

槐耳上清对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的 抗肿瘤作用研究

魏雪娇, 刘亚鑫, 黄惠铭, 欧阳里山, 谢锦欣, 王龙燕, 刘东晓,
屠鹏飞, 胡仲冬*

(北京中医药大学 中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029)

[摘要] 探讨槐耳上清(Huaier extract supernatant, HES)对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞增殖、凋亡、自噬和体外迁移能力的影响及其分子作用机制。采用 HPLC-MS 对 HES 中的主要成分进行简单初步分析。通过 MTT 法、集落形成实验、EdU 染色法探究 HES 对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞增殖的影响。利用 Hoechst 染色法、流式细胞术明确 HES 对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞凋亡的影响。通过吖啶橙染色法和细胞划痕实验分别研究 HES 对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞自噬和体外迁移能力的影响。借助 Western blot 检测 HES 对人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞中与凋亡、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及信号通路相关的蛋白表达水平的调控作用。结果显示, HES 中主要含有一些极性较大的成分。HES 能够明显降低人胃癌细胞的细胞活力, 且具有浓度和时间依赖性, 给药处理人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞 48 h 时, 其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 7.56、10.77 g·L⁻¹。同时, HES 能够显著抑制人胃癌细胞的集落形成能力和短期增殖能力。8 g·L⁻¹ 的 HES 作用于 2 种人胃癌细胞 72 h, 细胞凋亡率分别为 62.13%±8.92% 和 54.50%±3.26%。HES 还能够促进人胃癌细胞发生自噬, 并削弱人胃癌细胞的体外迁移能力。此外, HES 能够上调人胃癌细胞中凋亡标志物 PARP 的剪切水平和上皮细胞标志物 E-cadherin 的蛋白水平, 并下调 p-mTOR、p-S6 和 p-ERK 的蛋白水平。因此, HES 是槐耳发挥抗肿瘤作用的有效成分之一, 其能够抑制人胃癌细胞的增殖和迁移, 并诱导其发生凋亡和自噬, 而且 mTOR 信号和 ERK 信号可能参与了 HES 的抗胃癌作用。该研究能够为槐耳的深入研究和临床应用提供新的参考, 对进一步推动槐耳的科学开发利用具有重要意义。

[关键词] 槐耳上清(HES); 胃癌; 增殖; 凋亡; mTOR; ERK

Anti-tumor effect of Huaier extract supernatant on human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells

WEI Xue-jiao, LIU Ya-xin, HUANG Hui-ming, OUYANG Li-shan, XIE Jin-xin, WANG Long-yan, LIU Dong-xiao,
TU Peng-fei, HU Zhong-dong*

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] The purpose of this study was to investigate the effect of Huaier extract supernatant (HES) on the proliferation, apoptosis, autophagy, and migration of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells and its molecular mechanisms. The main components in HES were preliminarily analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, colony formation assay, and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining assay were used to explore the effect of HES on the proliferation of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells. Hoechst staining and flow cytometry assay were used to determine the effect of HES on apoptosis of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells. Acridine orange staining

[收稿日期] 2022-05-25

[基金项目] 北京市科技新星计划项目(Z191100001119083)

[通信作者] *胡仲冬, 研究员, 主要从事中药活性成分抗肿瘤作用研究, Tel/Fax: (010)64286180, E-mail: huzhongdong@126.com

[作者简介] 魏雪娇, 硕士研究生, E-mail: wxjubcm@163.com

and cell scratch assay were used to determine the effect of HES on autophagy and migration of human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells, respectively. Western blot was used to investigate the regulatory effect of HES on the expression levels of proteins related to apoptosis, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and signaling pathways in human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells. The results showed that HES mainly contained some components with high polarities. HES significantly reduced the cell viability of human gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner. The IC_{50} values after 48 h of HES treatment in human gastric cancer HGC-27 and MGC-803 cells were 7.56 and $10.77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Meanwhile, HES inhibited the colony-forming ability and short-term proliferation of human gastric cancer cells. The apoptosis rates of HGC-27 and MGC-803 cells treated with $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HES for 72 h were $62.13\% \pm 8.92\%$ and $54.50\% \pm 3.26\%$, respectively. HES also promoted autophagy in human gastric cancer cells and impaired their migration ability *in vitro*. Moreover, HES up-regulated the cleavage of the apoptosis marker poly ADP-ribose polymerase (PARP) and the protein expression level of the epithelial cell marker E-cadherin, and down-regulated the protein levels of phosphorylated-mammalian target of rapamycin (p-mTOR), phosphorylated-S6 (p-S6), and phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) in human gastric cancer cells. Therefore, HES is one of the effective anti-tumor components of Huaier, which inhibits the proliferation and migration of human gastric cancer cells, and induces apoptosis and autophagy. Moreover, the mTOR signal and ERK signal may be involved in the anti-gastric cancer effect of HES. This study provides novel references for the in-depth research and clinical application of Huaier. It is also of great significance to promote the scientific development and utilization of Huaier.

