

半枝莲总黄酮调控 MIIP 对人胃腺癌细胞 AGS 增殖、凋亡和放疗敏感性的作用及机制研究

张 锋, 吴 震, 徐 宁, 杜红蕾, 郭海彦

河北省保定市第二中心医院, 河北 保定 071000

摘 要: 目的 研究半枝莲总黄酮(TF-SB)对人胃腺癌细胞AGS增殖、凋亡和放疗敏感性的影响和分子机制。方法 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测TF-SB(0、25、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用24 h对AGS细胞存活率的影响。将AGS细胞分为对照组、溶剂对照(含相同浓度的甲醇)组、TF-SB(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、质粒空载体(pcDNA, 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、迁移侵袭抑制蛋白(MIIP)过表达质粒(pcDNA-MIIP, 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、TF-SB(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 小干扰RNA对照(si-con, 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、TF-SB(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + MIIP小干扰RNA(si-MIIP, 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组, 转染质粒后TF-SB处理24 h, CCK-8法检测细胞存活率; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blotting法检测B细胞淋巴瘤-x1(Bcl-x1)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved Caspase-3)、MIIP表达; 不同照射量X射线(0、2、4、6、8 Gy)照射后, 克隆形成实验检测细胞存活率, 并绘制单击多靶模型拟合曲线, Western blotting法检测 γ -H2AX蛋白表达。结果 与TF-SB 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较, TF-SB 25、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组AGS细胞存活率显著降低($P<0.05$); 与对照组及溶剂对照组比较, TF-SB 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组AGS细胞凋亡率显著升高($P<0.05$), Bcl-x1蛋白表达显著降低($P<0.05$), cleaved Caspase-3和MIIP蛋白表达显著升高($P<0.05$); 放疗后, TF-SB组细胞存活率显著降低($P<0.05$), γ -H2AX蛋白表达显著升高($P<0.05$), 放疗敏感性增加。与pcDNA组比较, pcDNA-MIIP组AGS细胞凋亡率显著增加, 细胞存活率显著降低, Bcl-x1蛋白表达显著降低, cleaved Caspase-3蛋白表达增加($P<0.05$); 放疗后, pcDNA-MIIP组细胞存活率显著降低($P<0.05$), γ -H2AX蛋白表达显著升高($P<0.05$), 敏感性增加。与TF-SB + si-con组比较, TF-SB + si-MIIP组AGS细胞凋亡率显著降低, 细胞存活率显著增加, Bcl-x1蛋白表达显著增加, cleaved Caspase-3蛋白表达显著降低($P<0.05$); 放疗后, TF-SB + si-MIIP组细胞存活率显著升高($P<0.05$), γ -H2AX蛋白表达显著降低($P<0.05$), 敏感性降低。结论 TF-SB通过上调MIIP可抑制AGS细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 提高其放疗敏感性。

关键词: 半枝莲总黄酮; 人胃腺癌细胞AGS; 迁移侵袭抑制蛋白(MIIP); 细胞增殖; 凋亡; 放疗敏感性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)04-0686-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.011

Effects of total flavonoids of *Scutellaria barbata* on proliferation, apoptosis and radiotherapy sensitivity of gastric cancer cell AGS by regulating MIIP

ZHANG Feng, WU Zhen, XU Ning, DU Honglei, GUO Haiyan

The second Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and molecular mechanism of total flavonoids of *Scutellaria barbata* (TF-SB) on the proliferation, apoptosis and radiosensitivity of gastric cancer cell AGS. **Methods** The cell counting kit (CCK-8) method was used to detect the effects of different concentrations (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of TF-SB on the survival of gastric cancer cells to determine the experimental concentration. AGS was divided into control group, solvent control group (methanol), TF-SB (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pcDNA (200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), pcDNA-MIIP (200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), TF-SB (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + si-con (200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), TF-SB (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + si-MIIP (200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. Cell viability was detected by CCK-8 method. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Clone formation test was used to detect the cell survival fraction after irradiation with different rays, and a one-click multi-target model was fitted to fit the curve. Western blotting was used to detect B cell lymphoma-x1 (Bcl-x1), cleaved Caspase-3, migration invasion inhibitor protein (MIIP), γ -H2AX protein expression. **Results** Compared with TF-SB 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, the survival rate of AGS cells in TF-SB 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ groups was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with control group and solvent

