正常组有上升趋势, 到28至34周则呈下降趋势, 差异无统计学意义($P>0.05$)(图4)。

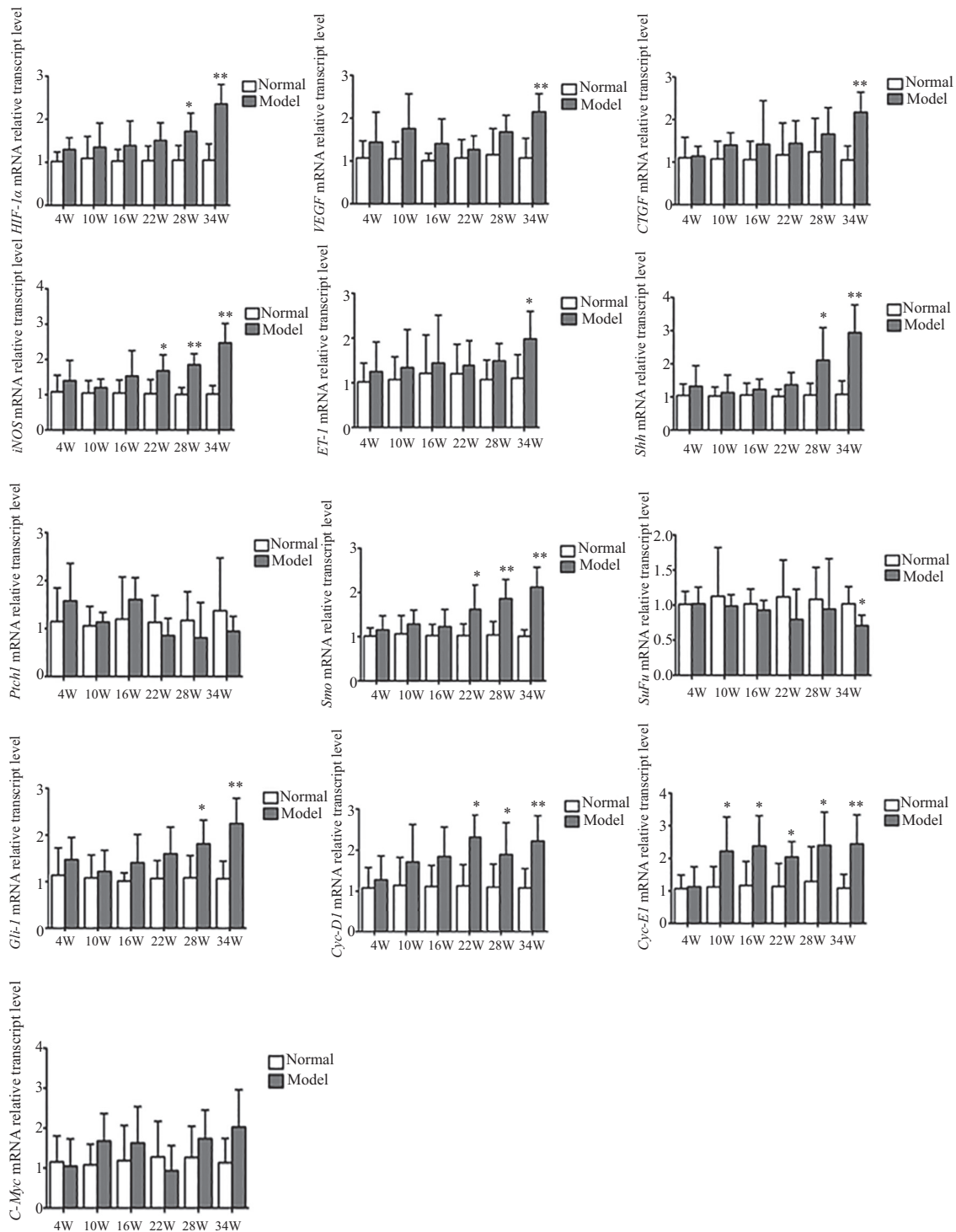
3 讨论

本研究结果表明, 随实验时间的增加, 大鼠胃

黏膜逐渐出现炎症、萎缩、肠化, 甚至异型增生, 同时, 模型组大鼠胃黏膜组织内HIF-1 α 、VEGF、CTGF、iNOS、Shh、Smo等在mRNA与蛋白水平上表达均逐渐增多, 表明HIF-1 α /Shh通路参与了胃黏膜恶性病变的过程, 并且对恶性转变起着正向促进的作用。课题组前期研究发现, 胃癌前病变模型大鼠胃黏膜组织存在因胃黏膜内皮细胞的损伤、血流减缓而导致局部的缺血、淤血和水肿等情况发生, 这证明胃黏膜组织受损及继发炎症时伴随缺氧现象, 主要与HIF信号通路有关。

HIF-1 α 在体内特异性地受氧浓度调节, 可作为低氧的指标, 具有广泛的生物学功能。目前发现HIF-1 α 具有多个靶基因, 如VEGF、乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase, *LDHA*)、促红细胞生成素(erythropoietin, *EPO*)、CTGF、iNOS、ET等^[10-11], 这些靶基因结构上都包含有低氧反应元件(hypoxia-response element, *HRE*)。已有研究发现, VEGF在肿瘤血管生成中起重要作用, 胃癌组织中VEGF的表达水平明显高于正常胃黏膜组织^[12]。肿瘤细胞可以通过自身合成分泌CTGF, 来促进肿瘤细胞DNA的合成和增殖^[13]。iNOS通过产生NO增加血管的通透性, 加速肿瘤血管的生成, 促进肿瘤的生长和转移^[14]。

Shh信号传导异常通常与一系列先天性残疾、恶性肿瘤和免疫缺陷有关, 与胃黏膜的病变过程也有着密切联系, 在肠上皮化生中常见Shh高表达^[15]。Shh信号的传递受靶细胞膜上两种受体膜结合受体patched(包括Ptch1和Ptch2, 与胃癌相关的主要基因产物是Ptch1)和跨膜信号蛋白平滑化受体Smoothed(Smo)的控制, Smo易位至细胞膜中的初级纤毛后, 信号



