

血竭石油醚提取物对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞的 抗肿瘤作用

黄惠铭, 田颖颖, 庞道然, 刘亚鑫, 欧阳里山, 屠鹏飞, 李军, 胡仲冬*
(北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究血竭石油醚提取物(SDPEF)对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞增殖、凋亡、体外迁移能力及自噬的影响,并阐明其分子作用机制。方法:采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测SDPEF(0, 20, 40, 60, 80 mg·L⁻¹)作用24, 48, 72 h时,对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞体外增殖的影响。借助Hoechst染色实验观察不同浓度的SDPEF作用48 h后对HGC-27和MGC-803细胞凋亡的影响。采用流式细胞术检测不同浓度SDPEF作用48 h,对HGC-27和MGC-803细胞凋亡率的影响。采用细胞划痕实验观察不同浓度SDPEF在不同作用时间点对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞体外迁移能力的影响。借助吖啶橙染色实验检测不同浓度SDPEF对HGC-27和MGC-803细胞自噬的影响。利用蛋白免疫印迹法检测SDPEF作用人胃癌HGC-27和MGC-803细胞48 h后对信号通路相关蛋白表达水平的调控作用。结果:与空白组比较,SDPEF(30 mg·L⁻¹)组人胃癌HGC-27和MGC-803细胞的增殖和体外迁移能力明显降低($P<0.05$),且具有浓度与时间依赖性;SDPEF(60 mg·L⁻¹)还能够诱导人胃癌HGC-27和MGC-803细胞凋亡($P<0.01$)和自噬的发生。与空白组比较,SDPEF(60 mg·L⁻¹)能够下调磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)表达($P<0.05$, $P<0.01$),且能够下调磷酸化信号传导与转录激活因子3(p-STAT3)蛋白表达水平($P<0.01$),提示SDPEF可能是通过抑制mTOR/STAT3信号通路来抑制人胃癌HGC-27和MGC-803细胞的增殖、迁移并诱导其发生凋亡和自噬。结论:mTOR/STAT3信号通路下调可能参与了SDPEF的抗胃癌作用。该研究能够为血竭抗肿瘤作用研究提供一定的参考。

[关键词] 血竭石油醚提取物; 人胃癌细胞; 增殖; 凋亡; 迁移; 自噬

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212124

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210908.1324.001.html>

[网络出版日期] 2021-09-08 15:28

Anti-tumor Effect of Draconis Sanguis Petroleum Ether Fraction on Human Gastric Cancer HGC-27 and MGC-803 Cells

HUANG Hui-ming, TIAN Ying-ying, PANG Dao-ran, LIU Ya-xin, OUYANG Li-shan,
TU Peng-fei, LI Jun, HU Zhong-dong*

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Draconis Sanguis petroleum ether fraction (DSPEF) on the proliferation, apoptosis, migration, and autophagy of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells, and preliminarily elucidate its molecular mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of DSPEF at different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 mg·L⁻¹) on the proliferation of HGC-27 and MGC-803 cells after 24, 48, 72 h. Hoechst staining and flow cytometry were used to explore the effects of DSPEF at different concentrations on the apoptosis and apoptosis rate of HGC-27 and MGC-803 cells after

[收稿日期] 20210624(009)

[基金项目] 北京市科技新星计划项目(Z191100001119083);中华中医药学会青年人才托举工程项目[CACM-2018-(QNRC2-B05)]