收稿日期: 2021-08-22

第一作者: 张 锋, 研究方向为消化系统疾病。E-mail: huzimeb7@126.com

control group, the apoptosis rate of AGS cells in TF-SB $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of Bcl-XL protein was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of Cleaved Caspase-3 and MIIP protein was significantly increased ($P < 0.05$). After radiotherapy, cell survival rate of TF-SB group was significantly decreased ($P < 0.05$), γ -H2AX protein expression was significantly increased ($P < 0.05$), and radiotherapy sensitivity was increased. Compared with the pcDNA group, the apoptosis rate of AGS cells in the pcDNA-MIIP group was significantly increased, the cell survival rate was significantly decreased, the expression of Bcl-XL protein was significantly decreased, and the expression of Cleaved Caspase-3 protein was increased ($P < 0.05$). After radiotherapy, the survival rate of pcDNA-MIIP group was significantly decreased ($P < 0.05$), the expression of γ -H2AX protein was significantly increased ($P < 0.05$), and the sensitivity was increased. Compared with TF-SB + si-con group, apoptosis rate of AGS cells in TF-SB + si-MIIP group was significantly decreased, cell survival rate was significantly increased, Bcl-XL protein expression was significantly increased, and Cleaved Caspase-3 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$). After radiotherapy, the survival rate of TF-SB + si-MIIP group was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of γ -H2AX protein was significantly decreased ($P < 0.05$), and the sensitivity was decreased. **Conclusions** TF-SB could inhibit the proliferation of gastric cancer cell line AGS, induce apoptosis, and improve its radiotherapy sensitivity through up-regulating MIIP.

Key words: total flavonoids of *Scutellaria barbata*; gastric cancer cell AGS; migration and invasion inhibitory protein (MIIP); cell proliferation; apoptosis; radiosensitivity

胃癌是全球常见的恶性肿瘤,也是全球第三大癌症相关死亡原因。据统计,2018年全球胃癌新发病例高达100万,且约78万人死于胃癌^[1]。尽管包括手术、放疗、化疗等综合治疗手段用于胃癌,但其预后仍然不容乐观。放射治疗在无法进行手术切除的胃癌中起着重要的作用,其可缓解晚期胃癌患者局部症状,更是术后辅助治疗的重要手段^[2-3],然而放疗抵抗的出现限制胃癌放疗疗效。因此,如何有效地抑制胃癌细胞存活,诱导细胞凋亡并提高放疗敏感性对胃癌治疗意义重大。近年来,中药已被证实具有显著的抗癌作用^[4-5]。半枝莲总黄酮(total flavonoids of *Scutellaria barbata*, TF-SB)是半枝莲提取物中的有效部位之一,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用^[6-7]。体内外研究表明,TF-SB具有抑制肿瘤发生、转移和血管生成的作用^[8-10]。然而,TF-SB对胃癌的抗肿瘤作用尚未完全阐明。迁移侵袭抑制蛋白(migration invasion inhibitory protein, MIIP)是近年发现的抑癌基因,胃癌中MIIP表达降低,过表达MIIP可抑制胃癌细胞的增殖和迁移^[11]。MIIP表达异常还与人类胶质瘤细胞放疗抵抗有关^[12]。本研究通过探讨TF-SB对胃癌细胞增殖、凋亡和放疗敏感性的影响,揭示其与MIIP之间的关系,为TF-SB在胃癌治疗中的应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人胃腺癌细胞AGS,购于上海通派生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

半枝莲购自河北中医学院,由河北中医学院药

学院刘勇教授鉴定为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don; 杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)购于美国Hyclone公司; 芦丁对照品(质量分数 $\geq 98\%$,货号D0842)购于上海宝曼生物科技有限公司; 细胞计数(cell counting kit, CCK-8)试剂盒、膜联蛋白V异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司; MIIP过表达质粒(pcDNA-MIIP)、质粒空载体(pcDNA)、MIIP小干扰RNA(si-MIIP)及其对照(si-con)由广州锐博生物公司提供; I抗: 兔抗B细胞淋巴瘤-x1(B cell lymphoma -x1, Bcl-x1)抗体、兔抗裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved Caspase-3)抗体、兔抗MIIP抗体、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体购于美国Abcam公司; 兔抗磷酸化组蛋白H2AX(γ -H2AX)抗体购于美国Trevigen公司; 山羊抗兔IgG购于南京金斯瑞生物公司; Lipofectamine 2000购于北京伊塔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

