

基于PARP在胃癌中的作用探讨胃复春胶囊对SGC-7901细胞增殖、凋亡的影响及机制

马吕丽, 陆晓晶, 张 伟*

杭州胡庆余堂药业有限公司, 浙江 杭州 311199

摘要:目的 分析胃癌患者中多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)族基因的表达情况及其与预后的关系, 体外细胞实验研究胃复春胶囊醇提物(WFCEE)对胃癌SGC-7901细胞及PARP表达的影响。方法 基于TCGA/GTEX/GEO数据库分析PARP族基因表达及预后, 蛋白互作网络分析PARP族基因的主要生物功能, 并采用MCODE联合cytoHubba预测核心基因及其作用通路。将SGC-7901细胞与WFCEE(10、20、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共孵育, 采用CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒检测细胞活力, 流式细胞术Annexin V/PI双染色检测细胞凋亡, Western blotting法检测PARP及凋亡相关蛋白表达情况。结果 与正常组比较, 胃癌患者PARP1、PARP4、PARP6、PARP9等基因表达有显著性差异; K-M曲线生存预后分析显示PARP平均表达量低组患者生存率高、中位生存时间更长。蛋白互作分析显示PARP家族主要与蛋白质ADP-核苷酸化、戊糖基团转移酶活性、糖基团转移酶活性、染色体上蛋白质定位、正或负向调节DNA代谢过程等过程相关, 其中PARP1、PARP2、PARP3、PARP9、PARP10、PARP12、PARP14为核心基因, 调节碱基切除修复、细胞凋亡、坏死性凋亡等信号通路。与对照组比较, WFCEE可时间、剂量相关性地抑制SGC-7901细胞活力并诱导凋亡($P<0.05, 0.01$); 20、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组PARP蛋白表达量显著降低($P<0.05$); 各浓度组cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Bax蛋白表达量显著增加($P<0.01, 0.001$), Bcl-2蛋白表达量显著降低($P<0.01, 0.001$)。结论 PARP在胃癌组表达与正常组比较存在显著差异, 并且与预后相关性显著, 在胃癌临床应用方面有一定的价值; WFCEE可抑制胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能与Bax/Bcl2-caspase3/9-PARP路径相关。

关键词: 多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶; 胃复春胶囊; 胃癌; 预后; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1214-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.007

Effect and mechanism of Weifuchun Capsules on proliferation and apoptosis of SGC-7901 cells based on role of PARP in gastric cancer

MA Luli, LU Xiaojing, ZHANG Wei

Hangzhou Huqing Yutang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311199, China

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the expression of polyadenosine diphosphate-ribose polymerase (PARP) family genes and prognosis, and to verify the intervention of Weifuchun Capsules ethanol extract (WFCEE) on gastric cancer SGC-7901 cells and PARP expression through cell *in vitro* experiments. **Methods** The expression and prognosis of PARP family genes were analyzed based on TCGA/GTEX/GEO database, protein interaction network analysis of the main biological functions of PARP family genes and using MCODE combined with cytoHubba to predict core genes and their pathways. Gastric cancer SGC-7901 cells were co-incubated with WFCEE (10, 20, and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) cell proliferation and activity detection kit, and cells were detected by flow cytometry Annexin V/PI double staining apoptosis, Western blotting method to detect the expression of PARP and related apoptosis proteins. **Results** There were significant differences in the expressions of PARP1, PARP4, PARP6, and PARP9 in gastric cancer group compared with control group. K-M curve survival prognosis analysis showed that patients with low average expression of PARP had a higher survival rate and a longer median survival time. Protein interaction analysis shows that the PARP family is mainly related to protein ADP-nucleotide, pentose group transferase activity, sugar group transferase activity, protein localization on chromosome, positive or negative regulation of DNA metabolism

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 浙江省科技计划项目(中药二次开发研究——以临床价值和品质提升为导向的“胃复春”大品种二次开发研究-2022C03131)

第一作者: 马吕丽(1977—), 高级工程师, 研究方向为中药制剂、中药学。E-mail: 1294530505@qq.com

*通信作者: 张 伟(1971—), 高级工程师, 研究方向为中药研发。E-mail: jonhwei@163.com

and other processes, among which *PARP1/PARP2/PARP3/PARP9/PARP10/PARP12/PARP14* are core genes, regulating base excision repair/apoptosis/ necroptosis and other signaling pathways. Experiments proved that, Compared with control group, WFCEE can inhibit the viability of SGC-7901 cells and induce apoptosis of SGC-7901 cells in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$, 0.01, and 0.001). Western blotting shows that, WFCEE can down-regulate the expression of PARP and up-regulate the expressions of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and Bax ($P < 0.05$, 0.01, and 0.001), and increase the expression of Bcl-2 ($P < 0.01$ and 0.001). **Conclusion** Compared with normal group, the expression of PARP in the gastric cancer group is significantly different and has a significant relationship with the prognosis, which has certain value in the clinical application of gastric cancer. Experiments have proved that WFCEE can inhibit the proliferation of gastric cancer cells and induce their apoptosis, and its mechanism of action is speculated to be the Bax/Bcl2-caspase3/9-PARP pathway.

Key words: polyadenosine diphosphate-ribose polymerase; Weifuchun Capsule; gastric cancer; prognosis; apoptosis

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位^[1]。绝大多数胃癌属于腺癌,早期症状不明显、诊断后无法手术、保守手术切除后复发等原因导致胃癌5年生存率较低。胃癌的靶向治疗可针对性地损伤癌细胞,减少正常细胞损害,但目前治疗药物种类及作用均有限,亟需开发新的治疗位点。近代遗传学发现多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)是存在于多数真核细胞中的一个多功能蛋白质翻译后修饰酶,是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶(caspase)的切割底物,在DNA损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用。2005年首次证实与乳腺癌易感基因(BRCA)1/2突变之间存在“合成致死”效应,其抑制剂奥拉帕利、鲁卡帕利、尼拉帕利以及他拉唑帕利已上市集中用于乳腺癌与卵巢癌治疗。新型抑制剂pamiparib联用temozolomide在剂量扩增阶段纳入20名胃癌/胃食管交界处癌症患者,经治疗15名可评估缓解,33.3%的患者实现了控制^[2],抑制PARP可能是一个新的有针对性的胃癌治疗策略^[3-4]。PARP家族共有17个成员,按照各自结构域和功能特征可将其大致分为4种不同的类型:DNA依赖性PARPs,包括PARP1、PARP2和PARP3;端锚聚合酶(Tankyrase),包括PARP5a、PARP5b;CCCH(即Cys-Cys-Cys-His)PARPs,包括PARP7、PARP12、PARP13;macro PARPs,包括PARP9、PARP14、PARP15。其中,PARP1是PARP家族中最主要的成员,在细胞中承担着PARP家族90%以上的功能,是DNA损伤修复中的关键作用因子。

