

密点麻蜥不同部位调控 NF- κ B/SNAIL 通路干预胃癌顺铂耐药研究

程翻娥¹, 白 星¹, 李 铮¹, 师小茜¹, 李卫强^{1,2*}

1. 宁夏医科大学中医学学院, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

摘要: 目的 基于核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /SNAIL 通路探讨密点麻蜥 *Eremias multiocellata* 不同部位联合顺铂 (cisplatin, DDP) 对胃癌裸鼠顺铂耐药模型的干预机制。方法 将 36 只 BALB/c 裸鼠于右侧腋窝 sc MKN45/DDP 细胞悬液制备胃癌裸鼠耐药模型, 造模成功后随机分为模型组、DDP 组、密点麻蜥头部+DDP 组、四肢+DDP 组、躯干+DDP 组和尾部+DDP 组, 每组 6 只。除模型组外, 其余各组给予相应药物治疗 4 周。MTT 法检测 MKN45/DDP 细胞的耐药性; 检测各组肿瘤体积及抑瘤率; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组肿瘤组织病理变化; 免疫组化法检测各组肿瘤组织黏蛋白 1 (Mucin 1, MUC1) 表达; Western blotting 检测各组肿瘤组织中 NF- κ B/SNAIL 通路相关蛋白、E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) 及 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、肺耐药蛋白 (lung resistant protein, LRP) 表达; TUNEL 检测各组肿瘤组织细胞凋亡情况。结果 与 MKN45 细胞相比, MKN45/DDP 细胞对顺铂的耐药性相对较强, 其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 和耐药指数分别为 0.671 μ g/mL、1.973。与模型组比较, 各给药组肿瘤体积均显著缩小 ($P < 0.05$), 以尾部+DDP 组抑瘤率最高; 肿瘤细胞排列稀疏, 细胞核呈不同程度缩小或破裂; 肿瘤组织 p-p65、SNAIL、P-gp、MRP1、LRP 和 MUC1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), E-cadherin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 以尾部+DDP 组最为明显。结论 密点麻蜥不同部位联合 DDP 可调控 NF- κ B/SNAIL 通路, 逆转荷瘤裸鼠胃癌顺铂耐药, 以尾部+DDP 组增效作用最佳。

关键词: 密点麻蜥; 顺铂; 胃癌; 耐药性; NF- κ B/SNAIL 通路; 尾部

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-4920-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.017

Different parts of *Eremias multiocellata* on intervention of cisplatin resistance in gastric cancer by regulating NF- κ B/SNAIL pathway

CHENG Fan-e¹, BAI Xing¹, LI Zheng¹, SHI Xiao-qian¹, LI Wei-qiang^{1,2}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. Key Laboratory of Modernization of Hui Nationality Medicine, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To explore the intervention mechanism of different parts of *Eremias multiocellata* combined cisplatin (DDP) on cisplatin-resistant model of gastric cancer in nude mice based on nuclear factor- κ B (NF- κ B)/SNAIL pathway. **Methods** Thirty-six BALB/c nude mice were subcutaneously injected with MKN45/DDP cells suspension in the right armpit to establish a drug-resistant model of gastric cancer. After successful modeling, mice were randomly divided into model group, DDP group, head + DDP group, limbs + DDP group, trunk + DDP group and tail + DDP group, with six mice in each group. Except the model group, the other groups were given corresponding drugs for four weeks. Drug resistance of MKN45/DDP cells were detected by MTT assay. The tumor volume and tumor inhibition rate of each group were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of tumor tissues in each group. Immunohistochemical method was used to detect Mucin 1 (MUC1) expression in tumor tissues of each group. Western blotting was used to detect expressions of NF- κ B/SNAIL pathway related proteins, E-cadherin, P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and lung resistance protein (LRP) in tumor tissues of each group. TUNEL was used to detect

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 宁夏自然科学基金重点项目 (2021AAC02014); 国家自然科学基金资助项目 (82260916)

作者简介: 程翻娥 (1994—), 女, 硕士研究生, 从事肝病和脾胃病的基础与临床研究。Tel: (0951)6880501 E-mail: 642630031@qq.com

*通信作者: 李卫强 (1974—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗脾胃病研究, 国家中医药管理局第六批名老中医师承项目继承人。

Tel: (0951)6880501 E-mail: lwq200309@163.com

the apoptosis of tumor tissue in each group. **Results** Compared with MKN45 cells, MKN45/DDP cells were relatively resistant to cisplatin, its half inhibitory concentration (IC_{50}) and drug resistance index were 0.671 $\mu\text{g/mL}$ and 1.973, respectively. Compared with model group, tumor volume in each group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the tumor inhibition rate in tail + DDP group was the highest. The tumor cells were sparsely arranged, and the nuclei were reduced or ruptured to varying degrees. The expressions of p-p65, SNAIL, P-gp, MRP1, LRP and MUC1 protein in tumor tissues were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), while E-cadherin protein expression was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), and apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), tail + DDP group was the most obvious. **Conclusion** The combination of different parts of *E. multiocellata* with DDP can regulate NF- κB /SNAIL pathway and reverse cisplatin resistance of gastric cancer in nude mice bearing tumor, and tail + DDP group has the best sensitization effect.

