

# 胃肠安诱导胃癌 MKN45 细胞自噬的机制

李朝燕<sup>1</sup>, 陈伟霞<sup>2</sup>, 秦梦梦<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 徐燕<sup>1</sup>, 赵爱光<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 河南省中医院, 郑州 450002)

**[摘要]** **目的:** 观察健脾复方胃肠安对人胃癌 MKN45 细胞自噬的影响, 探讨其抗肿瘤的作用机制。**方法:** 体外培养人胃癌 MKN45 细胞, 采用细胞活力检测法 (CCK-8) 检测不同质量浓度胃肠安 (250, 500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>) 作用体外培养的人胃癌细胞 MKN45 细胞, 共孵育 24, 48, 72 h, 检测细胞增殖活力的改变; 采用吖啶橙 (AO) 染色和单丹磺胺戊二胺 (MDC) 染色观察胃肠安对胃癌 MKN45 细胞自噬小体及自噬囊泡的变化; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3), 酵母 ATG6 同源物 (Beclin1), 泛素结合蛋白-1 (p62), 自噬相关基因 5 (ATG5), 自噬相关基因 7 (ATG7) mRNA 和蛋白的表达。**结果:** CCK-8 实验显示, 与空白组比较, 胃肠安 (500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>) 可明显抑制 MKN45 细胞的增殖能力 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); AO 和 MDC 染色显示, 与空白组比较, 随着胃肠安浓度的增加, 自噬小体和自噬囊泡含量逐渐增加; Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, 与空白组比较, 胃肠安 (1 000 mg·L<sup>-1</sup>) 组细胞中自噬相关蛋白 LC3-II, Beclin1, ATG5, ATG7 mRNA 和蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), p62 表达下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:** 胃肠安可诱导人胃癌 MKN45 细胞自噬, 其机制涉及上调自噬相关基因 Beclin1, ATG5, ATG7 mRNA 和蛋白表达, 下调 p62 mRNA 和蛋白表达, 促进自噬标志蛋白 LC3-I 向 LC3-II 转化。

**[关键词]** 健脾; 胃肠安; 胃癌; 自噬; MKN45 细胞

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0071-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192323

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190817.1311.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-08-19 09:34

## Mechanism of Weichang'an on Autophagy of MKN45 Cells

LI Zhao-yan<sup>1</sup>, CHEN Wei-xia<sup>2</sup>, QIN Meng-meng<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, ZHAO Ai-guang<sup>1\*</sup>

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200032, China;  
2. Henan Province Hospital of TCM, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Weichang'an (WCA) on the autophagy of human gastric cancer MKN45 cells and its possible anti-cancer mechanism. **Method:** MKN45 cells were cultured *in vitro* and incubated with different concentrations (250, 500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>) of WCA for 24, 48, 72 h. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the cell proliferation. AO/EB Dyeing (AO) staining and monodansylcadaverin (MDC) staining were used to observe the changes of the effect of WCA on autophagosome and autophagic vesicles in gastric cancer MKN45 cells at 48 h. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), Beclin1, sequestosome 1 (p62), human autophagy-related gene 5 (ATG5), human autophagy-related gene 7 (ATG7) mRNA and protein expression levels. **Result:** WCA showed a dose-and-time-dependent growth inhibition at the concentration above 1 000 mg·L<sup>-1</sup>. Compared with the blank group, WCA (500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>) significantly inhibited the

**[收稿日期]** 20190421(010)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1700605); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09304-001); 国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015068); 上海中医药大学附属龙华医院龙医学者(育苗计划)项目(LYTD-44)

**[第一作者]** 李朝燕, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治消化道恶性肿瘤研究, E-mail: lizhaoyan2008@hotmail.com

**[通信作者]** \* 赵爱光, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治消化道恶性肿瘤研究, E-mail: aiguangzhao@qq.com

proliferation of MKN45 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). AO staining and MDC staining showed that autophagosomes and autophagic sacs increased with the rise of WCA concentration compared with the blank group. Real-time PCR and Western blot showed that the expressions of autophagy-related proteins LC3-II, Beclin1, ATG5, ATG7, mRNA and protein increased gradually after WCA ( $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) intervention, while p62 expression decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** WCA induces the autophagy of human gastric cancer MKN45 cells in a time-and dose-dependent manner *in vitro*, which may be related to the up-regulation of LC3-II, Beclin1, ATG5 and ATG7 as well as the down-regulation of p62 and LC3-I.

