

## 基于MGC-803细胞微环境探讨加味小陷胸汤 抑制侵袭迁移作用机制

丁芮<sup>1</sup>, 王景辉<sup>1,2</sup>, 王靓<sup>1,2</sup>, 陈建<sup>1,2</sup>, 黄金玲<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230012;

2. 安徽省中医药科学院 中西医结合研究所, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**[摘要]** 目的:观察加味小陷胸汤水提取物对MGC-803细胞微环境的影响,探究该方通过调控MGC-803细胞微环境抑制侵袭迁移作用与其调控Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/活化T细胞核因子(NFAT)信号通路的可能机制。方法:转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)造模后,将MGC-803细胞分为空白组、模型组、加味小陷胸汤组(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>);Wnt5a过表达质粒转染后,分为过表达载体(pEX)-空白(NC)组、pEX-Wnt5a组、pEX-NC+加味小陷胸汤组(40 mg·L<sup>-1</sup>)和pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组(40 mg·L<sup>-1</sup>)。观察MGC-803细胞侵袭能力、迁移能力、微环境关键因子、上皮间质转化(EMT)基因、Wnt5a、钙调神经磷酸酶(CaN)、NFAT1、磷酸化(p)-NFAT1和NFAT1核蛋白表达及细胞Ca<sup>2+</sup>浓度变化。结果:与空白组比较,模型组微环境显著上调(P<0.01);与模型组比较,加味小陷胸汤(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>)可明显抑制微环境(P<0.05, P<0.01)。进一步实验表明,与空白组比较,模型组过表达Wnt5a后侵袭细胞增多,划痕率升高,微环境因子和EMT基因呈活化态势,Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT通路激活(P<0.01);与模型组比较,加味小陷胸汤可抑制细胞远处侵袭和减少愈合,抑制微环境、EMT发展,和Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号转导,降低NFAT1核表达和NFAT1介导的转录活性,从而降低细胞Ca<sup>2+</sup>浓度,且可逆转Wnt5a的作用(P<0.05, P<0.01)。结论:加味小陷胸汤可通过改善MGC-803细胞微环境调控Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT通路,抑制胃癌侵袭转移和EMT进程。

**[关键词]** 微环境; 加味小陷胸汤; MGC-803细胞; 胃癌; 侵袭转移

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0018-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221625

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220628.1745.007.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-30 8:42

### Mechanism of Modified Xiao Xianxiong Tang in Inhibiting Invasion and Metastasis by Targeting Microenvironment of MGC-803 Cells

DING Rui<sup>1</sup>, WANG Jinghui<sup>1,2</sup>, WANG Liang<sup>1,2</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>, HUANG Jinling<sup>1,2\*</sup>

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of the water extract of modified Xiao Xianxiong Tang on microenvironment of gastric cancer MGC-803 cells, and to explore its possible mechanism in inhibiting the invasion and metastasis and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of MGC-803 cells and regulating Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling pathway by regulating microenvironment. **Method:** The model of MGC-803 cells was established by transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>). The MGC-803 cells were divided into blank group, model group, and modified Xiao Xianxiong Tang (10, 20,

**[收稿日期]** 2022-03-04

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81173171,81573864)

**[第一作者]** 丁芮,在读博士,从事中药复方抗肿瘤作用研究,E-mail:584831330@qq.com

**[通信作者]** \*黄金玲,博士生导师,教授,从事中药抗肿瘤作用及其分子机制研究,E-mail:jinling6181@126.com

40 mg·L<sup>-1</sup>) groups. After transfection of Wnt5a overexpression plasmid, they were divided into pEX-normal control (NC) group, pEX-Wnt5a group, pEX-NC+modified Xiao Xianxiong tang (40 mg·L<sup>-1</sup>) group and pEX-Wnt5a+modified Xiao Xianxiong tang (40 mg·L<sup>-1</sup>) group. The invasion ability, migration ability, key factors of microenvironment, epithelial mesenchymal transformation (EMT) gene, Wnt5a, calcineurin (CaN), NFAT1, phosphorylated (p)-NFAT1 and NFAT1 nuclear protein expression and cell Ca<sup>2+</sup> concentration of MGC-803 cells were observed. **Result:** Compared with the blank group, the microenvironment in the model group was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ), and compared with the model group, modified Xiao Xianxiong tang (10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup>) could significantly inhibit the microenvironment ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Further experiments showed that compared with the blank group, the number of invasive cells increased, the scratch rate increased, the microenvironmental factors and EMT gene were activated and the Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway was activated in the model group after overexpression of Wnt5a. Compared with the model group, modified Xiao Xianxiong tang could inhibit cell distant invasion and reduce healing, inhibit microenvironment, EMT development, and Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT signal transduction, reduce NFAT1 nuclear expression and NFAT1-mediated transcriptional activity, thus reduce cell Ca<sup>2+</sup> concentration, and reverse the effect of Wnt5a ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Modified Xiao Xianxiong tang could regulate Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway and inhibit the invasion and metastasis of gastric cancer and EMT progression by improving tumor microenvironment.