全自动酶标仪(EL10A)购于山东博科仪器有限公司; 流式细胞仪(CytoFLEX S)购自美国Beckman公司。

2 方法

2.1 TF-SB的制备

参照文献报道方法^[13]制备TF-SB,称取1 kg半枝莲,按照料液比1:15加入80%乙醇浸泡过夜,于70℃加热回流提取1 h,提取2次,合并提取液,减压回收至无醇味,回收液加入碳酸钙,充分搅拌2 h,离心后除沉淀,取上清液加浓HCl调pH值至2.0,充分

搅拌后静置12 h,离心,弃上清液,干燥后得到TF-SB粉末0.05 kg,经紫外分光光度法测定,总黄酮质量分数达72.5%。取适量提取物,用甲醇制备成10 mg·mL⁻¹的母液,实验时用培养基稀释至所需浓度。

2.2 实验分组

采用含不同质量浓度(0、25、50、100、200 μg·mL⁻¹) TF-SB的DMEM培养液分别处理AGS细胞24 h, CCK-8法测定细胞存活率,确定TF-SB后续实验浓度。为证实TF-SB通过调控MIIP表达进而影响AGS细胞增殖、凋亡和放疗敏感性,实验分组如下: TF-SB组为用含100 μg·mL⁻¹ TF-SB培养液处理24 h; pcDNA组、pcDNA-MIIP组、si-con组、si-MIIP组为分别转染pcDNA、pcDNA-MIIP、si-con、si-MIIP,转染浓度和时间分别为200 nmol·L⁻¹和24 h; TF-SB+si-con组、TF-SB+si-MIIP组为分别转染si-con、si-MIIP后采用含100 μg·mL⁻¹ TF-SB的培养液处理24 h。同时设置对照(不加药)组和溶剂对照(含相同浓度的甲醇)组。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖活力

将转染/未转染AGS细胞按每孔5×10³个铺96孔板,药物处理结束后,按照每孔10 μL加入CCK-8试剂,继续孵育2 h,全自动酶标仪检测450 nm波长各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

用不含EDTA的胰酶消化收集各组AGS细胞,预冷的PBS液重悬、洗涤细胞;加入适量结合缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为5×10⁵·mL⁻¹;取100 μL细胞悬液,加入5 μL的Annexin V-FITC混匀后,室温避光孵育15 min;再加入5 μL的PI染色,补加结合缓冲液至500 μL后上机检测细胞凋亡情况。

2.5 集落形成实验检测细胞放疗敏感性

将各组AGS细胞按照每孔250个铺到5个6孔板中,培养48 h后,给予不同照射量X射线(0、2、4、6、8 Gy)照射,继续培养2周。当肉眼看见克隆形成时,弃去培养液,PBS液洗涤后,甲醇固定,结晶紫染色,显微镜下计算大于等于50个细胞的克隆数。计算克隆形成率、细胞存活率。利用GraphPadPrism 7软件拟合单击多靶模型曲线,计算各放射生物学参数:平均致死剂量(D₀)、准阈剂量(D_q)、外推值(N)、2 Gy剂量下对应的存活分数值(SF2)、细胞存活曲线的钝化常数(k)、放射增敏比(SER)。

$$\text{克隆形成率} = \text{克隆数} / \text{接种细胞数}$$

$$\text{细胞存活率} = \text{实验组克隆形成率} / \text{对照组克隆形成率}$$

2.6 Western blotting检测Bcl-xl,cleaved Caspase-3和MIIP表达

收集各组AGS细胞,RIPA裂解法提取总蛋白,并用BCA法进行蛋白定量。变性后进行SDS蛋白电泳,随后进行PVDF转膜。5%脱脂牛奶封闭2 h,洗膜后,加入I抗Bcl-xl(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:500)、MIIP(1:500)、γ-H2AX(1:1 000)、β-actin(1:1 000)4℃孵育过夜;洗膜后,加入相应的II抗37℃孵育2 h;洗膜后,加入显影混合液,显影曝光。以目的条带与β-actin灰度值的比值表示目的蛋白的表达。

2.7 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用SNK- q 检验。

3 结果

3.1 TF-SB对胃癌AGS细胞存活率的影响

如表1所示,与TF-SB 0 μg·mL⁻¹组比较,TF-SB 25、50、100、200 μg·mL⁻¹组AGS细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。选取100 μg·mL⁻¹用于后续试验。

