

复方蜥蜴散诱导细胞凋亡及自噬性死亡逆转胃癌顺铂耐药的机制研究[△]

刘彩月^{1*},李 锋¹,李卫强^{1,2#}(1.宁夏医科大学中医学院,银川 750004;2.宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室,银川 750004)

中图分类号 R285;R965

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)23-2924-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.23.07



摘要 目的 研究复方蜥蜴散通过核因子κB(NF-κB)/SNAIL信号通路逆转顺铂(DDP)耐药性胃癌细胞MKN45/DDP的耐药机制。方法 将MKN45/DDP细胞分为模型组(20%正常大鼠血清)、DDP组(1.3 μg/mL DDP+20%胎牛血清)及复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组(17.2、68.8 g/kg 复方蜥蜴散的20%含药血清+1.3 μg/mL DDP)。测定MKN45/DDP细胞的生存活力、凋亡水平、自噬水平,检测细胞上清中微管相关蛋白1轻链3(LC3)含量,检测细胞中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平以及磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)、SNAIL的蛋白表达水平;利用NF-κB通路激动剂肿瘤坏死因子α(TNF-α)进一步明确复方蜥蜴散改善DDP耐药性的分子机制。结果 与模型组及DDP组比较,复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞存活率均显著降低($P<0.05$),凋亡及自噬水平均显著升高($P<0.05$);细胞中Bcl-2(复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组除外)、p-NF-κB p65、SNAIL蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),LC3含量和Bax蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP可有效逆转TNF-α诱导的耐药细胞中LC3 II/LC3 I比值下降及Bax蛋白表达下调($P<0.05$)。结论 复方蜥蜴散含药血清联合DDP可通过抑制NF-κB/SNAIL信号通路,诱导MKN45/DDP细胞凋亡及自噬性死亡,从而逆转该细胞的DDP耐药性。

关键词 复方蜥蜴散;MKN45/DDP细胞;顺铂;耐药性;自噬;凋亡;NF-κB/SNAIL信号通路

Study on the mechanism of Compound lizard powder on reversing cisplatin resistance in gastric cancer by inducing apoptosis and autophagic death

LIU Caiyue¹, LI Zheng¹, LI Weiqiang^{1,2}(1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Modernization of Ethnic Minority Medicine, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the mechanism of Compound lizard powder on reversing cisplatin (DDP) resistance in resistant gastric cancer cell MKN45/DDP through nuclear factor-κB (NF-κB)/SNAIL signaling pathway. **METHODS** MKN45/DDP cells were divided into model group (20% normal rat serum), DDP group (1.3 μg/mL DDP+20% fetal bovine serum) and Compound lizard powder low- and high-dose drug-containing serum+DDP groups (17.2, 68.8 g/kg Compound lizard powder 20% drug-containing serum+1.3 μg/mL DDP). The viability, apoptosis and intracellular autophagosome of MKN45/DDP cells were detected. The content of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in the cell supernatant was detected. The expressions of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), as well as the protein expression levels of phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65) and SNAIL were detected. The molecular mechanism of Compound lizard powder in improving DDP resistance was further clarified by using NF-κB pathway agonist tumor necrosis factor-α (TNF-α). **RESULTS** Compared with model group and DDP group, the cell survival rates of Compound lizard powder low- and high-dose drug-containing serum+DDP groups were significantly decreased ($P<0.05$), while the levels of apoptosis and autophagic death were significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of Bcl-2 (except for the compound lizard powder low-dose drug-containing serum+DDP group), p-NF-κB p65 and SNAIL protein in MKN45/DDP cells were significantly decreased ($P<0.05$). The content of LC3 and expression of Bax protein were significantly increased ($P<0.05$). High-dose Compound lizard powder drug-containing serum+DDP could effectively reverse the down-regulation of LC3 II/LC3 I and Bax protein expression induced by TNF-α ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Compound lizard powder drug-containing serum combined with DDP can induce apoptosis and autophagic death of MKN45/DDP cells by inhibiting NF-κB/SNAIL signaling pathway, thus reversing DDP resistance of cells.

