

青蒿琥酯通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制人胃癌裸鼠移植瘤生长及对 PCNA 和 ZNF139 表达的影响^Δ

刘晓蕾^{1*}, 马立东², 张朵朵³(1. 邯郸市第一医院老年病一科, 河北 邯郸 056000; 2. 邯郸市第一医院消化一科, 河北 邯郸 056000; 3. 河北省优抚医院内一科, 石家庄 050062)

中图分类号 R96;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)10-1201-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.10.011



摘要 目的:探讨青蒿琥酯通过 Toll 样受体(TLR)4/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路抑制人胃癌裸鼠移植瘤生长及对增殖细胞核抗原(PCNA)和锌指蛋白(ZNF)139 表达的影响。方法:40 只 BALB/c 裸鼠接种人胃癌细胞株 SGC7901 建模,随机分为模型组(0.9%氯化钠溶液)、顺铂组(顺铂 4 mg/kg)、青蒿琥酯组(注射用青蒿琥酯 100 mg/kg)和联合组(顺铂 4 mg/kg+注射用青蒿琥酯 100 mg/kg),瘤体内注射给药,1 周 2 次,持续 4 周。记录治疗期间裸鼠食欲、活动度和精神状态等情况以及肿瘤生长情况;采用苏木精-伊红染色法进行病理检测,噻唑蓝法(MTT)检测原代细胞生长,逆转录聚合酶链反应检测 PCNA、ZNF139、TLR4、髓样分化因子(MyD88)和 NF- κ B mRNA 表达水平,蛋白质印迹法检测相对蛋白表达水平。结果:与模型组比较,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组平均瘤重明显降低;与顺铂组比较,青蒿琥酯组平均瘤重升高,抑瘤率降低;联合组平均瘤重低于顺铂组和青蒿琥酯组,抑瘤率高于顺铂组和青蒿琥酯组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。培养 48 h 后,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组吸光度(OD)值均低于模型组;联合组 OD 值低于顺铂组和青蒿琥酯组,抑制率高于顺铂组和青蒿琥酯组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 及相对蛋白表达水平均明显降低;顺铂组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 及相对蛋白表达水平明显低于青蒿琥酯组;联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 及相对蛋白表达水平明显低于顺铂组和青蒿琥酯组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:青蒿琥酯可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,抑制人胃癌细胞的生长,同时能下调 PCNA 和 ZNF139 的表达,影响肿瘤增殖、侵袭和转移。

关键词 青蒿琥酯; 胃癌; 裸鼠; TLR4/NF- κ B 信号通路; 增殖细胞核抗原; 锌指蛋白

Inhibition of Artesunate on Growth of Transplanted Human Gastric Cancer Through TLR4/NF- κ B Signaling Pathway and Its Effects on Expression of PCNA and ZNF139^Δ

LIU Xiaolei¹, MA Lidong², ZHANG Duoduo³(1. Dept. of Geriatrics, the First Hospital of Handan, Hebei Handan 056000, China; 2. Dept. of Gastroenterology, the First Hospital of Handan, Hebei Handan 056000, China; 3. Dept. of Internal Medicine, Hebei Special Care Hospital, Shijiazhuang 050062, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the inhibition of artesunate on growth of transplanted human gastric cancer through Toll-like receptor (TLR) 4/nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway and its effects on expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and ZNF139. **METHODS:** Forty BALB/c nude mice were inoculated with human gastric cancer cell line SGC7901 for modeling and randomly divided into the model group (0.9% sodium chloride solution), cisplatin group (cisplatin 4 mg/kg), artesunate group (artesunate for injection 100 mg/kg) and combination group (cisplatin 4 mg/kg + artesunate for injection 100 mg/kg). Intratumoral injection was performed twice a week for 4 weeks. The appetite, activity, mental state and tumor growth of nude mice were recorded. Hematoxylin and Eosin staining were used for pathological detection, MTT assay was used to detect the growth of primary cells, reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of PCNA, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF- κ B, and Western blotting was used to detect the relative protein expression. **RESULTS:** Compared with the model group, the average tumor weight of cisplatin group, artesunate group and combined group decreased significantly; compared with the cisplatin group, the average tumor weight increased and the tumor inhibition rate decreased in the artesunate group; the average tumor weight of the combination group was lower

^Δ 基金项目:河北省医学科学课题研究计划项目(No. 20220491)

