

## · 基础研究 ·

藤黄茎皮中莽吉柿素对人胃癌 HGC-27 细胞的作用研究<sup>△</sup>

常安琪, 张云封, 李军, 付冬君\*, 宋月林\*

北京中医药大学 中药学院 中药现代研究中心, 北京 100020

**[摘要]** 目的: 探讨藤黄树茎皮中氧杂环酮类成分莽吉柿素对人胃癌 HGC-27 细胞的生长抑制作用及潜在的作用机制。方法: 采用噻唑蓝 (MTT) 染色实验检测莽吉柿素对 HGC-27 细胞的抑制作用。采用克隆形成实验评估莽吉柿素对 HGC-27 细胞增殖的影响。采用 Hoechst 染色实验研究莽吉柿素对 HGC-27 细胞形态变化的影响。采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测莽吉柿素给药后与凋亡过程、Neddylation 修饰途径及丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关的蛋白表达水平变化。采用裸鼠移植瘤模型进行莽吉柿素裸鼠体内抗肿瘤药效研究。结果: 莽吉柿素给药后能够抑制 HGC-27 细胞的增殖能力和细胞集落形成。与对照组比较, 莽吉柿素显著上调 HGC-27 细胞多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1) 和 Bax 蛋白表达 ( $P < 0.001$ ), 下调抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 的表达 ( $P < 0.001$ ), 发挥促进胃癌细胞凋亡的作用。莽吉柿素给药后 HGC-27 细胞中  $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白 1 (APPBP1)、泛素样修饰激活酶 3 (UBA3) 和泛素结合酶 E2M (UBC12) 蛋白及 MAPK 信号通路蛋白 c-Jun、c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 和 p38 的磷酸化水平均显著下调 ( $P < 0.001$ )。进一步的体内移植瘤动物实验结果显示, 莽吉柿素给药后裸鼠肿瘤体积缩小 18.7%, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 莽吉柿素组裸鼠体内与肿瘤细胞增殖相关的标志蛋白 Ki67 阳性细胞数明显减少, 肿瘤组织中棕色细胞数量明显增加。结论: 藤黄树茎皮中氧杂环酮类化学成分莽吉柿素在 HGC-27 细胞和裸鼠上均显示良好的抗胃癌活性, 其作用机制可能与抑制 Neddylation 修饰途径以及抑制 MAPK 信号通路相关。

**[关键词]** 藤黄茎皮; 莽吉柿素; HGC-27 细胞; 丝裂原活化蛋白激酶; Neddylation 修饰

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-1902-09

**doi:** 10.13313/j.issn.1673-4890.20210115001

**Inhibitory Effect of Gartanin from Stem Barks of *Garcinia mangostana* on HGC-27 Cell Growth**

CHANG An-qi, ZHANG Yun-feng, LI Jun, FU Dong-jun\*, SONG Yue-lin\*

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of gartanin, an oxacyclic ketone, in the stem barks of *Garcinia mangostana* on the growth of human gastric cancer HGC-27 cells and its underlying mechanism. **Methods:** MTT assay was used to detect the inhibitory effect of gartanin on HGC-27 cells. Clone formation assay was used to evaluate the effect of gartanin on the proliferation of HGC-27 cells. Hoechst staining was carried out to study the effect of gartanin on the morphological changes of HGC-27 cells. Western blot was performed to detect the changes in the expression levels of proteins related to apoptosis process, Neddylation modification pathway and mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway after gartanin treatment. In addition, the xenograft model in nude mice was used to study the anti-tumor efficacy of gartanin. **Results:** Gartanin could inhibit the proliferation and colony formation of HGC-27 cells. Compared with the conditions in the control group, gartanin significantly up-regulated poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP1) and Bax

<sup>△</sup> [基金项目] 北京中医药大学青年科学家培育计划项目 (BUCM-2019-QNKXJB006); 中国博士后科学基金面上项目 (2020M670239)

\* [通信作者] 宋月林, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药质量评价和药效物质基础; E-mail: sylvtwc2005@163.com  
付冬君, 助理研究员, 研究方向: 天然药物化学; E-mail: zzufdj@sina.com

protein expression ( $P<0.001$ ) and down-regulated anti-apoptotic protein human B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) expression ( $P<0.001$ ), which promoted the apoptosis of gastric cancer cells. The amyloid beta precursor protein binding protein 1 (APPBP1), ubiquitin-like modifier activating enzyme 3 (UBA3), and ubiquitin conjugating enzyme E2M (UBC12) proteins and phosphorylation levels of proteins related to the MAPK signaling pathway, such as c-Jun, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38, were significantly down-regulated in HGC-27 cells after gartanin treatment ( $P<0.001$ ). Further results from *in vivo* animal experiments on xenograft model showed that the tumor volume was reduced by 18.7% after gartanin treatment ( $P<0.05$ ). Compared with the results in the control group, the gartanin group showed a decreased number of Ki67-positive cells associated with tumor cell proliferation and an increased number of brown cells in tumor tissues in the nude mice. **Conclusion:** Gartanin from the stem barks of *G. mangostana* shows good activity against gastric cancer on both HGC-27 cells and nude mice, and its mechanism of action may be related to the inhibition of Neddylation and the MAPK signaling pathway.