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82260916);宁夏医科大学科研项目(No.XZ2023012)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:中医药防治肝病及脾胃病。
E-mail:1925622481@qq.com

#通信作者 主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中医药防治肝病及脾胃病。
E-mail:lwq200309@163.com

胃癌是全球第五大常见恶性肿瘤,死亡率高居第三位,其发生与幽门螺杆菌感染、不良饮食习惯及遗传易感性密切相关^[1]。尽管早期胃癌通过手术可根治,但多数患者确诊时已是晚期,治疗效果差,生存率低。当前胃癌治疗以化疗、靶向药物和免疫治疗为主^[2],而肿瘤细胞对化疗药物[如顺铂(cisplatin, 简写为“DDP”)]产生的耐药性,是肿瘤复发转移和治疗失败的核心难题。

研究表明,细胞自噬和凋亡途径异常与胃癌化疗耐药密切相关^[3]。在化疗药物作用下,肿瘤细胞可通过激活自噬途径维持能量代谢来促进自身存活,并通过调控B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)等蛋白家族抑制细胞凋亡,从而逃避药物杀伤^[4]。另有研究表明,核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)/SNAIL信号通路的异常激活在肿瘤细胞耐药过程中发挥着关键作用,其可打破自噬-凋亡平衡,进一步加剧细胞耐药^[5-6]。因此,靶向该信号通路以恢复细胞自噬-凋亡平衡,可能为逆转细胞耐药提供新策略。

本课题组前期研究发现,密点麻蜥能抑制由DDP耐药性胃癌细胞MKN45/DDP构建的裸鼠移植瘤的生长^[7]。复方蜥蜴散是以密点麻蜥为君药的用于治疗脾胃病的临床经验方,具体由密点麻蜥、黄芪、白术、半枝莲、延胡索、山楂、白芍、乌梅、鹿角胶、甘草等组成,具有益气补阴、扶正抗癌、解毒通络的作用^[8-9]。本课题组前期研究已证实该方可通过调节上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程增强胃癌细胞对DDP的敏感性^[10]。本研究旨在阐明复方蜥蜴散含药血清逆转MKN45/DDP细胞耐药性的机制,即重点验证其是否通过抑制NF-κB/SNAIL信号通路,诱导细胞凋亡及自噬性死亡,从而发挥逆转DDP耐药性的效应,为胃癌的临床治疗提供新策略。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:HF100型二氧化碳细胞培养箱[力新仪器(上海)有限公司],EVOS XL Core型倒置显微镜、Multiskan GO型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Mini-PROTEAN Tetra型蛋白电泳系统(美国Bio-Rad公司),Amersham Imager 680 RGB型超灵敏多功能成像仪(美国GE医疗公司),ECLIPSE C1型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 主要药品与试剂

复方蜥蜴散的组方药材密点麻蜥、白术、黄芪、半枝莲、白芍、鹿角胶、乌梅、延胡索、山楂、甘草均购自宁夏医科大学附属中医医院(批号分别为2208036、1804052、1808123、2303340、1809146、2305020、1809011、2307204、2206048、2305057),其中君药密点麻蜥经宁夏医科大学药学院刘艳华教授鉴定为密点麻蜥*Eremias multiocellata* Günther的干燥全体,其余中药均由该单位中医学院李卫强教授鉴定为真品。

肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)

(批号HY-P1860,纯度≥98.5%)购自美国MCE公司;微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号061619461740616)购自上海江莱生物科技有限公司;细胞自噬染色(MDC)试剂盒(批号K2287)购自美国APExBIO公司;兔抗Bcl-2单克隆抗体、兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)多克隆抗体(批号分别为4223、2772)均购自美国CST公司;兔抗磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)多克隆抗体、兔抗SNAIL多克隆抗体、兔抗β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号分别为AF2006、AF6032、AF7018、S0001)均购自美国Affinity Biosciences公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(批号AC2111013A)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 动物与细胞