[第一作者] 黄惠铭,在读硕士,从事中药活性成分抗肿瘤作用研究,E-mail:hhmtcm@163.com

[通信作者] * 胡仲冬,研究员,从事中药活性成分抗肿瘤作用研究,Tel:010-64286180,E-mail:huzhongdong@126.com

48 h treatment, respectively. The wound healing assay and acridine orange staining were used to investigate the effects of DSPEF on the migration and autophagy of HGC-27 and MGC-803 cells, respectively. Western blot was used to detect the expression levels of signaling pathway-related proteins in HGC-27 and MGC-803 cells treated with DSPEF for 48 h. **Result:** Compared with the control group, DSPEF ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited the proliferation and migration of HGC-27 and MGC-803 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$), and induced the apoptosis ($P < 0.01$) and autophagy of HGC-27 and MGC-803 cells. DSPEF ($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) down-regulated the protein levels of phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and down-regulated phospho-signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) in HGC-27 and MGC-803 cells ($P < 0.01$), suggesting that DSPEF presumably inhibited the proliferation and migration of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells and induced their apoptosis and autophagy by inhibiting the mTOR/STAT3 signaling pathway. **Conclusion:** The down-regulation of the mTOR/STAT3 signaling pathway may be involved in the anti-gastric cancer effect of DSPEF. This study is expected to provide a reference for the investigation of the anti-tumor effect of Draconis Sanguis.

[Keywords] Draconis Sanguis petroleum ether fraction (DSPEF); human gastric cancer cells; proliferation; apoptosis; migration; autophagy

胃癌在亚洲等地区最为常见,是全球范围内的第四大癌症,全球死亡率第二,严重威胁人类健康^[1-2]。中医药是中华民族的瑰宝,近年来中药抗肿瘤作用研究正吸引越来越多学者的关注^[3]。目前临床上胃癌治疗正处于瓶颈阶段,中西医结合治疗胃癌显现出良好的前景,开展中医药抗胃癌作用研究具有重要意义^[4-6]。

血竭是棕榈科植物麒麟竭 *Daemonorops draco* 果实渗出的树脂经加工制成,具有活血化瘀、消肿止痛、敛疮止血等功用,药用历史长达1500年,被《本草纲目》誉为“活血圣药”^[7]。现代药理研究证明血竭具有活血、降糖、抗菌、保护心血管、增强愈合等作用^[8]。研究表明,血竭可以从活血化瘀、抗炎、抗氧化等方面改善神经退行性病变^[9],能通过降低血清肿瘤坏死因子(TNF)- α ,升高白细胞介素(IL)-10在血清中的表达量来治疗溃疡性结肠炎^[10]。血竭醇提物可以改变血液流变学,加速血管新生而防止穿支皮瓣坏死^[11]。复方血竭化瘀止痛颗粒能够提高IL-2/IL-10,增强机体免疫,而治疗子宫内膜异位症^[12]。目前血竭提取物抗肿瘤作用研究较少,本研究采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、流式细胞术、细胞划痕实验、吖啶橙染色法、免疫印迹等技术方法,探讨了血竭石油醚提取物(DSPEF)对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞增殖、凋亡、体外迁移及自噬的影响,并揭示其分子作用机制,为进一步开展血竭抗胃癌作用研究及临床应用提供了一定的参考和理论依据。

1 材料

1.1 药物 本实验所用血竭果实采集自印度尼西亚棉兰市,并经北京中医药大学屠鹏飞教授鉴定为棕榈科植物麒麟竭 *D. draco* 的果实,样品标本(XJ20170929)存放于北京中医药大学中药学院中药现代研究中心。将麒麟竭干燥果实粉碎后,分别经体积分数为95%,75%,50%的乙醇回流提取2次,每次2h,合并提取液,回收溶剂得到的血竭总提物经水分散后,用石油醚萃取,最终得到血竭石油醚部位,得率为0.6%。用二甲基亚砜(DMSO)溶解并配制成质量浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物母液, 4°C 储存以供短期内使用。

