

复方蜥蜴散调控糖酵解降低胃癌顺铂耐药性的效应机制研究[△]

程翻娥^{1*}, 李 铮¹, 刘彩月¹, 师小茜¹, 李卫强^{1,2,3#}(1. 宁夏医科大学中医学学院, 银川 750004; 2. 宁夏区域高发
病中医药防治教育部重点实验室, 银川 750004; 3. 宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室, 银川
750004)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1179-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.05



摘要 目的 基于磷脂酰肌醇3激酶(Pi3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路,探讨复方蜥蜴散调控糖酵解降低胃癌顺铂耐药性的效应机制。方法 体外培养人胃癌MKN45、MKN45/DDP(顺铂耐药)细胞,以不同质量浓度顺铂(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μg/mL)干预,检测其存活率、半数抑制浓度(IC₅₀)和耐药指数。于裸鼠右前腋窝皮下接种MKN45/DDP细胞悬液制备胃癌耐药裸鼠移植瘤模型,将造模成功的裸鼠随机分为模型组、顺铂组(0.002 g/kg)、复方蜥蜴散组(2.8 g/kg)、联合组(剂量同各单药组),每组8只;各药物组裸鼠给予相应药液,每周2次(顺铂,腹腔注射)或每天2次(复方蜥蜴散,灌胃),连续4周。实验期间,监测各组裸鼠体重并计算其肿瘤体积和肿瘤生长抑制率,检测其肿瘤组织中炎症因子(肿瘤坏死因子α、白细胞介素6)水平,多药耐药相关蛋白1(MRP1)、P糖蛋白(P-gp)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、乳酸脱氢酶A(LDHA)mRNA及蛋白,以及Pi3K、磷酸化Pi3K(p-Pi3K)、Akt、磷酸化Akt(p-Akt)、己糖激酶2(HK2)、丙酮酸激酶M2(PKM2)蛋白的表达情况。结果 在不同质量浓度顺铂的干预下,耐药细胞MKN45/DDP的存活率均显著高于亲本细胞MKN45($P<0.05$);MKN45/DDP和MKN45细胞的IC₅₀分别为(1.052 0±0.221 9)、(0.372 1±0.238 0)μg/mL,耐药指数为2.827。与模型组比较,顺铂组、复方蜥蜴散组、联合组裸鼠的肿瘤生长均受到不同程度的抑制,肿瘤生长抑制率显著升高($P<0.05$);肿瘤组织中炎症因子水平,MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA mRNA及蛋白的表达(顺铂组除外),Pi3K、Akt蛋白的磷酸化水平(顺铂组除外),以及HK2、PKM2蛋白的表达均显著降低或下调,且联合组的效果显著优于顺铂组($P<0.05$)。结论 复方蜥蜴散可通过减少肿瘤相关炎症因子的分泌,抑制糖酵解、耐药相关蛋白及基因的表达,抑制Pi3K/Akt信号通路的活化来抑制胃癌耐药细胞移植瘤裸鼠的肿瘤生长,具有一定的顺铂增效及逆转耐药的作用。

关键词 复方蜥蜴散;胃癌;顺铂耐药;糖酵解;Pi3K/Akt信号通路

Study on the mechanism of Compound lizard powder reducing cisplatin resistance in gastric cancer by regulating glycolysis

CHENG Fan¹, LI Zheng¹, LIU Caiyue¹, SHI Xiaoqian¹, LI Weiqiang^{1,2,3}(1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Ministry of Education of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Regional High Incidence Disease, Yinchuan 750004, China; 3. Ningxia Regional Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Regional High Incidence Disease, Yinchuan 750004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Compound lizard powder reducing cisplatin resistance in gastric cancer by regulating glycolytic activity based on phosphoinositide 3-kinase(Pi3K)/protein kinase B(Akt) signaling pathway. **METHODS** Human gastric cancer MKN45 and MKN45/DDP (cisplatin-resistant) cells were cultured *in vitro* and intervened with different mass concentrations of cisplatin (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μg/mL) to detect the survival rate, half inhibitory concentration (IC₅₀) and drug resistance index. MKN45/DDP cells were inoculated subcutaneously in the right anterior axilla of nude mice to prepare a transplanted tumor model of gastric cancer. After successful modeling, they were randomly divided into model group, cisplatin group (0.002 g/kg), Compound lizard powder group (2.8 g/kg) and combination group (the same dose as each single drug group), with 8 nude mice in each group. Each administration group was given relevant solution, twice a week (cisplatin, i.p.) or

[△]基金项目 国家自然科学基金项目(No.82260916);宁夏医科大学科学研究资助项目(No.XZ2023012)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:肝病和脾胃病的基础与临床。E-mail:642630031@qq.com