**[Keywords]** microenvironment; modified Xiao Xianxiong tang; MGC-803 cell; gastric cancer; invasion and metastasis

胃癌(GC)是消化道最常见的恶性肿瘤之一,是全球第五大发病原因和第二大死亡原因,对全人类构成严重威胁<sup>[1]</sup>。据报道,包括中国、日本和韩国在内的亚洲南部和东部居民患GC的风险更高<sup>[2]</sup>。由于GC早期症状不明显,许多患者首先被诊断为晚期GC,并伴有肿瘤浸润和转移。因此,寻找新替代性的GC治疗药物具有重要的治疗意义<sup>[3]</sup>。肿瘤或肿瘤干细胞存在的细胞环境称为肿瘤微环境(TME),肿瘤诱导微环境血管生成,获得供能。血管内皮生长因子(VEGF)是一种强有力的促瘤因子,沉默VEGF介导的信号可抑制肿瘤的存活<sup>[4-5]</sup>。细胞外基质(ECM)为TME提供结构支撑,可调节TME中肿瘤细胞和间质细胞的活性<sup>[6]</sup>。胃癌中ECM高度重塑和紊乱,从而调控细胞增殖、血管生成、侵袭和转移<sup>[7]</sup>。侵袭转移是造成患者死亡的最最终因素,是指肿瘤局部浸润到周围的肿瘤相关间质和正常组织<sup>[8-9]</sup>。Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/活化T细胞核因子(NFAT)信号能启动上皮间质化(EMT)活性释放,最终造成患者死亡<sup>[10]</sup>。本课题组前期体内外实验研究发现加味小陷胸汤可通过Wnt/ $\beta$ -连接蛋白( $\beta$ -catenin)和Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路有效抑制胃癌细胞EMT活性及侵袭迁移,但其对于MGC-803细胞微环境的影响尚不清楚<sup>[11-14]</sup>。考虑到MGC-803细胞的侵袭转移的恶性后果及加味小陷胸汤靶向MGC-803细胞微环境治疗胃癌的潜力,

本研究基于前期研究成果使用Wnt5a过表达质粒研究Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT参与侵袭和迁移作用,进一步探讨其潜在机制。Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路见图1。

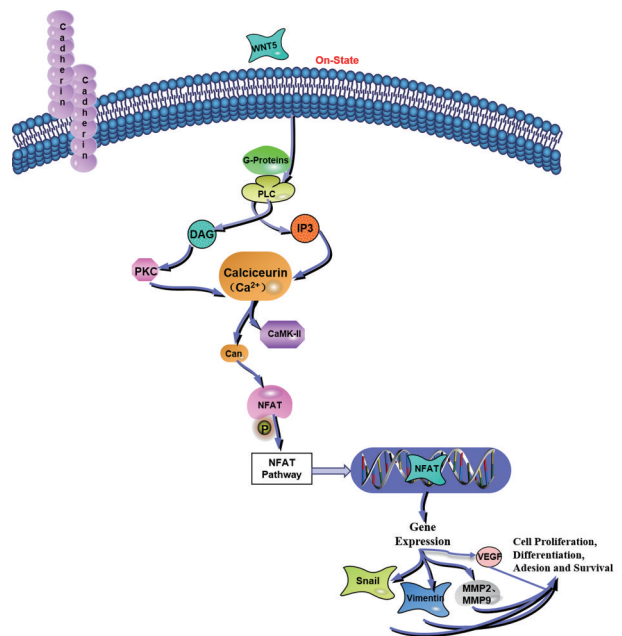


图1 Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路

Fig. 1 Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling pathway

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人胃癌细胞株MGC-803购自上海赛百慷生物技术股份有限公司,货号iCell-h141,传至7~8代用于实验。

**1.2 药物与试剂** 红参购自安徽济人药业有限公司,批号111106,清半夏购自安徽协和成药业饮片有限公司,批号20061109,黄连、三七、瓜蒌、酒大黄、白花蛇舌草、茯苓、薏苡仁、壁虎(批号分别为1801221、161105、2007211、171124、2003101、1803272、2005181、1804132)均购自安徽普仁中药饮片有限公司,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为道地药材,符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。制备方法为水提醇沉法<sup>[15]</sup>:浸泡煎煮,加入乙醇洗涤沉淀,低温旋转,每1g含生药3.58g[超高压液相色谱法(UPLC)测定小檗碱质量分数为5.455 mg·g<sup>-1</sup>]。转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>,美国Invitrogen公司,批号2209775);Fluo-4(上海羿圣有限公司,批号40776ES50);E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、锌指蛋白(Snail)、波形蛋白(Vimentin)、Wnt5a、钙调神经磷酸酶(CaN)、活化T细胞核因子、内参β-肌动蛋白(β-actin)、核蛋白内参增殖细胞核抗原(PCNA)、VEGF、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9一抗抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为06、07、11、12、13、14、15、18、19、25、26、27);磷酸化(p)-NFAT1(北京博奥森有限公司,批号22302);结晶紫(上海碧云天公司,批号0121);Wnt5a质粒由安徽通用生物公司提供。

