

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20231105

双参消瘤汤调控 Wnt/ β -catenin 信号通路防治胃癌的分子机制研究

张小路, 万鑫, 彭银杰

(河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002)

【摘要】目的:基于 Wnt/ β -catenin 信号通路研究双参消瘤汤抑制胃癌细胞增殖防治胃癌的分子机制。方法:动物实验采用健康雄性 BALB/c-nu 小鼠依据 MNNG 喂养法建立胃癌小鼠模型,根据干预方法不同分为模型组、双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组、联合组(双参消瘤汤 + miR-338-3p agomir);连续干预 8 周后采用 ELISA 法测定血清胃动素(MTL)、胃蛋白酶原 I(PG I)、胃泌素(GAS)等水平,HE 染色观察肿瘤组织病理,Real-time PCR 法检测肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin mRNA 表达水平,Western blot 检测肿瘤组织 SIRT2、Wnt/ β -catenin 蛋白表达水平。细胞实验根据干预方法不同分为模型组、双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p mimics 组、miR-Con 组;干预后采用 MTT 法检测细胞活性,Real-time PCR 法检测细胞 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin mRNA 表达水平。结果:干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组小鼠血清 MTL、PG I 及 GAS 水平明显升高($P < 0.05$)。HE 染色发现,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组的胃组织病理学较模型组得到不同程度的改善。干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组肿瘤组织 SIRT2、Wnt/ β -catenin 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和 miR-338-3p mimics 组细胞存活率均明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和 miR-338-3p mimics 组胃癌细胞 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。结论:双参消瘤汤抑制胃癌细胞增殖防治胃癌的分子机制与通过 miR-338-3p 靶向调控 SIRT2 促进 Wnt/ β -catenin 信号通路活化有关。

【关键词】胃癌细胞;双参消瘤汤;miR-338-3p;Wnt/ β -catenin 信号通路

【引用格式】

张小路,万鑫,彭银杰.双参消瘤汤调控 Wnt/ β -catenin 信号通路防治胃癌的分子机制研究[J].中医药信息,2023,40(11):32-38.

ZHANG X L, WAN X, PENG Y J. Molecular mechanism of Shuangshen Xiaoliu Decoction on regulating Wnt/ β -catenin pathway in prevention and treatment of gastric cancer[J]. Information on TCM, 2023, 40(11):32-38.

胃癌是我国癌症病死率排名第二的病因,目前临床一般采用手术作为胃癌的治疗方法,且采用中西医

联合的治疗方法,可显著改善患者临床症状,提高生存率。中医药防治癌症虽然取得了一定的成效,但其具

基金项目:河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2021JDZX2046)

第一作者简介:张小路(1976-),男,副主任医师,主要研究方向:中医药防治肿瘤疾病。

体的作用机制尚不明晰,在一定程度上限制了其推广应用。课题组既往研究发现,通过RNA干扰能够调控肝癌细胞和胰腺癌细胞的增殖和侵袭能力^[1-2],同时研究发现,中药对癌细胞有明显的抑制作用^[3],但具体作用机制不确定。最新研究发现,miRNA-338-3p能够靶向SIRT2调控Wnt/ β -catenin信号通路,影响胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移^[4]。本研究旨在观察双参消瘤汤抑制胃癌细胞增殖防治胃癌的分子机制是否与通过miRNA-338-3p靶向SIRT2调控Wnt/ β -catenin信号通路有关,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

SPF级健康雄性BALB/c-nu小鼠75只,体质量(20±2)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010;SPF级健康雄性SD大鼠60只,体质量(200±20)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004。饲养于河南中医药大学动物实验中心,(22±1)°C恒温、60%~75%恒湿、12h循环照明,自由摄食、饮水。经河南中医药大学第二附属医院动物实验伦理委员会审核通过,伦理审核批准标号:2021059。

