

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨“理气化湿方”对接种胃癌 MGC-803 细胞裸鼠肿瘤组织关键因子 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+ 表达的影响

周晓明 邵荣世 王 峰 孙慧丽 景 姍 刘金狄

(南京中医药大学南通附属医院, 江苏南通 226000)

摘 要 目的:观察理气化湿方对皮下接种胃癌MGC-803细胞裸鼠肿瘤组织的干预作用及其对瘤体 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因和蛋白表达的影响。方法:将胃癌MGC-803细胞接种于健康雄性裸鼠腋下,成瘤后将裸鼠随机分为模型组、胃复春组(0.56 g/kg)和理气化湿方低、中、高剂量(3.9、7.8、15.6 g/kg)组,每组7只。各组分别灌胃给予相应药物或生理盐水,每日1次,共灌胃4周。灌胃结束后处死所有裸鼠,取肿瘤组织,切片、染色,显微镜下观察病理组织学改变。另一部分肿瘤组织应用RT-PCR法、Western Blot法检测 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因和蛋白的表达情况。结果:模型组肿瘤组织细胞大小形态不一,核浆比例增大,核分裂明显,个别腺体呈共壁现象或囊状扩张;理气化湿方中、高剂量组肿瘤组织细胞形态较均匀,固有腺体排列整齐紧密,偶有淋巴细胞浸润,腺上皮和腺管分界清楚。与模型组比较,各给药组肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因与蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$),其中理气化湿方中、高剂量组上述基因与蛋白表达水平明显低于胃复春组($P < 0.05$),而中、高剂量组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:理气化湿方可通过抑制 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+增殖,调控Wnt/ β -catenin信号通路的异常活化,从而改善瘤体的病理状态、分化程度。

关键词 理气化湿方;胃癌MGC-803细胞; β -catenin;Wnt3a;Lgr5+;病理学;裸鼠;雄性

中图分类号 R289.55 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2021)12-0070-04

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81473632);南通市科技局项目(MS12020002,JCZ18040)

根据2021年国家卫生健康委公布的最新数据显示,2020年我国胃癌的新发病例与死亡病例仍高居所有肿瘤第3位,以胃窦部较为多见^[1-2]。Wnt/ β -catenin作为最经典的信号通路之一,普遍存在于多种肿瘤中,其异常活化经常伴随着肿瘤的发生。中医药治疗胃癌有多靶点、不良反应少等优势。邵荣世教授总结其近40年的临床经验,认为胃癌的病机关键是虚实相兼致使病情迁延复杂,气滞湿阻、胃络失养,提出治疗当以理气化湿为基本原则,自拟理气化湿方,临床疗效较好。本研究在既往研究的基础上,继续探寻理气化湿方对Wnt/ β -catenin信号通路的调控作用,以进一步揭示其干预胃癌的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物与细胞 雄性BALB/c裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,于南通大学实验动物中

心代养,体质量为(17 $\pm$ 1) g,生产许可证:SCXK(沪)2017-0005,使用许可证:SYXF(苏)2017-0046。裸鼠饲养于SPF环境EVC盒内,湿度控制在(55 $\pm$ 5)%,温度控制在(23 $\pm$ 2)℃,饲喂⁶⁰Co γ 辐照灭菌的双狮牌饲料,自由采食和饮水,定期更换笼具、垫料,采用14 h:10 h明暗交替照明。MGC-803细胞系,培养基为90%IMDM+10%FBS+双抗,于5%CO₂、饱和湿度、37℃的CO₂培养箱中培养,根据细胞生长情况,2 d左右以1:3浓度传代。

1.2 实验药物 理气化湿方,药物组成:紫苏梗、厚朴、炒枳壳、陈皮、三七、莪术、藤梨根,使用江阴天江药业有限公司生产的颗粒剂,购自南通市中医医院免煎中药房。胃复春(药物成分:红参、香茶菜、枳壳等),由杭州胡庆余堂药业有限公司生产,0.36 g/片,国药准字Z33020146,采购于南通市中医医院西药房。

