

网络出版时间: 2023-03-07 15:19:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1349.019.html>

南蛇藤提取物对小鼠胃类器官生长及 E-cadherin 表达的影响

朱方圆¹ 张效泽¹ 刘延庆² 李平¹ 朱耀东¹

摘要 目的 探讨南蛇藤提取物(COE)对小鼠胃类器官生长及其胃上皮细胞 E-cadherin 表达的影响。方法 将 8 周龄 C57 小鼠胃幽门部分离并培养成胃类器官。光镜下观察胃类器官形成的动态变化,HE 染色观察胃上皮细胞间结构,免疫荧光染色观察胃上皮细胞的上皮钙黏蛋白 E-cadherin 表达。类器官传代到第 3 代后,用不同浓度的 COE(0.5、10、20 $\mu\text{g/ml}$) 处理,收集类器官,计算其数量,测量其直径,噻唑蓝(MTT)比色法测其细胞活性,并用 Western blot 法检测 COE 处理后类器官中的 E-cadherin 表达。结果 24~48 h 形成囊样结构并出现中心结构为囊腺样的三维细胞团,72 h 后逐渐出芽并形成胃类器官,提示类器官成功构建。类器官中的上皮细胞标志物 E-cadherin 表达,进一步证实类器官的形成。与对照组比较,COE 组胃类器官数量与直径均增加、细胞活性增强($P < 0.05$),且 E-cadherin 的表达随着 COE 的剂量增加而逐渐增加($P < 0.01$)。结论 小剂量的 COE 可促进 E-cadherin 的表达与类器官的生长形成,可能会影响胃黏膜损伤的修复。

关键词 南蛇藤;胃类器官;小鼠;E-cadherin

中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0471-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.020

胃类器官是由胃干细胞或多能干细胞衍生的一种三维多细胞结构,是内部器官的体外简化和微型微观的世界^[1]。与动物模型相比,类器官培养具有实验操作简单、研究人员可以直接动态监测研究结果等优点。胃类器官的构建能准确再现胃干细胞驱动上皮细胞增殖与分化过程,对于癌症领域的研究具有重要意义^[2]。南蛇藤是一种传统中草药,广泛用于治疗认知功能障碍、癫痫、失眠等。目前,研究

人员已经从南蛇藤的不同部位提纯了数百种提取物。这些提取物具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等生物活性^[3]。其中,南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)抗肿瘤作用较为突出^[4]。E-钙黏蛋白(E-cadherin)是钙黏蛋白 1(cadherin-1, CDH-1)基因编码的细胞黏附糖蛋白,低表达于多种恶性肿瘤中,与患者生存预后密切相关^[5]。此外,E-cadherin 还可作为胃类器官形成标志。然而,对 COE 保护胃黏膜及调节胃类器官中 E-cadherin 方面作用尚未见到研究。该研究分析 COE 对胃类器官的生长形成及 E-cadherin 的影响,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 8 周龄雄性 C57 小鼠,SPF 级,体重(20.0 $\pm$ 2.0) g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 药物、试剂与仪器 南蛇藤的藤茎(广州志鑫药业有限公司,批号:070510)。COE 的提取方法参考巴赫等^[6]研究中所采取方法(该提取方法已获国家发明专利,专利号:ZL200710025343.3),其具体提取流程如下:南蛇藤的藤茎切断后粉碎成粉,使用 95% 乙醇溶液对其进行 3 次提取,将乙醇溶液回收后加水分散,分别用石油醚、乙酸乙酯对其进行 3 次萃取,回收并减压使其浓缩,真空冻干后便可以得到 COE。Advanced DMEM/F12(美国 Corning 公司,货号:10-092-CV),培养基加入 50% Wnt-3a、10% R-spondin-1,补充胃生长因子包括骨形态发生蛋白抑制剂(Noggin)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子 10(FGF 10)(美国 Peprotech 公司,货号分别为:315-20、315-32、250-38、315-09、40042),胃泌素 I(Gastrin I,上海 MedChemExpress 公司,货号:HYPI097),N-Acetylcysteine、Nicotinamide、Y-27632(美国 Sigma 公司,货号分别为 A9165、N0636、Y0503),HEPES(美国 Thermofisher 公司,货号:15630-056),N2、B27、青链霉素(美国 Thermofisher 公司,货号分别为 17502001、17504044、15070063),DPBS(美国 Corning 公司,货号:21-040-CV);Matri-

