

左金丸醇提物抑制人胃癌 SGC-7901 细胞糖酵解的作用机制

吴秋雪¹, 孙梦瑶¹, 许博¹, 张辉^{2*}, 汤庆丰^{1*}

1. 上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062

2. 上海中医药大学, 上海 200135

摘要: 目的 研究左金丸醇提物对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖和糖酵解的作用及机制。方法 采用 CCK-8 法检测左金丸醇提物 (5、10、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 对 SGC-7901 细胞增殖的影响; 检测左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞葡萄糖摄取量、乳酸和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量的影响, 评价左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞糖酵解的作用; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 法检测左金丸醇提物对细胞糖酵解途径相关蛋白 Rhotekin (RTKN) 表达的影响; 采用 RTKN shRNA 干扰慢病毒感染 SGC-7901 细胞, 检测左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞葡萄糖摄取、乳酸和 ATP 含量的影响。结果 左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞增殖具有显著抑制作用 ($P < 0.001$), 呈剂量、时间相关性; 左金丸醇提物显著降低 SGC-7901 细胞葡萄糖摄取、乳酸和 ATP 含量 ($P < 0.01$ 、 0.001); 左金丸醇提物显著降低 SGC-7901 细胞中 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白表达 ($P < 0.001$); 干扰 RTKN 抵消了左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞葡萄糖摄取、乳酸和 ATP 含量的抑制作用 ($P < 0.001$)。结论 左金丸醇提物可显著抑制 SGC-7901 细胞增殖、降低细胞糖酵解水平, 其机制与下调 RTKN 表达相关。

关键词: 左金丸; 胃癌; 细胞增殖; 糖酵解; Rhotekin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0145-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.018

Mechanism of alcohol extract of Zuojin Pills on inhibiting glycolysis in SGC-7901 cells

WU Qiu-xue¹, SUN Meng-yao¹, XU Bo¹, ZHANG Hui², TANG Qing-feng¹

1. Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200135, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Zuojin Pills (左金丸) alcohol extract on proliferation and glycolysis of gastric cancer SGC-7901 cells by downregulating Rhotekin (RTKN). **Methods** CCK-8 was used to evaluate the effect of Zuojin Pills alcohol extract (10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) on cell viability of SGC-7901 cell. Glucose uptake, lactate and ATP content of SGC-7901 cells were detected to evaluate the effects of Zuojin Pills alcohol extract on glycolysis of SGC-7901 cells. qRT-PCR and Western blotting were used to detect glycolysis related protein RTKN expression. Moreover, RTKN shRNA were transfected into SGC-7901 cells to knockdown RTKN and the effects of Zuojin Pills alcohol extract on glucose uptake, lactate and ATP content were evaluated. **Results** Zuojin Pills alcohol extract exhibited a dose- and time-dependent anti-proliferative effect on SGC-7901 cells ($P < 0.001$). In addition, glucose uptake, lactate and ATP content of SGC-7901 cells were significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001) with Zuojin Pills alcohol extract treatment. Zuojin Pills alcohol extract significantly reduced RTKN mRNA and RTKN protein expression in SGC-7901 cells ($P < 0.001$). However, RTKN knockdown significantly attenuated the inhibitory effect of Zuojin Pills alcohol extract on glycolysis of SGC-7901 cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Zuojin Pills alcohol extract significantly inhibited the proliferation and glycolysis of SGC-7901 cells, which was related to the downregulation of RTKN.

Key words: Zuojin Pills; gastric cancer; cell proliferation; glycolysis; Rhotekin

胃癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一。我国胃癌发病率在我国恶性肿瘤中居第 2 位, 死亡率居第 3 位^[2]。糖代谢是细胞获取能量的主要方式, 葡萄

收稿日期: 2020-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973808); 上海市自然科学基金资助项目 (19ZR1447800); 上海中医药大学预算内项目 (2019LK038)

作者简介: 吴秋雪, 女, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治肿瘤研究。E-mail: 13376221807@163.com