化疗药物长期运用中存在不良反应作用、耐药等风险而临床效果不佳^[5],亟需开发高效、低毒的胃癌治疗药物或辅助治疗药物。近年来,从天然产物中寻找抗癌活性成分研究成为热点^[6]。胃复春胶囊由红参、香茶菜、麸炒枳壳组成,具有健脾益气、活血解毒的功效,用于胃癌前期病变治疗及胃癌手术

后辅助治疗^[7-8],阐释胃复春胶囊药效学和作用机制有重要意义。因此本研究从基因表达及预后分析出发探究PARP胃癌临床价值;并以人胃癌细胞系为研究对象,探究胃复春胶囊对胃癌细胞增殖、凋亡的影响及作用机制。

1 材料

1.1 数据库

TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)、GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)、GTEx(<https://www.gtexportal.org/>)、GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)^[9]、STRING(<https://string-db.org>)、Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/>)^[10]、GENEMANIA(<http://genemania.org/>)、KOBAS(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)、Cytoscape 3.8.0;MCODE^[11]、cytoHubba^[12]等。

1.2 细胞、药物及主要试剂

人胃癌细胞株SGC-7901(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);胃复春胶囊(杭州胡庆余堂药业有限公司,每粒0.35 g,批号2011153),去胶囊壳后称取内容物10 g,以50 mL 95%乙醇回流提取3次,提取时间分别为20、20、20 min,合并3次提取液后滤过除渣,减压浓缩,烘干,得胃复春胶囊醇提取物粉末,收率为16.8%。临用时溶解于DMSO,配制成1 mg·mL⁻¹的母液,实验时用培养液(DMEM)稀释至所需浓度。细胞培养液RPMI1640(北京四季青生物材料研究所);CCK-8细胞活力检测试剂盒[赛信通(上海)生物试剂有限公司];胎牛血清(Invitrogen公司);AnnexinV/PI细胞凋亡检测试剂盒[翌圣生物科技(上海)有限公司];抗体PARP、cleaved PARP、z-VAD-FMK、Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、GAPDH(Cell Signaling Technology);细胞浆蛋白抽提试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.3 主要仪器

超低温冰箱 288 Boxes[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];XS105DU 梅特勒电子天平(梅特勒仪器有限公司);Chameleon 多功能酶标仪(芬兰 Hidex 公司);Eppendorf-5418 高速离心机(深圳市赛亚泰科仪器设备有限公司);美谱达 UV-3000PC 型紫外可见分光光度计(杭州俊升科学器材有限公司);DYY-6D 三恒电泳仪(北京市六一仪器厂);SQ-80N 细胞培养箱(上海幕斯实验设备有限公司);BD FACSCanto II 流式细胞仪(上海碧迪医疗器械有限公司);HY-8B 恒速大容量振荡器(常州市亿能实验仪器厂);上海申安 40 立升立式高压蒸汽灭菌器 LDZM-40L(杭州俊升科学器材有限公司)。

2 方法

2.1 PARP 表达

以 TCGA、GTEx 数据库为数据来源分析 PARP 家族基因在胃癌患者($n=408$)和正常组($n=211$)的表达,以 $\log_2FC$ filter=1、FDR filter=0.05 为标准分析基因差异表达显著性。

2.2 总生存期预后分析

登录 Kaplan-Meier Plotter,选择“gastric cancer”作为数据来源,PARP 家族基因作为目标,symbol 与探针对应关系见表 1。以“Auto select best cutoff”作为分组依据,分为高表达量组(high)和低表达量组(low)。纳入所有阶段患者,排除偏差阵列,绘制总生存期(OS)生存分析曲线并计算中位生存时间。

2.3 蛋白质相互作用(PPI)及核心基因分析

将 PARP 家族基因 Symbol ID 键入 GENEMANIA 及 STRING 中,设置物种为“human”、设定置信度为“high confidence>0.7”、删除游离节点、进行 PPI 及功能分析,结果保存为 TSV 文件导入 Cytoscape 中,分别利用 MCODE 及 cytoHubba 模块筛选核心基因,并取交集作为最终的核心基因,核心基因导入 KOBAS 数据库,设置物种为人类,以 $P<0.05$ 为标准进行通路富集,预测作用路径。

2.4 实验验证

2.4.1 细胞培养 将胃癌细胞株 SGC-7901 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱内,取对数生长期的细胞用于实验。

2.4.2 细胞增殖抑制实验 取 5×10^4 ·mL⁻¹ 对数生长期的 SGC-7901 细胞,分别以每孔 100 μL 接种于

表 1 PARP 家族探针

Table 1 PARP family probes

基因	Symbol Id	Probe Id
PARP1	PARP1	208644_at
PARP2	PARP2	214086_s_at
PARP3	PARP3	209940_at
PARP4	ADPRTL1	202239_at
PARP5A	pART5	202561_at
PARP5B	TNKS2	218228_s_at
PARP6	PARP6	232683_s_at
PARP7	pART14	212665_at
PARP8	PARP8	244008_at
PARP9	PARP9	223220_s_at
PARP10	PARP10	229350_x_at
PARP11	PARP11	229138_at
PARP12	PARP12	218543_s_at
PARP13	ZAP	213051_at
PARP14	PARP14	224701_at
PARP15	PARP15	1553380_at
PARP16	C15orf30	219034_at