[**Key words**] invigorating spleen; Weichang'an; gastric cancer; autophagy; MKN45 cells

胃癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,我国胃癌发病率和病死率均居世界第 3 位<sup>[1]</sup>。随着诊疗对策的不断更新,世界范围内胃癌的总体发病率和死亡率已较以往明显下降。但在我国,早期胃癌的检出率低,发现时多为进展期胃癌,即使行根治性切除,仍有不等的复发转移风险,80% 以上的胃癌患者最终进入晚期<sup>[2]</sup>,晚期胃癌预后更差,严重危害国民健康。因此有效抑制肿瘤生长是胃癌治疗的重点<sup>[3]</sup>。

细胞自噬是细胞程序性死亡之一,是细胞通过吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,以降解细胞内变性及衰老的蛋白或细胞,从而保持细胞稳态的过程<sup>[4]</sup>。近年来研究显示,自噬是把双刃剑,与细胞坏死、细胞凋亡共同存在<sup>[5]</sup>,在肿瘤的治疗中有重要作用,多项研究证实自噬可抑制细胞增殖,诱导凋亡,表明人工诱导自噬在肿瘤治疗中的潜在效用<sup>[6-7]</sup>。胃肠安是邱佳信教授及其团队以健脾法为主,辨证结合软坚散结、清热解毒等治法形成的治疗胃癌的中药复方,具有多方面抗肿瘤功效,可抑制胃癌细胞增殖<sup>[8-9]</sup>,抑制侵袭和黏附能力<sup>[10-11]</sup>,调节裸小鼠 NK 细胞杀伤活性及红细胞免疫功能等作用<sup>[12]</sup>。但关于胃肠安与肿瘤细胞自噬的关系仍不清楚,因此本研究利用显微镜染色观察自噬小体变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关标志物的表达变化,从细胞自噬角度来探讨健脾复方胃肠安抗胃癌的潜在作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人胃癌 MKN45 细胞株由华东理工大学刘建文课题组惠赠,传至第 10 代。

**1.2 药物** 胃肠安冻干粉制备,胃肠安方药组成:太子参 12 g,炒白术 12 g,茯苓 30 g,姜半夏 9 g,青皮 4.5 g,陈皮 4.5 g,生牡蛎 30 g,夏枯草 12 g,红藤 30 g,菝葜 30 g,白扁豆 30 g 等组成。单味生药由

上海中医药大学附属龙华医院药剂科主任中药师奚燕鉴定为正品。①药物提取,第一煎中药饮片加 10 倍量水,加热至沸,保持微沸 1 h,抽滤,第二煎加 8 倍量水,加热至沸,保持微沸 1 h,抽滤,合并滤液。②药物浓缩,滤液减压浓缩至比重为 1.10 ~ 1.12 ( $60\ ^\circ\text{C}$ )。清膏质量要求,清膏中应澄明、无药渣、焦屑。③喷雾干燥,工艺参数,进风温度  $160\sim 180\ ^\circ\text{C}$ ,出风温度  $95\sim 105\ ^\circ\text{C}$  收粉,适时收粉。④混合,喷干粉粉碎过 80 目筛。过筛所得浸膏粉用 V 型混合器混合 30 min 使均匀。⑤制粒,提取物制颗粒,以上制备工艺由江阴天江药业有限公司提供(批号 1507342),临用时用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,  $0.22\ \mu\text{m}$  微孔滤器过滤除菌。5-氟尿嘧啶注射液(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号 090906,  $0.25\ \text{g}/\text{支}$ )。

**1.3 试剂** RPMI 1640 培养基,微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II,单丹磺酰尸胺(MDC)试剂盒(美国 Sigma 公司,批号分别为 RNBG5440, GR3257983-1, BCBX0277);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 0270106);酵母 ATG6 同源物(Beclin1),自噬相关基因 5(ATG5),自噬相关基因 7(ATG7), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(美国 Bioworld 公司,批号分别为 CC02181, AAD12362, CC66171, AP0060);泛素结合蛋白-1(p62)抗体(华安生物公司,批号 HH0718);山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,山羊抗鼠 HRP 标记二抗(美国 Bioworld 公司,批号均为 BS13278);引物由上海闪晶分子生物科技有限公司合成(表 1);细胞增殖活性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁公司,批号 CK04);吖啶橙试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 E613BA0015];SYBR GREEN qPCR Super Mix,总 RNA 提取试剂盒(日本 Toyobo 公司,批号分别为 836900, 831300)。

