

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20231102

桦褐孔菌醇提物对胃癌模型裸鼠和BGC-823胃癌细胞Ras/MAPK信号通路的影响

乔羽, 项楠, 周忠光, 刘旭[✉]

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

【摘要】目的:观察桦褐孔菌醇提物对胃癌模型裸鼠和人系胃癌细胞株BGC-823 Ras/MAPK信号通路相关蛋白表达的干预作用。方法:采用体内与体外实验相结合的方式。体内实验中将49只裸鼠随机分为空白组、模型组、阴性对照组、西药组和桦褐孔菌醇提物高、中、低剂量组。除空白组外,其余6组裸鼠腋下皮肤接种0.2 mL BGC-823细胞(2×10^7 个/mL),建立荷瘤小鼠模型,桦褐孔菌醇提物高、中、低剂量组分别灌胃给予桦褐孔菌醇提物1.56、0.78、0.39 mg/g,西药组灌胃给予卡培他滨0.5 mg/g,阴性对照组灌胃给予CMC溶剂,空白组和模型组不给药,每日1次,连续21 d,免疫组织化学法检测荷瘤裸鼠肿瘤中Ras、JNKs、p38MAPK蛋白表达。体外实验中将对数生长期的BGC-823细胞随机分为模型组、阴性对照组、西药组、高剂量组、中剂量组和低剂量组。模型组给予同体积培养液,阴性对照组给予同体积二甲亚砜,西药组给予5-氟尿嘧啶120 mg/mL,高、中、低剂量组分别给予桦褐孔菌醇提物0.4、0.2、0.1 mg/mL。RT-PCR和Western blot检测信号通路中的关键因子Raf-1、MEK、ERKs、p38MAPK的表达水平。结果:体内实验中,与模型组比较,各给药组Ras、JNKs、p38MAPK蛋白的阳性表达降低($P < 0.01$)。体外实验中,与模型组比较,各给药组Raf-1、MEK、p38MAPK基因相对表达量降低($P < 0.01$);与模型组比较,西药组与桦褐孔菌醇提物处理后的高、中剂量组ERKs基因相对表达量降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs和p-p38MAPK表达水平降低($P < 0.01$)。结论:桦褐孔菌醇提物可能通过下调Ras、JNKs和p38MAPK表达,抑制Ras/MAPK信号通路的活化,从而延缓胃癌病情发展。

【关键词】桦褐孔菌;胃癌;Ras;p38MAPK

【引用格式】

乔羽, 项楠, 周忠光, 等. 桦褐孔菌醇提物对胃癌模型裸鼠和BGC-823胃癌细胞Ras/MAPK信号通路的影响[J]. 中医药信息, 2023, 40(11): 7-12.

QIAO Y, XIANG N, ZHOU Z G, et al. Effects of ethanol extract from inonotus obliquus on Ras/MAPK signaling pathway of gastric cancer model nude mice and BGC-823 gastric cancer cells[J]. Information on TCM, 2023, 40(11): 7-12.

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一^[1],预后相对较差,严重威胁人类健康^[2]。中国是胃癌高发国家^[3],发病率位居全球第五,病死率位居全球第三^[4],疾病负担严重,是我国癌症防治的重点^[5]。然而,大部分胃癌被发现时已处于晚期,错过了最佳手术治疗时

间^[6],加上对放疗化疗不敏感,治疗效果很难尽如人意^[7]。近年来,通过阻断致癌的分子信号通路,从而逆转癌症的发生、发展、阻滞癌细胞的转移,成为胃癌研究的焦点。研究表明,激活裸鼠的K-Ras基因,可以激活MAPK信号途径,从而引起前胃鳞状上皮细胞的过度增

基金项目:黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UPYSCT-2018231)