1.2 试剂 RPMI 1640基础培养基,DMEM高糖基础培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(以色列BioInd公司,批号分别为2052252,2051247,2049227);0.25%胰酶EDTA,青霉素-链霉素(美国Thermo Fisher公司,批号分别为25200072,15140122);胎牛血清(FBS,美国Corning公司,批号35-081-cv);CCK-8试剂盒,细胞凋亡检测试剂盒,Hoechst 33342染液(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为BN15201, C1062M, C1025);吖啶橙粉末(美国Sigma公司,批号A6014);Super ECL Plus超敏发光液(北京普利莱基因技术公司,批号RPN2232)购于;一抗 β -肌动蛋白(β -actin),雷帕霉素靶蛋白(mTOR),辣根过氧化物酶标记的兔抗和鼠抗(美国Santa Cruz公司,批号sc-47778, 2983, sc-2357, sc-516102);磷酸化(p)-mTOR,信号传导与转录激活因子3(STAT3),p-STAT3抗体(美国CST公司,批

号分别为5536,4904,9145)。

1.3 仪器 MCO-18AIC型细胞培养箱(日本SANYO公司);ICC50型光学显微镜,MD500型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);TDL-40B型离心机(上海安亭科学公司);Enspire型多功能酶标仪(美国Perkin Elmer公司);DYY-6D型电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂);5424R型低温高速离心机(美国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人胃癌HGC-27(第6代)和MGC-803细胞购买自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。人胃癌HGC-27细胞使用RPMI 1640完全培养基(含10% FBS和1%青霉素-链霉素),人胃癌MGC-803细胞使用DMEM完全培养基(含10% FBS和1%青霉素-链霉素),培养条件为湿度饱和,5% CO₂,37℃恒温。

2.2 CCK-8细胞增殖细胞活力 将状态良好、成对数生长期的细胞消化,配制成浓度为 3.0×10^4 个/mL的单细胞悬液,以每孔100 μL铺96孔板,置于细胞培养箱中24 h,使其完全贴壁。DSPEF 0, 20, 40, 60, 80 mg·L⁻¹分别作用于人胃癌HGC-27和MGC-803细胞,在培养箱中孵育24, 48, 72 h,每个浓度设5个复孔。弃去培养基,加入含有10% CCK-8的基础培养基,置于培养箱中孵育1~2 h,在450 nm波长下读取吸光度A,计算细胞存活率。

2.3 Hoechst染色实验检测细胞凋亡 待6 cm培养皿中的细胞生长至皿底90%左右时,以合适的密度接种于6孔板,在培养箱中孵育24 h使其完全贴壁,加入DSPEF(30 mg·L⁻¹)。作用48 h,吸弃含药培养基,用PBS清洗3次,每孔加入4%的多聚甲醛1 mL,于培养箱中固定15 min。用PBS配制终浓度为0.01 g·L⁻¹的Hoechst染色工作液,吸出多聚甲醛,更换为染色工作液1 mL,培养箱中避光反应30 min,吸弃染色液,每孔加入PBS 1 mL,最后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 把HGC-27和MGC-803细胞以合适的密度接种于六孔板中,待孵育24 h贴壁后,分别给予DSPEF 30, 60 mg·L⁻¹,每个浓度设置3个复孔,作用48 h,按照细胞凋亡检测试剂盒说明进行操作,再用流式细胞仪检测并分析。

2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 在12孔板上分别接种HGC-27和MGC-803细胞,待长满板底后,更换为基础培养基,在培养箱中饥饿至少12 h,

再用10 μL的白色枪头垂直于板底进行划痕,然后用PBS清洗2~3次除去细胞碎片。用基础培养基将DSPEF母液稀释成浓度为10, 20 mg·L⁻¹的工作液,给药后,HGC-27和MGC-803细胞分别于0, 24 h和0, 36 h拍照,计算并分析不同浓度药物作用不同时间对细胞迁移能力的影响。