#通信作者 主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中医药治疗脾胃病。E-mail:lwq200309@163.com

twice a day (Compound lizard powder, i. g.), for 4 consecutive weeks. During the experiment, the body weight of nude mice was monitored, and tumor volume and inhibitory rate of tumor were calculated. The levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor-α, interleukin-6) in tumor

tissue, the mRNA and protein expressions of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), P-glycoprotein (P-gp), glucose transporter-1 (GLUT1) and lactate dehydrogenase A (LDHA), as well as the protein expressions of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), hexokinase-2 (HK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2) were all detected. **RESULTS** With the intervention of different concentrations of cisplatin, the survival rate of MKN45/DDP-resistant cells was significantly higher than that of MKN45 parent cells ($P<0.05$). IC_{50} value of MKN45/DDP and MKN45 cells were $(1.052 0 \pm 0.221 9)$ and $(0.372 1 \pm 0.238 0) \mu\text{g/mL}$, and the drug resistant index was 2.827. Compared with the model group, cisplatin group, Compound lizard powder group and combination group all had certain inhibitory effects on the tumor growth in nude mice; the inhibitory rates of tumor increased significantly ($P<0.05$); the levels of inflammatory factors, the mRNA and protein expressions of MRP1, P-gp, GLUT1 and LDHA (except for cisplatin group), the phosphorylation levels of PI3K and Akt protein (except for cisplatin group) as well as the protein expressions of HK2 and PKM2 were decreased significantly, while the combination group was significantly better than the cisplatin group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Compound lizard powder may inhibit tumor growth in transplanted tumor model nude mice with gastric cancer-resistant cells by reducing the secretion of tumor-related inflammatory factors, inhibiting the expression of glycolysis, drug resistance-related proteins and genes, inhibiting the activation of the PI3K/Akt signaling pathway, thus having a certain effect of enhancing cisplatin efficacy and reversing drug resistance.

KEYWORDS Compound lizard powder; gastric cancer; cisplatin resistance; glycolysis; PI3K/Akt signaling pathway

胃癌恶变程度高、进展快、预后差,是世界范围内常见的恶性肿瘤之一。我国是胃癌高发国家之一,胃癌发病率和病死率分别位居恶性肿瘤的第3、2位^[1]。顺铂是胃癌患者术前/术后化疗、晚期及癌变转移患者治疗的常用药物,可抑制肿瘤细胞DNA复制,损伤其细胞膜结构,有较好的广谱抗肿瘤活性^[2]。但随着用药时间的延长,顺铂对肿瘤细胞的毒性会有所降低,并产生耐药性,从而导致临床治疗失败,患者肿瘤复发^[3]。

瓦伯格(Warburg)效应是肿瘤的重要代谢特征,即肿瘤细胞无论是在有氧还是低氧环境下都可进行糖酵解,从而产生大量能量,以维持其高水平能量代谢,其中糖酵解途径与肿瘤细胞耐药的发生密切相关^[4]。因此,如何调控胃癌细胞的糖酵解,从而降低顺铂耐药性已成为当前研究的焦点之一。本课题组前期研究发现,密点麻蜥对胃癌细胞顺铂耐药有一定的逆转作用^[5];同时,以密点麻蜥为君药的复方蜥蜴散有多年的实验和临床研究基础,可促进缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)介导的磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, 又称Akt)信号通路的激活,影响上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白的表达,从而抑制胃癌细胞的侵袭、转移,阻断癌变^[6]。基于此,本研究拟以人胃癌顺铂耐药细胞MKN45/DDP移植瘤裸鼠为对象,初步探讨复方蜥蜴散对其糖酵解的影响及潜在机制,旨在为改善或逆转顺铂耐药提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括3111型CO₂细胞培养箱、EVOS™ XL Core型倒置显微镜(美国 Thermo Fisher

Scientific公司),RM2255型全自动轮转式石蜡切片机、Aperio LV1型切片扫描仪(德国 Leica公司),Amersham Imager 680RGB型超灵敏多功能成像仪(美国 GE公司),MiniProtean Tetra型蛋白电泳系统、iMark型酶标仪(美国 Bio-Rad公司),Stepone Plus型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI公司)等。

1.2 主要药品与试剂

复方蜥蜴散组方药材密点麻蜥、黄芪、白术、半枝莲、延胡索、山楂、白芍、山药、鹿角胶、乌梅、甘草(批号分别为2208036、1808123、1804052、2303340、2307204、2206048、1809146、2305020、20110903、1809011、2305057)均购自宁夏医科大学附属中医医院,其中君药密点麻蜥经宁夏医科大学药学院刘艳华教授鉴定为密点麻蜥 *Eremias multiocellata* Günther 的干燥全体,其余各药材经宁夏医科大学中医学院李卫强教授鉴定均为真品。

顺铂对照品(批号124L021,规格100 mg,纯度 $\geq 98.5\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8试剂盒(批号KGA311-KGA312)购自武汉博士德生物工程有限公司;苏木精染色液(批号BA-4041)购自珠海贝索生物技术有限公司;免疫组化试剂盒(批号2206C0809)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;全蛋白提取试剂盒(批号20220823)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青-链霉素双抗混合液(批号分别为2230182、2302008、20220705)均购自上海达特希尔生物科技有限公司;荧光定量PCR试剂盒(批号MQ00401S)购自莫纳(苏州)生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)酶联免

疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号 GEM0001、GEM0004)及兔源P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)单克隆抗体(批号 GB113291)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔源PI3K、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、Akt、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)、葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter-1, GLUT1)、己糖激酶2(hexokinase-2, HK2)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(批号分别为AF6241、AF3241、AF6261、AF0016、AF6280、AF5462、AF6176、AF5234、AF7018、S0001)均购自美国Affinity Biosciences公司;兔源多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)多克隆抗体(批号 GTX116046)购自美国GeneTex公司。

1.3 实验细胞与动物

人胃癌细胞MKN45(货号CTCC-ZHYC-0503)和人胃癌耐药细胞MKN45/DDP(货号CTCC-0520-NY)均购自浙江美森细胞科技有限公司。

SPF级BALB/c裸鼠32只,雄性,体重(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0006。所有裸鼠均饲养于宁夏医科大学实验动物中心[24 h光照/黑暗循环,温度(22±3)°C、相对湿度(50±10)%],自由摄食、饮水,适应性喂养1周后开始实验。本研究方案经宁夏医科大学实验动物中心实验动物福利伦理审查委员会批准,批准号为IACUC-NYLAC-2023-018。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养

将MKN45细胞接种于RPMI 1640完全培养基(含10%FBS、1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基,下同)中培养;将MKN45/DDP细胞接种于含0.1 μ g/mL顺铂的RPMI 1640完全培养基中培养以维持耐药性,于正式实验前2周接种于不含顺铂的RPMI 1640完全培养基中培养。培养条件均为37 °C、5%CO₂。待细胞生长至对数生长期进行实验。

2.1.2 2种细胞的增殖能力及耐药指数检测

采用CCK-8法检测。取对数生长期的MKN45和MKN45/DDP细胞,以 1×10^4 个/mL接种于96孔板中,培养24 h后,分别加入不同质量浓度的顺铂[即不同质量浓度顺铂组(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ g/mL的顺铂),质量浓度设置参照相关文献^[5]],同时设置对照组(加细胞,不加药)和空白组(无细胞,不加药),每组设置6个复孔。

培养48 h,加入CCK-8试剂适量,于37 °C孵育2 h,使用酶标仪在490 nm波长处检测各孔的吸光度(A)值,并计算细胞存活率[细胞存活率(%) = (A_{药物组} - A_{空白组}) / (A_{对照组} - A_{空白组}) × 100%]。以细胞存活率为纵坐标、顺铂质量浓度为横坐标,采用Graphpad Prism 8软件确定半数抑制浓度(IC₅₀),并计算耐药细胞的耐药指数(耐药指数为MKN45/DDP细胞与MKN45细胞的IC₅₀比值)。

2.2 动物实验

2.2.1 复方蜥蜴散水煎液的制备

采用传统煎煮方法,按组方比例称取复方蜥蜴散组方药材,用水定容至1 000 mL,浸泡40 min后煮沸;待温度降至80 °C,继续煎煮至500 mL,用纱布过滤;药渣加水800 mL,同法第2次煎煮;合并2次煎煮药液,根据前期预实验结果,按照《伤寒论》的去渣再煎之法,将上述煎煮药液浓缩成质量浓度为0.28 g/mL(以生药量计)的水煎液,于4 °C保存,备用。

2.2.2 胃癌耐药裸鼠移植瘤模型的建立

参考文献方法^[5]建立胃癌耐药裸鼠移植瘤模型:于无菌条件下取 1×10^7 个/mL的MKN45/DDP细胞悬液[以磷酸盐缓冲液(PBS)为溶剂]0.2 mL,皮下接种至BALB/c裸鼠的右前腋窝,若接种1周后可扪及明显肿块则表明胃癌耐药裸鼠移植瘤模型复制成功。

2.2.3 分组与给药

将造模成功的裸鼠随机分为模型组、顺铂组、复方蜥蜴散组、联合组,每组8只(由第三方对裸鼠进行随机编号,以防止选择性偏倚)。复方蜥蜴散组裸鼠灌胃复方蜥蜴散水煎液(2.8 g/kg,剂量参照相关文献^[6-7]),每天2次;顺铂组裸鼠腹腔注射顺铂(0.002 g/kg,以生理盐水为溶剂,剂量参照相关文献^[5]),每周2次;联合组裸鼠灌胃复方蜥蜴散水煎液(2.8 g/kg),每天2次,同时腹腔注射顺铂(0.002 g/kg),每周2次;模型组裸鼠灌胃等体积生理盐水。各组均连续干预4周。

2.2.4 裸鼠肿瘤体积及肿瘤生长抑制率的检测

自给药起,每4 d测量各组裸鼠的体重,计算肿瘤体积[肿瘤体积(V) = $a \times b^2 / 2$ (式中,a为长径,b为短径)]^[8],并绘制裸鼠体重和肿瘤体积生长曲线。末次给药24 h后,各组裸鼠以1%戊巴比妥钠(4 mg/kg)腹腔注射麻醉后处死,完整剥离肿瘤组织,同法计算其体积,并计算肿瘤生长抑制率[肿瘤生长抑制率(%) = (裸鼠处死后模型组肿瘤体积 - 裸鼠处死后药物组肿瘤体积) / 裸鼠处死后模型组肿瘤体积 × 100%]^[8]。