**[Keywords]** *Garcinia mangostana* stem bark; gartanin; HGC-27 cells; MAPK; Neddylation modification

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人民的健康,2015年我国胃癌发病率和病死率分别为0.029%和0.021%,病死率较高<sup>[1-2]</sup>。近年来,许多研究发现中药具有一定的抗肿瘤作用,并且在中西医结合治疗肿瘤方面显示出增效减毒的作用<sup>[3-4]</sup>。藤黄是藤黄科藤黄属植物藤黄树的树脂,具有消肿攻毒、祛腐敛疮之功效,现代药理研究认为其具有抗肿瘤的功效<sup>[5-7]</sup>。莽吉柿素来源于藤黄树的茎皮,研究表明其具有广泛的抗肿瘤药理活性,可有效抑制膀胱癌、人胶质瘤等疾病<sup>[8-9]</sup>,并可通过抑制神经前体细胞表达的发育下调蛋白8活化酶(NAE)复合物的调节亚基活性,从而抑制相关蛋白的Neddylation修饰,发挥抑制前列腺癌细胞增殖的作用<sup>[10]</sup>。Luo等<sup>[9]</sup>发现莽吉柿素处理人胶质瘤T98G细胞后,其基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9的分泌和活性被显著抑制,推测是由于莽吉柿素对T98G细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的调控作用所致。目前,莽吉柿素对于胃癌细胞的体内、外作用效果及机制尚不完全明确,因此,本研究采用噻唑蓝(MTT)染色法、克隆形成实验、Hoechst染色实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)、裸鼠移植瘤等技术,探究莽吉柿素对人胃癌HGC-27细胞和人胃癌细胞裸鼠移植瘤生长的影响及作用机制,为莽吉柿素临床用药及莽吉柿素抗肿瘤作用机制的深入研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞与实验动物

HGC-27细胞购于中国医学科学院基础医学研究

所细胞中心;雄性BALB/c裸鼠,4~5周龄,购自北京维通利华公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。实验经北京中医药大学医学与实验动物临床委员会批准(批准编号:BUCM-4-2019120304-4109)。

### 1.2 试剂

莽吉柿素(批号:PRF10102823,纯度 $\geq 98\%$ ,成都普瑞法科技开发有限公司);5-氟尿嘧啶(5-FU,批号:B25419,纯度 $\geq 98\%$ ,上海源叶生物科技有限公司);RPMI 1640基础培养基(批号:10-040-CVR)、青霉素-链霉素混合液(批号:30-002-CI)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA,批号:25-053-CI)均购于美国Corning公司;胎牛血清(FBS,批号:04-001-1A,以色列BI公司);MTT细胞增殖和毒性检测试剂盒(批号:0793,美国Amresco公司);放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液(批号:G2002)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒(批号:G2003)、ECL发光液(批号:G2014)、肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(批号:GB12001)、Ki67抗体(批号:ZM-0166)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔抗体(批号:GB23303)、HRP标记山羊抗小鼠抗体(批号:GB23302)、原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒(批号:G1507-50T)均购于武汉Servicebio生物公司;磷酸脱氢酶(GAPDH,批号:60004-1-Ig)、 $\beta$ 淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白1(APPBP1,批号:14863-1-AP)、泛素结合酶E2M(UBC12,批号:14520-1-AP)、Bax(批号:60267-1-Ig)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2,批号:12789-1-AP)、多聚二磷酸腺苷(ADP)核糖聚合酶1(PARP1,批号:

13371-1-AP)、磷酸化的c-Jun (p-c-JUN, 批号: 28891-1-AP)、磷酸化的c-Jun氨基端激酶 (p-JNK, 批号: 80024-1-RR) 抗体均购于美国Proteintech公司; 泛素样修饰激活酶3 (UBA3, 批号: ab124728)、磷酸化的p38 (p-p38, 批号: ab195049) 抗体均购于英国Abcam公司。

### 1.3 仪器

MCO-18AIC型细胞培养箱 (日本三洋公司); DM500型倒置荧光显微镜 (德国Leica公司); EnSpire型多功能酶标仪 (美国PerkinElmer公司); 5424R型冷冻离心机 (美国Eppendorf公司); QT-1型涡旋混合器 (上海琪特分析仪器有限公司); TDL-40B型低速台式大型离心机 (上海安亭科学仪器厂); PL4002型电子天平 (瑞士Mettler-Toledo公司); TDL-40B型水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); FACSCanto II型流式细胞仪 (美国BD公司); XS-500型高压蒸汽灭菌器 (日本Tomy公司); DYY-6D型电泳仪 (北京六一仪器厂); 788BR04036型电泳槽及电转槽 (美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将HGC-27细胞在RPMI 1640完全培养基 (含10%FBS和1%双抗体) 中于37℃、饱和湿度和5%CO<sub>2</sub>下培养。

### 2.2 MTT染色实验检测细胞毒性

培养HGC-27细胞至对数生长期, 胰蛋白酶消化, 制成细胞密度为 $2 \times 10^4$ 个/mL的单细胞悬液, 以每孔100 μL接种于96孔板。培养24 h后使其完全贴壁, 将莽吉柿素母液用完全培养基稀释成终浓度为2、4、6、8、12 μmol·L<sup>-1</sup>的工作液, 每个浓度设置5个复孔, 分别培养24、48、72 h。将MTT粉末用磷酸盐缓冲液 (PBS) 制备成质量浓度为5 mg·mL<sup>-1</sup>的初始溶液, 然后用DMEM基础培养基稀释10倍, 弃去原培养基, 96孔板中每孔添加100 μL, 置于37℃培养箱培养4 h后, 弃去含MTT的基础培养基, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 溶液150 μL。将96孔板用箔纸包裹, 置于摇床上水平摇动10 min。用酶标仪在490 nm处检测吸光度 (A) 值, 并依照公式 (1) 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \quad (1)$$

