

# 基于 MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8 信号通路探讨蒙药格勒图呼和治疗胃癌的作用机制

周旻昱, 周秀芳\*

(内蒙古医科大学附属医院 药剂部, 内蒙古 呼和浩特 010050)

关键词: 蒙药; 提取工艺; 抗肿瘤作用

中图分类号: R966

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)S1-0006-04

蒙药格勒图呼, 由铁线莲、光明盐、蛇床子、芫荽、干姜、诃子灰(煅)六味药材组成, 收录在《中国医学百科全书-蒙医学》<sup>[1]</sup>。本方剂性温, 具有破痞消积, 调养胃火, 助消化吸收, 祛巴达干赫依等作用, 专门用于治疗巴达干赫依性食痞, 胃痞初期。处方中铁线莲的主要功能为破痞; 光明盐的主要作用为消食, 祛巴达干赫依; 以诃子调理体素, 以干姜、蛇床子和芫荽调养胃火。本研究优化了蒙药格勒图呼的提取工艺, 提取后药物的服用量与原剂型散剂比较明显减少。同时考察了格勒图呼提取物的抗肿瘤作用, 并初步探索了其作用机制, 为后期深入研究格勒图呼的活性成份和作用靶点提供了科研基础。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

蒙药材由呼和浩特天力药业有限公司提供; CCK8 试剂盒和 ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒由北京 solarbio 科技有限公司提供; p-ERK、p-p38、p-JNK 和 p-p65 四种抗体均购自 CST 公司; CXCL8 ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司; SGC7901 胃癌细胞购自中科院上海细胞库。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 格勒图呼和醇提取工艺条件的优化** 格勒图呼与原处方中有六味药材, 经查阅文献<sup>[2-4]</sup>, 选择乙醇浓度、乙醇加入量、醇提时间、醇提次数为主要的因素, 每个因素设计三个水平(见表1)。按处方比例称取药材, 按照正交试验设计表提取药材, 提取液浓缩, 回收乙醇, 定容至 100mL。以提取

液对胃癌细胞增殖抑制率为评价指标, 优选最佳提取工艺。

表1 醇提工艺因素水平表

水平	乙醇加入量	乙醇浓度	醇提时间	醇提次数
1	1:6	60%	1h	1
2	1:8	70%	1.5h	2
3	1:10	80%	2h	3

**1.2.2 细胞增殖、迁移、凋亡和克隆形成实验** SGC7901 胃癌细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿培养箱中培养, 培养基为 RPMI-1640, 培养基中加入 10% 胎牛血清、100 单位/mL 链霉素和 100 单位/mL 青霉素。当细胞处于对数生长期时, 接种到 96 孔板, CCK8 法研究格勒图呼和提取物对细胞增殖的影响; 接种到 transwell 小室, 药物处理后结晶紫染色并拍照统计迁移细胞数量; 接种到 6 孔板, 培养 48 h 后药物处理, 继续培养 24 h 后, 胰酶消化, Annexin V-FITC 染色, 1 h 内检测细胞凋亡; 接种于 6 孔板中, 药物处理后每 3 天更换一次培养基, 待细胞成团, 甲醇固定, Giemsa 溶液染色, 统计细胞克隆形成数量<sup>[5,6]</sup>。

**1.2.3 采用网络药理学方法筛选格勒图呼和提取物抗肿瘤作用的相关信号通路** 在 TCMSP 数据库中检索铁线莲、蛇床子、芫荽、干姜、诃子, 筛选五味药材中潜在的活性成分及活性成分对应的靶点。处方中光明盐主要成分是 NaCl, 无对应靶点。在 Gene Cards、OMIM 数据库检索收集胃癌相关的靶点基因。利用 R 语言导入格勒图呼和潜在靶点基因和胃癌相关靶点基因, 得到二者交互靶点的基因。将交互靶点基因导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 绘制调控网络; 将交互靶点基因导入 STRING 数据库, 分析