1.2 药物

双参消瘤汤组方:黄芪30g,人参15g,白术15g,牛膝12g,杜仲12g,苦参15g,草河车15g,白花蛇舌草30g和半枝莲30g。方中所有中药饮片均来源于河南中医药大学第二附属医院中药房。按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算成高、低等剂量,医院煎药房按照要求煎煮,具体剂量为高剂量3.24g/mL、低剂量0.81g/mL。

1.3 主要仪器和试剂

TGL-16M型台式高速冷冻离心机(济南欧莱博科学仪器有限公司);Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社);NanoDrop 2000分光光度计(美国Thermo公司);CX31-12C04光学显微镜(奥林巴斯北京有限公司);Iq5荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);JEM-1011透射电子显微镜(日本日本电子株式会社)。

荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司,批号:A8203-6);蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0029、P0027);miR-338-3p抗体(武汉华美生物工程有限公司,批号:CSB-EP335106SXV);miR-338-3p agomir(广州锐博生物技术有限公司,批号:miR10000828-1-5);SIRT2抗体(英国Abcam公司,

批号:ab45389);Wnt抗体(美国GENETEX公司,批号:GTX128101); β -catenin抗体(美国GENETEX公司,批号:GTX128206);脂质体2000转染试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:1734976);TNF- α (上海酶研生物科技有限公司,批号:EK-M29261);AB浓缩型试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:DA1010);原位末端标记法(Tunel)试剂盒(瑞士Roche公司,批号:11684817910);RNA逆转录试剂盒(莫纳生物科技有限公司,批号:MR05101M);TUG1干扰慢病毒、TUG1抑制剂(上海吉凯基因化学技术有限公司,批号:GV248、00015395);MTL、PG I及GAS酶联免疫检测试剂盒(均购自江苏酶免实业有限公司,批号:220415-0173R1、220415-71684R1、220415-0182R1);MTT溶液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0008)。

1.4 动物实验

1.4.1 造模与给药

BALB/c-nu小鼠适应饲养7d后造模,于小鼠右前腋下接种0.1mL MFC细胞株悬液,细胞总数为 1×10^7 个,接种第7天,随机挑选2只小鼠,剥取接种部位结节组织,经病理检测后证明结节组织具有胃癌细胞的特异性,为造模成功^[5],随机分为5组,每组15只;每日干预1次,连续干预8周后取材进行检测。

模型组:采用普通培养基,不给予任何血清干预。双参消瘤汤高剂量组:给予3.24g/mL双参消瘤汤,连续8周。双参消瘤汤低剂量组:给予0.81g/mL双参消瘤汤,连续8周。miR-338-3p agomir组:尾静脉注射miR-338-3p激动剂,连续8周。联合组(双参消瘤汤+miR-338-3p agomir):给予3.24g/mL双参消瘤汤和尾静脉注射miR-338-3p激动剂,连续8周。

1.4.2 ELISA法测定血清MTL、PG I及GAS水平

小鼠麻醉后取腹主动脉血分离上清液,采用ELISA法按试剂盒说明书检测血清MTL、PG I及GAS水平。

1.4.3 HE染色观察肿瘤组织病理

剥离瘤体,除去包膜,取小块组织,4%甲醛固定,脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,修整蜡块,用于HE染色。

1.4.4 Real-time PCR法检测肿瘤组织miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA表达水平

收集各组小鼠肿瘤组织,称取质量后加入适量的Trizol,提取总RNA,利用Nanodrop 2000测定总RNA浓度,将总RNA反转成cDNA模板,目的基因与内参GADPH的引物混匀后,上机检测;反应条件:95°C

30 s, 1个循环; 94 °C 5 s, 58 °C退火 30 s, 35个循环, 72 °C 延伸 5 min, PCR 仪检测, 按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的

mRNA 表达水平。PCR 实验所用引物由均广州锐博生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物	长度/bp
miR-338-3p	5'-GCGTCTGTCTTTACTTCGTCG-3'	121
SIRT2	5'-GCGGGTGCCTGATTGGATTG-3'	98
Wnt	5'-AGGTGCTAACACAGCAGCTTA-3'	96
β -catenin	5'-GCCTTGTTTCAGAGCGGAGAA-3'	86
GAPDH	5'-AACAGCGTCGGCTCAATATC-3'	86