2.6 吖啶橙染色实验检测细胞自噬 6 cm培养皿中的HGC-27和MGC-803细胞融合度达到90%时,以合适的密度接种于6孔板中,孵育24 h使其完全贴壁,加入30 mg·L⁻¹ DSPEF,作用48 h,吸弃含药培养基,用PBS清洗3次,每孔加入4%多聚甲醛1 mL,于培养箱中固定15 min。吖啶橙染色母液用PBS稀释为10 mg·L⁻¹的工作液,吸出多聚甲醛,更换为染色工作液1 mL,培养箱中避光反应30 min,最后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞蛋白表达 HGC-27和MGC-803细胞分别接种于6孔板,分别给予DSPEF 30, 60 mg·L⁻¹,处理48 h,再用适量的细胞裂解液裂解细胞,进行蛋白提取,收集蛋白样品至1.5 mL离心管,在电加热块上99℃加热10 min,进行蛋白变性。蛋白样品以10 μL/孔进行蛋白上样,恒压电泳,恒流转至PVDF膜,然后在室温下用5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭PVDF膜1.5 h,一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST漂洗3次,每次10 min,然后二抗(1:1万),4℃孵育4 h,TBST漂洗3次,每次10 min,暗室内曝光、显影,以目的蛋白和内参的比值表示相关蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析 在GraphPad Prism 8.0.1软件中进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞增殖活性的影响 与空白组比较,DSPEF(40~80 mg·L⁻¹)组HGC-27,MGC-803细胞的存活率显著下降($P < 0.01$),并呈现浓度与时间依赖趋势。见表1。

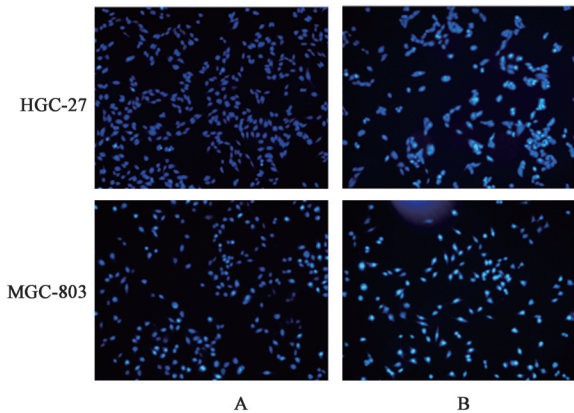
3.2 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞凋亡的影响 Hoechst是一种具有膜通透性的荧光染料,可以穿透细胞的生物膜与DNA结合显现蓝色荧光,发生凋亡的细胞核染色增强呈现亮蓝色荧光,非凋亡细胞荧光较暗且弱。30 mg·L⁻¹ DSPEF处理HGC-27和MGC-803细胞48 h,进行Hoechst,与空白组比较,30 mg·L⁻¹ DSPEF组蓝色荧光明显增强,

表1 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

细胞	组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
HGC-27	空白		100.000±1.710	100.000±1.017	100.000±3.695
	DSPEF	20	94.968±7.207	81.465±2.514 ²⁾	74.146±3.241 ²⁾
		40	76.948±4.646 ²⁾	60.821±5.359 ²⁾	41.896±6.343 ²⁾
		60	46.104±1.014 ²⁾	17.536±1.762 ²⁾	8.506±0.532 ²⁾
		80	14.773±0.562 ²⁾	2.997±0.961 ²⁾	1.340±0.058 ²⁾
MGC-803	空白		100.000±2.761	100.000±2.039	100.000±3.025
	DSPEF	20	84.430±2.583	85.102±3.541 ²⁾	100.110±0.757
		40	61.817±2.795 ²⁾	64.128±5.060 ²⁾	92.550±5.610
		60	39.852±4.254 ²⁾	33.100±0.974 ²⁾	32.756±0.746 ²⁾
		80	22.938±0.000 ²⁾	4.032±0.882 ²⁾	3.027±0.151 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

提示DSPEF能够诱导人胃癌HGC-27和MGC-803细胞凋亡。给予HGC-27和MGC-803细胞30, 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DSPEF作用48 h,流式细胞仪检测发现,与空白组比较,DSPEF(60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)能够增加HGC-27和MGC-803细胞的凋亡率($P<0.05$, $P<0.01$)。见图1,表2。