[Key words] Huaier extract supernatant (HES); gastric cancer; proliferation; apoptosis; mammalian target of rapamycin (mTOR); extracellular signal-regulated kinase (ERK)

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220830.401

胃癌是较为常见的恶性肿瘤之一,在全球范围内的发病率和病死率较高^[1],其发生发展是一个长期且复杂的过程,主要诱因包括幽门螺杆菌感染^[2]、家族遗传^[3]、高盐等不良饮食习惯^[4]等。由于胃癌早期症状不明显^[5],难以及时引起人们的重视,使得其诊断率较低,而现有治疗方法主要以手术^[6]为主,辅以化疗^[7]、靶向治疗^[8]、免疫疗法^[9]等,但因其均具有一定的局限性,导致患者预后往往较差。因此,寻找疗效更好,毒副作用更少的药物很有必要。中医药是一个宝库,从中挖掘发现具有抗胃癌作用的药物具有非常广阔的前景。现有研究表明,多种中药及其活性成分可通过多种途径发挥抗胃癌作用^[10-12]。

槐耳是多孔菌科真菌槐栓菌 *Trametes robiniophila* Murr. 的干燥子实体,性平,味苦、辛,具有扶正固本,活血消癥的功效,可发挥止血、止痢、抗癌等作用。槐耳颗粒在临床上已作为多种癌症治疗的辅助用药,包括胃癌^[13]等。关于槐耳的研究正逐渐深入,目前已知其主要有效成分是蛋白多糖类成分,大致由 41.53%多糖、12.93%氨基酸和 8.72%水分组成^[14],水解产物包括 L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、D-葡萄糖和 L-岩藻糖共 6 种单糖,以及脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸等 18 种氨基酸^[15]。

然而,关于槐耳中除蛋白多糖外是否还存在其他成分具有抗肿瘤活性的研究目前报道较少。因此,本研究以此科学问题为出发点,将槐耳清膏经水提醇沉处理除去大部分蛋白多糖后得到的槐耳上清(Huaier extract supernatant, HES)作为研究对象,探究其抗肿瘤活性。本研究选取了 2 株人胃癌细胞 HGC-27 和 MGC-803,探究了 HES 对这 2 株人胃癌细胞的增殖、凋亡、自噬以及体外迁移能力的影响,并初步研究了其分子作用机制,以期对槐耳的深入研究和临床应用提供新的参考,并推动槐耳的科学开发利用。

1 材料与方法

1.1 药物 槐耳清膏来自江苏盖天力药业有限公司(批号 181013)。首先,取适量槐耳清膏溶于 10 倍量的 ddH₂O 中,然后加入无水乙醇使其终浓度为 80%,4 ℃ 静置过夜,过滤得槐耳上清液,然后旋转蒸发浓缩至膏状,最后冻干即得。使用时,用相应的完全培养基制成 $32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 母液,0.22 μm 滤头过滤除菌,保存于 4 ℃ 冰箱中。

1.2 试剂 甲醇、甲酸(色谱纯)购于美国 Fisher 公司;用于样品制备的试剂(分析纯)购于北京化工厂;RPMI 1640 基础培养基(批号 2052252)、DMEM 基础培养基(批号 2051247)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号 2049227)均购于以色列 BioInd 公司;0.25%

胰酶 EDTA(批号 25200072)、青霉素-链霉素混合液(批号 15140122)均购于美国 ThermoFisher 公司;胎牛血清(FBS)(批号 35-081-cv)购于美国 Corning 公司;MTT 粉末(批号 298-93-1)购于北京百瑞极生物科技有限公司;BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(批号 C0071S)、Hoechst 33258 染液(批号 C1018)均购于上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号 1133534)购于美国 BD 公司;吖啶橙粉末(批号 A6014)购于美国 Sigma 公司;Super ECL Plus 超敏发光液(批号 RPN2232)购于北京普利莱基因技术公司;PARP(批号 9532T)、E-cadherin(批号 3195)、p-mTOR(批号 5536)、mTOR(批号 2983)、p-S6(批号 2211S)、S6(批号 2317S)、p-ERK(批号 4370T)、ERK(批号 4695T)均购于美国 CST 公司; β -actin(批号 sc-47778)、HRP 标记的羊抗鼠(批号 sc-2357)/兔(批号 sc-516102)均购于美国 Santa Cruz 公司。

1.3 仪器 Agilent 1200 LC 系统,含 G1311A 四元泵、G1322A 脱气机、G1329A ALS 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315D 二极管阵列检测器(DAD)(美国安捷伦科技有限公司);细胞培养箱(日本 SANYO 公司,型号 MCO-18AIC);多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司,型号 EnSpire);低温离心机(美国 Eppendorf 公司,型号 5424R);电泳仪和电转仪(北京六一仪器厂,型号 DYY-6D);光学显微镜(德国 Leica 公司,型号 ICC50HD);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司,型号 DM500);流式细胞仪(美国 BD 公司,型号 FACSCantoII)。

1.4 槐耳上清成分分析 配置 MM-ES+APCI 源的单级四极杆质谱仪(MSD)(Agilent 6120 Quadrupole)与液相(LC)系统。液相色谱条件:Zorbax SB-C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μ m, Agilent);流速 0.3 mL · min⁻¹;流动相甲醇(M)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱(0~50 min, 5%~95% M;50~60 min, 95% M);每次运行结束时,采用 5% M 平衡系统 10 min;进样量 10 μ L;DAD 检测器在 190~400 nm 扫描其吸收波长,检测波长为 256 nm。质谱分析的最佳操作条件:正离子模式;雾化气体 N₂,流速 12 L · min⁻¹;雾化室压力 35 psi(1 psi ≈ 6.895 kPa);干燥器温度 250 $^{\circ}$ C;气化室温度 200 $^{\circ}$ C;碰撞电离电压 150 V;毛细管电压 3 kV;离子扫描范围 m/z 100~1 000;HPLC-MS 分析采用自动扫

