

胃肠安颗粒通过RUFY3抑制人胃癌MKN45细胞侵袭转移

秦梦梦¹, 李佳^{1,2}, 李朝燕¹, 赵爱光^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032;

2. 郑州市中医院, 郑州 450002)

[摘要] 目的:研究健脾复方胃肠安颗粒抑制人胃癌MKN45细胞侵袭转移的分子机制。方法:体外培养人胃癌MKN45细胞,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)检测不同质量浓度的胃肠安颗粒(600,900,1 200,1 500 mg·L⁻¹)与人胃癌MKN45细胞共孵育24,48,72 h,对细胞增殖活力的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测RUN和FYVE结构域蛋3(RUFY3)在人正常胃黏膜细胞和不同胃癌细胞系中的表达;Western blot检测不同质量浓度的胃肠安颗粒干预(600,900,1 200 mg·L⁻¹)对人胃癌MKN45细胞中RUFY3蛋白表达的影响;利用慢病毒转染技术,构建稳定沉默RUFY3的人胃癌细胞MKN45细胞;采用Transwell迁移和侵袭实验,检测胃肠安颗粒和沉默RUFY3干预后人胃癌MKN45细胞迁移和侵袭能力的变化;采用Western blot检测各组细胞中上皮间质转化(EMT)相关蛋白E-钙黏蛋白(E-cadherin),N-钙黏蛋白(N-cadherin),波形蛋白(Vimentin),锌指转录因子(SNAI1,SNAI2)的表达。结果:与正常胃黏膜组比较,RUFY3在人胃癌细胞中表达明显升高($P<0.05$)。与慢病毒阴性组比较,沉默RUFY3组MKN45细胞中RUFY3的蛋白表达显著降低($P<0.01$);胃肠安颗粒可抑制人胃癌MKN45细胞中RUFY3的表达($P<0.05$, $P<0.01$),且呈浓度依赖。与空白组比较,胃肠安组和沉默RUFY3均能抑制人胃癌MKN45细胞的侵袭和转移能力($P<0.01$)。与空白组比较,胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3后,人胃癌MKN45细胞中上皮标志基因E-cadherin蛋白表达显著增加($P<0.01$),间质标志基因N-cadherin,Vimentin蛋白表达降低,但差异无统计学意义;锌指转录因子SNAI1,SNAI2的蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:健脾复方胃肠安颗粒可能通过RUFY3调控EMT抑制人胃癌MKN45细胞的侵袭和转移。

[关键词] 胃肠安颗粒;健脾中药;胃癌;上皮间质转化(EMT);侵袭转移;RUN和FYVE结构域蛋3

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0066-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202464

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201016.1428.005.html>

[网络出版日期] 2020/10/16 15:15

Inhibitory Effect of Weichang'an Granule on Invasion and Metastasis of MKN45 Cells in Human Gastric Cancer by RUFY3

QIN Meng-meng¹, LI Jia^{1,2}, LI Zhao-yan¹, ZHAO Ai-guang^{1*}

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

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of spleen-strengthening traditional Chinese medicine (TCM) Weichang'an granule in inhibiting the invasion and metastasis of human gastric cancer MKN45 cells. **Method:** MKN45 cells were cultured *in vitro* and incubated with different concentrations (600, 900, 1 200, 1 500 mg·L⁻¹) of Weichang'an granule for 24, 48, 72 h. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect its effect on the cell proliferation. Western blot was used to detect the expression of RUN and

[收稿日期] 20200914(021)

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2017YFC1700605);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09304-001);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015068)