2023-02-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82274355);安徽省自然科学基金(编号:2208085MH278);安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2020A0215)

作者单位: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 225003

作者简介:朱方圆,男,硕士研究生;

李平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:1964liping@sina.com;

朱耀东,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:zhuyadong2013@163.com

gel(美国 Corning 公司,货号: 356231); 兔抗人 E-cadherin 一抗(英国 Abcam 公司,货号: AF4039); HRP 标记山羊抗兔 IgG(美国 EarthOx 公司,货号: E03012001); MTT 细胞活力检测试剂盒(瑞士 Roche 公司,货号: 96922); PVDF 膜(美国 Millipore 公司,货号: IPVH00010); DAPI、RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,货号分别为 EZ3412B05、P0013B、P0009); ECL 检测试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,货号: WLA003); CO₂ 培养箱(美国 Thermo fisher 公司,型号: il60); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司,型号: CKX-41); 共聚焦激光显微镜(日本 Olympus 公司,型号: FV-3000)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠胃幽门部分离、胃幽门部类器官培养

小鼠禁食 24 h 后处死,解剖后获取全胃。在无菌培养皿中沿胃大弯剖开小鼠胃,展开后用 DPBS 溶液清洗至少 10 次(至清洗液澄清透明,肉眼观察不到明显的污物和杂质)。将幽门部位剪下置于 DPBS 溶液中,剪碎成 1 mm 左右的组织块(其他组织舍弃)。上述步骤中得到的组织块,用 5 mmol/L 的 EDTA 冰上温和消化 20 ~ 30 min,使胃腺体逐渐从基层层脱落。收集胃腺体,离心弃上清液,用 Matrigel 包裹重悬胃腺体,接种于 24 孔板中。接种密度:腺体 200 个/孔,Matrigel 体积 25 μ l/孔。将接种好的 24 孔板置于培养箱中 20 min,使 Matrigel 完全凝固,每孔中加入完全培养基 750 μ l 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下进行培养,每天观察细胞状态,每隔 2 ~ 3 d 进行换液。当小鼠胃类器官体积明显增大,多数类器官直径超过 400 μ m 时即可对类器官进行传代。用胶原酶 IV 在 37 $^{\circ}$ C 下消化,每 10 min 吹打并观察类器官形态,至多数细胞分散开形成 5 ~ 10 个细胞组成的粘连形态(不用消化至单个细胞)。消化完成后离心,去上清液,用 Matrigel 包裹重悬胃腺体,接种于每孔中加入 750 μ l 完全培养基的 24 孔板中,置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下进行培养。收集小鼠胃类器官进行石蜡包埋和切片。切片经脱蜡、乙醇脱水后进行常规 HE 染色。显微镜下观察拍照。

1.2.2 HE 染色 将类器官组织置于甲醛中进行固定。固定成功后对组织进行修剪、流水冲洗、乙醇脱水,溶于石蜡的透明剂中透明、浸蜡、包埋后,再进行切片(4 μ m 薄片)、展片、烤片。切片标本脱蜡与复水,经苏木精浸泡后冲洗,再用伊红染色 10 min,冲洗后就完成了染色。

1.2.3 免疫荧光染色 切片与一抗(1 : 200)在 4 $^{\circ}$ C 过夜,荧光标记的相应二抗(1 : 200)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 DAPI 进行核染色,最后载玻片由共聚焦激光显微镜进行检查。