* 主治医师。研究方向:老年消化相关疾病的治疗。E-mail:qingxin166@126.com

than that of the cisplatin group and artesunate group, and the tumor inhibition rate was higher than that of the cisplatin group and artesunate group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). After 48 h of culture, the OD values of cisplatin group, artesunate group and combination group were lower than those of model group; the OD value of the combination group was lower than that of the cisplatin group and artesunate group, and the inhibition rate was higher than that of the cisplatin group and artesunate group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mRNA expression of PCNA, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF- κ B in the cisplatin group, artesunate group and combination group significantly decreased; the mRNA expression of PCNA, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF- κ B of the cisplatin group were significantly lower than those of the artesunate group; the mRNA expression of PCNA, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF- κ B of the combination group were significantly lower than those of the cisplatin group and artesunate group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Artesunate may inhibit the growth of human gastric cancer through inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway, which can down-regulate the expression of PCNA and ZNF139 and affect the proliferation, invasion and metastasis of tumor. KEYWORDS Artesunate; Gastric cancer; Nude mice; TLR4/NF- κ B signaling pathway; Proliferating cell nuclear antigen; Zinc finger protein

胃癌是我国死亡率居前3位的恶性肿瘤,极大地危害患者的生命健康。由于缺乏特殊临床表现,胃癌早期诊断率低,确诊时多为中晚期,该类患者手术治疗效果不佳,化疗敏感性低,5年生存率普遍 $<30\%$ ^[1]。相较于西医治疗,中药可作用于胃癌发生、发展多个环节,具有多环节、多靶点的特点,同时不良反应小、耐药性低,是我国治疗恶性肿瘤的特色疗法。青蒿琥酯是中药青蒿中分离得到的抗疟疾有效单体青蒿素的衍生物,具有抗感染、抗疟、免疫调节和抗肿瘤等多种生物活性^[2-3]。增殖、侵袭转移是胃癌演变过程中的重要步骤,也是造成患者预后差的主要原因,增殖细胞核抗原(PCNA)与DNA合成密切相关,在细胞增殖周期中作用关键;锌指蛋白(ZNF)家族成员对多种基因的转录调控发挥着重要作用。本实验以人胃癌裸鼠移植瘤动物模型为研究对象,分析青蒿琥酯对人胃癌裸鼠移植瘤生长及对PCNA和ZNF139表达的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞株

SPF级BALB/c裸鼠40只,8周龄,雌雄各半,体重(22±5)g,购自广东省医学实验动物中心,动物许可证号为SCXK(粤)2019-0035。适应性饲养1周,室温20~22℃,通风良好,自由饮水进食,12h明暗交替。人胃癌细胞株SGC7901购自中科院上海细胞所。

1.2 仪器

CKX53型光学显微镜(日本Olympus公司);LF-31DS型琼脂糖凝胶电泳设备(北京龙方科技有限公司);MQ-PYZ-82型电热恒温培养箱[中科美其(北京)科技有限公司];Fluocycle型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(上海科华生物工程股份有限公司)。

1.3 药品与试剂

注射用青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司,国药准字H10930195,规格为60mg);注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,国药准字H37021358,规格为10mg);氯化钠溶液(四川科伦

药业股份有限公司,国药准字H20083400,规格为500mL:4.5g);10%胎牛血清(FBS,澳大利亚Ausbian公司,货号为VS100TZ);RPMI 1640培养基(美国Thermo Fisher公司,批号为187256);Trizol Reagent(美国Invitrogen公司,批号为18572)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养:人胃癌细胞株SGC7901接种于1640培养基(10%FBS),5%CO₂,37℃和95%湿度条件下培养,每3d换液1次,待细胞生长汇合时按1:3传代,每周1~2次。经0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA混合消化液消化后收集对数生长周期细胞。

1.4.2 人胃癌裸鼠移植瘤模型建立:将收集的对数生长周期细胞按800r/min离心(离心半径为13.5cm)分离4min,弃置上清液后配制为单细胞悬液(2×10^7 个/mL)。无菌条件下接种于裸鼠腋下,剂量为0.2mL/只,继续饲养1周观察状态。以裸鼠皮下出现直径约5mm的结节为模型建立成功标准,40只裸鼠均建模成功,成瘤率为100%。