描模式。

1.5 细胞培养 人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞均购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。人胃癌 HGC-27 细胞使用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% FBS 和 1%青-链霉素混合液)培养,人胃癌 MGC-803 细胞使用 DMEM 完全培养基(含 10% FBS 和 1%青-链霉素混合液)培养,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度。

1.6 MTT 细胞增殖毒性实验 取对数生长期细胞制得密度为 2.0×10^4 个/mL 的单细胞悬液,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中。细胞培养 24 h 使其贴壁,将 HES 母液用相应的完全培养基制成不同浓度的工作液,每个浓度设置 6 个复孔,并设置 3 个不加细胞的空白孔,给药处理 24、48、72 h 后,于避光条件下,每孔加入 100 μ L MTT 溶液($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),培养箱中孵育 4 h。然后,吸除 MTT 溶液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO),避光摇晃 10 min,最后用酶标仪测量其在 490 nm 波长处的吸光度(A),并根据以下公式计算细胞存活率:细胞存活率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.7 集落形成实验 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,于每个 6 cm 培养皿中接种 800 个细胞。细胞培养 24 h 使其贴壁,设置空白对照组和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 给药组,每组设置 3 个培养皿,每隔 3 d 换液。待给药 8 d 后,吸除旧培养基,PBS 溶液清洗 3 次,4%多聚甲醛室温固定 15 min,再用结晶紫染液($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)染色 30 min,PBS 溶液清洗 3 次,最后对培养皿中被染色的细胞簇拍照计数,并进行统计学分析。

1.8 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测分析 将细胞以适当密度接种于 12 孔板中,细胞培养 24 h 使其贴壁,分别加入 $0, 4, 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 处理 48 h。然后,按照试剂盒说明书内容进行操作,包括 EdU 标记、固定、洗涤、通透、点击反应等,最后,将孔板置于倒置荧光显微镜下观察,并用 10 倍物镜拍照记录。

1.9 Hoechst 33258 染色法 将细胞以适当密度接种于 6 孔板中,细胞培养 24 h 使其贴壁,分别加入 $0, 4, 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 处理 48 h。然后吸除旧培养基,PBS 溶液清洗 3 次,4%多聚甲醛室温固定 10 min,再用 Hoechst 33258 染液($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)避光染色 30 min,PBS 溶液清洗 2 次,最后,将孔板置于倒置荧光显微镜下观察,并用 20 倍物镜拍照记录。

1.10 流式细胞术 将细胞以适当密度接种于6孔板中,细胞培养24 h使其贴壁,分别加入不同浓度的HES,继续培养72 h,每个浓度设置3个复孔。然后,将旧培养基收集到2 mL的EP管中,PBS溶液清洗1次,加入适量0.05%胰酶消化,再加入旧培养基终止消化,并将其转移到EP管中,4℃,1 000 r·min⁻¹离心5 min。弃去上清,加入PBS溶液重悬,4℃,1 000 r·min⁻¹离心5 min。弃去上清,于每管样品中加入200 μL 1×binding buffer,2 μL Annexin V-FITC和2 μL propidium iodide (PI),然后吹打混匀,室温避光孵育15 min,最后用流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

1.11 吖啶橙染色法 将细胞以适当密度接种于6孔板中,细胞培养24 h使其贴壁,分别加入0、8、12 g·L⁻¹的HES,继续培养24 h。然后,吸除旧培养基,PBS溶液清洗3次,4%多聚甲醛室温固定15 min,再用吖啶橙染液(10 mg·L⁻¹)染色30 min,最后,将孔板置于倒置荧光显微镜下观察,并用40倍物镜拍照记录。

1.12 细胞划痕实验 将细胞以适当密度接种于12孔板中,待细胞贴壁且融合度接近100%时,用无血清基础培养基饥饿细胞12 h,用10 μL枪头划痕,PBS溶液清洗3次,除去细胞碎片,再用相应的无血清基础培养基配成0、2、4 g·L⁻¹的HES,并在给药处理0、12、24 h时于倒置显微镜下观察划痕的愈合程度,选择每孔中的5个独立视野进行拍照,最后进行统计学分析。

1.13 Western blot 实验 将细胞以适当密度接种于6孔板中,加入不同浓度的HES处理48 h,再加入适量细胞裂解液,收集于1.5 mL EP管中,99℃加热10 min制得细胞蛋白样品。每孔上样量为10 μL,恒压电泳,恒电流转,再用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭2 h,根据目的蛋白不同的相对分子质量裁剪出不同条带,并使用相对应的一抗溶液(1:1 000)4℃孵育过夜,TBST溶液洗膜3次,每次10 min,再使用相对应的二抗溶液(1:10 000)室温孵育2 h,TBST溶液洗膜3次,每次10 min,最后,在暗室中曝光,观察目的蛋白的表达情况。

1.14 数据分析 实验数据运用GraphPad Prism 9.3.0软件进行统计学分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组之间的差异用*t*检验进行分析,*P*<0.05认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳上清中主要含有极性较大的成分 对HES中的成分进行简单初步分析,见图1,HPLC-DAD以及LC-MS正、负离子模式色谱图显示,HES中主要含有一些极性较大的成分,可能包括有机酸、肽或糖苷等,与文献报道相一致^[16-18]。