第一作者简介:乔羽(1983-),女,副教授,主要研究方向:中医药防治慢性病及肿瘤。

✉通信作者简介:刘旭(1984-),男,实验师,主要研究方向:医学形态学。

殖和胃腺体的化生^[8]。因此,笔者选择 Ras/MAPK 信号通路作为切入点,研究桦褐孔菌醇提取物对该信号通路的影响,为寻找胃癌的潜在治疗靶点和药物的开发奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

雄性裸鼠 49 只,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号:SCXK(京)2016-0006,3~5 周龄,体质量(20 ± 2)g,清洁级饲养,自由摄入水和饲料,适应性喂养一周后开始实验。

1.2 瘤株

人系胃癌细胞株 BGC-823 由中科院上海细胞所提供。

1.3 药物

桦褐孔菌由黑龙江儒泰科技发展有限公司提供。按照醇提法常规操作,取桦褐孔菌 1 kg,加 70% 乙醇 10 L,加盖常温浸泡 24 h,100℃ 加热回流 1 h 提取,得到滤液 1,残渣再加 70% 乙醇,加热回流 1 h 提取,得到滤液 2,合并滤液 1 与滤液 2,水浴箱蒸干,打粉;卡培他滨片(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H20133366);5-FU(索莱宝生物科技有限公司,批号:IF0170)。

1.4 主要仪器与试剂

Ras 试剂盒、JNKs 试剂盒、p38MAPK 试剂盒[爱必信(上海)生物科技有限公司,货号:abs123144、abs131533、abs131944];PVDF 膜(Summus, S59825);丙稀酰胺(Vetec, V900845);甲叉双丙烯酰胺(Sigma, 146072);过硫酸铵(Sigma, 9913);SDS、Tween20(Biotopped, 货号:S6010、P9416);TEMED(Sigma, T7024);Glycine(Sigma, G7126);TRIS(Sigma, T3253);PageRuler™ Prestained Protein Ladder(Thermo, 26616);Western blotting 及 IP 裂解液(碧云天, P0013);PMSF(碧云天, ST506);一抗稀释液(碧云天, P0023A);一抗二抗去除液(碧云天, P0025);二抗(中杉, ZB2301);20XTBS(Solarbio, T1080);Western 专用脱脂奶粉(BD, 1174551);甲醇(天津市富宇精细化工有限公司, 2018. 6. 10);BeyoECL Plus(碧云天, P0018)。

-80℃ 低温冰箱(日本三洋, MDF-C8V1);制冰机(Simag, SPR80);超纯水仪(美国密理博, Milli-Q);凝胶成像系统(美国 UVP, MegaCam815);低温离心机(德国 Sigma, 4-16S);高速离心机(上海安亭, TGL-20B);电子恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司, DK98-1);普通 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司, ETC811);水平电泳系统(北京六一, DYCP-31CN);精密天平(瑞士赛多利斯, BSA124S);酸度计(美国奥德龙, StartA2117);

紫外分光光度计(日本岛津, UV-2401);荧光定量 PCR(美国 ABI, 7500);PH 复合电极棒(梅特勒-托利多, LP115);磁力搅拌器(金城国胜实验仪器厂, 78-1);SDS 电泳仪(Bio-Rad, 042BR13724);微量光吸收仪(Implen, p330);转膜仪(Bio-Rad, 221BR52130);垂直凝胶电泳槽(Bio-Rad, 552BR113758);凝胶成像系统(Bio-Rad, Universal hood II);脱色摇床(沃德生物医学仪器公司, WD-9405B);全自动图像分析系统(TANON, 5020)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组及模型制备

49 只雄性裸鼠随机分为空白组、模型组、阴性对照组、西药组和桦褐孔菌醇提取物高、中、低剂量组。除空白组外,其余 6 组在每只裸鼠腋下皮肤接种 0.2 mL BGC-823 细胞(2×10^7 个/mL)。每天观察肿瘤形成情况,第 7 天开始可在皮下触及粟粒样肿瘤,所有裸鼠模型均制备成功。