1.4.3 实验分组及干预方法:将40只建模成功裸鼠随机分为模型组、顺铂组、青蒿琥酯组和联合组,每组10只。顺铂组给予顺铂4mg/kg,青蒿琥酯组给予注射用青蒿琥酯100mg/kg,联合组给予顺铂4mg/kg+注射用青蒿琥酯100mg/kg,模型组给予等量0.9%氯化钠溶液。所有大鼠均瘤体内注射给药,给药体积为0.01mL/g,每周给药2次,持续4周。

1.4.4 标本处理:停药次日称重,摘眼球取血,处死裸鼠,取瘤体,剥离中心坏死组织和周围结缔组织,分为4份,1份采用甲醛固定进行病理检测,2份以液氮快速冰冻后于-80℃保存待检,1份研磨成细胞悬液进行原代细胞培养。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 一般情况观察:从药物干预开始直至停药,每日观察裸鼠食欲、活动度和精神状态等情况。

1.5.2 抑瘤作用观察:取各组裸鼠瘤体称重,计算抑瘤率=(模型组瘤体平均重量-干预组瘤体平均重量)/模型组瘤体平均重量 $\times 100\%$ 。

1.5.3 病理检测:固定后肿瘤组织常规石蜡包埋切片,采用苏木精-伊红染色法观察病理状态。石蜡切片经二甲苯、无水乙醇脱水后进行苏木素染色 10 min,自来水冲洗;分化液分化 30 s,温水浸泡 5 min,伊红染色 2 min;脱水、透明后封片,由病理科医师在光学显微镜下观察切片病理情况,每张切片选取 5 张无重复视野图像,采用盲式阅片,依据阳性细胞比例判定。

1.5.4 噻唑蓝法(MTT)检测原代细胞生长:将新鲜瘤体组织加入适量 PBS 溶液匀浆,移动细胞悬液至离心管,1 000 r/min 离心(离心半径为 13.5 cm)5 min 后弃置上清液,以 PBS 溶液冲洗 3 次,接种细胞培养至培养基,37 ℃、5% CO₂ 条件下培养;收集对数生长细胞,采用 RPMI 1640 培养基制成单细胞悬液,以 5×10⁴/mL 浓度接种于 96 孔板,以实验分组进行分组,设置 4 个复孔,相同条件下培养 48 h。完成后加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,培养 4 h;吸取各孔上清液后加入二甲基亚砷 200 μL,震荡 15 min 后采用酶标仪检测吸光度(OD)值(490 nm),计算抑制率(IR)=(1-阳性孔均值/对照孔均值)×100%。

1.5.5 逆转录 PCR 检测 PCNA、ZNF139、Toll 样受体(TLR)4、髓样分化因子(MyD88)和核因子 κB(NF-κB)的 mRNA 表达水平:-80 ℃条件下取肿瘤标本加入研磨器,加入 Trizol 试剂 1 mL,冰上快速充分研磨;转移组织匀浆至 EP 管,静置 15 min 后加入氯仿 200 μL,震荡充分混匀后静置 15 min;4 ℃条件下以 10 800 r/min 离心(离心半径为 13.5 cm)15 min;弃置上清液后加入 75%乙醇洗涤,晾干沉淀后加入无 RNA 酶水溶解沉淀。取适量 RNA 和上样缓冲液混合后,1.5%琼脂糖凝胶电泳(40 mA,80 V)30 min,紫外透射仪下观察条带,检测 RNA 完整性;吸取样品 1 μL,使用微量核酸蛋白检测仪检测浓度和纯度,-80 ℃保存。5 μg 为总 RNA 模板,构建逆转录体系,合成 cDNA,-20 ℃保存;以 cDNA 为模板,扩增目的基因。PCR 反应条件为 cDNA 和上、下游引物 1 μL,DEPC 水 7 μL,绿色体系 10 μL。引物序列及 PCR 反应条件如下,(1)PCNA(326 bp),上游引物为 5'-CGTCTGG CAGTGC GGCTC-3',下游引物为 5'-TGCTC GCCGCAGTAC TGCT-3';94 ℃、3 min,90 ℃、30 s,55 ℃、50 s,72 ℃、45 s,35 个循环,72 ℃、5 min。(2)ZNF139(482 bp),上游引物为 5'-CCGTCTGCTA GAGTGGCATG-3',下游引物为 5'-GCTGACTCA GCGCTGACTCCG-3';94 ℃、3 min,95 ℃、30 s,58 ℃、40 s,72 ℃、30 s,30 个循环,72 ℃、5 min。(3)β-actin(540 bp),上游引物为 5'-GTCCCCGGG AGGCTA CCA-3',下游引物为 5'-CTCCGGC TTAAGTGGCAGCCTTC-3';94 ℃、5 min,95 ℃、30 s,58 ℃、40 s,72 ℃、30 s,30 个循环,72 ℃、5 min。获得 PCR 产物后进行凝胶电泳,条件同上,以 β-actin 基因为内参,采用凝胶成像系统分析软件扫描灰度值分析 mRNA 水平。