### 2.3 平板克隆形成实验考察莽吉柿素对HGC-27细胞克隆形成的影响

将HGC-27细胞分为4组, 接种在6 mm培养皿中, 每个培养皿500个细胞, 细胞接种后24 h, 培养基分别替换为0、4、8、12 μmol·L<sup>-1</sup>的莽吉柿素含药培养基。药物处理后9 d后, 将培养的细胞固定、结晶紫染色、风干并拍照, 观察细胞集落数目。

### 2.4 Hoechst染色观察细胞形态

将处于对数生长期的HGC-27细胞接种于6孔板 (细胞密度为 $50 \times 10^4$ 个/孔), 培养24 h, 使其完全附着在板上。弃去培养基, 用完全培养基配制终浓度分别为0、4、8、12 μmol·L<sup>-1</sup>的莽吉柿素溶液, 加入不同孔中。37℃培养箱放置48 h后, 用PBS洗涤3次, 用4%多聚甲醛固定15 min, 并在黑暗中用Hoechst 33258染色溶液染色30 min, 将细胞置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

### 2.5 Western blot实验检测蛋白表达

将处于对数生长期的HGC-27细胞接种于6孔板 (细胞密度为 $50 \times 10^4$ 个/孔), 细胞贴壁后, 加入完全培养基配制的终浓度为0、4、8、12 μmol·L<sup>-1</sup>的莽吉柿素溶液, 培养箱中孵育48 h。弃去细胞上清液后, 用PBS洗涤3次, 然后用适量的裂解缓冲液裂解, 将其收集到1.5 mL离心管中。在99℃下加热10 min后, 通过SDS-PAGE分离蛋白质样品。然后将蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 电转完成后, 将转好的膜放入含有5%的脱脂奶粉封闭液中, 室温下封闭1.0~1.5 h, 加入相关蛋白的一抗, 4℃孵育过夜。条带用1×TBST清洗3次, 每次10 min, 之后加入对应的二抗, 室温摇床慢摇, 孵育2 h。取出PVDF膜, 条带用1×TBST清洗3次, 每次10 min。将电化学发光 (ECL) 发光液均匀地加到剪切的条带上, 室温避光反应1 min、显影、定影、扫描胶片。使用Photoshop CS6软件处理结果图, 计算蛋白的相对表达量。

### 2.6 裸鼠移植瘤实验

**2.6.1 模型制备** BALB/c裸鼠饲养在SPF级动物房内, 给予灭菌饲料和双蒸水。室温维持在23~27℃, 相对湿度维持在49%~51%, 采用12 h循环照明方式。

将密度为 $1 \times 10^7$ 个/mL的HGC-27细胞悬液在无

菌条件下注入BALB/c裸鼠右前肢的腋窝0.2 mL。整个移植瘤实验必须在30 min内完成,以确保良好的细胞活力。每天观察注射裸鼠的肿瘤状态。接种11 d后,裸鼠出现圆形或椭圆形的直径>5 mm的皮下硬结节,表明该模型制备成功。

**2.6.2 分组与给药** 裸鼠肿瘤体积达到100~200 mm<sup>3</sup>时,进行分组和给药。裸鼠分为对照组、5-FU阳性对照组和莽吉柿素组,每组各7只。莽吉柿素给药组裸鼠按55 mg·kg<sup>-1</sup>的给药剂量每天腹腔内注射莽吉柿素。对照组裸鼠每天注射相同体积的空白溶剂(含有5% DMSO和2.5%聚山梨酯-80的PBS)。参考相关文献,阳性药物组按30 mg·kg<sup>-1</sup>每2 d向裸鼠腹腔内注射5-FU溶液,连续给药24 d<sup>[11]</sup>。

**2.6.3 肿瘤抑制率计算** 给药后每天观察裸鼠的一般状态,称量裸鼠体质量,以评估莽吉柿素对裸鼠体质量的影响。用游标卡尺测量皮下移植肿瘤的最大直径(*a*)和横向直径(*b*),并详细记录。根据公式(2)~(3)计算肿瘤体积(*V*)和肿瘤抑制率(*IR*)。

$$V=ab^2/2 \quad (2)$$

$$IR=(\text{对照组平均肿瘤质量}-\text{实验组平均肿瘤质量})/\text{对照组平均肿瘤质量}\times 100\% \quad (3)$$

**2.6.4 移植肿瘤的组织学评估** 对裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏进行苏木精-伊红(HE)染色。免疫组化法检测肿瘤组织中Ki67蛋白表达情况。TUNEL染色检测细胞凋亡。

## 2.7 数据统计

实验数据运用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析,实验数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用

单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 莽吉柿素对HGC-27细胞增殖的影响

不同浓度的莽吉柿素作用不同时间对HGC-27细胞活力的影响见表1。结果表明,莽吉柿素能够显著抑制HGC-27细胞的增殖并且呈时间和浓度依赖性,其作用于HGC-27细胞24、48、72 h的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(9.74±0.97)、(6.85±0.37)、(4.79±0.07) μmol·L<sup>-1</sup>。根据莽吉柿素的IC<sub>50</sub>结果,采用4、8、12 μmol·L<sup>-1</sup>的莽吉柿素进行后续实验。