**1.4 仪器** MCO-18AIC 型  $\text{CO}_2$  培养箱(日本 Sanyo 公司);Cedex XS 型细胞计数仪(瑞士 Roche 公司);AlphaClean 1300 型超净工作台(中国香港 Heal

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
LC3-II	上游 AGCACCCAGCAAATCC	176
	下游 GTTCACCAGCAGGAAGAAGG	
Beclin1	上游 TGAAAACCAGATGCGTTATGC	122
	下游 CCAGCCTGAAGTTATTGATTGTG	
p62	上游 ATGAGGAAGATCGCCTTGG	154
	下游 CGGATTCTGGCATCTGTAGG	
ATG5	上游 CGAGATGTGTGTTTGGACG	161
	下游 TGTCTCATAACCTTCTGAAAGTGC	
ATG7	上游 CCTGTGGCATCTGCTGACC	176
	下游 AGGGCTCTGCAATCACG	
β-actin	上游 TGACGTGGACATCCGAAAG	205
	下游 CTGGAAGCTGGACAGCGAGG	

Force 公司); SpectraMax M5 型多功能酶标仪(美国 MD 公司); DMI3000B 型荧光倒置显微镜, TCS-SP8 型激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); StepOne Plus 型 Real-time PCR 分析仪 Step One Plus(美国 ABI 公司); Mini-PROTEAN® Tetra 型蛋白垂直电泳系统, Trans-biot® Turbo 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); EC3 410 型化学发光成像系统(美国 UVP 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人胃癌 MKN45 细胞株使用含有 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素的培养基培养于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内, 当细胞融合达 80% ~ 90% 时用 0.5% (含 EDTA) 胰蛋白酶消化传代。2 ~ 3 d 传代 1 次, 传 3 代左右后取对数生长期的细胞进行实验。

**2.2 CCK-8 检测细胞增殖** 取对数生长期的 MKN45 单细胞悬液计数, 调整细胞密度至 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 接种到 96 孔板中, 培养 24 h; 每孔中分别加入不同浓度的胃肠安(250, 500, 1 000, 2 000 mg · L<sup>-1</sup>), 空白组加入正常培养液, 每组设置 5 个复孔, 培养 24, 48, 72 h; 加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续孵育 2 h, 震荡混匀, 在 450 nm 波长下用酶标仪检测其吸光度 A, 并根据 A 计算肿瘤细胞的存活率, 细胞存活率 = A<sub>胃肠安组</sub> / A<sub>空白组</sub> × 100%。

**2.3 AO 染色检测自噬水平** 取传代 MKN45 细胞, 以密度 5 × 10<sup>3</sup> 个/mL 接种于 6 孔板, 于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 设置空白组, 胃肠安低、中、高剂量组和 5-FU 组, 每组设 3 个复孔, 加药培养细胞 48 h, 吸弃上清, 收集各组细胞, 用吖啶橙(1 mg · L<sup>-1</sup>) 室温避光

染色 20 min, 离心后弃去染液, 用磷酸盐缓冲液(PBS) 清洗 3 次后, 荧光显微镜检测荧光信号, FL1 通道检测绿色荧光, FL3 通道检测红色荧光, 以红色荧光的强弱反映细胞内自噬小体的多少。

**2.4 MDC 染色检测自噬囊泡** 细胞培养、分组及给药同 2.3 项, 加药培养 48 h, 弃上清液, PBS 洗 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 10 min, 弃上清液, 每孔加入终浓度为 50 μmol · L<sup>-1</sup> 的 MDC 染液, 于 37 °C 培养箱中温育 30 min, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察 MKN45 细胞中自噬囊泡的变化。