**1.3 仪器** Tanon5200型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司);PowerPac basic型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);FD50A型高压灭菌器(厦门致微医疗器械厂);HH-6型水浴恒温箱(常州荣华电器有限公司);HNY-2102C型低温培养摇床(天津欧诺有限公司);XM-650T型超声细胞破碎仪(上海净信有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养和转染** 参照文献[14]和说明书

进行培养及转染。转染24h,免疫荧光法检测转染效率,选取效率最优质粒。

**2.2 模型复制** 参考文献[14]使用10 μg·L<sup>-1</sup> TGF-β<sub>1</sub>处理对数生长期MGC-803细胞24h,建立EMT模型。

**2.3 分组及处理** 根据前期实验时间和浓度<sup>[16]</sup>,造模24h后,分为空白组、模型组、加味小陷胸汤组(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>)。转染MGC-803细胞后,分为过表达载体(pEX)-空白(NC)组、pEX-Wnt5a组、pEX-NC+加味小陷胸汤组(40 mg·L<sup>-1</sup>)和pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组(40 mg·L<sup>-1</sup>)。

**2.4 胃癌MGC-803细胞侵袭、迁移能力** 参考前期发表文献[11],按照2.3项下模型复制和2.4项下分组及处理方法处理细胞,随机选取3~5个视野拍照,并记录细胞穿膜数目划痕面积。

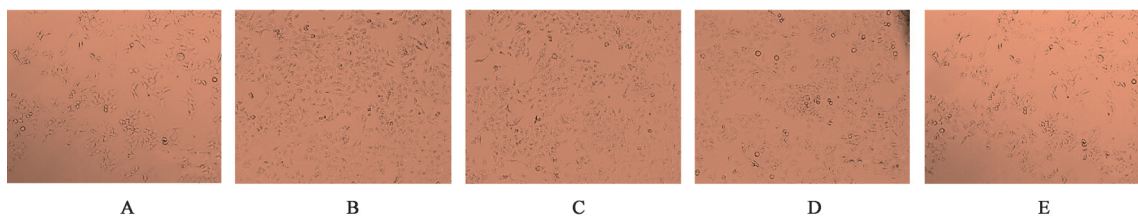
**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测EMT和Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路关键蛋白** 种板、分组给药、提取蛋白。电泳,转膜、封闭、孵育一抗(1:1000),二抗(1:2万)后化学显影。

**2.6 免疫荧光法检测细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度变化** 参考文献[17]装载荧光探针,共培养40min后进行检测。

**2.7 统计学处理** 使用SPSS 24.0软件采用单因素方差分析进行统计分析,进行S-N-K检验。实验数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 加味小陷胸汤对人胃癌MGC-803细胞形态的影响** 与空白组比较,模型组部分细胞形态由椭圆形变为扁梭形,细胞间隙明显增大,呈现明显的EMT细胞形态;与模型组比较,加味小陷胸汤组(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>)扁梭形细胞及细胞间隙明显减少。见图2。



注:A.空白组;B.模型组;C-E.加味小陷胸汤组(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>)(图3同)

图2 加味小陷胸汤对MGC-803细胞形态学的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 2 Effect of modified Xiao Xianxiong Tang on morphology of MGC-803 cells (inverted microscope, ×100)

**3.2 加味小陷胸汤对MGC-803细胞微环境的影响** 与空白组比较,模型组细胞VEGF、MMP-2、

MMP-9丰度显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,加味小陷胸汤组(10、20、40 mg·L<sup>-1</sup>)细胞VEGF、

MMP-2、MMP-9 丰度随给药浓度的升高而逐渐降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表1、图3。

表1 加味小陷胸汤对 MGC-803 细胞微环境的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effects of modified Xiao Xianxiongtang on tumor microenvironment of MGC-803 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	VEGF/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
空白组		0.45±0.05	0.35±1.42	0.59±0.49
模型组		0.84±0.28 <sup>1)</sup>	0.71±0.46 <sup>1)</sup>	1.22±4.56 <sup>1)</sup>
加味小陷胸汤	10	0.79±0.63 <sup>2)</sup>	0.69±0.65 <sup>2)</sup>	1.11±1.23 <sup>2)</sup>
	20	0.62±1.21 <sup>3)</sup>	0.54±0.70 <sup>3)</sup>	0.89±1.16 <sup>3)</sup>
	40	0.55±0.45 <sup>3)</sup>	0.45±0.31 <sup>3)</sup>	0.69±2.31 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与TGF- $\beta_1$ 组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$

