

基于HDAC3/HNF4 α 通路探讨铁皮石斛多糖对胆汁酸诱导型胃黏膜肠上皮化生的改善作用

方红¹, 刘璐¹, 刘芳², 周国茂³, 孙有智^{4*}, 赵益^{1*}

(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西南昌 330004) (2. 江西中医药大学临床学院, 江西南昌 330004) (3. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004) (4. 江西中医药大学方证研究中心, 江西南昌 330004)

摘要: 为了研究铁皮石斛多糖 (*Dendrobium officinale* Polysaccharide, DOP) 是否可以基于组蛋白去乙酰化酶3 (Histone Deacetylase 3, HDAC3) / 肝细胞核因子 4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α , HNF4 α) 通路改善胆汁酸诱导型胃黏膜肠上皮化生 (Gastric Intestinal Metaplasia, GIM), 选择 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鹅去氧胆酸 (Chenodeoxycholic Acid, CDCA) 建立胆汁酸诱导型 GIM 模型 (细胞存活率为 91.11%), 同时给予质量浓度 400、200 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 干预, 观察一般形态学变化, EdU 染色检测细胞增殖, RT-PCR、Western Blot 检测 G 蛋白偶联受体 5 (Takeda G-protein-coupled Receptor 5, TGR5)、法尼醇 X 受体 (Farnesoid X Receptor, FXR)、HDAC3、尾型同源框基因 (Caudal Type Homeobox Gene 2, CDX2)、黏蛋白 2 (Mucin 2, MUC2)、HNF4 α 相关 mRNA 和蛋白表达水平; 构建 HDAC3 过表达 GIM 模型, Western Blot、CO-IP 检测 HDAC3 对 HNF4 α 的调控。结果显示 DOP 对 GES-1 细胞无毒副作用, 高于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA 对 GES-1 细胞存在明显毒副作用, 质量浓度 100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型的细胞活力及细胞增殖无明显作用, 但有助于维持 GES-1 细胞的正常表型, DOP 能显著下调 CDX2、MUC2、HNF4 α 、TGR5、FXR、HDAC3 的基因和蛋白表达水平; 此外, HDAC3 过表达 GIM 模型中 HDAC3、HNF4 α 的蛋白表达分别提高 52.52%、62.94%, 均明显增加, DOP 干预后蛋白表达均降低, 且 HDAC3 与 HNF4 α 存在相互作用。综上所述, DOP 可基于 HDAC3/HNF4 α 通路降低组蛋白去乙酰化酶、胆汁酸受体、肠化生标志物的表达, 改善胆汁酸诱导型胃黏膜肠上皮化生, 为胃癌前病变的治疗提供理论基础。

关键词: 铁皮石斛多糖; 胆汁酸; 胃黏膜肠上皮化生; 组蛋白去乙酰化酶 3

文章编号: 1673-9078(2026)07-11-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0562

Ameliorative Effect of *Dendrobium officinale* Polysaccharide on Bile Acid-induced Gastric Intestinal Metaplasia Via the HDAC3/HNF4 α Pathway

FANG Hong¹, LIU Lu¹, LIU Fang², ZHOU Guomao³, SUN Youzhi^{4*}, ZHAO Yi^{1*}

(1.Center for the Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)(2.School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Traditional

引文格式:

方红,刘璐,刘芳,等.基于HDAC3/HNF4 α 通路探讨铁皮石斛多糖对胆汁酸诱导型胃黏膜肠上皮化生的改善作用[J].现代食品科技,2026,42(7):11-21.

FANG Hong, LIU Lu, LIU Fang, et al. Ameliorative effect of *Dendrobium officinale* polysaccharide on bile acid-induced gastric intestinal metaplasia via the HDAC3/HNF4 α pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 11-21.

收稿日期: 2025-04-21; 修回日期: 2025-05-29; 接受日期: 2025-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82560860); 江西省自然科学基金面上项目 (20242BAB25562); 中医药大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD22007); 江西省双一流学科项目 (zxxyylxk20220103)

作者简介: 方红 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治肿瘤, E-mail: 1102484416@qq.com

通讯作者: 赵益 (1982-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治肿瘤, E-mail: zhysyz2008@163.com; 共同通讯作者: 孙有智 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治肿瘤, E-mail: sunyz2007@163.com

Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)(3.School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)(4.Research Center for Formula and Syndrome, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: To investigate whether *Dendrobium officinale* polysaccharide (DOP) ameliorates bile acid-induced gastric intestinal metaplasia (GIM) via the histone deacetylase 3 (HDAC3)/hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) pathway, a bile acid-induced GIM model was established using 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chenodeoxycholic acid (CDCA) (cell viability 91.11%) and treated with DOP at concentrations of 400, 200, and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Morphological changes were observed, and cell proliferation was assessed via EdU staining. RT-PCR and Western blot were used to evaluate mRNA and protein expressions of Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5), Farnesoid X receptor (FXR), HDAC3, caudal type homeobox gene 2 (CDX2), mucin 2 (MUC2), and HNF4 α . An HDAC3-overexpressing GIM model was constructed to examine HDAC3 regulation of HNF4 α using Western blot and co-immunoprecipitation (CO-IP). Results demonstrated that DOP exhibited no cytotoxicity toward GES-1 cells, whereas CDCA concentrations exceeding 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly impaired cell viability. Although DOP (100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed negligible effects on cell viability or proliferation in the CDCA-induced GIM model, it effectively maintained the normal phenotype of GES-1 cells. Furthermore, DOP significantly downregulated gene and protein expressions of CDX2, MUC2, HNF4 α , TGR5, FXR, and HDAC3. In the HDAC3-overexpressing GIM model, HDAC3 and HNF4 α protein levels increased by 52.52% and 62.94%, respectively, which were subsequently reduced by DOP intervention. CO-IP confirmed a direct interaction between HDAC3 and HNF4 α . Collectively, these findings indicate that DOP alleviates bile acid-induced GIM by suppressing the expressions of histone deacetylase, bile acid receptors, and intestinal metaplasia markers via the HDAC3/HNF4 α pathway, providing a theoretical foundation for treating gastric precancerous lesions.

Key words: *Dendrobium officinale* polysaccharide; bile acid; gastric intestinal metaplasia; histone deacetylase 3

胃黏膜肠上皮化生 (Gastric Intestinal Metaplasia, GIM) 是胃黏膜长期慢性损伤后出现以胃上皮细胞被肠型上皮替代为特征的胃癌前病^[1], 长期胆汁反流导致的胃内高浓度胆汁酸 (Bile Acids, BAs) 暴露是诱发 GIM 的关键危险因素^[2]。研究表明, 胆汁酸反流到胃中损伤胃黏膜屏障并通过激活 TGR5^[3]、FXR^[4], 以及触发核因子 κB (Nuclear Factor Kappa-B, NF- κB)、信号转导及转录激活蛋白 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3) 诱导炎症, 引起 DNA 损伤^[5-7], 同时驱动肠化生标志物 CDX2、MUC2、HNF4 α 的异常表达^[8]。HNF4 α 作为调控肠上皮形态发生和分化的关键核转录因子, 其异常表达与 GIM 及胃癌的发生发展密切相关, 被认为是治疗 GIM 向 GC 转变的关键靶点。临床病理分析显示, HNF4 α 在 GIM 及胃癌组织中较正常胃黏膜表达显著升高^[9], 且通过直接结合并激活 CDX2、MUC2 等肠化生基因的启动子诱导胃黏膜上皮向肠上皮表型转化^[10]。其翻译后修饰如乙酰化、磷酸化、泛素化通过影响共激活因子和辅阻遏因子的募集, 从而改变 HNF4 α 对其结合基因的转录影响^[11]。组蛋白脱乙酰化酶 (Histone Deacetylase, HDAC) 通过重塑染色质对基因表达起关键作用, 其中 HDAC3 可调节组蛋白或非组蛋白乙酰化。临床研究表明, HDAC3 在胃组织的表达水平与肿