1.5.6 蛋白质印迹法检测 PCNA、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 相对蛋白表达水平:-80 ℃条件下取肿瘤标本加入 RIPA 裂解液,冰上充分裂解,4 ℃条件下以 12 000 r/min 离心(离心半径为 13.5 cm)20 min;取定量上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度;总蛋白上样,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝

胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,每孔加入样品电泳后将凝胶转印至 PVDF 膜,以 5%脱脂奶粉封闭;稀释蛋白抗体(1:1 000)4 ℃孵育过夜,第 2 日用 TBST 冲洗 PVDF 膜,每次 5 min,共 3 次;加入二抗后室温孵育 1 h,TBST 冲洗,每次 5 min,共 3 次;膜上加入 ECL 显示液,凝胶成像系统曝光显色,记录内参条带和目的条带灰度值,以 β-actin 为内参分析蛋白表达水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

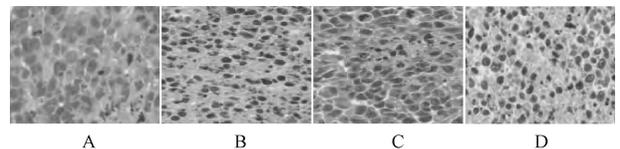
2 结果

2.1 一般情况比较

药物干预期间,各组裸鼠均未出现死亡。模型组裸鼠瘤体长势明显,进水、进食均明显减少,运动量减少,精神状态差,有嗜睡情况。顺铂组和青蒿琥酯组裸鼠肿瘤生长速度慢于模型组,食欲较好,运动量一般,精神状态和反应能力影响较小,有轻微嗜睡情况。联合组裸鼠肿瘤生长速度最低,食欲、运动、精神和反应能力未见明显影响。

2.2 病理结果比较

模型组胃癌细胞核细胞核增大、深染,可见明显的病理性核分裂象和恶性增殖,细胞量大、生长旺盛,紧密排列;与模型组比较,顺铂组胃癌细胞出现不同程度的凋亡,病理性核分裂象和恶性增殖明显减少,细胞排列分散,密度明显较低,可见明显空泡;青蒿琥酯组胃癌细胞病理性核分裂象和恶性增殖较模型组明显减少,细胞密度高于顺铂组,排列分散;联合组胃癌细胞病理性核分裂象和密度均低于顺铂组和青蒿琥酯组,见图 1。



A. 模型组;B. 顺铂组;C. 青蒿琥酯组;D. 联合组
A. model group; B. cisplatin group; C. artesunate group;
D. combination group

图 1 病理结果比较

Fig 1 Comparison of pathological results

2.3 移植瘤重及抑瘤率比较

与模型组比较,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组平均瘤重明显降低;与顺铂组比较,青蒿琥酯组平均瘤重升高,抑瘤率降低;联合组平均瘤重低于顺铂组和青蒿琥酯组,抑瘤率高于顺铂组和青蒿琥酯组,上述差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2。

2.4 移植瘤细胞生长抑制率比较

培养 48 h 后,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组的 OD 值均低于模型组;联合组的 OD 值低于顺铂组和青蒿琥酯组,抑制率高于顺铂组和青蒿琥酯组,上述差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 四组裸鼠移植瘤重及抑瘤率比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of tumor weight and tumor inhibition rate among four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	平均瘤重/g	抑瘤率/%
模型组 (n=10)	1.41±0.08	—
顺铂组 (n=10)	1.05±0.06 ^a	32.50±5.80
青蒿琥酯组 (n=10)	1.22±0.05 ^{ab}	22.35±4.50 ^{ab}
联合组 (n=10)	0.92±0.03 ^{abc}	45.70±6.10 ^{abc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与顺铂组比较,^b $P<0.05$;与青蒿琥酯组比较,^c $P<0.05$

Note:rs. the model group, ^a $P<0.05$; rs. the cisplatin group, ^b $P<0.05$; rs. the artesunate group, ^c $P<0.05$