96 孔板,细胞贴壁后,吸去培养基,每孔加入终质量浓度为 0~100 μg·mL⁻¹ (0 μg·mL⁻¹ 为对照组) 的 WFCEE,不接种细胞,以同体积 RPMI 1640 培养液为空白对照。各质量浓度均设 4 个复孔,分别继续培养 24 h 后,吸去药液,每孔加入含 10% CCK-8 的培养基 100 μL,继续孵化 4 h,酶标仪 450 nm 下测定各孔吸光度(A)值。时间相关性实验与上述操作相同,每孔加入质量浓度 50 μg·mL⁻¹ 的 WFCEE,处理时间分别为 24、48、72 h,吸去药液,每孔加入含 10% 的 CCK-8 的培养基 100 μL,继续孵化 4 h,多功能读板机 450 nm 下测定各孔 A 值。计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将对数生长期的 SGC-7901 细胞,以 1×10^6 ·mL⁻¹ 浓度接种于 6 孔细胞培养板内,待细胞贴壁后分别加入终质量浓度为 0(对照组)、10、20、50 μg·mL⁻¹ 的 WFCEE,继续培养 24 h 后,收集细胞,离心固定后加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光条件下染色。筛网滤过后送流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。

2.4.4 Western blotting 检测蛋白表达 细胞分组及给药同“2.4.3”项,根据试剂盒说明书对 SGC-7901 细胞浆蛋白进行抽提操作,提取细胞内总蛋白并测定蛋白浓度,蛋白样品加入 1/5 体积的 5× 上样缓冲液,于沸水中煮沸 5 min,根据蛋白浓度以每孔 20 μg

上样,进行SDS-PAGE电泳,然后电转至PVDF膜上,室温封闭1 h,加入一抗4℃过夜。TBST清洗3次,加入1:1 000稀释的辣根酶标记的兔抗山羊IgG,室温孵育2 h,清洗3次,ECL发光液显色,观察各条带深浅变化。

2.4.5 统计学方法 应用SPSS 19.0统计软件进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 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,组间两两比较采用LSD- t 检验。

3 结果

3.1 PARP基因表达

PARP家族基因在胃癌组($n=408$)和正常组($n=211$)表达量见图1,以 $\log_2FCfilter=1$ 、FDR Filter=0.05为标准筛选得PARP1、PARP4、PARP6、

PARP9、PARP12、PARP13、PARP14表达存在显著差异。

3.2 总生存预后分析

经条件筛选共纳入患者631例,由于GSE62254($n=300$)与GSE14120($n=145$)、GSE15459($n=200$)、GSE22377($n=43$)、GSE29272($n=268$)、GSE51105($n=94$)的“longer survival”“shifted expression”等临床特征差异较大,因而分为2组进行分析,记为EX62254($n=348$)和62254($n=283$)2组,以PARP家族基因及总体均值表达量进行生存分析,结果见图2、3,中位生存时间见图4。总生存预后分析显示,在EX62254组中,PARP 2~4、PARP5B、PARP8、PARP10、PARP 12~16表达量与胃癌患者生存周期显著相关($P<0.05$),其