$\bar{x} \pm s$; $n=6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常组比。

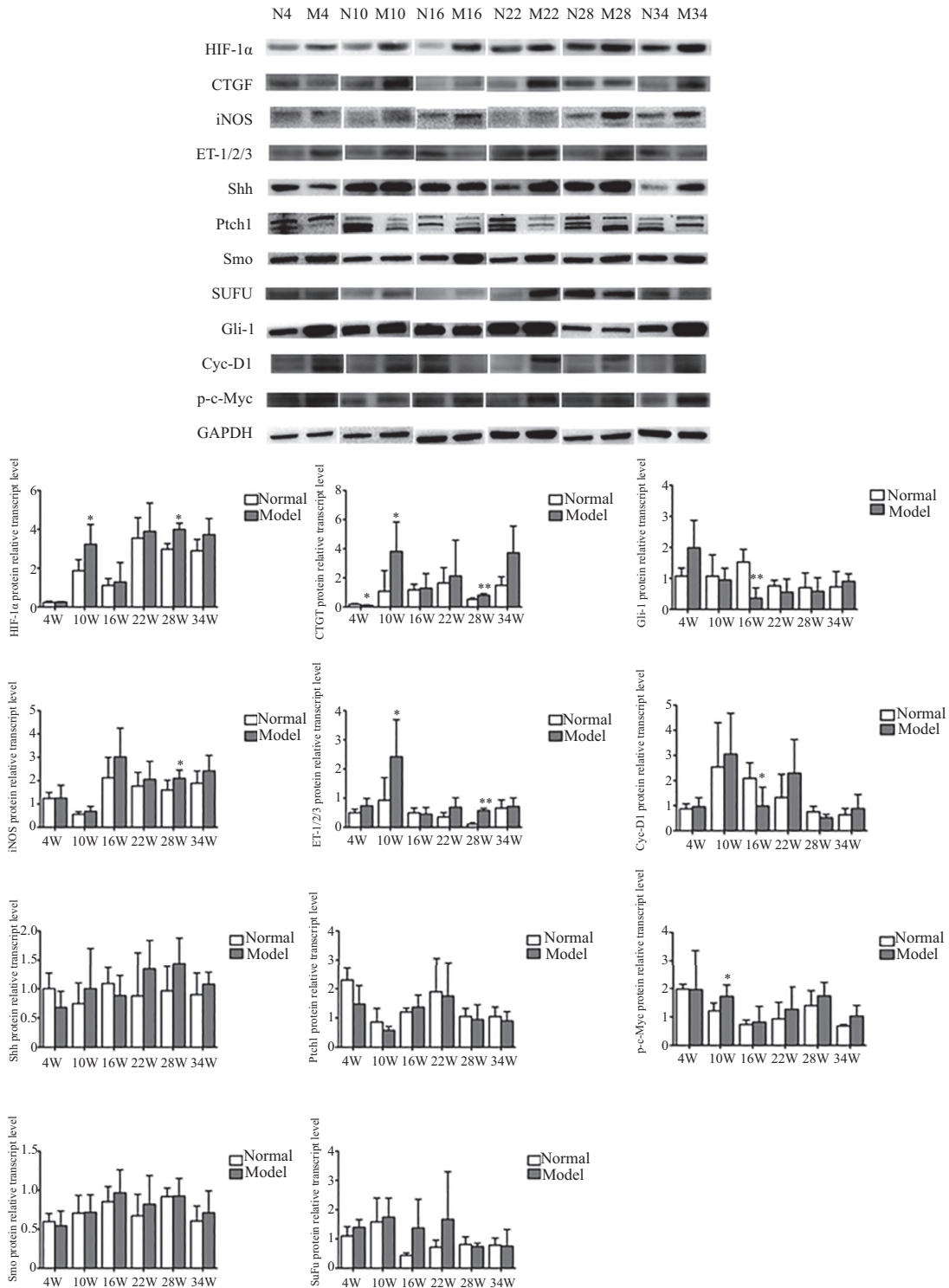
$\bar{x} \pm s$; $n=6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the normal group.

图3 大鼠胃黏膜胃黏膜HIF-1 α /Shh信号通路关键基因表达动态变化

Fig.3 Dynamic changes of the key mRNA of HIF-1 α /Shh signaling pathway in the gastric mucosa of the rats

传导通过胶质母细胞瘤家族(glioma-associated family of zinc finger transcription factors, Glis)转录因子改变转录。Gli家族是锌指转录因子Kruppel家族的成员,包括Gli-1、Gli-2和Gli-3。同时,参与Shh信号转导的核内因子还包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

Fused(Fu)、Fu抑制剂(SuFu)、类运动蛋白Costal-2(Cos2)、蛋白激酶A(PKA)等^[16]。其中,SuFu起负调节作用,抑制Gli家族转录因子的活性。正常情况下,Ptc1抑制Smo蛋白活性,从而抑制下游通路,当Ptc1和Shh结合以后,解除对Smo的抑制作用,促使



$\bar{x} \pm s$; n=6; *P<0.05, **P<0.01, 与正常组比。

$\bar{x} \pm s$; n=6; *P<0.05, **P<0.01 compared with the normal group.

图4 雄性大鼠胃黏膜HIF-1α/shh信号通路关键蛋白表达动态变化

Fig.4 Dynamic changes of expression of the key protein of HIF-1α/Shh signaling pathway in the gastric mucosa of the rats

Gli蛋白进入核内激活下游靶基因(如 *CyclinD*、*CyclinE*、*Myc*等基因)转录^[17-20],致使DNA异常复制而导致胃黏膜发生相应的恶性转变,促进癌前病变的发生。

最近有研究发现, HIF-1α可能是 Shh信号通路活化的诱导因子。WEI等^[7]认为, HIF-1α能够促进胶质瘤细胞自分泌 Shh, 从而激活 Shh信号通路及 Gli-1的核易位, 进一步上调 *Gli-1*及下游靶基因的表达。