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠,共30只,6~8周龄,体重220~280 g,购自宁夏医科大学实验动物中心,动物使用许可证号为SYXK(宁)2020-0001。动物饲养环境为光照、黑暗各12 h循环,相对湿度为40%~60%,温度为20~25 °C;动物在饲养期间自由摄食和饮水。本研究动物实验通过了宁夏医科大学实验动物中心实验动物福利伦理审查委员会审核(编号为IACUC-NYLAC-2022-165)。

DDP耐药性胃癌细胞MKN45/DDP(货号CTCC-0520-NY)购自浙江美森细胞科技有限公司。

2 方法

2.1 复方蜥蜴散水煎液、含药血清的制备

2.1.1 复方蜥蜴散水煎液的制备

取复方蜥蜴散组方药材(密点麻蜥30 g、黄芪30 g、白术15 g、半枝莲30 g、延胡索10 g、山楂20 g、白芍20 g、鹿角胶15 g、乌梅5 g、甘草6 g),加水至总体积为1 000 mL,浸泡30 min;以大火煮沸后转小火煎煮30~40 min,煎煮至体积为500 mL,过滤取药液;药渣加800 mL水,同法再煎20~30 min;合并2次滤液,小火煎煮,浓缩成质量浓度为6.88 g/mL(以生药量计,下同)的水煎液。根据大鼠给药剂量需求,复方蜥蜴散17.2 g/kg组对应的药物质量浓度为1.72 g/mL(用生理盐水稀释),复方蜥蜴散68.8 g/kg组直接使用母液(6.88 g/mL)。放凉后分装,4 °C冷藏备用。

2.1.2 复方蜥蜴散含药血清的制备

将30只SD大鼠按照随机数字表法分为空白对照组和复方蜥蜴散17.2、68.8 g/kg组(分别相当于临床等效剂量的1、4倍)^[10],每组10只。复方蜥蜴散组大鼠灌胃相应剂量的复方蜥蜴散水煎液,灌胃体积为5 mL/kg;空白对照组大鼠灌胃等体积生理盐水。每天给药2次,连续7 d。末次灌胃1 h后,麻醉大鼠,心尖取血;将血样在冰上静置3 h,离心取上清,56 °C恒温水浴锅灭活30 min后于超净台上过滤,分装于无菌EP管中,保存于-80 °C冰

箱中备用。将制备好的血清以20%的体积比^[11](该体积比在维持细胞正常生理状态的同时,能充分体现药物的体外效应)加至细胞培养基中(即含药血清与RPMI 1640培养基的体积比为1:4),即得17.2、68.8 g/kg复方蜥蜴散的20%含药血清和20%正常大鼠血清。

2.2 复方蜥蜴散联合DDP对MKN45/DDP细胞的影响

2.2.1 分组与给药

将MKN45/DDP细胞置于含5 μmol/L DDP的RPMI 1640完全培养基中常规培养(37 °C, 5%CO₂),以维持其耐药表型。在此后的实验干预开始前2周,将细胞更换至不含DDP的完全培养基中培养。实验过程中,将细胞分为模型组(20%正常大鼠血清)、DDP组[1.3 μg/mL(根据前期CCK-8预实验结果确定的半数抑制浓度)DDP+20%胎牛血清]、复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组(17.2 g/kg复方蜥蜴散的20%含药血清+1.3 μg/mL DDP)、复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组(68.8 g/kg复方蜥蜴散的20%含药血清+1.3 μg/mL DDP)。

2.2.2 细胞存活率检测

采用CCK-8法检测。将MKN45/DDP细胞接种于96孔板中,每孔8×10³个细胞。待细胞贴壁后,按“2.2.1”项下方法分组(每组设置6个复孔)、给药,同时设置空白组(无细胞,不加药)。干预24 h后,每孔加入CCK-8试剂10 μL,在37 °C下孵育1 h。采用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度(A),并计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{加药组}-A_{空白组})/(A_{模型组}-A_{空白组})×100%。

2.2.3 细胞凋亡检测

采用TUNEL染色法检测。将处于对数生长期的MKN45/DDP细胞消化成单细胞悬液后,接种在48孔板内,每孔1×10⁴个细胞,按“2.2.1”项下方法分组(每组设置3个复孔)、给药。干预24 h后,常规进行TUNEL染色及DAPI染色。随后在荧光显微镜下随机观察,对阳性染色细胞(TUNEL阳性细胞的细胞核被标记为明亮的绿色荧光,DAPI阳性细胞的细胞核被标记为蓝色荧光)进行计数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=绿色荧光细胞数量/蓝色荧光细胞数量×100%。