[第一作者] 秦梦梦,在读硕士,从事中西医结合防治消化道恶性肿瘤研究,E-mail:qinmm64@163.com

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

FYVE domain containing 3(RUFY3) in normal gastric mucosa cells and different gastric cancer cell lines. The expression of RUFY3 in the gastric cancer cells after Weichang'an granule intervention (600, 900, 1 200 mg·L⁻¹) was detected by Western blot. Lentivirus transfection technique was used to achieve the stable and silenced expression of RUFY3 in gastric cancer MKN45 cells. Transwell assay was used to evaluate the influence of Weichang'an granule and silenced RUFY3 on the metastasis and invasion ability of MKN45. E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Zinc-finger transcription factor (SNAIL1 and SNAIL2) protein expression levels were detected by Western blot. **Result:** RUFY3 expression in human gastric cancer cells was significantly higher than that in normal gastric mucosa. The protein expression of RUFY3 in MKN45 cells of silenced RUFY3 group was significantly lower than that in Lentivirus negative group ($P<0.01$). Weichang'an granule inhibited the expression of RUFY3 in human MKN45 gastric cancer cells ($P<0.05$, $P<0.01$) in a concentration-dependent manner. As compared with the blank group, both Weichang'an granule and silenced RUFY3 inhibited the metastasis and invasion ability of MKN45 ($P<0.01$). After Weichang'an granule and silenced RUFY3 treatment, the protein expression of epithelial marker gene E-cadherin was up-regulated ($P<0.01$), the protein expression of Vimentin and N-cadherin decreased, but with no statistical difference, while SNAIL1 and SNAIL2 were both significantly down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** By targeting RUFY3 to regulate epithelial mesenchymal transformation, the spleen-strengthening TCM compound Weichang'an granule can inhibit the invasion and metastasis of gastric cancer.

[Key words] Weichang'an granule; spleen-strengthening traditional Chinese medicine; gastric cancer; epithelial mesenchymal transformation(EMT); invasion and metastasis; RUN and FYVE domain protein 3

全球癌症发病率和死亡率正在迅速增长,我国胃癌的发病数将会随着人口老龄化的加剧而增加^[1]。我国胃癌发病率位于恶性肿瘤的第2位,死亡率居于第3位^[2]。目前,手术仍然是根治胃癌的最主要方式。但是中国的早期胃癌诊断率低,大多数患者确诊时已为进展期或转移性胃癌。经姑息性治疗,进展期或转移性胃癌的5年生存率为5%~20%,中位总体生存率<1年^[3]。胃癌的侵袭转移是晚期胃癌的重要特点,也是胃癌治疗失败的根本原因。邱佳信教授及其团队创制了以健脾为主,辨证结合软坚化痰、清热解毒等治法的中药复方胃肠安颗粒。多项研究表明,胃肠安颗粒是进展期胃癌根治术后无病生存期(DFS)的独立影响因素,患者接受胃肠安颗粒联合化疗可有效抑制胃癌的复发转移,与单纯化疗相比,显著降低转移率,延长患者的DFS^[4-6]。对于胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移的机制,前期研究表明,胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移与抑制肿瘤新生血管形成、基质金属蛋白酶(MMP)蛋白表达和上皮间质转化(EMT)有关^[7-9]。赵爱光等^[10]利用互补脱氧核糖核酸(cDNA)微阵列技术,筛选出胃肠安颗粒作用于人胃癌SGC-7901细胞的差异表达基因RUN和FYVE结构域蛋白3(RUFY3),有研究表明,RUFY3与肿瘤的侵袭转移和患者预后密切相关^[11]。胃肠安颗粒抑制胃癌的

侵袭转移,其机制可能与抑制RUFY3过表达有关。本研究以人胃癌MKN45细胞系及胃癌的侵袭、转移相关分子机制为研究对象,对潜在靶点RUFY3进行抑制,观察胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3对胃癌侵袭转移的影响,以及对胃癌细胞中EMT相关蛋白E-钙黏蛋白(E-cadherin),N-钙黏蛋白(N-cadherin),波形蛋白(Vimentin),锌指转录因子(SNAIL)1,SNAIL2表达的影响,探讨胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移的分子机制。

1 材料

1.1 细胞 人正常胃黏膜细胞GES-1,人胃癌MKN45细胞株,人胃癌MGC803细胞株均由华东理工大学药学院刘建文课题组惠赠,传至第10代。

1.2 药物 胃肠安组方:太子参12g,炒白术12g,茯苓30g,姜半夏9g,青皮4.5g,陈皮4.5g,生牡蛎30g,夏枯草12g,红藤30g,菝葜30g,白扁豆30g。中药饮片来自上海龙华医院中药房,单味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均为正品。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1h,抽滤,第二煎加8倍量水,加热至沸,保持微沸1h,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℃)。清膏中应澄明、无药渣、焦屑。③喷雾干

燥,工艺参数,进风温度160~180℃,出风温度95~105℃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,提取物添加辅料,制成细颗粒。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 μm微孔过滤器过滤除菌。