表 2 四组移植瘤细胞生长抑制率比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of growth inhibition rate of transplanted tumor cells among four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	OD 值	抑制率/%
模型组 (n=10)	0.52±0.07	—
顺铂组 (n=10)	0.37±0.08 ^a	34.85±4.12
青蒿琥酯组 (n=10)	0.41±0.05 ^{ab}	28.56±3.05 ^{ab}
联合组 (n=10)	0.34±0.05 ^{abc}	38.34±3.88 ^{abc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与顺铂组比较,^b $P<0.05$;与青蒿琥酯组比较,^c $P<0.05$

Note:rs. the model group, ^a $P<0.05$; rs. the cisplatin group, ^b $P<0.05$; rs. the artesunate group, ^c $P<0.05$



模型组 顺铂组 青蒿琥酯组 联合组

图 2 治疗 4 周后的裸鼠移植瘤大体

Fig 3 Transplanted tumor in nude mice after 4 weeks of treatment

表 3 四组 PCNA、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Comparison of mRNA expression of PCNA, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF-κB among four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	PCNA/β-actin	ZNF139/β-actin	TLR4/β-actin	MyD88/β-actin	NF-κB/β-actin
模型组 (n=10)	0.98±0.13	0.96±0.06	0.85±0.12	0.80±0.12	0.89±0.18
顺铂组 (n=10)	0.77±0.18 ^a	0.69±0.13 ^a	0.61±0.20 ^a	0.56±0.21 ^a	0.55±0.13 ^a
青蒿琥酯组 (n=10)	0.86±0.21 ^{ab}	0.78±0.15 ^{ab}	0.75±0.25 ^{ab}	0.68±0.25 ^{ab}	0.63±0.08 ^{ab}
联合组 (n=10)	0.57±0.14 ^{abc}	0.62±0.10 ^{abc}	0.56±0.23 ^{abc}	0.43±0.10 ^{abc}	0.39±0.10 ^{abc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与顺铂组比较,^b $P<0.05$;与青蒿琥酯组比较,^c $P<0.05$

Note:rs. the model group, ^a $P<0.05$; rs. the cisplatin group, ^b $P<0.05$; rs. the artesunate group, ^c $P<0.05$

2.6 PCNA、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平比较

与模型组比较,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平均明显降低;顺

2.5 PCNA、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达水平比较

与模型组比较,顺铂组、青蒿琥酯组和联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达水平均明显降低;顺铂组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 表达水平低于青蒿琥酯组;联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达水平低于顺铂组和青蒿琥酯组,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 4 四组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 相对蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of relative protein expression of PCNA2, ZNF139, TLR4, MyD88 and NF-κB among four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	PCNA	ZNF139	TLR4	MyD88	NF-κB
模型组 (n=10)	0.95±0.08	1.05±0.05	0.81±0.04	0.78±0.06	0.83±0.08
顺铂组 (n=10)	0.56±0.15 ^a	0.75±0.12 ^a	0.55±0.09 ^a	0.59±0.10 ^a	0.52±0.05 ^a
青蒿琥酯组 (n=10)	0.69±0.20 ^{ab}	0.83±0.15 ^{ab}	0.63±0.07 ^{ab}	0.67±0.11 ^{ab}	0.64±0.10 ^{ab}
联合组 (n=10)	0.43±0.11 ^{abc}	0.60±0.17 ^{abc}	0.42±0.10 ^{abc}	0.52±0.07 ^{abc}	0.39±0.07 ^{abc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与顺铂组比较,^b $P<0.05$;与青蒿琥酯组比较,^c $P<0.05$

Note:rs. the model group, ^a $P<0.05$; rs. the cisplatin group, ^b $P<0.05$; rs. the artesunate group, ^c $P<0.05$

铂组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平低于青蒿琥酯组;联合组 PCNA2、ZNF139、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平低于顺铂组和青蒿琥酯组,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4、图 3。