作者简介: 周旻昱(1975-), 女, 内蒙古医科大学附属医院药剂部副主任药师。

通讯作者: 周秀芳, 主任药师, E-mail: 119351860@qq.com 内蒙古医科大学附属医院药剂部, 010050

蛋白与蛋白的相互作用,绘制 PPI 网络图,并进一步筛选 PPI 网络核心基因;将交互靶点基因进行 GO 与 KEGG 富集分析,筛选相关信号通路<sup>[7]</sup>。

**1.2.4 western blot 法验证格勒图呼和提取物治疗胃癌的信号通路** 将生长状态良好的 SGC7901 细胞接种到培养皿中,孵育 24h 后,分别加入不同浓度的格勒图呼和提取物和 DMSO 处理 48h,用预冷的 PBS 冲洗,裂解细胞,4℃ 离心 10min,测定蛋白浓度。提取的总蛋白 95℃ 水浴 5min 变性,凝胶电泳,转膜后加入 p-p53、p-ERK、p-JNK、p65 和 tubulin 抗体孵育,然后加入二抗和 DAB 显色,拍照<sup>[8]</sup>。

**1.2.5 统计学处理** 工艺优化实验中细胞增殖抑制率以百分比表示,按照正交试验设计进行数据处理;细胞功能实验中细胞迁移数量、凋亡比例、克隆形成数量和 CXCL8 的含量属于计量资料,用均值 ± 标准差表示,采用 Graphpad prism 8.0 软件进行数据处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准具体值为  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 格勒图呼和醇提取工艺优化

正交实验结果中各因素对应的 K1、K2、K3 中最大值对应的条件为最佳条件,按照各因素对应的 K 值大小可知,格勒图呼和的最佳醇提取工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即加入 8 倍量 70% 的乙醇提取 2 次,每次 1h;正交实验结果中各因素对应的 R 值越大,说明该因素对提取效率的影响越大,按照 R 值的大小顺序可知各因素对提取效率的影响大小顺序为 D>C>B>A,即醇提次数>醇提时间>乙醇浓度>乙醇加入量(见表 2)。按最佳提取工艺开展放大实验,回收乙醇后,减压干燥得提取物,称重,提取率为 18.47%。提取物干燥后粉碎过 100 目筛,用于细胞实验。

### 2.2 格勒图呼和提取物对胃癌细胞增殖、迁移、凋亡和克隆形成的影响

实验结果显示,格勒图呼和提取物 50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$  各组对胃癌细胞增殖的抑制率分别为 13.38%、29.18%和 59.76%,且具有剂量依赖性,实验结果(见图 1A);格勒图呼和提取物能够显著降低胃癌迁移细胞数量和克隆形成数量,且具有剂量依赖性(见图 1B、1C、1D、1E);格勒图呼和提取物 50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$  各组胃癌细

胞的凋亡率分别为 12.32%、20.87%和 25.47%,与对照组相比,100  $\mu\text{g/mL}$  和 200  $\mu\text{g/mL}$  组凋亡率明显增加,差异有统计学意义(见图 1F)。

表 2 醇提工艺正交实验表

试验号	A	B	C	D	抑制率(%)
1	1	1	1	1	19.76
2	1	2	2	2	23.64
3	1	3	3	3	21.33
4	2	1	2	3	21.09
5	2	2	3	1	20.13
6	2	3	1	2	24.84
7	3	1	3	2	20.03
8	3	2	1	3	24.86
9	3	3	2	1	19.99
K1	64.73	60.88	69.46	59.88	
K2	66.06	68.63	64.72	68.51	
K3	64.88	66.16	61.49	67.28	
R	1.33	7.75	7.97	8.63	