*通信作者: 汤庆丰, 男, 硕士生导师, 副主任技师。E-mail: tangqingfeng126@126.com

张辉, 男, 硕士生导师, 研究员。E-mail: zhanghuiman@126.com

糖是细胞糖代谢的主要能量来源。近年来研究发现,肿瘤细胞中广泛存在以有氧糖酵解为主的代谢重编程现象,以满足肿瘤细胞增殖与能量供给的需求,从而促进恶性肿瘤的增殖、转移等^[3]。左金丸是中药经典方剂,出自元代医家朱丹溪的《丹溪心法》,由黄连6两、吴茱萸1两组成,常用于治疗胃部疾病^[4-5]。现代药理学研究表明左金丸对胃癌有较好的防治作用^[6],但左金丸治疗胃癌的作用机制尚不明确。Rhotekin (RTKN) 是一种 Rho 效应蛋白,在细胞骨架重组、细胞分化、细胞周期进展和细胞迁移等多种生物学过程中起着关键作用^[7]。研究表明,与正常组织相比,RTKN 在肝癌^[8]、胃癌^[9]、结肠癌^[10-11]、乳腺癌^[12]等多种癌组织中呈高表达状态^[13],且敲除 RTKN 后可抑制人胃癌细胞 SGC-7901 和 MKN-45 中的乳酸、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平^[10]。本研究以 SGC-7901 细胞为研究对象,探究左金丸醇提物对 SGC-7901 细胞增殖和糖酵解水平的影响及其潜在的分子机制,为左金丸应用于临床胃癌的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人胃癌细胞株 SGC-7901,购自上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药物

黄连 (批号 HY2014050601)、吴茱萸 (批号 LY1408074) 购自上海华宇药业有限公司,经上海中医药大学中药研究所吴大正教授鉴定分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基 (批号 01-100-1ACS),购自以色列 BI 公司;胎牛血清 (FBS,批号 10099-141)、双抗 (批号 15240-062)、0.25% EDTA-胰蛋白酶 (批号 25200-072),购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒 (批号 CK04),购自日本同仁化学研究所;葡萄糖检测试剂盒 (批号 K682-50),购自美国 Biovision 公司;乳酸检测试剂盒 (批号 A019-2-1),购自南京建成生物工程研究所;蛋白酶抑制剂混合物 (批号 P1045-1)、磷酸酶抑制剂混合物 (批号 P1045-2)、ATP 检测试剂盒 (批号 S0026)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0011)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体 (批号 A0208),购

自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜 (批号 ISEQ00010),购自美国 Millipore 公司;蛋白预染 Marker (批号 26619),购自加拿大 Fermentas 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔单克隆抗体 (批号 D16H11),购自美国 CST 公司;RTKN 抗体 (批号 ab154954),购自英国 Abcam 公司;RTKN 干扰慢病毒 (批号 PIEL248033167)、嘌呤霉素 (批号 REVG1001)、HiTrans G 病毒感染液 (批号 REVG005),购自上海吉凯基因公司;RIPA 组织细胞快速裂解液 (批号 89900)、Trizol 裂解液 (批号 15596018),购自美国 Ambion 公司;逆转录试剂盒 (批号 K1622)、qRT-PCR 试剂盒 (批号 K0222),购自 Thermo Fisher Scientific 公司;GAPDH、RTKN 基因引物,购自生工生物工程股份有限公司。

1.4 仪器

Heraceii 2401 CO₂ 恒温培养箱、Presco 21 Multifuge XIR 离心机、Varioskan LUX Flash 酶标仪,购自美国 Thermo 公司;DMi1 倒置相差显微镜、DFC450 C 荧光显微镜,购自德国 Leica 公司;PowerPac Basic 电泳仪、Mlini Protean® Tetra Cell 垂直板电泳槽、Mlini Trans-Blot® Cell 转膜仪、CDT94547 ChemiDoc™ Touch Imaging Western blotting 成像系统,购自美国 Bio Rad 公司。

2 方法

2.1 左金丸醇提物的制备

取吴茱萸 300 g 和黄连 1800 g,加 8 倍量 75% 乙醇,回流提取 2 次,每次 1 h。合并提取液,减压干燥,得干粉 565 g,提取率为 26.9%。左金丸醇提物中活性成分黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量分数分别为 7.120%、4.150%、31.400%、8.400%、0.053%、0.051%^[14],符合《中国药典》2015 年版的质量控制标准。左金丸醇提物以培养基配制成相应质量浓度的溶液用于后续实验。