2.2.5 裸鼠肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平检测

采用ELISA法检测。取“2.2.4”项下各组裸鼠的肿瘤组织,剪碎。取该组织适量,加入10倍量的PBS匀浆,

再经超声(功率150 W,频率20 kHz)处理至澄清;将上述匀浆液以4 000 r/min离心15 min,取上清液,参照相应试剂盒说明书方法操作,以酶标仪检测其肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平。

2.2.6 裸鼠肿瘤组织中MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA mRNA表达检测

采用实时PCR(real-time PCR, RT-PCR)法检测。取各组裸鼠肿瘤组织适量,提取总RNA,测定浓度及纯度后,将其逆转录为cDNA。以所得cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系(20 μ L)包括cDNA模板1 μ L,2 \times SuperReal PreMix Plus试剂10 μ L,10 μ mol/L的上、下游引物各0.6 μ L,无酶ddH₂O 7.8 μ L。PCR条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min;94 $^{\circ}$ C变性10 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法检测各目的基因mRNA的表达水平,结果以对照组为参照进行归一化处理。PCR引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
MRP1	正向:GTCGGGGCAATATCTCTGGC	117
	反向:CTGAAGACTGAACCTCCCTTCT	
P-gp	正向:GGGATGGTCAGTGTGATGGA	110
	反向:GCTATCGTGGTGGCAACAATA	
GLUT1	正向:GGCCAAGAGTGTGCTAAAGAA	201
	反向:ACAGCGTTGATGCCAGACAG	
LDHA	正向:TTGACTACGTGGCTTGAAG	91
	反向:GGTAACGGAATCGGGCTGAAT	
β -actin	正向:CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
	反向:CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

2.2.7 裸鼠肿瘤组织中相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取各组裸鼠肿瘤组织适量,加入裂解液(全程冰上操作),于4 $^{\circ}$ C以12 000 r/min离心10 min,取上清液,测定浓度后,将其与5 \times 还原型蛋白上样缓冲液(体积比4:1)充分混匀,随后于沸水浴中变性10 min。取变性蛋白适量,进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转至聚偏二氟乙烯膜上,以快速封闭液孵育15 min;洗膜后,加入通路相关蛋白(PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt)、耐药相关蛋白(MRP1、P-gp)、糖酵解相关蛋白(GLUT1、LDHA)、内参(β -actin)一抗(稀释比例分别为1:500、1:500、1:500、1:500、1:1 000、1:1 000、1:500、1:500、1:3 000),于4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于室温下孵育2 h;加入ECL化学发光液显影后,置于超灵敏多功能成像仪下成像,用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的条带灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量,以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt蛋白的相对表达量比值表示PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平。

2.2.8 裸鼠肿瘤组织中HK2、PKM2蛋白表达的检测

采用免疫组织化学法检测。取各组裸鼠肿瘤组织适量,用4%多聚甲醛溶液固定24 h、流水冲洗12 h后,行常规脱水、透明、切片、烤片、脱蜡、水化、热修复及封闭,加入HK2、PKM2一抗(稀释比例均为1:100),于4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗膜3次后,加入相应二抗(稀释比例为1:200),再经DAB显色、苏木精复染、乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后,使用显微镜观察,采用Image J软件对阳性染色区域(呈棕色或棕黄色)的平均光密度进行分析,以表示目的蛋白的表达水平。

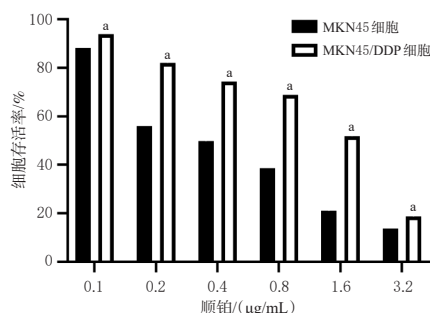
2.3 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,采用GraphPad Prism 8.0软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

在0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ g/mL顺铂的干预下,耐药细胞MKN45/DDP的存活率均显著高于亲本细胞MKN45($P<0.05$);MKN45/DDP和MKN45细胞的IC₅₀分别为(1.052 0 \pm 0.221 9)、(0.372 1 \pm 0.238 0) μ g/mL,耐药指数为2.827。结果见图1。