1.2.4 不同浓度 COE 处理胃类器官并检测其生长

在类器官生长状态较好时按照以下方法分组并进行干预:对照组为含体积分数 1% DMSO 的生理盐水(不给药 0 μ g/ml),低剂量 COE 组(5 μ g/ml),中剂量 COE 组(10 μ g/ml),高剂量 COE 组(20 μ g/ml)。在 COE 处理后的第 1、3、6 天在显微镜下对类器官进行拍照,在图片中计算类器官数量并用 Image J 软件测量其直径。噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT] 比色法测定细胞活力:使用 MTT 细胞活力检测试剂盒按照说明书将不同浓度 COE 处理后的三代胃类器官溶解消化成单细胞,用 Matrigel 包裹接种于 2 000 个细胞/孔的 24 孔板中。每孔中加入 10 μ l (500 μ g/ml) 的 MTT 溶液,孵育 4 h,然后用 100 μ l DMSO 溶解甲醛晶体,在 490 nm 处测定吸光度 A₄₉₀ 并计算细胞活力。检测的时间选择其生长的第 1、3、6 天。

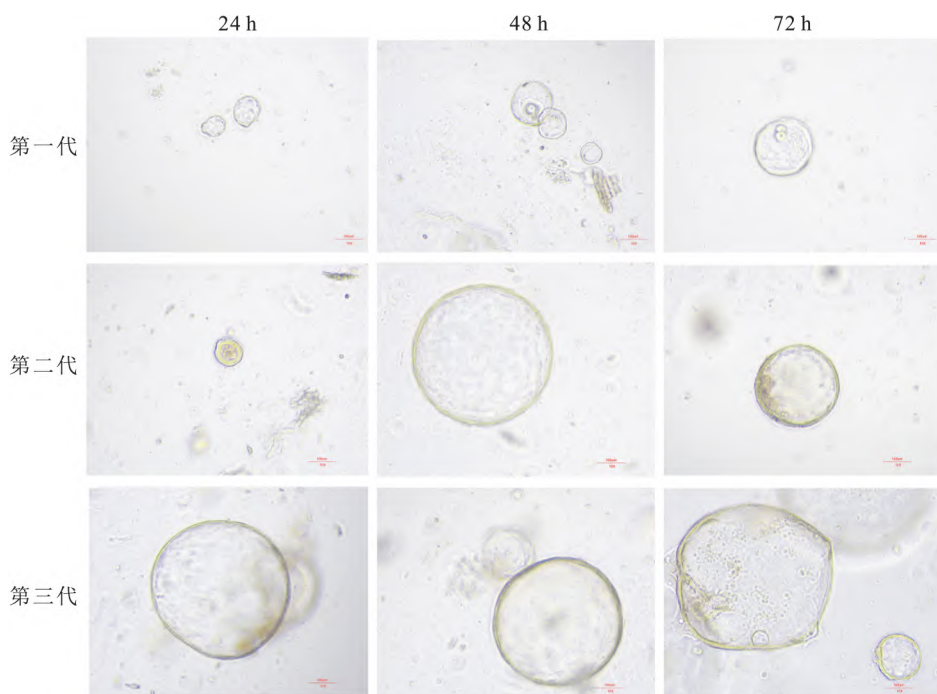
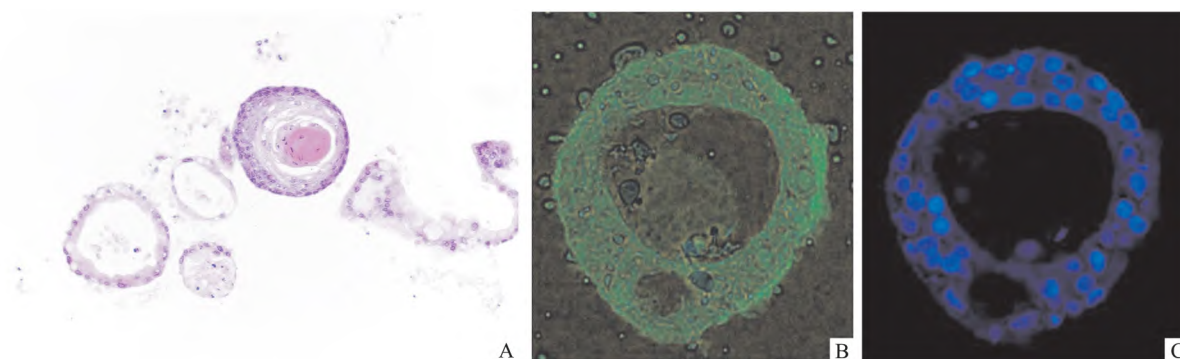
1.2.5 Western blot 检测 将胃类器官消化并制备成单细胞悬液,RIPA 裂解缓冲液裂解细胞提取蛋白,并用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后将其转到 PVDF 膜上,再将 PVDF 膜在脱脂牛奶(5%)中室温封闭 100 min,在 4 $^{\circ}$ C 与 E-cadherin 一抗孵育过夜,TBST 洗膜 4 次后加入二抗 25 $^{\circ}$ C 下反应 1 h,再次洗膜,ECL 试剂盒进行显像。GAPDH 作为对照,蛋白质灰度分析使用 Image J。