表1 TF-SB对胃癌细胞AGS存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%
TF-SB	0.00	100.82±5.12
	25.00	83.68±6.42*
	50.00	74.17±5.37*
	100.00	52.82±4.24*
	200.00	32.46±4.19*

与TF-SB 0 μg·mL⁻¹组比较:* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs TF-SB 0 μg·mL⁻¹ group

3.2 TF-SB促进胃癌细胞AGS凋亡

如图1和表2所示,与对照组和溶剂对照组比较,TF-SB 100 μg·mL⁻¹组AGS细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),Bcl-xl蛋白表达显著降低($P < 0.05$),cleaved Caspase-3和MIIP蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。

3.3 过表达MIIP对胃癌细胞AGS增殖和凋亡的影响

如图2和表3所示,与对照和pcDNA组比较,pcDNA-MIIP组AGS细胞MIIP、cleaved Caspase-3表达显著升高($P < 0.05$),Bcl-xl表达显著降低($P < 0.05$),细胞存活率显著降低($P < 0.05$),细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。

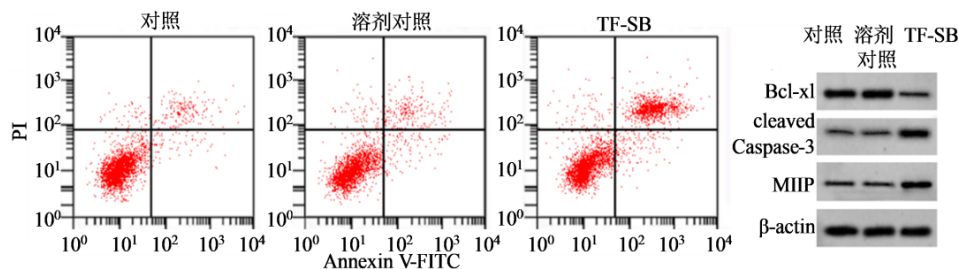


图1 TF-SB对AGS细胞凋亡和Bcl-xl、cleaved Caspase-3、MIIP蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of TF-SB on AGS cell apoptosis and expression of Bcl-xl, cleaved Caspase-3 and MIIP proteins

表2 TF-SB对AGS细胞凋亡和Bcl-xl、cleaved Caspase-3、MIIP蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 2 Effects of TF-SB on AGS cell apoptosis and expression of Bcl-xl, cleaved Caspase-3 and MIIP proteins ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Bcl-xl/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	MIIP/ β -actin	细胞凋亡率/%
对照	—	0.73 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.02	2.86 ± 0.43
溶剂对照	—	0.76 ± 0.07	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.03	3.24 ± 0.62
TF-SB	100	$0.35 \pm 0.05^{*\Delta}$	$0.65 \pm 0.06^{*\Delta}$	$0.52 \pm 0.07^{*\Delta}$	$16.47 \pm 2.35^{*\Delta}$

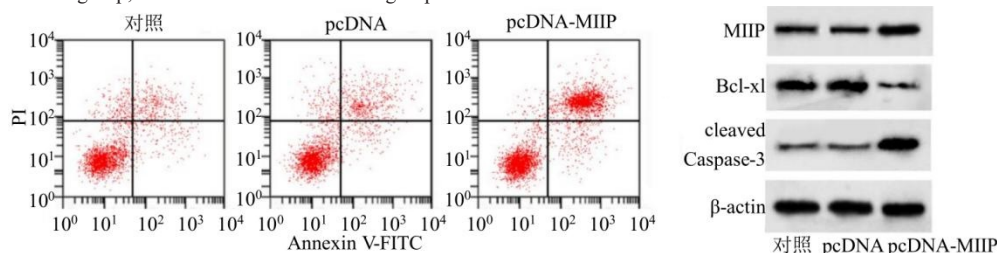
与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs solvent control group

图2 过表达MIIP对AGS细胞凋亡和Bcl-xl、cleaved Caspase-3、MIIP蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of overexpression of MIIP on AGS cell apoptosis and expression of Bcl-xl, cleaved Caspase-3 and MIIP proteins