**2.5 Real-time PCR 检测自噬相关分子 mRNA 的表达** 细胞培养、分组及给药同 2.3 项, 加药培养 48 h, 弃上清液, 收集各组细胞, 用 trizol 试剂提取各组的细胞总 RNA, 使用 RNase-free 的 DNase I 去基因组。按照逆转录反应试剂盒的说明, 每个样本取 RNA 1 μL, 作为逆转录模板合成 cDNA, 再以此为模板, 按 10 μL 的反应体系进行 PCR 反应。反应条件为 95 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 40 个循环, 每个样本设 4 个复孔, 重复 3 次。以 β-actin 为内参, 分析扩增曲线, 计算样本 ΔΔC<sub>t</sub>, 以 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示 mRNA 相对表达。

**2.6 Western blot 检测自噬相关分子的蛋白水平** 细胞培养、分组及给药同 2.3 项, 加药培养 48 h, 弃上清液, 收集各组细胞, 提取不同干预组细胞总蛋白, 蛋白浓度测定后, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 80 V 恒压 20 min, 120 V 恒压电泳 40 min, 转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 后加一抗(β-actin, LC3-II, Beclin1, p62, ATG5, ATG7, 1 : 1 000) 4 °C 暗盒过夜, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次。加入相应的二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 采用 ECL 荧光底物进行化学发光、显色, 于凝胶成像仪拍照, 以 Image J 进行灰度分析。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / 同一样本内参灰度值。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐性检验后, 采用单因素方差分析对实验数据进行统计学分析, 均数间多重比较采用最小显著性差异法(LSD) 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 胃肠安对 MKN45 细胞增殖的影响** 胃肠安(250, 500, 1 000, 2 000 mg · L<sup>-1</sup>) 作用 MKN45 细胞 24, 48, 72 h, 与空白组比较, 随着药物浓度和作用时间增加, 胃肠安对 MKN45 细胞增殖抑制作用逐渐增强, 提示胃肠安可抑制 MKN45 细胞的增殖, 采用

SPSS 19.0 计算胃肠安作用人胃癌 MKN45 细胞的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),为  $1\ 014\ mg \cdot L^{-1}$  (48 h),见表 2。为进一步观察胃肠安对胃癌 MKN45 细胞自噬的影响,后续实验采用胃肠安低、中、高剂量组 (250, 500,  $1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ ) 及空白组,5-FU 组 ( $32\ mg \cdot L^{-1}$ ) 5 组<sup>[13]</sup>进行观察,作用时间为 48 h。

表 2 胃肠安对 MKN45 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Effect of Weichang'an (WCA) on proliferation of MKN45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

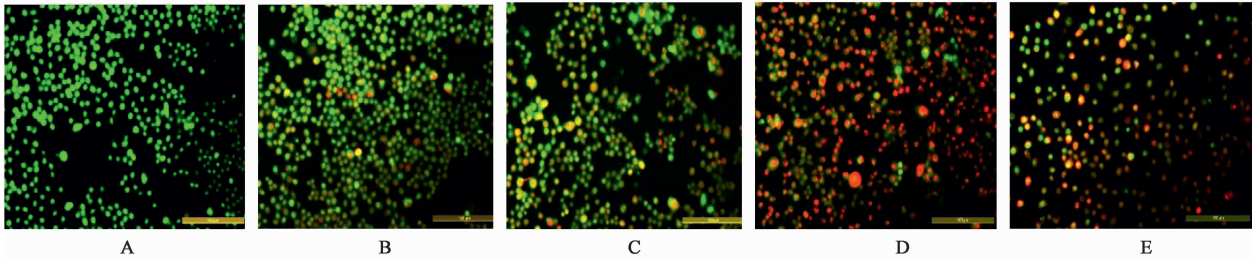
组别	质量浓度 / $mg \cdot L^{-1}$	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
胃肠安	250	$15.07 \pm 3.49$	$15.87 \pm 1.23^{1)}$	$20.5 \pm 5.13^{2)}$
	500	$20.33 \pm 1.99^{1)}$	$40.65 \pm 1.31^{2)}$	$43.77 \pm 0.77^{2)}$
	1 000	$28.06 \pm 1.21^{2)}$	$51.49 \pm 2.67^{2)}$	$66.21 \pm 1.86^{2)}$
	2 000	$36.74 \pm 1.43^{2)}$	$64.21 \pm 1.75^{2)}$	$69.33 \pm 1.17^{2)}$