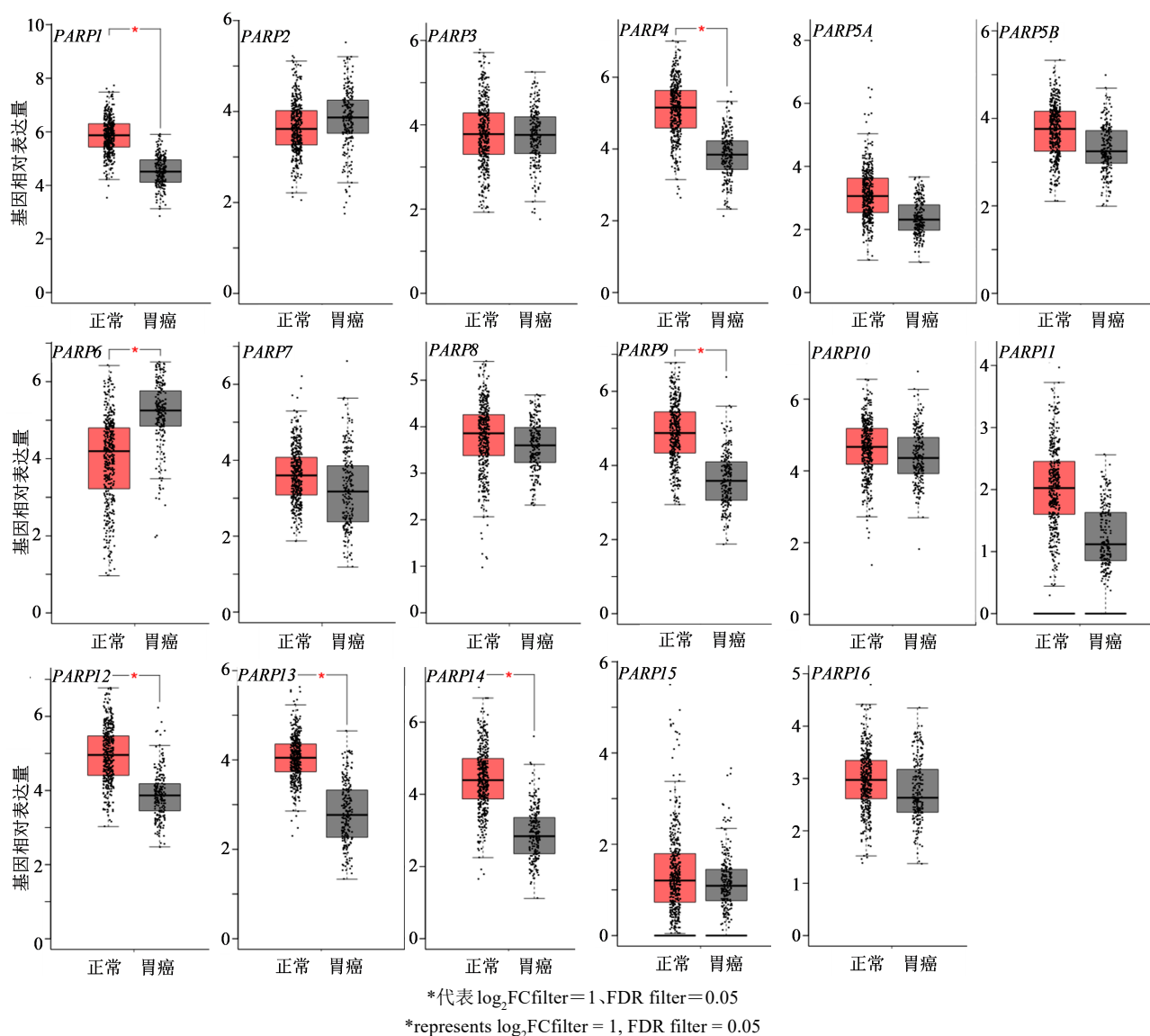


图1 PARP家族基因在胃癌组和正常组表达

Fig. 1 Expression of PARP family genes in gastric cancer group and normal group

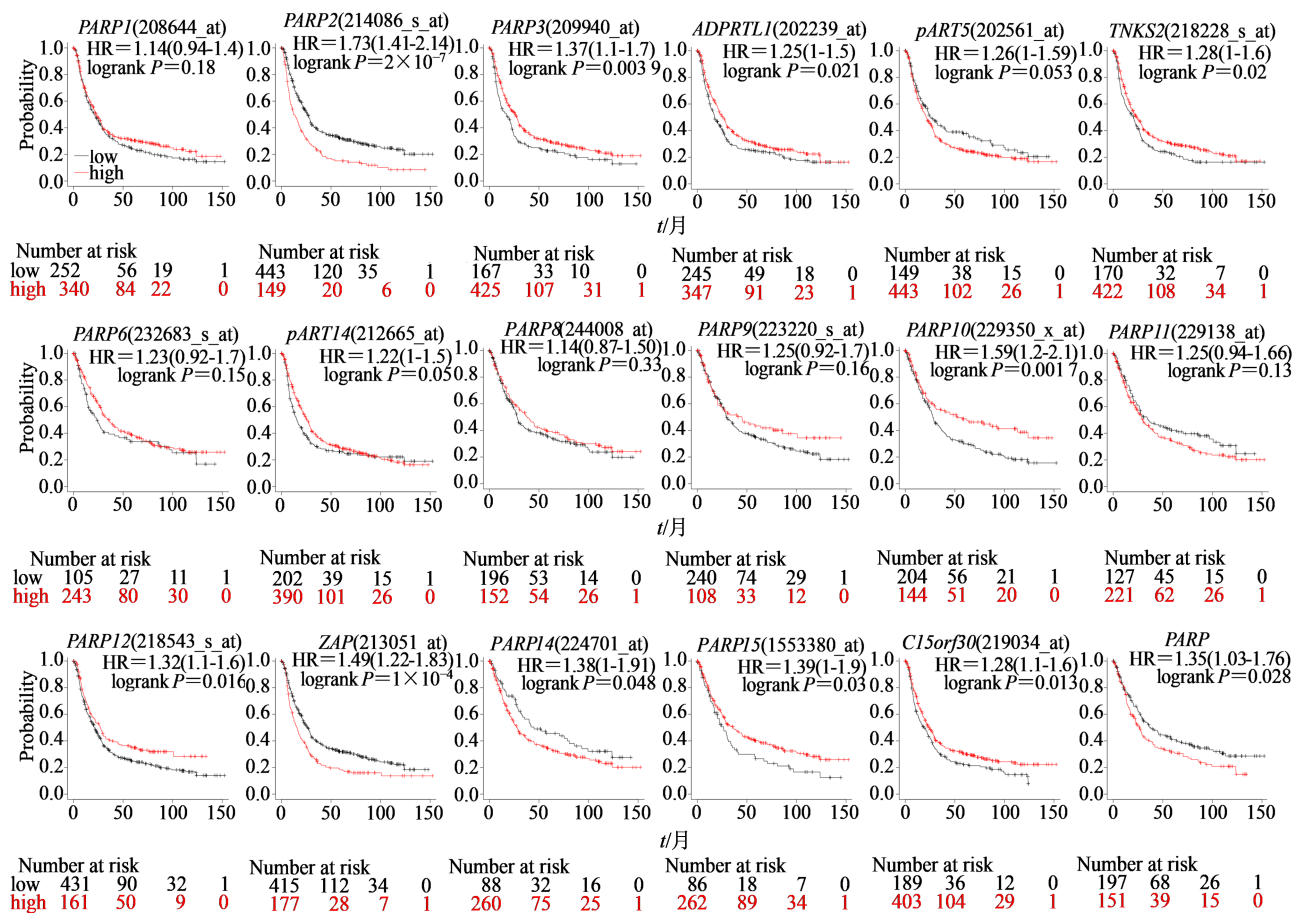


图2 PARP在EX62254组总生存预后分析

Fig. 2 Overall survival prognosis analysis of PARP in EX62254 group

中 *PARP2/13* 极显著相关 ($P < 0.001$), 平均表达量与胃癌患者生存周期显著相关 ($P = 0.028$)。在 62254 组中, *PARP 1~2*、*PARP5A/B*、*PARP6*、*PARP 8~9*、*PARP 12~16* 表达量与胃癌患者生存周期显著相关 ($P < 0.05$), 其中 *PARP1/3/6/9/12* 极显著相关 ($P < 0.001$), 平均表达量与胃癌患者生存周期相关极显著 ($P = 0.00048$), 结合中位生存时间可知 *PARP* 整体表达量低组患者生存周期更长。

3.3 PPI及核心基因分析

将 *PARP* 家族基因 Symbol Id 键入 GENEMANIA 进行 PPI 分析, 结果见图 5, 内圈为 *PARP* 家族成员, 外圈为 20 个相关联的基因, 共建立 607 个相互作用, 其中共享蛋白质结构域占 89.69%、物理相互作用占 5.91%、共表达占 3.27%、共定位占 0.97%、遗传相互作用占 0.09%、预测占 0.07%, 主要与蛋白质 ADP-核苷酸化、戊糖基团转移酶活性、糖基团转移酶活性、染色体上蛋白质定位、正或负向调节 DNA 代谢过程、端粒区染色体、双链断裂修复等相关。

采用 MCODE 分析核心基因结果如图 6 左侧所示, 其中橘红色部分为分析出的核心基因。采用

cytoHubba 分析核心基因结果如图 6 右侧所示。将 2 种方式筛选的核心基因取交集 (图 7), *PARP1*、*PARP2*、*PARP3*、*PARP9*、*PARP10*、*PARP12*、*PARP14* 为双重验证下的核心基因, 在其他基因调控及生物学过程中发挥重要作用。KEGG 富集分析 ($P < 0.05$) 显示 (图 8), 核心基因主要通过调节碱基切除修复、细胞凋亡、坏死性凋亡、NF- κ B 信号通路发挥作用。