A. 空白组;B. DSPEF(30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图1 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞凋亡的影响(Hoechst, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of DSPEF on apoptosis of HGC-27 and MGC-803 cells (Hoechst, $\times 100$)

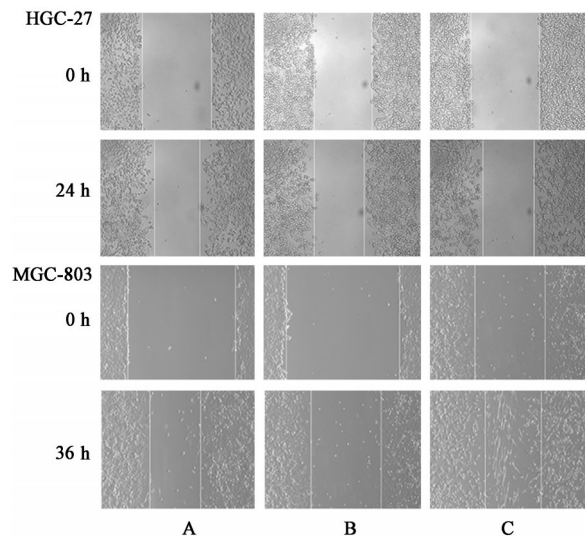
3.3 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞迁移能力的影响 与空白组比较,DSPEF(20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组HGC-27和MGC-803细胞的体外迁移能力均有不同程度的减弱($P<0.01$)。见图2,表3。

3.4 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞自噬的影响 吖啶橙是一种对PH敏感的具有细胞渗透性的荧光染料,可以嵌入DNA呈现绿色荧光,也可以进入酸性细胞器(pH较低)呈现橘红色荧光,如

表2 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of DSPEF on apoptosis of HGC-27 and MGC-803 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
HGC-27	空白		43.433±7.800
	DSPEF	30	58.667±7.454
		60	68.433±5.622 ¹⁾
MGC-803	空白		9.067±1.050
	DSPEF	30	13.433±2.967
		60	18.633±2.470 ²⁾



A. 空白组;B. DSPEF(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组;C. DSPEF(20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图2 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞迁移能力的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of DSPEF on migration ability of HGC-27 and MGC-803 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

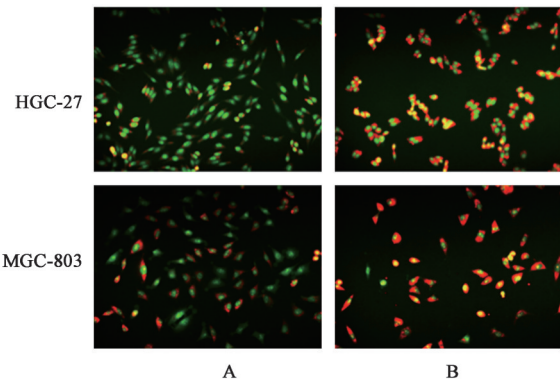
表3 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞迁移的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DSPEF on migration of HGC-27 and MGC-803 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移距离/ 倍
HGC-27	空白		1.000±0.020
	DSPEF	10	0.616±0.028 ²⁾
		20	0.555±0.025 ²⁾
MGC-803	空白		1.416±0.196
	DSPEF	10	1.128±0.103
		20	0.493±0.071 ²⁾

自噬溶酶体。与空白组比较,DSPEF($30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组橙红色荧光明显增强,提示DSPEF给药能够激活人胃癌HGC-27和MGC-803细胞的自噬水平。见图3。

3.5 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞中mTOR/STAT3信号通路相关蛋白的影响 mTOR/STAT3信号通路在肿瘤发生发展过程中发挥了重要作用,能够调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、自噬、转移



A. 空白组;B. DSPEF($30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图3 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞自噬的影响(吖啶橙, $\times 10$)