1.4.5 Western blot 检测肿瘤组织 SIRT2、Wnt、 β -catenin 的蛋白表达水平

干预后收集各组肿瘤组织磨碎, 提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量法, 电泳, 分离, 转膜, 脱脂奶粉封闭, 一抗(SIRT2、Wnt、 β -catenin)孵育, 4 °C过夜, 洗涤后标记二抗杂交。采用化学发光试剂盒检测, 检测印迹条带净吸光度值, 以 β -actin 内参照, 结果以样本灰度值/内参照灰度值表示。

1.5 细胞实验

1.5.1 含药血清和空白血清的制备

取 60 只健康雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量(300 ± 20)g, 其中 40 只给予双参消瘤汤 3.24、0.81 g/mL 灌胃制备药物血清, 2 次/d, 连续灌胃 5 d。其余 20 只给予等量的生理盐水灌胃制备不含药血清; 末次灌胃后 1 h, 腹腔注射 4% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉, 腹主动脉取血, 37 °C 静置 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 56 °C 灭活, 分装, -80 °C 保存备用^[6]。

1.5.2 肿瘤细胞模型造模和分组

①模型组: 采用普通培养基, 不给予任何血清干预。②双参消瘤汤高剂量组: 采用高剂量双参消瘤汤含药血清干预细胞, 48 h 后进行检测。③双参消瘤汤低剂量组: 采用低剂量双参消瘤汤含药血清干预细胞, 48 h 后进行检测。④miR-338-3p mimics 组: 采用 miR-338-3p mimics 过表达载体转染 HGC-27 细胞中, 根据 Lipofectamine TM 2000 转染试剂说明进行转染, 48 h 后进行检测。⑤miR-Con 组: 采用 miR-338-3p mimics 空载体转染细胞, 48 h 后进行检测。

1.5.3 观察指标

1.5.3.1 MTT 法检测细胞活性

收集干预后各实验组细胞, 同时设立正常对照组及空白对照组, 正常对照组细胞加正常细胞培养基, 空白对照组只加培养基, 不加细胞; 调整密度为 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h 后加入 MTT 20 μ L (5 mg/mL), 培养箱孵育 4 h 后取出, 弃上

清, 加入二甲苯亚砷 150 mL, 摇床震荡 10 min 后, 混匀, 酶标仪 490 nm 测定吸光度(absorbance, A)值^[6]。

细胞存活率(%) = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (正常对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) × 100%

1.5.3.2 Real-time PCR 法检测细胞 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA 表达水平

干预后收集各组细胞, 提取总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 测定总 RNA 浓度, 将总 RNA 反转成 cDNA 模板, 其余方法同动物实验。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 若方差齐多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 若不符合正态分布或方差不齐, 则采用非参数检验。以 0.05 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 MTL、PG I 及 GAS 水平

干预后, 与模型组相比, 双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组小鼠血清 MTL、PG I 及 GAS 水平明显升高($P < 0.05$)。与联合组相比, 双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组血清 MTL、PG I 及 GAS 水平明显降低($P < 0.05$)。双参消瘤汤高剂量组和双参消瘤汤低剂量组血清 MTL、PG I 及 GAS 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组血清 MTL、PG I 及 GAS 水平比较比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	MTL/ (pg/mL)	PG I / (ng/mL)	GAS/ (pg/mL)
模型组	106.35 ± 22.42	3.09 ± 0.51	65.91 ± 9.01
双参消瘤汤高剂量组	119.44 ± 17.21 ^{*△}	4.99 ± 0.63 ^{*△}	80.91 ± 10.35 ^{*△}
双参消瘤汤低剂量组	118.46 ± 15.16 ^{*△}	4.95 ± 0.51 ^{*△}	81.04 ± 11.24 ^{*△}
miR-338-3p agomir 组	136.35 ± 19.43 ^{*△}	5.85 ± 0.63 ^{*△}	90.77 ± 11.04 ^{*△}
联合组	161.92 ± 19.83 [*]	7.31 ± 1.21 [*]	109.51 ± 13.95 [*]