表1 不同浓度莽吉柿素作用不同时间对HGC-27细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

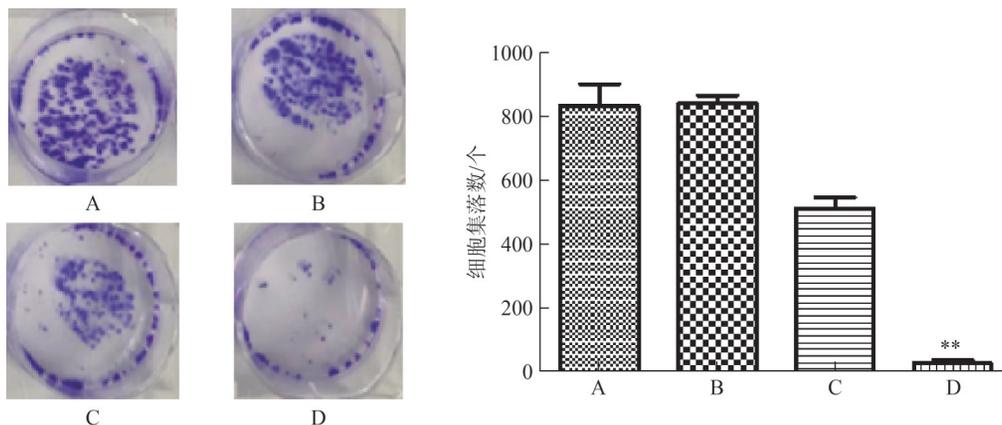
组别	浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照		100.00±6.63	100.00±1.98	100.00±5.26
莽吉柿素	2	97.29±6.17	92.51±3.79	93.91±5.74
	4	68.53±6.29	81.55±10.62	63.54±0.88
	6	61.12±4.93	49.39±2.07	27.71±2.14
	8	56.06±5.27	41.75±1.88	22.86±0.98
	12	53.71±6.60***	34.84±1.05***	19.47±0.19***

注:与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ 。

结晶紫染色结果(图1)显示,与对照组比较,莽吉柿素12 μmol·L<sup>-1</sup>给药后HGC-27细胞集落数目明显减少,莽吉柿素能够明显抑制HGC-27细胞的集落形成( $P<0.01$ )。

### 3.2 莽吉柿素对HGC-27细胞凋亡的影响

Hoechst 33258可穿透细胞膜,使细胞发出蓝色



注:A.对照组;B.莽吉柿素4 μmol·L<sup>-1</sup>组;C.莽吉柿素8 μmol·L<sup>-1</sup>组;D.莽吉柿素12 μmol·L<sup>-1</sup>组;图2~5同;与对照组比较,\*\* $P<0.01$ 。

图1 莽吉柿素对HGC-27细胞集落形成的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

荧光的低毒性DNA染料，正常细胞在染色后细胞核呈现均匀弥散的蓝色荧光，细胞发生凋亡时，细胞膜通透性发生变化，因此染色后细胞核呈现颗粒块状的亮蓝色荧光<sup>[12]</sup>。Hosechst染色结果（图2）显示，与对照组比较，莽吉柿素处理HGC-27细胞48 h后，细胞形态发生明显变化，细胞核呈现亮蓝色荧光，并具有浓度依赖性，表明莽吉柿素可促进HGC-27细胞凋亡。

如图3所示，与对照组比较，莽吉柿素处理48 h后，HGC-27细胞中凋亡标志物PARP1的剪切水平升高，细胞中的凋亡蛋白Bax的表达上调，抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平下调（ $P < 0.001$ ）。

### 3.3 莽吉柿素对HGC-27细胞中Neddylaton修饰途径的影响

Western blot结果（图4）显示，与对照组比较，莽吉柿素作用48 h后，除莽吉柿素4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

APPBP1蛋白外，各组HGC-27细胞中APPBP1、UBA3及UBC12的表达水平均下调（ $P < 0.001$ ）。

### 3.4 莽吉柿素对HGC-27中MAPK信号通路相关蛋白表达的影响

MAPK信号通路蛋白Western blot结果（图5）显示，与对照组比较，莽吉柿素作用48 h后，HGC-27细胞中JUN、JNK和p38的磷酸化水平均发生了下调（ $P < 0.001$ ）。

### 3.5 莽吉柿素对HGC-27细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用

与对照组比较，莽吉柿素给药后裸鼠的体质量没有明显改变，肿瘤体积缩小18.7%，结果见表2~3。整个实验过程未出现荷瘤鼠死亡。莽吉柿素干预前14 d，各组裸鼠肿瘤生长速度趋势一致，14 d后各组别肿瘤生长呈现出不同趋势，其中模型组瘤体体积增长速度最快，其次是5-FU

