

miR - 155 介导 TGF - β /SMAD - 2 信号 参与胃癌及清热化湿方的干预研究

赵俊佳¹, 陈远能^{2*}, 张 涛², 钟 婵¹, 黄李冰雪¹, 敖先伟¹

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530000)

摘要:目的 通过构建稳定沉默 miR - 155 人胃腺癌 SGC - 7901 细胞系, 探讨 miR - 155 参与胃癌的生物学行为。观察清热化湿方对胃癌细胞的增殖、周期、侵袭和迁徙, 以及 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 的表达水平变化, 分析清热化湿方防治胃癌的机制。方法 应用基因转染技术构建稳定沉默 miR - 155 胃癌 SGC - 7901 细胞系, 观察胃癌细胞的生物学行为变化。应用血清药理学的方法制备含药血清, 分为空白对照组 (control)、阴性对照组 (sh - NC)、sh - miR - 155 组、治疗组 (低、中、高剂量) 即 sh - miR - 155 + (5%、10%、20% 含药血清), CCK8 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, Transwell 法检测细胞的迁徙和侵袭, qRT - PCR、Western - blotting 检测细胞 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 mRNA 及蛋白表达水平。结果 沉默 miR - 155 可促进胃癌 SGC - 7901 细胞增殖、迁徙和侵袭 ($P < 0.05$), 促进 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05$); 清热化湿方通过上调 miR - 155 表达, 诱导胃癌 SGC - 7901 细胞的凋亡, 抑制胃癌 SGC - 7901 细胞增殖、迁徙和侵袭 ($P < 0.05$); 并且抑制胃癌 SGC - 7901 细胞 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 稳定沉默 miR - 155 可上调 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 表达, 促进胃癌进展。清热化湿方可上调 miRNA155 的表达, 抑制 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 的表达, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖、迁徙和侵袭, 达到协同防治胃癌的效用。

关键词: 清热化湿方; microRNA155; TGF - β ; SMAD2; 胃癌

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2021.11.13

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2021)11-2613-05

Study on the involvement of TGF - β / Smad - 2 signal mediated by miR - 155 in gastric cancer and the intervention of Qingrehuashi formula

ZHAO jun-jia¹, CHEN Yuan-neng^{2*}, ZHANG Tao², ZHONG Chan¹, HUANG Li-bing-xue¹, AO Xian-wei¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of miR - 155 in the biological behavior of gastric cancer, we constructed a stable silenced human gastric adenocarcinoma SGC - 7901 cell line. To observe the proliferation, cycle, invasion and migration of gastric cancer cells as well as the changes in the expression levels of TGF - β , Smad2 and CyclinD1, and analyze the mechanism of Qingrehuashi formula in the prevention and treatment of gastric cancer. **Methods** Stably silenced miR - 155 gastric cancer cell line SGC - 7901 was constructed by gene transfection technique, and the changes of biological behavior of gastric cancer cells were observed. Serum pharmacological method was used to prepare pharmaceutical clear, which was divided into control group, negative control group (sh - NC), sh - miR - 155 group, treatment group (low, medium and high dose) namely sh - miR - 155 + (5%, 10% and 20% containing pharmaceutical clear). Cell proliferation was detected by CCK8 assay, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, and cell migration and invasion were detected by Transwell assay. MRNA and protein expression levels of TGF - β , Smad2 and CyclinD1 were detected by qRT - PCR and Western - blotting. **Results** Silencing miR - 155 promoted the proliferation, migration and invasion of SGC - 7901 cells ($P < 0.05$), and promoted the mRNA and protein expressions of TGF - β , Smad2 and CyclinD1 ($P < 0.05$). Qingrehuashi formula induced apoptosis of SGC - 7901 cells by up - regulating the expression of miR - 155, and inhibited proliferation, migration and invasion of SGC - 7901 cells ($P < 0.05$). Moreover, the mRNA and protein expressions of TGF - β , Smad2 and CyclinD1 in gastric cancer SGC - 7901 cells were inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion** Stably silencing miR - 155 can up - regulate the expressions of TGF - β , Smad2 and CyclinD1, and promote the progression of gastric cancer. Qingrehuashi formula can up - regulate the expression of miRNA155, inhibit the expression of TGF - β , Smad2 and CyclinD1, induce cell apoptosis, inhibit cell proliferation, migration and invasion, and achieve synergistic efficacy in the prevention and treatment of gastric cancer.

Key words: Qingrehuashi formula; MicroRNA155; TGF - β ; SMAD2; Gastric cancer

收稿日期: 2021-04-09; 修订日期: 2021-10-12

基金项目: 广西自然科学基金(2020GXNSFAA238030)