瘤分期与转移密切相关^[12], 并在胃癌组织中高表达^[13], 目前已开发出组蛋白脱乙酰化酶抑制剂 (Histone Deacetylase Inhibitor, HDACi)^[14]。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 为兰科石斛属多年附生草本植物, 具有“益胃生津、滋阴清热”之效, 久服厚肠胃^[15]。2023 年国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局联合发布将铁皮石斛纳入药食同源名录^[16]。铁皮石斛具有丰富的化学成分以及药理活性, 被作为药膳、保健品以及化妆品广泛使用。铁皮石斛多糖 (*Dendrobium officinale* Polysaccharide, DOP) 作为铁皮石斛的主要活性成分已被证实具有抗炎、抗氧化和黏膜修复等作用。研究发现, DOP 通过外泌体提高小肠上皮细胞抗氧化酶活性, 增强紧密连接蛋白表达治疗炎症性肠病^[17], DOP 降低炎症因子基因表达以及 NF- κB 通路相关蛋白表达抗阿司匹林诱导的 GES-1 细胞损伤发挥胃黏膜保护作用^[18]。文献报道 DOP 可以显著增加产丁酸菌的丰度, 上调肠道菌群代谢产物丁酸的含量^[19]。丁酸作为重要的短链脂肪酸 (Short-chain Fatty Acids, SCFAs) 之一, 不仅是肠道上皮细胞的主要能量来源, 还具有调节 HDAC3 活性的作用, 是 HDAC3 抑制剂^[20]。但 DOP 是否可以通过 HDAC3/HNF4 α 通路调控胆汁酸诱导型 GIM 的进展仍未可知。因此, 该研究构建胆汁酸诱导型 GIM 体外模型, 进一

步证实 DOP 对 GIM 的改善作用与机制, 提高铁皮石斛在胃部疾病上应用, 促进健康食品与功能食品的开发。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

多糖来源于课题组制备的 DOP^[21]; GES-1 细胞, 浙江美森生物科技有限公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青霉素链霉素双抗, 美国 Gibco 公司; 鹅去氧胆酸, 美国 MCE 公司; 细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK8), 美国 Apexibio 公司; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖试剂盒, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司; TransZol Up Plus RNA Kit 高纯度 RNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司; 抗体 β -actin、CDX2、MUC2、TGR5、FXR、HDAC3, 武汉三鹰技术有限公司; 抗体 HNF4 α , 英国 abcam 公司; Lipo3000, 美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司; ECL 显影液, 亚科因生物技术有限公司; 免疫沉淀试剂盒 (ProteinA+G 磁珠法), 上海碧云生物技术股份有限公司。

SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏洁净化设备; G154TW 高压灭菌锅, 美国致微仪器有限公司; D111 细胞培养箱, 美国 Thermo Fisher 有限公司; BZ-X810 一体化荧光显微成像系统, 基恩士 (中国) 有限公司; SPARK 10M 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 5424R 小型台式高速冷冻离心机, 德国艾本德公司; T100 梯度 PCR 仪、Mini-PROTEAN 电泳转印系统、ChemiDocXRS+ 化学发光凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; LightCycler 480 II Real-time PCR 仪, 瑞士 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

GES-1 细胞用完全培养基 (10% (V/V) 胎牛血清、1% (V/V) 青霉素链霉素双抗、89% (V/V) RPMI 1640 培养基) 在 37 °C 细胞培养箱中培养, 待细胞生长密度达 80%~90% 进行传代并选择生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.2.1.1 胆汁酸诱导型 GIM 模型的建立

将生长状态良好的 GES-1 细胞在培养箱中孵育 24 h 后, 设置对照组 (Control, CTRL)、Model 组 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA)、DOP 给药高、中、低剂量组

(造模 +DOP 终质量浓度为 400、200、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 除 CTRL 完全培养基培养, 其余各组细胞饥饿 12 h 后, 造模 + 给药作用 12 h。

1.2.1.2 细胞转染及分组

待 GES-1 细胞生长汇合度达 60%~70% 时, 细胞饥饿 12 h 后用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA 作用 12 h 建立胆汁酸诱导型 GIM 模型。根据制造商的方案使用 Lipo 3000 转染试剂瞬时转染 24 h。转染结束后, 设置空载组 (OE-NC)、HDAC3 过表达组 (OE-HDAC3)、HDAC3 过表达 + 给药组 (DOP 终质量浓度为 400、200、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、HDAC3 过表达 + HDAC 广谱抑制剂丁酸钠 (Sodium butyrate, NaB) (0.1、0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、HDAC3 过表达 + HDAC3 靶向抑制剂 RGFR966 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 药物干预 6 h。

设置空载组 (OE-NC)、HNF4 α 过表达组 (OE-HNF4 α)、HNF4 α 过表达 + DOP 给药组 (终质量浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、HNF4 α 过表达 + HNF4 α 靶向抑制剂 BI-6015 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 药物干预 6 h。

1.2.2 DOP、CDCA 对 GES-1 细胞及 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型毒性影响

1.2.2.1 不同质量浓度 DOP 对 GES-1 细胞的毒性

设置空白组、对照组、DOP 给药高、中、低剂量组 (终质量浓度为 800、400、200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 培养孵育 12 h, 在避光条件下, 先将 CCK8 试剂按照 CCK8: 完全培养基 = 1:10 的比例配制试剂, 充分混匀后每孔加入 110 μL 试剂放入培养箱孵育 4 h。CCK8 试剂作用 4 h 后, 用酶标仪测 OD_{450 nm}。

1.2.2.2 不同浓度 CDCA 对 GES-1 细胞的毒性

设置空白组、对照组、CDCA 造模组 (终浓度为 400、200、100、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在 CCK8 试剂作用 4 h 后, 用酶标仪测 OD_{450 nm}。

1.2.2.3 不同质量浓度 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型的毒性

设置空白组、CTRL 组、Model 组 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA)、DOP 给药组 (造模 + DOP 终质量浓度为 800、400、200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 除 CTRL 完全培养基培养, 其余各组细胞饥饿 12 h 后, 造模 + 给药作用 12 h。在 CCK8 试剂作用 4 h 后, 用酶标仪测 OD_{450 nm}。

计算公式如下:

$$A = \frac{B}{C} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——细胞存活率, %;

B——样品组 OD 值;

C——空白组 OD 值。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	上游引物 (5' to 3')	下游引物 (5' to 3')
<i>HDAC3</i>	CCTGGCATTGACCCATAGCC	CTCTTGGTGAAGCCTTGCATA
<i>FXR</i>	ATTTTGACGGAAATGGCAAC	AGACCCTTTCAGCAAAGCAA
<i>TGR5</i>	GCTGCTTCTTCCTGAGCCTA	GTTGGGAGCCAAGTAGACGA
<i>MUC2</i>	GGAGATCACCAATGACTGCGA	GAATCGTTGTGGTCACCCTTG
<i>CDX2</i>	GCTATAAATGCCAGAGCCAACC	CACAGACCAACAACCCAAACAG
<i>HNF4α</i>	GTTCAAGGACGTGCTGCTCCTA	AGGCATACTCATTGTTCATCGATCTG
<i>β-actin</i>	GTGGCCGAGGACTTTGATTG	CCTGTAACAACGCATCTCATATT