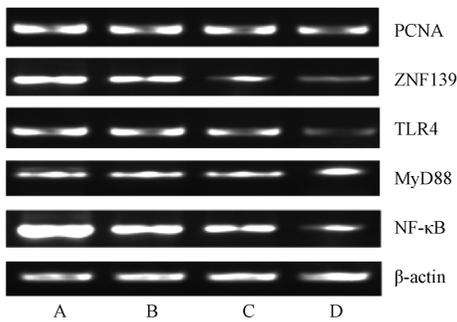
3 讨论

作为世界范围内常见的恶性肿瘤,胃癌的发生发展与多种因素相关。很多胃癌患者在发现时已经错过最佳治疗时期,不适用于内镜或手术治疗,主要采取以化疗为主的综合治疗方案。对于晚期胃癌的治疗,尤其是多线治疗时可选择的药物并不多,而且不良反应大,疗效也欠佳^[4]。寻找高效、低毒的药物治疗意义重大。

近年来,多种体外研究结果表明,青蒿琥酯对胃癌细胞的抑制和杀伤作用较为明显^[5-6]。本研究通过建立人胃癌细胞株 SGC7901 裸鼠移植瘤模型,探讨青蒿琥酯对于胃癌裸鼠移植瘤生长的影响,并分析其可能的作用机制。研究结果显示,

经过青蒿琥酯干预的裸鼠瘤重明显减轻,抑瘤率和移植瘤细胞生长抑制率均明显提高,虽然效果不及顺铂,但也能证实青蒿琥酯可抑制裸鼠移植瘤生长。通过青蒿琥酯与顺铂联合应用发现,相较于顺铂单独用药,联合用药能够更好地抑制肿瘤生长。

TLR 是一类天然免疫受体家族,能特异性地识别病原相关的分析模式,在激活天然免疫的同时能够调节获得性免疫,被认为是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁,其相关的信号通路在免疫调节和炎症中具有重要的作用^[7-8]。相关研究结果证实,TLR4/NF-κB 通路相关分子在胃癌组织中的表达与胃癌恶性行为显著相关,猜测该通路是促进胃癌发生发展的重要机



A. 模型组; B. 顺铂组; C. 青蒿琥酯组; D. 联合组
A. model group; B. cisplatin group; C. artesunate group;
D. combination group

图3 蛋白电泳图

Fig 3 Protein electrophoresis

制^[9]。MyD88 在 TLR 信号转导通路中起着至关重要的信号转导作用,其在胃癌组织中高表达,可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。TLR4 能通过 MyD88 激活下游的 NF-κB 调节血管内皮生长因子以及 IL-8 等炎症因子的表达,参与炎症反应、细胞增殖和凋亡等过程的调控。本研究中,青蒿琥酯组裸鼠 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 水平均低于模型组,证实青蒿琥酯能够抑制 TLR4/NF-κB 通路激活。在干预的三组中,联合组 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 和相对蛋白表达水平最低,提示青蒿琥酯能够增强化疗药的效果,其机制可能与抑制 TLR4/NF-κB 通路激活有关,是治疗胃癌的重要方法。

在肿瘤侵袭转移过程中,多种基因发挥着调控的作用,ZNF 家族与肿瘤的侵袭、转移具有密切的关系^[10-11]。相关研究结果证实,ZNF139 在胃癌组织高表达,推测其参与胃癌的发生、发展及胃癌多药耐药的调控^[12-13]。赵群等^[14]的研究结果显示,胃癌转移过程中 ZNF139 促进 MMP-2、MMP-7 的表达,使得肿瘤细胞具有更强的侵袭能力。李振兴^[15]将重组质粒 siRNA-ZNF139 转染至胃癌移植瘤裸鼠肿瘤中,阻断其表达后发现肿瘤细胞增殖受到明显的抑制,说明 ZNF139 在肿瘤增殖中的地位十分重要。本研究结果显示,经过药物干预,肿瘤组织中的 ZNF139 表达明显降低,证实通过药物干预能够降低肿瘤组织中 ZNF 的表达,从而抑制肿瘤增殖,减缓肿瘤生长速度。作为影响肿瘤进展速度的重要因素之一,细胞增殖的无限性是恶性肿瘤的重要特征^[16-17]。PCNA 存在于细胞核内,蛋白质相对分子质量为 3.6×10^4 ,与细胞 DNA 合成密切相关,且表达水平与 DNA 合成量变化呈现一致性^[18]。测定细胞内 PCNA 水平可反映细胞增殖的水平,可作为评价细胞生长的重要指标^[19]。有研究结果证实,PCNA 在癌旁组织中表达较低,而在恶性肿瘤组织内具有高表达^[20]。本研究结果显示,与模型组比较,各干预组 PCNA mRNA 水平明显降低,提示青蒿琥酯可以抑制 PCNA 基因表达,从而抑制肿瘤细胞 DNA 合成,影响肿瘤的生长。从联合组 PCNA mRNA 水平显著低于青蒿琥酯组 ($P < 0.05$) 也可以看出,青蒿琥酯与顺铂联合应用具有协同趋势。