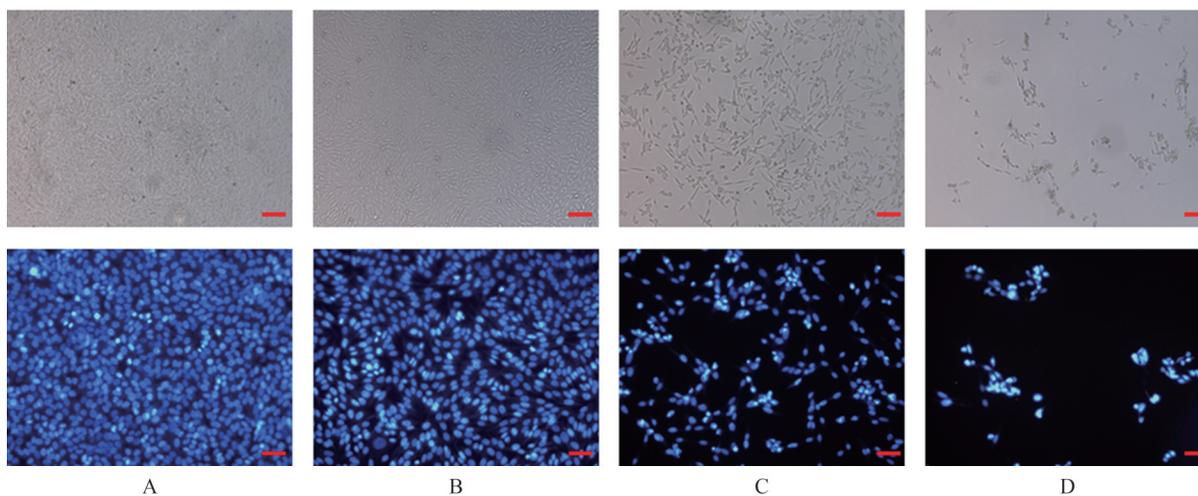
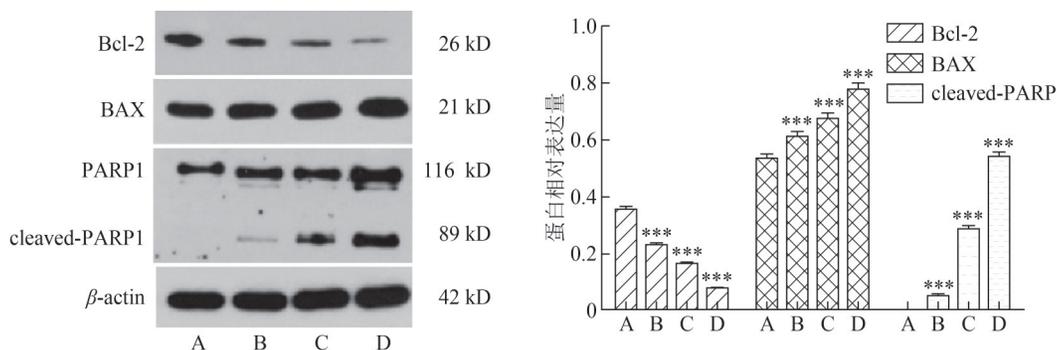


图2 莽吉柿素对HGC-27细胞形态的影响(标尺为50  $\mu\text{m}$ , 400 $\times$ )



注：与对照组比较：\*\*\* $P < 0.001$ ；图4~5同。

图3 莽吉柿素对HGC-27细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

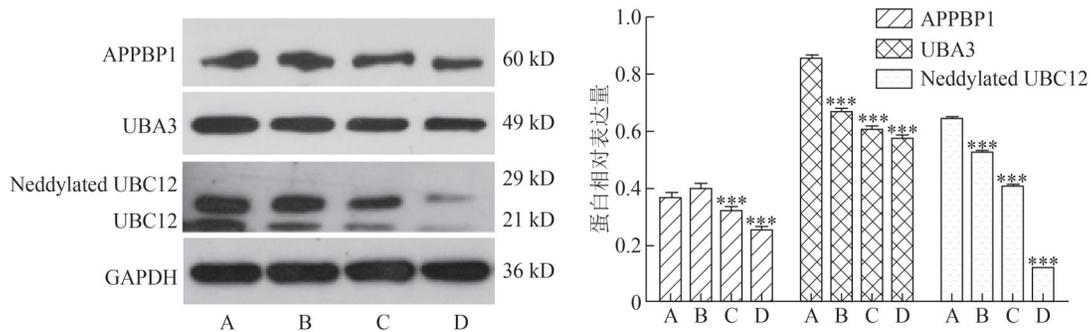


图4 莽吉柿素对HGC-27细胞Neddylated UBC12修饰途径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

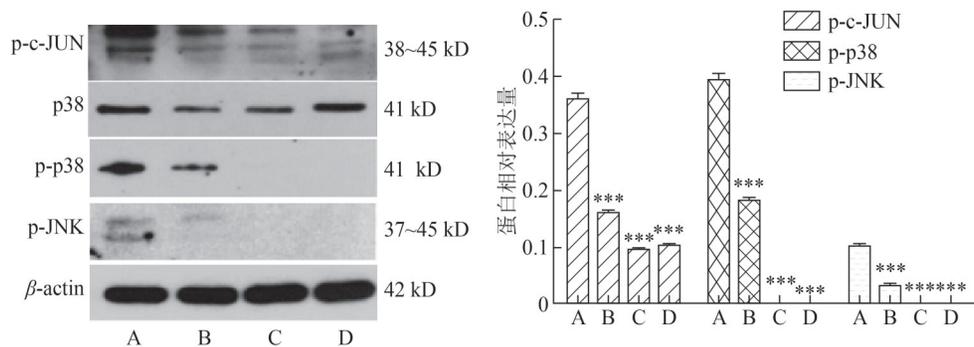


图5 莽吉柿素对HGC-27细胞中MAPK信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组，再次为莽吉柿素给药组。给药24 d后，与对照组比较，5-FU组和莽吉柿素组裸鼠的瘤体积均呈现出不同程度缩小趋势，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。并且，莽吉柿素组裸鼠的瘤体积小于5-FU组。

HE染色结果显示(图6)，与对照组比较，莽吉柿素组裸鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏的