表3 过表达MIIP对AGS细胞存活率、凋亡率和Bcl-xl、cleaved Caspase-3、MIIP蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 3 Effects of overexpression of MIIP on AGS cell survival rate, apoptosis and expression of Bcl-xl, cleaved Caspase-3 and MIIP proteins ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	浓度/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MIIP/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	Bcl-xl/ β -actin	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
对照	—	0.38 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.63 ± 0.05	101.57 ± 5.43	2.72 ± 0.45
pcDNA	200	0.35 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.61 ± 0.07	98.34 ± 8.60	3.69 ± 0.54
pcDNA-MIIP	200	$0.62 \pm 0.07^{*#}$	$0.87 \pm 0.08^{*#}$	$0.25 \pm 0.05^{*#}$	$73.27 \pm 6.64^{*#}$	$16.64 \pm 2.51^{*#}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与pcDNA组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs control; $^{\#}P < 0.05$ vs pcDNA group

3.4 沉默MIIP部分逆转TF-SB对胃癌AGS细胞的抑制作用

如图3和表4所示,与TF-SB+si-con组比较,TF-SB+si-MIIP组AGS细胞MIIP和cleaved Caspase-3蛋白表达显著降低($P < 0.05$),Bcl-xl蛋白表达显著增加($P < 0.05$),细胞存活率显著升高($P < 0.05$),细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)。

3.5 TF-SB促进胃癌细胞AGS放疗敏感性

如图5所示,采用不同剂量(0、2、4、6、8 Gy)射线分别照射对照组、溶剂对照组、TF-SB组、pcDNA

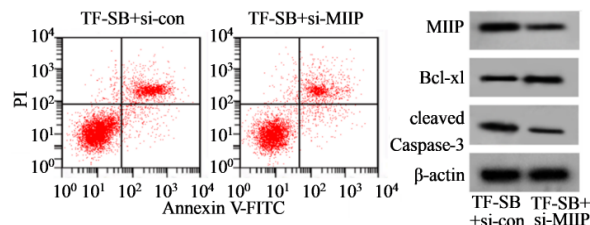


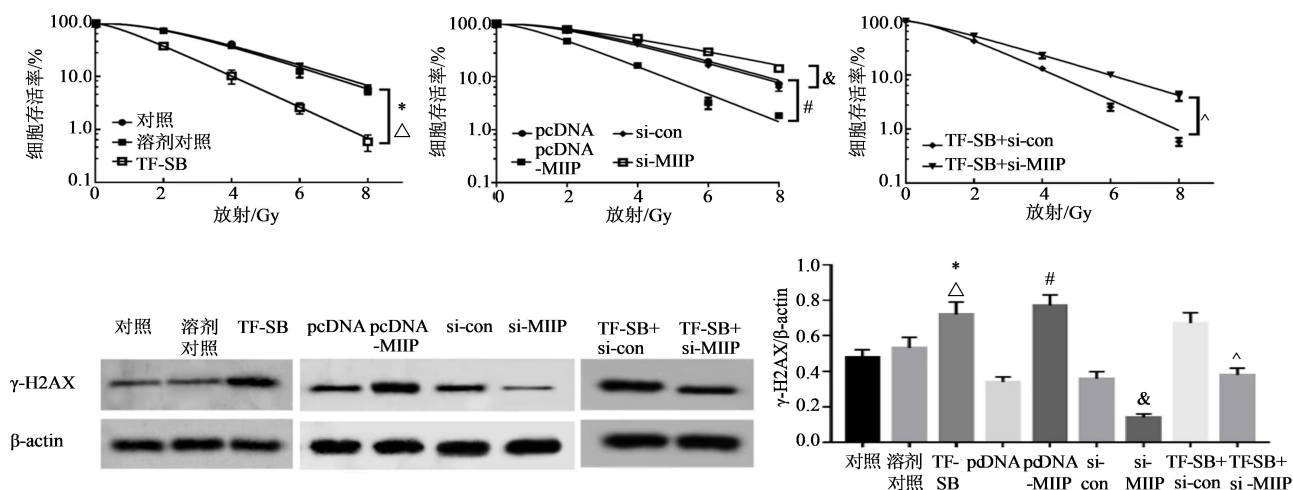
图3 沉默MIIP对TF-SB诱导凋亡作用的影响

Fig. 3 Effect of MIIP silencing on TF-SB induced apoptosis

组、pcDNA-MIIP组、si-con组、si-MIIP组、TF-SB+si-con组、TF-SB+si-MIIP组AGS细胞后,细胞存活

表4 沉默MIIP对TF-SB诱导凋亡作用的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 4 Effect of MIIP silencing on TF-SB induced apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	浓度	MIIP/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	Bcl-xl/ β -actin	细胞存活率/ %	细胞凋亡率/ %
TF-SB+si-con	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ +200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.63 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.05	101.57 $\pm$ 8.02	15.26 $\pm$ 2.48
TF-SB+si-MIIP	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ +200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.38 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.03*	0.51 $\pm$ 0.04*	138.64 $\pm$ 11.04*	7.37 $\pm$ 1.06*