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与联合组比较, [△] $P < 0.05$ 。

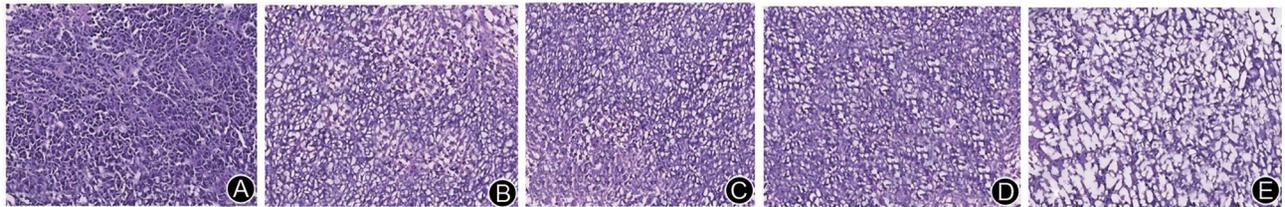
2.2 各组小鼠肿瘤组织病理观察

模型组可见小鼠胃组织上皮细胞萎缩、变薄、结构紊乱,腺体数量减少、细胞异型性改变,炎症细胞浸润,形成淋巴滤泡,细胞核染色加深,核质比增大;与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir组和联合组的胃组织病理学得到不同程度的改善,尤其以联合组改善最明显。结果见图1。

2.3 各组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、β-catenin mRNA 表达水平

干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双

参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir组和联合组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、β-catenin mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。与联合组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、β-catenin mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$)。双参消瘤汤高剂量组和双参消瘤汤低剂量组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、β-catenin 的 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表3。



注:A为模型组;B为双参消瘤汤高剂量组;C为双参消瘤汤低剂量组;D为miR-338-3p agomir组;E为联合组。

图1 各组小鼠肿瘤组织病理观察(HE, ×400)

表3 各组肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt、β-catenin mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	miR-338-3p	SIRT2	Wnt	β-catenin
模型组	1.00 ± 0.13	1.03 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.21
双参消瘤汤高剂量组	2.18 ± 0.26 [▲]	2.21 ± 0.36 [▲]	2.11 ± 0.25 [▲]	2.02 ± 0.33 [▲]
双参消瘤汤低剂量组	2.19 ± 0.35 [▲]	2.20 ± 0.28 [▲]	2.13 ± 0.19 [▲]	2.03 ± 0.34 [▲]
miR-338-3p agomir组	2.49 ± 0.44 [▲]	2.47 ± 0.31 [▲]	2.50 ± 0.26 [▲]	2.58 ± 0.29 [▲]
联合组	2.91 ± 0.37 [*]	2.98 ± 0.21 [*]	2.91 ± 0.19 [*]	3.01 ± 0.39 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与联合组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

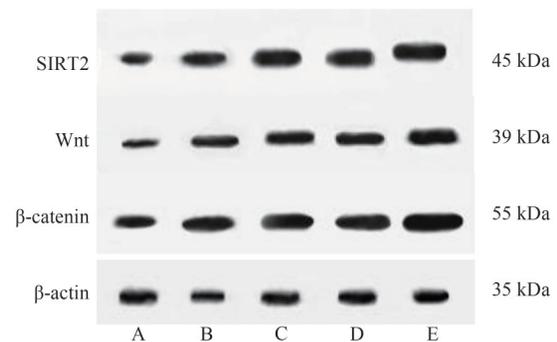
2.4 各组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 蛋白表达水平

干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir组和联合组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。与联合组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 蛋白表达水平明显较低($P < 0.05$)。双参消瘤汤高剂量组和双参消瘤汤低剂量组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表4、图2。