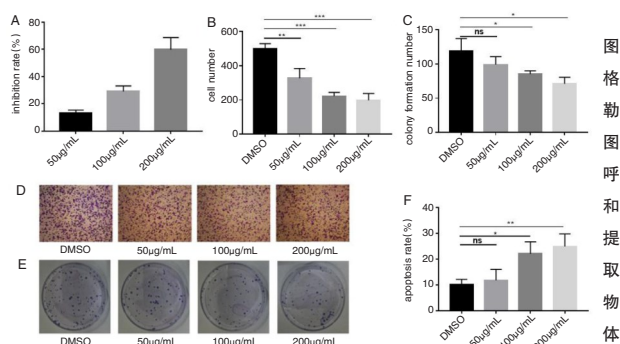


图 1 外抑制胃癌细胞增殖、迁移、克隆形成,促进胃癌细胞凋亡

### 2.3 网络药理学探讨格勒图呼和提取物治疗胃癌的相关信号通路

网络药理学分析结果显示,格勒图呼和提取物中潜在的活性成分为 51 个,活性成分对应的靶点约为 130 个,其中排名前十的活性成分(见表 3)。在 Gene Cards、OMIM 数据库检索收集的胃癌相关的靶点基因为 8804 个。R 语言分析格勒图呼和潜在靶点基因和胃癌相关靶点基因,获得 115 个交互靶点基因(见图 2A)。将 115 个交互靶点基因导入 STRING 数据库,筛选得到 PPI 网络核心基因,其中包括 JUN、NFKBIA、CXCL8、IL1B 和 TNF(见图 2B)。KEGG 富集分析结果包括 NF- $\kappa$ B 信号通路, TNF 信号通路和 IL-17 信号通路, JUN、NFKBIA、CXCL8、IL1B 和 TNF 是上述三种信号通路中的靶点基因(见图 2C)。网络药理学分析结果显示格勒图呼和提取物有可能通过 MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8 信号通路发挥抗肿瘤作用。

表3 格勒图呼和提取物中排名前十的活性化合物

mol ID	mol name	度值	CAS
MOL000358	beta-sitosterol	84	83-46-5
MOL000449	Stigmasterol	54	83-48-7
MOL001592	piperine	44	94-62-2
MOL009137	(R)- (6- methoxy- 4-quinolyl)- [(2R,4R,5S)-5- vinylquinuclidin- 2-yl]methanol	28	\
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	24	126979-84-8
MOL009149	Cheilanthifoline	24	483-44-3
MOL009135	ellipticine	21	519-23-3
MOL001558	sesamin	20	607-80-7
MOL001002	ellagic acid	19	476-66-4
MOL003624	o-Isovalerylcolum bianetin	17	\

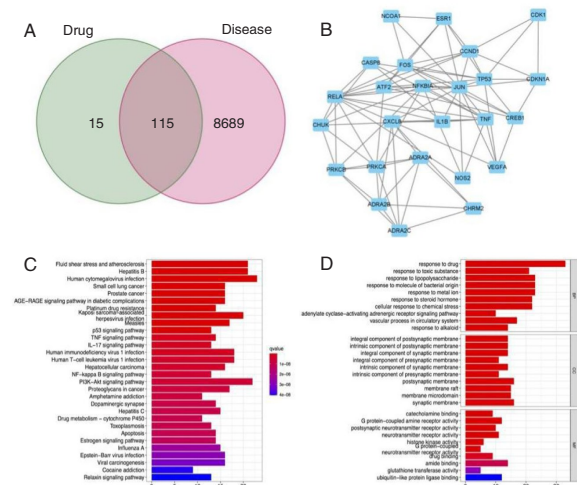


图2 格勒图呼和网络药理学分析结果

## 2.4 格勒图呼和提取物通过 MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8 信号通路发挥抗肿瘤作用

western blot 结果显示,格勒图呼和提取物各剂量组能够抑制 p38、ERK、JNK 的磷酸化,且具有剂量依赖性,说明格勒图呼和提取物抗肿瘤作用与 MAPK 信号通路密切相关。p65 是 NF- $\kappa$ B 的一个亚基,其磷酸化被抑制,可以抑制 NF- $\kappa$ B 入核,进而影响下游靶基因的表达式,说明格勒图呼和提取物通过转录因子 NF- $\kappa$ B 发挥抗肿瘤作用。细胞上清液中趋化因子 CXCL8 的含量降低,说明格勒图呼和提取物可以降低肿瘤细胞中趋化因子 CXCL8 的合成, CXCL8 是转录因子 NF- $\kappa$ B 的转录产物。综上所述,格勒图呼和提取物通过 MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8 信号通路发挥抗肿瘤作用(见图3)。