Key words: *Eremias multiocellata* Günther; cisplatin; gastric cancer; drug resistance; NF- κB /SNAIL pathway; tail

胃癌是全球发病率位居第 5 位、死亡率位居第 4 位的消化道恶性肿瘤, 其 5 年存活率仅为 25%~30%^[1]。化疗是目前治疗胃癌的主要方法, 尤其对于中晚期患者而言, 化疗几乎是延长生命的唯一方式, 但化疗耐药是治疗的主要障碍^[2]。因此, 探索逆转胃癌耐药的药物已成为当前临床研究的热点问题, 中药在改善化疗药物耐药方面有明显优势、疗效确切, 尤其是增敏提效更为明显^[3]。密点麻蜥 *Eremias multiocellata* Günther 以沙地生存为主, 有活血化瘀、消癥散结、利尿通淋、镇静之功^[4]。课题组前期结合潍坊医学院应用密点麻蜥同类无蹼壁虎身体不同部位抗癌研究的启示下, 对沙地密点麻蜥 (人工养殖) 进行了全体及身体分部位抗癌研究, 发现密点麻蜥不同部位可通过抑制沉默调节蛋白 1 (Sirtuin 1, SIRT1), 诱导细胞凋亡, 从而发挥抗癌作用, 其中以密点麻蜥尾部作用最明显^[5]; 密点麻蜥可能通过降低 SNAIL 蛋白表达, 增加 E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) 蛋白表达, 降低 N-cadherin 蛋白表达, 来抑制上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 发展进程, 发挥对胃癌肝转移的抑制作用^[6]。基于此, 本研究进一步探究宁夏密点麻蜥不同部位通过调控核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)/SNAIL 通路对荷瘤裸鼠胃癌顺铂化疗耐药的干预作用。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠 36 只, 4~6 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2021-0006。裸鼠饲养于宁夏医科大学动物中心, 自由进食饮水, 温度 (22 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (50 $\pm$ 10) %, 适应性喂养 3 d 后进行实验。动物实验经宁夏医科大学伦理审查委员会批准 (批准号 IACUC-NYLAC-2022-

109)。人胃癌 MKN45 细胞、人胃癌顺铂耐药株 (MKN45/DDP) 购自浙江美森细胞科技有限公司。

1.2 药材

密点麻蜥 (批号 2208036) 购自宁夏医科大学附属中医医院门诊, 经宁夏医科大学药学院刘艳华教授鉴定为密点麻蜥 *E. multiocellata* Günther。

1.3 药品与试剂

顺铂 (质量分数 $\geq$ 99.9%, 批号 124L021)、中性树胶 (批号 622G021)、胎牛血清 (批号 2222092) 购自北京索莱宝科技有限公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (批号 KGA311-KGA312) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色液 (批号 CR2107043)、P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 单克隆抗体 (批号 GB113291)、肺耐药蛋白 (lung resistant protein, LRP) 单克隆抗体 (批号 GB112334)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 GB23303)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 GB25301)、黏蛋白 1 (Mucin 1, MUC1) 多克隆抗体 (批号 GB114938) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 全蛋白提取试剂盒 (批号 20220823) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; RPMI 1640 培养液 (批号 2230182)、青链霉素混合液 (批号 20220705) 购自上海达特希尔生物科技有限公司; NF- κB p65 单克隆抗体、磷酸化 NF- κB p65 (phosphorylated NF- κB p65, p-NF- κB p65) 多克隆抗体、E-cadherin 多克隆抗体、SNAIL 多克隆抗体、兔抗鼠 β -actin 多克隆抗体 (批号分别为 AF5006、AF2006、AF0131、AF6032、AF7018) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 多药耐药蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) 多克隆抗体 (批号 GTX116046) 购自深圳欣博盛生物科技有限公司; 无蛋白快速封闭液 (批号 03661200) 购自上海雅酶生物科技有限公司。

1.4 仪器

311 型细胞培养箱、EVOS™ XL core 细胞成像系统倒置生物显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CKX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);TP1020 型全自动组织脱水机、RM2255 型全自动轮转式石蜡切片机、HI1210 型烤片机、HI1220 型摊片机、Aperio LV1 型切片扫描仪(德国 Leica 公司);JXFSTPRP-CL 型冷冻研磨机(上海净信实业发展有限公司);A-14C 型高速冷冻离心机、Amersham Imager 680RGB 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司);Mini Protean Tetra 蛋白电泳系统(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MKN45/DDP 细胞用 RPMI 1640 完全培养基,置于 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱内培养。培养基中加入 0.1 μg/mL 顺铂以维持其耐药性,造模前 2 周换无顺铂的完全培养基培养,每 2~3 天换液 1 次,待细胞生长至对数生长期,用于后续实验。