1.3 主要试剂与仪器 见表1、表2。

表1 主要试剂

试剂名称	试剂来源	货号
BCA蛋白定量试剂盒	BIOSHARP	BL521A
30%丙烯酰胺(29:1)	上海国药	南通麦杰
1.5 mol/L Tris-HCl电泳缓冲液(pH=8.8)	上海国药	南通麦杰
1.0 mol/L Tris-HCl电泳缓冲液(pH=6.8)	上海国药	南通麦杰
10%十二烷基硫酸钠	上海国药	南通麦杰
10%过硫酸铵	SIGMA	南通麦杰
四甲基乙二胺	SIGMA	南通麦杰
4×蛋白上样缓冲液	TAKARA	南通麦杰
蛋白预染Marker	Thermo	Thermo
丽春红S	上海国药	南通麦杰
pvd膜	millipore	HATF00010
5%牛血清白蛋白溶液	BIOSHARP	南通麦杰
PBS磷酸盐缓冲液	南通麦杰	南通麦杰
Tween-20 吐温-20	Amresco	BYL40713
发光液	Millipore	WBKLS0100

表2 主要仪器

仪器名称	仪器来源	型号
电泳仪	BIO-RAD公司	mini protean 3 cell
电转仪	大连竞迈科技有限公司	PS-9
酶标仪	Thermo	MK3
移液器	Thermo	F2
水浴锅	Leica(莱卡公司)	HI1210
一体式化学发光成像仪	Chemi Scope	5300Pro

2 实验方法

2.1 造模、分组与给药 选取雄性裸鼠,用1 mL医用注射器将胃癌MGC-803细胞按 1×10^6 cells/只接种于裸鼠腋下,待裸鼠皮下成瘤后,选35只,按随机数字表法随机分为模型组、胃复春组和理气化湿方高、中、低剂量组,每组7只。测量各组裸鼠体质量和瘤体大小,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

取紫苏梗10 g、厚朴6 g、炒枳壳10 g、陈皮6 g、三七3 g、莪术10 g、藤梨根15 g,使用江阴天江药业有限公司生产的颗粒剂,研磨后溶于蒸馏水中,配制成浓度为0.156、0.312、0.624 g/mL的溶液。胃复春配置为0.025 g/mL的溶液。分组后对各组裸鼠灌胃给予相应药物或生理盐水:胃复春组灌胃剂量为0.56 g/kg,理气化湿方高、中、低剂量组给药剂量分别为3.9、7.8、15.6 g/kg,模型组灌胃等量生理盐水,均为每日1次,共4周。

2.2 指标检测 末次给药或生理盐水后,所有裸鼠禁食不禁水24 h,颈椎脱臼处死,沿腋下剖开,

取肿瘤组织。一部分放入液氮中冻存,准备进行分子实验;一部分放入福尔马林保存,拟进行形态学观察。

2.2.1 瘤体病理组织形态学 取部分肿瘤组织,4%多聚甲醛4℃固定48 h;将固定好的标本用流水冲洗30 min,冲洗掉多余的固定液,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,脱蜡,包埋,切片,切片厚度为4 μm,经二甲苯脱蜡2次,每次5 min;中性树胶封固,显微镜下观察。

2.2.2 Real Time PCR(RT-PCR)法检测瘤体组织中β-catein、Wnt3a、Lgr5+基因表达 取部分肿瘤组织,用总RNA提取试剂TRIzol提取组织RNA,具体实验操作按TRIzol说明书进行,按逆转录试剂盒说明书将RNA反转录成cDNA。按荧光定量PCR Mixs操作方法做RT-PCR。最终将冰上的96-PCR板放于Real Time PCR仪并进行PCR反应。以2 μL加样量的各样品目的基因和内参进行RT-PCR反应。选用管家基因GAPDH作为内参,其在不同样品间的表达量基本保持恒定,以校正实验过程中的误差。RNA逆转录效率和RNA浓度定量等均可以产生这些误差,造成2 μL体积各样品的CDNA含量不同,故采用内参校正。按照RT-PCR检测的原始结果,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式,进行最终测算。