作者简介: 赵俊佳(1990-), 女(汉族), 四川泸州人, 广西中医药大学在读硕士研究生, 主要从事消化系统疾病诊治工作。

* 通讯作者简介: 陈远能(1964-), 男(汉族), 广西平南人, 广西中医药大学附属瑞康医院教授, 博士学位, 主要从事消化系统疾病诊治工作。

胃癌(Gastric Cancer,GC)作为最常见的恶性肿瘤之一,在全球发病率排名第五,癌症相关死亡原因排第三^[1]。手术和化疗仍是胃癌治疗的主要手段,手术复发率高,化疗耐受差,导致胃癌的总体预后差^[2]。中药已被广泛认可在肿瘤治疗中发挥减轻毒副作用,增强疗效的作用^[3]。但中药治疗肿瘤的机制,仍需不断研究。课题组前期研究证实清热化湿方通过抑制 CD14 过度活化调节下游炎症因子的表达从而发挥防治胃癌的效用^[4-6]。并通过收集 12 例手术后胃癌病理标本,采用基因芯片分析证实 miR-155 在胃癌组织中明显下调,通过生物信息学分析发现 miR155 负性调控胃癌,尤其在调控 TGF-β 信号通路中的作用^[7]。因此,本研究拟通过基因转染及离体细胞培养实验,深入探讨清热化湿方多靶点防治胃癌的机制,旨在进一步为清热化湿方治疗胃癌提供依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞株及试剂 人胃癌细胞系 SGC-7901 慢病毒包装专用 293T 细胞株由中国科学院上海生命科学研究院提供。干扰慢病毒载体和慢病毒空载体来源于上海吉凯基因技术有限公司。

1.2 试剂和仪器 DMSO 购置于 Invitrogen 公司,D-Hank's 溶液、Trypsin-EDTA 溶液由上海吉凯基因技术有限公司提供, RNAi-Mate 由上海吉凯基因技术有限公司提供,慢病毒包装质粒(PGag/Pol,PRev,PVSV-G)、慢病毒载体质粒(PCDNA3.1)购置于上海吉凯基因技术有限公司;CCK8 试剂盒购置于日本同仁公司;细胞周期检测试剂盒购置于 Keygen 公司;Anti-CyclinD1 抗体(ab40754,Abcam 公司)1:2000;Anti-SMAD2 抗体(ab33875,Abcam 公司)1:1000;Anti-GAPDH 抗体(ab9482,Abcam 公司)1:5000。EcliPse TE-2000U 倒置显微镜购自 Nikon 公司,离心机购自卢湘仪公司,荧光 PCR 仪购自 ABI 公司,流式细胞仪购自 BD 公司。

1.3 实验药物 清热化湿方购置于广西中医药大学附属瑞康医院,组成成分:藿香 6 g,川厚朴 3 g,姜半夏 4.5 g,淡豆豉 9 g,泽泻 4.5 g,黄连 12 g,栀子 12 g,赤茯苓 9 g,杏仁 9 g,生薏苡仁 12 g,白豆蔻 1.8 g,猪茯苓 4.5 g。用蒸馏水煎成清热化湿方药液,浓缩配制成 1g 原生药/1ml 的药液,过滤分装于 4℃ 冰箱保存。

2 方法

2.1 含药血清制备 采用血清药理学的方法制备含药血清。具体操作:选择 SPF 级雄性 SD 大鼠,给予清热化湿方水提液灌胃,参照公式=临床常用量×动物等剂量系数×培养液内稀释度(动物等效剂量×培养基内稀释浓度)。置-20℃ 保存备用。

2.2 细胞转染 课题组前期实验已证实 miR-155 在胃癌 SGC-7901 细胞表达最高,并通过慢病毒构建,成功构建稳定沉默 miR-155 胃癌 SGC-7901 细胞系模型。具体方法:应用 Tu D RNA (Tough Decoy RNA) 的设计方法构建 miRNA 的抑制慢病毒载体,将 LiPofectamineTM2000 转染 293T 细胞包装编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及其三种辅助包装原件载体质粒(P Gag/Pol,P Rev,P VSV-G),在荧光显微镜下观察,计算病毒滴度 MOI 值,判断慢病毒载体是否成功转染 293T 细胞;然后用慢病毒成功感染的胃癌 SGC-7901 细胞用于实验,采用 RT-PCR 验证 miRNA155 的表达。

2.3 细胞培养及分组 将成功构建的稳定沉默 miR-155 胃癌 SGC-7901 细胞系为实验对象。分为空白对照组(control)、阴性对照组(sh-NC)、sh-miR-155 组、治疗组(低剂量组、中剂量组、高剂量组)即 sh-miR-155+(5%、10%、20% 含药血清)。空白对照组为未作感染处理的 SGC-7901 细胞,阴性对照组为空白转染的 SGC-7901 细胞,除空白对照组及阴性对照组外,其余

各组均转染稳定沉默 miR-155 慢病毒载体。治疗组(低剂量组、中剂量组、高剂量组)分别加用 5%、10%、20% 浓度的清热化湿方含药血清。所有细胞均在 RPMI-1640 培养基,37℃,5% CO₂ 下常规培养细胞。sh-miR-155 转染序列:5'-GGAAAG-GACGAAACACCGGGGTGTGACTTCATCATTC-3';3'-TGCTCGAGGTGCGAGAATTAATAAAGAGAAGACTTGGTGC-5'。