1.3 统计学处理 用统计软件 SPSS 26.0 处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验对两组数据进行比较;采用单因素方差分析对多组数据进行比较,在总体差异有统计学意义的情况下进一步用 LSD 法进行两两间的比较。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠胃类器官构建 光镜下观察显示,小鼠胃幽门部组织在培养基中不断的进行生长与分裂,24 ~ 48 h 形成囊样结构,并出现中心结构为囊腺样的三维细胞团,72 h 后逐渐出芽并开始形成胃类器官(图 1)。表明类器官初步构建。

2.2 小鼠胃类器官的形态特征 HE 染色显示,类

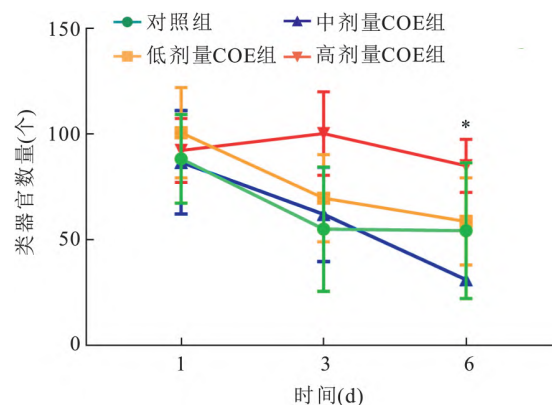
图1 小鼠胃类器官形成动态变化 $\times 100$ 图2 小鼠胃类器官形态特征 $\times 200$

A: HE 染色; B: E-cadherin 免疫荧光染色; C: 细胞核表达

器官中排列规则有序的单层柱状上皮构成了胃类器官的囊腺样结构,细胞核呈卵圆形或圆形;E-cadherin 免疫荧光染色的阳性表达显示,胃上皮细胞的结构完整,排列有极向性。见图2。提示类器官已构建成功。

2.3 COE 对小鼠胃类器官生长的影响 类器官数量变化见图3,与对照组相比,仅高剂量 COE 组的类器官数量有明显增加($P < 0.05$)。低、中剂量 COE 组的类器官数量无明显变化($P > 0.05$)。类器官直径变化见图4,与对照组相比,仅有高剂量 COE 组的类器官直径有明显增加($P < 0.05$)。类器官活性变化见图5,MTT 的检测结果显示,与对照组相比,中高剂量 COE 组的吸光度值提高,细胞活性增加($P < 0.05$)。而低剂量 COE 组则无法明显增加细胞

