

加味七方胃痛颗粒对胃癌的抑制作用及机制研究^Δ

陈鑫源^{1,2*}, 吴成挺¹, 熊常州¹, 王 婷¹, 崔引航¹, 吴培斌¹, 陈文隆¹, 陈慧琳¹, 林才志^{1,2}, 唐梅文^{1,2#} (1. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530000; 2. 广西中医药大学第一附属医院脾胃肝病科, 南宁 530219)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)21-2656-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.21.07



摘要 目的 结合体内外实验研究加味七方胃痛颗粒对胃癌的抑制作用及机制。方法 将人胃癌HGC-27细胞分为对照组(胎牛血清)、10%含药血清组、15%含药血清组、20%含药血清组、5-氟尿嘧啶(5-Fu)组(阳性对照, 3.90 μg/mL), 各组细胞给予相应血清/药液培养后, 检测其增殖、迁移、侵袭能力以及细胞周期, 检测细胞中上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白[E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)]表达水平。另取对数期HGC-27细胞, 经皮下注射至裸鼠右侧腋下, 以建立裸鼠皮下移植瘤模型。将造模成功的荷瘤裸鼠随机分为模型组和加味七方胃痛颗粒低、中、高剂量组(17.65、35.29、70.58 g/kg)以及5-Fu组(25 mg/kg), 每组5只。各组裸鼠给予相应药物处理14 d后, 观察裸鼠肿瘤组织病理学形态, 采用免疫组化法和Western blot法检测裸鼠肿瘤组织中EMT相关蛋白表达水平。结果 细胞实验中, 与对照组相比, 15%含药血清组、20%含药血清组的细胞增殖率、迁移率、侵袭数和N-cadherin、vimentin蛋白表达水平以及G₂/M期细胞百分比均显著降低/减少($P<0.05$), G₀/G₁期细胞百分比和E-cadherin蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。动物实验中, 与模型组相比, 加味七方胃痛颗粒高剂量组裸鼠的肿瘤质量和肿瘤组织中N-cadherin、vimentin蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$), 肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); 肿瘤细胞大小不一, 且大量坏死。结论 加味七方胃痛颗粒在体内外模型中均能有效抑制胃癌, 其作用机制与抑制EMT有关。

关键词 加味七方胃痛颗粒; 胃癌; HGC-27细胞; 上皮-间充质转化; 增殖; 侵袭

Study on the inhibitory effect and mechanism of Modified qifang weitong granules on gastric cancer

CHEN Xinyuan^{1,2}, WU Chengting¹, XIONG Changzhou¹, WANG Ting¹, CUI Yinhang¹, WU Peibin¹, CHEN Wenlong¹, CHEN Huilin¹, LIN Caizhi^{1,2}, TANG Meiwen^{1,2} (1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Dept. of Spleen, Stomach and Hepatology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530219, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the inhibitory effect and mechanism of Modified qifang weitong granules on gastric cancer based on *in vitro* and *in vivo* experiments. **METHODS** Human gastric cancer HGC-27 cells were divided into the following groups: control group (treated with fetal bovine serum), 10% drug-containing serum group, 15% drug-containing serum group, 20% drug-containing serum group, and 5-fluorouracil (5-Fu) group (positive control, 3.90 μg/mL). After culturing the cells in each group with the corresponding serum/drug solution, their proliferation, migratory and invasive abilities, as well as the cell cycle, were assessed. Additionally, the expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins [E-cadherin, N-cadherin, and vimentin] in the cells were measured. Logarithmic-phase HGC-27 cells were harvested and subcutaneously injected into the right axillary region of nude mice to establish a subcutaneous xenograft tumor model in nude mice. The successfully modeled tumor-bearing nude mice were randomly divided into model group, low-, medium- and high-dose groups of Modified qifang weitong granules (17.65, 35.29 and 70.58 g/kg, respectively), and 5-Fu group (25 mg/kg), with 5 mice in each group. After 14 days of treatment with the corresponding drugs in each group, the histopathological morphology of the tumor tissues in the nude mice was observed. Immunohistochemistry and Western blot assay were employed to detect the expression levels of EMT-related proteins in the tumor tissues of the nude mice. **RESULTS** In the cell experiment, compared with the control group, the cell proliferation rate, migration rate, number of invasive cells, as well as the expression levels of N-cadherin and vimentin proteins, and the percentage of cells in the G₂/M phase were all significantly decreased/reduced in the 15% drug-containing serum group, 20% drug-containing serum group ($P<0.05$). Conversely, the percentage of cells in the G₀/G₁ phase and the expression level of E-cadherin protein were significantly increased ($P<0.05$). In animal experiment, compared with the model group, the high-dose group of Modified qifang weitong granules exhibited significantly reduced tumor mass and expression levels of N-cadherin and vimentin proteins in the tumor tissues of nude mice ($P<0.05$), while the expression level of E-cadherin