2.4 指标检测

2.4.1 CCK-8 法检测细胞的增殖 分别收集各组细胞铺在 96 孔板的每个孔中,在指定的时间,将 10μL CCK-8 试剂直接添加到培养基中,而后,将细胞在 37℃ 下孵育 2h,并使用酶标仪测量在 450 nm 处的吸光度。

2.4.2 流式细胞仪检测细胞的周期和凋亡 分别收集各组细胞,用乙醇进行细胞固定,加入溴化丙锭、100μg/mL RNase A,0.2% Triton X-100,4℃ 避光孵育 30 min,进行细胞染色。以流式细胞仪标准程序检测,计数细胞,检测细胞凋亡情况,并用 Mod Fit 分析细胞周期结果。

2.4.3 Transwell 法检测细胞的迁徙和侵袭 分别收集各组细胞,无血清培养基重悬至密度为 1×10⁵/mL,Transwell 小室上室加入 200μL 细胞悬液,下室加入 600μL 的完全培养液,于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养 48h。取出小室,晾干,用结晶紫溶液染色,于倒置显微镜下观察并拍照,随机选取 5 个视野计数,每个样本均设置 3 个复孔,实验结果取均值。

2.4.4 qRT-PCR 检测细胞的 TGF-β、SMAD2、CyclinD1 mRNA 表达变化 分别收集各组细胞,待细胞生长进入对数期时,分别取 1×10⁶ 个细胞放入 1mL Trizol 的匀浆管中,严格按照说明书的操作流程,以 Trizol 法提取细胞总 RNA;取适量将其反转录成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 反应,检测 miRNA-155、TGF-β、SMAD2、CyclinD1 在各组胃癌细胞中的表达。U6 作为对照。每个样品重复 3 次,2^{-ΔΔCT} 法计算相对 mRNA 表达量,qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 反应引物

序列名称	引物序列
miR-155 RT Primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGCACTGGATACGAC ACCCCCT-3'
miR-155 forward Primer	5'-GGATTAATGCTAATCGTGAT-3'
miR-155 reverse Primer	5'-GTGCAGGCTCCGAGGT-3'
U6 RT Primer	5'-AACGCTTCACGAATTCGCGT-3'
U6 forward Primer	5'-CTCCGCTTCGGCAGCAC-3'
U6 reverse Primer	5'-AACGCTTCACGAATTCGCGT-3'
TGF-β1 forward Primer	5'-TGGACATCAACGGCTTCACT-3'
TGF-β1 reverse Primer	5'-GAAGCTGGCATGCTAGCCCT-3'
cyclin D1 forward Primer	5'-GATGCCAACCTCCTCAACGA-3'
cyclin D1 reverse Primer	5'-GGAAGCGGTCCAGGTAAGTTC-3'
SMAD2 forward Primer	5'-AGGCTTCACAGCAACTATC-3'
SMAD2 reverse Primer	5'-GCCATCTACAGTGAGTGAGG-3'

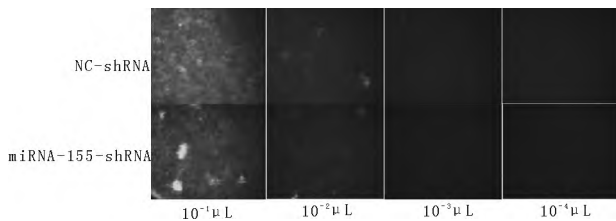
2.4.5 Western-blotting 检测细胞 TGF-β、SMAD2、CyclinD1 蛋白变化 分别培养各组细胞,待细胞生长进入对数期时,胰酶消化后收集细胞,加入 RIPA 裂解液抽提总蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,以等量的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,经“转膜→封闭→一抗孵育→二抗孵育”过程,一抗抗体:Anti-TGF-β1(ab27969,Abcam)1:2000;Anti-CyclinD1(ab40754,Abcam)1:2000;Anti-SMAD2(ab33875,Abcam)1:1000;Anti-GAPDH(ab9482,Abcam)1:5000。ECL 显影,使用化学发光仪扫描拍照,以 GAPDH 为内参。

2.5 统计学方法 数据结果采用 SPSS 26.0 软件包进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,进行多样本均数间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时,采用 LSD 法,方差不齐时,采用 Games-Howell 法;多因素比较采用析因分析。P<0.05 表

示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 成功构建稳定沉默慢病毒 SGC-7901 细胞株 荧光显微镜下显示, 荧光细胞数清晰可见, 病毒滴度为 1×10^8 TU/mL, MOI 值 = 80, 即转染效率峰值, 标志着慢病毒载体成功转染 293T 细胞 (见图 1)。将转染的慢病毒细胞用 PCR 验证显示: 与阴性对照组比较, sh-miR155 组细胞的 miRNA155 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。说明 miRNA-155-shRNA 慢病毒载体成功感染 SGC-7901 细胞后有效沉默了 miRNA-155 表达。



滴度 (TU/ml) = 细胞数 × 荧光百分比 × 10^3 / 病毒原液体积 (μl)

图 1 转染 293T 细胞的慢病毒荧光表达 (200 ×)