注:设空白组细胞抑制率为 0;与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

3.2 胃肠安对自噬小体的影响 AO 染色时 AO 可进入细胞核中与 DNA 结合表现为绿色,与自噬溶酶体结合则表现为红色荧光。与空白组比较,胃肠安组出现酸性自噬小体的比例增加,胃肠安高剂量组,5-FU 组细胞自噬小体比例均明显高于空白组,胃肠安低、中、高剂量组自噬小体逐渐增加,表明胃肠安可诱导人胃癌 MKN45 细胞自噬。见图 1。

3.3 胃肠安对自噬囊泡的影响 MDC 染色时 MDC 可与自噬溶酶体结合表现出绿色荧光。激光共聚焦显微镜下观察发现,空白组及 5-FU 组仅有极少量的黄绿色荧光小点-自噬囊泡,胃肠安组细胞中发现大量的荧光小点,说明胃肠安促进自噬囊泡形成数量增加,并呈剂量依赖性方式上调 MKN45 胃癌细胞的自噬。见图 2。

3.4 胃肠安对 MKN45 细胞中自噬相关 mRNA 水平的影响 与空白组比较,胃肠安作用 MKN45 细胞 48 h,胃肠安 ( $500, 1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ ) 组 Beclin-1,



A. 空白组;B~D. 胃肠安 ( $250, 500, 1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ ) 组;E. 5-FU 组(图 2,3 同)

图 1 胃肠安对 MKN45 细胞自噬小体的影响 (AO,  $\times 100$ )

Fig.1 Effect of WCA on autophagosomes of MKN45 cells (AO,  $\times 100$ )

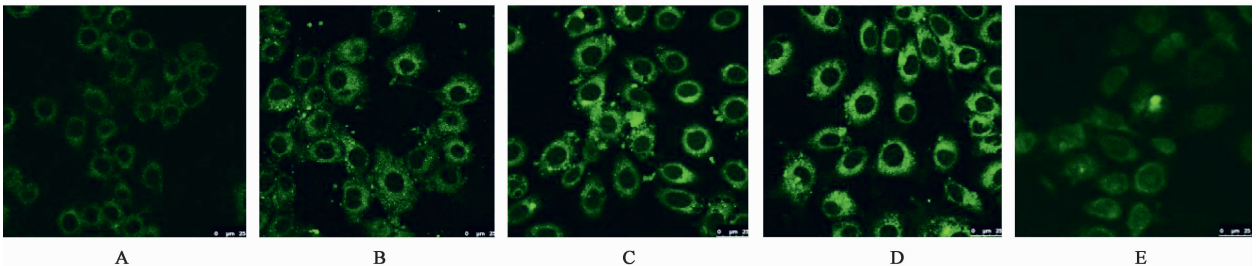


图 2 胃肠安对胃癌 MKN45 细胞自噬囊泡的影响 (MDC,  $\times 630$ )

Fig.2 Effect of WCA on autophagy vesicles of MKN45 cells (MDC,  $\times 630$ )

LC3-II mRNA 表达上调,p62 mRNA 表达下调 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );胃肠安 ( $1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ ) 组 ATG5, ATG7 mRNA 表达上调 ( $P < 0.05$ ),显示胃肠安在 mRNA 水平诱导 MKN45 细胞发生自噬。见表 3。

### 3.5 胃肠安对 MKN45 细胞中自噬相关蛋白的影响

与空白组比较,5-FU 组 LC3-II, ATG5, ATG7 蛋白表达上调,p62 蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ );胃肠安

( $1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ ) 组 Beclin1, LC3-II, ATG5, ATG7 蛋白表达上调,p62 蛋白表达降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),显示胃肠安在蛋白质水平诱导 MKN45 细胞发生自噬。见图 3,表 4。