形态特征没有明显变化。免疫组织化学染色结果显示(图7)，与对照组比较，莽吉柿素组与肿瘤细胞增殖有关的标志蛋白Ki67阳性细胞数明显减少，提示莽吉柿素可以抑制肿瘤细胞增殖。TUNEL染色结果(图7)表明，莽吉柿素组裸鼠肿瘤组织切片中的棕色细胞数量明显增加，表明莽吉柿素可以促进肿瘤细胞凋亡。

表2 HGC-27细胞移植瘤裸鼠体质量变化 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g							
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
对照		20.65±1.28	21.20±1.46	19.97±1.67	20.17±1.68	20.04±1.87	19.99±1.81	19.90±2.02	19.76±1.89
5-FU	30	20.54±1.38	20.24±1.75	20.61±1.83	20.53±1.75	20.73±1.77	20.69±1.71	20.93±1.61	20.70±1.55
莽吉柿素	55	19.51±1.20	18.85±1.33	19.13±1.343	19.23±1.22	19.16±1.21	19.17±1.23	19.13±1.14	19.07±1.17
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g							
		9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d
对照		19.73±1.97	20.23±1.74	20.96±1.36	20.61±1.78	20.66±1.67	21.20±1.60	20.83±1.52	21.14±1.18
5-FU	30	20.74±1.55	20.89±1.61	21.03±1.59	20.87±1.54	20.97±1.27	20.84±1.37	20.96±1.44	20.79±1.64
莽吉柿素	55	19.24±1.15	19.33±0.85	19.53±0.85	19.84±0.89	19.94±1.05	20.19±0.10	19.63±0.93	19.90±0.92
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g							
		17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	22 d	23 d	24 d
对照		20.99±1.39	20.60±1.49	21.00±1.67	21.21±1.59	21.56±1.75	21.80±1.75	21.96±1.62	21.99±1.71
5-FU	30	21.49±1.38	21.57±1.60	21.91±1.29	21.80±1.46	21.80±1.46	21.84±1.82	22.31±1.52	22.39±1.68
莽吉柿素	55	19.93±1.09	20.09±1.63	19.94±1.63	20.03±1.48	19.86±1.08	20.43±1.41	20.57±1.25	20.99±1.27

表3 HGC-27移植瘤裸鼠肿瘤生长情况 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿瘤体积/ $\text{mm}^3$							
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
对照		129.07±22.80	162.14±26.51	208.80±20.98	251.00±28.34	314.30±29.87	350.82±35.52	414.21±67.81	461.25±28.48
5-FU	30	132.98±18.38	165.46±37.07	239.81±17.74	244.06±36.09	317.50±14.89	375.14±38.76	488.51±25.93	439.24±89.50
莽吉柿素	55	132.65±14.14	161.89±22.93	218.03±18.84	232.51±16.66	262.81±28.27	342.45±25.39	346.14±148.41	443.40±68.02

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿瘤体积/ $\text{mm}^3$							
		9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d
对照		542.65±36.58	554.39±48.68	701.47±48.82	814.97±28.66	735.27±62.31	838.49±34.18	859.42±20.47	943.03±21.39
5-FU	30	553.68±18.12	575.66±53.15	685.46±58.68	719.13±14.94	707.88±31.00	657.95±29.30	759.81±26.18	777.88±6.82
莽吉柿素	55	458.97±25.64	503.57±60.17	621.36±57.02	654.94±31.28	718.26±6.64	748.59±29.38	742.26±19.42	762.59±17.82

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿瘤体积/ $\text{mm}^3$							
		17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	22 d	23 d	24 d
对照		962.93±15.49	983.13±9.45	1 081.83±25.08	1 175.69±10.73	1 272.87±11.03	1 361.82±7.93	1 480.84±9.07	1 547.01±139.20
5-FU	30	757.69±17.51	848.59±16.31	872.56±6.06*	881.59±11.77*	919.80±5.73**	957.32±7.21**	972.23±9.02**	1 034.84±19.24**
莽吉柿素	55	853.03±16.10	935.12±14.54	973.30±12.73*	883.64±7.62*	863.84±7.68**	919.85±9.01**	941.37±7.75**	990.99±6.01**

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

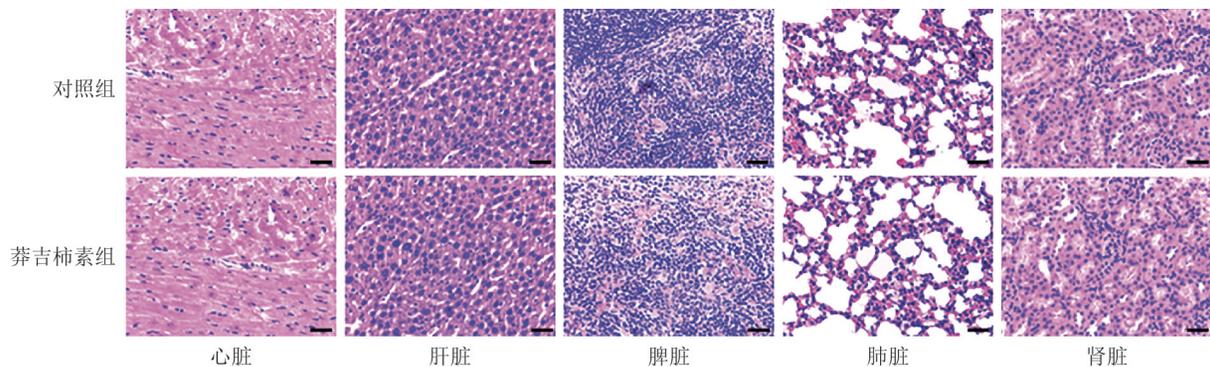


图6 莽吉柿素给药后HGC-27细胞裸鼠异种移植瘤模型各器官组织HE染色(标尺为50  $\mu\text{m}$ , 400 $\times$ )