2.2.3 Western Blot法检测瘤体组织中β-catein、Wnt3a、Lgr5+蛋白表达 将收集的瘤体组织剪碎加入蛋白酶抑制剂及蛋白裂解液,提取总蛋白。蛋白上样并电泳,300 mA、90 min转膜并室温封闭2 h。各抗体按比例稀释,一抗4℃孵育过夜。隔日4℃环境下拿出膜,室温孵育30 min。TBST洗膜5次,每次3 min。用5%脱脂奶粉-TBST稀释二抗,山羊抗兔IgG(H+L)HRP和山羊抗鼠IgG(H+L)HRP,1:10 000,室温轻摇40 min。TBST洗膜6次,每次3 min。ECL加到膜上后反应3~5 min,胶片曝光:10 s~5 min(曝光时间随不同光强度而调整),显影2 min,定影。将膜浸于ECL发光液中,避光显色3 min,将膜用滤纸吸干,置于全自动化学发光图像分析系统中扫描,分析相应条带,测算蛋白表达。

2.3 统计学方法 全部实验数据使用SPSS 23.0软件进行统计分析。检验实验数据资料的正态性和方差齐性,当资料满足正态分布且组间方差齐时,定量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间的比较采用单因素方差分析;当方差分析有统计学意义时,采用校正LSD法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组裸鼠瘤体病理组织形态学比较 见图1。

模型组肿瘤组织细胞大小形态不一,核浆比例增大,核分裂明显,个别腺体呈共壁现象或囊状扩张。胃复春组肿瘤组织镜下可见水肿、充血和上皮坏死细胞脱落,间质内有淋巴细胞浸润,也可见少量嗜酸性粒细胞和中性粒细胞与核深染。理气化湿方低剂量组肿瘤组织可见腺体排列相对较整齐,细胞形态较均匀,腺上皮和腺管分界清楚,部分腺体可见萎缩,炎细胞浸润主要局限于黏膜浅层,固有腺体保持相对完整。理气化湿方中、高剂量组肿瘤组织细胞形态较均匀,固有腺体排列整齐紧密,偶有淋巴细胞浸润,腺上皮和腺管分界清楚,中、高剂量组组间并无显著差异。

3.2 各组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因表达比较 结果见表3。与模型组比较,各给药组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因表达水平均明显下降($P<0.05$);与胃复春组比较,理气化湿方中、高剂量组上述基因表达水平均有明显降低($P<0.05$),理气化湿方低剂量组则明显升高($P<0.05$);理气化湿方中、高剂量组上述基因表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.3 各组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+蛋白表达比较 结果见表4。与模型组比较,各给药组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与胃复春组比较,理气化湿方中、高剂量组上述蛋白表达水平均有明显降低($P<0.05$),理气化湿方低剂量组上述蛋白表达明显升高($P<0.05$);理气化湿方中、高剂量组上述蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

4 讨论

异常活化的Wnt/ β -catenin信号通路在多种肿瘤中普遍存在,上调的Wnt/ β -catenin信号促进了肿瘤的进展与恶化^[3-5]。多项研究显示,Wnt/ β -catenin信

号通路的异常激活,促进了人类癌症的发生和发展^[6-7]。

胃癌可归属于中医学“胃癌”范畴。第六批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师邵荣世教授认为,本病的发生与发展是一个漫长且复杂的过程,脾胃同居于中焦,主气血的生化与运行,共为后天之本,本病的主要病理机制为饮食不节、情志不畅导致气机郁滞、通降失司,日久化湿,使脉络不通,遂立理气化湿之法,自拟理气化湿方,理气、化湿、活血、通络,攻补兼施。方中紫苏梗行气宽中,兼顾疏肝理气,在促进消化液分泌的同时,增加胃肠动力;厚朴燥湿散满以运脾,行气导滞以除胀;炒枳壳行气消胀、祛痰除痞;陈皮具有降逆止呕、理气健脾、燥湿化痰、消痞散结之功,使补气而不至滞气。现代药理学研究发现,三七的主要有效成分三七总皂苷能够抑制人类胃癌细胞SGC-7901的增殖,并能有效地诱导其细胞周期停滞和