活性($P > 0.05$)。以上表明 COE 可促进类器官生长,且高剂量 COE 组的效果较为显著。

图3 药物处理后胃类器官数量
与对照组比较: * $P < 0.05$

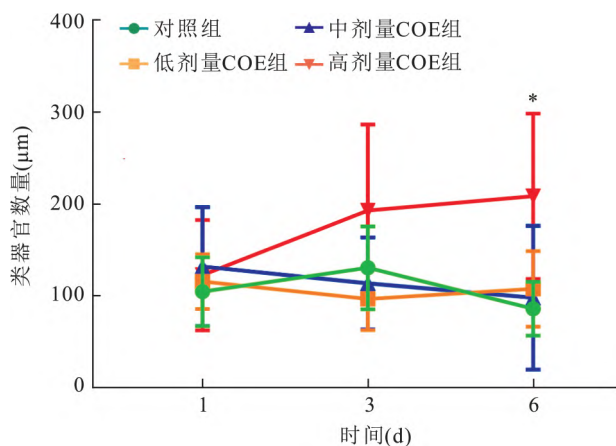


图4 药物处理后胃类器官直径
与对照组比较: * $P < 0.05$

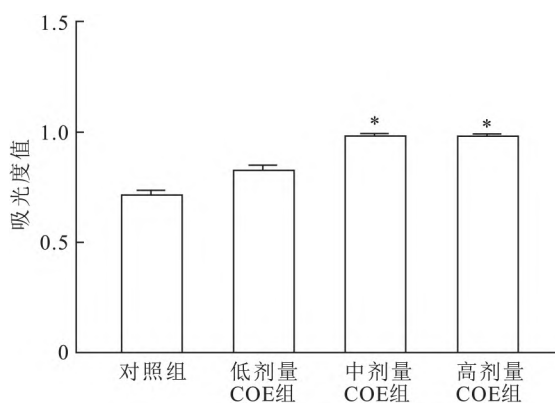


图5 药物处理后胃类器官的细胞的吸光度值
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 COE 对小鼠胃类器官中 E-cadherin 表达的影响 Western blot 检测结果显示,与对照组相比,小剂量 COE 处理可使类器官中 E-cadherin 的表达升高 ($P < 0.01$),且 E-cadherin 的表达水平随着 COE 的剂量增加而逐渐增加 ($F = 418.9$, $P < 0.05$),高剂量 COE 组的 E-cadherin 蛋白水平变化最大(图 6)。提示 COE 促进胃类器官的生长形成可能与 COE 能促进 E-cadherin 表达有关(因为 E-cadherin 可作为胃类器官成功构建的标志,而 COE 可促进 E-cadherin 蛋白的表达)。

3 讨论

胃是人体重要器官,不仅吸收营养,还会与毒素和细菌接触,而毒素和细菌会损伤胃黏膜。而位于胃腺体的峡部与基底部胃干细胞,可分化成表面黏液细胞、黏液颈细胞、壁细胞、主细胞、肠内分泌细胞和簇状细胞等各种胃细胞,不断地更新胃上皮细胞来确保胃黏膜的完整和功能^[7]。

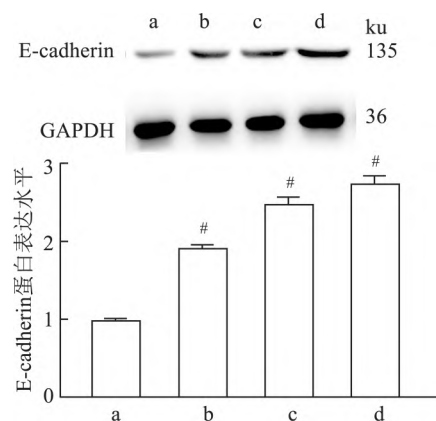


图6 Western blot 法检测药物处理后胃类器官中的 E-cadherin 表达
a: 对照组; b: 低剂量 COE 组; c: 中剂量 COE 组; d: 高剂量 COE 组; 与对照组比较: # $P < 0.01$