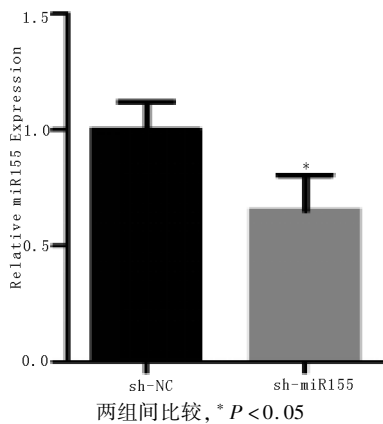
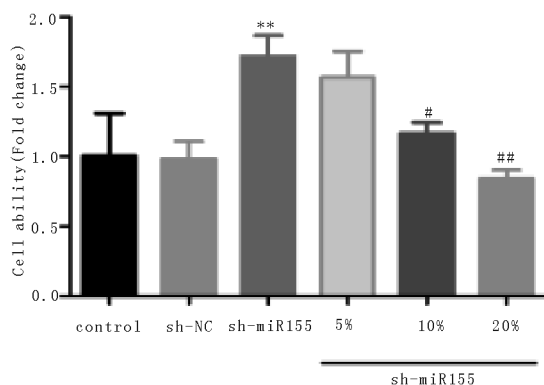


图 2 成功转染慢病毒细胞

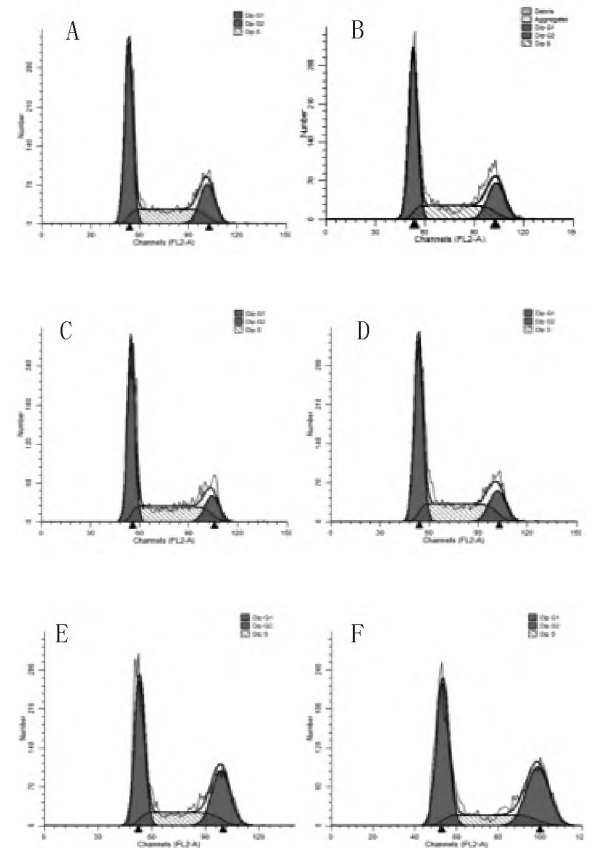
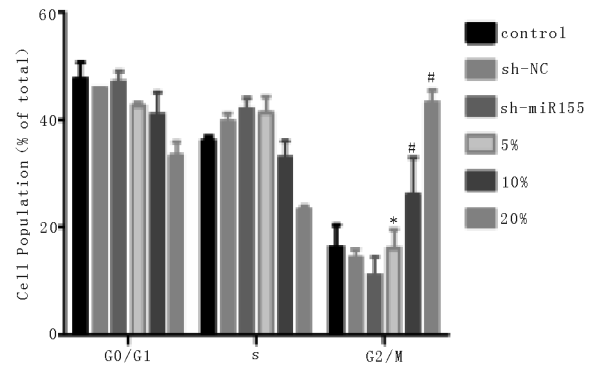
3.2 清热化湿方对细胞增殖的影响 如图 3 所示, 与空白对照组相比, sh-miR155 组的 SGC-7901 细胞活力明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 sh-miR155 组比较, 治疗组中的中剂量及高剂量组 SGC-7901 细胞活力明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明清热化湿方抑制人胃腺癌 SGC-7901 细胞的增殖。



与 control 组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与 sh-miR155 组比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