1.3 试剂与抗体 RPMI 1640培养基(美国Sigma公司,批号RNBG5440);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号0270106);吉姆萨染液(上海翊圣生物科技有限公司,批号60529);RIPA裂解液(上海威奥生物公司,批号WB0105);Transwell小室,预包被Matrigel(人工基底膜)基质胶的Transwell小室(美国Corning公司,批号3422,354480);RUFY3抗体(美国Gene Tex公司,批号GTX118968);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, SNAIL1抗体(美国Proteintech公司,批号分别为60004, 60335, 66219, 10366, 10375);SNAIL2抗体(美国CST公司,批号9585T);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);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁公司,批号CK04)。

1.4 仪器 BB 5060型CO₂培养箱(美国Thermo公司), Cedex XS型细胞计数仪(瑞士Roche公司), Alpha Clean 1300型超净工作台(香港HealForce公司), Infinite F200型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司), DMI3000B型荧光倒置显微镜(德国Leica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), EC3410型化学发光成像系统(美国UVP公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与传代 人胃癌细胞株MKN45细胞培养在含有10%FBS的1640培养基中,常规培养于37℃含5%CO₂的培养箱中。显微镜下观测,细胞长到70%~80%融合时,用胰蛋白酶消化细胞备用。

2.2 胃肠安颗粒药物浓度筛选 采取细胞增殖实验,取对数生长期的MKN45细胞,按照 5×10^4 个/mL接种到96孔板中,培养24 h。各孔中分别加入胃肠安颗粒(600, 900, 1200, 1500 mg·L⁻¹),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波长下用酶标仪进行检测其吸光度A,并根据A计算肿瘤细胞的抑制率,细胞抑制率=(1-A_{实验组}/A_{溶剂组})×100%。检测细胞抑

制率为50%时,所对应胃肠安颗粒的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测RUFY3蛋白表达 取正常胃黏膜细胞与不同胃癌细胞系细胞(对数生长期),以 3×10^5 个/孔的密度接种6孔板,培养48 h,提取总蛋白,进行凝胶电泳实验,电转膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入GAPDH(1:2万),RUFY3(1:1 000)一抗孵育过夜(4℃),二抗室温孵育1 h,检测RUFY3的蛋白表达水平。

2.4 验证胃肠安颗粒干预对RUFY3蛋白表达的影响 取对数生长期人胃癌MKN45细胞接种于6孔板中,培养24 h,用胃肠安颗粒(600, 1200 mg·L⁻¹)作用细胞48 h后提取细胞总蛋白,Western blot检测胃肠安颗粒干预对RUFY3蛋白表达的影响。

2.5 慢病毒转染抑制胃癌细胞中RUFY3表达 取对数生长期的人胃癌细胞MKN45,以 5×10^4 个/孔接种于6孔板,培养过夜。然后将慢病毒加入培养液中,继续孵育72 h,换上新鲜的培养基,再培养24 h,荧光显微镜下观察转染效率。随后用Western blot验证RUFY3的抑制效率。

2.6 分组与干预 人胃癌MKN45细胞,慢病毒阴性细胞和沉默RUFY3细胞,细胞迁移和侵袭实验用600 mg·L⁻¹胃肠安颗粒干预,Western blot检测侵袭转移相关蛋白表达用1 000 mg·L⁻¹胃肠安颗粒干预,空白组用生理盐水处理。

2.7 细胞迁移和侵袭实验 各组细胞分别用胃肠安颗粒(600 mg·L⁻¹)和生理盐水干预24 h,收集细胞用含无血清培养基制成 1×10^6 个/mL细胞悬液1 mL;将Transwell小室进行水化1 h;Transwell上室中加入细胞悬液100 μL,下室中加入30%FBS培养基600 μL,培养24 h;4%多聚甲醛固定20 min;吉姆萨染液染色20 min,用PBS清洗晾干,用棉签轻轻拭去小室上层的细胞,显微镜下观察迁移的细胞数,共计数5个视野(×200),取平均值,计算侵袭抑制率。侵袭实验是预包被Matrigel基质胶的Transwell小室,处理方法同细胞迁移实验,小室上室加入细胞悬液200 μL,检测方法同迁移实验。

2.8 采用Western blot检测侵袭转移相关蛋白的表达 取对数生长期的各组细胞 5×10^5 个,铺于6 cm培养皿中;培养24 h后各组细胞分别用胃肠安颗粒(1 000 mg·L⁻¹)和生理盐水进行干预;作用48 h,弃去培养基,收集细胞,每皿加入总蛋白裂解液200 μL,提取细胞总蛋白,BCA蛋白定量法检测样品蛋白浓度,加入上样缓冲液后100℃煮10 min,冷