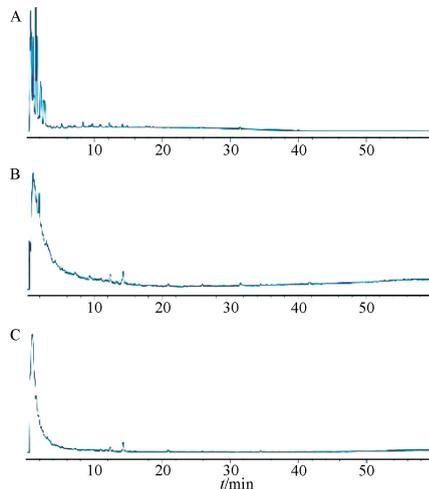
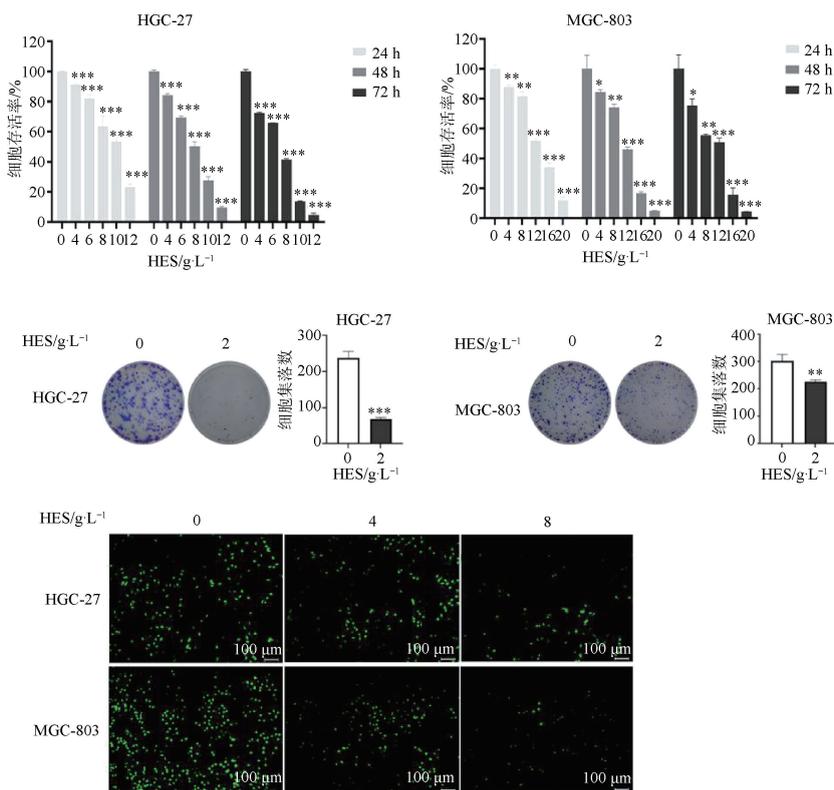


图1 槐耳上清的HPLC-DAD(A)、LC-MS正离子模式(B)和负离子模式(C)色谱图

Fig. 1 HPLC-DAD (A), and LC-MS in positive mode (B), and negative mode (C) chromatograms of Huaier extract supernatant

2.2 槐耳上清能够抑制人胃癌细胞增殖 用MTT法检测HES对人胃癌HGC-27和MGC-803细胞增殖能力的影响,结果见图2,HES能够显著降低人胃癌细胞的细胞活力,且具有浓度和时间依赖性,HES作用于人胃癌细胞48 h时,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为7.56、10.77 g·L⁻¹。同时,随着给药剂量的加大,培养皿中的细胞集落数和EdU标记的绿色荧光细胞数均明显减少,见图2。所以,HES能够抑制人胃癌细胞的增殖。

2.3 槐耳上清能够诱导人胃癌细胞凋亡 Hoechst染色结果提示HES作用于人胃癌HGC-27和MGC-803细胞后,呈现致密浓染亮蓝色荧光的细胞数增多,说明细胞膜通透性发生改变,细胞发生凋亡,见图3。此外,采用流式细胞术发现,随着给药浓度的升高,细胞的凋亡率逐渐升高,8 g·L⁻¹的HES作用于人胃癌细胞72 h时,细胞凋亡率分别为62.13%±8.92%和54.50%±3.26%,见图3。而且,免疫印迹法结果显示,与空白对照组相比,HES给药组中



与空白对照组 ($0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图 3、5 同)。

图 2 槐耳上清 (HES) 对 HGC-27 和 MGC-803 细胞增殖的影响 (EdU 染色, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of Huaier extract supernatant (HES) on proliferation of HGC-27 and MGC-803 cells (EdU staining, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

cleaved-PARP 的蛋白表达水平随着给药剂量的增大而逐渐升高, 见图 3, 说明 HES 可上调凋亡标志物 PARP 的剪切水平。因此, HES 能够诱导人胃癌细胞发生凋亡。

2.4 槐耳上清能够促进人胃癌细胞自噬 将 $0, 8, 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 分别作用于人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞后, 吡啶橙染色结果见图 4, 细胞中红黄荧光的强度逐渐增强, 说明酸性的自噬溶酶体逐渐增多, 细胞发生自噬。所以, HES 能够促进人胃癌细胞发生自噬。