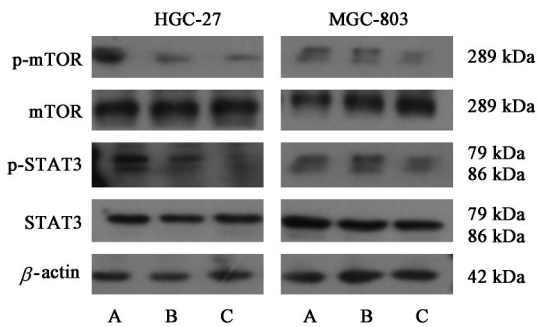
Fig. 3 Effect of DSPEF on autophagy of HGC-27 and MGC-803 cells(Acridine Orange, $\times 10$)

等生物学过程^[13-15]。与空白组比较,DSPEF($60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)可下调p-mTOR和p-STAT3蛋白水平($P<0.05, P<0.01$),说明DSPEF能够抑制人胃癌HGC-27和MGC-803细胞中mTOR/STAT3信号通路。见表4,图4。

表4 DSPEF对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞mTOR/STAT3信号通路的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DSPEF on mTOR/STAT3 signaling pathway of HGC-27 and MGC-803 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	p-mTOR/ β -actin	mTOR/ β -actin	p-STAT3/ β -actin	STAT3/ β -actin
HGC-27	空白		1.065±0.337	1.233±0.239	1.263±0.212	1.110±0.324
	DSPEF	30	0.465±0.309	1.162±0.242	1.052±0.173	1.097±0.346
		60	0.246±0.153 ¹⁾	0.977±0.078	0.519±0.417 ²⁾	1.065±0.273
MGC-803	空白		0.819±0.059	1.033±0.059	0.826±0.026	0.974±0.112
	DSPEF	30	0.584±0.246	1.156±0.129	0.705±0.332	0.975±0.094
		60	0.314±0.166 ²⁾	1.104±0.124	0.418±0.247 ²⁾	0.929±0.181



A. 空白组;B. DSPEF($30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组;C. DSPEF($60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图4 DSPEF作用人胃癌细胞HGC-27和MGC-803中mTOR/STAT3信号通路电泳

Fig. 4 Electrophoresis of DSPEF inhibited mTOR/STAT3 signaling pathway in HGC-27 and MGC-803 cells

4 讨论

胃癌严重威胁着人类的健康,寻找胃癌治疗药物具有重要意义。中药通过对机体的整体调节作

用,并且发挥其多层次、多环节、多靶点的优势来治疗肿瘤。近年来中药抗肿瘤作用研究正受到越来越多的关注^[6]。目前血竭提取物抗肿瘤作用研究尚未见报道,因此本文针对血竭石油醚提取物对人胃癌细胞的抗肿瘤作用研究具有较好的新颖性。

肿瘤细胞的无限增殖性是区别于正常细胞的特征之一,其不受机体调控且无止境。细胞凋亡是细胞为维持内环境稳定,由基因调控的自发有序的死亡。因此,阻断肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的重要策略方向^[16-19]。有研究报道白菖蒲水提物和南蛇藤提取物能够抑制人肝癌细胞增殖,并且通过激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3进而诱导人肝癌细胞发生凋亡^[20-21]。土茯苓提取液被报道能够抑制人肝癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[22]。在本研究中发现DSPEF能够明

显示抑制人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的增殖,并呈现浓度与时间依赖趋势。此外,借助 Hoechst 染色和流式细胞术检测发现 DSPEF 能够诱导 HGC-27 和 MGC-803 细胞凋亡。自噬是细胞自我吞噬内部蛋白或细胞器实现更新和满足代谢需要的过程^[23]。作为一种重要的细胞死亡方式,活化自噬可以被作为一种杀伤肿瘤细胞的“武器”。研究发现半枝莲总黄酮能够通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 通路诱导肿瘤细胞发生自噬而抑制小鼠黑色素瘤生长^[24]。黄芪多糖能够通过上调微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)来诱导宫颈癌 HeLa 细胞自噬发挥抗肿瘤作用^[25]。本研究吖啶橙染色实验结果显示,DSPEF 给药能够激活人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的自噬水平。综上,DSPEF 显示出良好的体外抗胃癌活性。