却后, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心 10 min, 离心半径 9.5 cm。配胶, 上样, 10%SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 GAPDH(1:2 万), E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, SNAIL1, SNAIL2(1:1 000)一抗孵育过夜(4 °C), 二抗室温孵育 1 h。用化学发光法显色, 凝胶成像系统分析结果。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 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检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胃肠安颗粒对 MKN45 细胞增殖的影响 胃肠安颗粒(600, 900, 1 200, 1 500 mg·L⁻¹)作用于人胃癌 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, 胃肠安颗粒对 MKN45 细胞增殖抑制作用逐渐增强($P < 0.05$), 提示胃肠安颗粒可抑制 MKN45 细胞增殖, 胃肠安颗粒作用人胃癌 MKN45 细胞半数抑制浓度(IC₅₀)为 1 273 mg·L⁻¹(48 h), 见表 1。为进一步观察胃肠安颗粒对胃癌 MKN45 侵袭转移的影响, 后续实验分别采用不同质量浓度的胃肠安颗粒进行实验, 作用时间 48 h。

表 1 胃肠安对 MKN45 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

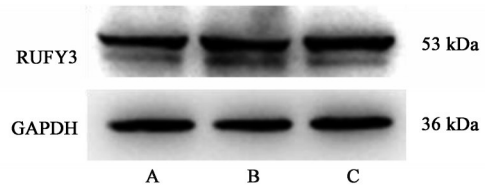
Table 1 Effect of Weichang'an granule on proliferation of MKN45 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	抑制率		
		24 h	48 h	72 h
胃肠安	600	6.61±3.33	12.02±1.45 ²⁾	13.93±4.40 ²⁾
	900	13.78±4.36 ¹⁾	25.42±2.67 ²⁾	28.44±2.49 ²⁾
	1 200	26.16±1.73 ²⁾	46.01±5.24 ²⁾	56.57±2.92 ²⁾
	1 500	36.93±3.97 ²⁾	66.01±1.88 ²⁾	70.84±1.60 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 RUFY3 在人正常胃黏膜细胞和不同胃癌细胞系中的差异表达 与正常胃黏膜细胞 GES-1 组比较, MGC803 和 MKN45 组中 RUFY3 蛋白表达明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。提示 RUFY3 在人胃癌细胞中高表达。见图 1, 表 2。

3.3 胃肠安颗粒干预对人胃癌细胞 MKN45 中 RUFY3 表达的影响 与空白组比较, 胃肠安组(600, 1 200 mg·L⁻¹)RUFY3 的蛋白表达明显减少($P < 0.05, P < 0.01$), 随着胃肠安颗粒浓度的升高,



A. GES-1 细胞; B. MGC803 细胞; C. MKN45 细胞

图 1 RUFY3 在不同胃癌细胞系中的蛋白表达

Fig. 1 Protein expression of RUFY3 in different gastric cancer cell lines

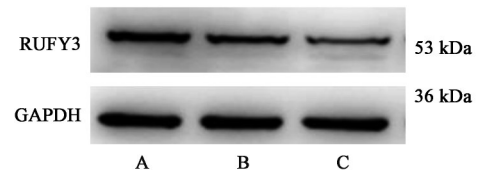
表 2 RUFY3 在不同胃癌细胞系中的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Protein expression of RUFY3 in different gastric cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	RUFY3/GAPDH
GES-1 细胞	1.00±0.07
MGC803 细胞	1.26±0.04 ¹⁾
MKN45 细胞	1.36±0.11 ²⁾

注: 与 GES-1 细胞组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

RUFY3 表达逐渐减弱($P < 0.01$)。提示胃肠安颗粒干预可抑制 RUFY3 蛋白表达, 并呈剂量依赖性。见图 2, 表 3。



A. 空白组; B, C. 胃肠安(600, 1 200 mg·L⁻¹)组

图 2 胃肠安颗粒干预对人胃癌细胞 MKN45 中 RUFY3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Weichang'an granule on protein expression of RUFY3 in MKN45 cells

表 3 胃肠安颗粒干预对人胃癌细胞 MKN45 中 RUFY3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Weichang'an granule on protein expression of RUFY3 in MKN45 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