3.4 实验验证

3.4.1 WFCEE 对 SGC-7901 细胞活力的影响
WFCEE 处理 24 h 后, 可剂量相关性降低 SGC-7901 细胞活力, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(43.85 \pm 3.30) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 结果见图 9。50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 WFCEE 分别处理 24、48、72 h 后, 可不同程度 (时间相关性地) 抑制 SGC-7901 细胞活力 ($P < 0.05, 0.01$), 其中 24、48、72 h 时细胞相对存活率分别下降为 47.3%、31.2%、12.7%, 结果见图 10。即随着 WFCEE 处理时间的增加, 抑制细胞活力的作用也增强, 呈现时间相关效应。

3.4.2 SGC-7901 细胞凋亡 如图 11 所示, 终质量浓度分别为 10、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 WFCEE 处理 SGC-

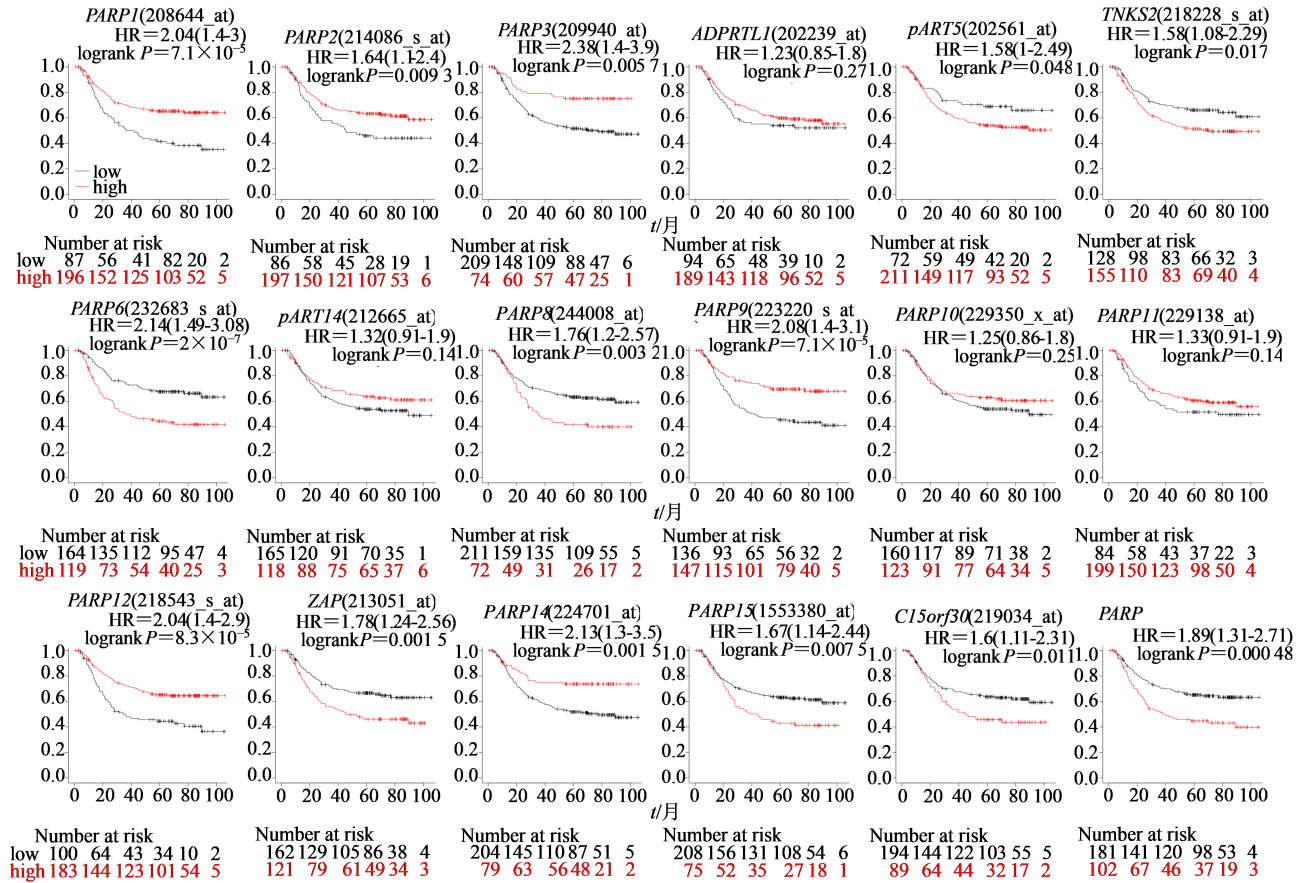


图3 PARP在62254组总生存预后分析

Fig. 3 Overall survival prognosis analysis of PARP in 62254 group

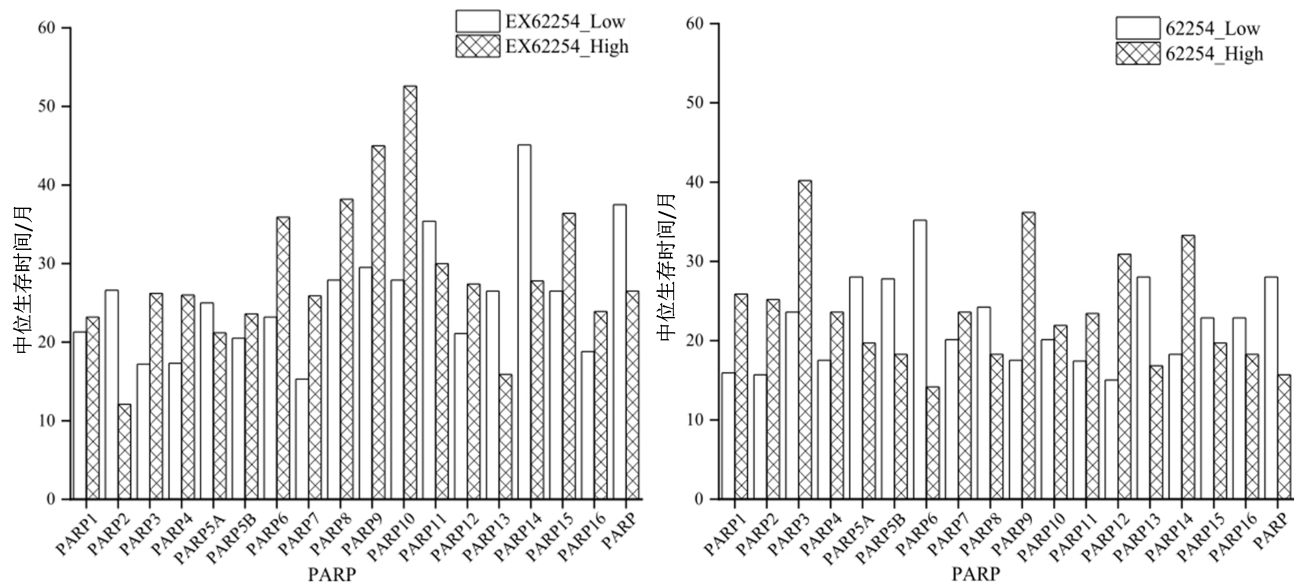


图4 中位生存时间

Fig. 4 Median survival time

7901 细胞 24 h 后, 细胞平均凋亡率分别为 21.2%、36.2%、46.5%, 明显高于对照组 (3.88%, $P < 0.001$), 且呈明显剂量相关性。流式细胞仪检测结果显示, WFCCE 能诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