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82360959); 广西研究生创新计划项目(No.YCBZ2025193)

* 第一作者 住院医师, 硕士。研究方向: 中医药防治脾胃病。
E-mail: 839029828@qq.com

通信作者 教授, 博士。研究方向: 中医药防治脾胃病。E-mail: tangmw@gxtcmu.edu.cn

protein in the tumor tissues was significantly increased ($P<0.05$). Additionally, the tumor cells varied in size and showed extensive necrosis. **CONCLUSIONS** Modified qifang weitong granules effectively inhibit gastric cancer in both *in vitro* and *in vivo* models, and the mechanism of action is related to the suppression of EMT.

KEYWORDS Modified qifang weitong granules; gastric cancer; HGC-27 cells; epithelial-mesenchymal transition; proliferation; invasion

胃癌是全球范围内高发的恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别位居全球恶性肿瘤的第5位和第4位^[1-2]。虽然现代医学已发展出包括手术、放疗、化疗、靶向治疗及免疫治疗在内的综合治疗方案^[3],但是患者的5年生存率仍较低。因此,临床迫切需要开发能够改善胃癌患者预后的有效药物^[4]。肿瘤复发、转移及对治疗药物产生耐药性是影响患者预后的关键因素^[5]。研究发现,上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤转移和耐药机制中扮演着关键角色,这一生物学过程赋予了肿瘤细胞更强的侵袭能力和治疗抵抗特性^[6]。因此,靶向干预EMT是改善患者胃癌预后的重要策略。

加味七方胃痛颗粒是全国名老中医罗伟生教授的临床经验方,该方剂由四君子汤、丹参饮、左金丸、逍遥散、枳实芍药散、枳术丸、木香槟榔丸7个古方化裁而成,由红参、茯苓、白术等19味药材组成,具有益气扶正、活血化瘀、清肝泻火等多重功效,临床研究证实其对胃癌癌前病变具有显著疗效^[7-8]。本课题组前期研究发现,加味七方胃痛颗粒可显著抑制胃癌细胞的增殖并诱导凋亡^[9],初步证实了其抗肿瘤效应。胃癌的高死亡率与肿瘤转移密切相关,而EMT是驱动肿瘤转移的核心机制^[6],该方剂是否可通过调控EMT抑制胃癌转移尚不明确。基于此,本研究通过体内外研究策略,从EMT角度研究加味七方胃痛颗粒对胃癌的抑制作用及机制,以期为临床应用加味七方胃痛颗粒治疗胃癌提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

DYY-4C型电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;PowerPac™ Basic型转膜仪购自美国Bio-Rad公司;CKX41型倒置光学显微镜购自日本Olympus公司;DMi8型荧光显微镜购自德国Leica公司;LSRFortessa™ X-20型流式细胞仪购自美国Biosciences公司;Infinite® M200 PRO型多功能酶标仪购自瑞士Tecan公司。

1.2 主要药品与试剂

加味七方胃痛颗粒各组成药材(红参10 g、茯苓10 g、麸炒白术10 g、炙甘草9 g、黄连6 g、木香6 g、制吴茱萸3 g、枳实6 g、半夏10 g、黄芪30 g、黄精6 g、瓜蒌壳20 g、天花粉10 g、白芍30 g、丹参10 g、炒鸡内金9 g、三棱15 g、莪术15 g、白花蛇舌草20 g)的配方颗粒均由江苏天阴天江制药股份有限公司提供。

DMEM培养基(货号11965092)、胎牛血清(货号

A5669701)均购自美国Gibco公司;RIPA裂解液(货号P0013B)、BCA蛋白浓度检测试剂盒(货号P0012S)、结晶紫染色液(货号240009007)均购自北京索莱宝科技有限公司;Matrix-Gel基质胶(货号C0372)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Transwell小室(货号3414)购自美国Corning公司;鼠源E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G二抗(货号分别为GB12083、GB12135、GB121308、GB15003、GB23301)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;细胞周期检测试剂盒(货号CCS012)购自杭州联科生物技术股份有限公司;EdU细胞增殖检测试剂盒(货号G24122304)购自信天翁生物科技(广州)有限公司;5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu; 货号253425)购自美国MCE公司。

1.3 实验细胞与动物

人胃癌HGC-27细胞购自广州源井生物科技有限公司,使用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养细胞。