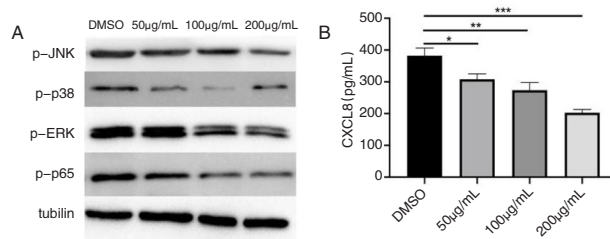


图3 格勒图呼和提取物抗肿瘤作用相关信号通路

## 3 讨论与分析

胃癌是世界上最常见和致命的癌症之一。胃癌总死亡率排名全球第三,仅次于肺癌和结直肠癌,大约每12例肿瘤死亡中就有1例可归因于胃癌。胃癌的发病率在癌症中排名第五,占有新发病例的5.7%。全世界每年确诊的胃癌病例超过100万例<sup>[9,10]</sup>。因此研发疗效确切,副作用少的治疗胃癌的新药仍然是一个巨大的挑战。

蒙药治疗癌症有多年宝贵的临床经验,应用现代医学技术,详细的探索蒙药抗肿瘤活性成分及作用靶点,可以更好的为蒙药临床用药提供理论依据,有助于更好的挖掘蒙医药的宝贵财富,推动蒙医药发展,为人类健康做出贡献。

格勒图呼和处方中发挥破痞作用的药材是铁线莲。早在公元8世纪,藏医学经典著作《四部医典》<sup>[11]</sup>中就有对铁线莲的记载;《甘露四部》<sup>[12]</sup>和《无误蒙药鉴》<sup>[13]</sup>中均对铁线莲进行了详细描述;《中国医学百科全书·蒙医学》<sup>[14]</sup>破痞祛滞类蒙药收录了铁线莲;《卫生部药品标准·蒙药分册》中记载铁线莲具有破痞,燥“协日乌素”,消肿,等功效,蒙医临床常用来治疗各种寒性痞、食积、水肿等<sup>[14]</sup>。现代药理学研究结果显示铁线莲具有抗肿瘤作用,杨林<sup>[15]</sup>等学者研究发现铁线莲在体内体外均有抗肿瘤作用,昌妍希研究发现铁线莲中多种抗肿瘤活性成分单体,金晨等学者研究了铁线莲中抗肿瘤活性成分的提取分离工艺。

CXCL8是一个含有72个氨基酸的多肽,由3条反向平行的 $\beta$ 链和1个 $\alpha$ -螺旋组成,在20世纪80年代末由Peveri等人发现,是趋化因子CXCL家族的重要成员,与多种癌症的发生发展密切相关。肿瘤细胞在受到缺氧、炎症、病毒颗粒等环境刺激时, NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基磷酸化,转位到细胞核并与 DNA 结合,激活 CXCL8 启动子区域, CXCL8 表达上调。文献报道, CXCL8 在胃癌、结肠癌、头颈部癌、胰腺



癌和食管癌中的表达明显高于正常组织,CXCL8的表达水平也与肿瘤的分级和转移潜能相关。本课题的研究结果显示蒙药格勒图呼和能够通过抑制胃癌细胞中JNK、p38、Erk和p65的磷酸化,同时能够降低细胞上清液中CXCL8的含量,说明蒙药格勒图呼和通过MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8信号通路发挥抗肿瘤作用。

民族药的复方制剂通常由多味药材组成,活性成分多,对应的作用靶点也很多。在开展民族药作用机制的研究中,如何选择作用靶点是一个难题。本课题以网络药理学分析结果为依据,确定了MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8作为作用机制研究的对象,并进行了实验验证。