与TF-SB+si-con组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs TF-SB+si-con group与对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与pcDNA组比较: # $P < 0.05$; 与si-con组比较: & $P < 0.05$; 与TF-SB+si-con组比较: ^ $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs solvent control group; # $P < 0.05$ vs pcDNA group; & $P < 0.05$ vs si-con group; ^ $P < 0.05$ vs TF-SB+si-con group图5 TF-SB对AGS细胞放射后存活率及 γ -H2AX蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Fig. 5 Effects of TF-SB on survival rate of AGS cells and expression of γ -H2AX protein after radiation ($\bar{x} \pm s, n=9$)

率呈剂量相关性降低,且TF-SB组AGS细胞存活率显著低于对照组和溶剂对照组($P < 0.05$),pcDNA-MIIP组AGS细胞存活率显著低于pcDNA组($P < 0.05$),si-MIIP组AGS细胞存活率显著高于si-con组($P < 0.05$),TF-SB+si-MIIP组AGS细胞存活率显著高于TF-SB+si-con组($P < 0.05$)。经4 Gy射线照射后,TF-SB组AGS细胞 γ -H2AX蛋白表达显著高于对照组和溶剂对照组($P < 0.05$),pcDNA-MIIP组 γ -H2AX蛋白表达显著高于pcDNA组($P < 0.05$),si-MIIP组 γ -H2AX蛋白表达显著低于si-con组,TF-SB+si-MIIP组 γ -H2AX蛋白表达显著低于TF-SB+si-con组($P < 0.05$)。单击多靶模型参数见表5,TF-SB组 D_0 、 D_q 、 N 、SF2低于对照组和溶剂对照组($P < 0.05$), k 高于对照组和溶剂对照组;pcDNA-MIIP组 D_0 、 D_q 、 N 、SF2低于pcDNA组, k 高于pcDNA组;si-MIIP组 D_0 、 D_q 高于si-con组;TF-SB+si-MIIP组 D_0 高于TF-SB+si-con组。TF-SB组细胞SER值为1.42,pcDNA-MIIP组细胞SER值为1.41,si-MIIP组细胞SER值为0.72,TF-SB+si-MIIP

组细胞SER值为0.68。

4 讨论

过度增殖、凋亡异常以及放疗抵抗是肿瘤的重要生物学特征。本研究首先探讨了TF-SB对胃癌细胞AGS增殖的影响,并确定TF-SB以剂量相关方式抑制AGS细胞增殖,这与张跃等^[14]的研究报道相符。Bcl-xl是细胞抗凋亡家族的重要成员,其通过抑制细胞色素c从线粒体膜释放到细胞质,抑制Caspase-9活化,最终抑制凋亡执行蛋白cleaved Caspase-3表达发挥抗肿瘤作用^[15]。本研究表明,TF-SB可诱导AGS细胞凋亡,并下调抗凋亡蛋白Bcl-xl表达,上调促凋亡蛋白cleaved Caspase-3表达。为确定TF-SB对细胞放疗敏感性的影响,本研究进行集落形成实验,并根据存活曲线计算放射生物学参数。SER是放射敏感性的直接反映,本研究表明,在2、4、6、8 Gy时,TF-SB预处理组AGS细胞的 D_0 、 D_q 值明显降低,SER为1.42。表明大多数细胞丧失了继续增殖的能力,即TF-SB干预可提高AGS细胞的放疗敏感性。放疗还可直接引起DNA

表5 AGS细胞放射后单击多靶模型拟合的参数值

Table 5 Parameter values of multi-target model fitting after radiotherapy of AGS cells

组别	D_0/Gy	D_q/Gy	N	SF2	k	SER(D_0 比)
对照	2.17	2.25	2.81	0.76	0.46	—
溶剂对照	2.08	2.16	2.82	0.74	0.48	—
TF-SB	1.47	0.67	1.58	0.37	0.68	1.42
pcDNA	2.33	2.16	2.53	0.75	0.43	—
pcDNA-MIIP	1.64	0.98	1.82	0.47	0.61	1.41
si-con	2.33	2.16	2.53	0.75	0.43	—
si-MIIP	3.23	2.41	2.11	0.80	0.31	0.72
TF-SB+si-con	1.54	0.88	1.77	0.43	0.65	—
TF-SB+si-MIIP	2.27	0.75	1.39	0.53	0.44	0.68