表4 各组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	SIRT2	Wnt	β-catenin
模型组	1.07 ± 0.13	1.03 ± 0.14	1.04 ± 0.26
双参消瘤汤高剂量组	2.05 ± 0.31 [▲]	1.92 ± 0.21 [▲]	1.83 ± 0.31 [▲]
双参消瘤汤低剂量组	2.03 ± 0.25 [▲]	1.94 ± 0.19 [▲]	1.85 ± 0.24 [▲]
miR-338-3p agomir组	2.10 ± 0.22 [▲]	2.40 ± 0.26 [▲]	1.91 ± 0.29 [▲]
联合组	2.88 ± 0.31 [*]	2.93 ± 0.11 [*]	2.61 ± 0.39 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与联合组比较,[▲] $P < 0.05$ 。



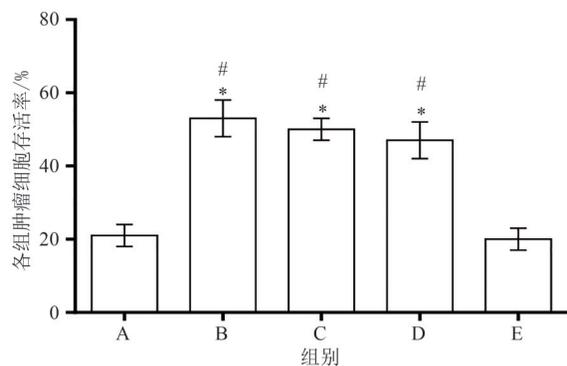
注:A为模型组;B为双参消瘤汤高剂量组;C为双参消瘤汤低剂量组;D为miR-338-3p agomir组;E为联合组。

图2 各组肿瘤组织 SIRT2、Wnt、β-catenin 的蛋白表达

2.5 各组细胞存活率

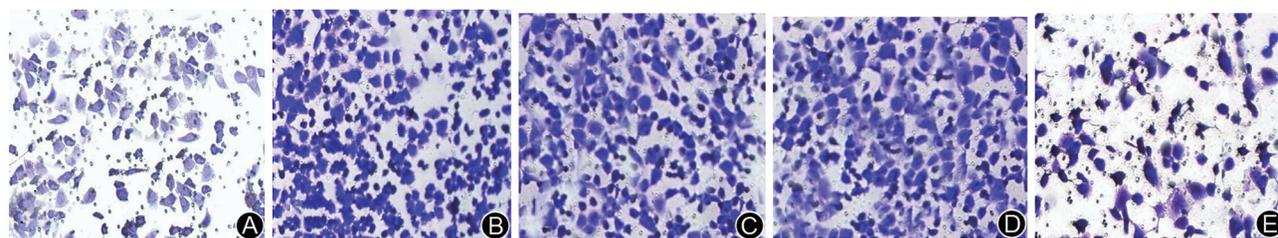
MTT检测结果显示:干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和 miR-338-3p mimics 组细胞存活率均明显较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 miR-Con 组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和 miR-338-3p mimics 组细胞存活率均明显较高($P < 0.05$)。双参消瘤汤高剂量组和双参消瘤汤低剂量组细胞存活率比较差异无统计学

意义($P > 0.05$)。结果见图3和图4。



注: A为模型组; B为双参消瘤汤高剂量组; C为双参消瘤汤低剂量组; D为miR-338-3p mimics组; E为miR-Con组。与模型组比较, $^*P < 0.05$; 与miR-Con组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图3 各组细胞存活率比较



注: A为模型组; B为双参消瘤汤高剂量组; C为双参消瘤汤低剂量组; D为miR-338-3p mimics组; E为miR-Con组。

图4 各组胃癌细胞形态学观察镜下观察($\times 400$)