1.2.3 EdU染色法检测DOP对CDCA诱导型GIM模型细胞增殖的影响

按照 1.2.2 方法，造模给药 12 h 后，将 EdU 试剂按照 EdU: 完全培养基 =1:1 000 的比例配制工作液，充分将配制的试剂涡旋混匀待用，每孔中加入配制完成的 100 μL 试剂后放入培养箱孵育 2 h。根据细胞增殖试剂盒产品说明书进行后续操作，然后镜下拍照，最后通过 Image J 定量细胞增殖效率。计算公式如下：

$$A = \frac{B}{C} \times 100\%$$
 (2)

式中：

A——EdU⁺ 细胞占比，%；

B——EdU⁺ 细胞数；

C——Hoechst⁺ 细胞数。

1.2.4 DOP对CDCA诱导型GIM模型基因表达水平的影响

按照 1.2.2 方法，造模给药 12 h 后，根据 Trizol 法提取细胞总 RNA。使用 NCBI 数据库的引物设计和特异性检验工具 Primer-BLAST 设计用于 HDAC3、FXR、TGR5、MUC2、CDX2、HNF4α、β-actin 的 PCR 引物（见表 1），由上海生工公司合成。使用反转录试剂盒在梯度 PCR 仪进行 cDNA 合成反应，将合成的 cDNA 分装并保存在 -20 ℃ 冰箱。根据 Real-time PCR 试剂盒反应体系为 20 μL 的加样要求进行操作，设定扩增程序：①预变性：95 ℃，30 s；②循环阶段（40 cycles）：55 ℃，30 s→70 ℃，1 min；③熔解曲线：95 ℃，0 s→65 ℃，15 s→95 ℃，0 s。以 β-actin 为内参基因，每个反应重复 3 次。2^{-ΔΔCT} 方法用于定量相对 mRNA 表达水平。

1.2.5 DOP对CDCA诱导型GIM模型蛋白表达水平的影响

细胞培养同 1.2.2 方法，提取细胞总蛋白后 BCA 测定蛋白浓度。蛋白电泳后电转至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 2 h，TBST 洗脱后，与抗体 β-actin

（稀释比例 1:20 000）、CDX2、HNF4α、MUC2、TGR5、FXR、HDAC3（稀释比例 1:1 000）4 ℃ 孵育过夜，次日二抗室温孵育 2 h 后，ECL 显影。

1.2.6 Western Blot检测DOP对HDAC3过表达GIM细胞模型的作用

按照 1.2.1.2 方法，药物干预 6 h 后，提取细胞总蛋白，采用 Western Blot 检测转染效率及 DOP 对过表达 HDAC3 胆汁酸诱导型 GIM 的作用效果。

1.2.7 CO-IP检测HDAC3与HNF4α的作用机制

按照 1.2.1.2 方法，药物干预 6 h 后，按照免疫共沉淀试剂盒说明书制作细胞样本，CO-IP 检测 HDAC3 和 HNF4α 的作用机制。

1.2.8 数据处理与统计学分析

实验数据使用平均数 ± 标准差（mean ± SD）表示，采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析，先对数据进行正态性检验及方差齐性检验，若均符合要求，则采用单因素方差分析，以 P < 0.05 为差异有统计学意义，并进行多重比较。若不满足正态检验及方差分析，则采用非参数秩和检验比较总的差异及组间比较。

2 结果与讨论

2.1 DOP、CDCA对GES-1细胞及DOP对CDCA诱导型GIM模型细胞活力的影响

DOP 作为一种天然植物来源成分，其对生物体是否存在毒副作用至关重要，图 1a 显示，与 CTRL 组比较，质量浓度为 50~800 μg·mL⁻¹ 的 DOP 对 GES-1 细胞存活率无显著差异，表明在此质量浓度范围内的 DOP 对 GES-1 细胞无细胞毒性。高浓度胆汁酸暴露是导致 GIM 的关键致病因素^[22]，CDCA 作为一种初级胆汁酸，对胃黏膜上皮细胞具有直接损害作用^[23]，被用于构建胆汁酸诱导型 GIM 模型。如图 1b 所示，低于 100 μmol·L⁻¹ CDCA 对 GES-1 细胞活力无显著性，高于 100 μmol·L⁻¹ CDCA 的

GES-1 细胞活力下降至 60%，损伤过于严重，因此选取 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA 建立胆汁酸诱导型 GIM 模型。如图 1c 所示，Model 组的细胞存活率存在显著性差异，质量浓度为 50、800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型存在抑制作用，故后续实验选择质量浓度为 100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DOP。

2.2 DOP对CDCA诱导型GIM模型一般形态学影响

胃黏膜损伤是机体为抵抗物理因素、化学因素、细菌及其毒素等因素侵袭所发生的炎症反应。CDCA 对 GES-1 细胞存在直接损伤作用，而 DOP 具有胃黏膜保护作用^[24]。镜下观如图 2 所示，CTRL 组细胞呈椭圆形或短梭形，Model 组 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDCA 作用下细胞呈长梭形；DOP 干预后，细胞形态趋向于正常。结果表明 DOP 有助于维持 GES-1 细胞正常表形。

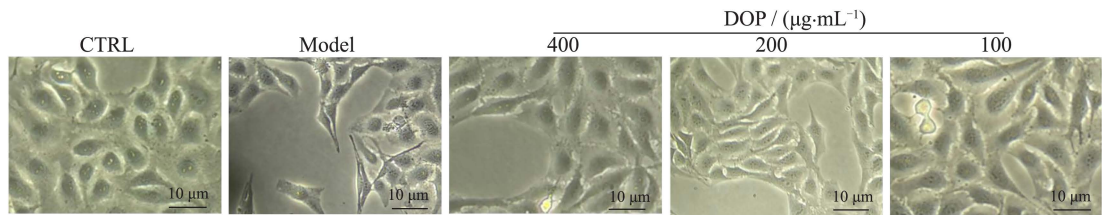
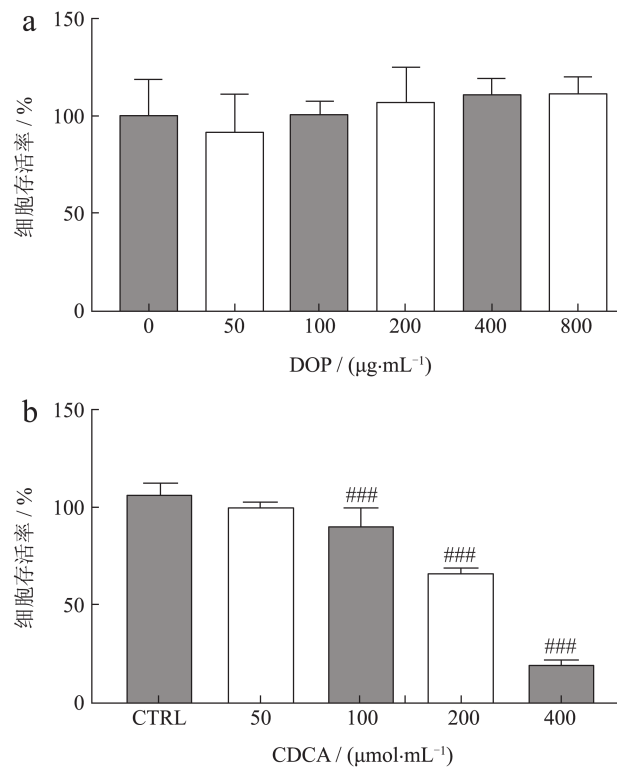


图 2 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型的一般形态学影响 (400 ×)

Fig.2 General morphological effects of DOP on CDCA-induced GIM models (400×)