本课题研究结果显示,按照最佳提取工艺获得的格勒图呼和提取物能够抑制胃癌细胞增殖、迁移和克隆形成并诱导其凋亡,其抗肿瘤作用与抑制MAPK/NF- $\kappa$ B/CXCL8信号通路密切相关。本课题的研究结果为后期深入研究蒙药格勒图呼和的活性成分和抗肿瘤分子机制奠定了基础。

#### 参考文献

- [1]中国医学百科全书编辑委员会.中国医学百科全书·蒙医学[M].上海:上海科学技术出版社,1992:218
- [2]刘鲁祥.蛇床子提取工艺的单因素实验设计研究[J].山东化工,2017;46(02):7-8
- [3]杨家强,车万莉,彭红艳,等.Box-Behnken响应面法优化葶苈总生物碱的提取工艺研究[J].中国药房,2018;29(13):1802-1805
- [4]李杨,张伟,赫雪锋,等.响应面法优化超声提取甘青铁线莲总黄酮工艺[J].中南药学,2018;16(06):745-748
- [5]Shuo W, Song ZJ, Gong XM, et al. Chloroform extract from *Sophora Tonkinensis* Gagnep. inhibit proliferation, migration, invasion and promote apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by silencing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021:271
- [6]杨延庆,王焕焕,谢坤霞,等.MAPK/ERK通过诱导纤维蛋白A磷酸化抑制垂体瘤细胞增殖、凋亡、迁移及相关信号转导[J].实用药物与临床,2021;24(01):6-10
- [7]刘丝雨,李东芳.基于网络药理学挖掘治疗胃癌中药复方的研究进展[J].中医肿瘤学杂志,2020;2(05):81-86
- [8]李治,千维娜,魏思敏,等.从Leptin/c-Myc/PGC-1信号通路调控的能量代谢途径探索黄连-吴茱萸配伍抗胃癌的分子生物学机制.中药材,2020;(10):2526-2531
- [9]Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018;68(6):394-424
- [10]曹毛毛,李贺,孙殿钦,等.2000—2019年中国胃癌流行病学趋势分析[J].中华消化外科杂志,2021;20(01):102-109
- [11]玉多·云登贡布.四部医典[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1997:281
- [12]伊希巴拉珠尔.甘露四部[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1998:566
- [13]占布拉道尔吉.无误蒙药鉴[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1998:145-146
- [14]中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册[S].1998:32
- [15]杨林,钱娇玲,蒲利红,等.棉团铁线莲总皂苷抗肿瘤活性研究Ⅱ[J].中医药学报,2013;41(02):51-53

## 超声图像3D打印二尖瓣脱垂模型可行性的研究

孙爱童,冯德喜\*

(内蒙古自治区人民医院 超声医学科,内蒙古 呼和浩特 010017)

**关键词:**经食管;3D打印;二尖瓣脱垂;可行性;精准度

**中图分类号:** R542.5

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2021)S1-0009-04

二尖瓣脱垂(mitral valve prolapse, MVP)作为常见的心脏瓣膜病变,是指二尖瓣和/或附属结构,包括瓣叶、瓣环、腱索、乳头肌及其附着处的心室壁发生病变,导致二尖瓣瓣叶在收缩期超过瓣环水平而

脱入左房,伴或不伴有二尖瓣关闭不全的继发性瓣膜病变。3D打印作为新型的快速建模技术之一,具有精准度高、个体化强等优势,是实现个体化精准治疗的有效手段,是准确选择MVP术中成形环的

**基金项目:**内蒙古自治区自然科学基金项目(2017MS(LH)0856)

**作者简介:**孙爱童(1981-),女,内蒙古自治区人民医院超声医学科副主任医师。

**通讯作者:**冯德喜,主任医师,E-mail:fengdexifengzhuo@126.com 内蒙古自治区人民医院超声医学科,010017