表5 各组胃癌细胞miR-338-3p, SIRT2, Wnt, β -catenin的mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	miR-338-3p	SIRT2	Wnt	β -catenin
模型组	1.00 ± 0.12	1.03 ± 0.14	1.02 ± 0.11	1.01 ± 0.16
双参消瘤汤高剂量组	2.19 ± 0.21 ^{*#}	2.20 ± 0.32 [#]	2.12 ± 0.23 ^{*#}	2.03 ± 0.31 ^{*#}
双参消瘤汤低剂量组	2.17 ± 0.31 ^{*#}	2.23 ± 0.21 ^{*#}	2.11 ± 0.12 ^{*#}	2.04 ± 0.32 ^{*#}
miR-338-3p mimics组	2.48 ± 0.38 ^{*#}	2.41 ± 0.27 ^{*#}	2.53 ± 0.27 ^{*#}	2.53 ± 0.27 ^{*#}
miR-Con组	1.02 ± 0.12	1.01 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.13

注: 与模型组比较, $^*P < 0.05$; 与miR-Con组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

3 讨论

microRNAs 作为一类小的非蛋白质编码RNA, 可与靶mRNA的3'-UTR结合, 对基因表达进行调控, 部分miRNA在胃癌中具有显著的调节功能。研究发现, miR-338-3p的表达因肿瘤类型而不同, 在肝细胞癌、乳腺癌、肺癌及胃癌中, miR-338-3p表达水平较低, 而在宫颈癌、甲状腺癌等肿瘤中, miR-338-3p表达水平升高。已有研究发现了大量的与胃癌相关的miRNA, 但其对胃癌的具体调控机制仍不明晰^[7-9]。有研究观察了干扰miR-338-3p对胃癌进展和胃癌细胞生物活性的影响, 通过转染胃癌细胞, 构建miR-338-3p靶基因的过表达, 检测Wnt/ β -catenin信号通路及其相关蛋白的表达, 结果发现上调SIRT2可一定程度地逆转因miR-338-3p下调引起的胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, miR-338-3p/SIRT2对胃癌细胞

2.6 各组胃癌细胞miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA表达水平

干预后, 与模型组相比, 双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和miR-338-3p mimics组胃癌细胞miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$)。与miR-Con组相比, 双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p mimics组胃癌细胞miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$)。双参消瘤汤高剂量组和双参消瘤汤低剂量组胃癌细胞miR-338-3p、SIRT2、Wnt、 β -catenin mRNA表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表5。

生物活性调控作用与调控其下游信号通路Wnt/ β -catenin有关, 可见miRNA-338-3p能够靶向SIRT2调控Wnt/ β -catenin信号通路, 影响胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移^[4]。

胃癌属“癥瘕”“伏梁”“胃积”等范畴, 《金匱要略》中记载:“脾伤则不磨, 朝食暮吐, 暮食朝吐, 宿谷不化, 名曰胃反。”胃癌的病因主要有先天禀赋不足、饮食不节、外邪六淫入侵, 七情内伤等, 从而导致正气亏损, 脏腑阴阳失调, 热毒、痰凝和气滞等相互搏结, 形成胃癌。基于古人经验, 现代诸多医家逐渐形成了“扶正培本”“扶正祛邪”“扶正祛瘀”“扶正抑瘤”等治疗胃癌的学术体系^[9-12]。壮雨雯等^[13]认为“正气亏损”和“瘀毒内积”二者相互辨证, 是晚期胃癌的基本病机; 赵昌林^[14]根据毒邪理论提出了解毒抗癌是治疗恶性肿瘤的主要治疗方法, 把解毒抗癌细分为清热解毒、健脾解毒和活血解毒

三类。本课题组结合胃癌发生的病因病机以及既往临床治疗经验,提出了治疗胃癌的根本大法——扶正解毒法,拟定方剂双参消瘤汤。双参消瘤汤中人参大补元气,为君药,白术和黄芪补中益气、健脾祛湿、扶正培本;牛膝、杜仲补肝益肾、填精益髓为佐药;苦参、草河车、半枝莲、白花蛇舌草等清热祛湿、解毒抗癌。全方共奏益气扶正、解毒祛邪的作用。