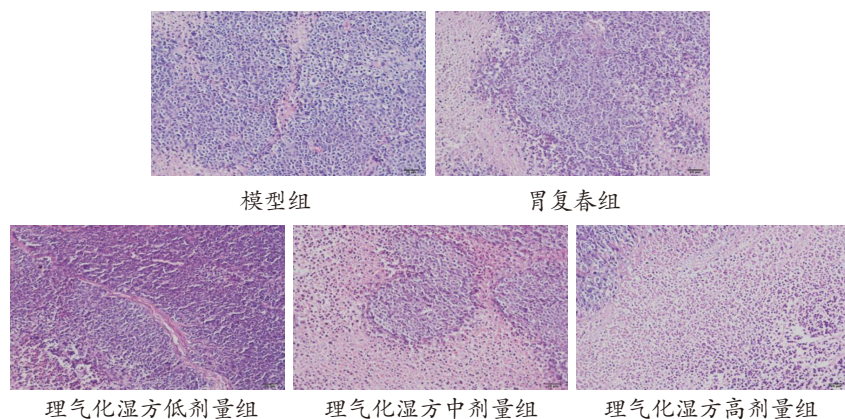


图1 各组裸鼠瘤体病理组织形态学比较(HE染色,×200)

表3 各组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	β -catenin	Wnt3a	Lgr5+
模型组	7	1.0000±0.00000 [△]	1.0000±0.00000 [△]	1.0000±0.00000 [△]
胃复春组	7	0.4856±0.02749*	0.5995±0.03869*	0.5883±0.06433*
理气化湿方低剂量组	7	0.6363±0.06958 [△]	0.7875±0.04554 [△]	0.6672±0.04087 [△]
理气化湿方中剂量组	7	0.3640±0.01820 [△]	0.4600±0.05569 [△]	0.3668±0.04385 [△]
理气化湿方高剂量组	7	0.3474±0.04028 [△]	0.4365±0.03693 [△]	0.3607±0.04503 [△]

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与胃复春组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表4 各组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	β -catenin	Wnt3a	Lgr5+
模型组	7	1.0000±0.04788 [△]	1.000±0.02110 [△]	1.0000±0.06323 [△]
胃复春组	7	0.5253±0.04178*	0.6535±0.03951*	0.6773±0.02426*
理气化湿方低剂量组	7	0.6798±0.03854 [△]	0.7404±0.04425 [△]	0.7552±0.04068 [△]
理气化湿方中剂量组	7	0.4260±0.02752 [△]	0.5669±0.03149 [△]	0.5183±0.02667 [△]
理气化湿方高剂量组	7	0.3809±0.03994 [△]	0.5179±0.01998 [△]	0.4463±0.04305 [△]

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与胃复春组比较, $\Delta P<0.05$ 。

凋亡^[8]；莪术挥发油中含有姜黄素、 β -榄香烯、莪术二酮等，都是莪术抗肿瘤的有效成分，其中姜黄素可以有效抑制多种线粒体的高表达，从而有效降低肿瘤侵袭及转移的可能性，对低分化MKN45细胞的增殖、迁移及侵袭抑制作用最强，且能够诱导其凋亡^[9]；藤梨根具有抗肿瘤、调节免疫及解热镇痛等作用^[10]，可通过调控PID-ATF2信号通路，达到抑制肿瘤的目的^[11-14]。

既往临床及实验研究已证实，理气化湿方能有效地改善胃黏膜肠上皮化生及不典型增生等病变的发生与发展^[15-18]。而通过大量的文献阅读，我们选择具有改变血液高凝状态，增加胃黏膜血流量，临床用于胃癌治疗的中成药胃复春作为阳性对照药。