2.1.2 给药

桦褐孔菌醇提取物高、中、低剂量组给予羧甲基纤维素钠(CMC)溶解的桦褐孔菌醇提取物 1.56、0.78、0.39 mg/g;西药组药物依据临床应用,选用抗消化道肿瘤常用口服药物卡培他滨片,剂量经人鼠等效剂量折算确定为 0.5 mg/g,每只裸鼠灌胃给药 0.3 mL;阴性对照组只给予 CMC 溶剂;空白组和模型组不给药,每日 1 次,连续 21 d。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养

用 90% RPMI-1640, 10% 胎牛血清和 1% 双抗制作培养液、用于人系胃癌细胞株 BGC-823 的培养。

2.2.2 体外实验分组

在肿瘤细胞 BGC-823 的对数生长期,用胰酶消化,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。随机分为模型组、阴性对照组、西药组、高剂量组、中剂量组和低剂量组。模型组给予同体积培养液,阴性对照组给予同体积二甲基亚砜,西药组给予 5-氟尿嘧啶(5-Fu)120 mg/mL,高、中、低剂量组分别给予桦褐孔菌醇提取物 0.4、0.2、0.1 mg/mL。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 免疫组化法检测肿瘤组织 Ras、JNKs、p38MAPK

给药 21 d 后,取肿瘤组织用多聚甲醛溶液固定,采用免疫组化法检测 Ras/MAPK 通路上下游相关因子 Ras、JNKs、p38MAPK 的表达水平。切片、65℃ 烘片 2 h、脱蜡、水化、滴加 3% H_2O_2 ,静置 10 min,把切片放入枸橼酸钠溶液中,微波修复,冷却至室温 37℃,滴加山羊血清封闭 10 min、滴加一抗,装入湿盒,放入冰箱

4℃过夜,次日37℃复温45 min,滴加二抗试剂1,37℃孵育15 min,滴加二抗试剂2,37℃孵育15 min,加DAB试剂显色,镜下观察,随时清洗,苏木复染,盐酸酒精分化,梯度醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,400倍镜下观察并拍照。

2.3.2 荧光定量PCR检测肿瘤细胞Raf-1、MEK、ERKs、p38MAPK的基因表达

设计与合成引物,扩增的片段长度为100~300 bp,提取总RNA,反转录,65℃(1 min)→30℃(5 min)→65℃(25 min)→98℃(5 min)→5℃(5 min)从30℃升温到65℃时,必须15~30 min内匀速升温。两步法PCR扩增标准程序:预变性95℃30 s;95℃5 s,60℃34 s 40个循环。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	长度/bp
Raf-1	TGTCAGAAAGTTCTGCTAAA	273
	AGGGCTGGAGGTGTTG	
MEK	GGGTCGCCTCTGTCTT	291
	ATCCTGGTGAAGTGCGT	
ERKs	ACTTGCCGAATGTGCT	232
	CCTTCAGAAAGATGACCCT	
p38MAPK	ACCGTGACCTCAAGCC	209
	GCAGCCCACAGACCAA	
GAPDH	TGTTTCCTCGTCCCCTAG	108
	CAATCTCCACTTTGCCACT	

2.3.3 Western blot检测p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs、p-p38MAPK蛋白表达

称取样品100 mg置于裂解液中冰上裂解,30 min后离心10 min,取中间层。按照SDS-PAGE凝胶试剂盒说明书操作完成分离胶的配制,插入齿梳水平放置约15 min,将蛋白样品用移液枪注入泳道,每孔上样10 μL,接通电泳仪。结束电泳,取下玻璃板,切取分离胶,于转膜液中平衡10 min。自下而上依次放置平衡