本研究聚焦胃癌的防治机制这一临床难点和中医药优势点,联系 miR-338-3p 和 Wnt/ β -catenin 信号通路这两个关键病理机制点,结合最新研究报道和既往研究结果,提出了一个全新的中药复方双参消瘤汤抑制胃癌细胞增殖防治胃癌的可能机制。研究发现,干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组小鼠血清 MTL、PG I 及 GAS 水平明显升高,且联合组改善效果优于 miR-338-3p agomir 组。MTL、PG I 及 GAS 水平是反映胃组织细胞正常功能的指标,胃黏膜组织细胞病变时,MTL、PG I 及 GAS 水平显著降低,胃组织功能明显降低^[15-16]。HE 染色发现,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组的胃组织病理学较模型组得到不同程度的改善。研究结果提示双参消瘤汤能够改善胃癌小鼠胃功能指标,促进胃组织细胞功能的恢复,通过干扰 miR-338-3p 具有同样的效果。

干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组、miR-338-3p agomir 组和联合组胃癌小鼠胃组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin 表达水平明显升高。表明双参消瘤汤能够调控肿瘤组织 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin 表达水平,通过干扰 miR-338-3p 具有同样的效果。通过细胞实验验证发现,干预后,与模型组相比,双参消瘤汤高剂量组、双参消瘤汤低剂量组和 miR-338-3p mimics 组细胞存活率均明显较高,且胃癌细胞 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin 的表达水平明显升高。进一步验证了双参消瘤汤对 miR-338-3p、SIRT2、Wnt/ β -catenin 表达的调控作用。综上所述,双参消瘤汤能够显著恢复胃癌小鼠胃组织功能,调节胃癌细胞凋亡相关蛋白水平,改善胃组织病理改变,这可能与通过 miR-338-3p 靶向调控 SIRT2 促进 Wnt/

β -catenin 信号通路活化有关。

【参考文献】

- [1] 张小路,杜梅红,陈红跃,等. miR-375 靶向调控 YAP 表达对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019,26(1):79-84.
- [2] 张小路,杜梅红. lncRNA MALAT1 调控 miR-204 表达影响胰腺癌细胞的生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018,25(1):79-84.
- [3] 张小路,杜梅红,张全,等. 雷公藤红素对肾透明细胞癌 786-0 细胞的作用及其机制研究[J]. 中国全科医学, 2017,20(21):2590-2597.
- [4] NGUYEN P, LEE S, LORANG L D, et al. SIRT2 interacts with β -catenin to inhibit Wnt signaling output in response to radiation-induced stress[J]. Mol Cancer Res, 2014,12(9):1244-1253.
- [5] 李红亮. 参芪抑瘤方联合顺铂对 MFC 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2017:3-10.
- [6] 秦合伟,李彦杰,张志鑫,等. 化痰祛瘀法通过调控 miR-181 影响输入蛋白 α 3/NF- κ B 通路的抗动脉粥样硬化的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2020,43(8):653-660.
- [7] KONG P, ZHU X, GENG Q, et al. The micro RNA-423-3p-Bim axis promotes cancer progression and activates oncogenic autophagy in gastric cancer[J]. Mol Ther, 2017,25(4):1027-1037.
- [8] ZHANG P F, SHENG L L, WANG G, et al. miR-363 promotes proliferation and chemo-resistance of human gastric cancer via targeting of FBW7 ubiquitin ligase expression[J]. Oncotarget, 2016,7(23):35284-35292.
- [9] HU X, WANG Y, LIANG H, et al. miR-23a/b promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2017,8(10):e3059.
- [10] 苏园园,刘宁宁,赖优莹,等. 胃癌中医证型研究进展[J]. 陕西中医, 2023,44(2):262-266.
- [11] 苏羚子,焦丽静,许玲. 中医药治疗胃癌临床研究进展[J]. 世界临床药物, 2021,42(5):335-339.
- [12] 张云舒,周琪,孟凡跃,等. 从“毒”论治胃癌前病变研究进展[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022,30(11):804-808.
- [13] 壮雨雯,周锦勇,刘沈林. 扶正祛瘀法治疗晚期胃癌之药对举隅[J]. 环球中医药, 2015,8(9):1114-1116.
- [14] 赵昌林. 毒邪理论在恶性肿瘤治疗中的应用[J]. 中医学报, 2016,31(11):1633-1636.
- [15] 黎玉容,彭颂兴,杨兵. Linifanib 对胃癌模型大鼠胃黏膜组织细胞增殖、凋亡及周期分布的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020,29(11):67-71.
- [16] 王存吉,余芳,胡亚. 健脾解毒汤联合 5-氟尿嘧啶对胃癌大鼠 p53/Hippo 信号通路的调节作用[J]. 广东药科大学学报, 2022,38(2):79-84.