2.2 MTT 检测 MKN45/DDP 细胞对顺铂的耐药性

MKN45、MKN45/DDP 细胞分别以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。分别加入 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μg/mL 顺铂处理细胞 24 h,设置不含培养基不接种细胞的空白孔,弃去培养基,每孔加入 50 μL MTT,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,轻微震荡 5 min 使甲臞溶解,采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。采用 Graphpad Prism 8 软件计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值,再通过 IC₅₀ 计算耐药指数。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$$\text{耐药指数} = \text{MKN45/DDP 细胞 IC}_{50} / \text{MKN45 细胞 IC}_{50}$$

2.3 动物造模、分组及给药

参考文献方法^[7]制备裸鼠胃癌耐药模型,取对数生长期的 MKN45/DDP 细胞(1×10^7 个/mL),无菌条件下接种于裸鼠右前腋窝皮下(0.2 mL/只)。sc 1 周后,所有裸鼠皮下均可摸到肿块,表明造模成功。将 36 只裸鼠随机分为模型组、顺铂(2 μg/kg)组、密点麻蜥头部(2 g/kg)+顺铂(2 μg/kg)组、密点麻蜥四肢(2 g/kg)+顺铂(2 μg/kg)组、密点麻蜥躯干(2 g/kg)+顺铂(2 μg/kg)组、密点麻蜥尾部(2 g/kg)+顺铂(2 μg/kg)组,每组 6 只。待

瘤体生长至长径>5 mm 时开始给药^[8],中药给药剂量参照临床等效剂量(成人日用量与小鼠体表面积计算出裸鼠等效剂量^[9])。采用传统煎药方法将密点麻蜥身体不同部位分别置于 1 L 蒸馏水中煎煮 2 次,纱布滤过,合并药液,根据前期预实验结果浓缩至 0.02 g/mL 的水提液,4 °C 保存备用。顺铂组参照文献方法^[10],小鼠 ip 顺铂(2 μg/kg),2 次/周,连续给药 8 次;宁夏密点麻蜥头部、四肢、躯干、尾部+顺铂组小鼠分别 ig 头部、四肢、躯干、尾部水提液,2 次/d,持续 28 d,同时 ip 顺铂(2 μg/kg),2 次/周,连续给药 8 次;模型组 ig 等体积生理盐水,连续 28 d。

2.4 肿瘤体积及抑瘤率测定

自首次给药干预后每 3 天测量肿瘤长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积^[11]。末次给药 24 h 后,处死全部裸鼠,完整剥离肿瘤组织,测量肿瘤体积,计算抑瘤率。

$$\text{肿瘤体积} = ab^2/2$$

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均肿瘤体积} - \text{给药组平均肿瘤体积}) / \text{模型组平均肿瘤体积}$$

2.5 各组裸鼠肿瘤组织病理变化观察

末次给药后处死全部裸鼠,完整剥离瘤组织,用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h,流水冲洗 12 h,分别置于 75%、85%、95%、100%乙醇中脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、展片、捞片、烤片,经苏木素-伊红(HE)染色、中性树胶封片后,置于显微镜下观察各组裸鼠肿瘤组织病理学变化。

2.6 免疫组化法检测肿瘤组织 MUC1 表达

将各组肿瘤组织切片置于烘箱中 1 h,常规脱蜡、水化、高压抗原热修复及封闭后,分别加入一抗、二抗孵育,DAB 显色、苏木素复染、脱水封片后,显微镜下观察并进行图像采集,阳性结果表达呈棕色或棕黄色。依据阳性免疫反应的图像选取阳性表达区域,Image J 软件对上述阳性结果进行分析。

2.7 Western blotting 检测肿瘤组织 p65、p-p65、SNAIL、E-cadherin、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白表达

取各组肿瘤组织 100 mg,加入裂解液,置冰上备用,加入研磨珠,放入冷冻研磨机中研磨,置于高速冷冻离心机中 4 °C 离心 10 min,取上清,用 BCA 蛋白含量试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,混匀后沸水浴 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF

膜,经快速封闭液摇床孵育 15 min,加入一抗,4 ℃ 孵育过夜;次日复温 1 h,洗膜 5 次,每次 5 min,加入二抗,室温孵育 2 h,洗膜后,加入 ECL 化学发光液曝光及图像采集,用 Image J 软件分析目的蛋白灰度。

2.8 TUNEL 检测肿瘤组织细胞凋亡情况

各组肿瘤组织切片常规脱蜡至水,加入蛋白酶 K 工作液 37 ℃ 孵育 20 min,漂洗 3 次;加入 50 μL TUNEL 反应混合液,37 ℃ 避光孵育 1 h,漂洗 3 次;加入 DAPI 染色液,室温孵育 20 min,漂洗 3 次;封片,用荧光显微镜观察并拍照。凋亡细胞核为绿色荧光,DAPI 染色细胞核为蓝色荧光,用 Image J 软件分析结果。