2.2.4 细胞自噬水平检测

采用MDC法检测。将处于对数生长期的MKN45/DDP细胞接种于6孔板内,每孔2×10⁵个细胞,按“2.2.1”项下方法分组(每组设置3个复孔)、给药。干预24 h后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞2~3次,每孔加入1 mL MDC工作液,37 °C避光孵育30 min。吸出MDC染色液,使用Assay Buffer洗细胞3次,采用荧光显微镜(激发波长为355 nm)观察自噬体(蓝色荧光)颗粒。使用Image J软件检测细胞自噬体荧光强度,荧光强度越大表示细胞自噬水平越高。

2.2.5 细胞中LC3含量检测

采用ELISA法检测。将处于对数生长期的MKN45/DDP细胞接种于6孔板中,每孔2×10⁵个细胞,按“2.2.1”项下方法分组、给药。干预24 h后,收集细胞,

裂解、离心取上清。按ELISA试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测细胞中LC3含量。实验重复3次。

2.2.6 细胞中Bax、Bcl-2、p-NF-κB p65、SNAIL蛋白表达检测

采用Western blot法检测。将处于对数生长期的细胞接种于10 cm培养皿中,每皿6×10⁵个细胞,按“2.2.1”项下方法分组、给药。干预24 h后,收集各组细胞,使用RIPA裂解液(含1%苯甲磺酰氟)提取细胞中总蛋白,使用BCA法测定总蛋白浓度。将蛋白变性后,上样进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶电压80 V,分离胶电压120 V),电泳结束后将蛋白湿转(温度4 °C,电流300 mA,转膜时间1 h)至PVDF膜,用快速封闭液封闭20 min;以TBST洗膜后,加入相应一抗(Bax、Bcl-2、p-NF-κB p65、SNAIL的稀释比例均为1:1 000,β-actin的稀释比例为1:5 000),4 °C孵育过夜;次日用TBST洗膜后,加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育2 h;用ECL化学发光试剂显影,在超灵敏多功能成像仪下成像。采用Image J软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。实验重复3次。

2.3 复方蜥蜴散联合DDP逆转细胞耐药的机制验证

2.3.1 分组与给药

将MKN45/DDP细胞分为模型组(20%正常大鼠血清)、TNF-α组(5 μmol/L TNF-α^[12]+20%胎牛血清)、复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组(68.8 g/kg复方蜥蜴散的20%含药血清+1.3 μg/mL DDP)、复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP+TNF-α组(68.8 g/kg复方蜥蜴散的20%含药血清+1.3 μg/mL DDP+5 μmol/L TNF-α)。

2.3.2 细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax蛋白表达检测

采用Western blot法检测。将MKN45/DDP细胞按“2.3.1”项下方法分组、给药。干预24 h后,收集细胞,按“2.2.6”项下方法操作,检测细胞中LC3及Bax蛋白的表达,并计算LC3 II/LC3 I比值。其中,LC3、Bax、GAPDH(内参蛋白)一抗的稀释比例均为1:1 000,HRP标记的山羊抗兔IgG二抗的稀释比例为1:5 000。实验重复3次。

2.4 统计学方法

采用SPSS 25.0和GraphPad Prism 8.0软件进行实验数据分析。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,组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 复方蜥蜴散联合DDP对耐药细胞存活的影响

与模型组比较,DDP组和复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞存活率均显著降低($P<0.05$);与DDP组比较,复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞存活率均显著降低($P<0.05$),且复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞存活率显著低于复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组MKN45/DDP细胞的存活率及凋亡率比较
($\bar{x} \pm s$, %)