图 3 清热化湿方对细胞增殖的影响

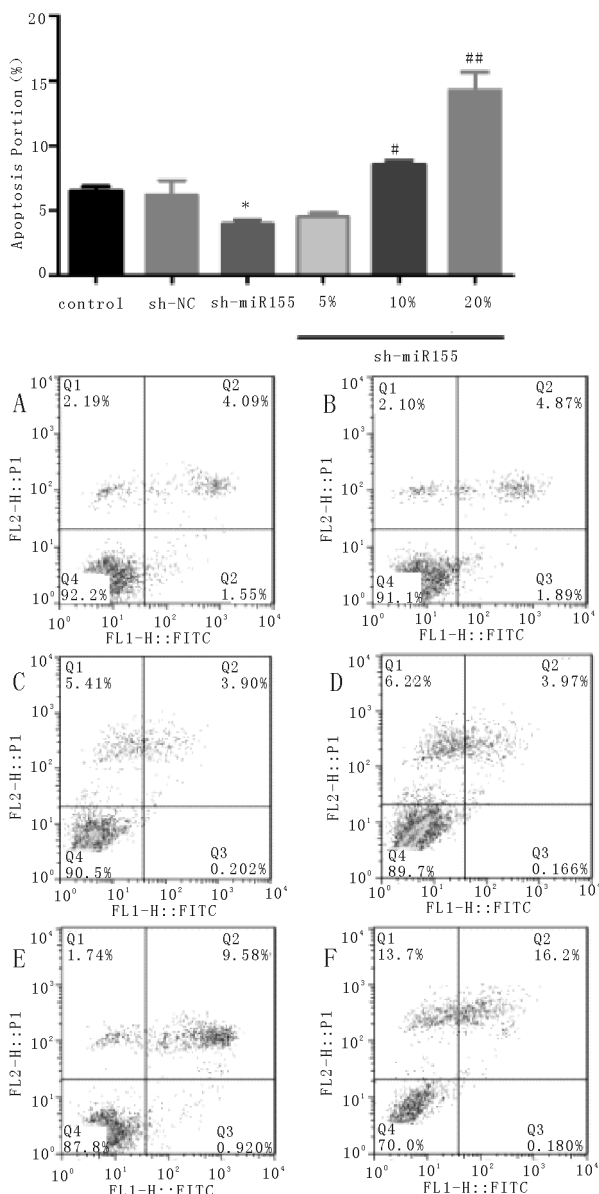
3.3 清热化湿方对各组细胞周期的影响 如图 4 所示, 与对照组相比, sh-miR155 组在 G_2/M 期细胞比例明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 sh-miR155 组比较, 治疗组中剂量组及高剂量组在 G_2/M 期细胞比例明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明清热化湿方主要作用于 SGC-7901 细胞周期的 G_2/M 期。



A、B、C、D、E、F 分别为 control 组、sh-NC 组、sh-miR155 组、sh-miR155 + 5% 组、sh-miR155 + 10% 组、sh-miR155 + 20% 组。
与 control 组比, * $P < 0.05$; 与 sh-miR155 组比, # $P < 0.05$

图 4 清热化湿方对细胞周期的影响

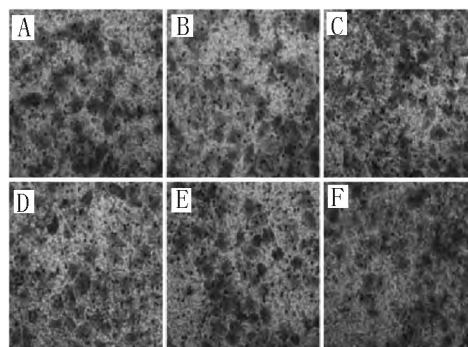
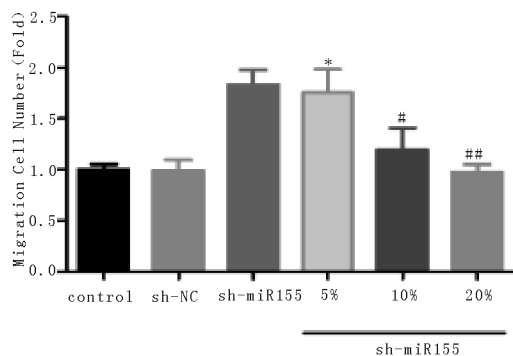
3.4 清热化湿方对各组细胞凋亡的影响 如图 5 所示, 与空白对照组相比, sh-miR155 组的细胞凋亡率减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 sh-miR155 组比较, 治疗组中剂量及高剂量组细胞凋亡率明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明清热化湿方促进人胃腺癌 SGC-7901 细胞的凋亡。



A、B、C、D、E、F 分别为 control 组、sh - NC 组、sh - miR155 组、sh - miR155 + 5% 组、sh - miR155 + 10% 组、sh - miR155 + 20% 组。与 control 组比, * $P < 0.05$; 与 sh - miR - 155 组比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

图 5 清热化湿方对细胞凋亡的影响

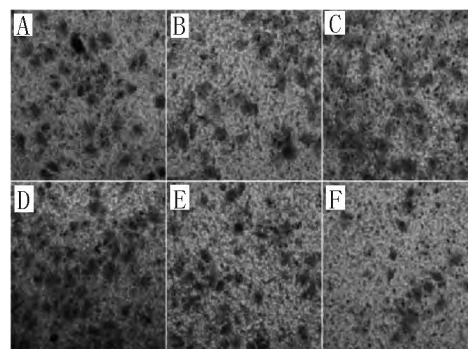
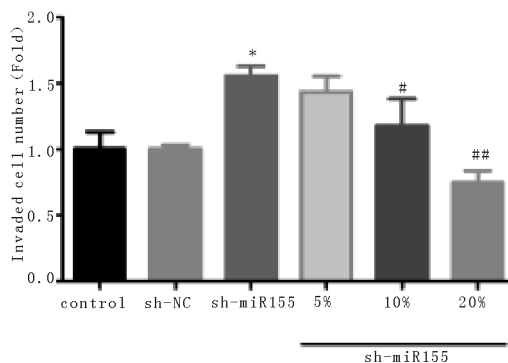
3.5 清热化湿方对各组细胞迁徙的影响 如图 6 所示,与对照组相比,sh - miR155 组细胞迁徙数增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 sh - miR155 组相比,治疗组中剂量及高剂量治疗组细胞迁徙数下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明清热化湿方可抑制胃癌细胞的迁徙。