类器官培养技术的出现为研究胃干细胞与胃上皮细胞损伤及再生提供了较理想的模型。与原代细胞培养比,类器官培养可以长时间维持细胞的基因组稳定性,并保留组织原始的特征。广泛应用于模拟器官发生、感染、恶性肿瘤等研究。值得注意的是,类器官的培养要求较高,因此在培养过程中要严格按照标准步骤进行。此外,如果考虑培养人胃窦来源类器官,还需要加入 A83-01 来抑制 TGF- β 信号通路,才能维持其长期生长^[8]。近年来对胃类器官的研究迅速发展,但国内该方面研究起步较晚。应用胃类器官模型探究中药对胃癌及胃癌前病变的作用与机制是一个相当有前景的方向。本研究初步探讨了中药对胃类器官的作用。

南蛇藤系卫矛科植物南蛇藤属植物,药性辛温、有小毒,具有祛风胜湿、活血通络、消肿解毒之功效^[9]。其抗肿瘤活性成分主要是萜类、脂肪类、苷类及黄酮类化合物。相比较中药单体,COE 作为中药提取物,是以中药南蛇藤为原料通过物理化学提取方法定向获取和浓集而成的,其中含有多种有效成分:不仅富含 3 β -hydroxy-2-oxoolean-12-ene-22,29-lactone、齐墩果酸等多种萜类化合物,还含有 3-氧代齐墩果酸 β -香树酯醇、 β -香树酯醇乙酸酯、表儿茶素、表阿夫儿茶精等脂肪类及苷类单体化合物^[10-11]。因此,COE 抗肿瘤作用较为显著。而 COE 抗肿瘤作用的发挥,可能和 Bcl-2 与 Bax(对应齐墩果烷型三萜化合物)、MMP2 与 MMP9(南蛇藤总萜)、mTOR 通路(南蛇藤素)、PI3K/Akt(槲皮素)通路等多个靶点及信号通路相关^[12]。值得注意的是,现代医学药理学研究表明南蛇藤提取物 COE 在抗胃癌方面作用尤为显著。以往研究^[12]表明 COE

可通过多靶点与信号通路对胃癌细胞起到抑制作用,而本研究发现 COE 可能对胃类器官的胃黏膜上皮细胞起到一定的促进与保护作用。COE 对胃类器官损伤模型的胃黏膜上皮细胞的作用则需要进一步研究。

E-cadherin 在维持细胞骨架、增加细胞流动性、参与细胞间质表型等方面发挥关键作用。在恶性肿瘤中 E-cadherin 最显著的生物学特性是侵袭与转移。E-cadherin 的低表达不仅促进肿瘤细胞侵袭与转移,还促进上皮间质转化及细胞去分化,甚至影响 Wnt/ β -catenin、RAS 和 RAF/MEK、FAK/C-SRC 和 PI3K/AKT/mTOR 等信号通路,从而促进肿瘤细胞的增殖和转移^[13]。此外,Tang et al^[14] 研究表明 E-cadherin 对 Lgr5 胃窦干细胞稳态的维持具有关键作用,E-cadherin 的缺失会引起 Lgr5 干细胞池减少,损害胃窦上皮稳态及体外胃类器官生长。而本研究表明 COE 可明显促进 E-cadherin 表达。因此,猜测 COE 促进胃类器官生长可能与其调节 E-cadherin 影响 Lgr5 胃窦干细胞稳态有关。此外,COE 具有抗炎作用,而炎症与胃癌密切相关。慢性炎症会在损伤和免疫抑制之间创造了一个平衡的环境,在此环境下,干细胞易于发生突变,促炎细胞因子和趋化因子还可促进胃上皮细胞恶性转化,极大增加了胃癌发生的风险。因此推测 COE 可能会通过其抗炎作用来保护胃黏膜。然而,探究 COE 抗炎作用对胃类器官损伤模型的影响是课题组下一步计划,本研究是为其奠定基础。