2.2 细胞培养

SGC-7901 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基,于 5% CO₂、37 °C 的恒温培养箱培养。

2.3 左金丸醇提物对细胞活性的影响

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板中。培养 12 h 后,加入左金丸醇提物 (5、10、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),对照组加入不含药物的培养基,

培养 24、48、72 h 后,每孔加入 110 μL 含 10% CCK-8 的无血清培养基,孵育 1 h。采用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度 (A) 值,并计算细胞存活率。

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

2.4 左金丸醇提物对细胞糖酵解的影响

2.4.1 左金丸醇提物对葡萄糖摄取的影响 取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 24 孔板,培养 24 h。将培养液更换为含 0.5% FBS 的 RPMI 1640 培养基,加入左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入不含药物的培养基,于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱培养 1 h。400 $\times g$ 离心 5 min,弃上清,加入葡萄糖混合物和左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次,采用荧光显微镜拍照,结果采用 Image J 软件分析。

2.4.2 左金丸醇提物对乳酸含量的影响 取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,培养 12 h。将培养液更换为含 0.5% FBS 的 RPMI 1640 培养基,加入左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h 后,收集细胞上清液,采用乳酸检测试剂盒检测细胞上清液中的乳酸含量。以蒸馏水作空白,于 530 nm 处测定 A 值,并计算乳酸含量。

2.4.3 左金丸醇提物对 ATP 含量的影响 取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,培养 12 h。将培养液更换为含 0.5% FBS 的 RPMI 1640 培养基,加入左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h 后,加入 200 μL ATP 裂解液,于冰上裂解 10 min,11 269 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量,采用酶标仪于 562 nm 处检测 A 值,根据标准曲线计算每孔蛋白质量浓度,采用 ATP 检测试剂盒检测每单位细胞所产生的 ATP,并计算 ATP 含量。

2.5 左金丸醇提物对细胞 RTKN mRNA 水平的影响

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,培养 12 h。将培养液更换为含 0.5% FBS 的 RPMI 1640

培养基,加入左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。加入 1 mL Trizol 裂解液裂解细胞,收集细胞,加入 200 μL 氯仿剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min 后 11 269 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min;取 400 μL 上层水样层,加入等量异丙醇,室温静置 10 min,11 269 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,4402 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心 5 min;室温晾干沉淀,采用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参基因,qRT-PCR 反应体系:SYBR Green 12.5 μL 、水 10 μL 、cDNA 产物 1 μL 、上下游引物各 0.75 μL 、总体积为 25 μL 。反应条件:95 $^\circ\text{C}$,10 min,循环 1 次;95 $^\circ\text{C}$,15 s,60 $^\circ\text{C}$,1 min,循环 40 次。GAPDH 上游引物序列:5'-AATCCCATCACCATCTTC-3',GAPDH 下游引物序列:5'-AGGCTGTTGTCACTTTC-3';RTKN 上游引物序列:5'-GCCGCTGCTTACTATTGC-3',RTKN 下游引物序列:5'-GTGCTTCCCGACTTTCTG-3'。

2.6 左金丸醇提物对细胞 RTKN 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,培养 12 h。将培养液更换为含 0.5% FBS 的 RPMI 1640 培养基,加入左金丸醇提物 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。以 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 200 μL 含 2% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 10 min;收集细胞,11 269 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min,收集上清液;采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,于 95 $^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min 进行蛋白变性。蛋白样品经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜。加入 5% BSA 于 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1~2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;分别加入 GAPDH (1:1000)、RTKN (1:8000) 抗体于 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体 (1:1000),于室温孵育 1 h;TBST 洗涤 3 次,按 ECL 试剂盒说明书进行显影曝光。采用 Image J 软件对蛋白灰度值进行分析。

2.7 干扰 RTKN 后左金丸醇提物对细胞糖酵解的影响

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液,以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,培养 24 h。分别加入 10 μL shNC (对照短发夹 RNA) 或 shRTKN (RTKN 短发夹 RNA) 慢病毒 (sh 10-1、sh 11-1、sh 12-1 序列分别为 GCTGCTTACTATTGCTGTCAA、TGCC-