A、B、C、D、E、F 分别为 control 组、sh - NC 组、sh - miR155 组、sh - miR155 + 5% 组、sh - miR155 + 10% 组、sh - miR155 + 20% 组。与 control 组比, * $P < 0.05$; 与 sh - miR155 组比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

图 6 清热化湿方对细胞迁徙的影响

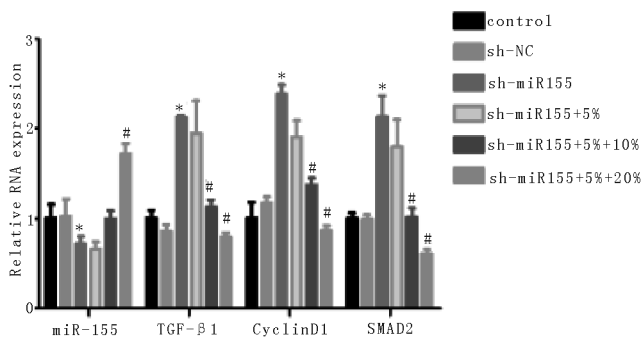
3.6 清热化湿方对各组细胞侵袭的影响 如图 7 所示,与对照组相比,sh - miR155 组细胞侵袭数增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 sh - miR155 组相比,清热化湿方中剂量及高剂量治疗组细胞侵袭数量明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明清热化湿方可抑制胃癌细胞的侵袭。



A、B、C、D、E、F 分别为 control 组、sh - NC 组、sh - miR155 组、sh - miR155 + 5% 组、sh - miR155 + 10% 组、sh - miR155 + 20% 组。与 control 组比, * $P < 0.05$; 与 sh - miR155 组比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

图 7 清热化湿方对细胞侵袭的影响

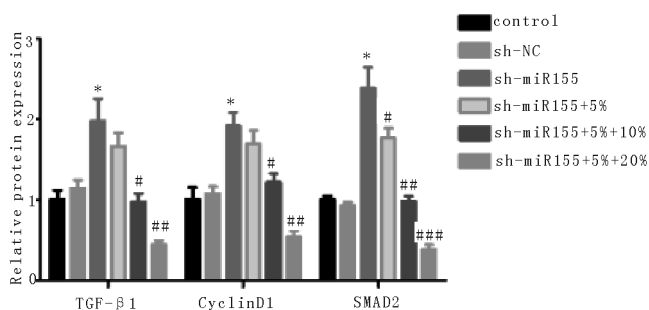
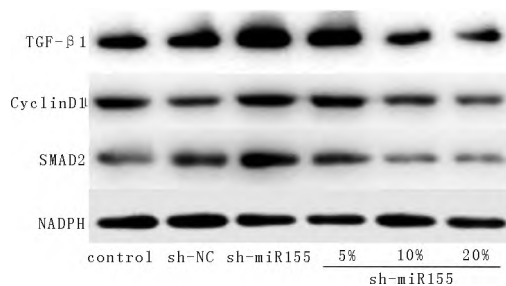
3.7 qRT - PCR 检测清热化湿方对各组细胞 TGF - β 、SMAD2、CyclinD1 mRNA 表达水平的影响 如图 8 所示,与 sh - miR155 组比较,清热化湿方治疗组的 miRNA155 表达增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,sh - miR155 组的 TGF - β 1、SMAD2、CyclinD1 mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 sh - miR155 组比较,清热化湿方组 TGF - β 1、SMAD2、CyclinD1mRNA 表达明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



与 control 组比, * $P < 0.05$; 与 sh-miR-155 组比, # $P < 0.05$

图 8 RT-PCR 检测各组细胞的 TGF- β 、SMAD2、CyclinD1 mRNA 表达

3.8 Western-blot 检测清热化湿方对各组细胞 TGF- β /SMAD2 蛋白表达水平的影响 与对照组相比, sh-miR155 组的 TGF- β 1、SMAD2、CyclinD1 蛋白表达明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 sh-miR155 组比较, 清热化湿方低、中、高剂量治疗组的 TGF- β 1、SMAD2、CyclinD1 蛋白表达明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 9。



与 control 组比, * $P < 0.05$;

与 sh-miR-155 组比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$

图 9 WB 检测各组细胞的 TGF- β 、SMAD2、CyclinD1 蛋白表达

4 讨论

祖国医学认为, 胃癌的治疗以健脾为基础, 辅之以理气、化痰、解毒、消痰等法。课题组选用清热化湿方为经典方“藿朴夏苓汤”加黄连、栀子化裁而成。诸药合用, 共奏宣通气机、燥湿利水、清热解暑之效, 从而促进术后恢复、减少毒副反应、防止转移复发, 提高患者生活质量^[8]。本研究采用基因转染及血清药理学方法, 探讨不同浓度含药血清防治胃癌的效用机制, 结果表明, 清热化湿方可以调控 miRNA155 的表达, 导致 TGF- β 、SMADs、CyclinD1 变化, 抑制 SGC-7901 细胞周期 G₂/M 期, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖、侵袭和迁徙, 阐释了清热化湿方防治胃癌的效用机制。