过的厚滤纸,PVDF膜,分离胶,厚滤纸,接通电源进行转膜。转膜结束后,将PVDF膜移入盛有TBST缓冲液的平皿中,用TBST洗涤两次,每次10 min。移膜至盛有封闭液的平皿中,置水平摇床上,封闭2 h。封闭结束后,将PVDF膜用TBST洗涤两次,每次10 min。之后将膜放入杂交袋中,置入4℃冰箱过夜。次日,移至盛有TBST液的平皿中,洗涤4次,每次10 min,将膜及二抗液封入杂交袋中,水平摇床上摇动,室温下孵育1 h,洗脱二抗。滤纸吸干液体,ECL发光液滴注于PVDF膜上,约1 min后曝光,保存图像。

2.4 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计学处理,多组间连续变量采用单因素方差分析(OneWay ANOVA),数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组裸鼠肿瘤组织Ras、JNKS、p38MAPK的表达情况

模型组和阴性对照组Ras阳性表达强,西药组和桦褐孔菌醇提取物高剂量组Ras阳性表达弱,桦褐孔菌醇提取物中、低剂量组Ras阳性表达高于西药组和桦褐孔菌醇提取物高剂量组,低于模型组。见图1。

模型组和阴性对照组JNKS阳性表达强,西药组JNKS阳性表达最弱,桦褐孔菌醇提取物高、中、低剂量组JNKS阳性表达高于西药组,低于模型组。见图2。

模型组和阴性对照组p38MAPK阳性表达强,西药组p38MAPK阳性表达弱,桦褐孔菌醇提取物高、中、低剂量组p38MAPK阳性表达高于西药组,低于模型组。见图3。

与模型组比较,西药组与桦褐孔菌醇提取物高、中、低剂量组Ras、JNKS、p38MAPK蛋白的阳性表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

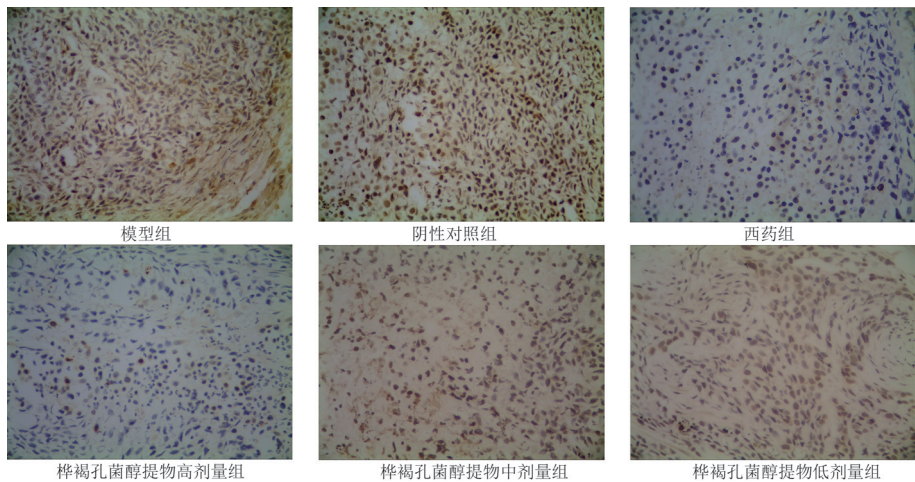


图1 各组肿瘤组织Ras的表达情况(×400)

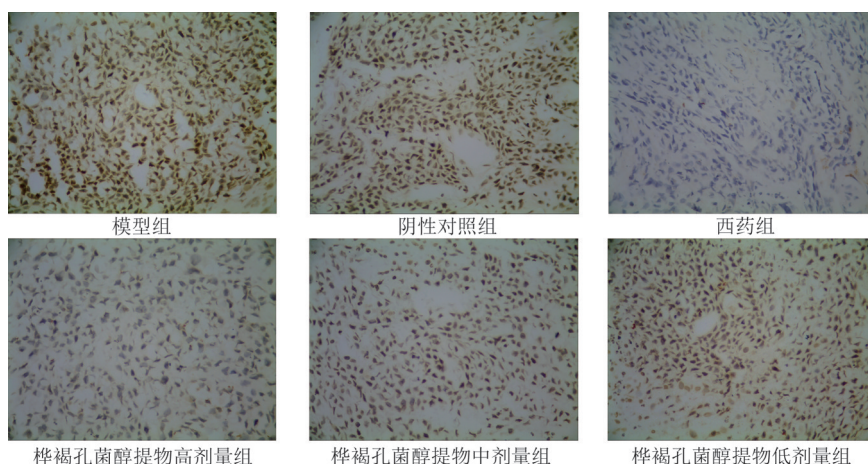


图2 各组肿瘤组织JNKs的表达情况(×400)