组别	细胞存活率($n=6$)	细胞凋亡率($n=3$)
模型组	100.73 ± 5.57	12.15 ± 0.75
DDP组	80.97 ± 4.15 ^a	17.68 ± 0.58
复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组	70.04 ± 7.19 ^{ab}	34.56 ± 3.78 ^{ab}
复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组	47.73 ± 5.62 ^{abc}	62.28 ± 1.35 ^{abc}

a:与模型组比较, $P < 0.05$; b:与DDP组比较, $P < 0.05$; c:与复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 复方蜥蜴散联合DDP对耐药细胞凋亡的影响

与模型组比较, DDP组细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$), 复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$)。与DDP组比较, 复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$), 且复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞凋亡率显著高于复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组($P < 0.05$)。结果见表1、图1。

3.3 复方蜥蜴散联合DDP对耐药细胞自噬水平的影响

与模型组比较, 各给药组细胞的自噬水平均显著升高($P < 0.05$); 与DDP组比较, 复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞的自噬水平进一步升高($P < 0.05$), 且复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞的自噬水平显著高于复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组($P < 0.05$)。结果见图2、表2。

3.4 复方蜥蜴散对耐药细胞中LC3含量的影响

与模型组比较, 各给药组细胞中LC3含量均显著升高($P < 0.05$); 与DDP组比较, 复方蜥蜴散低、高剂量含

药血清+DDP组细胞中LC3含量进一步升高($P < 0.05$), 且复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞中LC3含量显著高于复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组($P < 0.05$)。结果见表2。

3.5 复方蜥蜴散对耐药细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与模型组比较, DDP组细胞中p-NF-κB p65和SNAIL蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$); 复方蜥蜴散低、高剂量含药血清+DDP组细胞中Bcl-2、p-NF-κB p65和SNAIL蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$), Bax蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与DDP组比较, 除复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组细胞中Bcl-2外, 其余给药组细胞中上述蛋白的相对表达量均被显著逆转($P < 0.05$), 且复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞中上述蛋白表达的变化较复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组更明显($P < 0.05$)。结果见图3、表3。

3.6 机制验证实验中复方蜥蜴散对耐药细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax表达的影响

与模型组比较, TNF-α组细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$), 复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与TNF-α组比较, 复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP+TNF-α组细胞中上述指标水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图4、表4。

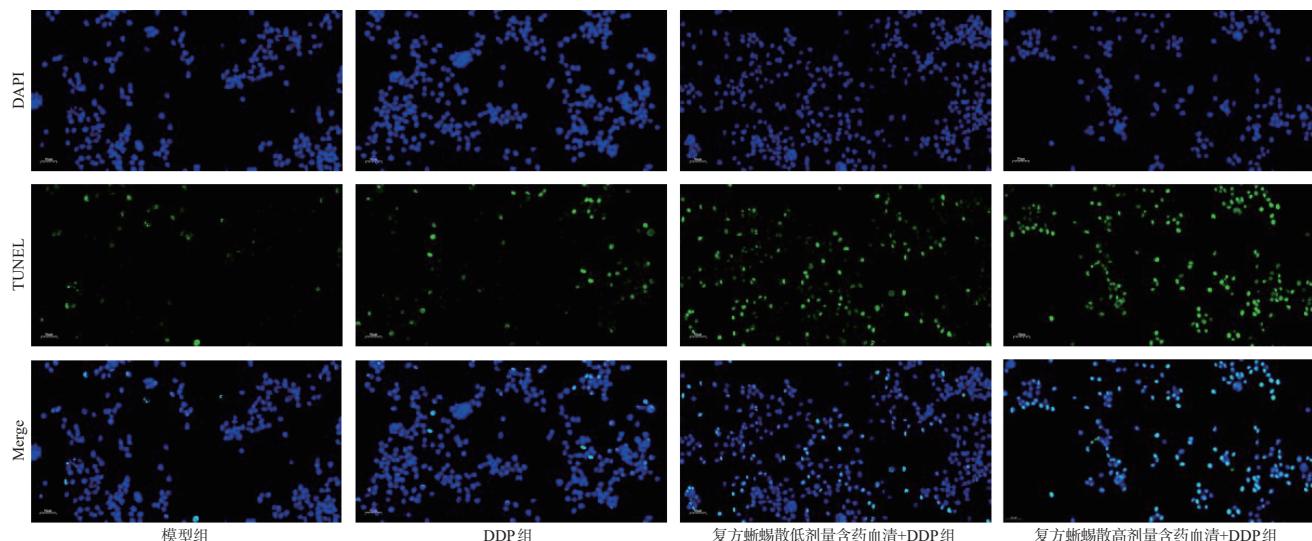


图1 各组MKN45/DDP细胞凋亡检测的TUNEL染色图(标尺:50 μm)