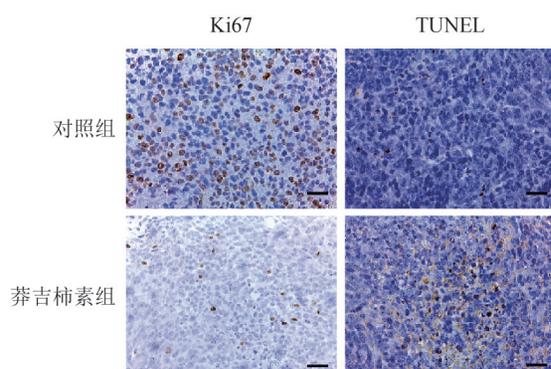


图7 莽吉柿素给药后HGC-27细胞裸鼠异种移植瘤模型的免疫组化染色分析(标尺为50  $\mu\text{m}$ , 400 $\times$ )

#### 4 讨论

研究发现抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 可以有效抑制肿瘤的生长<sup>[13-19]</sup>。莽吉柿素具有良好的抗肿瘤作用<sup>[20]</sup>, 然而其对胃癌的作用效果和相作

用机制还不是十分清楚, 有待于进一步阐明。本研究发现莽吉柿素能够明显抑制HGC-27细胞的增殖能力。

目前, 很多临床上使用的抗癌药物通过诱导细胞凋亡来引发癌细胞死亡<sup>[21-24]</sup>。PARP蛋白是存在于细胞核中用以重组与修复DNA的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶, PARP蛋白被活化的Caspase-3剪切, 是细胞发生凋亡的重要标志。本研究发现, 莽吉柿素能够上调PARP1的剪切水平和Bax蛋白表达水平, 下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平。因此推测莽吉柿素诱导HGC-27细胞凋亡可能与促进Bax表达、抑制Bcl-2表达的途径相关。

Neddylation修饰是蛋白质翻译后修饰方式之一, 不仅可以造成多种底物蛋白泛素化降解, 还可通过修饰底物蛋白, 广泛参与多种信号传导途径的调节<sup>[25-26]</sup>。Neddylation修饰与肿瘤发生发展关系密切,

广泛的参与调控肿瘤的细胞周期、凋亡、衰老、自噬、血管生成以及免疫细胞等多种过程<sup>[27]</sup>。本研究发现,莽吉柿素作用之后,HGC-27细胞中APPBP1、UBA3及UBC12的表达水平均发生了下调。因此推测,抑制人胃癌细胞HGC-27中MAPK信号通路相关蛋白的Neddylaton修饰可能是莽吉柿素抑制HGC-27细胞生长的机制之一。

MAPK信号通路在调节细胞增殖、凋亡、分化、迁移和黏附等过程中发挥了重要作用。c-Jun、JNK与p38的表达失调与肿瘤的发生发展密切相关,研究表明,c-Jun、JNK和p38抑制剂可以有效抑制肿瘤的生长<sup>[28]</sup>。田颖颖等<sup>[11]</sup>研究发现,抑制MAPK信号通路可能是槐耳清膏抑制NCI-H1299细胞生长和转移的机制。本研究发现,莽吉柿素给药能够抑制HGC-27细胞c-Jun、JNK和p38的磷酸化水平,提示在HGC-27细胞中莽吉柿素能够抑制MAPK信号通路。因此,推测MAPK信号通路的下调可能部分介导了莽吉柿素抗胃癌作用。

体内抗肿瘤研究表明,腹腔注射给药 $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的莽吉柿素后,裸鼠移植瘤的生长得到了显著抑制,而体质量、精神状态、饮食和饮水未受明显影响。肿瘤组织HE切片染色结果表明,与对照组相比,莽吉柿素对裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏等器官组织并没有表现出明显毒性。

Ki67蛋白的表达水平通常被用来评估细胞的增殖水平,Ki67蛋白含量越高表明细胞增殖活性越强<sup>[26]</sup>。免疫组化实验结果表明,在注射了莽吉柿素的裸鼠体内,Ki67蛋白的表达水平显著降低,提示莽吉柿素使HGC-27细胞的增殖活性受到抑制。

TUNEL实验通常用于分析组织或细胞的凋亡<sup>[29-30]</sup>。本研究结果显示,与对照组相比,莽吉柿素组裸鼠的肿瘤组织细胞凋亡明显增强。因此,莽吉柿素可通过阻止肿瘤细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡而明显抑制裸鼠HGC-27细胞移植瘤的生长。

综上所述,体外研究发现,莽吉柿素能够抑制HGC-27细胞增殖,诱导细胞凋亡,抑制其类泛素化修饰过程。莽吉柿素还能够抑制HGC-27细胞中MAPK信号通路。体内研究发现,莽吉柿素能够显著抑制裸鼠体内HGC-27细胞移植瘤的生长。因此,推测莽吉柿素是潜在的天然抗胃癌活性成分,具有一定的临床开发价值。