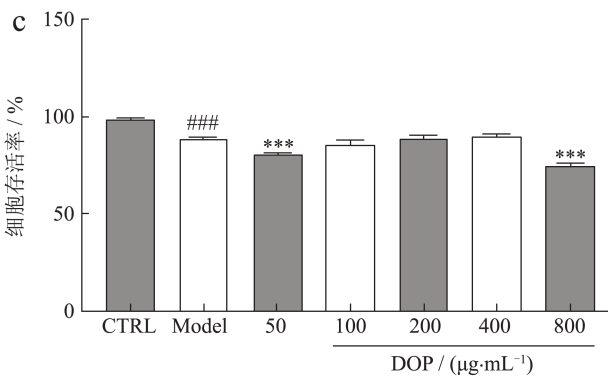


图 1DOP、CDCA 对 GES-1 细胞及 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型细胞活力的影响

Fig.1 Effects of DOP and CDCA on GES-1 cell survival rate and effects of DOP on CDCA induced GIM model cell survival rate

注：a 为不同质量浓度 DOP 对 GES-1 细胞存活率的影响；b 为不同浓度 CDCA 对 GES-1 细胞存活率的影响；c 为 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型细胞存活率的影响；## 表示与 CTRL 组比较差异显著 ($P<0.01$)；### 表示与 CTRL 组比较差异非常显著 ($P<0.001$)；*** 表示与 Model 组比较差异非常显著 ($P<0.001$)。

2.3 EdU 染色检测 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型细胞增殖的影响

5- 乙炔基 -2'- 脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 是一种胸腺嘧啶类似物，能够替代胸腺嘧啶在 DNA 合成期 (S 期) 掺入新合成的 DNA 链中，用于标记增殖活跃的细胞。研究表明以多糖为主的铁皮石斛提取物通过平衡胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡对各种模型的胃黏膜损伤具有恢复损伤及保护作用。CDCA 会引起 GES-1 的直接损伤，影响细胞增殖。利用 EdU 染色检测 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型的细胞增殖作用。如图 3 所示，Model 组对 GES-1 细胞无明显的促增殖作用；给药 DOP 后，DOP 无明显促进增殖。

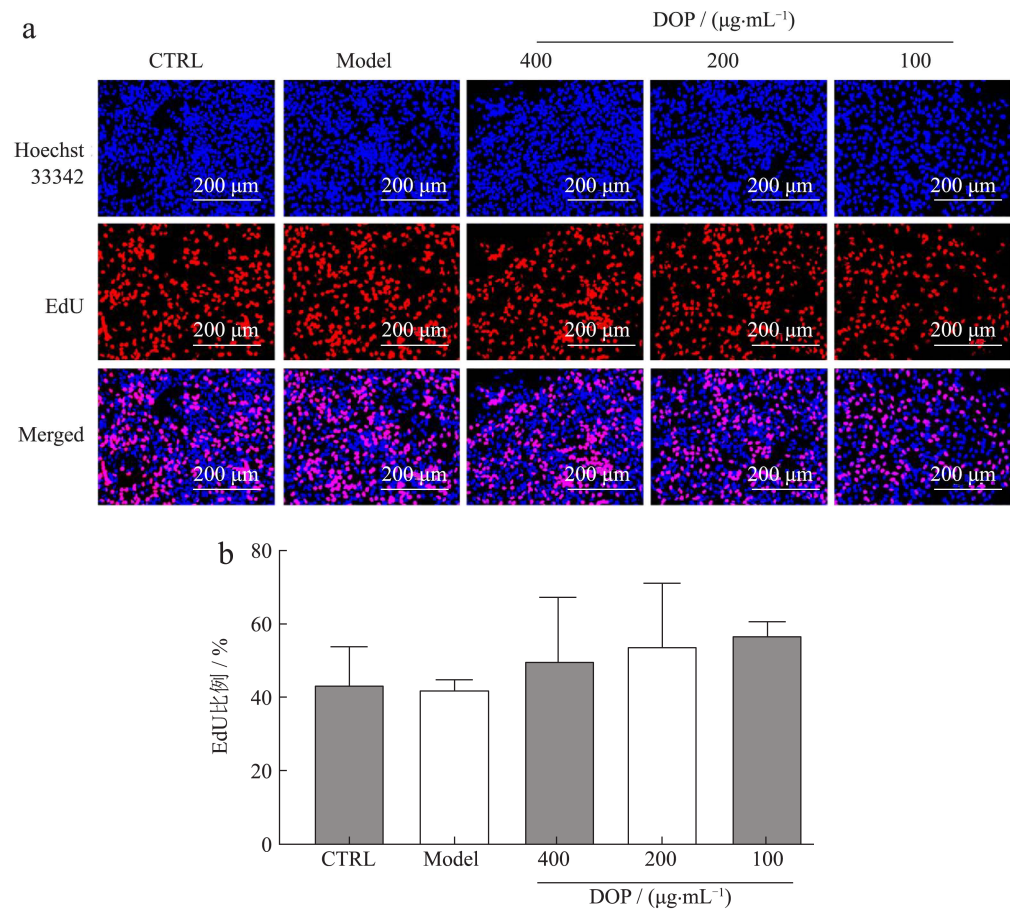
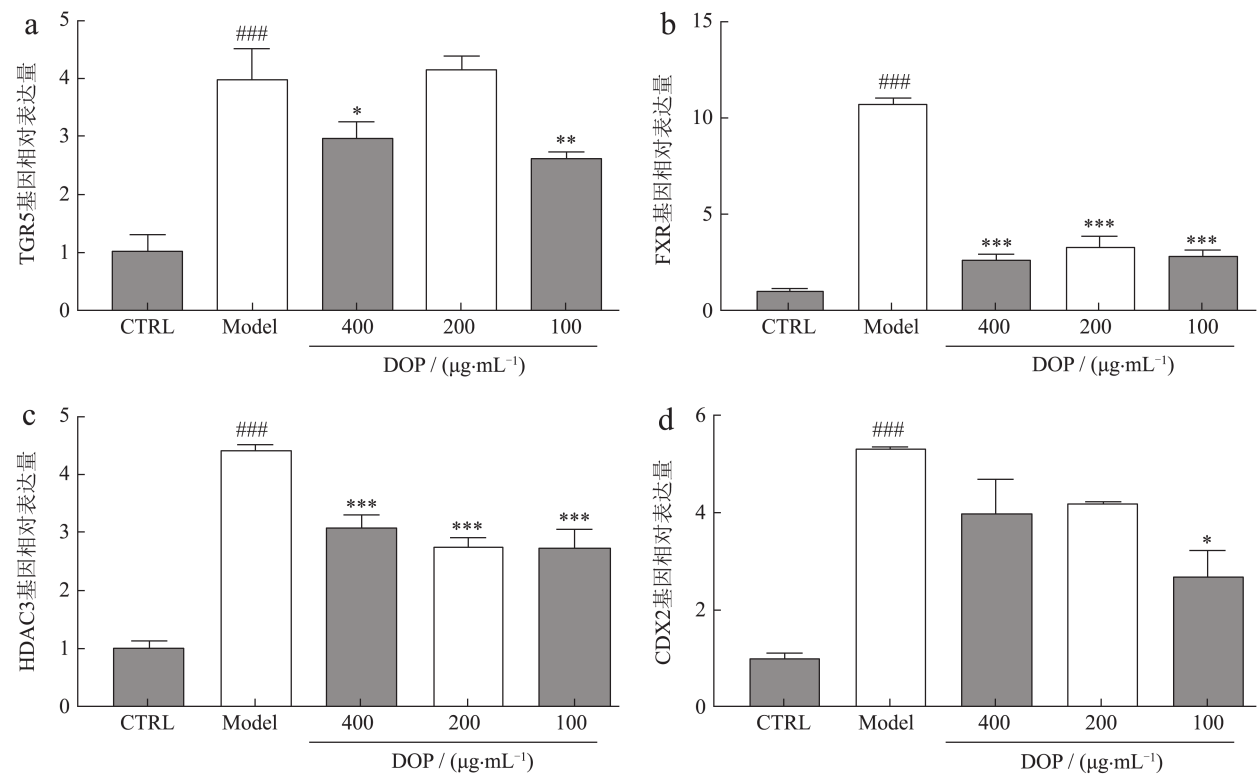