3.4.3 SGC-7901 细胞 PARP 蛋白表达 Western blotting 结果如图 12 所示, 与对照组比较, WFCCE 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后 PARP 蛋白表达呈剂量相关性下调趋势, 20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组差异显著 ($P <$

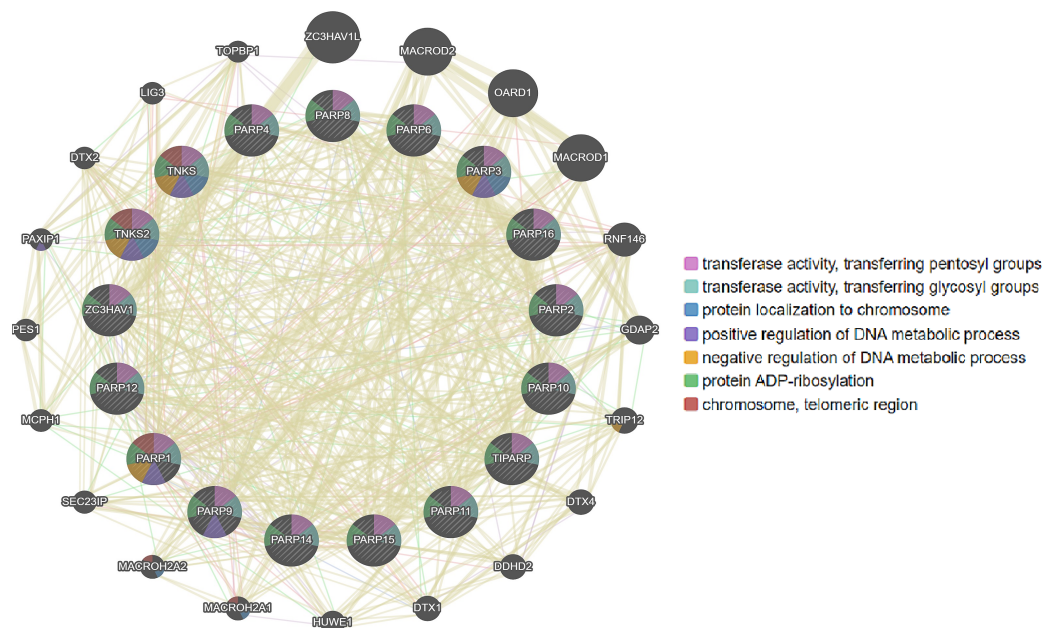


图5 PARP家族PPI网络图

Fig. 5 PARP family PPI network diagram

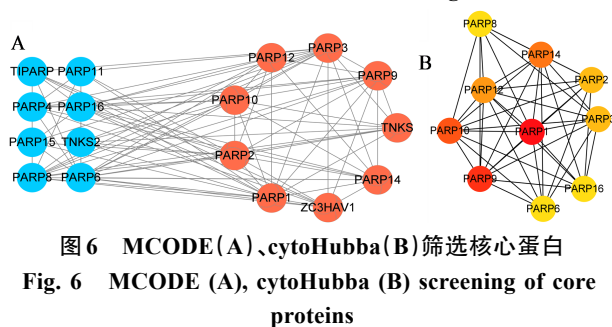


图6 MCODE(A)、cytoHubba(B)筛选核心蛋白

Fig. 6 MCODE (A), cytoHubba (B) screening of core proteins

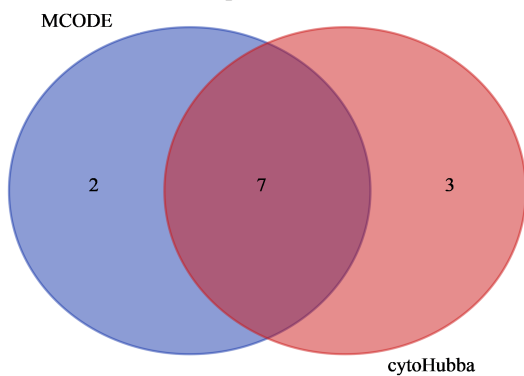


图7 MCODE、cytoHubba交集

Fig. 7 Intersection of MCODE and cytoHubba

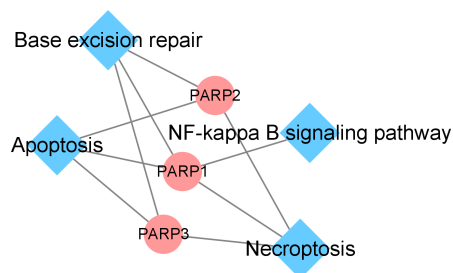


图8 核心基因通路富集

Fig. 8 Enrichment of core gene pathways

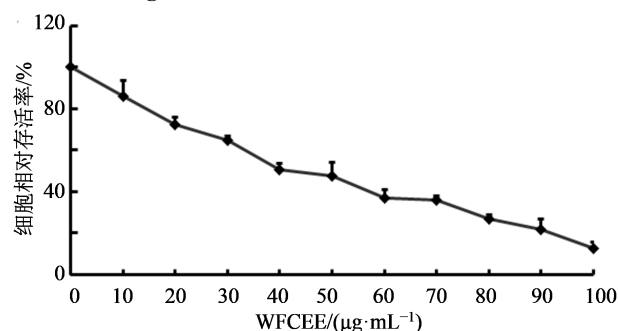


图9 不同浓度WFCEE对SGC-7901细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 9 Effect of WFCEE of different concentrations on viability of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