AGCAGTGCAAGATGGAT、GAGCAATGTGCTCTT-CGCTGA), 12 h后换成正常培养基, 感染 72 h后每孔加入嘌呤霉素 (2 μg/mL) 筛选细胞, 3 d后再次加入嘌呤霉素, 共重复3次, 构建 *RTKN* 稳定干扰的胃癌细胞株。取处于对数生长期的SGC-7901细胞、shNC细胞和3组 sh*RTKN* 细胞, 胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液, 以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL, 接种于6孔板, 24 h后收样, 分别用qRT-PCR和Western blotting法检测细胞中*RTKN* mRNA和*RTKN* 蛋白表达, 筛选出*RTKN* 干扰效率最高的sh11-1组细胞进行后续实验。

设置对照组、左金丸醇提取物 (50 μg/mL) 组、sh*RTKN* (sh11-1) 组、sh*RTKN*+左金丸醇提取物组。对照组、左金丸醇提取物组取处于对数生长期的SGC-7901细胞, sh*RTKN* 组、sh*RTKN*+左金丸醇提取物组取sh*RTKN* 细胞, 胰蛋白酶消化后吹打均匀制成单细胞悬液, 以培养基将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL,

分别接种于6孔板, 培养12 h。将培养液更换为含0.5% FBS的RPMI 1640培养基, 除对照组和sh*RTKN* 组加入不含药物的培养基, 其余组加入50 μg/mL左金丸醇提取物, 检测葡萄糖摄取量、乳酸和ATP含量。

2.8 统计学分析

所有实验均重复3次。采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析: 各组与对照组比较采用Dunnett法; 组内两两比较采用Tukey法。

3 结果

3.1 左金丸醇提取物对SGC-7901细胞活性的影响

如表1所示, 与对照组比较, 左金丸醇提取物作用24、48、72 h后, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$), 呈时间、剂量相关性。提示左金丸醇提取物对SGC-7901细胞增殖有显著的抑制作用。

3.2 左金丸醇提取物对SGC-7901细胞糖酵解的影响

如图1所示, 与对照组比较, 不同质量浓度(25、

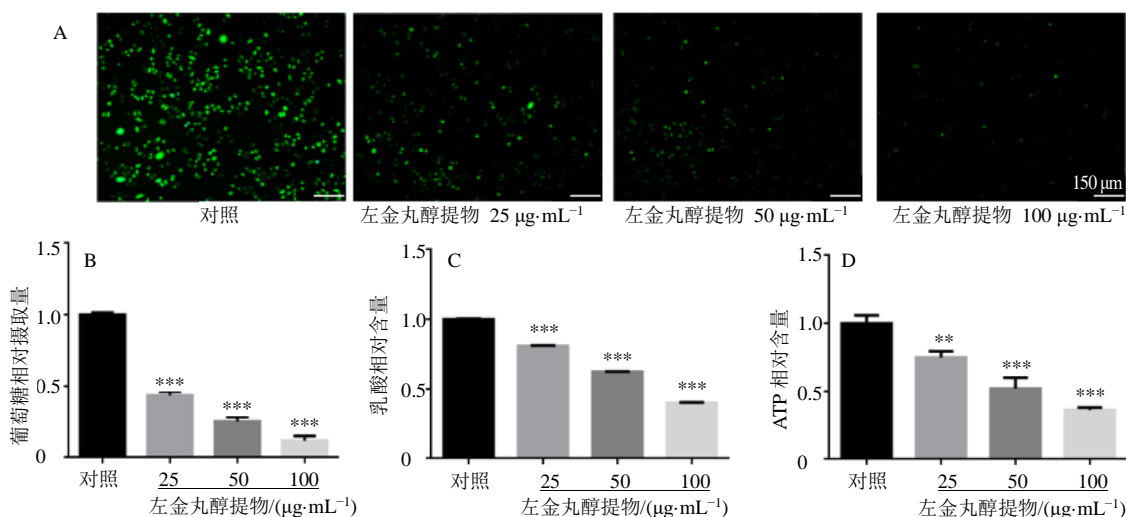
表1 左金丸醇提取物对SGC-7901细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Zuojin Pills alcohol extract on cell viability of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.00 ± 4.07	100.00 ± 2.30	100.00 ± 1.46
左金丸醇提取物	5	100.35 ± 1.91	97.20 ± 4.31	98.07 ± 2.56
	10	95.71 ± 1.65	96.12 ± 3.54	89.31 ± 2.82***
	25	90.43 ± 2.55***	85.28 ± 0.85***	79.34 ± 2.77***
	50	80.20 ± 5.92***	74.10 ± 2.91***	60.61 ± 1.90***
	100	71.03 ± 0.59***	59.72 ± 2.08***	48.46 ± 0.68***
	200	43.95 ± 4.92***	34.51 ± 2.30***	25.20 ± 0.30***