双链断裂, γ -H2AX是放疗后DNA损伤的重要分子标志物^[16-17]。本研究发现TF-SB干预可增加放疗后AGS细胞 γ -H2AX表达,提示TF-SB通过增加放疗后AGS细胞DNA损伤进而提高放疗敏感性。

MIIP基因位于染色体1p36区域,在肿瘤发生中起着关键作用。既往研究显示,MIIP在乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中呈低表达^[18-19]。MIIP还可抑制子宫内膜癌细胞的迁移和侵袭,其表达降低与子宫内膜癌发生发展有关^[20]。MIIP还可改变有丝分裂检查点蛋白的稳定性,干扰拓扑异构酶II活性,引起染色体错配,进而促进大肠癌进展^[21]。此外,MIIP表达上调还可降低胶质瘤干细胞的迁移和侵袭能力^[22]。本研究发现TF-SB干预后AGS细胞MIIP的表达显著增加,于是推测MIIP表达增加可能与TF-SB抗肿瘤作用有关。功能分析显示,过表达MIIP可促进AGS细胞凋亡,上调Cleaved Caspase-3表达,下调Bcl-xl表达,这与Sun等^[11]MIIP在胃癌中发挥抑癌基因作用的研究结论一致。此外,过表达MIIP还可提高放疗后AGS细胞 γ -H2AX表达水平,并提高其放疗敏感性。已有研究报道,MIIP通过调节Bax和Bcl-2表达促进细胞凋亡,并诱导G₂/M期细胞周期阻滞,从而提高鼻咽癌细胞的放射敏感性^[23],与本研究结论类似。进一步研究显示,沉默MIIP可部分逆转TF-SB对AGS细胞的增殖抑制、凋亡促进和放疗增敏作用。以上研究表明,上调MIIP表达是TF-SB发挥抗胃癌作用的重要分子机制。

本研究证实TF-SB可抑制胃癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,并提高其放疗敏感性,其机制与上调MIIP表达有关,为TF-SB在胃癌治疗中的应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer

statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 张振, 李国元. 胃癌新辅助治疗的研究现状和进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(5): 194.

Zhang Z, Li G Y. Research status and progress of neoadjuvant therapy for gastric cancer [J]. J Clin Med Lit, 2019, 6(5): 194.

[3] 徐菁, 魏启春. 局部晚期胃癌术后辅助放疗的价值 [J]. 实用肿瘤杂志, 2018, 33(2): 112-115.

Xu J, Wei Q C. The value of adjuvant radiotherapy after surgery for locally advanced gastric cancer [J]. J Pract Oncol, 2018, 33(2): 112-115.

[4] Hu X Q, Sun Y, Lau E, et al. Advances in synergistic combinations of Chinese herbal medicine for the treatment of cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2016, 16(4): 346-356.

[5] 李阳, 赵晨翔, 张雅敏. 中药提取物抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(11): 2787-2790.

Li Y, Zhao C X, Zhang Y M. Research progress in anti-tumor mechanism of Chinese herbs extracts [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(11): 2787-2790.

[6] 王翊豪, 许晓义, 杨斯琪, 等. 半枝莲药理作用及化学成分提取的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(6): 116-118.

Wang Y H, Xu X Y, Yang S Q, et al. Research progress on the pharmacological effects and chemical composition extraction of *Scutellaria barbata* [J]. J Mudanjiang Med Univ, 2017, 38(6): 116-118.

[7] 吴朗杰, 赵春燕, 战丽彬. 基于网络药理学和分子对接研究白花蛇舌草和半枝莲药对治疗宫颈癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1049-1058.