## 4 讨论

胃癌是一种高度异质性的上皮源性恶性肿瘤,晚期胃癌预后极差。化疗是晚期胃癌的主要治疗

表 3 胃肠安对 MKN45 细胞 LC3-II, Beclin1, p62, ATG5 和 ATG7 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of WCA on LC3-II, Beclin1, p62, ATG5, ATG7 mRNA expressions in MKN45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3 II	Beclin1	p62	ATG5	ATG7
空白	-	1.03 ± 0.03	1.01 ± 0.08	1.06 ± 0.23	1.02 ± 0.15	1.04 ± 0.05
胃肠安	250	0.96 ± 0.11	0.97 ± 0.56	1.05 ± 0.10	1.03 ± 0.02	1.06 ± 0.29
	500	1.39 ± 0.37 <sup>1)</sup>	1.68 ± 0.29 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.46 ± 0.22	1.26 ± 0.08
	1 000	2.20 ± 0.41 <sup>2)</sup>	2.39 ± 0.31 <sup>2)</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>2)</sup>	2.27 ± 0.42 <sup>1)</sup>	1.83 ± 0.19 <sup>1)</sup>
5-FU	32	1.58 ± 0.28 <sup>1)</sup>	0.92 ± 0.20	1.46 ± 0.13 <sup>2)</sup>	1.98 ± 0.40 <sup>1)</sup>	1.54 ± 0.68

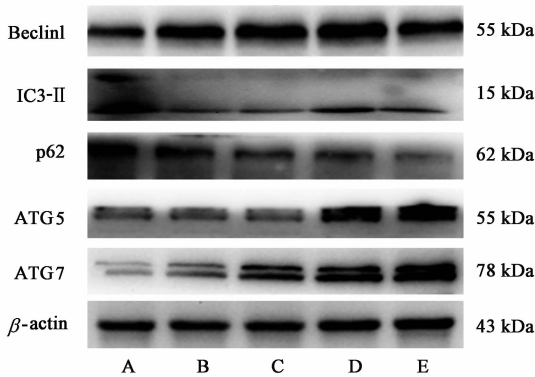


图 3 胃肠安作用 MKN45 细胞中自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of WCA on LC3-II, Beclin1, p62, ATG5, ATG7 protein expressions in MKN45 cells

表 4 胃肠安对 MKN45 细胞 LC3-II, Beclin1, p62, ATG5 和 ATG7 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of WCA on LC3-II, Beclin1, p62, ATG5, ATG7 protein expressions in MKN45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3-II/β-actin	Beclin1/β-actin	p62/β-actin	ATG5/β-actin	ATG7/β-actin
空白	-	0.80 ± 0.14	1.03 ± 0.22	1.88 ± 0.12	1.09 ± 0.12	0.49 ± 0.03
胃肠安	250	0.82 ± 0.07	1.48 ± 0.27	1.64 ± 0.08 <sup>1)</sup>	1.05 ± 0.11	0.92 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	500	1.39 ± 0.09 <sup>1)</sup>	1.64 ± 0.39	1.21 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.11 ± 0.07	1.54 ± 0.11 <sup>2)</sup>
	1 000	1.95 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.91 ± 0.34 <sup>1)</sup>	1.19 ± 0.09 <sup>2)</sup>	1.56 ± 0.16 <sup>1)</sup>	1.72 ± 0.17 <sup>2)</sup>
5-FU	32	1.47 ± 0.11 <sup>2)</sup>	1.37 ± 0.35	1.01 ± 0.05 <sup>2)</sup>	1.73 ± 0.17 <sup>2)</sup>	1.80 ± 0.21 <sup>2)</sup>

主要病机,发挥健脾理气之功效;红藤、菝葜等起佐使作用;牡蛎、夏枯草软坚化痰,姜半夏、青陈皮等和胃理气,起到辅助作用,全方共奏健脾理气、清热解毒、软坚化痰之效,多项多中心同期病例对照研究均证明了健脾复方胃肠安具有明确的临床疗效<sup>[18-19]</sup>。

自噬又称 II 型程序化细胞死亡,以出现自噬体为基本特征<sup>[20]</sup>。自噬极为复杂且高度保守,受一系列自噬相关基因的调控,其中 LC3 是酵母的 ATG8 基因的同源物,是参与自噬调节的关键基因,LC3 有 LC3-I 和 LC3-II 两存在形式,自噬发生时,LC3-I 的 C 端经过泛素样系统(包括 ATG7 和 ATG3)的脂化形成 LC3-II,并参与自噬体的形成<sup>[21]</sup>,II 型 LC3 表达的水平可以反映细胞自噬活性;Beclin1 是自噬开启阶段不可或缺的基因,主要通过和 PI3K 形成复