与同时时间对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group at same time



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图1 左金丸醇提取物对SGC-7901细胞葡萄糖相对摄取量(A、B), 乳酸(C)和ATP相对含量(D)的影响

Fig. 1 Effect of Zuojin Pills alcohol extract on glucose intake (A and B), lactic acid (C) and ATP content (D) of SGC-7901 cells

50、100 $\mu\text{g/mL}$)左金丸醇提取物组细胞的葡萄糖摄取、乳酸和 ATP 含量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001),呈剂量相关性。提示左金丸醇提取物可显著抑制 SGC-7901 细胞的糖酵解水平。

3.3 左金丸醇提取物对 SGC-7901 细胞 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,不同质量浓度(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)左金丸醇提取物组 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$),呈剂量相关

性。提示左金丸醇提取物可显著下调 SGC-7901 细胞 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白表达。

3.4 干扰 RTKN 后左金丸醇提取物对 SGC-7901 细胞糖酵解的影响

为了进一步探讨左金丸醇提取物对胃癌细胞 SGC-7901 糖酵解水平的影响,采用 shRTKN 慢病毒感染 SGC-7901 细胞,并采用 qRT-PCR 和 Western blotting 验证干扰效率,如图 3-A、B 所示。选取干扰效率最强的一个位点 (sh 11-1) 进行后续实验。

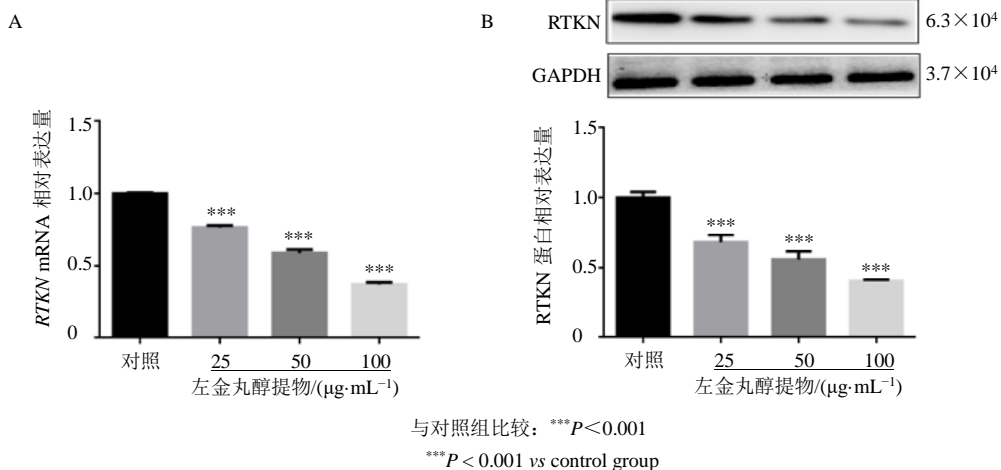


图 2 左金丸醇提取物对 SGC-7901 细胞 RTKN mRNA (A) 和 RTKN 蛋白表达 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of Zuojin Pills alcohol extract on RTKN mRNA (A) and RTKN protein expression (B) in SGC-7901 cells