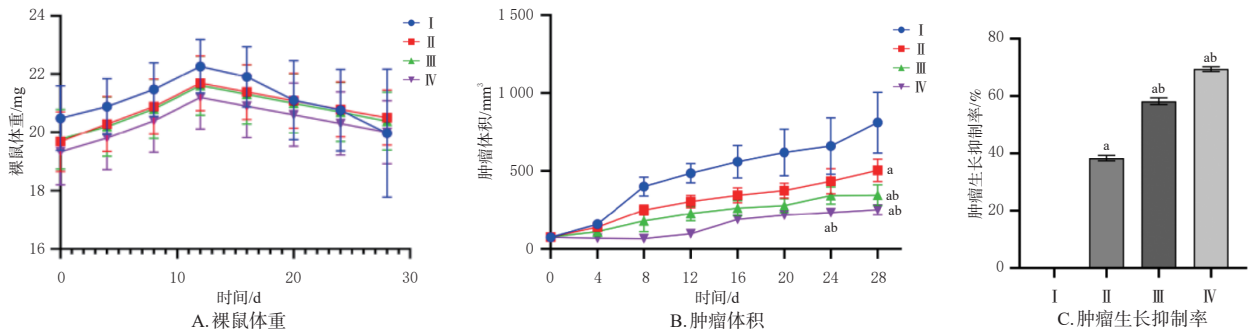
a: 与MKN45细胞比较, $P<0.05$ 。

图1 人胃癌MKN45亲本细胞与MKN45/DDP耐药细胞的存活率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 动物实验结果

3.2.1 复方蜥蜴散对胃癌裸鼠体重、肿瘤体积及肿瘤生长的影响

裸鼠体重曲线(图2A)显示,各药物组裸鼠各时间点的体重与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。肿瘤生长曲线(图2B)显示,顺铂组、复方蜥蜴散组裸鼠第28天时的肿瘤体积和联合组裸鼠第24、28天的肿瘤体积均显著小于模型组,且复方蜥蜴散组裸鼠第28天的肿瘤体积和联合组裸鼠第24、28天的肿瘤体积均显著小于顺铂组($P<0.05$)。肿瘤生长抑制率检测结果(图2C)显示,各药物组裸鼠的肿瘤生长抑制率均显著高于模型组,且复方蜥蜴散组和联合组裸鼠的肿瘤生长抑制率均显著高于顺铂组($P<0.05$)。

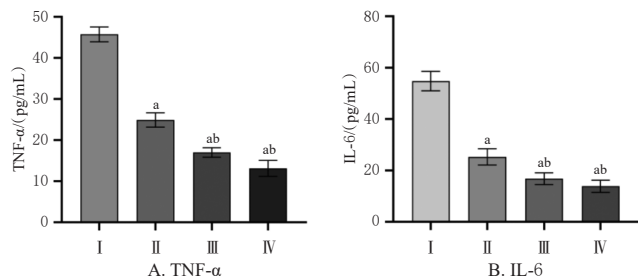


I: 模型组; II: 顺铂组; III: 复方蜥蜴散组; IV: 联合组; a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与顺铂组比较, $P < 0.05$ 。

图2 各组裸鼠的体重、肿瘤体积和肿瘤生长抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2.2 复方蜥蜴散对胃癌裸鼠肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平的影响

与模型组比较,各药物组裸鼠肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平均显著降低($P < 0.05$),且复方蜥蜴散组和联合组上述指标均显著低于顺铂组($P < 0.05$)。结果见图3。



I: 模型组; II: 顺铂组; III: 复方蜥蜴散组; IV: 联合组; a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与顺铂组比较, $P < 0.05$ 。

图3 各组裸鼠肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2.3 复方蜥蜴散对胃癌裸鼠肿瘤组织中MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA mRNA表达的影响

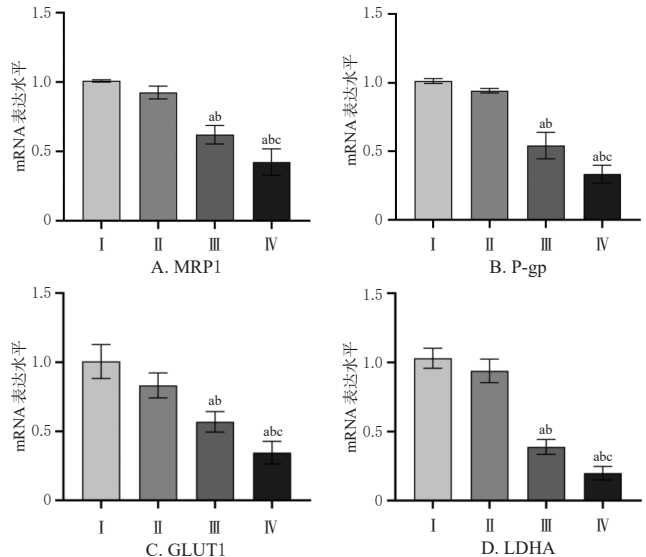
与模型组和顺铂组比较,复方蜥蜴散组和联合组裸鼠肿瘤组织中MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA mRNA的表达水平均显著降低,且联合组上述指标水平均显著低于复方蜥蜴散组($P < 0.05$)。结果见图4。

3.2.4 复方蜥蜴散对胃癌裸鼠肿瘤组织中相关蛋白表达的影响

与模型组和顺铂组比较,复方蜥蜴散组和联合组裸鼠肿瘤组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA蛋白的相对表达量均显著降低,且联合组上述指标均显著低于复方蜥蜴散组($P < 0.05$)。结果见图5、表2。