2.5 槐耳上清能够抑制人胃癌细胞迁移 细胞划痕实验发现, $0, 2, 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 分别作用于人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞后, 随着给药浓度的升高, 细胞迁移距离逐渐缩短, 体外迁移能力逐渐减弱, 见图 5。同时, Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, HES 给药组中上皮细胞标志物 E-cadherin 的蛋白表达水平逐渐升高, 见图 5, 说明 HES 能够促进间质-上皮转化 (mesenchymal-epithelial transition,

MET) 进程, 进而削弱人胃癌细胞的迁移能力。

2.6 槐耳上清能够抑制 mTOR 信号和 ERK 信号 免疫印迹法结果见图 6, 与空白对照组相比, HES 可下调人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞中 p-mTOR、p-S6 和 p-ERK 的蛋白水平, 说明 HES 可能是通过抑制 mTOR 信号和 ERK 信号而发挥抗胃癌作用。

3 讨论

癌症的发生发展多是饮食劳伤、情志内伤、瘀血内阻、热毒内蕴、正气亏虚等多种因素综合作用的结果, 《医宗必读·积聚篇》云“积之成者, 正气不足, 而后邪气踞之”, 说明正气亏虚是癌症进展中的主要因素之一, 因此, 扶正治癌的理论和方法在中医研究和临床应用中发挥着重要作用^[19-20]。而且, 现临床常用抗癌中药多为补虚药, 常用方剂亦多具有扶正固本的功效, 诸如四君子汤、理中汤和补中益气汤^[21]。槐耳正是一味补益药, 具有扶正固本、活血消癥的功效, 可发挥止血、止痢、抗癌等作用。槐耳颗粒, 商品名“金克”, 现已成为临床上多种癌症治

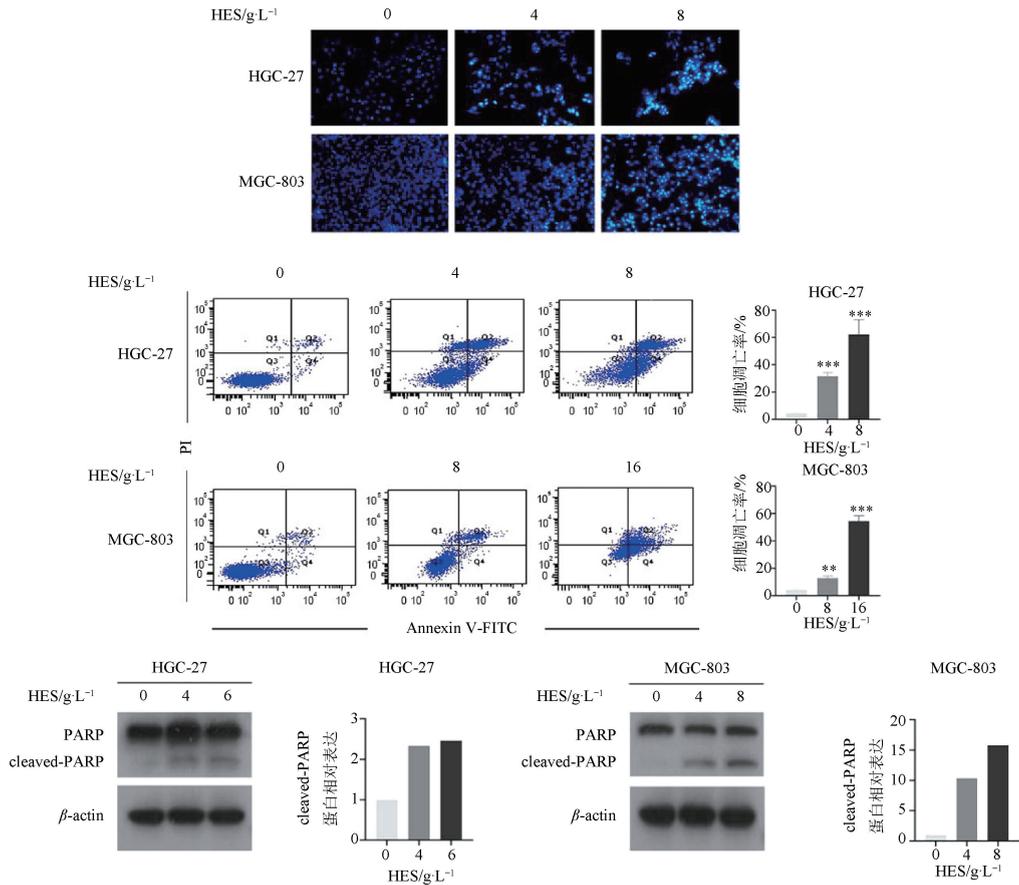


图3 槐耳上清(HES)对HGC-27和MGC-803细胞凋亡的影响(Hoechst染色, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of Huaier extract supernatant (HES) on apoptosis of HGC-27 and MGC-803 cells (Hoechst staining, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

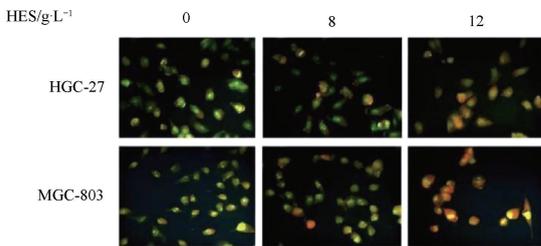


图4 槐耳上清(HES)对HGC-27和MGC-803细胞自噬的影响(吖啶橙染色, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of Huaier extract supernatant (HES) on autophagy of HGC-27 and MGC-803 cells (acridine orange staining, $\times 400$)