2.9 统计学分析

处理数据用 SPSS 25.0 软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据进行正态性及方差齐性检验,两组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间两两比较用 LSD 法。

3 结果

3.1 MKN45/DDP 细胞对顺铂的耐药性

0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μg/mL 顺铂分别作用于 MKN45 和 MKN45/DDP 细胞 24 h 后,如图 1 所示,顺铂对 MKN45 和 MKN45/DDP 细胞增殖均有抑制作用,IC₅₀ 分别为 0.340、0.671 μg/mL,耐药指数为 1.973。与 MKN45 细胞相比,MKN45/DDP 细胞对顺铂的耐药性相对较强,敏感性降低。

3.2 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤体积和抑瘤率的影响

各组裸鼠肿瘤组织表面可见结节状突起,呈圆形或类圆形,质脆、硬,边界清楚,部分肿瘤组织

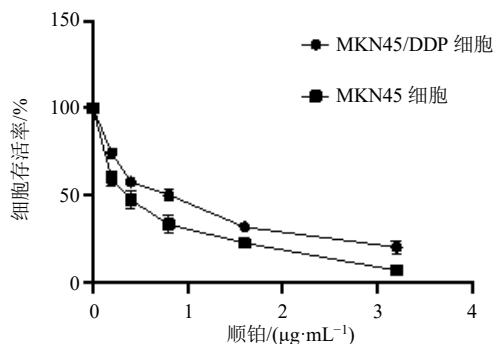


图 1 不同质量浓度的顺铂对 MKN45 和 MKN45/DDP 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of cisplatin on survival rate of MKN45 and MKN45/DDP cells

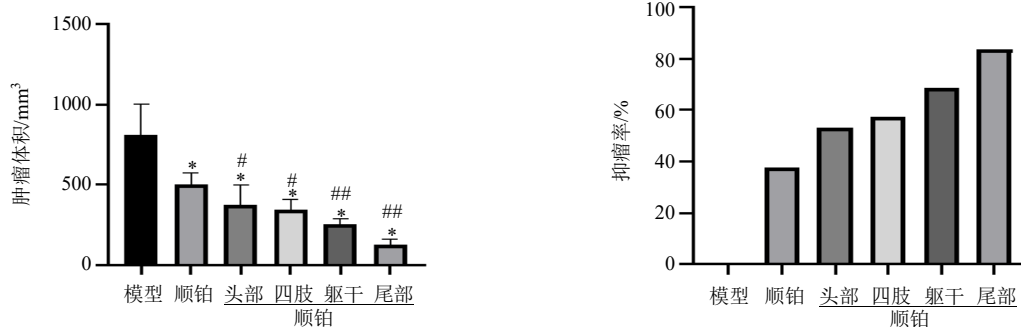
表面易破溃、出血。如图 2 所示,与模型组比较,各给药组肿瘤体积均显著缩小 ($P < 0.05$);与顺铂组比较,密点麻蜥不同部位+顺铂组肿瘤体积均显著缩小 ($P < 0.05$ 、0.01),其中尾部+顺铂组肿瘤体积最小且抑瘤率最高,表明尾部+顺铂组治疗效果最佳。

3.3 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织病理变化的影响

如图 3 所示,模型组肿瘤细胞呈圆形、卵圆形或不规则形,连接紧密,细胞核大、深染、圆而均匀;各给药组肿瘤细胞排列稀疏,大小不一,呈片状坏死,细胞核出现不同程度缩小或破裂。

3.4 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织 MUC1 表达的影响

MUC1 阳性表达大多在细胞膜或细胞质,呈棕黄色或褐色颗粒状。如图 4 所示,与模型组比较,各给药组 MUC1 蛋白阳性表达量均显著减少 ($P <$



与模型组比较: * $P < 0.01$ ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同

* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ vs model group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs cisplatin group, same as below figures

图 2 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤体积和抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effects of different parts of *E. multiocellata* on tumor volume and tumor inhibition rate of drug-resistant gastric cancer model in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

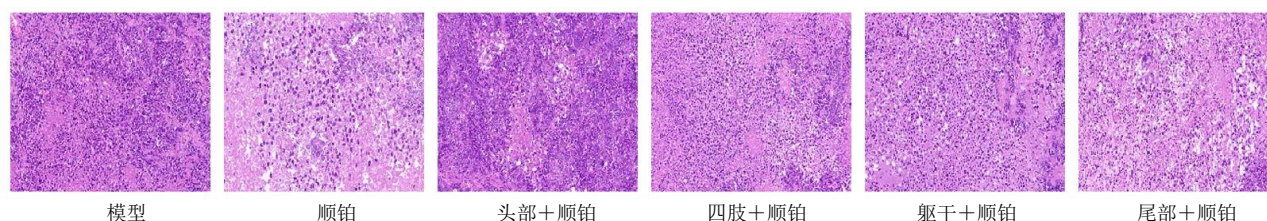


图 3 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effects of different parts of *E. multiocellata* on pathological changes of tumor tissue in drug-resistant gastric cancer model in nude mice (HE, $\times 200$)