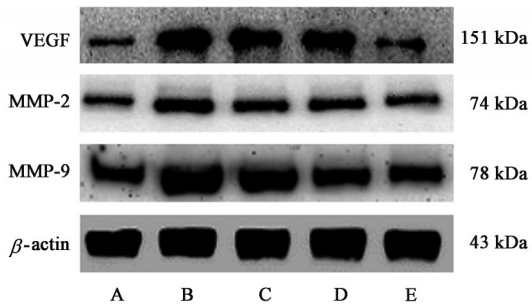
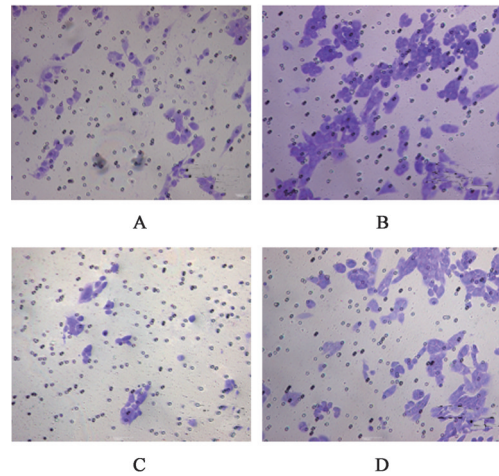


图3 加味小陷胸汤对 MGC-803 细胞微环境相关指标电泳

Fig. 3 Electrophoresis of modified Xiao Xianxiongtang on tumor microenvironment of MGC-803 cells

3.3 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞侵袭迁移能力的影响 与 pEX-NC 组比较, pEX-Wnt5a 组过表达 Wnt5a 后穿过 Matrigel 胶侵袭进入 Transwell 下室数目和愈合率明显增加 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与 pEX-Wnt5a 组比较, pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组 ( $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 细胞穿过 Matrigel 胶侵袭进入 Transwell 下室数目和划痕愈合率明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见图4、图5、表2。

3.4 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞微环境的影响 与 pEX-NC 组比较, pEX-Wnt5a 组过表达 Wnt5a 后 VEGF、MMP-2、MMP-9 丰度明显抬高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 与



注: A. pEX-NC 组; B. pEX-Wnt5a 模型组; C. pEX-NC+加味小陷胸汤 ( $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组; D. pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤 ( $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组 (图5-图9同)

图4 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫,  $\times 100$ )

Fig. 4 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on invasive ability of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a (crystal violet,  $\times 100$ )

pEX-Wnt5a 组比较, pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组 ( $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 细胞 VEGF、MMP-2、MMP-9 丰度明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表3、图6。

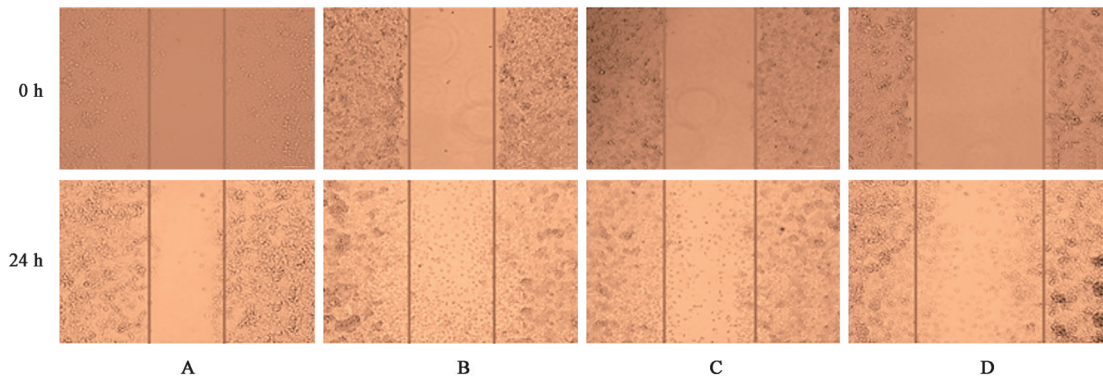


图5 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞迁移能力的影响 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on migration ability of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a (inverted microscope,  $\times 200$ )