疗的辅助用药,包括胃癌^[13]等。然而,目前槐耳抗胃癌作用基础研究较少且不够深入。此外,有研究报道槐耳的主要有效成分是蛋白多糖类成分^[22],可发挥广泛的抗肿瘤作用^[23],但是缺少对除蛋白多糖以外的其他成分的关注与研究。然而槐耳蛋白多糖不如槐耳清膏的抗癌作用强,这也提示除了蛋白多

糖以外,其中含量较少的其他物质或许也发挥着重要作用。这为槐耳的深入研究提供了一种新思路,即探究槐耳除蛋白多糖类成分以外是否还存在其他抗肿瘤活性成分,以期发现新的抗肿瘤活性物质,并有望未来将其高效地应用于临床。本研究遵循该思路,将槐耳清膏经水提醇沉处理除去大部分蛋白多糖后得到的HES作为研究对象,探究其抗肿瘤活性,尤其是抗胃癌活性,具有重要意义。

不受控制的增殖是肿瘤细胞的特征之一,抑制肿瘤细胞的增殖能力,是抗肿瘤研究中的重要一步。本研究采用MTT法发现HES能够以浓度和时间依赖性的方式显著抑制人胃癌HGC-27和MGC-803细胞的细胞活力,药物作用细胞48h的 IC_{50} 分别为7.56、10.77 $g \cdot L^{-1}$ 。同时,集落形成实验和EdU染色实验也进一步验证了HES能够抑制人胃癌细胞的增殖。细胞凋亡是一种比较常见的细胞程序性死亡方式,该过程的发生可使机体免受异常细胞的不

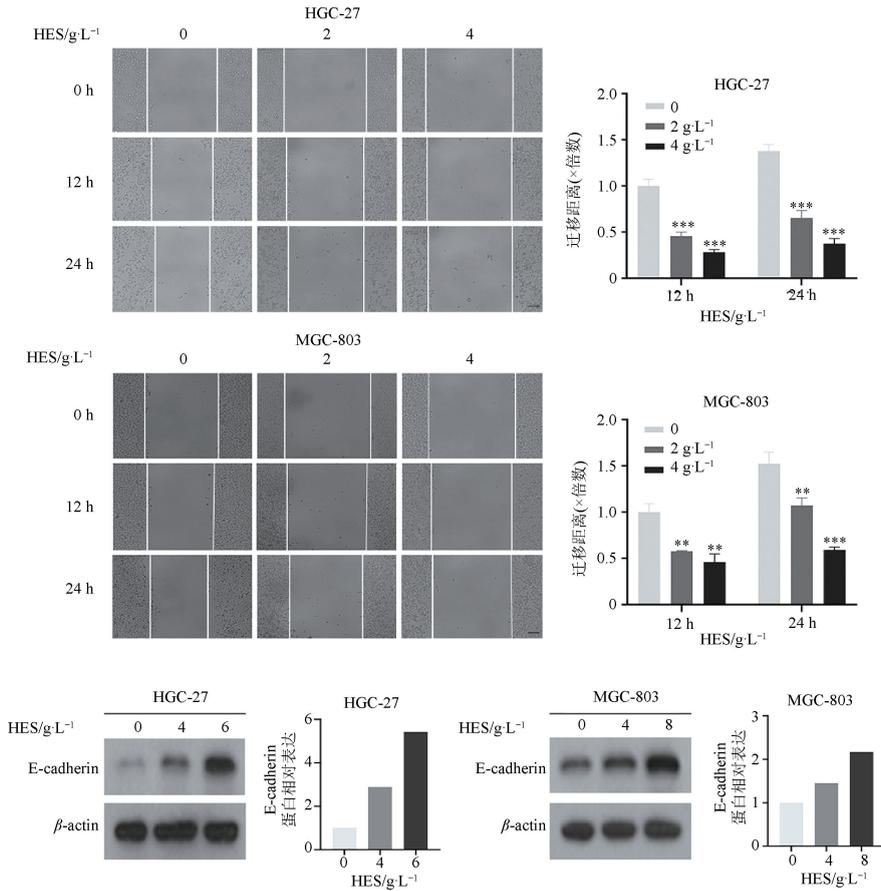


图 5 槐耳上清(HES)对 HGC-27 和 MGC-803 细胞迁移能力的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of Huaier extract supernatant (HES) on migration ability of HGC-27 and MGC-803 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