SPIVAK-KROIZMAN等^[21]发现,肿瘤缺氧状态时HIF-1 α 的激活可使肿瘤细胞分泌配体Shh,反过来导致基质成纤维细胞纤维组织沉积的增加。HIF-1 α 的高表达可能诱导细胞周期阻滞,反馈性地活化与细胞增殖相关的信号通路,从而引起多种与增殖相关蛋白的表达,如Shh信号通路中的c-Myc。而Shh信号通路的活化可能会反作用于HIF-1 α ,形成正反馈环,共同促进胃癌前病变的发生发展。

本项目研究显示,与同期正常组相比,模型组大鼠胃黏膜内HIF-1 α 、VEGF、CTGF、iNOS、Shh、Smo、Gli1基因和其蛋白的表达量明显增加,而Ptch1和SUFU的表达水平呈下降趋势,同时,下游相应靶基因*Cyc-D1*、*Cyc-E1*和*c-Myc*表达有所增加,胃黏膜萎缩、肠化也明显呈加重趋势,考虑胃黏膜病变的过程中HIF-1 α 信号通路的激活诱导Shh通路的激活,两者共同作用于胃黏膜的恶性病变。基因水平上,模型组大鼠胃黏膜内*Ptch1* mRNA表达水平在实验早中期4周至16周较正常组有升高趋势,但后期有下降趋势,这提示早中期模型组大鼠胃黏膜逐渐萎缩过程中,HIF-1 α 信号通路已被激活,但可能因为还未出现异型增生,Ptch1无法与Shh结合发挥作用而呈下降趋势。蛋白水平上,模型组大鼠实验早中期4周至16周时SUFU的蛋白表达水平有所增加,Gli-1的表达降低,在22周至34周却与之相反,考虑大鼠胃黏膜的萎缩、肠化以及异型增生的发生发展引起缺氧程度加重,HIF-1 α 可能与Shh通路相互作用,增强缺氧诱导的Gli-1表达^[22],因SUFU主要通过Gli-2介导的胃肠道间质信号的激活而激活,起负调节作用^[23],故实验后期SUFU的降低和Gli-1的增加都可能促进了Shh通路的激活。

综上,缺氧可诱导HIF-1 α 通路的激活,上调*Gil-1*表达,诱导Shh通路激活下游靶基因,促进胃黏膜病变,若抑制HIF-1 α 通路可能同时抑制Shh通路,从而减缓甚至逆转胃癌前病变的进展,因此,测定HIF-1 α /Shh信号通路的动态表达可以更好地了解胃黏膜的病变过程,为胃癌高风险个体的早期发现及治疗提供有效的手段。但仍需进一步明确HIF-1 α /Shh信号通路的激活促进黏膜病变的作用机理和两者之间的具体联系,是否有其他信号通路协同或拮抗作用,是否存在能够阻断该信号通路传导的分子靶点单克隆抗体,以明确HIF-1 α /Shh信号通路作为研究胃癌前病变预测及治疗靶点的可能性。

参考文献 (References)