措施,有效率一般在 40% 左右,中位生存时间仅为 8.6 ~ 13.0 个月<sup>[14]</sup>。近年来,分子靶向药物在胃癌方面运用不断发展,分子靶向药物在晚期胃癌中显示出一定的疗效,但目前仍然十分有限<sup>[15-17]</sup>。

古代并无胃癌的具体称谓,类似胃癌的证候记载多散在于“噎膈”“反胃”“胃脘痛”“伏梁”等范畴内。中医药尤其是中药复方作为一种有效的肿瘤防治手段,其作用机制是多靶点、多途径的<sup>[16]</sup>。胃肠安方是邱佳信教授及其团队以健脾法为主,辨证结合软坚散结、清热解毒等治法形成了治疗胃癌的中药复方,运用于临床实践已 30 余年。方中以太子参、白术、茯苓、白扁豆等共为君药,针对脾胃虚弱的

合体,从而促进自噬起始囊泡的形成<sup>[22]</sup>;p62 是自噬降解的一种选择性底物蛋白,与自噬呈负性相关。发生自噬时 p62 等泛素化蛋白在自噬体膜上与 ATG8/LC3 结合,以靶向自噬体进行降解<sup>[23]</sup>;在自噬缺陷条件下 p62 表达上调,从而造成 DNA 损伤而产生肿瘤;ATG5 和 ATG7 是自噬上游的关键蛋白,可抵抗细胞毒、帮助细胞减轻应激作用<sup>[24]</sup>。自噬是去除细胞内衰老破损的细胞器及过量沉积的蛋白质,维持机体正常的生理活动,广泛存在于生物体内,自噬功能低下将导致衰老的细胞器及蛋白质片段过量沉积,气虚则细胞生理活动减退,导致自噬过度或不足,出现一系列病理变化,自噬发生发展过程与中医认为的“气虚则邪实内生”相吻合<sup>[25]</sup>,虚是胃癌形成的基础,痰、瘀、火、毒日久留而不去则聚成

癌毒,是胃癌形成的关键因素,中医药治疗肿瘤强调整体观和辨证论治,补益脾胃,扶正培元是维持胃癌病态平衡、带瘤生存及延长生命的重要法则,这与肿瘤细胞自噬的机制和意义一致。

本实验首先观察了胃肠安对胃癌细胞株 MKN45 增殖的影响,与前期胃肠安可抑制细胞生长的研究结果一致<sup>[8]</sup>。有报道表明,多种抗肿瘤中药复方及单体在抑制增殖的同时会诱导细胞保护性自噬<sup>[26-27]</sup>,自噬的特征表现是胞质内大量的酸性自噬小体形成,这些酸性自噬小体吞噬了细胞质和(或)细胞器后,经 AO 染色呈现亮红色荧光,MDC 染色发现自噬囊泡增加,初步证实了胃肠安作用 MKN45 细胞后,细胞自噬增加。实验结果显示,胃肠安干预后 LC3-II,Beclin1,ATG5,ATG7 mRNA 和蛋白表达上调,诱导 MKN45 细胞自噬发生从而抑制胃癌细胞增殖。

然而,中药复方的药味多,成分复杂多样,而且作用机制和靶点不一,即使同一中药复方在不同肿瘤类型或细胞株中亦可能有不同的自噬调节作用<sup>[28]</sup>,而且自噬作为细胞对内外刺激的一种应激反应机制,本身与凋亡之间存在着丰富的交叉网,如某些药物诱导的保护性自噬会减轻凋亡的作用,抑制这些自噬有可能会减轻治疗抵抗。比较中药单体、复方在抗肿瘤的作用及机制方面存在着较大争议,以及自噬本身的复杂性及双向性,因此,进行更深入的研究以明确胃肠安对胃癌自噬的影响将是下一步研究的方向。

#### [参考文献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.

[2] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[3] 单磊,汪子书.胃癌转移分子机制研究进展[J].包头医学院学报,2017,33(10):121-124.

[4] Bruckova L, Soukup T, Visek B, et al. Proliferative potential and phenotypic analysis of long-term cultivated human granulosa cells initiated by addition of follicular fluid[J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(10):939-950.