Wu L J, Zhao C Y, Zhan L B. Mechanism of *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* in treatment of cervical cancer based on network pharmacology and molecular

- docking [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(4): 1049-1058.
- [8] 林敬明, 刘煜, 罗荣城. 半枝莲提取物抗人肝癌 Hep-G2 细胞增殖及其机制研究 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(7): 975-977.
- Lin J M, Liu Y, Luo R C. Effect of *Scutellaria barbata* extract against human hepatocellular Hep-G2 cell proliferation and its mechanism [J]. J South Med Univ, 2006, 26(7): 975-977.
- [9] 任守雷, 郭晓晓, 陈翠翠, 等. 半枝莲总黄酮对非小细胞肺癌细胞增殖及迁移的影响 [J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1939-1942, 2122.
- Ren S L, Guo X X, Chen C C, et al. Effects of total flavonoids of *Scutellaria barbata* D. Don on proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells [J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(10): 1939-1942, 2122.
- [10] 徐敏, 卜平, 李瑶瑶. 半枝莲黄酮类化合物对体外肿瘤血管生成的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2215-2219.
- Xu M, Bu P, Li Y Y. Effects of an extract from *Scutellaria barbata* e D. DON on tumor angiogenesis *in vitro* [J]. World Chin J Dig, 2007, 15(20): 2215-2219.
- [11] Sun D, Wang Y W, Jiang S S, et al. MIIP is downregulated in gastric cancer and its forced expression inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 8951-8964.
- [12] 臧晋, 王一维, 王欣, 等. MIIP 基因对人胶质瘤细胞 U87 增殖能力与放疗敏感性影响 [J]. 临床军医杂志, 2016, 44(9): 900-903.
- Zang J, Wang Y W, Wang X, et al. Effect of MIIP gene on the proliferation and radiosensitivity of human glioblastoma cell line U87 [J]. Clin J Med Off, 2016, 44(9): 900-903.
- [13] 郝玉玲, 缪红, 商亚珍. 紫外分光光度法测定半枝莲总黄酮含量 [J]. 承德医学院学报, 2009, 26(1): 66-67.
- Chi(Xi) Y L, Miao H, Shang Y Z. Determination of Total Flavonoids in *Scutellaria barbata* by Ultraviolet Spectrophotometry [J]. J Chengde Med Coll, 2009, 26(1): 66-67.
- [14] 张跃, 张科, 赵琦, 等. 半枝莲抑制胃癌 SGC-7901 细胞浸润转移作用及机理 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2692-2694.
- Zhang Y, Zhang K, Zhao Q, et al. The effect and mechanism of *Scutellaria barbata* in inhibiting invasion and metastasis of gastric cancer SGC-7901 cell [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(11): 2692-2694.
- [15] 丁黎敏, 黄小民, 张微, 等. 原花青素通过对 Caspase-3 和 Bcl-x1、Bax 蛋白的调节抑制人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 582-584.
- Ding L M, Huang X M, Zhang W, et al. Inhibition of procyanidins on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cell through the regulating caspase-3 and bcl-x1 and bax [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2013, 31(3): 582-584.
- [16] 邓洁, 庄亮, 陈元. 吉非替尼对肺癌细胞株 H358 放疗敏感性的影响及其机制 [J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(11): 841-847.
- Deng J, Zhuang L, Chen Y. Effect and mechanism of radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell line H358 following gefitinib treatment [J]. Chin J Lung Cancer, 2011, 14(11): 841-847.
- [17] Deng P, Wu Y N. Knockdown of miR-106a suppresses migration and invasion and enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by upregulating FBXW7 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(4): 1184-1193.
- [18] Du Y Y, Wang P. Upregulation of MIIP regulates human breast cancer proliferation, invasion and migration by mediated by IGFBP₂ [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(7): 152440.
- [19] Wang X H, Liu H L, Wang X Y, et al. Clinical significance of migration and invasion inhibitor protein expression in non-small-cell lung cancer [J]. Oncol Lett, 2014, 8(6): 2417-2422.
- [20] 姜素, 田文艳, 闫晔, 等. 迁移侵袭抑制蛋白和 p21 活化激酶 1 在子宫内膜癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(5): 359-364.
- Jiang S, Tian W Y, Yan Y, et al. Expression and clinical significance of MIIP and PAK1 in endometrial carcinoma [J]. Chin J Oncol, 2018, 40(5): 359-364.
- [21] Sun Y, Ji P, Chen T, et al. MIIP haploinsufficiency induces chromosomal instability and promotes tumour progression in colorectal cancer [J]. J Pathol, 2017, 241(1): 67-79.
- [22] Zhao X H, Liu Y H, Zheng J, et al. GAS5 suppresses malignancy of human glioma stem cells via a miR-196a-5p/FOXO1 feedback loop [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(10): 1605-1617.
- [23] Zhou H P, Qian L X, Zhang N, et al. MIIP gene expression is associated with radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9471-9479.