- [1] LYONS K, LE L C, PHAM Y T, et al. Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2019, 28(5): 397-412.
- [2] SONG H, EKHEDEEN I G, ZHENG Z, et al. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk western population [J]. *BMJ*, 2015, 351: h3867.
- [3] BANKS M, GRAHAM D, JANSEN M, et al. 英国胃肠病学会关于胃癌风险患者的诊断和管理指南[J]. *中华胃肠内镜电子杂志*(BANKS M, GRAHAM D, JANSEN M, et al. Guidelines of the British Society of Gastroenterology for the diagnosis and management of patients at risk of gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Endoscopy*), 2020, 7(2): 49-83.
- [4] YIN J, YI J, YANG C, et al. Weiqi decoction attenuated chronic atrophic gastritis with precancerous lesion through regulating microcirculation disturbance and hif-1 α signaling pathway [J]. 2019, 2019: 2651037.
- [5] 刘庆生, 俞建顺, 蔡丹莉, 等. 大鼠胃癌前病变形成过程中胃黏膜sonic hedgehog信号通路的变化[J]. *中国临床药理学与治疗学*(LIU Q S, YU J S, CAI D L, et al. Changes of sonic hedgehog signaling pathway in gastric mucosa during the formation of gastric precancerous lesions in rats [J]. *Chin J Clin Pharm Ther*), 2018, 23(7): 761-9.
- [6] KONSTANTINOUD, BERTAUX-SKEIRIK N, ZAVROS Y. Hedgehog signaling in the stomach [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 31: 76-82.
- [7] WEI M, MA R, HUANG S, et al. Oroxylin a increases the sensitivity of temozolomide on glioma cells by hypoxia-inducible factor 1 α /hedgehog pathway under hypoxia [J]. 2019, 234(10): 17392-404.
- [8] 房静远, 杜奕奇, 刘文忠, 等. 中国慢性胃炎共识意见[J]. *胃肠病学*(FANG J Y, DU Y Q, LIU W Z, et al. Consensus on chronic gastritis in China [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*), 2017, 22(11): 670-87.
- [9] ROBINSON M J. Gastric dysplasia: the pavoda international classification [J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(5): 694.
- [10] MAXWELL P, SALNIKOW K. Hif-1: an oxygen and metal responsive transcription factor [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(1): 29-35.
- [11] SCHOFIELD C J, RATCLIFFE P J. Oxygen sensing by hif hydroxylases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5): 343-54.
- [12] 熊向乐. Hif-1 α 、vegf表达与胃癌患者临床病理特征的相关性[J]. *中国卫生工程学*(XIONG X L. Correlation between HIF-1 and VEGF expression and clinicopathological features in patients with gastric cancer [J]. *China Health Engineering*), 2019, 18(4): 597-9.
- [13] 贺旭辉, 陈劲, 彭晋修, 等. Tace联合索拉菲尼治疗晚期肝癌对患者血清vegf、ctgf、hif-1 α 和opn水平的动态变化分析[J]. *医疗装备*(HE X H, CHEN M, PENG J X, et al. Dynamic changes of SERUM VEGF, CTGF, HIF-1 and OPN levels in patients with advanced liver cancer treated with TACE combined with sorafenib [J]. *Medical Equipment*), 2015, 28(8): 81-2.
- [14] 牛蕾, 雷丽. 胃癌组织中一氧化氮合酶与整合素连接激酶的表达及意义[J]. *中国医药导报*(NIU L, LEI L. Expression and significance of nitric oxide synthase and integrin-linked kinase in gastric cancer [J]. *China Medical Herald*), 2015, 12(23): 83-

- 6,91,170.
- [15] AKYALA A I, PEPPELENBOSCH M P. Gastric cancer and hedgehog signaling pathway: emerging new paradigms [J]. *Genes Cancer*, 2018, 9(1/2): 1-10.
- [16] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(1): 8-20.
- [17] DUMAN-SCHEEL M, WENG L, XIN S, et al. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing cyclin d and cyclin e [J]. *Nature*, 2002, 417(6886): 299-304.
- [18] LEE H J, WU Q, LI H, et al. A sesquiterpene lactone from *siegesbeckia glabrescens* suppresses hedgehog/gli-mediated transcription in pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2912-7.
- [19] MAZUMDAR T, DEVECCHIO J, AGYEMAN A, et al. Blocking hedgehog survival signaling at the level of the gli genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5904-14.
- [20] MOHAPATRA P, SATAPATHY S R, SIDDHARTH S, et al. Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21(waf1/cip1) mediated inhibition of hh-gli signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 66: 75-84.
- [21] SPIVAK-KROIZMAN T R, HOSTETTER G, POSNER R, et al. Hypoxia triggers hedgehog-mediated tumor-stromal interactions in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(11): 3235-47.
- [22] LEI J, FAN L, WEI G, et al. Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 3119-26.
- [23] YUNG T, POON F, LIANG M, et al. Sufu- and spop-mediated downregulation of hedgehog signaling promotes beta cell differentiation through organ-specific niche signals [J]. 2019, 10(1): 4647.