本研究所用动物有SPF级SD雄性大鼠20只(体重180~220 g,用于制备含药血清)和BALB/c裸鼠25只(体重13~16 g),均购自湖南省斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004号。本研究动物实验在广西中医药大学实验动物中心进行。大鼠饲养环境温度为20~25℃,相对湿度为40%~70%。本研究所有实验程序均严格遵守实验动物福利伦理原则,并已获得广西中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批号为DW20240507-091)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 含药血清制备

取10只SD大鼠按24.68 g/kg(剂量根据临床等效剂量换算)灌胃加味七方胃痛颗粒药液,每天2次,连续7 d。末次给药1 h后腹主动脉取血,血样静置2 h,以3 000 r/min离心15 min,收集血清;将血清置于56℃水浴条件下灭活30 min,再以0.22 μ m微孔滤膜过滤,收集滤液置于一80℃冰箱中保存。

2.1.2 HGC-27细胞增殖能力检测

采用EdU法进行检测。将HGC-27细胞以 1×10^5 个/mL的密度接种于6孔板,分为对照组(胎牛血清100

μL +DMEM 培养基 890 μL +1% 青链霉素 10 μL)、10% 含药血清组(含药血清 100 μL +DMEM 培养基 890 μL +1% 青链霉素 10 μL)、15% 含药血清组(含药血清 150 μL +DMEM 培养基 840 μL +1% 青链霉素 10 μL)、20% 含药血清组(含药血清 200 μL +DMEM 培养基 790 μL +1% 青链霉素 10 μL)、5-Fu 组(5-Fu 终浓度为 3.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，每组设 3 个复孔。各组细胞培养 48 h 后，加入 EdU (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 工作液孵育 2 h，去除培养液；加入多聚甲醛 1 mL，室温固定 15 min，吸弃上清液，每孔加入 Hoechst 33342 溶液 1 mL，室温避光孵育 10 min；吸弃上清液，洗涤 3 次，采用荧光显微镜观察，并计算各组细胞增殖率，细胞增殖率=EdU 阳性细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

2.1.3 HGC-27 细胞迁移能力检测

将 HGC-27 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板，按“2.1.2”项下方法分组、给药，每组设 3 个复孔。待细胞融合率达 90% 时，吸弃上清液，使用枪头划痕，用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 3 次，去除划下的细胞；在 0、48 h 时于显微镜下观察划痕中细胞迁移的情况，采用 Image J 软件测量划痕宽度，每个时间点至少测量 3 个不同位置，取平均值，并计算细胞迁移率，细胞迁移率(%)=(初始划痕宽度-最终划痕宽度)/初始划痕宽度 $\times$ 100%。

2.1.4 HGC-27 细胞侵袭能力检测

将 Matrix-Gel 基质胶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下解冻，次日用培养基稀释，取 100 μL 至每个 Transwell 小室，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 成膜。取 HGC-27 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板，按“2.1.2”项下方法分组、给药，加入相应含药血清培养基培养；干预 48 h 后将上述各组细胞以 5×10^4 个/mL 接种至相应小室，每组设 3 个复孔。将 Transwell 小室放入 12 孔板中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后取出，置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min，再用结晶紫染色 30 min；以 PBS 清洗 3 次，采用倒置光学显微镜观察细胞，随机选择 3 个不同视野拍照记录，并使用 Image J 软件计数，细胞侵袭数越多，表明其侵袭能力越强。

2.1.5 HGC-27 细胞周期检测

将 HGC-27 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h 后弃去培养基，按“2.1.2”项下方法分组、给药，每组设 3 个复孔。培养 48 h 后收集细胞，离心弃上清液；按细胞周期检测试剂盒说明书方法处理后，上机检测。

2.1.6 HGC-27 细胞中 EMT 相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。将 HGC-27 细胞以 4×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中，按“2.1.2”项下方法分组、给药，每组设 3 个复孔。培养 48 h 后收集细胞，加入 RIPA 裂解液裂解，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液；采用 BCA 法测定蛋白浓度后，将蛋白进行变性处理，取蛋白样品适量，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯

酰胺凝胶电泳，然后转移至 PVDF 膜，以 5% 脱脂奶粉孵育 1 h，加入 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、 β -actin 一抗(稀释度分别为 1:1 000、1:2 000、1:1 000、1:5 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；以 TBST 清洗 3 次，加入相应二抗(稀释度为 1:10 000)孵育 1 h；以 TBST 清洗 3 次，置于曝光液中浸泡 10 min 以显影，使用 Image J 软件分析蛋白灰度值，以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药