表2 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞侵袭和迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on invasive and migration ability of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞侵袭数/个	划痕愈合率/%
pEX-NC 组		56.15±2.60	28.15±3.71
pEX-Wnt5a 组		105.41±4.51 <sup>1)</sup>	62.78±7.80 <sup>2)</sup>
pEX-NC+加味小陷胸汤组	40	46.52±5.26 <sup>2)</sup>	30.24±4.51 <sup>1)</sup>
pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组	40	65.12±5.40 <sup>3)</sup>	45.45±4.15 <sup>4)</sup>

注:与 pEX-NC 组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与 pEX-Wnt5a 组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表 3-表 5 同)

表3 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞微环境的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on tumor microenvironment of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
pEX-NC 组		0.65±0.52	0.57±1.20	0.69±5.21
pEX-Wnt5a 组		1.12±5.42 <sup>1)</sup>	1.35±6.85 <sup>1)</sup>	1.52±3.25 <sup>1)</sup>
pEX-NC+加味小陷胸汤组	40	0.62±1.78 <sup>2)</sup>	0.51±1.20 <sup>1)</sup>	0.63±2.45 <sup>1)</sup>
pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组	40	0.84±5.64 <sup>3)</sup>	0.64±5.26 <sup>4)</sup>	1.02±4.05 <sup>4)</sup>

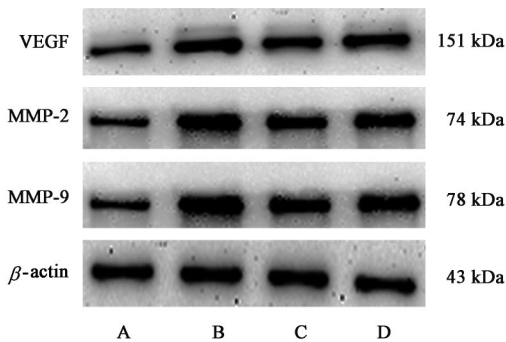


图6 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞微环境相关因子电泳

Fig. 6 Electrophoresis of modified Xiao Xianxiongtang on tumor microenvironment of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a

3.5 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导 MGC-803 细胞 EMT 蛋白表达的影响 与 pEX-NC 组比较, pEX-Wnt5a 组过表达 Wnt5a 后细胞总蛋白 N-cadherin、Snail 和 Vimentin 表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ),

E-cadherin 表达明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 pEX-Wnt5a 组比较, pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 细胞 N-cadherin、Snail 和 Vimentin 表达降低, E-cadherin 表达明显升高 ( $P<0.05$ )。见图 7、表 4。

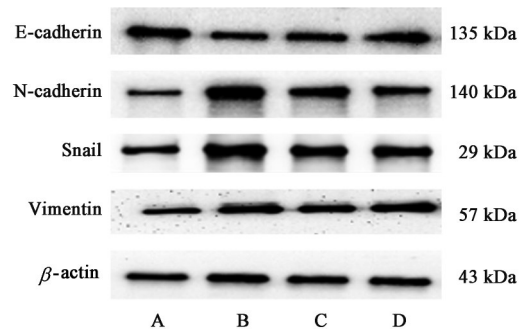


图7 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞 EMT 蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of modified Xiao Xianxiongtang on expression of EMT of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a

表4 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞 EMT 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on expression of EMT of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	E-cadherin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin	Snail/ $\beta$ -actin	Vimentin/ $\beta$ -actin
pEX-NC 组		1.06±0.64	0.57±0.24	1.05±3.54	0.78±5.61
pEX-Wnt5a 组		0.68±1.02 <sup>1)</sup>	1.59±1.41 <sup>1)</sup>	1.53±5.74 <sup>2)</sup>	1.27±3.21 <sup>1)</sup>
pEX-NC+加味小陷胸汤组	40	1.36±2.30 <sup>2)</sup>	0.50±1.30 <sup>2)</sup>	0.97±2.73 <sup>1)</sup>	0.69±4.15 <sup>1)</sup>
pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤组	40	1.01±3.21 <sup>3)</sup>	0.96±3.52 <sup>3)</sup>	1.16±3.27 <sup>3)</sup>	0.89±1.23 <sup>3)</sup>

3.6 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导 MGC-803 细胞 Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号通路的影响 与 pEX-NC 组比较, pEX-Wnt5a 组总蛋白 Wnt5a、CaN、NFAT、p-NFAT1 和 NFAT1 核蛋白表达升高, 胞内 Ca<sup>2+</sup> 通量

增加, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与 pEX-Wnt5a 组比较, pEX-Wnt5a+加味小陷胸汤 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组总蛋白 Wnt5a、CaN、NFAT、p-NFAT1 和 NFAT1 核蛋白表达降低, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度