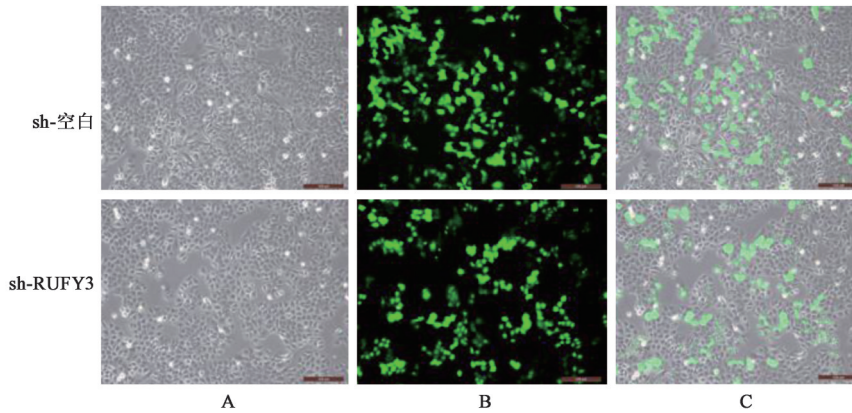
组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	RUFY3/GAPDH
空白		1.00±0.05
胃肠安	600	0.87±0.04 ¹⁾
	1 200	0.65±0.03 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与胃肠安低剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 慢病毒转染抑制人胃癌细胞 MKN45 中 RUFY3 蛋白表达 慢病毒转染后在荧光倒置显微镜下观察到慢病毒阴性细胞组(sh-空白组)和沉默 RUFY3 细胞组(sh-RUFY3 组)中 MKN45 细胞均带有绿色荧光。与 sh-空白组比较, sh-RUFY3 组

MKN45 细胞中 RUFY3 的蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。提示慢病毒沉默 RUFY3 抑制了人胃癌

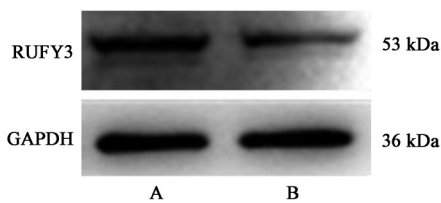
MKN45 细胞中 RUFY3 的蛋白表达。见图 3, 4, 表 4。



A. Bright 组; B. Fluorescence 组; C. Merger 组

图 3 慢病毒转染对人胃癌细胞 KMN45 荧光表达的影响 (荧光倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of lentiviral transfection on RUFY3 in MKN45 cells (fluorescent inverted microscope, $\times 100$)



A. sh-空白组; B. sh-RUFY3 组

图 4 慢病毒转染对人胃癌细胞 KMN45 中 RUFY3 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of lentivirus transfection on protein expression of RUFY3 in MKN45 cells

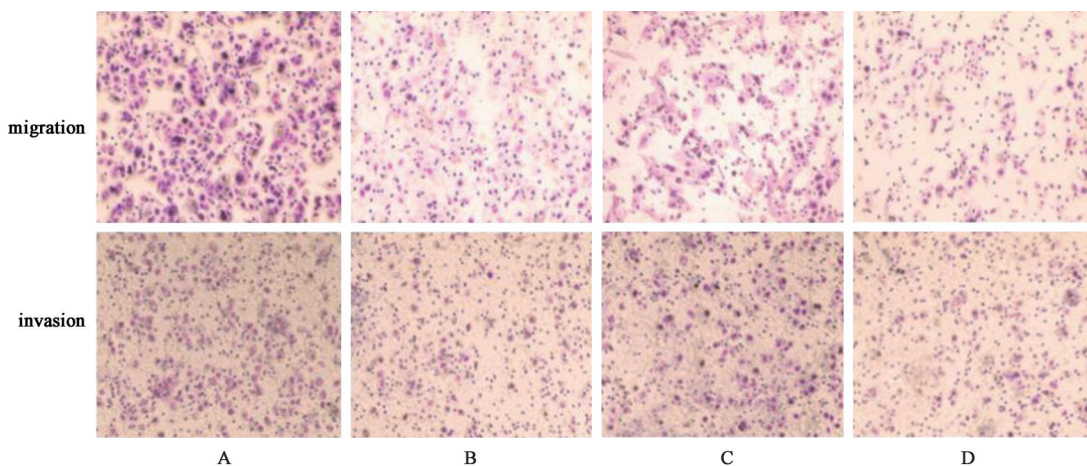
3.5 胃肠安颗粒干预和沉默 RUFY3 对人胃癌 MKN45 细胞迁移和侵袭的影响 与 sh-空白组比较, sh-RUFY3 组和 sh-空白+胃肠安组中细胞穿膜数