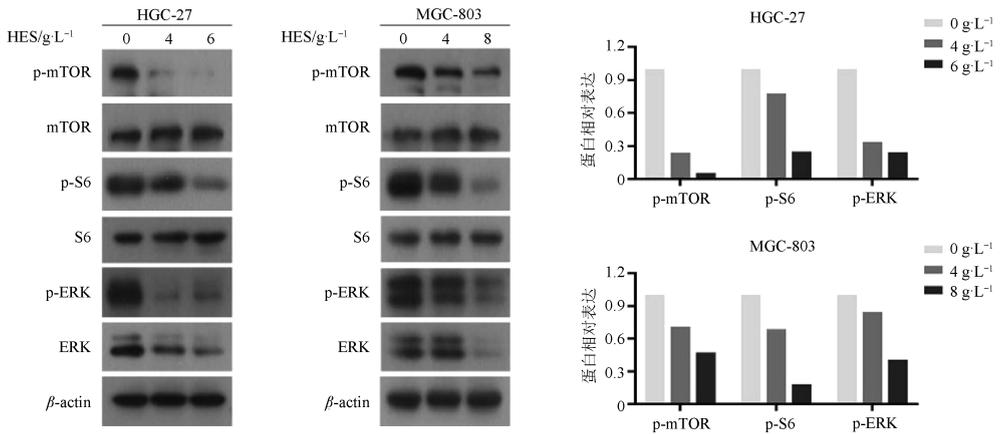


图 6 槐耳上清(HES)对 HGC-27 和 MGC-803 细胞中 mTOR 信号和 ERK 信号的影响

Fig. 6 Effect of Huaier extract supernatant (HES) on mTOR signal and ERK signal in HGC-27 and MGC-803 cells

良影响,对肿瘤的发生进展具有深远影响。因此,诱导肿瘤细胞发生凋亡,对肿瘤治疗具有重要意义。

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP ribose polymerase, PARP) 位于细胞核内,可修复受损

DNA。当细胞发生凋亡时,PARP 被酶切,其剪切水平被上调^[24]。本研究中Hoechst 染色实验提示HES 可诱导人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞发生凋亡,流式细胞术检测发现 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HES 作用于人胃癌细胞 72 h 后,细胞凋亡率分别是 $62.13\% \pm 8.92\%$ 和 $54.50\% \pm 3.26\%$ 。同时,Western blot 结果显示 HES 能够上调人胃癌细胞中凋亡标志物 PARP 的剪切水平。因此,HES 能够促进人胃癌细胞凋亡的发生。

自噬是另一种目前公认的比较重要的程序性细胞死亡方式,是指细胞在应激状态下,通过自噬相关基因的调控作用,利用胞内溶酶体降解受损细胞器、废弃蛋白质等成分的生物学过程^[25]。本研究采用吖啶橙染色法发现,HES 可促进人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞发生自噬。已知有研究^[26-28]发现,槐耳清膏可通过上调自噬相关蛋白的表达进而激活自噬以发挥抗肿瘤作用。因此,作者推测 HES 作为槐耳的有效成分之一,可能参与了槐耳对自噬的激活作用。

淋巴结转移是临床上治疗胃癌的一大难题,涉及到肿瘤细胞恶变、侵袭、浸润等多个环节,发生后会增加手术和放化疗的难度,进而导致患者预后较差^[29]。因此,降低胃癌细胞的迁移能力,是治疗胃癌的有效手段之一。EMT 可增强细胞的迁移侵袭能力和对凋亡刺激的抵抗能力,在肿瘤的发生和转移中发挥重要作用^[30]。在受到细胞外因子刺激后,肿瘤上皮细胞会失去极性,转化成间质细胞,其迁移能力会增强,而引起肿瘤转移^[31]。EMT 相关蛋白中,E-cadherin 是癌细胞迁移过程中的主要指标,具有维持细胞和细胞间连接的作用,在胃癌细胞中表达降低^[32]。本研究采用细胞划痕实验发现,HES 可明显缩短人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的迁移距离,削弱人胃癌细胞的迁移能力。同时,Western blot 结果显示 HES 可上调人胃癌细胞中 E-cadherin 的蛋白水平,说明 HES 能够抑制人胃癌细胞的 EMT 进程。因此,HES 具有较好的抗肿瘤转移潜能。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在肿瘤细胞生长和增殖中发挥重要作用,其与多种蛋白质结合,可形成 2 种不同的复合物 mTORC1 和 mTORC2,而 mTORC1 能够活化 S6K1/2 促进细胞生长,S6Ks 磷酸化后可调节多种蛋白质的表达,其中就包括核糖体蛋白质 S6^[33]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-

regulated kinase, ERK)是一种普遍存在于细胞增殖、分化、存活和转化等多种过程中的调节因子,其上游的 RAS 和 RAF 癌基因可通过激活 ERK 激酶而促进人类癌症的发生^[34]。RAS-ERK 和 PI3K-mTORC1 通路是调节细胞存活、增殖和运动的关键机制通路,这 2 条通路相互交叉调节,兼具正向和负向调节作用^[35],而且现有研究表明,共同抑制这 2 条信号通路可减慢小鼠异种移植瘤的肿瘤生长速度^[36]。本实验结果发现 HES 可下调人胃癌细胞中 p-mTOR、p-S6(一个 mTOR 活性的标志物)和 p-ERK 的蛋白水平,说明 HES 能够抑制人胃癌细胞中 mTOR 信号和 ERK 信号。因此,mTOR 信号和 ERK 信号的下调可能介导了 HES 的抗胃癌作用。此外,这与槐耳清膏抗神经母细胞瘤的作用机制^[28]相一致,进一步为支持 HES 为槐耳清膏中的有效成分之一提供了证据。

综上所述,作为槐耳发挥抗肿瘤作用的有效成分之一,HES 能够抑制人胃癌细胞的增殖和迁移,并诱导其发生凋亡和自噬,而且 mTOR 信号和 ERK 信号可能参与了 HES 的抗胃癌作用。本研究工作能够进一步丰富槐耳抗肿瘤作用的研究内容,尤其是槐耳有效成分抗肿瘤药理研究,能够为槐耳的深入研究和临床应用提供新的参考,对进一步推动槐耳的科学开发利用具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] WROBLEWSKI L E, PEEK RM J R, WILSON K T, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(4): 713.
- [3] VOGELAAR I P, VAN DER POST R S, BISSELING T M, et al. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology[J]. Hered Cancer Clin Pract, 2012, 10(1): 18.
- [4] FERRO A, ROSATO V, ROTA M, et al. Meat intake and risk of gastric cancer in the stomach cancer pooling (StoP) project [J]. Int J Cancer, 2020, 147(1): 45.
- [5] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635.
- [6] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014(ver. 4)[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(1): 1.
- [7] AL-BATRAN S E, HOMANN N, PAULIGK C, et al.

- Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10184): 1948.
- [8] FERGUSON F M, GRAY N S. Kinase inhibitors; the road ahead [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17 (5): 353.
- [9] FUCHS C S, DOI T, JANG R W, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical keynote-059 trial [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (5): e180013.
- [10] FANG X, TAN T, GAO B, et al. Germacrone regulates HBXIP-mediated cell cycle, apoptosis and promotes the formation of autophagosomes to inhibit the proliferation of gastric cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:537322.
- [11] 田义敏,周欣,赵超,等. 中药有效成分抗胃癌作用机制的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (15): 3584.
- [12] 钟佳倚,陈海兵,叶大增,等. 基于网络药理学及实验验证探讨灵芝抗胃癌的分子机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (1): 203.
- [13] MA Y, WANG C, ZHANG Q, et al. The effects of polysaccharides from *Auricularia auricula* (Huaier) in adjuvant anti-gastrointestinal cancer therapy: a systematic review and network Meta-analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 132:80.
- [14] 王建忠,程若川. 槐耳的研制及临床应用 [J]. *井冈山医学学报*, 2003, 10 (1): 15.
- [15] 杨爱琳,胡仲冬,屠鹏飞. 槐耳抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (24): 4805.
- [16] 李可心,吕建华,董婧,等. 槐耳发酵液乙酸乙酯部位化学成分的研究 [J]. *中成药*, 2022, 44 (2): 445.
- [17] 宋金同. 毛叶巴豆和槐耳的化学成分及生物活性研究 [D]. 济南:山东大学, 2016.
- [18] 黄挺,陈佳辉,徐志远,等. 槐耳醇提物抑制人胃癌细胞 MKN-45 增殖的实验研究 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2017, 40 (1): 73.
- [19] 姚嘉麟,王青,许玲. 中医治癌要法:扶正法的探源 [J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2013, 15 (5): 1089.
- [20] 戴玲玲,孟鹏,毛俊俊,等. 仙芪扶正颗粒联合三焦针法对 III-IV 期结肠癌患者免疫及 CEA、CA724 的影响 [J]. *世界中医药*, 2020, 15 (20): 3074.
- [21] 李星,樊巧玲. 胃癌中医辨证与方药应用的文献研究 [J]. *中医杂志*, 2017, 58 (8): 693.
- [22] 王雨曦,袁海生. 槐生拜尔孔菌(槐耳)的化学成分及其抗肿瘤活性研究进展 [J]. *菌物学报*, 2021, 40 (3): 411.
- [23] XU Z, ZHENG G, WANG Y, et al. Aqueous Huaier extract suppresses gastric cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition by targeting twist [J]. *J Cancer*, 2017, 8 (18): 3876.
- [24] BÖHM I. Das apoptose-markerenzym poly-(ADP-ribose-) polymerase (PARP) beim systemischen lupus erythematoses [J]. *Z Rheumatol*, 2006, 65 (6): 541.
- [25] YANG X, YU D, YAN F, et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5 (1): 14.
- [26] 杨爱琳,刘亚鑫,黄惠铭,等. 槐耳清膏对人前列腺癌 VCaP 细胞增殖的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (1): 79.
- [27] 杨爱琳,夏天吉,赵亚楠,等. 槐耳清膏通过激活自噬抑制人肝癌细胞 SK-HEP-1 增殖 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (3): 591.
- [28] XU D Q, YUAN X J, TOYODA H, et al. Anti-tumor effect of Huaier extract against neuroblastoma cells *in vitro* [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18 (4): 1015.
- [29] IKOMA N, ESTRELLA J S, BLUM M, et al. Central lymph node metastasis in gastric cancer is predictive of survival after preoperative therapy [J]. *J Gastrointest Surg*, 2018, 22 (8): 1325.
- [30] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13:395.
- [31] OKUBO K, UENOSONO Y, ARIGAMI T, et al. Clinical significance of altering epithelial-mesenchymal transition in metastatic lymph nodes of gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20 (5): 802.
- [32] 谢贞兰,邢益祥,李佳,等. 胃癌患者组织中 EMT 相关蛋白、TGF- β 1 mRNA 相对表达水平与淋巴结转移的相关性分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43 (2): 188.
- [33] CARGNELLO M, TCHERKEZIAN J, ROUX P P. The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation [J]. *Mutagenesis*, 2015, 30 (2): 169.
- [34] DESCHÈNES-SIMARD X, KOTTAKIS F, MELOCHE S, et al. ERKs in cancer: friends or foes? [J]. *Cancer Res*, 2014, 74 (2): 412.
- [35] MENDOZA M C, ER E E, BLENIS J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36 (6): 320.
- [36] KINKADE C W, CASTILLO-MARTIN M, PUZIO-KUTER A, et al. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (9): 3051.

[责任编辑 马超一]