图 3 EdU 染色检测 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型细胞增殖的影响

Fig.3 EdU staining was used to detect the effect of DOP on cell proliferation in CDCA-induced GIM models

注: EdU⁺ 细胞核 (红色); Hoechst⁺ 细胞核 (蓝色)。



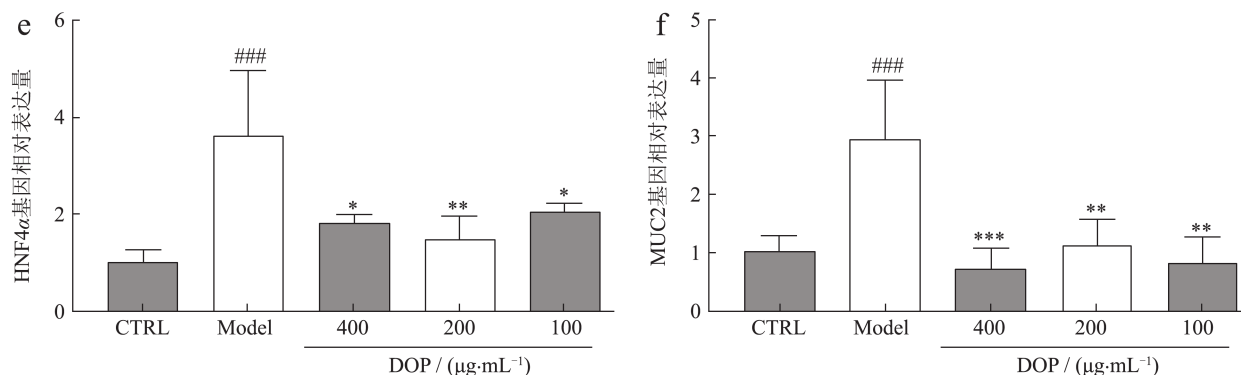


图4 DOP对CDCA诱导型GIM模型相关基因的表达

Fig.4 DOP induced the expression of related genes in CDCA-induced GIM model

注：###表示与CTRL组比较差异非常显著 ($P<0.001$)；*表示与Model组差异比较显著 ($P<0.05$)，**表示与Model组比较差异显著 ($P<0.01$)，***表示与Model组比较非常显著 ($P<0.001$)。下同。

2.4 DOP对CDCA诱导型GIM模型基因和蛋白表达的影响

2.4.1 RT-PCR检测HDAC3、TGR5、FXR、CDX2、HNF4α、MUC2的基因表达

近年研究揭示，胆汁酸可通过激活胆汁酸受体介导的信号通路，协同表观遗传调控因子，共同驱动GIM的发生发展。在GIM中，胆汁酸作为信号分子，主要通过激活胆汁酸膜受体TGR5^[25]或核受体FXR^[26,27]调节下游信号。HDAC3是I类HDAC的一种，通过去乙酰化组蛋白和非组蛋白底物来改变表观遗传学，从而直接抑制基因转录^[28]。HDAC3在调节代谢生长和发育以及影响细胞迁移和分化方面发挥着关键作用^[29]。HNF4α、CDX2、MUC2被认为是GIM的关键标志物^[30,31]。闵亚莉等^[10]提出，HNF4α通过CDX2来调控胆汁酸介导的GIM，而CDX2蛋白通过作用于MUC2基因的启动子，最终导致胃上皮细胞转分化为肠型上皮细胞。RT-PCR结果如图4所示，与CTRL组比较，Model组TGR5、FXR、HDAC3、CDX2、HNF4α及MUC2 mRNA表达量分别显著上调287.38%、970.69%、342.36%、431.48%、261.21%和194.23% ($P<0.001$)。不同质量浓度DOP干预后呈现剂量依赖性抑制作用，400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP显著降低TGR5、FXR、HDAC3、HNF4α及MUC2表达水平 ($P<0.05$, $P<0.001$)；200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP对FXR、HDAC3、HNF4α及MUC2的抑制效果达极显著水平 ($P<0.001$, $P<0.01$)；而100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP可全面调控所有靶基因表达 ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$)。

2.4.2 Western Blot检测HDAC3、TGR5、FXR、CDX2、HNF4α、MUC2的蛋白表达

本研究发现，CDCA诱导的GIM模型中，肠化

生标志物HNF4α、CDX2及MUC2基因表达呈现显著异常高表达。研究表明，HNF4α-CDX2-MUC2信号轴可能通过调控胃上皮细胞转分化进程，促进肠型表型的形成^[10]，HDAC3作为关键表观调控因子，可能通过脱乙酰化修饰直接影响靶基因的转录活性。Western blot结果进一步证实，如图5b所示，Model组TGR5、HDAC3、NF-κB p65、CDX2、HNF4α、MUC2蛋白表达量分别较CTRL组升高88.65%、71.13%、105.48%、147.90%、62.74%和48.45% ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。经200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP干预后，上述蛋白表达出现显著下调 ($P<0.05$, $P<0.01$)；100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP则特异性抑制CDX2、HNF4α和NF-κB p65蛋白表达 ($P<0.05$)。

综上所述，DOP在CDCA诱导型GIM模型中发挥保护作用。DOP可以调节胆汁酸受体、组蛋白去乙酰化酶以及炎症因子相关mRNA和蛋白水平，减少肠化生标志物的表达，抑制肠化生的进程，但其具体的作用机制仍需要进一步的研究。