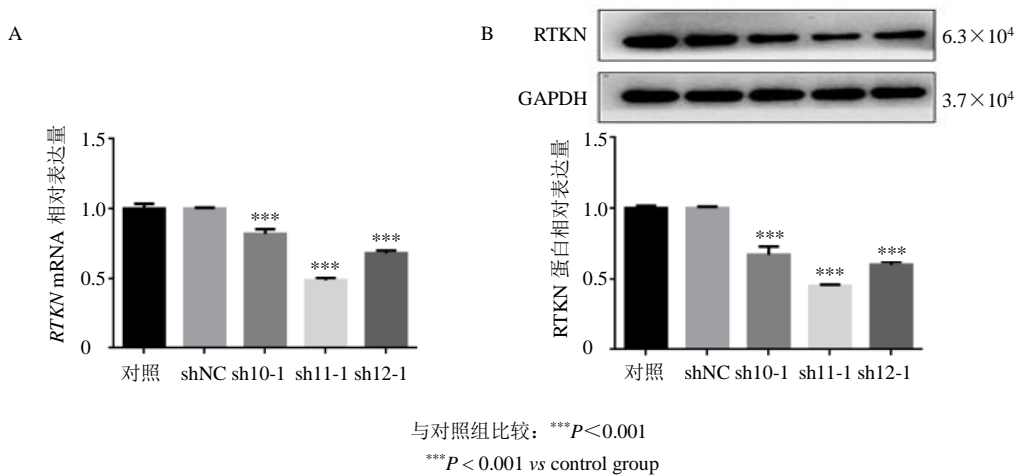


图 3 shRTKN 慢病毒对 SGC-7901 细胞 RTKN mRNA (A) 和 RTKN 蛋白表达 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of RTKN interference on RTKN mRNA (A) and RTKN protein expression (B) in SGC-7901 cells

如图 4 所示,与对照组比较,shRTKN 组细胞葡萄糖摄取、乳酸和 ATP 含量均明显降低 ($P < 0.001$);与 shRTKN 组相比,左金丸醇提取物+shRTKN 组葡萄糖摄取量、乳酸和 ATP 含量无明显差异,表明干扰 RTKN 抵消了左金丸醇提取物对 SGC-7901 细胞糖酵解的抑制作用,提示左金丸醇提取物通过下调 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白表达抑制 SGC-7901 细胞糖酵解。

4 讨论

目前,胃癌的治疗主要以外科手术为主,辅以化疗、靶向治疗、支持治疗,部分早期胃癌可内镜下切除。胃癌起病隐匿,多数患者确诊时已处于晚期,无法进行早期手术根治,且化疗药物不良反应严重^[15-16]。中药复方具有多成分、多靶点的优势,临床上对肿瘤的疗效突出^[17]。左金丸具有泻火、疏