显著减少 ($P<0.01$), sh-RUFY3+胃肠安组中细胞穿膜数进一步减少 ($P<0.01$)。提示沉默 RUFY3 与胃肠安颗粒干预均能抑制人胃癌 MKN45 细胞的迁移和侵袭。见图 5, 表 5。

表 4 慢病毒转染对人胃癌细胞 KMN45 中 RUFY3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	RUFY3/GAPDH
sh-空白	1.00 \pm 0.13
sh-RUFY3	0.54 \pm 0.11 ¹⁾

注: 与 sh-空白组比较 ¹⁾ $P<0.01$ (表 6 同)。



A. sh-空白组; B. sh-RUFY3 组; C. sh-空白+胃肠安组; D. sh-RUFY3+胃肠安组(图 6 同)

图 5 胃肠安颗粒干预和沉默 RUFY3 对人胃癌 MKN45 细胞迁移和侵袭的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 5 Effect of Weichang'an granule and silenced RUFY3 on metastasis and invasion of MKN45 cells (inverted microscope, $\times 100$)

表5 胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3对人胃癌MKN45细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Weichang'an granule and silenced RUFY3 on metastasis and invasion of MKN45 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h 迁移细胞	48 h 侵袭细胞
sh-空白		126.00±5.29	69.33±4.16
sh-RUFY3		30.00±5.00 ¹⁾	26.67±1.53 ¹⁾
sh-空白+胃肠安	600	25.67±2.08 ¹⁾	32.22±2.52 ¹⁾
sh-RUFY3+胃肠安	600	14.33±1.53 ^{1,2)}	13.33±1.51 ^{1,2)}

注:与sh-空白组比较¹⁾P<0.01;与sh-空白+胃肠安组比较²⁾P<0.01。

3.6 胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3对人胃癌MKN45细胞中EMT相关蛋白表达的影响 与sh-空白组比较,sh-RUFY3组与sh-空白+胃肠安组中E-cadherin蛋白表达上调(P<0.01),N-cadherin,Vimentin蛋白表达下调,但差异无统计学意义,SNAIL1,SNAIL2蛋白表达显著下调(P<0.01);sh-RUFY3+胃肠安组中E-cadherin蛋白表达进一步显著上调(P<0.01),N-cadherin,

Vimentin,SNAIL1,SNAIL2蛋白表达进一步下调(P<0.01)。研究结果提示,沉默RUFY3与胃肠安颗粒干预均能抑制人胃癌MKN45细胞中EMT进程。见表6,图6。

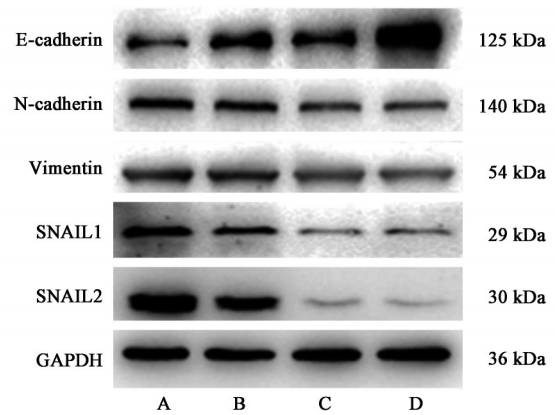


图6 胃肠安颗粒(1 000 mg·L⁻¹)干预和沉默RUFY3对人胃癌MKN45细胞中EMT相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of Weichang'an granule and silenced RUFY3 on protein expression of EMT-related biomarkers in MKN45 cells

表6 胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3对人胃癌MKN45细胞中EMT相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Weichang'an granule and silenced RUFY3 on protein expression of EMT-related biomarkers in MKN45 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	SNAIL1	SNAIL2
sh-空白		1.00±0.11	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.04	1.00±0.05
sh-RUFY3		1.47±0.08 ¹⁾	0.88±0.06	0.94±0.14	0.77±0.02 ¹⁾	0.70±0.03 ¹⁾
sh-空白+胃肠安	1 000	1.42±0.02 ¹⁾	0.71±0.06 ¹⁾	0.82±0.13	0.49±0.04 ¹⁾	0.29±0.04 ¹⁾
sh-RUFY3+胃肠安	1 000	2.02±0.05 ¹⁾	0.64±0.02 ¹⁾	0.71±0.09 ¹⁾	0.32±0.03 ¹⁾	0.23±0.01 ¹⁾