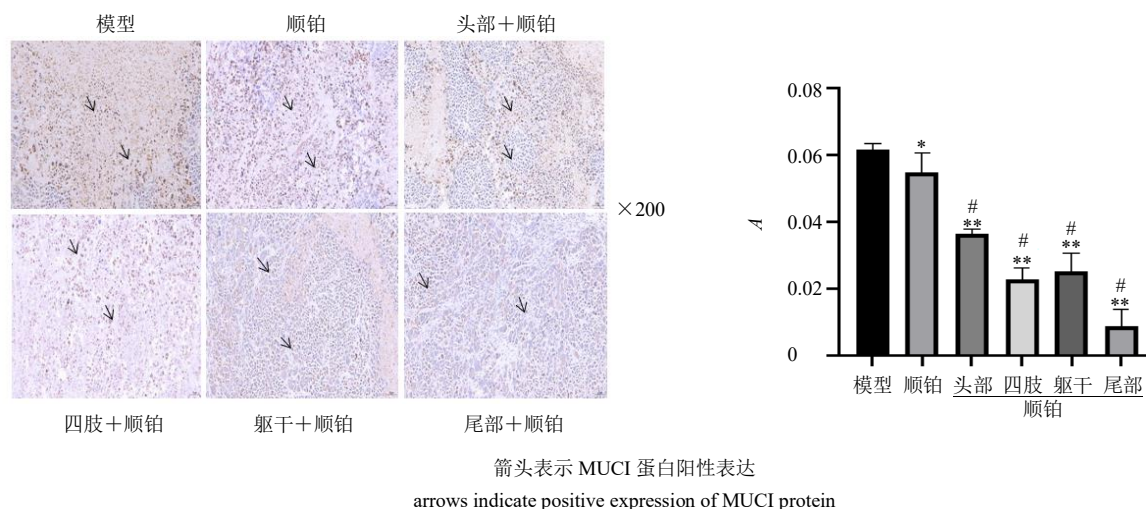


图 4 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织 MUC1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effects of different parts of *E. multiocellata* on MUC1 expression in tumor tissue of drug-resistant gastric cancer model in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

0.05、0.01); 与顺铂组比较, 密点麻蜥不同部位+顺铂组 MUC1 蛋白阳性表达量均显著减少 ($P < 0.05$), 其中尾部+顺铂组 MUC1 蛋白阳性表达量最低。

3.5 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织 p65、p-p65、SNAIL、E-cadherin、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与模型组比较, 各给药组肿瘤组织 p-p65、SNAIL、P-gp 和 LRP 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 密点麻蜥不同部位+顺铂组 E-cadherin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), MRP1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与顺铂组比较, 密点麻蜥不同部位+顺铂组 E-cadherin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 四肢+顺铂组、躯干+顺铂组和尾部+顺铂组 p-p65、SNAIL、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 以尾部+顺铂组上述蛋白表达变化最为明显。各组 p65 蛋白表达无统计学差异。

3.6 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织细胞凋亡的影响

如图 6 所示, 与模型组比较, 各给药组细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01); 与顺铂组比较, 密点麻蜥不同部位+顺铂组细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$), 其中尾部+顺铂组细胞凋亡率最高。

4 讨论

胃癌是一种由幽门螺旋杆菌感染、饮食、遗传、环境等多类因素引起的胃黏膜恶性病变, 其发病率位居我国恶性肿瘤第 3 位, 病死率位居第 2 位, 且进展期胃癌有较高的转移率和复发率, 其 5 年生存率仅 25%~30%^[12], 极大威胁患者健康。因胃癌患者缺乏早期有效诊断方法, 发现时多处于中晚期, 已失去手术机会, 故化疗成为其主要的治疗方式。顺铂是晚期和转移性患者的重要化疗药物之一, 多数患者早期可通过顺铂化疗取得较好疗效, 但随用药时间延长会使顺铂对肿瘤细胞的细胞毒性减低而产生耐药性^[13], 致临床效果不佳。因此, 顺铂耐药性逆转成为临床胃癌化疗增敏提效的重要问题。探索