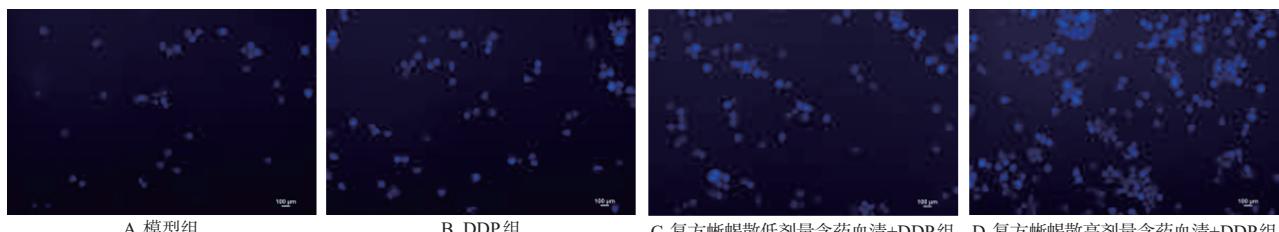
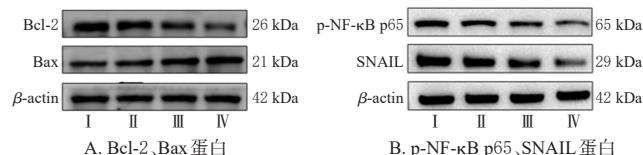


图2 各组MKN45/DDP细胞自噬水平检测的MDC染色图(标尺:100 μm)

表2 各组MKN45/DDP细胞的自噬水平及细胞中LC3含量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	自噬体荧光强度	LC3/(pg/mL)
模型组	51.70 ± 5.92	605.48 ± 14.38
DDP组	75.12 ± 3.87 ^a	856.74 ± 29.83 ^a
复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组	91.29 ± 2.78 ^{ab}	1 049.24 ± 32.51 ^{ab}
复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组	146.43 ± 5.35 ^{abc}	1 211.49 ± 14.97 ^{abc}

a:与模型组比较, $P<0.05$;b:与DDP组比较, $P<0.05$;c:与复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组比较, $P<0.05$ 。



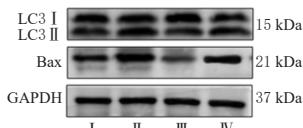
I : 模型组 ; II : DDP 组 ; III : 复方蜥蜴散低剂量含药血清 + DDP 组 ; IV : 复方蜥蜴散高剂量含药血清 + DDP 组。

图3 各组MKN45/DDP细胞中Bax、Bcl-2、p-NF-κB p65和SNAI1蛋白表达的电泳图

表3 各组MKN45/DDP细胞中Bax、Bcl-2、p-NF-κB p65和SNAI1蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	p-NF-κB p65/β-actin	SNAI1/β-actin
模型组	0.59 ± 0.06	1.08 ± 0.05	0.46 ± 0.01	1.03 ± 0.02
DDP组	0.71 ± 0.03	0.97 ± 0.08	0.35 ± 0.04 ^a	0.79 ± 0.02 ^a
复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组	0.94 ± 0.07 ^{ab}	0.75 ± 0.06 ^a	0.21 ± 0.04 ^{ab}	0.61 ± 0.02 ^{ab}
复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组	1.08 ± 0.12 ^{abc}	0.50 ± 0.04 ^{abc}	0.12 ± 0.01 ^{abc}	0.24 ± 0.03 ^{abc}

a:与模型组比较, $P<0.05$;b:与DDP组比较, $P<0.05$;c:与复方蜥蜴散低剂量含药血清+DDP组比较, $P<0.05$ 。



I : 模型组 ; II : 复方蜥蜴散高剂量含药血清 + DDP 组 ; III : TNF-α 组 ; IV : 复方蜥蜴散高剂量含药血清 + DDP + TNF-α 组。