4 讨论

随着癌症发病率和死亡率越来越高,癌症将会成为世界各国死亡的主要原因^[12]。近年来,胃癌的发病率虽有下降趋势,但其发病率和死亡率仍高居不下^[13]。由于早期胃癌无明显的临床症状,部分患者或出现上腹不适、胀满、恶心、呕吐、食欲下降等,大多数患者确诊时已为局部晚期或发生转移,而局部晚期的患者也往往难逃复发转移的结局。虽然姑息性化疗已被证明可以提高生存和生活质量,但转移性胃癌患者的预后仍然较差,且对一线化疗的反应是部分和异质性的^[14]。有效防治胃癌的侵袭和转移,对于延长患者的生存期至关重要。随着分子生物学研究的快速发展,分子靶向治疗及免疫治疗成为胃癌综合治疗的热点,晚期胃癌的治疗效果也有了一定的提高,但远不如人们期待的那样乐观^[15]。

中医学对于胃癌及其转移的认识久远而深刻,

胃癌在中医学上属于“胃脘痛”“噎膈”“痞满”“呃逆”“反胃”“积聚”等范畴,并将肿瘤的转移称为“传舍”。胃癌经过根治术治疗后,体内仍有可能存在微小的肿瘤病灶,中医谓之“伏邪”“余毒”“余邪”,是肿瘤复发转移的根源所在,即“癌毒传舍”^[16]。而正气亏虚、余毒未尽、伏邪流注经络脏腑则是其病因病机^[17]。邱佳信教授长期从事中西医结合防治肿瘤的临床工作,他提出胃癌的主要病机为脾虚,贯穿于胃癌患者的始终,是以脾虚为本,热毒、湿阻、痰凝、气滞、血瘀等证为标的本虚标实之病^[18-19]。邱教授及其团队创制了胃肠安颗粒,以太子参、白术、茯苓、白扁豆等共为君药,针对脾胃虚弱主要病机,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。该方应用于临床多年,疗效显著,临床研究表明,胃癌根治术后患者接受胃肠安

颗粒联合化疗可有效抑制胃癌的复发转移,与单纯化疗相比,可显著降低转移率,延长患者的无病生存期^[4-6]。关于胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移的作用机制,前期研究表明胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移与抑制肿瘤新生血管形成,MMP蛋白表达和EMT有关,但具体机制尚未明确^[7-9]。

胃癌的侵袭转移是一个多步骤、多因素共同参与的复杂过程^[20]。上皮细胞向可运动的间充质细胞的转化过程被称为EMT,EMT是肿瘤细胞侵袭的关键因子,促进癌细胞的迁移、侵袭、抗凋亡和细胞外基质降解^[21]。在具有侵袭性或转移能力的细胞中,参与细胞与其周围环境相连接的几种蛋白质发生了改变。在癌症中细胞与环境相互作用中最广泛观察到的改变包括E-cadherin,它是一种同型细胞与细胞相互作用分子,在上皮细胞中广泛表达。相反,与细胞迁移相关的黏附分子,如N-cadherin,常常被上调^[22]。在EMT的过程中,上皮表型受抑制和间质表型被激活的基因表达的改变由转录因子调控,其中,SNAIL1和SNAIL2可以直接调控与EMT的启动和进展相关的多个基因和多条信号通路^[23]。

课题组利用全基因表达谱芯片筛选出45个以上差异表达基因,经验证,RUFY3在mRNA水平上的表达有明显差异^[10]。RUFY3,又称为RIPX,属RUFY蛋白家族,主要定位于早期核内体。含有该结构域的蛋白通常在细胞极性、细胞膜转运、细胞骨架重构和其他一些信号转导过程中发挥作用^[24]。在肿瘤细胞迁移和侵袭过程中,细胞外周肌动蛋白的突起是侵袭原细胞形成的关键^[25],研究表明,过表达RUFY3可诱导富含丝肌动蛋白(F-actin)的细胞外周突出形成,从而促进了胃癌细胞的侵袭和转移^[11]。课题组研究发现,胃肠安颗粒抑制胃癌侵袭转移,其机制可能与RUFY3、MAPK通路有关^[26]。本实验结果显示,RUFY3在人胃癌细胞中高表达,胃肠安颗粒可抑制人胃癌MKN45细胞中RUFY3的表达,且呈浓度依赖性。