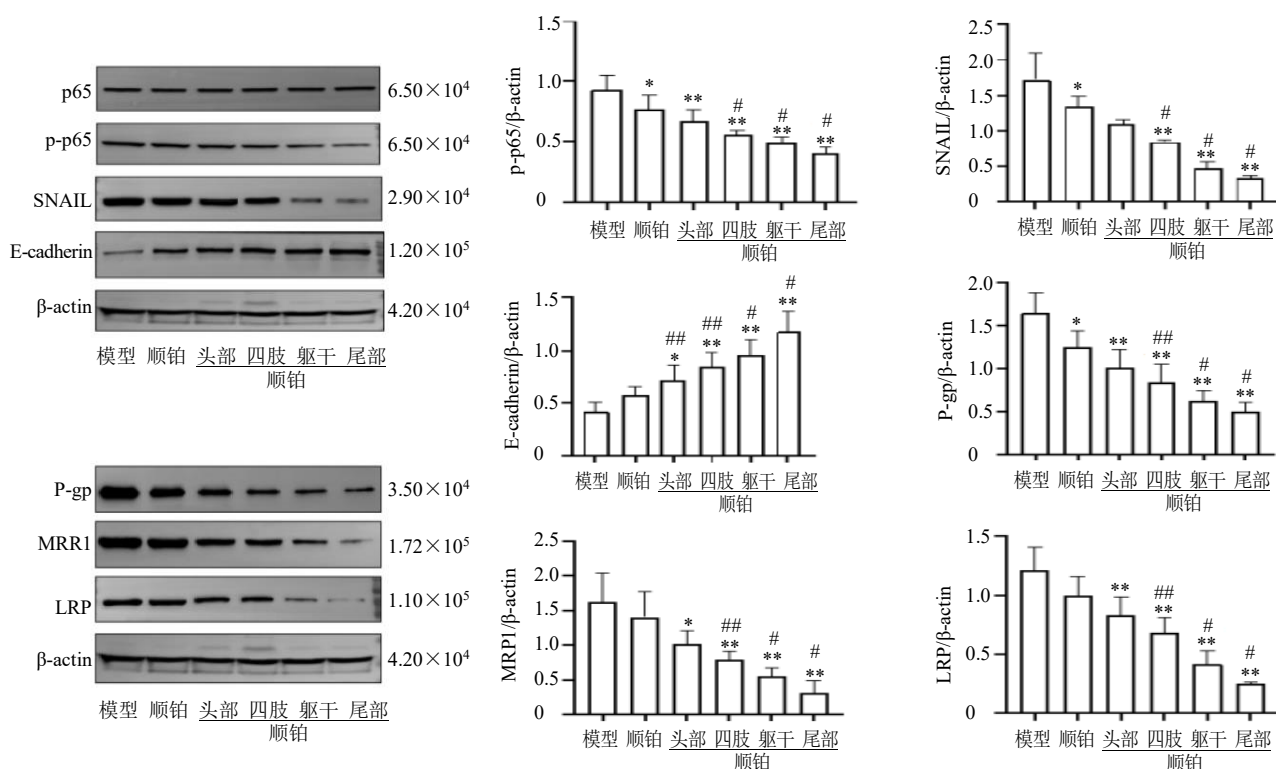


图 5 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织 p65、p-p65、SNAIL、E-cadherin、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of different parts of *E. multiocellata* on p65, p-p65, SNAIL, E-cadherin, P-gp, MRP1 and LRP protein expressions in tumor tissue of drug-resistant gastric cancer model in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

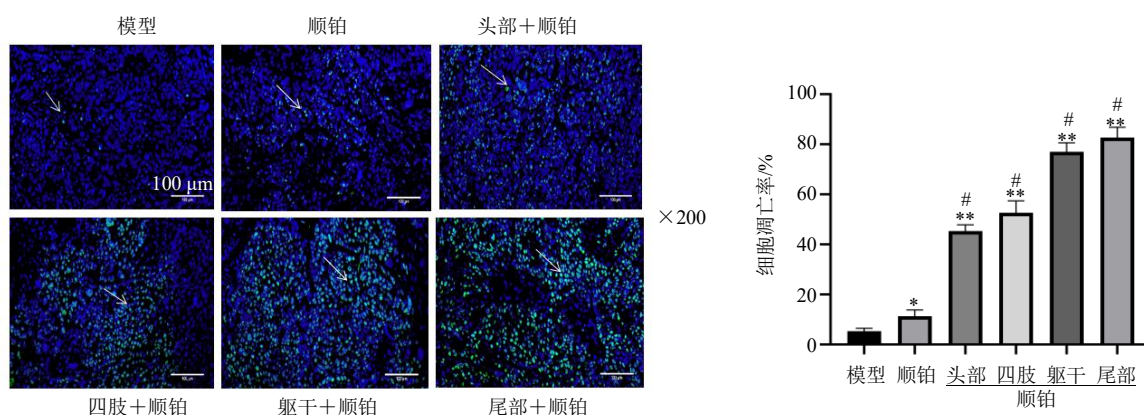


图 6 密点麻蜥不同部位对裸鼠胃癌耐药模型肿瘤组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effects of different parts of *E. multiocellata* on apoptosis in tumor tissue of drug-resistant gastric cancer model in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