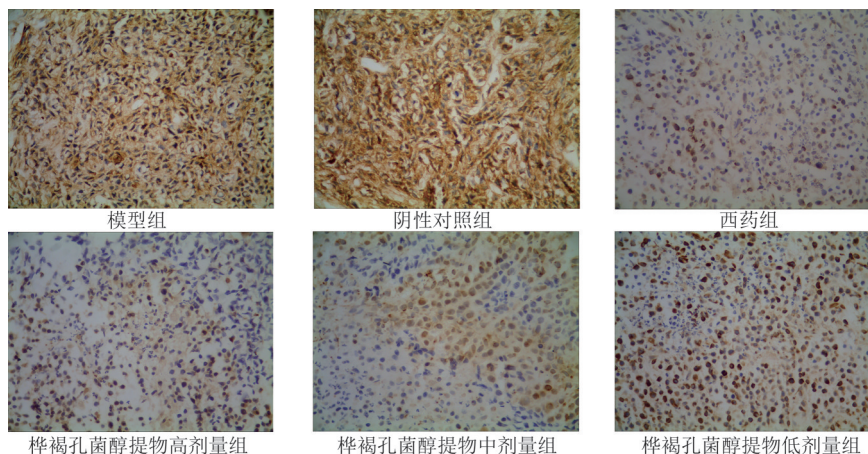


图3 各组肿瘤组织p38MAPK的表达情况(×400)

表2 各组肿瘤组织Ras、JNKs、p38MAPK表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ras	JNKs	p38MAPK
模型组	6	0.365 ± 0.018	0.351 ± 0.020	0.529 ± 0.395
阴性对照组	6	0.365 ± 0.018	0.352 ± 0.013	0.550 ± 0.380
西药组	6	0.079 ± 0.011*	0.292 ± 0.012*	0.145 ± 0.009*
桦褐孔菌醇提取物高剂量组	6	0.106 ± 0.008*	0.107 ± 0.011*	0.182 ± 0.175*
桦褐孔菌醇提取物中剂量组	6	0.148 ± 0.017*	0.178 ± 0.014*	0.313 ± 0.283*
桦褐孔菌醇提取物低剂量组	6	0.231 ± 0.014*	0.218 ± 0.017*	0.419 ± 0.277*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

3.2 PCR 检测 BGC-823 肿瘤细胞 Raf-1、MEK、ERKs、p38MAPK 的基因表达

与模型组比较,西药组与高、中、低剂量组 Raf-1、p38MAPK 基因相对表达量降低,差异有统计学意义

($P < 0.01$);与模型组比较,西药组与高、中剂量组 MEK、ERKs 基因相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表3。

表3 各组Raf-1、MEK、ERKs、p38MAPK基因相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Raf-1	MEK	ERKs	p38MAPK
模型组	5	1.271 ± 0.092	0.081 ± 0.008	0.159 ± 0.010	6.058 ± 0.422
阴性对照组	5	1.252 ± 0.082	0.079 ± 0.007	0.161 ± 0.012	5.964 ± 0.537
西药组	5	0.653 ± 0.065*	0.041 ± 0.004*	0.077 ± 0.006*	2.309 ± 0.347*
高剂量组	5	0.814 ± 0.067*	0.054 ± 0.005*	0.104 ± 0.008*	2.919 ± 0.281*
中剂量组	5	0.962 ± 0.074*	0.063 ± 0.008*	0.126 ± 0.006*	3.486 ± 0.316*
低剂量组	5	1.059 ± 0.091*	0.069 ± 0.005*	0.148 ± 0.009	4.072 ± 0.392*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