取对数期 HGC-27 细胞(1×10^7 个/mL)0.1 mL，采用胰岛素注射针将其经皮下注射至裸鼠右侧腋下，以建立裸鼠皮下移植瘤模型；当肿瘤体积达到 100 mm^3 时，则表明造模成功^[10]。造模成功后，将荷瘤裸鼠随机分为模型组和加味七方胃痛颗粒低、中、高剂量组(17.65、35.29、70.58 g/kg，其中中剂量为临床等效剂量)以及 5-Fu 组(25 mg/kg^[11])，每组 5 只；加味七方胃痛颗粒各剂量组裸鼠灌胃相应药物，每天 2 次，连续 14 d；5-Fu 组裸鼠腹腔注射 5-Fu(注射体积为 10 mL/kg)，每 3 天 1 次，连续 14 d。

2.2.2 肿瘤组织生长及病理学形态观察

末次给药后，处死裸鼠，完整剥离各组裸鼠的皮下移植瘤组织；迅速称量并记录各瘤块湿重，然后取部分(剩余部分用于 EMT 相关蛋白表达检测)以 10% 多聚甲醛固定，经石蜡包埋后制作成 4 μm 厚度的切片；取部分切片进行 HE 染色，采用光学显微镜观察各组裸鼠肿瘤组织的病理学形态。

2.2.3 肿瘤组织中 EMT 相关蛋白表达检测

(1)采用免疫组化法检测。取“2.2.2”项下切片，加入 1% 高碘酸盐静置 10 min 灭活内源性酶，再加入 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 一抗(稀释度分别为 1:1 000、1:2 000、1:1 000)，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，以 PBS 洗涤 3 次；加入相应二抗(稀释度为 1:10 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，以 PBS 洗涤 3 次；经乙醇梯度脱水后封片，随机选择 3 个视野于荧光显微镜下观察。采用 Image J 软件测定每个视野下各蛋白阳性染色的光密度值，以表示相应蛋白的表达水平。

(2)采用 Western blot 法检测。取“2.2.2”项下各组剩余肿瘤组织适量，加入 RIPA 裂解液裂解，然后按“2.1.6”项下方法处理，检测相应蛋白表达水平。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时组间两两比较采用 LSD-*t* 检验，方差不齐时组间两两比较采用 Tamhane's *T2* 检验；不符合正态分布的计量资料采用非参数检验，多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验，进一步两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 加味七方胃痛颗粒对HGC-27细胞增殖的影响

与对照组相比,各含药血清组和5-Fu组的细胞增殖率均显著降低($P<0.05$);与5-Fu组相比,各含药血清组的细胞增殖率均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组HGC-27细胞增殖率、迁移率、侵袭数比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	细胞增殖率/%	细胞迁移率/%	侵袭细胞数/个
对照组	50.34±3.50	84.31±5.03	89.00±5.03
10%含药血清组	42.72±0.70 ^{ab}	73.29±0.87 ^{ab}	64.33±3.79 ^{ab}
15%含药血清组	36.52±1.20 ^{ab}	56.85±6.79 ^{ab}	50.67±3.76 ^{ab}
20%含药血清组	35.46±0.51 ^{ab}	51.38±0.50 ^{ab}	43.67±3.06 ^{ab}
5-Fu组	21.83±1.98 ^a	31.72±1.33 ^a	30.67±4.04 ^a

a:与对照组相比, $P<0.05$;b:与5-Fu组相比, $P<0.05$ 。

3.1.2 加味七方胃痛颗粒对HGC-27细胞迁移的影响

与对照组相比,各含药血清组和5-Fu组的细胞迁移率均显著降低($P<0.05$);与5-Fu组相比,各含药血清组的细胞迁移率均显著升高($P<0.05$)。结果见图1、表1。

3.1.3 加味七方胃痛颗粒对HGC-27细胞侵袭的影响

与对照组相比,各含药血清组和5-Fu组细胞侵袭数均显著减少($P<0.05$);与5-Fu组相比,各含药血清组的细胞侵袭数均显著增加($P<0.05$)。结果图2、表1。

3.1.4 加味七方胃痛颗粒对HGC-27细胞周期的影响

与对照组[G₀/G₁期、S期、G₂/M期细胞百分比分别为

(41.58±0.71)%、(14.10±0.20)%、(27.58±0.71)%]相比,10%、15%、20%含药血清组的G₀/G₁期细胞百分比[分别为(44.83±0.67)%、(46.38±0.62)%、(49.05±0.35)%]和5-Fu组S期细胞百分比[(62.90±0.30)%]均显著升高($P<0.05$),上述含药血清组G₂/M期细胞百分比[(12.15±0.05)%、(10.40±0.20)%、(12.40±0.40)%]均显著降低($P<0.05$)。结果见图3。