综上所述,青蒿琥酯可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路激活抑制人胃癌肿瘤细胞的生长,同时能下调 PCNA 和

ZNF139 的表达,影响肿瘤增殖、侵袭和转移。

参考文献

- [1] 帕孜来提·亚森,袁浩,路红,等.胃癌靶向治疗药物临床实验研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2021,26(4):454-461.
- [2] 蒋师,张兴强.青蒿琥酯诱导人胃癌细胞凋亡的分子机制研究[J].上海中医药杂志,2018,52(6):67-71.
- [3] 史珂,刘东洋,符明诗,等.青蒿琥酯抑制胃癌细胞的作用机制[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2021,42(4):441-450.
- [4] 王倩,商建,王晓月,等.晚期胃癌分子靶向药物治疗及免疫治疗新进展[J].武汉大学学报(医学版),2021,42(3):407-412.
- [5] 马里程,农晓琳.青蒿琥酯抗肿瘤作用机制研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2020,27(11):921-926.
- [6] 刘丹,孙洪胜.青蒿素及其衍生物的抗肿瘤作用研究进展[J].山东医药,2016,56(18):99-102.
- [7] 陆姗姗,陈益国,闵卫平.TLRs 调节中性粒细胞抗菌免疫功能研究现状[J].中国细胞生物学学报,2017,39(8):1108-1112.
- [8] 吴琦,王洪伟,郑慧哲,等.HMGB1 调控 TLR4/MyD88/NF-κB 通路对胃癌侵袭及转移的影响[J].贵州医科大学学报,2021,46(9):1047-1053.
- [9] 贺娜,胡辉歌,麻婧,等.TLR4/NF-κB 信号通路分子在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的相关性[J].胃肠病学,2018,23(2):88-91.
- [10] 薛金慧,和莹莹,刘芮茵,等.miR-21 通过靶基因 ZNF326 调控乳腺癌细胞侵袭、迁移的分子机制研究[J].现代肿瘤医学,2020,28(6):906-912.
- [11] 秦文,赵楠楠,韩永焕,等.ZNF436 在胃癌中的表达及调控 Wnt/β-catenin 对胃癌细胞迁移及侵袭的影响[J].实用肿瘤学杂志,2019,33(3):222-227.
- [12] 聂红峰.ZNF139 在胃癌中的表达及其作用机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2018.
- [13] 张旭.粉防己碱对胃癌耐药细胞 ZNF139、MDR1 及 GST-π mRNA 的影响[J].东南大学学报(医学版),2018,37(3):467-470.
- [14] 赵群,李勇,范立侨,等.人胃癌细胞原位移植转移裸鼠原发灶及转移灶中锌指蛋白 139 的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系研究[J].中国全科医学,2013,16(15):1740-1743.
- [15] 李振兴.siRNA 抑制 ZNF139 对人胃癌裸鼠原位移植瘤增殖影响的研究[D].石家庄:河北医科大学,2013.
- [16] 张志栋,李勇,檀碧波,等.siRNA 抑制锌指蛋白 139 对人胃癌裸鼠原位移植瘤增殖的影响[J].中华普通外科杂志,2015,30(10):815-816.
- [17] 范立侨,李勇,冯峰,等.抑制锌指蛋白 139 对胃癌原位移植裸鼠肿瘤细胞凋亡的影响[J].广东医学,2015,36(3):353-356.
- [18] 马希中.莜术醇联合氟尿嘧啶对裸鼠胃癌移植瘤生长及 PCNA 和 P27 表达影响的研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.
- [19] 戴林,张学庸,惠宏襄,等.PCNA 基因反义 RNA 表达质粒的构建及对入胃癌裸鼠移植瘤的抑制效应[J].解放军医学杂志,1999,24(1):49-51.
- [20] 吴文字,杨柱,龙奉玺,等.葛花解酩方对乙醇性 HBV 转基因小鼠肝癌前病变 GST-Pi 和 PCNA 表达及 Wnt/β-catenin 信号通路的影响[J].中国免疫学杂志,2020,36(1):36-41.

(收稿日期:2022-03-30 修回日期:2022-06-10)