3.3 Western blot 检测 BGC-823 肿瘤细胞 p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs、p-p38MAPK 蛋白表达

与模型组比较,西药组与桦褐孔菌醇提取物处理后高、中、低剂量组 p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs 和 p-p38MAPK 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 4 各组 p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs、p-p38MAPK 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-Raf-1/GAPDH	p-MEK/GAPDH	p-ERKs/GAPDH	p-p38MAPK/GAPDH
模型组	5	6.139 4 ± 0.210 9	3.676 2 ± 0.133 9	3.094 6 ± 0.089 4	0.889 3 ± 0.034 7
阴性对照组	5	5.973 2 ± 0.146 6	3.605 1 ± 0.081 5	2.954 9 ± 0.080 0	0.896 3 ± 0.020 4
西药组	5	1.159 5 ± 0.018 5*	0.242 1 ± 0.012 9*	0.364 6 ± 0.009 9*	0.146 1 ± 0.009 7*
高剂量组	5	1.510 8 ± 0.026 5*	0.385 ± 0.005 8*	0.469 6 ± 0.005 0*	0.189 2 ± 0.005 9*
中剂量组	5	2.430 5 ± 0.067 4*	0.907 9 ± 0.023 8*	1.508 5 ± 0.039 5*	0.573 2 ± 0.024 6*
低剂量组	5	3.224 1 ± 0.151 9*	1.677 1 ± 0.042 0*	2.296 4 ± 0.033 1*	0.785 3 ± 0.011 3*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

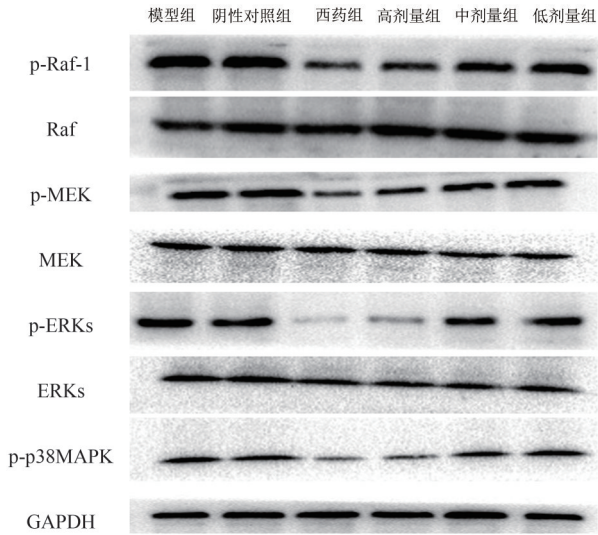


图 4 各组 p-Raf-1、Raf-1、p-MEK、MEK、p-ERKs、ERKs、p-p38MAPK 蛋白表达图

4 讨论

本研究采用体内与体外实验相结合的方式进行。体内实验采取免疫组织化学法检测桦褐孔菌醇提取物治疗后的肿瘤中 Ras、JNKs、p38MAPK 蛋白表达。结果表明,与模型组比较,各给药组肿瘤组织中 Ras、JNKs、p38MAPK 蛋白的阳性表达降低。Ras 的活化是 MAPK 途径级联反应的第一步^[9],有研究表明,胃癌患者癌组织中 Ras 的表达明显高于癌旁组织^[10]。Ras 活化后,与 Raf 结合,磷酸化后激活 MAPK/ERK 激酶(MAPK/ERK kinase)1 和 MAPK/ERK 激酶 2,MAPK/ERK 激酶 2 活化 Erk1 和 Erk2,移位至细胞核,作用于相关基因,促进 RNA 的合成,进而调节细胞增殖。JNKs 是 MAPK 家族成员之一,可被炎症因子、氧化损伤等多种因素激活,通过细胞凋亡、氧化应激反应在多种人类疾病的发生与发展过程中起着至关重要的作用^[11]。在 MAPK 家族中,p38 激酶在肿瘤中被发现有改变,对肿瘤的形成有负