综上所述,小剂量的 COE 可促进小鼠胃类器官的生长形成及 E-cadherin 表达,可能对胃黏膜有一定的保护作用。课题组将构建胃类器官损伤模型,进一步探究小剂量 COE 对胃类器官损伤模型的作用及具体机制。

参考文献

- [1] Fujii M, Sato T. Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases [J]. Nat Mater, 2021, 20(2): 156–69.
- [2] Guo R, Chu A, Gong Y. Identification of cancer stem cell-related biomarkers in intestinal-type and diffuse-type gastric cancer by stemness index and weighted correlation network analysis [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 418.
- [3] Jang H J, Kim K H, Park E J, et al. Anti-inflammatory activity of diterpenoids from celastus orbiculatus in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 7207354.
- [4] Tao L, Yin Z, Ni T, et al. The ethyl acetate extract from celastus orbiculatus promotes apoptosis of gastric cancer cells through mitochondria regulation by PHB [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 835426.
- [5] Chang K, Jiang L, Sun Y, et al. Effect of E-cadherin on prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis update [J]. Mol Diagn Ther, 2022, 26(4): 397–409.
- [6] 巴赫,彭强,朱耀东. 抑癌基因 PDCD4 的表达对南蛇藤提取物抑制人胃癌裸鼠移植瘤生长的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 358–62.
- [7] Xiao S, Zhou L. Gastric stem cells: physiological and pathological perspectives [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 571536.
- [8] Bartfeld S, Bayram T, Wetering M V D, et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection [J]. Gastroenterology, 2015, 148(1): 126–36. e6.
- [9] 朱耀东,刘延庆,钱亚云,等. 南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长及凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 697–702.
- [10] 李建娟,杨杰,吕芳,等. 南蛇藤茎的化学成分(英文) [J]. 中国天然药物, 2012, 10(4): 279–83.
- [11] 冯心怡,褚泽文,罗园园,等. 南蛇藤及其有效成分抗胃癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3863–9.
- [12] Zhu Y A, Ba H, Chen J, et al. Celastus orbiculatus extract reduces stemness of gastric cancer stem cells by targeting PDCD4 and EIF3H [J]. Integr Cancer Ther, 2021, 20: 15347354211058168.
- [13] Zhao H, Hu H, Chen B, et al. Overview on the role of E-cadherin in gastric cancer: dysregulation and clinical implications [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 689139.
- [14] Tang Y, Yang G, Zhang J, et al. E-cadherin is required for the homeostasis of Lgr5(+) gastric antral stem cells [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(1): 34–43.

Effects of *Celastrus orbiculatus* extract on gastric organoids and expression of E-cadherin in mice

Zhu Fangyuan¹, Zhang Xiaozhe¹, Liu Yanqing², Li Ping¹, Zhu Yaodong¹

(¹Dept of Chinese Integrative Medicine Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225003)

Abstract Objective To investigate the effect of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) on the growth of gastric organoids and the expression of E-cadherin in gastric epithelial cells of mice. **Methods** The gastric pylorus of

网络出版时间: 2023-03-07 15:20:31 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1349.021.html>