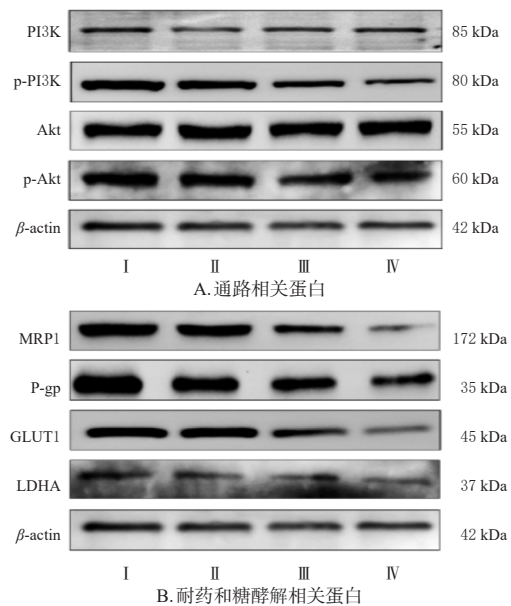
3.2.5 复方蜥蜴散对裸鼠肿瘤组织中HK2、PKM2蛋白表达的影响

与模型组比较,各药物组裸鼠肿瘤组织中HK2、PKM2蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$),且复方蜥蜴散组和联合组上述指标均显著低于顺铂组($P < 0.05$)。结果见图6。



I: 模型组; II: 顺铂组; III: 复方蜥蜴散组; IV: 联合组; a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与顺铂组比较, $P < 0.05$; c: 与复方蜥蜴散组比较, $P < 0.05$ 。

图4 各组裸鼠肿瘤组织中MRP1、P-gp、GLUT1、LDHA mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)



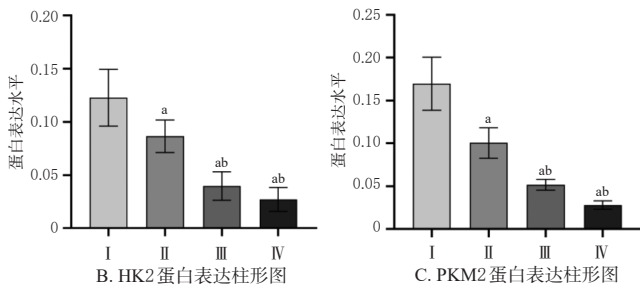
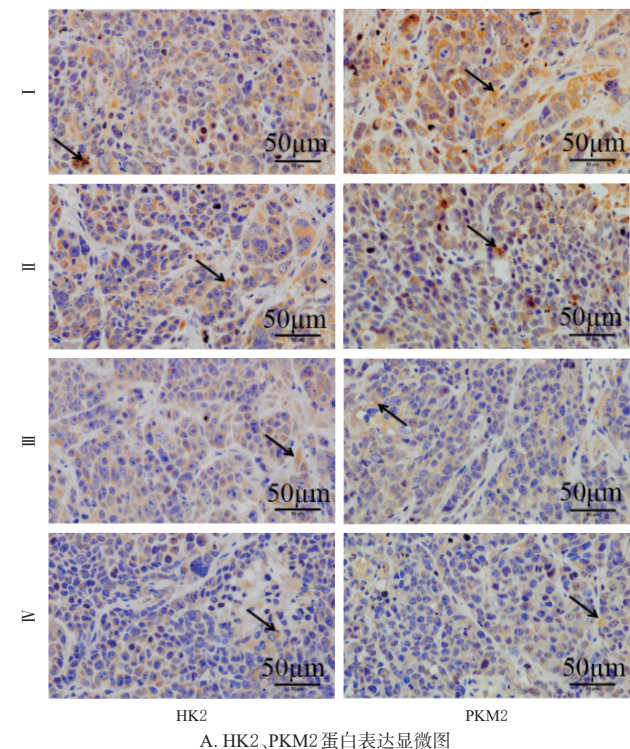
I: 模型组; II: 顺铂组; III: 复方蜥蜴散组; IV: 联合组。

图5 各组裸鼠肿瘤组织中相关蛋白表达的电泳图

表2 各组裸鼠肿瘤组织中相关蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	MRP1/ β -actin	P-gp/ β -actin	GLUT1/ β -actin	LDHA/ β -actin
模型组	0.49 \pm 0.04	2.02 \pm 0.04	1.77 \pm 0.03	2.54 \pm 0.07	1.43 \pm 0.03	1.09 \pm 0.04
顺铂组	0.42 \pm 0.02	1.97 \pm 0.02	1.71 \pm 0.04	2.44 \pm 0.06	1.40 \pm 0.01	1.05 \pm 0.05
复方蜥蜴散组	0.29 \pm 0.01 ^{ab}	1.64 \pm 0.09 ^{ab}	0.95 \pm 0.01 ^{ab}	1.61 \pm 0.04 ^{ab}	0.96 \pm 0.09 ^{ab}	0.79 \pm 0.05 ^{ab}
联合组	0.19 \pm 0.02 ^{abc}	1.42 \pm 0.10 ^{abc}	0.29 \pm 0.01 ^{abc}	1.13 \pm 0.01 ^{abc}	0.78 \pm 0.08 ^{abc}	0.59 \pm 0.01 ^{abc}

a:与模型组比较, $P<0.05$;b:与顺铂组比较, $P<0.05$;c:与复方蜥蜴散比较, $P<0.05$ 。



箭头:对应蛋白阳性表达; I:模型组; II:顺铂组; III:复方蜥蜴散组; IV:联合组;a:与模型组比较, $P<0.05$;b:与顺铂组比较, $P<0.05$ 。
图6 各组裸鼠肿瘤组织中HK2、PKM2蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