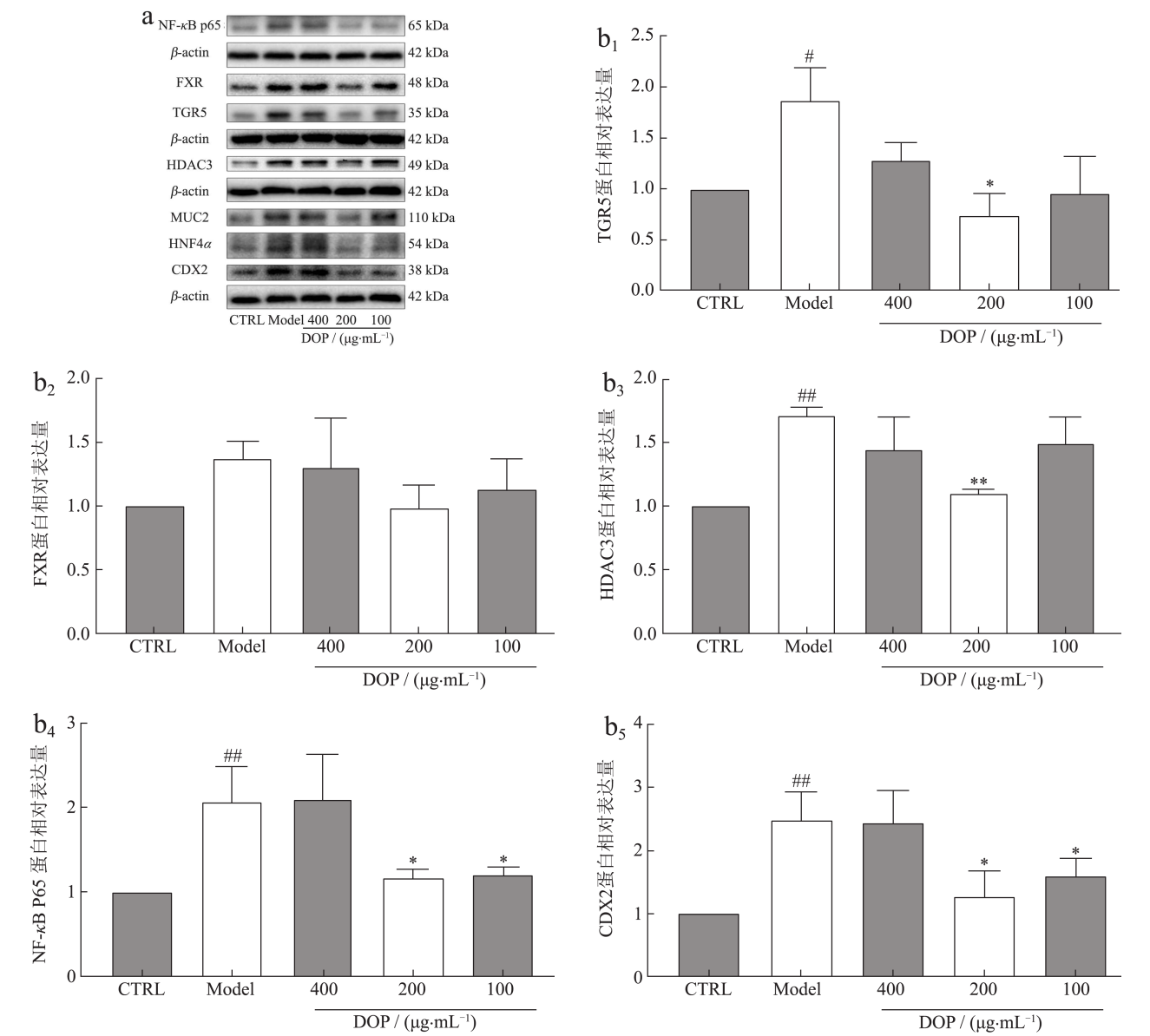
2.5 DOP对HDAC3过表达GIM模型的影响

2.5.1 Western Blot检测DOP对HDAC3过表达GIM模型HDAC3、CDX2、HNF4α、MUC2、TGR5、STAT3、p-STAT3的蛋白表达

植物多糖，因其具有良好的抗炎、免疫调节、修复等作用，在很多炎症性疾病上具有很好的运用价值^[32]，党参多糖调控Wnt/β-catenin信号通路抑制胃癌前病变^[33]；黄芪多糖通过NF-κB信号通路抑制细胞凋亡和炎症减轻大鼠慢性萎缩性胃炎^[34]。课题组前期已证实DOP能够通过核因子-E2相关因子2(Nuclearfactor erythroidderived 2-like 2, Nrf2)/血红素加氧酶1(Heme Oxygenase 1, HO-1)通路抑制胆汁酸诱导型GIM模型^[21]。本研究在前期研究基础上，进一步从表观遗传

学的角度，分析 HNF4 α 的组蛋白修饰以及 HDAC3 对其表达的影响。HNF4 α 作为肠上皮分化的关键转录因子，其活性受表观遗传修饰精密调控。研究表明^[35]，NaB、曲古菌素（Trichostatin A, TSA）等 HDACi 通过抑制 HNF4 α 的表达进一步减低下游癌症相关靶基因黏液蛋白 4（Mucin 4, MUC4）的表达，提示靶向 HNF4 α 的 HDACi 在干预胆汁酸诱导型 GIM 中具有潜在价值。为验证 HDAC3 对 HNF4 α 的调控作用，本研究构建 HDAC3 过表达（OE-HDAC3）细胞模型，结果如图 6b 所示，HDAC3 与 HNF4 α 蛋白表达分别显著上调 52.52% 和 62.94%，且两者呈显著正相关性，而 TGR5、p-STAT3 及 CDX2 等蛋白未见显著改变，表明 HDAC3 可

能特异性调控 HNF4 α 介导转分化通路。与 OE-HDAC3 组相比，200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP、0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaB 及 RGFR966 均能显著降低 HDAC3 表达（ $P < 0.001$ ），100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 降低 HDAC3 表达（ $P < 0.05$ ）；200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 与 RGFR966 对 HNF4 α 的抑制效果最为显著（ $P < 0.01$ ）；200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 可同步下调 TGR5（ $P < 0.05$ ）、p-STAT3（ $P < 0.01$ ）及 CDX2（ $P < 0.001$ ）表达，且 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOP 极显著下调 CDX2 的表达（ $P < 0.001$ ）。本研究证实 HDAC3 过表达 GIM 模型中 HDAC3、HNF4 α 的表达呈正相关，DOP 干预减少了 HDAC3、HNF4 α 、TGR5、CDX2、P-STAT3 的蛋白表达，存在作为 HDACi 的潜力。



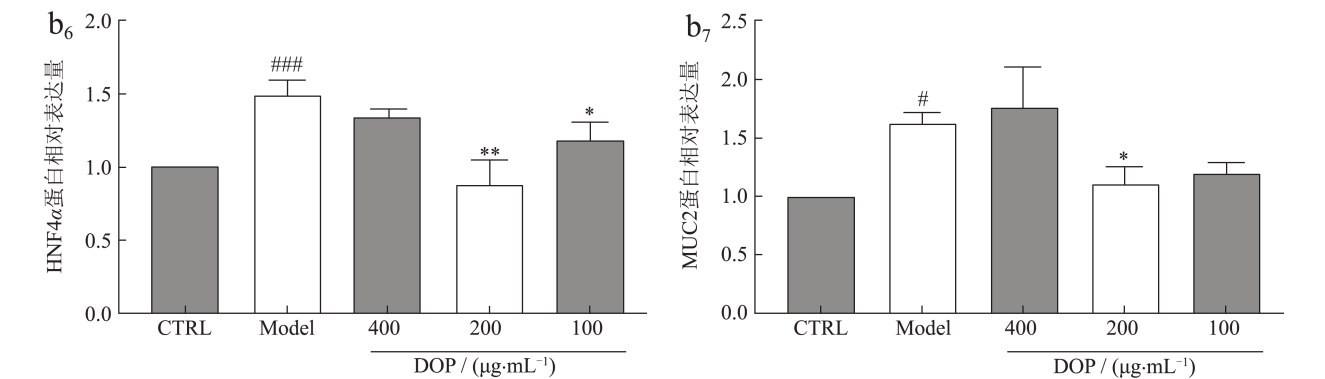


图 5 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型相关蛋白的影响和表达

Fig.5 Effect and expression of DOP on CDCA-inducible GIM model-associated proteins

注: a 为 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型相关蛋白的影响; b 为 DOP 对 CDCA 诱导型 GIM 模型相关蛋白的表达。