逆转胃癌化疗耐药、增敏提效的药物具有重要的临床意义和价值，特别是结合理论指导和临床思维的中医药抗化疗耐药的疗效及机制研究显示出其重要性和迫切性，中西药联合应用抑制胃癌化疗耐药是当前临床肿瘤研究的焦点^[10]。

宁夏密点麻蜥是蜥蜴科动物丽斑麻蜥属，生活于荒漠中，以干燥全体入药^[14]，为宁夏地区道地药

材之一，其味咸、寒，归肺、肝、肾经，具有活血化瘀、消癥散结、利尿通淋、镇静之功效^[4]。研究发现，密点麻蜥富含蛋白质、氨基酸、硒等微量元素，可提高机体免疫力，有较好的抗癌作用，其尾部再生力强，对身体有良好保护和功能修复作用^[14-15]。课题组前期研究表明，密点麻蜥不同部位含药血清可有效抑制胃癌细胞增殖，具有良好的抗癌作用，

以尾部抗肿瘤作用最强^[5,16]。本研究发现,密点麻蜥不同部位联合顺铂均有不同程度逆转胃癌顺铂耐药的作用,并诱导耐药细胞凋亡,以尾部+顺铂组效果最为明显。表明密点麻蜥联合顺铂可不同程度增强胃癌细胞对顺铂的敏感性,逆转化疗耐药。

NF- κ B/SNAIL 信号通路与肿瘤化疗耐药密切相关。NF- κ B 是一种重要的核转录蛋白,在 MDR1 的第 1 个内含子中确定了 1 个相同的 NF- κ B 结合位点,并证实其复合物可与该内含子位点相结合,形成耐药^[17]。NF- κ B 主要由核转录因子 p65 和 p50 构成同源/异源二聚体,可协调各种基因表达,影响体内细胞分化、凋亡和肿瘤生长等生物学功能,其中 p65 的磷酸化是 NF- κ B 最关键的修饰方式之一^[18-19]。SNAIL 作为锌指转录调控因子 SNAIL 超家族中的成员,可诱导 EMT,下调 E-cadherin 表达,参与肿瘤的浸润和转移^[20]。研究表明,SNAIL 在胃癌、肝癌、结肠癌等组织高表达,并与组织学分级和肿瘤耐药性密切相关^[21-23]。本研究发现,荷瘤裸鼠胃癌顺铂耐药后 p-p65 及 SNAIL 表达上调,E-cadherin 表达下调;给予宁夏密点麻蜥不同部位联合顺铂治疗后,p-p65 及 SNAIL 蛋白表达均有不同程度下调,E-cadherin 蛋白表达均有不同程度上调,以尾部+顺铂组上述蛋白表达变化最为明显。上述结果表明宁夏密点麻蜥联合顺铂可通过不同程度介导 NF- κ B/SNAIL 信号通路,促使 p-p65 及 SNAIL 表达下调、E-cadherin 表达上调,从而抑制 EMT 进程,进而逆转胃癌顺铂耐药。

P-gp、MRP1、LRP 为跨膜转运蛋白,可介导肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,通过降低细胞内化疗药物的浓度,抑制肿瘤细胞杀伤作用,还可使化疗药物从细胞核转移到细胞质,使其无法到达靶点部位^[24-25]。研究发现,P-gp、MRP1、LRP 在癌组织中异常高表达可引起细胞内化疗药物的浓度降低,达不到有效治疗浓度,从而产生耐药性^[26]。MUC1 是 MUCIN 家族一种关键黏蛋白,在多种上皮性肿瘤细胞中常过表达,能以不同形式上调三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合盒转运蛋白的表达,调节肿瘤微环境中的炎症细胞,促进肿瘤的发生与发展,诱导化疗耐药^[27-28]。本研究结果显示,与模型组比较,密点麻蜥不同部位联合顺铂组 P-gp、MRP1、LRP 及 MUC1 蛋白表达均有不同程度下调,以尾部+DDP 组上述蛋白表达下调最为明显。证实宁夏密点麻蜥不同部位联合顺铂可通过抑