mTOR 是细胞生长和增殖信号的重要调节因子^[26]。STAT3 是 STAT 家族的成员之一,其作为一种非常重要的转录因子,能够对多种信号进行响应并调控下游基因的^[27]。mTOR/STAT3 信号通路在肿瘤发生发展过程中发挥了重要作用,其能够表达调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、自噬、转移等生物学过程,在很多肿瘤中都能发现 mTOR/STAT3 信号通路的异常活化^[28]。当 mTOR 的表达被阻断,STAT3 的表达也下降时,HepG2 细胞迁移和侵袭能力降低提示与 mTOR/STAT3 信号通路被阻断有关^[14]。抑制上游基因 YB-1 可以通过阻断 mTOR/STAT3 信号通路来抑制三阴性乳腺癌细胞生长并诱导其发生凋亡^[29]。一种 p53 调控的 DNA 损伤诱导基因(Gadd45a)能够通过阻断 mTOR/STAT3 通路抑制肿瘤血管生成^[30]。在结肠癌细胞中铃兰毒苷通过 PI3K/Akt/mTOR/STAT3 途径抑制了肿瘤细胞的增殖^[15]。研究发现双氢青蒿素和吉非替尼联合给药能够通过调控 Akt/mTOR/STAT3 途径来抑制非小型肺癌细胞生长,促进其凋亡^[31]。本研究免疫印迹实验结果显示,DSPEF 能够下调 mTOR 和 STAT3 的磷酸化水平,提示 DSPEF 能够抑制人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞中 mTOR/STAT3 信号通路。基于上述内容,本研究推测 mTOR/STAT3 信号通路参与了 DSPEF 对人胃癌细胞增殖、凋亡、迁移及自噬的作用。

综上所述,DSPEF 能够抑制人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的增殖和体外迁移能力,而且能够诱导人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞凋亡和自噬的发生。此外,在人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞中

DSPEF 能够抑制 mTOR/STAT3 信号通路。因此,mTOR/STAT3 信号通路下调可能参与了 DSPEF 的抗胃癌作用。本研究能够为深入研究血竭抗肿瘤作用提供一定的参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PILLERON S, SOTO-PEREZ-DE-CELIS E, VIGNAT J, et al. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050 [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(3):601-608.
- [2] YANG L, ZHAO L, ZENG T, et al. Mechanisms underlying therapeutic effects of traditional Chinese medicine on gastric cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, doi: 10.2147/CMAR.S218214
- [3] 汤涛,廖正根,董伟,等. 中药四气属性与逆转肿瘤多药耐药功能关联规律探讨[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4):795-799.
- [4] 王雅坤,沈琳. 2020年度胃癌治疗进展盘点[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2021, 7(1):1-5.
- [5] 李亚,李蕊白,王俭,等. 中药复方抗胃癌基础研究现状与展望[J]. *世界中医药*, 2020, 15(20):3142-3146.
- [6] 田义敏,周欣,赵超,等. 中药有效成分抗胃癌作用机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15):3584-3593.
- [7] 张卫,张瑞贤,李健,等. 药用血竭品种新考[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(7):1354-1357.
- [8] 张丽,王绪平,黄孝闻,等. 血竭及龙血竭化学成分、药理作用研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(20):2605-2611.
- [9] 张晓燕,于莹,徐峰,等. 血竭对神经退行性疾病潜在治疗作用探讨[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(5):178-182.
- [10] 李敏,刘肖,李天然,等. 血竭对 UC 大鼠疗效及血清 TNF- α 、IL-10 表达的影响研究[J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(23):3620-3622, 3625.
- [11] 张丽,张扬,王绪平,等. 血竭醇提物对大鼠穿支皮瓣模型存活及 PI3K/Akt/eNOS 通路的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(23):3252-3257.
- [12] 董杰,李会影,于映霞. 血竭化瘀止痛颗粒对子宫内异位症气滞血瘀证模型大鼠 IL-2、IL-10 的影响[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(66):171-172.
- [13] NI Y, WU S, WANG X, et al. Cucurbitacin I induces pro-death autophagy in A549 cells via the ERK-mTOR-STAT3 signaling pathway [J]. *Cell Biochem*, 2018, 119(7):6104-6112.
- [14] PU X, GUO Q X, LONG H A, et al. Effects of mTOR-STAT3 on the migration and invasion abilities