3.1.5 加味七方胃痛颗粒对HGC-27细胞中EMT相关蛋白表达的影响

与对照组相比,15%含药血清组、20%含药血清组和5-Fu组细胞中E-cadherin蛋白表达水平均显著升高,各含药血清组和5-Fu组细胞中N-cadherin、vimentin蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与5-Fu组相比,各含药血清组细胞中E-cadherin蛋白表达水平均显著降低,N-cadherin、vimentin蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图4、表2。

3.2 动物实验结果

3.2.1 加味七方胃痛颗粒对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

与模型组[(410.00±24.49)mg]相比,加味七方胃痛颗粒低、中、高剂量组和5-Fu组裸鼠的肿瘤质量[分别为(384.00±36.11)、(298.00±36.55)、(198.00±36.55)、(130.00±20.00)mg]均显著降低($P<0.05$);与5-Fu组相比,加味七方胃痛颗粒各剂量组裸鼠的肿瘤质量均显著升高($P<0.05$)。结果见图5。

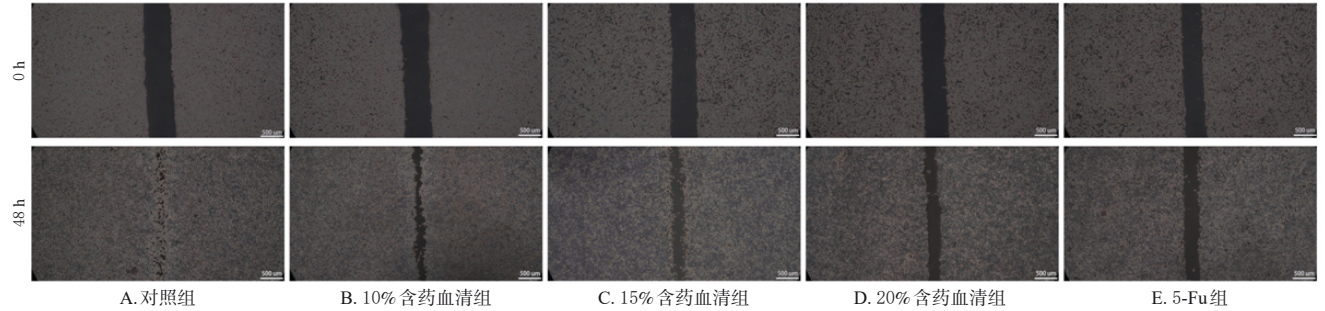


图1 各组HGC-27细胞迁移情况观察结果

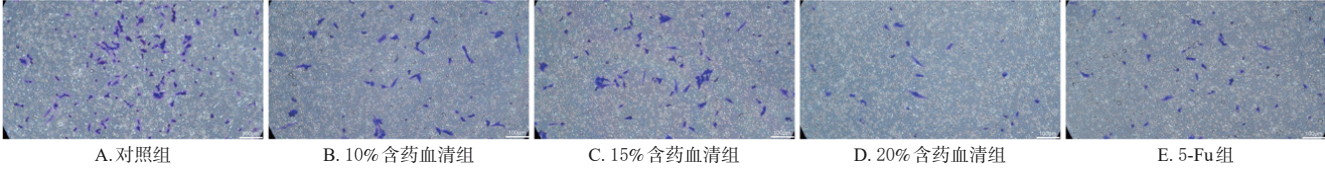


图2 各组HGC-27细胞侵袭情况观察结果

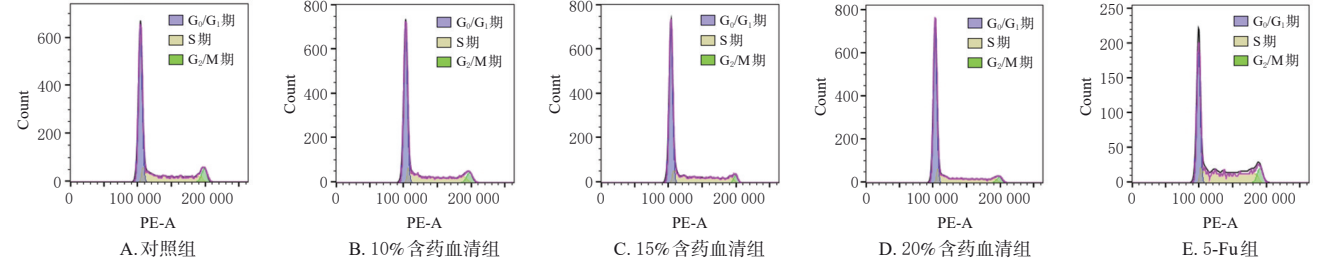
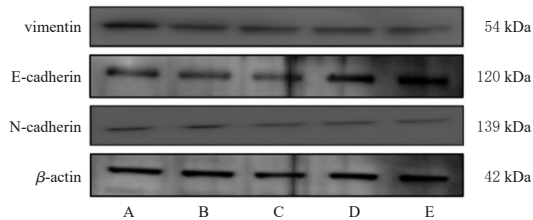