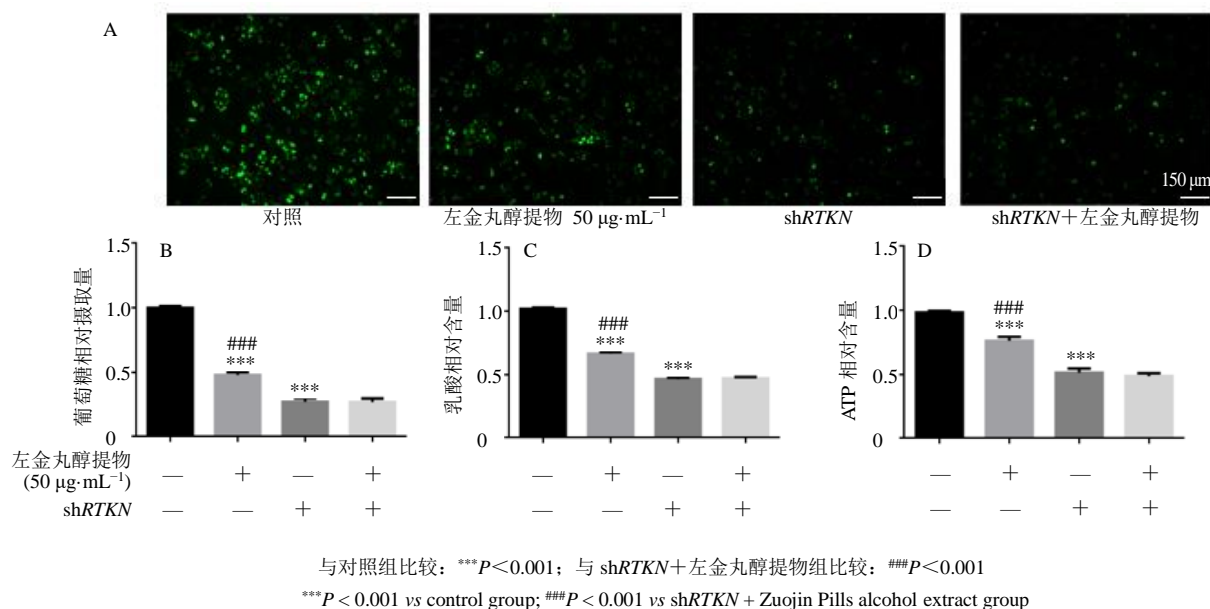


图4 干扰 *RTKN* 后左金丸醇提取物对 SGC-7901 细胞葡萄糖相对摄取量 (A、B)、乳酸 (C) 和 ATP 相对含量 (D) 的影响
 Fig. 4 Effect of Zuojin Pills alcohol extract on glucose intake (A and B), lactic acid (C) and ATP content (D) of SGC-7901 cells after interfering *RTKN*

肝、和胃、止痛的功效，常用于治疗肝火犯胃、脘胁疼痛、口苦嘈杂、呕吐酸水、不喜热饮等症^[18-20]。研究表明，左金丸有显著的抗肿瘤作用，可通过上调 B 淋巴瘤-2 基因相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、B 淋巴瘤相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated protein X, Bak) 表达，同时下调 B 淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴瘤-x1 (B-cell lymphoma-x1, Bcl-x1) 蛋白表达，增加半胱氨酸蛋白酶-3 (cystein-dependent aspartate-specific programmed 3, Caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-9 (cystein-dependent aspartate-specific programmed 9, Caspase-9) 的活性，诱导人肝癌细胞 SMMC-7721、人肺癌细胞 A549 和人结肠癌细胞 HCT-116 线粒体凋亡^[21]；左金丸可抑制 SGC-7901 细胞增殖^[22]。本研究发现，左金丸醇提取物可显著抑制 SGC-7901 细胞的增殖，且呈时间和剂量相关性，与文献报道一致。

Warburg 等^[23]提出肿瘤细胞即使在氧气充足的情况下，依旧以糖酵解方式提供能量，这是肿瘤细胞维持生物学功能的重要机制。在无氧或缺氧条件下，细胞内葡萄糖部分降解为丙酮酸后，不再进行三羧酸循环，而在细胞质基质中合成乳酸，为细胞提供能量^[24]。虽然此过程中产生的 ATP 含量低于有氧磷酸化反应，但肿瘤细胞中的糖酵解水平远高于正常细胞，且与正常细胞相比，肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下，也优先通过糖酵解途径产生能量^[25]。

有氧糖酵解增强已成为肿瘤细胞重要的生物学标志^[26]。研究表明，大多数恶性肿瘤表现为糖酵解活跃，抑制糖酵解可有效抑制肿瘤细胞的增殖^[27-29]。本研究结果显示，左金丸醇提取物显著抑制 SGC-7901 细胞的糖酵解，表现为降低葡萄糖摄取量、减少乳酸和 ATP 产量，呈剂量相关性。

RTKN 在多种肿瘤如肝癌^[9]、胃癌^[10]、结直肠癌^[11-12]中呈高表达状态。研究发现，干扰 *RTKN* 表达可降低细胞周期蛋白如细胞周期调节蛋白 D1 和人类细胞增生原癌基因的表达，显著抑制肿瘤细胞增殖和细胞周期进程^[30]。*RTKN* 表达与肿瘤细胞的能量代谢有关。干扰 *RTKN* 后，SGC-7901 细胞、MKN-45 细胞乳酸和 ATP 含量显著降低^[10]。本研究发现，左金丸醇提取物显著降低 SGC-7901 细胞中 *RTKN* mRNA 和 *RTKN* 蛋白表达水平，呈剂量相关性。干扰 *RTKN* 后，SGC-7901 细胞的葡萄糖摄取量、乳酸和 ATP 含量均显著降低，且抵消了左金丸醇提取物对细胞糖酵解的抑制作用，表明左金丸醇提取物通过下调 *RTKN* mRNA 和 *RTKN* 蛋白表达抑制 SGC-7901 细胞糖酵解。