化疗耐药是导致胃癌晚期患者治疗失败及复发的一个关键因素,但其耐药机制较复杂,涉及肿瘤微环境、肿瘤细胞自噬等诸多因素。其中,肿瘤细胞的能量代谢在胃癌的发生发展中具有重要作用。研究表明,胃癌细胞能量代谢过程中的糖酵解与化疗耐药密切相关^[9]。研究指出,在缺血缺氧的状态下,胃黏膜低葡萄糖、低能量供给的微环境能够促进胃癌等肿瘤细胞的糖酵解,从而

快速为肿瘤细胞提供能量,并促使其对顺铂等化疗药物产生耐药性^[9-10]。

耐药细胞模型是肿瘤细胞耐药研究的常见细胞模型之一^[11]。基于此,本研究以人胃癌亲本细胞MKN45、胃癌耐药细胞MKN45/DDP为对象,分别对其增殖能力和耐药情况进行了检测。结果显示,顺铂对MKN45、MKN45/DDP细胞均表现出了一定的增殖抑制作用,且呈一定的浓度趋势;同时,经同一浓度顺铂的干预后,MKN45/DDP细胞的存活率均显著高于MKN45细胞,耐药指数为2.827。上述结果表明,与人胃癌亲本细胞MKN45比较,耐药细胞MKN45/DDP对顺铂具有更高的耐药性。

复方蜥蜴散具有解毒通络、益气养阴、扶正祛邪之功效。其中,君药密点麻蜥味咸、性寒,归肺、肝、肾经,有活血化瘀、消癥散结之效;配伍黄芪、白术、半枝莲、延胡索、乌梅、白芍、鹿角胶等药材,可益气养阴、通络和胃、扶正抑癌。本研究中的裸鼠体重曲线、肿瘤生长曲线及肿瘤生长抑制率检测结果显示,顺铂、复方蜥蜴散及两药联用均对裸鼠的体重无明显影响;同时,顺铂、复方蜥蜴散及两药联用均对裸鼠肿瘤生长有不同程度的抑制作用,且复方蜥蜴散及两药联用的效果优于顺铂。

TNF- α 、IL-6是参与先天免疫的必需炎症因子,二者在肿瘤的发生发展中具有重要作用^[12]。研究表明,TNF- α 、IL-6高表达是诱导胃癌耐药的因素之一,IL-6可通过激活TNF- α 相关信号通路,诱导胃癌裸鼠对顺铂耐药^[13];同时,TNF- α 、IL-6亦可通过激活HK2、LDHA等糖酵解酶的活性来促进糖酵解^[14]。本研究结果表明,顺铂、复方蜥蜴散及两药联合均可显著降低裸鼠肿瘤组织中TNF- α 、IL-6水平,并显著下调HK2、LDHA(顺铂组除外)蛋白的表达,且复方蜥蜴散及两药联用的效果优于顺铂,提示复方蜥蜴散可能通过降低肿瘤相关炎症因子水平来抑制胃癌细胞的糖酵解,从而改善其耐药性。

PI3K/Akt信号通路是肿瘤发生发展的典型通路。肿瘤细胞在低氧微环境下,PI3K/Akt信号通路表达失常,可导致胃黏膜环境失和,使该通路的重要蛋白3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1激活,进而促进PKM2、GLUT1、LDHA等多个糖酵解酶编码基因的转录,最终引发Warburg效应^[6,15]。本研究结果显示,复方蜥蜴散组和联合组裸鼠肿瘤组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和LDHA、GLUT1蛋白的表达,以及各药物组裸鼠肿瘤组织中PKM2蛋白的表达均较模型组显著降低或下调,且复方蜥蜴散组、联合组上述指标显著低于顺铂组,联合组上述指标(PKM2蛋白除外)显著低于复方蜥蜴散组,提示复方蜥蜴散可通过抑制PI3K/Akt信号通路的活

化来降低相关糖酵解酶的表达,从而抑制移植瘤裸鼠体内耐药细胞的糖酵解活性。

P-gp、MRP1 为跨膜转运蛋白,是肿瘤细胞发生耐药的标志性蛋白,可通过降低细胞内化疗药物的浓度来抑制肿瘤细胞的杀伤作用^[5,11]。本研究结果显示,与模型组和顺铂组比较,复方蜥蜴散组和联合组裸鼠肿瘤组织中P-gp、MRP1 蛋白的表达均显著下调,且联合组显著低于复方蜥蜴散组。因此笔者推测,复方蜥蜴散可能通过抑制耐药蛋白表达、减少药物外排来发挥逆转胃癌顺铂耐药的作用。