图3 各组HGC-27细胞的流式图



A: 对照组; B: 10%含药血清组; C: 15%含药血清组; D: 20%含药血清组; E: 5-Fu组。

图4 各组HGC-27细胞中EMT相关蛋白表达的电泳图

表2 各组HGC-27细胞中EMT相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	vimentin	E-cadherin	N-cadherin
对照组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.16
10%含药血清组	0.78 ± 0.08 ^{ab}	1.02 ± 0.03 ^b	0.78 ± 0.06 ^{ab}
15%含药血清组	0.71 ± 0.05 ^{ab}	1.13 ± 0.07 ^{ab}	0.71 ± 0.03 ^{ab}
20%含药血清组	0.63 ± 0.02 ^{ab}	1.74 ± 0.11 ^{ab}	0.61 ± 0.02 ^{ab}
5-Fu组	0.32 ± 0.08 ^a	2.53 ± 0.30 ^a	0.39 ± 0.02 ^a

a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与5-Fu组相比, $P < 0.05$ 。

3.2.2 加味七方胃痛颗粒对裸鼠皮下移植瘤病理学形态的影响

模型组裸鼠肿瘤细胞排列整齐, 增殖旺盛; 加味七方胃痛颗粒各剂量组和5-Fu组裸鼠肿瘤细胞大小不一, 且大量坏死。结果见图6。

3.2.3 加味七方胃痛颗粒对裸鼠皮下移植瘤组织中EMT相关蛋白表达的影响

免疫组化结果和Western blot结果均显示, 与模型组相比, 加味七方胃痛颗粒高剂量组和5-Fu组裸鼠肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平均显著升高, N-cadherin、vimentin蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$);

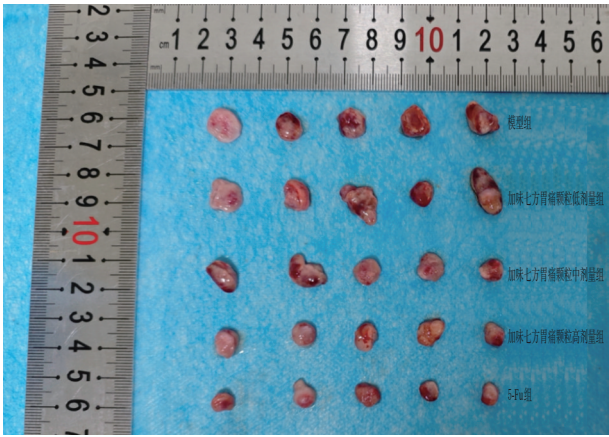


图5 各组裸鼠肿瘤组织观察结果

与5-Fu组相比, 加味七方胃痛颗粒各剂量组裸鼠肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平均显著降低, N-cadherin、vimentin蛋白表达水平(加味七方胃痛颗粒高剂量组除外)均显著升高($P < 0.05$)。结果见图7、图8、表3。

4 讨论

胃癌的高转移性是导致患者预后不良的主要原因, 而EMT是肿瘤细胞获得迁移、侵袭能力的关键步骤。当EMT发生时, 排列规则、连接紧密的上皮细胞向形态不规则、连接松散的间充质细胞转化, 上皮细胞失去极性和黏附特性, 获得间充质细胞的迁移与侵袭能力, 主要表现为上皮细胞相关蛋白, 如E-cadherin表达下调; 而间充质细胞相关蛋白, 如N-cadherin、vimentin表达上调, 进而促进肿瘤的侵袭和迁移^[12]。本研究选用人未分化胃癌HGC-27细胞系, 该细胞具有典型的EMT特征, 且