见表 4。

与模型组比较,桦褐孔菌醇提取物处理后低、中、高剂量组和西药组 p-Raf、p-MEK、p-ERKs 和 p-p38MAPK 的蛋白表达逐渐减少,而 Raf、MEK、ERK 蛋白水平保持不变。见图 4。

向调控作用^[12]。体外实验应用 PCR 和 Western blot 检测信号通路中的关键因子 Raf-1、MEK、ERKs、p38MAPK。PCR 结果表明,给药组的肿瘤细胞中 Raf-1、MEK、ERKs 和 p38MAPK 表达水平降低,Western blot 结果表明,各给药组 p-Raf-1、p-MEK、p-ERKs 和 p-p38MAPK 表达水平降低。以上结果说明桦褐孔菌醇提取物可能通过下调 Ras、JNK、p38MAPK 表达,抑制 Ras/MAPK 信号通路的活化,从而延缓胃癌病情发展。

桦褐孔菌是一种极具研究价值的药食两用大型真菌,在民间治疗恶性肿瘤已有悠久历史,可明显抑制胃癌,防止肿瘤细胞转移、复发^[13]。研究表明,桦褐孔菌提取物对多种恶性肿瘤有抑制作用^[14]。课题组前期研究发现桦褐孔菌醇提取物在体外可抑制胃癌 BGC-823 细胞的增殖,体内实验发现其可抑制胃癌荷瘤裸鼠的肿瘤生长速度^[15]。本研究首次从 Ras/MAPK 信号通路角度探讨桦褐孔菌醇提取物的抗胃癌作用机制,为桦褐孔菌应用于临床治疗胃癌提供了实验依据,但本研究还存在着一定的局限性,如无法确定提取物中具体哪一种有效成分在发挥作用,实验设计还有待完善,下一步计划加入 Ras/MAPK 信号通路抑制剂验证桦褐孔菌对胃癌的拮抗作用。

【参考文献】

[1] ZHANG F, PU K, WU Z, et al. Prevalence and associated risk factors of Helicobacter pylori infection in the Wuwei cohort of north-western China[J]. Trop Med Int Health, 2021, 26: 290-300.
[2] JOHNSTON F M, BECKMAN M. Updates on management of gastric cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(8): 67.
[3] SPOLVERATO G, PAWLIK T M. Clinicopathological evaluation of recurrence in early gastric cancer[J]. Am J Surg, 2019, 157(3): 202-207.
[4] CATHERINE D M, DAMIEN G, FREDDIE B, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis[J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(2): 180-190.
[5] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

- for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [6] 陈浩林,杜镇鸿,彭昌兵,等.腹腔镜辅助微创胃癌根治术治疗胃癌的疗效及对患者胃肠功能与癌性疼痛的影响[J].湖南师范大学学报(医学版),2018,15(1):25–27.
- [7] 郭梁,陈康,刘海鹏,等.术前血小板/淋巴细胞比值和淋巴细胞/单核细胞比值对胃癌患者预后的影响分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(11):1353–1358.
- [8] MATKAR S S, DURHAM A, BRICE A, et al. Systemic activation of K-Ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice[J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(4):432–445.
- [9] 刘慧萍. 23, 24-Dihydrocucurbitacin E抑制胃癌侵袭、迁移及诱导凋亡作用和机制研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2022:71.
- [10] 王洁. K-ras诱导的细胞衰老与胃癌癌前病变的关系[D]. 延安:延安大学, 2019:10.
- [11] 张宇琼,张雪怡,徐美琴,等. JNK/c-Jun信号通路参与介导EB病毒编码的BARF1基因上调胃癌细胞Bcl-2的表达[J]. 江苏大学学报(医学版), 2015, 25(3):199–202.
- [12] GARCÍA-HERNÁNDEZ L, GARCÍA-ORTEGA M B, RUIZ-ALCALÁ, et al. The p38 MAPK components and modulators as biomarkers and molecular targets in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1):370.
- [13] JIANG S, SHI F, LIN H, et al. Inonotus obliquus polysaccharides induces apoptosis of lung cancer cells and alters energy metabolism via the LKB1/AMPK axis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151:1277–1286.
- [14] ANTOINE G, CHRISTELLE D, VERONIQUE A, et al. Chaga (inonotus obliquus), a future potential medicinal fungus in oncology? A chemical study and a comparison of the cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cells (A549) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)[J]. Integrative Cancer Therapies, 2018, 17(3):832–843.
- [15] 王蔚,周忠光,刘旭,等.桦褐孔菌醇提取物对几种消化系统恶性肿瘤的影响[J]. 中医药信息, 2018, 35(1):12–15.