(收稿日期:2023-02-28)

Molecular Mechanism of Shuangshen Xiaoliu Decoction on Regulating Wnt/ β – catenin Pathway in Prevention and Treatment of Gastric Cancer

ZHANG Xiaolu, WAN Xin, PENG Yinjie

(The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective: To study the molecular mechanism of Shuangshen Xiaoliu Decoction (SXD) inhibiting cell proliferation of gastric cancer and preventing the disease based on Wnt/ β – catenin signaling pathway. Methods: Animal experiments were conducted using healthy male BALB/c – nu mice to establish a gastric cancer mouse model based on MNNG feeding method. According to different intervention methods, the mice were divided into model group, SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p agomir group, and combination group (SXD + miR – 338 – 3p agomir). After 8 weeks of continuous intervention, the levels of serum motilin (MTL), pepsinogen I (PGI) gastrin (GAS), etc., were measured by ELISA; the pathological changes of tumor tissue were observed through HE staining; the mRNA expression levels of miR – 338 – 3p, SIRT2, Wnt, and β – catenin in tumor tissue were detected by Real – time PCR; and the protein expression levels of SIRT2, Wnt, and β – catenin of tumor tissue were detected using Western blot technique. For cell experiment, according to different intervention methods, the mice were divided into model group, SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p mimics group, and miR – Con group. After the intervention, the cell activity was detected by MTT method, and the mRNA expression levels of cell miR – 338 – 3p, SIRT2, Wnt, and β – catenin were detected by Real – time PCR method. Results: After intervention, compared with the model group, the serum MTL, PGI and GAS levels of mice in SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p agomir group and combination group were significantly increased ($P < 0.05$). HE staining showed that compared with the model group, the gastric histopathology in SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p agomir group and combination group were improved in varying degrees. After intervention, compared with the model group, the mRNA expression level of miR – 338 – 3p, SIRT2, Wnt, and β – catenin in tumor tissue of SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p agomir group, and the combination group were significantly increased ($P < 0.05$). After the intervention, compared with the model group, the protein expression levels of SIRT2, Wnt, and β – catenin in tumor tissue of SXD high dose group, SXD low dose group, miR – 338 – 3p agomir group, and combination group were significantly increased ($P < 0.05$). After the intervention, compared with the model group, the cell survival rate of SXD high dose group, SXD low dose group, and miR – 338 – 3p agomir group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mRNA expression levels of miR – 338 – 3p, SIRT2, Wnt, and β – catenin in gastric cancer cells in SXD high dose group, SXD low dose group, and miR – 338 – 3p agomir group were significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: The molecular mechanism of SXD to inhibit the proliferation of gastric cancer cells and prevent gastric cancer is related to the activation of Wnt/ β – catenin signaling pathway through the targeted regulation of SIRT2 by miR – 338 – 3p.

【Key words】 Gastric cancer cells; Shuangshen Xiaoliu Decoction; miR – 338 – 3p; Wnt/ β – catenin signaling pathway