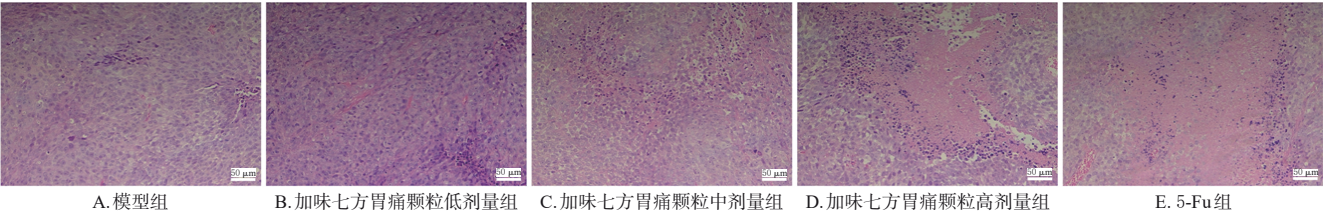


图6 各组裸鼠肿瘤组织的HE染色图

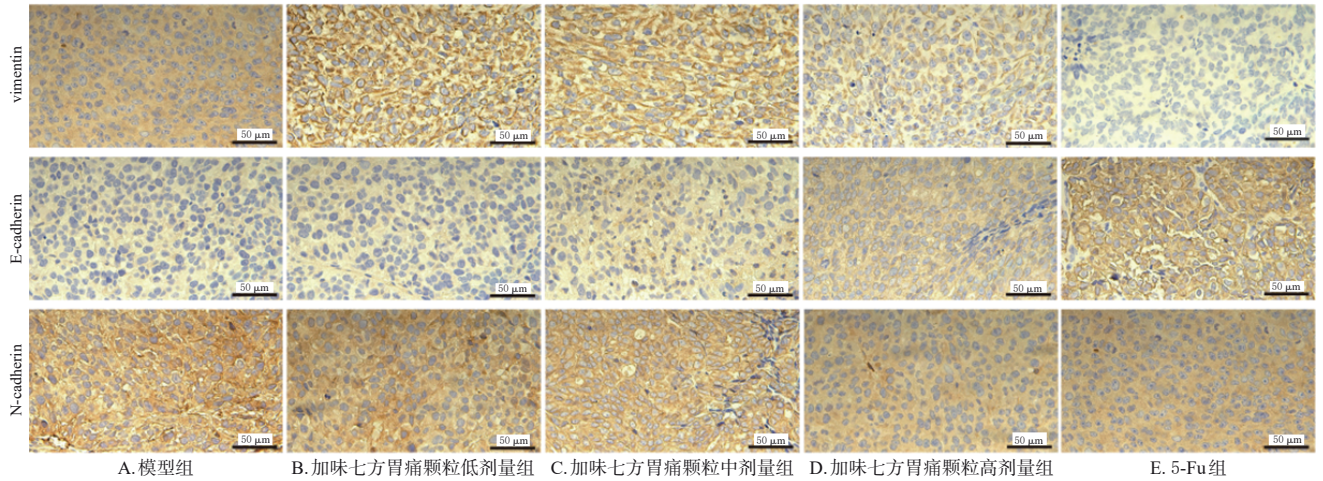
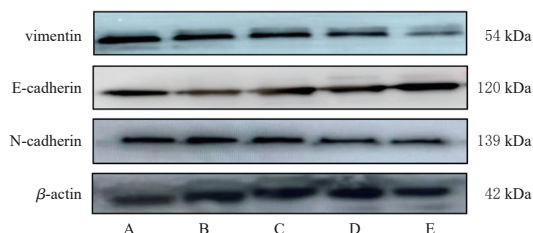


图7 各组裸鼠肿瘤组织中EMT相关蛋白表达的免疫组化图



A:模型组;B:加味七方胃痛颗粒低剂量组;C:加味七方胃痛颗粒中剂量组;D:加味七方胃痛颗粒高剂量组;E:5-Fu组。

图8 各组裸鼠肿瘤组织中EMT相关蛋白表达的电泳图

表3 各组裸鼠肿瘤组织中EMT相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	vimentin		E-cadherin		N-cadherin	
	平均光密度值	灰度值	平均光密度值	灰度值	平均光密度值	灰度值
模型组	0.43±0.02	1.15±0.11	0.24±0.01	1.06±0.14	0.45±0.05	1.15±0.10
加味七方胃痛颗粒低剂量组	0.40±0.03 ^b	0.77±0.15 ^{ab}	0.25±0.01 ^b	0.98±0.08 ^b	0.38±0.03 ^b	0.77±0.17 ^{ab}
加味七方胃痛颗粒中剂量组	0.36±0.03 ^{ab}	0.77±0.11 ^{ab}	0.27±0.00 ^b	1.39±0.06 ^b	0.36±0.02 ^{ab}	0.77±0.11 ^{ab}
加味七方胃痛颗粒高剂量组	0.25±0.02 ^a	0.71±0.06 ^{ab}	0.30±0.01 ^{ab}	1.47±0.09 ^{ab}	0.34±0.01 ^{ab}	0.64±0.01 ^{ab}
5-Fu组	0.24±0.02 ^a	0.42±0.05 ^a	0.39±0.02 ^a	1.72±0.07 ^a	0.27±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a