(收稿日期:2023-03-26)

Effects of Ethanol Extract from Inonotus Obliquus on Ras/MAPK Signaling Pathway of Gastric Cancer Model Nude Mice and BGC-823 Gastric Cancer Cells

QIAO Yu, XIANG Nan, ZHOU Zhongguang, LIU Xu[✉]

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

【Abstract】 Objective: To observe the intervention effect of ethanol extract of inonotus obliquus on the expression of Ras/MAPK signaling pathway related proteins in gastric cancer model nude mice and human gastric cancer cell line BGC-823. Methods: This study was conducted through combining in vivo and in vitro experiments. For in vivo experiments, 49 nude mice were randomly divided into blank group, model group, negative control group, Western medicine group, and inonotus obliquus alcohol extract low, medium and high dose groups. Except for the blank group, the remaining 6 groups of nude mice were inoculated with 0.2 mL of BGC-823 cells on their axillary skin ($2 \times 10^7/\text{mL}$) to establish tumor bearing mouse model. The high, medium, and low dose groups of inonotus obliquus alcohol extract were gavaged with 1.56, 0.78, and 0.39 mg/g of inonotus obliquus alcohol extract respectively, the Western medicine group was given 0.5 mg/g of capecitabine by gavage, and the negative control group was given CMC solvent by gavage, once a day for 21 consecutive days, and the blank group and model group were not given medication. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of Ras, JNKS, and p38MAPK proteins in tumor bearing nude mice. In vitro experiments, BGC-823 cells with logarithmic growth phase were randomly divided into model group, negative control group, Western medicine group, and high-dose, medium dose, and low-dose groups. The model group was given the same volume of culture medium, the negative control group was given the same volume of dimethyl sulfoxide, the Western medicine group was given 120 mg/mL of 5-fluorouracil, and the high, medium, and low dose groups were given 0.4, 0.2, and 0.1 mg/mL of ethanol extract of inonotus obliquus respectively. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression levels of key factors Raf-1, MEK, ERKs, and p38MAPK in the signaling pathway. Results: In vivo experiments, compared with the model group, the positive expression of Ras, JNKS, and p38MAPK proteins in each treatment group decreased ($P < 0.01$). In vitro experiments, compared with the model group, the relative expression levels of Raf-1, MEK, and p38MAPK genes in each treatment group decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the relative expression of ERKs gene in Western medicine group and the high and medium dose groups of inonotus obliquus alcohol extract decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of p-Raf-1, p-MEK, p-ERKs and p-p38MAPK in each treatment group were decreased ($P < 0.01$). Conclusions: The ethanol extract of inonotus obliquus may inhibit the activation of Ras/MAPK signaling pathway by down-regulating the expression of Ras, JNKS and p38MAPK, thus delaying the development of gastric cancer.

【Key words】 Inonotus obliquus; Gastric cancer; Ras; p38MAPK