[5] SONG Y, ZHANG P, SUN Y, et al. AMPK activation-dependent autophagy compromises oleoic acid-

induced cytotoxicity in human bladder cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(40):67942-67954.

[6] YANG A, ZHAO Y, WANG Y, et al. Huaier suppresses proliferative and metastatic potential of prostate cancer PC3 cells via downregulation of Lamin B1 and induction of autophagy[J]. Oncol Rep, 2018, 39(6):3055-3063.

[7] LIN S R, FU Y S, Tsai M J, et al. Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7):1412.

[8] 陈伟霞,牛焱飞,邹煜明,等.胃肠安对人胃癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1):91-95.

[9] 何萍,梁云麒,胡兵,等.胃肠安对人胃癌 MGC-803 细胞裸鼠皮下移植瘤生长及细胞凋亡的作用[J].上海中医药大学学报,2018,32(1):65-69.

[10] 陈伟霞,牛焱飞,陈彬,等.健脾中药胃肠安对胃癌 MKN45 细胞侵袭迁移能力的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(9):2121-2124.

[11] 李佳,陈伟霞,李朝燕,等.胃肠安颗粒剂与汤剂抑制人胃癌裸鼠皮下移植瘤生长、淋巴结转移作用比较及对 RUFY3, SNAI1, VEGF 和 EMT 蛋白的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(5):92-97.

[12] 苑伟,陈彬,赵爱光,等.健脾复方对人胃癌细胞株 MKN-45 裸小鼠皮下移植瘤模型非特异性免疫功能的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(9):2766-2770.

[13] 邹煜明,陈伟霞,牛焱飞,等.健脾中药胃肠安与 5-FU 相互作用的中效原理评价[J].中医学报,2019,34(2):333-338.

[14] Slagter A E, Jansen E P M, van Laarhoven H W M, et al. CRITICS-II: a multicentre randomised phase II trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery versus neo-adjuvant chemotherapy and subsequent chemoradiotherapy followed by surgery versus neo-adjuvant chemoradiotherapy followed by surgery in resectable gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):877.

[15] Wilke H, Muro K, Van Cutsem E et al. Ramucicromab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW). a double-blind, randomized phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(11):1224-1235.

[16] LI J, QIN S, XU J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic

- adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13):1448-1454.
- [17] ZHANG L, WU C, ZHANG Y, et al. Comparison of efficacy and toxicity of traditional Chinese medicine (TCM) herbal mixture LQ and conventional chemotherapy on lung cancer metastasis and survival in mouse models[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109814.
- [18] 段连香, 郑坚, 赵爱光, 等. 中医药辨证治疗对老年晚期胃癌预后影响的同期对照研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(8):800-807.
- [19] XU Y, ZHAO A G, LI Z Y, et al. Survival benefit of traditional Chinese herbal medicine (a herbal formula for invigorating spleen) for patients with advanced gastric cancer[J]. *Integr Cancer Ther*, 2013, 12(5):414-422.
- [20] Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, et al. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(5):310-322.
- [21] ZHENG H Y, ZHANG X Y, WANG X F, et al. Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus[J]. *Cancer Bio Med*, 2012, 9(2):105-110.
- [22] Scarlatti F, Maffei R, Beau I, et al. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(8):1318-1329.
- [23] Ishimura R, Tanaka K, Komatsu M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(5):822-828.
- [24] Gomez-Puerto M C, Folkerts H, Wierenga A T, et al. Autophagy proteins ATG5 and ATG7 are essential for the maintenance of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem-progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(6):1651-1663.
- [25] 侯贝贝, 游宇, 刘玉晖, 等. 补阳还五汤对 LPS 诱导巨噬细胞活化与自噬的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(11):16-23.
- [26] CHEN J L, CHANG C J, WANG J Y, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of Jia-Wei-Xiao-Yao-San in human breast cancer MCF-7 cells treated with tamoxifen[J]. *Integr Cancer Ther*, 2014, 13(3):226-239.
- [27] ZOU N, WEI Y, LI F, et al. The inhibitory effects of compound Muniziqi granule against B16 cells and harmine induced autophagy and apoptosis by inhibiting Akt/mTOR pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):517.
- [28] 焦延娜, 韩淑燕. 抗癌中药单体对肿瘤细胞自噬的调控[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(7):206-214.

[责任编辑 张丰丰]