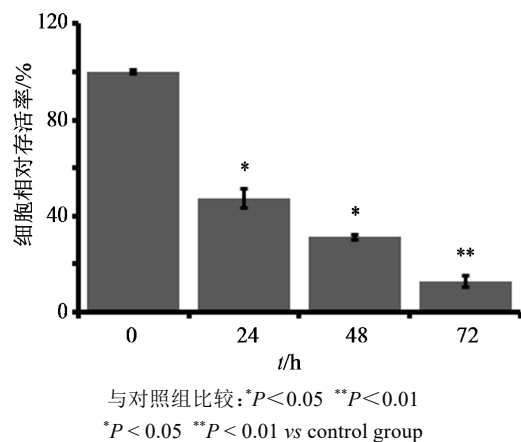


图10 不同处理时间的WFCEE对SGC-7901细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 10 Effect of WFCEE with different treatment times on viability of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

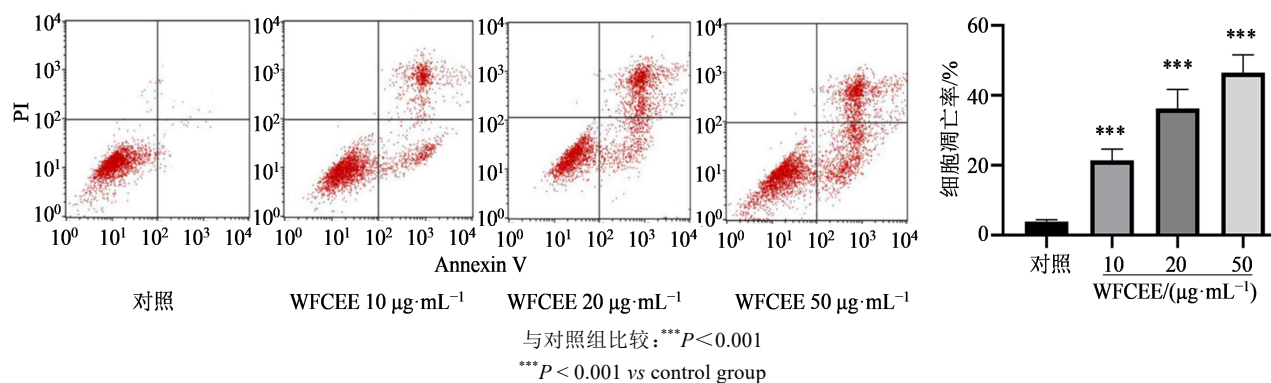


图 11 WFCEE 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 11 Effect of WFCEE on apoptosis of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

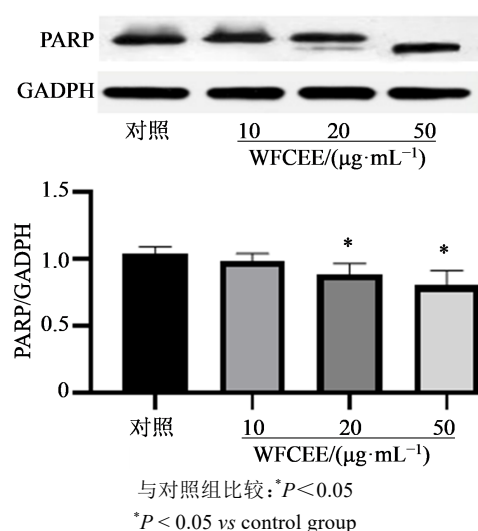


图 12 WFCEE 对 SGC-7901 细胞中 PARP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 12 Effect of WFCEE on expression of PARP protein in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

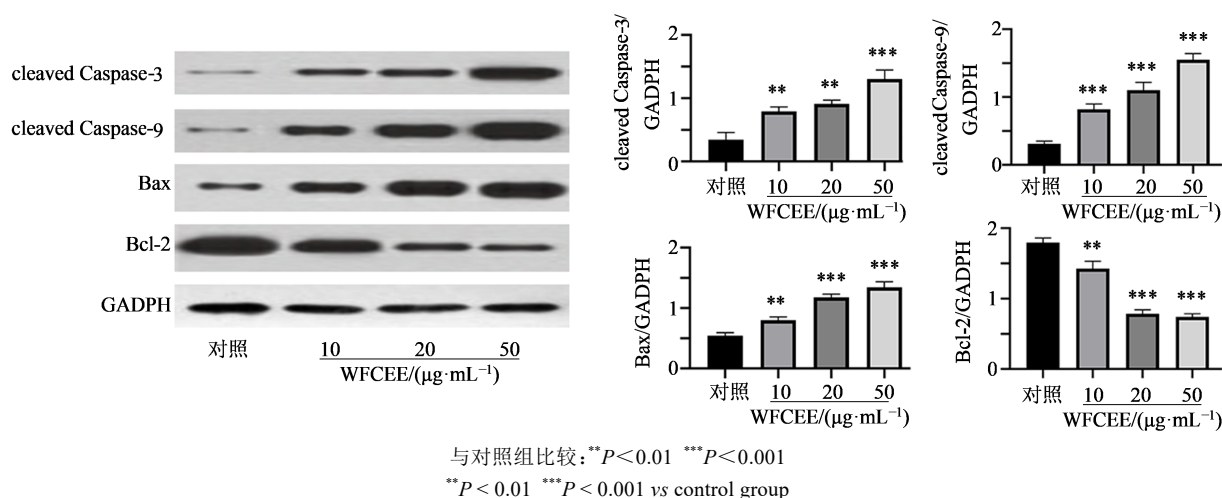


图 13 WFCEE 对 SGC-7901 细胞内 Caspase 和 Bcl-2 家族蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 13 Effect of WFCEE on expression of Caspase and Bcl-2 family proteins in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

0.05),抑制肿瘤细胞DNA损伤的修复,从而导致肿瘤细胞死亡。

3.4.4 SGC-7901 细胞凋亡相关蛋白表达 Western blotting 结果如图 13 所示,与对照组比较,经过 WFCEE 处理后,SGC-7901 细胞中 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001),促凋亡蛋白 Bax 表达量增加 ($P < 0.01$ 、 0.001),抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