降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见 表5、图8、图9。

表5 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞 Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	Wnt5a /β-actin	CaN /β-actin	NFAT1 /β-actin	p-NFAT1 /β-actin	核NFAT1 /PCNA	Ca <sup>2+</sup> 荧光强度
pEX-NC组		0.74±5.41	0.61±1.89	0.54±3.21	0.59±2.03	0.45±1.89	24.23±1.65
pEX-Wnt5a组		1.53±0.16 <sup>1)</sup>	1.31±2.94 <sup>1)</sup>	1.55±2.56 <sup>2)</sup>	1.45±5.41 <sup>1)</sup>	1.04±6.54 <sup>2)</sup>	75.45±6.48 <sup>1)</sup>
pEX-NC + 加味小陷胸汤组	40	0.70±2.48 <sup>1)</sup>	0.58±5.62 <sup>2)</sup>	0.50±3.04 <sup>1)</sup>	0.56±6.48 <sup>1)</sup>	0.64±1.23 <sup>1)</sup>	43.78±4.85 <sup>1)</sup>
pEX-Wnt5a + 加味小陷胸汤组	40	1.01±3.45 <sup>3)</sup>	0.75±1.64 <sup>3)</sup>	0.89±4.52 <sup>3)</sup>	0.99±3.93 <sup>3)</sup>	0.88±4.56 <sup>4)</sup>	51.23±4.82 <sup>3)</sup>

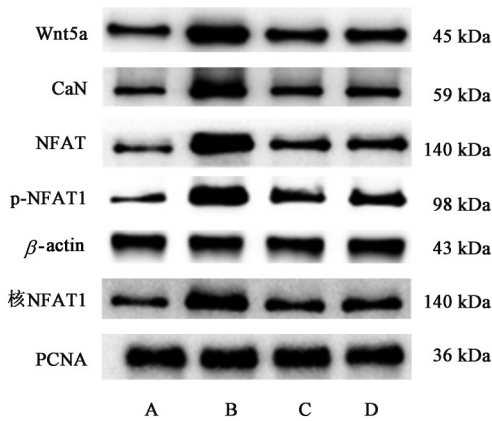


图8 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞 Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号通路电泳

Fig. 8 Electrophoresis of modified Xiao Xianxiongtang on Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a

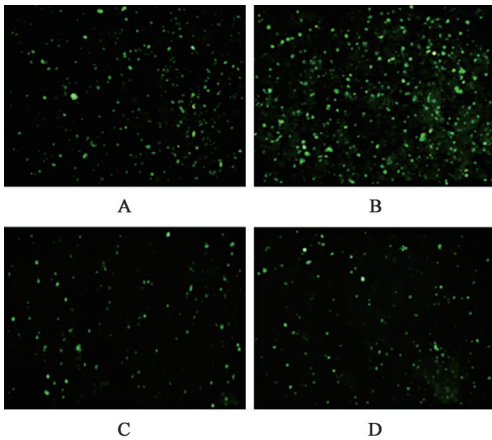


图9 加味小陷胸汤对 pEX-Wnt5a 诱导的 MGC-803 细胞 Ca<sup>2+</sup> 通量的影响 (免疫荧光, ×100)

Fig. 9 Effect of modified Xiao Xianxiongtang on Ca<sup>2+</sup> load of MGC-803 cells induced by pEX-Wnt5a (immunofluorescence, ×100)

#### 4 讨论

侵袭转移是恶性肿瘤的本质生物学特征, 侵袭为细胞跨越基底膜移动到另一部位或组织, 而转移则发生在肿瘤细胞起源以外的部位。细胞侵袭是肿瘤转移的关键, 侵袭转移可以扩散肿瘤细胞, 使治疗复杂化, 并导致 90% 的癌症死亡<sup>[18]</sup>。胃癌通过

级联逐步扩散和浸润、向远处器官侵袭和转移<sup>[19]</sup>。胃癌细胞通过 EMT 发生侵袭转移, TGF-β<sub>1</sub> 在诱导 EMT 中起着至关重要的作用<sup>[15]</sup>。TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 EMT 与胃癌侵袭转移、复发, 和药物耐药性增加有关<sup>[20]</sup>。在细胞水平上, EMT 的特征是细胞黏附性丧失, 细胞移动性和侵袭性增强, 这是由于钙黏蛋白从 E-cadherin 转换为 N-cadherin 所致<sup>[21]</sup>。N-cadherin 可导致上皮细胞到纤维细胞的表型改变、形态改变、细胞骨架重组, ECM 降解和随后的微环境改变, VEGF 刺激肿瘤血管新生<sup>[22-23]</sup>。侵袭和转移是肿瘤转移的关键, 降解 ECM 是肿瘤有效侵袭转移的关键, MMPs 对侵袭过程至关重要, 因此 MMP-2 和 MMP-9 被认为是肿瘤侵袭性和不良预后的指标<sup>[24]</sup>。

Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号通路异常激活与多种疾病密切相关, 在恶性肿瘤细胞增殖、分化、黏附等运动过程中起重要作用<sup>[25]</sup>。Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号通路作为肿瘤细胞的生存因子, 抑制其活性被认为是治疗疾病的重要途径, 涉及多个信号分子之间高度调控的相互作用<sup>[26]</sup>。Wnt5a 入膜, 游离 Ca<sup>2+</sup> 通过重塑肌动蛋白细胞骨架和激活 Ca<sup>2+</sup> 依赖的信号因子, 去磷酸化 NFAT。Wnt5a 通过激活 NFAT 的核易位和信号转导, 调控内皮细胞中 EMT 生物标志物表达<sup>[27]</sup>。反过来, EMT 促进肿瘤与内皮细胞之间的相互作用, 引导侵袭性细胞浸润到淋巴管和血液循环中进行转移<sup>[28]</sup>。在本研究中发现, 加味小陷胸汤能逆转 MGC-803 细胞间质化状态, 并通过调节 EMT 大幅减少易动性。

中医学将“反胃”“心腹痞”“胃脘痛”“噎膈”“积聚”“癥瘕”“伏梁”等皆认为是胃癌范畴, 其发生从中医角度认为是脾胃正气虚弱, 虚邪留滞, 情志不遂, 饮食不当等因素引起脏腑功能失调如肝脾胃功能失司, 水湿不化, 气血阴阳失衡, 正气内虚, 热毒血瘀, 痰浊内蕴, 浊毒闭阻日久而积聚成块, 化生癌毒, 最终形成胃癌<sup>[29-30]</sup>。本方加味小陷胸汤以汉代

张仲景《伤寒论》小陷胸汤为基础方加减化裁而成,组方为黄连、清半夏、瓜蒌、酒大黄、三七、茯苓、薏苡仁、人参、白花蛇舌草和壁虎,其中黄连、半夏、瓜蒌为小陷胸汤原方,黄连气寒味苦,泻火解毒;清半夏气温味辛,宽胸散结;瓜蒌气寒味甘,开结而兼润下;酒大黄合三七破血逐瘀,通里泻热;茯苓、薏苡仁健脾化湿,宁心安神,佐以人参大补元气,扶正固脱,气行湿自化,则痰浊无从以生;白花蛇舌草气寒味苦,消痈散结;壁虎气寒味咸,补肺益肾,搜剔络中混处之邪,攻邪而不伤正。诸药合用,共奏扶正培元,化痰破瘀,通腑解毒之效。

先前研究结果<sup>[11]</sup>已表明,加味小陷胸汤能抑制MGC-803细胞的侵袭和迁移,本实验基于前期基础上进一步探究该方对微环境关键因子VEGF、MMP-2、MMP-9的影响。结果提示,加味小陷胸汤可能通过调控MGC-803细胞微环境抑制活性。此外,前期研究发现加味小陷胸汤可以抑制Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号转导<sup>[11]</sup>,但并未进行深层探索。因此该研究使用Wnt5a质粒转染,激活Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT通路,结果表明,加味小陷胸汤可以减少Wnt5a与胞膜受体结合,使其无法活化下游Ca<sup>2+</sup>依赖的信号因子和去磷酸化NFAT1,沉默MGC-803细胞微环境。

综上所述,促侵袭迁移过程是由多个分子相互作用的网络级联而不是一个孤立的途径控制的。本实验再次证实,肿瘤侵袭迁移过程依赖于复杂的分子调控网络<sup>[31]</sup>。本研究结果明确了加味小陷胸汤调控Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT通路与肿瘤微环境中的共受体之间相互作用,抑制MGC-803细胞侵袭转移能力的部分作用机制,提示加味小陷胸汤可能成为治疗胃癌患者的潜在靶向药物。因此,需要进一步研究更好地了解Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT在肿瘤细胞功能控制中的作用,以便将来更有效地靶向这一途径,并为日益常见的肿瘤患者实现更大的治疗益处。本课题组正在使用转录组学和蛋白组学进一步探讨加味小陷胸汤的有效性和毒理学,促进胃癌个体化和靶向治疗。对于未来的临床应用,Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路和其他多通路的潜在特异性抑制剂(如中药复方和单体)可以作为一个目标来开发,并通过激活这些有效的抗癌调节剂,调节机体免疫系统和微环境,为临床诊治胃癌提供新的治疗途径。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] KIM W, KIDAMBI T, LIN J, et al. Genetic

syndromes associated with gastric cancer [J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2022, 32(1): 147-162.

[2] SANO T. Gastric cancer: Asia and the world [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(1): 1-2.

[3] CHITTAWADAGI B, NAYAK S K, RAMAKRISHNAN P, et al. Laparoscopic D2 gastrectomy in advanced gastric cancer: Postoperative outcomes and long-term survival analysis [J]. *Asian J Endosc Surg*, 2021, 14(4): 707-716.