a:模型组相比, $P<0.05$;b:与5-Fu组相比, $P<0.05$ 。

侵袭性强,是研究胃癌转移机制的理想模型^[13]。

胃癌的病因病机主要涉及先天禀赋不足、后天饮食失宜、情志内伤等因素,导致脾胃运化失司、气机升降失常,继而形成气滞、痰凝、血瘀等病理产物蕴结于胃腑^[14]。加味七方胃痛颗粒由广西中医药大学罗伟生教授创制,该方通过调节气血阴阳平衡,重建脾胃运化功能,从而达到扶正祛邪、调和阴阳的治疗目的。相关研究发现,加味七方胃痛颗粒中白花蛇舌草中的槲皮素、莪术中的姜黄醇已被证实能有效抑制EMT进程^[15-16],由此笔者推测这些活性成分可能是加味七方胃痛颗粒抑制EMT进程的潜在物质。基于此,本研究进一步通过细胞实验和动物实验,从EMT角度出发,探究加味七方胃痛颗粒对胃癌的抑制作用及机制。本研究结果发现,加味七方胃痛颗粒能显著抑制HGC-27细胞的增殖、迁移和侵袭,并将细胞周期阻滞于G₀/G₁期;另外,其还能显著抑制裸鼠皮下移植瘤生长。在机制上,体内外实验中均观察到给药组E-cadherin表达上调,而N-cadherin和vimentin表达下调,进一步验证了加味七方胃痛颗粒可通过逆转EMT过程发挥抑制胃癌的作用。

综上所述,加味七方胃痛颗粒在体外和体内模型中均能有效抑制胃癌EMT过程,这为其抗胃癌转移作用提供了关键表型学证据。

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] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and deter-

minants[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5):584-590.

[3] 国家卫生健康委员会医政医管局,委加孚. 胃癌诊疗指南: 2022年版[J]. 中华消化外科杂志, 2022(9):1137-1164.

[4] LIU Y, WANG L Y, DU W Y, et al. Identification of high-risk factors associated with mortality at 1-, 3-, and 5-year intervals in gastric cancer patients undergoing radical surgery and immunotherapy: an 8-year multicenter retrospective analysis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1207235.

[5] BIAGIONI A, SKALAMERA I, PERI S, et al. Update on gastric cancer treatments and gene therapies[J]. Cancer Metastasis Rev, 2019, 38(3):537-548.

[6] YAO H H, ZHAO Y J, HE Y F, et al. Knockdown of AGGF1 inhibits the invasion and migration of gastric cancer via epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin pathway[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19:41.

[7] 唐梅文,邓嫦,黄勇华,等. 加味七方胃痛颗粒治疗慢性萎缩性胃炎临床疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(4):337-338.

[8] 唐梅文,黄勇华,邓嫦,等. 加味七方胃痛颗粒治疗慢性萎缩性胃炎临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(8):151-152.

[9] 王婷,梁英业,李霞,等. 加味七方胃痛颗粒通过MicroRNA let-7c促进胃癌细胞凋亡机制研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(11):2572-2580.

[10] 马永超,程琦,吴华,等. 基于Nrf2/ROS信号通路探讨岩藻多糖对食管癌细胞增殖的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(11):316-322.

[11] CHO Y H, RO E J, YOON J S, et al. 5-Fu promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated Wnt/ β -catenin pathway activation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):5321.

[12] PENG Z, WANG C X, FANG E H, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18):5403-5410.

[13] TIAN S, PENG P L, LI J, et al. SERPINH1 regulates EMT and gastric cancer metastasis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4):3574-3593.

[14] 朱超林,薛维伟,潘宇,等. 胃癌中医病名定义规范化研究探讨[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6):1489-1490.

[15] CHEN W J, TSAI J H, HSU L S, et al. Quercetin blocks the aggressive phenotype of triple-negative breast cancer by inhibiting IGF1/IGF1R-mediated EMT program[J]. J Food Drug Anal, 2021, 29(1):98-112.

[16] BIAN Y, YIN G, WANG G, et al. Degradation of HIF-1 α induced by curcumin blocks glutaminolysis and inhibits epithelial-mesenchymal transition and invasion in colorectal cancer cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 39(5):1957-1978.

(收稿日期:2025-05-13 修回日期:2025-10-05)

(编辑:唐晓莲)