近年来,合成致死已成为肿瘤治疗领域的研究热点之一,PARP 抑制剂是首个利用合成致死概念在临床上取得成功的药物,自问世以来在乳腺癌治疗已显示出积极的治疗效果,在胃癌方面研究报道却较少,因此本研究基于 GEO、TCGA、GTEx 数据库胃癌患者活检基因表达及临床信息分析 PARP 表达与胃癌患者总生存周期之间的关系,结果显示

PARP家族多个基因与胃癌患者生存显著相关,因此笔者认为PARP具有胃癌治疗药物开发的潜力,研究现有治疗药物对其干预作用有一定价值。

胃复春胶囊上市多年,有健脾益气、活血解毒的功效^[13],用于治疗胃癌癌前期病变、胃癌手术后辅助治疗、慢性浅表性胃炎属脾胃虚弱证者,已加入多个胃癌前病变应用指南。因此本研究选择WFCEE作为干预手段,探究其对PARP家族表达干预情况,及其胃癌辅助治疗的作用机制。CCK-8实验显示WFCEE可时间及剂量相关性地降低胃癌SGC-7901细胞活力,流式细胞术显示WFCEE可诱导SGC-7901细胞的凋亡,Western blotting显示胃复春可下调PARP蛋白表达,提示其通过下调PARP表达,抑制凋亡早期的DNA修复,从而导致肿瘤细胞死亡发挥治疗作用。

Bcl-2家族包含抑制(Bax)和促进细胞凋亡(Bcl-2)两类功能相反的蛋白质,Bax/Bcl-2的表达比值决定并调节细胞进入凋亡阶段的进程,比值增大可促进细胞色素C(Cyto C)从线粒体释放到细胞质中,细胞质中的Cyto C与Apaf-1结合,激活Caspase-3剪切PARP^[14-16]。Western blotting结果显示Bax的表达明显增加而Bcl-2的表达降低,Bax/Bcl-2比值明显增大,提取物可能通过增大Bax/Bcl-2比值,激活Caspase-3剪切PARP使其失活。Caspase-9以非活性的酶原形式存在,细胞受到凋亡信号刺激后,Apaf-1与Procaspase-9结合,使得Procaspase-9被剪切而发生活化,活化的Caspase-9使Caspase-3发生剪切,启动Caspase级联激活,而在凋亡早期,Caspase-3作用于PARP,使其裂解为 8.9×10^4 和 2.4×10^4 2个片段,丧失修复作用^[17-18],检测Caspase-9、Caspase-3表达,结果显示WFCEE可以浓度相关性地增加活性形式cleaved Caspase-9和cleaved caspase3的表达,表明WFCEE可能通过上调活性形式cleaved Caspase-9和cleaved Caspase-3表达剪切PARP使其失活。

PARP家族在胃癌靶向治疗及药物开发领域有一定临床价值,经实验证明WFCEE能调节PARP表达及其关联凋亡蛋白表达诱导肿瘤细胞凋亡。本研究为胃复春胶囊临床价值二次开发及作用机制研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang L, Ying X J, Liu S, et al. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies [J].

Chin J Cancer Res, 2020, 32(6): 695-704.

- [2] Stradella A, Johnson M L, Goel S, et al. Updated results of the PARP1/2 inhibitor pamiparib in combination with low-dose (1d) temozolomide (TMZ) in patients (pts) with locally advanced or metastatic solid tumours [J]. Ann Oncol, 2019, 30: v166-v167.
- [3] Koustas E, Karamouzis M V, Sarantis P, et al. Inhibition of c-MET increases the antitumour activity of PARP inhibitors in gastric cancer models [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10420-10431.
- [4] Wang H X, Ren B, Liu Y, et al. Discovery of pamiparib (BGB-290), a potent and selective poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in clinical development [J]. J Med Chem, 2020, 63(24): 15541-15563.
- [5] Zhou H X, Hu X G, Li N, et al. Loganetin and 5-fluorouracil synergistically inhibit the carcinogenesis of gastric cancer cells via down-regulation of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 13715-13726.
- [6] Xiaokaiti Y, Li X J. Natural product regulates autophagy in cancer [A]//Le W. *Autophagy: Biology and Diseases* [M]. Singapore: Springer, 2020.
- [7] Gu Z J, Ling J H, Cong J, et al. A review of therapeutic effects and the pharmacological molecular mechanisms of Chinese medicine Weifuchun in treating precancerous gastric conditions [J]. Integr Cancer Ther, 2020, 19: 153473542095321.
- [8] Bian Y Q, Chen X, Cao H Y, et al. A correlational study of Weifuchun and its clinical effect on intestinal flora in precancerous lesions of gastric cancer [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 120.
- [9] Tang Z F, Li C W, Kang B X, et al. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (W1): W98-W102.
- [10] Szász A M, Lánckzy A, Nagy Á, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1, 065 patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49322-49333.
- [11] Xu Z, Hejzlar P. MCODE, Version 2.2: An MCNP-ORIGEN depletion program [EB/OL]. (2008-12) [2022-11-23]. <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/75242>
- [12] Chin C H, Chen S H, Wu H H, et al. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. BMC Syst Biol, 2014, 8 (Suppl 4): S11.
- [13] 杨恒, 杨家越, 代耀, 等. 基于Meta分析桥接网络药理学的胃复春治疗消化性溃疡疗效评价及潜在作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6625-6636.

- Yang H, Yang J y, Dai Y, et al. Clinical efficacy evaluation and potential mechanism of Weifuchun in treatment of peptic ulcer based on Meta-analysis associated network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(21): 6625-6636.
- [14] 孙吉凤, 何海涛. 黄芩素通过线粒体凋亡途径诱导体外培养喉癌细胞凋亡的机制 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(8): 1947-1951.
- Sun J F, He H T. Mechanism of baicalein inducing apoptosis of laryngeal cancer cells *in vitro* through mitochondrial apoptosis pathway [J]. Chin J Gerontol, 2018, 38(8): 1947-1951.
- [15] Valentijn A, Upton J P, Gilmore A. Analysis of endogenous Bax complexes during apoptosis using blue native PAGE: Implications for Bax activation and oligomerization [J]. Biochem J, 2008, 412(2): 347-357.
- [16] Li K, Li Y C, Shelton J M, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis [J]. Cell, 2000, 101(4): 389-399.
- [17] Renatus M, Stennicke H R, Scott F L, et al. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14250-14255.
- [18] Boulares A H, Yakovlev A G, Ivanova V, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(33): 22932-22940.

【责任编辑 兰新新】