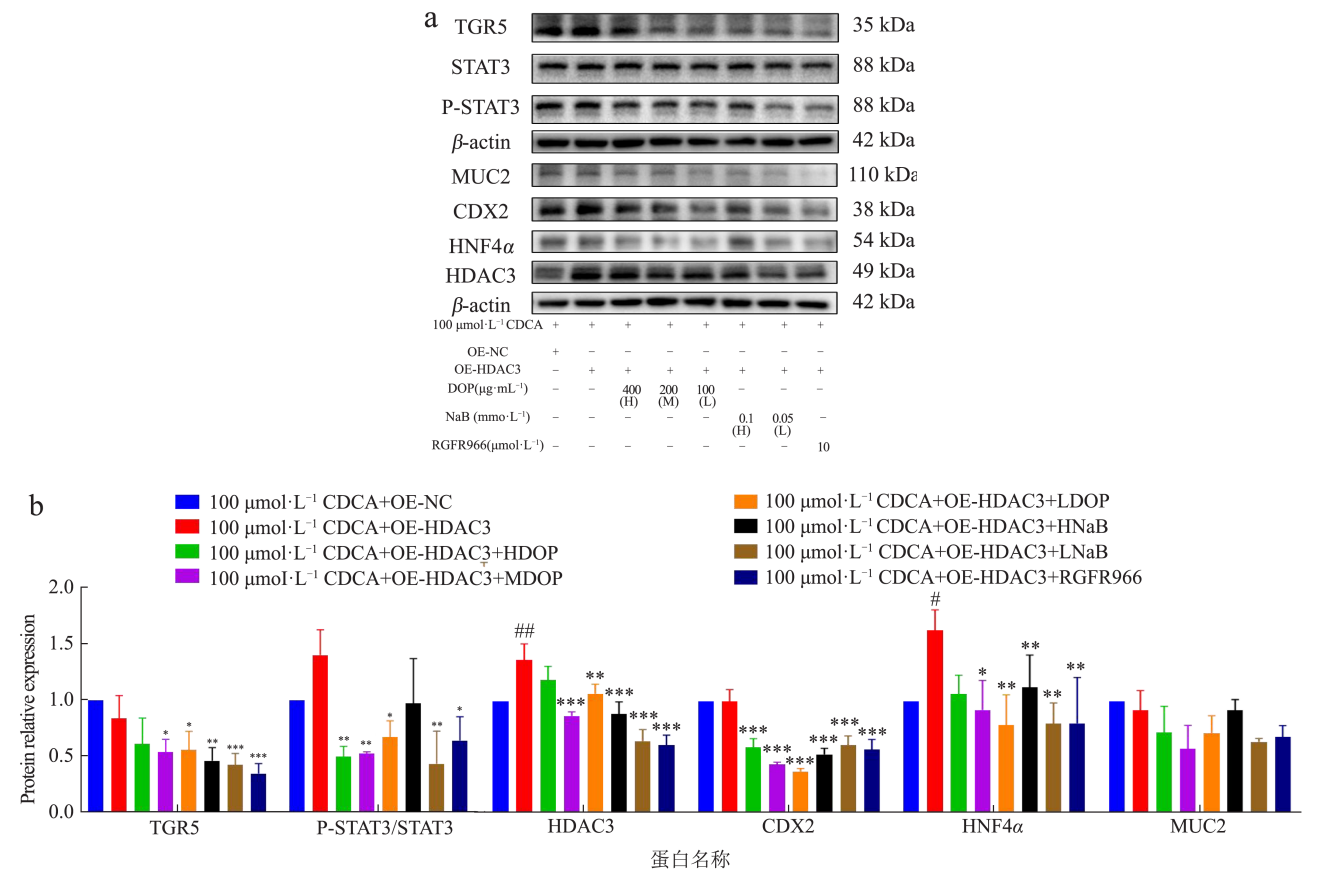


图 6 DOP 对 HDAC3 过表达 GIM 模型相关蛋白的影响和表达

Fig.6 Effect and expression of DOP on HDAC3 overexpression of GIM model-related proteins

注: a 为 DOP 对 HDAC3 过表达 GIM 模型相关蛋白的影响; b 为 DOP 对 HDAC3 过表达 GIM 模型相关蛋白的表达; # 表示与 OE-NC 组比较差异显著 ($P<0.05$), ## 表示与 OE-NC 组比较差异比较显著 ($P<0.01$); * 表示与 OE-HDAC3 组差异比较显著 ($P<0.05$), ** 表示与 OE-HDAC3 组比较差异显著 ($P<0.01$), *** 表示与 OE-HDAC3 组比较非常显著 ($P<0.001$)。

2.5.2 CO-IP检测HDAC3和HNF4α的相互作用

目前, HDAC3 抑制剂在肿瘤上具有良好的开发前景, 不过对于植物多糖如何抑制 HDAC3 的表达, 笔者认为一是通过影响肠道菌群的代谢产物丁酸间接抑制 HDAC3 的表达, 如文献报道肠道菌群代谢产物丁酸通过促进 HDAC3/ 维生素 D 受体途径促进回肠

Coristatin 表达改善类风湿关节炎^[36]。此外, HDAC3-HNF4α 形成复合物动态互作直接调控 HDAC3 的表达, 如普洛斯彼罗同源盒 1 (Prospero homeobox1, PROX1) 通过与肝脏中的 HNF4α 与 HDAC3 共募集维持脂质稳态^[37]。同时, DOP 等多糖会通过 Toll 样受体 (Toll-like Receptors, TLR) /NF-κB 途径^[38], 抑制炎症

的发生发展，并产生抑制 HDAC3 的作用。为了进一步观察 HDAC3 是否直接调控 HNF4 α 抑制胆汁酸诱导型 GIM 的发生发展。如图 7a 所示，细胞转染 HDAC3 过表达质粒后进行 IP 实验发现 HDAC3 调控了 HNF4 α 的表达；如图 7b 所示，细胞转染 HNF4 α 过表达质粒后进行 IP 实验发现 HNF4 α 调控了 HDAC3 的表达；证明 HDAC3 和 HNF4 α 存在相互作用。

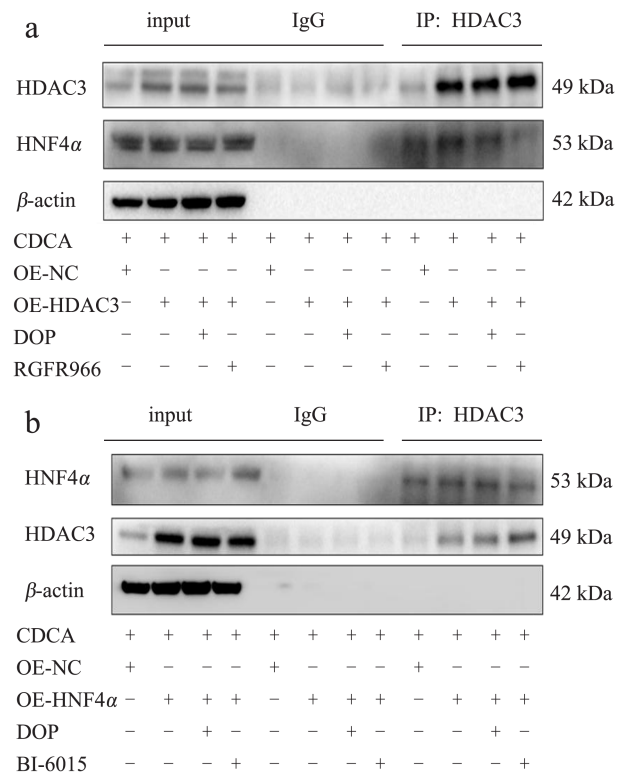


图 7 CO-IP 检测 HDAC3 与 HNF4 α 的关系
Fig.7 Interactions of HDAC3 and HNF4 α

3 结论

本研究以药食同源铁皮石斛多糖为研究目标，通过构建 CDCA 诱导型 GIM 细胞模型，检测细胞活力和观察细胞形态，同时检测肠化生相关 mRNA 和蛋白水平。结果表明，DOP 干预后未明显提高细胞活力及促进细胞增殖，但有助于维持细胞正常表型。RT-PCR、Western Blotting 结果显示 DOP 抑制 CDX2、MUC2、HNF4 α 、TGR5、FXR、HDAC3 等的表达，而且 HDAC3 和 HNF4 α 存在相互作用。以上结果提示 DOP 可能通过降低 HDAC3 的表达抑制肠化生标志物 HNF4 α 的表达，逆转 GIM 的发生发展。本课题后续将进行 HNF4 α 乙酰化水平和乙酰化位点检测；建立 HDAC3 敲除细胞系，验证靶点特异性；并探索是否有其他辅助因子参与 HDAC3/HNF4 α 复合物的动态组装，为进一步探索 DOP 防治胆汁酸诱导型 GIM 提供实验基础，并为产品开发提供实验支撑。

参考文献

[1] DE VRIES A C, VAN GRIEKEN N C, LOOMAN C W, et al. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4): 945-952.