制 P-gp、MRP1、LRP 及 MUC1 表达,从而增强耐顺铂细胞对顺铂的敏感性,改善荷瘤裸鼠胃癌顺铂耐药。

综上,宁夏密点麻蜥不同部位联合顺铂对胃癌顺铂耐药裸鼠皮下瘤均有明显抑制作用,可不同程度减小肿瘤体积,促进耐药细胞凋亡,并调节相关蛋白表达,从而改善胃癌裸鼠的化疗耐药性,增敏提效,以尾部+顺铂组效果最为明显。其机制可能为通过抑制 NF- κ B/SNAIL 信号通路的激活,从而发挥逆转胃癌顺铂耐药的作用。另外,密点麻蜥提取和成分鉴定仍是一个难题。课题组前期与南京中医药大学段金廛教授合作对复方蜥蜴散在动物体内的代谢产物进行初步鉴定,由于相关药物研究较少且尚未查询到可以做质谱的对照品,具体成分仍未明确。目前课题组仍在进行密点麻蜥单味提取及成分鉴定工作。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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): 209-249.
- [2] Li Y J, Lei Y H, Yao N, *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer [J]. *Cancer Commun*, 2017, 36(1): 52.
- [3] 詹东梅, 刘延庆. 中药逆转胃癌多药耐药的研究进展 [J]. *癌症进展*, 2020, 18(13): 1307-1311.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 660.
- [5] 李卫强, 王骄, 关芳, 等. 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对人胃癌细胞凋亡的影响研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(8): 1447-1451.
- [6] 白星, 程翻娥, 杨长沅, 等. 基于 SNAIL 信号通路及肠道菌群研究密点麻蜥抑制胃癌肝转移的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 825-833.
- [7] 赵欢, 吕鹏, 潘一鸣, 等. 复方浙贝颗粒联合顺铂对 L1210/CDDP 移植瘤模型生存期及多药耐药基因影响的研究 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(11): 1920-1924.
- [8] 袁国荣, 袁见, 朱莹杰. 人参皂苷 Rg₃ 对人胃腺癌 BGC-823 细胞皮下移植瘤的抑制作用及机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(7): 168-172.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1169.
- [10] 师林, 黄圆圆, 柯斌. 加味龟鹿二仙胶汤对肺癌耐药裸鼠化疗药敏感性的改善作用 [J]. *中成药*, 2021, 43(11): 2976-2981.
- [11] 伊庆亭, 张红军, 姜韬, 等. 多烯磷脂酰胆碱在裸鼠模

- 型中逆转胃癌细胞奥沙利铂耐药的作用及机制研究 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2018, 32(5): 385-390.
- [12] Thrift A P, El-Serag H B. Burden of gastric cancer [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(3): 534-542.
- [13] 王海燕, 王钊华, 马波. 青藤碱联合顺铂对顺铂耐药 Hela 细胞株增殖凋亡的作用 [J]. 武警医学, 2022, 33(2): 158-162.
- [14] 景燕燕, 白星, 李卫强. 蜥蜴胃康方对胃癌浸润转移的干预作用及机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(4): 783-786.
- [15] 朱西杰, 李卫强, 钱月慧. 中华虫药宁夏蜥蜴 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2014: 16.
- [16] 王骅. 宁夏密点麻蜥身体不同部位含药大鼠血清对 MGC-803 人胃癌细胞的干预作用及机制研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2020.
- [17] 丁秋花. 卵巢癌多药耐药分子机制的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(7): 807-812.
- [18] Zheng J, Zhang H, Ma R R, *et al.* Long non-coding RNA KRT19P3 suppresses proliferation and metastasis through COPS7A-mediated NF- κ B pathway in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(45): 7073-7088.
- [19] Soleimani A, Rahmani F, Ferns G A, *et al.* Role of the NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. *Gene*, 2020, 726: 144132.
- [20] Wang Y F, Shi J, Chai K Q, *et al.* The role of snail in EMT and tumorigenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 963-972.
- [21] 瞿昌晶, 王铮元, 崔嵘嵘, 等. MiR-34 在胃癌组织中的表达及与 EMT、化疗耐药性的相关性 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(16): 2952-2956.
- [22] 钟晓丹, 文彬, 孙海涛, 等. 鳖甲煎丸通过 NF- κ B 信号通路抑制肝癌细胞上皮间质转化的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 24-32.
- [23] 陈林俊, 陈文斌. 岩大戟内酯 B 通过阻断 PI3K/Akt/NF- κ B 通路抑制结肠癌细胞的增殖和转移 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(3): 250-257.
- [24] 宋淑萍, 蔡利军, 孟立娜. 温郁金醇提物对多药耐药人胃癌裸鼠异位移植瘤的抑制及葡萄糖神经酰胺合成酶的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(7): 853-857.
- [25] 蔡利军. 温郁金逆转人胃癌 SGC-7901/VCR 多药耐药的实验研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
- [26] 张颖, 王淳, 于丹, 等. 黄芪多糖抑制肺腺癌 A549/DDP 细胞移植瘤裸鼠 EMT 改善顺铂耐药的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 79-85.
- [27] 汤开然, 吴琼, 黄思佳, 等. 与 MUC1 共同调控肿瘤化疗耐药的 MUCIN 家族成员的筛选 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2022, 42(9): 1288-1295.
- [28] Cascio S, Finn O J. Intra-and extra-cellular events related to altered glycosylation of MUC1 promote chronic inflammation, tumor progression, invasion, and metastasis [J]. *Biomolecules*, 2016, 6(4): E39.

[责任编辑 李亚楠]