各组瘤体病理组织形态学观察结果表明，与模型组比较，各给药组瘤体分化程度均有不同程度的改善，其中改善较为明显的是理气化湿方中、高剂量组，提示理气化湿方可有效改善瘤体病理状态、分化程度。

本研究结果显示，MGC-803细胞裸鼠皮下成瘤瘤体组织中 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+的基因及蛋白存在异常的高表达，提示胃癌的发生、发展过程可能伴随着多药耐药的产生；经理气化湿方、胃复春干预后，裸鼠瘤体组织 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+基因与蛋白表达均有明显下降，其中以理气化湿方中、高剂量作用最为明显。而 β -catenin、Wnt3a、Lgr5+是Wnt/ β -catenin信号通路上的关键因子，提示理气化湿方对胃癌的治疗作用，可能是通过抑制异常活化的Wnt/ β -catenin信号通路，从而抑制肿瘤。但本研究只观察了Wnt/ β -catenin信号通路，而中药复方发挥疗效是多成分、多靶点共同作用的结果，理气化湿方是否存在调节其他信号通路的作用，将是我们下一步的研究方向。

参考文献

- [1] PARK S Y, JEON S W, JUNG M K, et al. Long-term follow-up study of gastric intraepithelial neoplasias: progression from low-grade dysplasia to invasive carcinoma[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008, 20 (10): 966.
- [2] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见[J]. 胃肠病学, 2006, 11 (11): 674.
- [3] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169 (6): 985.
- [4] CHEN M, LI L, ZHENG P S. SALL4 promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells through activation of the Wnt/ β -catenin pathway via CTNNB1[J]. Cancer Sci, 2019, 110 (9): 2794.
- [5] SEBIO A, KAHN M, LENZ H J. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18 (6): 611.
- [6] KATOH M, KATOH M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review) [J]. Int J Mol Med, 2017, 40 (3): 587.
- [7] 何璠, 郑伟伟, 陈冰冰, 等. miR-139-5p靶向PAK5基因通过Wnt/ β -catenin信号通路对胃癌细胞侵袭和迁移的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2021, 29 (4): 174.
- [8] 高晓会, 张亚利, 张治业, 等. 三七总皂苷对人胃癌SGC-7901细胞增殖、侵袭及凋亡的影响[J]. 西北药学杂志, 2019, 34 (2): 245.
- [9] 刘文虎, 袁江北, 张帆, 等. 姜黄素通过Wnt3a/ β -catenin/EMT信号通路抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (14): 3107.
- [10] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 2677.
- [11] 袁振亚, 王明华, 翁阳. 激活转录因子-2在非特指型弥漫大B细胞淋巴瘤中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 广东医学, 2020, 41 (6): 575.
- [12] 田忠, 周雪宏, 贾弘提, 等. ATF-2在肿瘤发生中的作用[J]. 生理科学进展, 2012, 43 (6): 463.
- [13] 郑佳露, 闫霞, 沈克平, 等. 藤梨根抗肿瘤作用及机制[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (10): 2562.
- [14] 徐楚韵, 张光霁, 楼招欢, 等. 藤梨根有效组分抑制胃癌BGC-823细胞增殖与迁移作用的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34 (6): 602.
- [15] 邵荣世. 胃宁茶治疗慢性浅表性胃炎80例疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11 (19): 1902.
- [16] 邵荣世, 顾庆华, 季雁浩, 等. 胃宁茶治疗慢性萎缩性胃炎52例临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2003, 19 (2): 59.
- [17] 鞠晓云. 胃宁茶治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的实验研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [18] 邵荣世, 季雁浩, 顾庆华, 等. 胃宁茶袋泡茶剂治疗慢性萎缩性胃炎机理的实验研究[J]. 江苏中医药, 2005, 26 (12): 56.

第一作者: 周晓明 (1981—), 女, 医学硕士, 副主任中医师, 研究方向为中医脾胃病的诊疗。

通讯作者: 刘金狄, 医学博士。315053736@qq.com

收稿日期: 2021-09-04

编辑: 吴 宁