综上所述,复方蜥蜴散可通过减少肿瘤相关炎症因子的分泌,抑制糖酵解、耐药相关蛋白及基因的表达,抑制PI3K/Akt信号通路的活化来抑制胃癌耐药细胞移植瘤裸鼠的肿瘤生长,具有一定的顺铂增效及逆转耐药的作用。本研究为该方靶向胃癌耐药的代谢研究提供了新的思路,但其具体机制仍有待进一步探讨。

参考文献

[1] THRIFT A P, EL-SERAG H B. Burden of gastric cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3):534-542.

[2] YUE P, HAN B J, ZHAO Y. Focus on the molecular mechanisms of cisplatin resistance based on multi-omics approaches[J]. Mol Omics, 2023, 19(4):297-307.

[3] ZHAO X Y, FU J F, TANG W F, et al. Inhibition of serine metabolism promotes resistance to cisplatin in gastric cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:4833-4842.

[4] GUO S J, ZHANG C H, ZENG H O, et al. Glycolysis maintains AMPK activation in sorafenib-induced Warburg effect[J]. Mol Metab, 2023, 77:101796.

[5] 程翻娥,白星,李铮,等. 密点麻蜥不同部位调控NF-κB/SNAIL通路干预胃癌顺铂耐药研究[J]. 中草药, 2023, 54(15):4920-4927.

CHENG F E, BAI X, LI Z, et al. Different parts of *Eremias multiocellata* on intervention of cisplatin resistance in gastric cancer by regulating NF-κB/SNAIL pathway[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15):4920-4927.

[6] 李卫强,兰苗苗,景燕燕,等. 复方蜥蜴散基于HIF-1α介导PI3K/AKT通路干预裸鼠胃癌浸润转移[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(6):1369-1374.

LI W Q, LAN M M, JING Y Y, et al. Based on HIF-1α mediating PI3K/AKT pathway of the Compound lizard powder intervention in invasion and metastasis of nude mice gastric cancer[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(6):1369-1374.

[7] 兰苗苗. 基于HIF-1α介导PI3K/AKT信号通路研究复方蜥蜴散从毒瘀交阻干预胃癌EMT的作用机制[D]. 银

川:宁夏医科大学,2021.

LAN M M. Mechanism study on intervention of Compound lizard powder on EMT of gastric cancer from duyu-jiaozu based on HIF-1α mediated PI3K/AKT signal pathway[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2021.

[8] 伊庆亭. TLR4/Nanog/ABCF2途径在裸鼠模型中多烯磷脂酰胆碱逆转胃癌细胞铂类耐药的作用及机制研究[D]. 青岛:青岛大学,2019.

YI Q T. To explore the effect and mechanism of TLR4/Nanog/ABCF2 pathway in reversing platinum resistance of gastric cancer cells by polyene phosphatidylcholine in the nude mouse model[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.

[9] QIAN Y, WU X, WANG H X, et al. MicroRNA-4290 suppresses PDK1-mediated glycolysis to enhance the sensitivity of gastric cancer cell to cisplatin[J]. Rev Bras De Pesquisas Med E Biol, 2020, 53(5):e9330.

[10] 张慧芳,曾志军,周艳宏. 乳酸代谢:肿瘤治疗新靶点[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(2):147-157.

ZHANG H F, ZENG Z J, ZHOU Y H. Lactic acid metabolism in tumors: a novel target for therapy[J]. Prog Biochem Biophys, 2021, 48(2):147-157.

[11] KONG F B, DENG Q M, DENG H Q, et al. Siva-1 regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting MDR1 and MRP1 via the NF-κB pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2):1558-1566.

[12] JU X L, ZHANG H, ZHOU Z D, et al. Tumor-associated macrophages induce PD-L1 expression in gastric cancer cells through IL-6 and TNF-α signaling[J]. Exp Cell Res, 2020, 396(2):112315.

[13] 丁忠阳,王柯,梅丹,等. IL-6通过激活HIF-1α促进人胃癌MKN45细胞裸鼠移植瘤顺铂耐药的作用及机制研究[J]. 中国现代手术学杂志, 2019, 23(3):161-165.

DING Z Y, WANG K, MEI D, et al. IL-6-mediated HIF-1α activation promotes the resistance of gastric cancer transplanted tumors to cisplatin in BALB/c nude mice[J]. Chin J Mod Oper Surg, 2019, 23(3):161-165.

[14] TAN Q, HUANG Q, MA Y L, et al. Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 44:18-27.

[15] WANG Y X, PAN S L, HE X H, et al. CPNE1 enhances colorectal cancer cell growth, glycolysis, and drug resistance through regulating the AKT-GLUT1/HK2 pathway[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14:699-710.

(收稿日期:2023-11-03 修回日期:2024-03-25)

(编辑:张元媛)