[2] HE Q, LIU L, WEI J, et al. Roles and action mechanisms of bile acid-induced gastric intestinal metaplasia: a review [J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1): 158.

[3] YOUNES M, ARORA A, EVERETT J, et al. Expression of bile acid receptor TGR5 in gastric biopsies with intestinal metaplasia correlates with p53 protein accumulation: 1149 [J]. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 2016, 111: S500.

[4] YU J H, ZHENG J B, QI J, et al. Bile acids promote gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 and MUC2 expression via the FXR/NF- κ B signalling pathway [J]. *International Journal of Oncology*, 2019, 54(3): 879-892.

[5] BECHI P, AMOROSI A, MAZZANTI R, et al. Reflux-related gastric mucosal injury is associated with increased mucosal histamine content in humans [J]. *Gastroenterology*, 1993, 104(4): 1057-1063.

[6] GOLDMAN A, SHAHIDULLAH M, GOLDMAN D, et al. A novel mechanism of acid and bile acid-induced DNA damage involving Na⁺/H⁺ exchanger: implication for Barrett's oesophagus [J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1606-1616.

[7] JIN D, HUANG K, XU M, et al. Deoxycholic acid induces gastric intestinal metaplasia by activating STAT3 signaling and disturbing gastric bile acids metabolism and microbiota [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2120744.

[8] DEBRUYNE P R, WITEK M, GONG L, et al. Bile acids induce ectopic expression of intestinal guanylyl cyclase C Through nuclear factor-kappaB and Cdx2 in human esophageal cells [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(4): 1191-1206.

[9] TANAKA T, JIANG S, HOTTA H, et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer [J]. *The Journal of pathology*, 2006, 208(5): 662-672.

[10] 闵亚莉,倪阵,雷超,等.肝细胞核因子4 α 在胆汁酸诱导的胃黏膜肠上皮化生中的作用及其机制[J].*中华消化杂志*,2018, 38(3):165-170.

[11] WALESKY C, APTE U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in cell proliferation and cancer [J]. *Gene Expression*, 2015, 16(3): 101-108.

[12] WU S M, JAN Y J, TSAI S C, et al. Targeting histone deacetylase-3 blocked epithelial-mesenchymal plasticity and metastatic dissemination in gastric cancer [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2023, 39(5): 1873-1896.

[13] 王银环,王正江,姚志新,等.组蛋白去乙酰化酶3在胃癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J].*中国老年学杂志*,2013,33(23): 5836-5838.

[14] GEZER U, YÖRÜKER E E, KESKIN M, et al. Histone methylation marks on circulating nucleosomes as novel blood-based biomarker in colorectal cancer [J]. *International Journal of*

- Molecular Sciences, 2015, 16(12): 29654-29662.
- [15] 杨传玉,刘帆,吴耽,等.铁皮石斛抗阿司匹林诱导急性胃黏膜损伤活性组分筛选及作用研究[J].天然产物研究与开发,2016, 28(11):1699-1705,746.
- [16] 胡杨,赵勉,邱雨轩,等.药食同源中药铁皮石斛的研究进展[J].南京中医药大学学报,2024,40(1):94-108.
- [17] 张雅欣,李拥军,梁嘉熹,等.铁皮石斛多糖对小肠上皮细胞肠道屏障的保护作用[J].现代食品科技,2025,41(5):28-35.
- [18] 吴耽,江婷婷,赵青,等.铁皮石斛多糖抗阿司匹林诱导人胃黏膜上皮细胞GES-1损伤的保护作用机制研究[J].中国药理学通报,2017,33(10):1479-1480.
- [19] SHI D C, WANG P Y, XU L, et al. Potential of *Dendrobium officinale* oligosaccharides to alleviate chronic colitis by modulating inflammation and gut microbiota [J]. Food & Medicine Homology, 2024, 2(1): 100032.
- [20] HU C, ZENG D, HUANG Y, et al. Sodium butyrate ameliorates atopic dermatitis-induced inflammation by inhibiting HDAC3-mediated STAT1 and NF- κ B pathway [J]. Inflammation, 2024, 47(3): 989-1001.
- [21] ZHAO Y, SUN Y, WANG G, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides protect against MNNG-induced PLGC in rats via activating the NRF2 and antioxidant enzymes HO-1 and NQO-1 [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 1-11.
- [22] 钟雅璐,李国印,黄卫.胆汁酸反流诱导肠化生及胃癌的研究进展[J].胃肠病学和肝病杂志,2021,30(10):1086-1090.
- [23] LEE S M, PARK M S, PARK S Y, et al. Primary bile acid activates Egr-1 expression through the MAPK signaling pathway in gastric cancer [J]. Molecular Medicine Reports, 2022, 25(4): 129.
- [24] ZENG Q, KO C H, SIU W S, et al. Polysaccharides of *Dendrobium officinale* Kimura & Migo protect gastric mucosal cell against oxidative damage-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 208: 214-224.
- [25] NI Z, MIN Y, HAN C, et al. TGR5-HNF4 α axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression [J]. Cell Death Discovery, 2020, 6: 56.
- [26] ZHOU H, NI Z, LI T, et al. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2 [J]. Oncology Letters, 2018, 15(5): 7617-7624.
- [27] LI S, CHEN X, ZHOU L, et al. Farnesoid X receptor signal is involved in deoxycholic acid-induced intestinal metaplasia of normal human gastric epithelial cells [J]. Oncology Reports, 2015, 34(5): 2674-2682.
- [28] ESHLEMAN E M, SHAO T Y, WOO V, et al. Intestinal epithelial HDAC3 and MHC class II coordinate microbiota-specific immunity [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2023, 133(4), e162190.
- [29] EMMETT M J, LAZAR M A. Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3 [J]. Molecular Cell Biology, 2019, 20(2): 102-115.
- [30] 徐征宇,陈吉.CDX2等相关基因与胃粘膜肠化及胃癌的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(33):33-34.
- [31] MA H M, ZHANG Q, YANG X M, et al. HNF4 α regulates the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022: 8168988.
- [32] SANG Y, HAN X, GAO Y, et al. Research progress on biological activities of polysaccharides from edible fungus [J]. Starch-Stärke, 2023, 75(5-6): 2200219.
- [33] LIN ZHENYAN, FENG XIAOKE, CUI GUOLIANG, et al. Effect of polyporus umbellatus polysaccharides on gastrointestinal metaplasia cell model induced *in vitro* [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2021, 29(1): 8-13.
- [34] TANG Z, WANG Y, HUANG Y. Astragalus polysaccharide inhibits apoptosis and inflammation to alleviate chronic atrophic gastritis through NF- κ B signaling pathway in rats [J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e121921.
- [35] MARKS P A, RICHON V M, RIFKIND R A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92(15): 1210-1216.
- [36] LIAO M, ZHU Y, CUI Q, et al. Intestinal butyrate ameliorates rheumatoid arthritis through promoting the expression of cortistatin in ileum via HDAC3-Vitamin D receptor pathway [J]. Immunology, 2025, 175(3): 373-390.
- [37] ARMOUR SM, REMSBERG JR, DAMLE M, et al. An HDAC3-PROX1 corepressor module acts on HNF4 α to control hepatic triglycerides [J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 549.
- [38] YANG K, ZHAN L, LU T, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides protected against ethanol-induced acute liver injury *in vivo* and *in vitro* via the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Cytokine, 2020, 130: 155058.