本实验通过对潜在靶点进行抑制,结果显示,沉默RUFY3的表达和胃肠安颗粒干预,均能降低人胃癌MKN45细胞的迁移和侵袭能力。胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3表达后,EMT通路中关键分子的表达受到显著影响,N-cadherin,Vimentin,转录因子SNAIL1,SNAIL2表达明显增加,而E-cadherin表达明显降低,且胃肠安颗粒干预沉默表达的MKN45细胞后,EMT通路中的关键分子的表达进

一步改变。因此,胃肠安颗粒干预和沉默RUFY3表达均能抑制人胃癌MKN45细胞的EMT进程,从而抑制其侵袭转移。由此得出结论,胃肠安颗粒可能通过靶向RUFY3调控EMT抑制胃癌的侵袭转移。但其如何下调RUFY3的表达,还需要进一步研究。中药复方成分复杂,通过新的实验技术和现代药理学研究方法优化中药复方组方结构,明确靶点对应的活性成分,也是课题组下一步的研究方向。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 杨之洵,郑荣寿,张思维,等. 中国胃癌发病趋势及预测[J]. 中国肿瘤,2019,28(5):321-326.
- [2] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149.
- [3] BANG Y J, VAN CUTSEM E, FEYEREISLOVA A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial [J]. Lancet, 2010, 376 (9742):687-697.
- [4] 朱晓虹,赵爱光,李宏伟,等. 基于健脾为基础的辨证治疗方案对ⅢC期胃癌根治术后患者无病生存期的影响[J]. 中国肿瘤,2016,25(7):569-574.
- [5] 杨金坤,郑坚,沈克平,等. 中药胃肠安防治进展期胃癌术后转移的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(8):580-582.
- [6] 孙姗姗,赵爱光,杨金坤,等. 健脾为基础的复方辨证治疗对胃癌根治术后无病生存期的影响[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(6):581-587.
- [7] 潘传芳,梁未未,顾贤,等. 胃肠安方对人胃癌生长、转移及血管生成和MMP2表达的影响[J]. 上海中医药大学学报,2009,23(1):64-66.
- [8] 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.
- [9] 沈克平,王海永,胡兵,等. 胃肠安对人胃癌SGC-7901细胞TGF- β_1 诱导上皮间质转化作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):132-135.
- [10] 赵爱光,赵海磊,杨金坤,等. cDNA微阵列技术检测胃肠安复方对人胃癌细胞基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2004,12(2):67-70.
- [11] WANG G, ZHANG Q, SONG Y, et al. PAK1 regulates RUFY3-mediated gastric cancer cell migration and invasion [J]. Cell Death Dis, 2015, 6 (3):e1682.

- [12] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68:394-424.
- [13] SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(7):1-7.
- [14] BILIC A. Treatment options in patients with metastatic gastric cancer: current status and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (14) : 3905-3915.
- [15] 李卫威,智晓玉,胡毅. 晚期胃癌的治疗进展[J]. 解放军医学院学报,2019,40(8):690-694.
- [16] 徐振晔,郑展. 中医药分阶段防治恶性肿瘤术后复发转移优化方案探讨[J]. 中西医结合学报, 2007, 5 (1):5-10.
- [17] 李佃贵,史纯纯,崔建从,等. 中医“治未病”思想在胃癌防治中的应用[J]. 环球中医药,2009,2(6):422-424.
- [18] 赵爱光,杨金坤,郑坚,等. 脾虚与胃癌发生发展的相关性研究[J]. 上海中医药杂志,1998,32(5):10-12.
- [19] 杨金坤,郑坚. 邱佳信治疗消化道恶性肿瘤的学术经验[J]. 上海中医药杂志,1995,29(2):8-10.
- [20] 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.
- [21] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- [22] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5) : 646-74.
- [23] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biology*, 2014, 15(3):178-196.
- [24] XIE R, WANG J, TANG W, et al. Rufy3 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 390: 30-38.
- [25] YAMAGUCHI H, CONDEELIS J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773 (5) : 642-652.
- [26] 李佳,陈伟霞,李朝燕,等. 胃肠安对人胃癌细胞侵袭转移及RUFY3、MAPKs通路的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(7): 592-596.

[责任编辑 张丰丰]