## 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: A Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [3] 陈锦萍, 林鸿悦, 曾杨, 等. 姜黄素调节 $\beta$ -catenin/TCF<sub>4</sub>通路对胃癌细胞体内外生长和转移的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 3032-3037.
- [4] 罗斯满, 杜刚, 泽郎哈姆, 等. 厚朴酚对胃癌细胞增殖及凋亡的影响及机制研究[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2019, 13(3): 259-261.
- [5] 李惠, 沈凯凯. 中药抗肿瘤联合用药研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(3): 90-94.
- [6] 段琳琳, 隋华, 朱蕾, 等. 云南藤黄提取物对人结肠癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用及其机制研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(2): 377-381.
- [7] 郁仁存. 以毒攻毒法治疗恶性肿瘤临床与实验研究的进展[J]. 北京中医, 1982, 1(2): 57-60.
- [8] LIU Z, ANTALEK M, NGUYEN L, et al. The effect of gartanin, a naturally occurring xanthone in mangosteen juice, on the mTOR pathway, autophagy, apoptosis, and the growth of human urinary bladder cancer cell lines [J]. Nutr Cancer, 2013, 65(Suppl 1): 68-77.
- [9] LUO M, LIU Q, HE M, et al. Gartanin induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses migration involving PI3K/Akt/mTOR and MAPK signalling pathway in human glioma cells [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(1): 46-57.
- [10] PHAM V, RENDON R, LE V X, et al. Gartanin is a novel NEDDylation inhibitor for induction of Skp2 degradation, FBXW2 expression, and autophagy [J]. Mol Carcinog, 2020, 59(2): 193-201.
- [11] 田颖颖, 杨爱琳, 陈孝男, 等. 槐耳清膏抑制人非小细胞肺癌NCI-H1299细胞生长和转移及其作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15): 3700-3706.
- [12] 拱欣欣, 山丹. 华蟾素诱导人胶质瘤U87细胞凋亡的作用机制研究[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(6): 653-656.
- [13] 岳重群, 杨锦, 李哲, 等. 黔产商陆醇提物对HeLa细胞增殖的影响[J]. 科学技术创新, 2020(35): 36-37.
- [14] 林霄, 孙国平, 章菊, 等. 抑制肝癌细胞内质网应激可增强槐耳清膏的抗肿瘤作用[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(12): 1822-1827.
- [15] 闫芳, 李欣, 包海鹰, 等. 蝙蝠蛾拟青霉Cs-4菌粉对H22荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 77-84.
- [16] 李莹雪, 王锐银, 包永明. 芹菜素与丹参酮II<sub>A</sub>的协同抗

- 肿瘤作用及机制[J]. 中草药,2020,51(22):5788-5797.
- [17] 田艳花,吴磊,社会枝,等. 君迁子叶杨梅苷诱导HepG2细胞凋亡及其作用机制[J]. 食品科学,2021,42(11):176-185.
- [18] 程学芳,朱冠华,熊学惠,等. 葡萄糖剥夺增强NQO1底物 $\beta$ -拉帕醌的抗肿瘤作用研究[J]. 中南药学,2020,18(11):1791-1794.
- [19] 文鹏,陈慧静,林平,等. 双硫仑的抗肿瘤作用机制[J]. 中南药学,2020,18(11):1863-1868.
- [20] LUO M, LIU Q, HE M, et al. Gartanin induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses migration involving PI3K/Akt/mTOR and MAPK signalling pathway in human glioma cells[J]. J Cell Mol Med,2017,21(1):46-57.
- [21] 王铭,司小萌,陈欢,等. 罗哌卡因对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响及作用机制[J]. 安徽医药,2020,24(12):2347-2351.
- [22] 段丽,王莉莉,冯雪,等. 靶向抑制CDK6对人卵巢癌细胞凋亡的影响[J]. 中国卫生标准管理,2020,11(21):130-132.
- [23] 胡志霞,王文元,王岩,等. 红凉伞提取物调控MNX1-AS1对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 新中医,2020,52(22):10-14.
- [24] BAILLY A, PERRIN A, MALHAB L J B, et al. The NEDD8 inhibitor MLN4924 increases the size of the nucleolus and activates p53 through the ribosomal-Mdm2 pathway[J]. Oncogene,2016,35(4):415-426.
- [25] JIANG Y, JIA L. Neddylation pathway as a novel anti-cancer target: Mechanistic investigation and therapeutic implication [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2015, 15(9):1127-1133.
- [26] ZHOU L, ZHANG W, SUN Y, et al. Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy [J]. Cell Signal,2018,44:92-102.
- [27] CICENAS J, ZALYTE E, RIMKUS A, et al. JNK, p38, ERK, and SGK1 inhibitors in cancer [J]. Cancers, 2018, doi:10.3390/cancers10010001.
- [28] CHEN Q, YANG B, NASS N, et al. Impact of eukaryotic translation initiation factors on breast cancer: Still much to investigate [J]. Cancers, 2020, 12(7):1984.
- [29] FERRARI D, DI MARIA G, FAZIO N, et al. Complete pathological response of hepatocellular carcinoma with systemic combination chemotherapy [J]. Anticancer Drugs, 2008, 19(8):837-840.
- [30] SINGH S S, MEHEDINT D C, FORD O H, et al. Comparison of ACINUS, Caspase-3, and TUNEL as apoptotic markers in determination of tumor growth rates of clinically localized prostate cancer using image analysis [J]. Prostate, 2009, 69(15):1603-1610.

(收稿日期: 2021-01-15 编辑: 田苗)