◇临床医学研究◇

直肠癌与肛门距离影响因素的分位数回归分析

闫 强 汪圣毅 李永翔

摘要 目的 探讨直肠癌与肛门距离的影响因素。方法 收集102例直肠癌患者的临床和病理资料,直肠癌与肛门的距离(DAVtRC) ≤ 7 cm为低位直肠癌(LRC)组、DAVtRC > 7 cm为中高位直肠癌(M/HRC)组,比较组间临床病理因素的差异。分位数回归分析DAVtRC与临床病理因素的关系。结果 LRC组DAVtRC的中位数[5.00 cm (IQR: 4.00, 6.00 cm)]低于M/HRC组[10.00 cm (IQR: 10.00, 11.00 cm)] $P < 0.01$,但单核细胞平均数较高[(0.41 ± 0.16) *vs* (0.34 ± 0.11) $P < 0.05$]。95%分位数时,模型纳入连续和分类自变量,DAVtRC与年龄($\beta = -0.204, P < 0.01$)、TNM分期(III+IV)期与I期($\beta = -6.623, P < 0.01$)、血小板(PLT $\beta = -0.024, P < 0.01$)、血管侵犯($\beta = -1.544, P < 0.01$)负相关,与BMI($\beta = 0.278, P < 0.01$)、肿瘤直径($\beta = 0.548, P < 0.01$)、男性($\beta = 1.421, P < 0.01$)、肿瘤低中分化($\beta = 4.727, P < 0.01$)、T分期(T2与T1比较: $\beta = 4.422, P < 0.01$)、N分期(N1与N0比较: $\beta = 6.670, P < 0.01$)、

神经侵犯($\beta = 1.825, P < 0.01$)、癌胚抗原(CEA $\beta = 0.068, P < 0.01$)、淋巴细胞(L $\beta = 3.068, P < 0.01$)、血小板淋巴细胞比(PLR $\beta = 0.045, P < 0.01$)、淋巴细胞单核细胞比(LMR $\beta = 1.088, P < 0.01$)正相关。回归曲线显示:年龄、体质量指数(BMI)、肿瘤直径、PLT、PLR、LMR在不同分位数的系数不同。结论 DAVtRC与多种临床病理因素有关,不同分位数的系数大小和方向不同。

关键词 直肠肿瘤;直肠癌与肛门的距离;低位直肠癌;分位数回归;临床病理因素

中图分类号 R 735.3+7; R 604

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0476-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.021

直肠癌发病率较高,进展期直肠癌的占比较高,病死率较高^[1]。根据肿块下缘到肛门下缘的距离,直肠癌可分为^[2]:低位、中位、高位直肠癌,不同部位的直肠癌,其生物学行为、淋巴转移途径、治疗方法、预后^[3]均存在较大的差异。直肠癌与肛门的距离(distance from the anal verge to rectal cancer, DAVtRC)和临床病理因素的关系尚不明确。常规的 t 检验、组间比较的秩和检验、列联表的 χ^2 检验、最小二乘回归等统计分析方法,只能从数据的整

2022-12-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81672389)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普外科胃肠外科,合肥 230022

作者简介:闫 强 男 主治医师;

李永翔 男 教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liyongxiang@ahmu.edu.cn

8-week-old C57 mice was isolated and cultured into gastric organoids. The dynamic changes of gastric organoid formation were observed under light microscope; the intercellular structure of gastric epithelium was observed by HE staining; the expression of epithelial-cadherin E-cadherin in gastric epithelial cells was observed by immunofluorescence staining. After passage to the third-generation, the organoids were treated with different concentrations of COE (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$), the organoids were collected, their numbers were counted, their diameters were measured, their cellular activities were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry, and Western blot was used to detect the expression of E-cadherin in organoids after COE treatment. **Results** At 24 to 48 h, cystlike structures were formed and three-dimensional cell clusters with cystic gland-like central structure appeared, and gradually budding and forming gastric organoids after 72 h, suggesting that the organoids were successfully constructed. The epithelial cell marker E-cadherin was expressed in the organoid, which further confirmed the formation of organoid. Compared with the control group, the number and diameter of gastric organoids in the COE group significantly increased, cell activity was significantly enhanced ($P < 0.05$), and the expression of E-cadherin increased with the increase of COE dose ($P < 0.01$). **Conclusion** Low dose COE can promote the expression of E-cadherin and the growth and formation of organoids, which may affect the repair of gastric mucosa injury.

Key words Celastrus orbiculatus extract; gastric organoids; mice; E-cadherin