MicroRNA 是一种短的非编码 RNA, 长度由 18~25 个核苷酸组成, 可抑制靶基因的表达, 是许多生物过程中关键调节因子^[9,10]。microRNA 被证实是胃癌诊断和预后的潜在重要生物

标志物^[11]。MicroRNA-155 涉及细胞分裂和免疫调节的多种途径的调节, 在多种癌症中异常表达, 常被作为是治疗的关键^[12,13]。研究者发现 miR-155-5P 抑制通过 NF- κ B P65 激活促进胃黏膜上皮间质转化, 促进胃癌的发生^[14,15]。后来的研究者证实 MicroRNA-155 表达与胃癌的病理阶段呈负相关, 且通过靶向细胞周期蛋白 D1 抑制胃癌细胞的生长^[16]。细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 在调节许多细胞生物活动中至关重要。正常情况下, CyclinD1 在 G₀ 相中合成, G₁ 期达到最高水平, 在 S 期降低, 在细胞周期的其他阶段均处于较低水平。CyclinD1 的过度表达可能导致 G₁/S 期延长, 细胞周期异常调节, 细胞快速增殖, 最终导致肿瘤的形成^[17]。Ru 等研究者证实 CyclinD1 的表达在转移性疾病的肿瘤分化程度及侵袭性相关, 可能是潜在的预后因素^[18]。近来的研究者通过收集胃贲门腺癌组织, 发现 CyclinD1 表达越高, 癌细胞的转移和侵袭能力越强^[19]。本研究证实, 清热化湿方通过上调 miRNA155 的表达, 抑制胃癌细胞 CyclinD1 的表达, 阻滞细胞周期 G₂/M 期, 诱导细胞凋亡。转化生长因子- β (TGF- β) 是一种涉及许多生物学过程的细胞因子, 具有促进肿瘤或抑制肿瘤的能力^[20]。TGF- β 被证实参与肿瘤、纤维化疾病、免疫功能障碍和各种先天性疾病的发生^[21]。TGF- β 通过 TGF- β 与 TGF- β 受体 II 的结合而启动, 激活 Smad2/3 磷酸化并形成 Smad2/3/4 复合物^[22], 然后与转录调节因子相互作用来控制靶基因的活性, 从而对细胞生物学产生广泛的影响^[23]。本研究证实清热化湿方通过上调 miRNA155 的表达, 抑制 TGF- β /SMAD2 信号的表达, 诱导胃癌细胞凋亡, 抑制细胞增殖、侵袭和迁徙, 表明清热化湿方治疗胃癌的机制。

本研究结果显示, 沉默 miR-155 促进胃癌细胞增殖和侵袭, 这与课题组前期的研究结果一致^[7]。清热化湿方通过上调 miRNA155, 抑制 TGF- β 、SMADs、CyclinD1 的表达, 阻滞 G₂/M 期, 诱导胃癌细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 迁徙和侵袭, 从而阐释清热化湿方防治胃癌的效用, 为中药治疗胃癌的效用机制提供理论基础, 也能为未来的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The Global Burden of Cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4):505.
- [2] Van Cutsem E, Sagaert X, ToPal B, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10060):2654.
- [3] Huang Y, Cai T, Xia X, et al. Research Advances in the Intervention of Inflammation and Cancer by Active Ingredients of Traditional Chinese Medicine[J]. J Pharm Pharm Sci, 2016, 19(1):114.
- [4] 张涛, 黄会云, 陈思羽, 等. 稳定沉默 CD14 胃癌 SGC-7901 细胞系变化及清热化湿类方药干预研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3):762.
- [5] 黄李冰雪, 张涛, 钟婵, 等. 清热化湿方对 MNU 联合幽门螺杆菌感染相关胃癌细胞中 CD14、NF- κ B 及 IL-6 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5):1053.
- [6] 钟婵, 张涛, 陈远能, 等. 清热化湿方对 MNU 联合幽门螺杆菌感染小鼠胃组织中 TNF- α 、IL-8 及 TLR-4 水平的影响[J]. 中成药, 2020, 42(5):1339.
- [7] Zhang T, Liu C, Huang S, et al. A Downmodulated MicroRNA Profiling in Patients with Gastric Cancer[J]. Gastroenterol Res Pract, 2017, 2017:1526981.
- [8] 张保静, 陈远能, 张涛. 基于 CD14、IL-1 β 表达及 SGC-7901 细胞凋亡变化探讨清热化湿方防治胃癌的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20):246.
- [9] Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment[J]. Nature, 2015, 518