综上所述，本研究发现左金丸醇提取物能够通过下调 *RTKN* mRNA 和 *RTKN* 蛋白表达，从而发挥对 SGC-7901 细胞增殖和糖酵解的抑制作用。课题组后续将对左金丸醇提取物抑制 SGC-7901 细胞糖酵解的具体机制进行深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, *et al.* Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. *Cancer Commun*, 2019, 39(1): 22-33.
- [3] Mok T S, Wu Y L, Ahn M J, *et al.* Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. *New Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640.
- [4] 周祥羽, 邹忠杰. 左金丸化学成分及现代药理研究进展 [J]. *广东化工*, 2017, 44(10): 89-90.
- [5] 华晓东, 芮菁, 任变文. 左金丸对胃肠道的调节作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(2): 190-195.
- [6] 戚笑笑. 反左金丸抗肿瘤和抗转移的机制研究 [D]. 开封: 河南大学, 2015.
- [7] Heasman S J, Ridley A J. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from *in vivo* studies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9): 690-701.
- [8] Zhou J J, Zhang Y J, Qi Y H, *et al.* MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1227-1234.
- [9] Sun M Y, Zhang H, Tao J, *et al.* Expression and biological function of rhotekin in gastric cancer through regulating p53 pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1069-1080.
- [10] Li B, Chen P, Chang Y X, *et al.* Let-7a inhibits tumor cell growth and metastasis by directly targeting RTKN in human colon cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 739-745.
- [11] Dong Y, Wei M H, Lu J G, *et al.* Long non-coding RNA HULC interacts with miR-613 to regulate colon cancer growth and metastasis through targeting RTKN [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2035-2042.
- [12] Chen M, Bresnick A R, O'Connor K L. Coupling S100A4 to Rhotekin alters Rho signaling output in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(32): 3754-3764.
- [13] Ito H, Morishita R, Nagata K. Functions of Rhotekin, an effector of Rho GTPase, and its binding partners in mammals [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2121-2130.
- [14] Sun M Y, Wang D D, Sun J, *et al.* The Zuo Jin Wan Formula increases chemosensitivity of human primary gastric cancer cells by AKT mediated mitochondrial translocation of cofilin-1 [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(3): 198-208.
- [15] 李加桩, 王凯冰, 郑红艳, 等. 胃癌分子靶向药物治疗的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(4): 279-285.
- [16] 黄海涛. 肿瘤诊断与化疗的纳米材料的研究及应用评价 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [17] 朱元章, 张贵彪, 朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(16): 227-234.
- [18] 王向娟, 干红女. HPLC法测定左金丸中四种活性成分的含量研究 [J]. *浙江中医杂志*, 2016, 51(7): 539-540.
- [19] 许锋. 左金胃漂浮一生物黏附小丸制备关键技术与评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [20] 张颖, 张兆旺. 均匀设计法优选左金丸方药的半仿生提取工艺 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4): 466-469.
- [21] 张金华, 李琦. 左金丸抗肿瘤机制的研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2018, 34(3): 609-612.
- [22] Peng Q X, Cai H B, Peng L J, *et al.* Extract of Zuojin Pill induces apoptosis of SGC-7901 cells via mitochondria-dependent pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(11): 837-845.
- [23] Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body [J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8(6): 519-530.
- [24] Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment [J]. *Genes Dis*, 2017, 4(1): 25-27.
- [25] Pavlova N N, Thompson C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47.
- [26] 艾子莺. K562/ADM细胞耐药性与有氧糖酵解的关系及双氢青蒿素诱导其铁死亡的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [27] 石文静, 谭佳妮, 沈卫星, 等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20): 120-125.
- [28] 周永, 郑金英, 徐小华, 等. 抑制 PKM2 介导的糖酵解在蛇葡萄素抗乳腺癌增殖中的作用 [J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2019, 6(2): 236-241.
- [29] 孙梦瑶, 王丹丹, 吴秋雪, 等. 左金丸对胃癌耐药细胞 SGC-7901/DDP 增殖和糖酵解的抑制作用 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(1): 71-75.
- [30] Pang X, Li R, Shi D, *et al.* Knockdown of Rhotekin 2 expression suppresses proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 8028-8034.

[责任编辑 李亚楠]