[4] BERG T J, PIETRAS A. Radiotherapy-induced remodeling of the tumor microenvironment by stromal cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, doi:10.1016/j.semcancer.2022.02.011

[5] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.

[6] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5): 1080-1093.

[7] APPUNNI S, RUBENS M, RAMAMOORTHY V, et al. Lumican, pro-tumorigenic or anti-tumorigenic: A conundrum [J]. *Clinica chimica acta*, 2021, 514(3): 1-7.

[8] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84.

[9] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13(2):395-412.

[10] OWUSU-AKYAW A, KRISHNAMOORTHY K, GOLDSMITH L T, et al. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function [J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(1): 114-133.

[11] 丁芮,葛瑞瑞,王恩宇,等. 加味小陷胸汤水提取物通过Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>/NFAT信号通路抑制TGF-β<sub>1</sub>介导的人胃癌MGC-803细胞上皮-间质转化及侵袭迁移[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(4):37-46.

[12] 范晓芸,彭佳,黄金玲,等. 化痰通瘀解毒方水提取物通过Wnt/β-catenin信号通路抑制人胃癌细胞株MKN-45上皮-间质转化及侵袭迁移[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(6):163-168.

[13] 方海雁,刘蕾,施慧,等. 化痰通瘀解毒方提取物对人胃癌细胞SGC-7901侵袭转移能力的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35(3):67-70.

[14] 谷金繁,王翔,陈建,等. 加味小陷胸汤干预Wnt/β-catenin信号通路抑制人胃癌MGC803细胞上皮间

- 质转化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 42-50.
- [15] TIAN S, PENG P, LI J, et al. SERPINH1 regulates EMT and gastric cancer metastasis via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(4): 3574-3593.
- [16] LIN M H, GUO X H, QIAO L X, et al. Effect of overexpression of apoptosis-stimulating protein 2 of p53 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells induced by transforming growth factor- $\beta_1$  and its mechanism [J]. *Chin J Hepatol*, 2019, 27(11): 890-895.
- [17] PENG S, SONG C, LI H, et al. Circular RNA SNX29 sponges miR-744 to regulate proliferation and differentiation of myoblasts by activating the Wnt5a/ $Ca^{2+}$  signaling pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16(3):481-493.
- [18] SAHA T, SOLOMON J, SAMSON A O, et al. Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(16): 3498.
- [19] LIU Z, SHI Y, LIN Q, et al. Attenuation of PITPNM1 signaling cascade can inhibit breast cancer progression [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(9): 1265.
- [20] YUE B, SONG C, YANG L, et al. METTL3-mediated N6-methyladenosine modification is critical for epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 142.
- [21] LI S, CONG X, GAO H, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 6.
- [22] FIGUEIREDO J, FERREIRA R M, XU H, et al. Integrin  $\beta_1$  orchestrates the abnormal cell-matrix attachment and invasive behaviour of E-cadherin dysfunctional cells [J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25(1): 124-137.
- [23] CHENG Y, SONG S, WU P, et al. Tumor associated macrophages and TAMs-based anti-tumor nanomedicines [J]. *AAAdv Healthc Mater*, 2021, 10(18): e2100590.
- [24] RAJESH Y, BANERJEE A, PAL I, et al. Delineation of crosstalk between HSP27 and MMP-2/MMP-9: A synergistic therapeutic avenue for glioblastoma management [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(7): 1196-1209.
- [25] CHEN Z, TANG C, ZHU Y, et al. TrpC5 regulates differentiation through the  $Ca^{2+}$ /Wnt5a signalling pathway in colorectal cancer [J]. *Clin Sci*, 2017, 131(3): 227-237.
- [26] NISHITA M, SAJI T, MINAMI Y. Non-canonical Wnt signaling and cellular responses [J]. *Clin Calcium*, 2019, 29(3): 291-297.
- [27] GAO M, LIU L, YANG Y, et al. LncRNA HCP5 induces gastric cancer cell proliferation, invasion, and EMT processes through the miR-186-5p/WNT5A axis under hypoxia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.663654
- [28] YANG N, CHEN H, HUANG Y, et al. The role and significance of Wnt5a in regulating epithelial-mesenchymal transition in endometrioid adenocarcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13(5):6527-6535.
- [29] 李星,樊巧玲. 胃癌中医辨证与方药应用的文献研究 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(8):693-696.
- [30] 梁云麒,沈克平,胡兵. 中医胃癌病机与治法研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(3): 513-515.
- [31] KIM Y J, JEON Y, KIM T, et al. Combined treatment with zingerone and its novel derivative synergistically inhibits TGF- $\beta_1$  induced epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(4): 1081-1088.

[责任编辑 张丰丰]