- of hepatoma cell and mTOR-STAT3 expression in liver cancer [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7 (5) : 368-372.
- [15] ZHANG Z H, LI M Y, WANG Z, et al. Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer [J]. *Phytotherapy*, 2020, doi: 10.1016/j.phymed. 2020. 153172.
- [16] 金浩,余佳,王梓瑜,等. 槐角黄酮通过调控LncRNA FBXL19-AS1/miR-342-3p通路抑制肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (18):4440-4447.
- [17] 罗林明,覃丽,詹济华,等. 百合总皂苷对肺癌细胞增殖、凋亡及侵袭转移的作用及其初步机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22):4498-4505.
- [18] 李亚巍,张巍,许娜,等. 双氢青蒿素通过调节凋亡相关蛋白的表达及活性氧的产生而抑制胰腺癌JF-305细胞的增殖[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(15):3026-3030.
- [19] HUANG M, YI C, HUANG X Z, et al. Recombinant protein TRAIL-Mu3 enhances the antitumor effects in pancreatic cancer cells by strengthening the apoptotic signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(6):438.
- [20] GUAN Z, CHEN J, LI X. *Patrinia herba* aqueous extract on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(3):119-124.
- [21] 李文原. 南蛇藤提取物靶向mTOR抑制肝癌的作用及机制研究[D]. 扬州:扬州大学, 2019.
- [22] SA F, GAO J L, FUNG K P, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines[J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 171(1):1-14.
- [23] PATEL N H, XU J, SALEH T, et al. Influence of nonprotective autophagy and the autophagic switch on sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.bcp. 2020. 113896
- [24] 陈明,王举涛,吴珍妮,等. 半枝莲总黄酮通过PI3K/AKT/mTOR通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7):1358-1364.
- [25] 翟秋丽,胡向丹,肖静,等. 黄芪多糖可能通过调控细胞自噬提高宫颈癌HeLa细胞对顺铂的敏感性[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(4):805-812.
- [26] MA R, YU D, PENG Y, et al. Resveratrol induces AMPK and mTOR signaling inhibition-mediated autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin: Shanghai*, 2021, 53 (6):775-783.
- [27] PARK H J, PARK S H, CHOI Y H, et al. The root extract of *scutellaria baicalensis* induces apoptosis in EGFR TKI-resistant human lung cancer cells by inactivation of STAT3 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (10):5181.
- [28] 刘翠颖,谢昌利,林艳,等. IL-12通过AKT/mTOR/STAT3信号通路诱导肝癌细胞自噬[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(7):870-875.
- [29] FUJII T, SEKI N, NAMOTO-MATSUBAYASHI R, et al. YB-1 prevents apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway in HER-2-overexpressing breast cancer cells [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(2):153-156.
- [30] YANG F, ZHANG W, LI D, et al. Gadd45a suppresses tumor angiogenesis via inhibition of the mTOR/STAT3 protein pathway [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9):6552-6560.
- [31] JIN H, JIANG A Y, WANG H, et al. Dihydroartemisinin and gefitinib synergistically inhibit NSCLC cell growth and promote apoptosis via the Akt/mTOR/STAT3 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (3):3475-3481.

[责任编辑 张丰丰]