- (7537);107.
- [10] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006,6(11):857.
- [11] Ahadi A. A systematic review of microRNAs as potential biomarkers for diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. Immunogenetics, 2021, 73(2):155.
- [12] Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, et al. Nanoparticle - based therapy in an in vivo microRNA - 155 (miR - 155) - dependent mouse model of lymphoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(26):E1695.
- [13] KohlhaPP FJ, Mitra AK, Lengyel E, et al. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment[J]. Oncogene, 2015, 34(48):5857.
- [14] Zhu M, Wang M, Yang F, et al. miR - 155 - 5P inhibition promotes the transition of bone marrow mesenchymal stem cells to gastric cancer tissue derived MSC - like cells via NF - κ B P65 activation. Oncotarget, 2016, 7(13):16567.
- [15] Wang M, Yang F, Qiu R, et al. The role of mmu - miR - 155 - 5P - NF - κ B signaling in the education of bone marrow - derived mesenchymal stem cells by gastric cancer cells[J]. Cancer Med, 2018, 7(3):856.
- [16] Ma Z, Ma Y, Xia Q, et al. MicroRNA - 155 expression inversely correlates with pathologic stage of gastric cancer and it inhibits gastric cancer cell growth by targeting cyclin D1[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(6):1201.
- [17] Dreyer JH, Hauck F, Barros MHM, et al. PRb and CyclinD1 Complement P16 as Immunohistochemical Surrogate Markers of HPV Infection in Head and Neck Cancer[J]. APPI Immunohistochem Mol Morphol, 2017, 25(5):366.
- [18] Lee HJ, Lee WK, Kang CW, et al. A selective cyclin - dependent kinase 4, 6 dual inhibitor, Ribociclib (LEE011) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in aggressive thyroid cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 417:131.
- [19] Ru Y, Chen XJ, Zhao ZW, et al. CyclinD1 and P57kiP2 as biomarkers in differentiation, metastasis and Prognosis of gastric cardia adenocarcinoma[J]. Oncotarget. 2017, 8(43):73860.
- [20] de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor - beta signaling in cancer[J]. J Natl Cancer Inst. 2000, 92(17):1388.
- [21] David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018, 19(7):419.
- [22] Cohen MM Jr. TGF beta/Smad signaling system and its Pathologic correlates[J]. Am J Med Genet A. 2003, 116A(1):1.
- [23] Bertero A, Brown S, Madrigal P, et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in PluriPotency[J]. Nature. 2018, 555(7695):256.

解毒活血方通过调控 CD40L - NF - κ B 信号通路对 ApoE^{-/-} 小鼠斑块稳定性的影响

张 洁¹, 尹丽梅¹, 袁 建¹, 陈 楷¹, 张海泉¹, 刘小聪¹, 刘林坤¹, 邹国辉^{2*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 本研究拟从抑制易损斑块炎症反应入手,以 CD40L/NF - κ B 信号通路为切入点,观察解毒活血方对 ApoE^{-/-} 小鼠易损斑块炎症反应的影响,为探讨 ACS 的发病机制提供新的思路和治疗方向。方法 高脂饲料喂养 ApoE^{-/-} 小鼠建立动脉粥样硬化模型,给予解毒活血方进行干预。给药结束后采集血液标本,分别测血清血脂、炎症指标 IL - 1 β 、ICAM - 1 水平;显微镜下解剖分离出心脏及主动脉组织,全长主动脉用油红染色后,运用 ImageJ 图像分析系统计算血管内斑块面积与全长主动脉面积的占比;利用免疫组织化学技术检测主动脉根部中 CD40L、NF - κ B 蛋白的表达水平。结果 与模型组相比,中、高剂量中药组具有显著降脂效果($P < 0.05$);与模型组相比,中、高剂量组的 ICAM - 1 水平显著下降($P < 0.05$),各中药组的 IL - 1 β 水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比,各中药组斑块面积占比减小($P < 0.05$)。与模型组相比,中、高剂量组 CD40L 蛋白表达下降明显($P < 0.05$)。低、中、高剂量组 NF - κ B 蛋白表达明显下降($P < 0.05$)。结论 解毒活血方可以降低 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平,拮抗 CD40L/NF - κ B 信号通路的激活与传导,抑制 ICAM - 1、IL - 1 β 等下游炎症因子的释放,减轻炎症反应,从而达到稳定斑块的目的。

关键词:解毒活血方; 动脉粥样硬化; CD40L/NF - κ B

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2021.11.14

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2021)11-2618-05

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病中最普遍的

病变基础,随着病情进展,其表现的临床症状及最终导致的疾病也不一样,主要包括缺血性心脏病、缺血性中风及外周动脉疾病^[1]。AS 病变的主要特征是脂质沉积在动脉内壁,并伴有平滑肌细胞和纤维基质增生,逐渐发展成动脉粥样硬化斑块的形成。AS 病变本身是一个良性病变,斑块并不可怕,但是斑块形成的位置和斑块的最终结果对病情发展很关键,危急病证主要在于不稳定的 AS 斑块破裂,血小板聚集和血栓形成引起的狭窄或闭塞血管导致急性心血管疾病,临床上把这些病情危急的病变统称为动脉粥样硬化性心血管疾病(arteriosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)^[2]。目前药物治疗主要以他汀类药物稳斑调脂,氯吡格

收稿日期:2021-03-25; 修订日期:2021-10-20

基金项目:国家自然科学基金(81760811;81960854);

江西省自然科学基金面上项目(20192BAB205099;S2019ZRM1923);

江西省卫生健康委基金项目(2018A385,20204420)

作者简介:张 洁(1994-),女(汉族),江西九江人,江西中医药大学硕士研究生,硕士学位,主要从事心血管内科研究工作。

* 通讯作者简介:邹国辉(1977-),男(汉族),河南罗山人,江西中医药大学附属医院主任医师,博士研究生导师,博士学位,主要从事心血管疾病的中西医结合治疗研究工作。