图4 机制验证实验中各组耐药细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax蛋白表达的电泳图

表4 机制验证实验中各组耐药细胞中LC3 II/LC3 I比值及Bax蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LC3 II/LC3 I	Bax/GAPDH
模型组	0.89 ± 0.06	0.67 ± 0.04
复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP组	1.19 ± 0.03 ^a	1.04 ± 0.10 ^a
TNF-α组	0.74 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.03 ^a
复方蜥蜴散高剂量含药血清+DDP+TNF-α组	0.95 ± 0.09 ^b	0.80 ± 0.03 ^b

a:与模型组比较, $P<0.05$;b:与TNF-α组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

DDP是一种被广泛用于临床的抗肿瘤药物,主要通过与细胞DNA上的碱基形成交联,干扰DNA的复制和转录,进而抑制肿瘤细胞增殖^[13]。胃癌在中医属“胃脘痛”“积聚”范畴,其发生发展以脾肾亏虚为根、痰瘀毒结为标。DDP等“苦寒攻伐”化疗药物的长期使用易使患者耗伤气血、损伤脾胃,致正气亏虚失于运药,病邪日久成“癥瘕顽积”,故需结合辨证调补正气、祛邪通络以改善耐药状况。近年来的研究发现,肿瘤细胞可能通过激

活保护性自噬途径来减弱化疗药物诱导的细胞死亡效应,进而产生细胞耐药^[3]。适度的自噬在应激初期可能通过清除受损细胞器、提供能量而暂时保护细胞;然而,持续或过度的自噬则可能通过降解关键生存蛋白、促进凋亡相关因子释放等,最终导致细胞死亡^[14]。

中医认为耐药性源于“毒瘀互结,邪毒深伏”。复方蜥蜴散以密点麻蜥为君药,咸寒入络,善解“瘀毒”,能破积聚、通瘀滞,取其“虫类搜剔”之性,直达病所;加以半枝莲共同祛瘀毒以恢复自噬清除功能,激活异常细胞凋亡;再配以黄芪、白术、白芍、乌梅等通过扶正养阴来调控自噬适度激活、抑制过度自噬,避免正常细胞损伤;延胡索、甘草能通络调和。

自噬是一种细胞降解和回收自身组分的过程,通过形成自噬小体包裹受损或不再需要的细胞组分,然后与溶酶体融合,降解内容物^[15]。LC3是自噬小体的标志蛋白,以LC3 I(细胞质形式)和LC3 II(膜结合形式)的形式存在。LC3的前体首先被半胱氨酸蛋白酶ATG4切割,暴露出C末端的甘氨酸残基,形成可溶性的LC3 I;在自噬起始阶段,LC3 I与磷脂酰乙醇胺通过泛素化反应结合,形成脂溶性的LC3 II;自噬活性增强时,LC3 I向LC3 II的转化增加,使LC3 II的含量升高,LC3 II/LC3 I的比值也随之升高^[16]。本研究结果显示,复方蜥蜴散联合DDP干预可使MKN45/DDP细胞中自噬体荧光增强,并可使细胞中自噬蛋白LC3含量升高,诱导细胞自噬性死亡。这提示复方蜥蜴散可能通过激活自噬途径,增强DDP对胃癌耐药细胞的杀伤作用,这或许是其逆转MKN45/DDP细胞对DDP耐药的重要机制之一。

细胞凋亡的失衡是化疗耐药的重要特征,耐药的肿瘤细胞可能通过上调抗凋亡蛋白表达或下调促凋亡蛋白表达来抵抗化疗药物诱导的细胞死亡^[17]。Bcl-2家族蛋白是细胞凋亡调控的关键因素,其中Bcl-2蛋白是最早被发现的抗凋亡蛋白,主要定位在线粒体外膜上^[18]。Bcl-2通过抑制线粒体膜透化来阻止细胞色素C释放,从而抑制细胞凋亡;Bax是一种重要的促凋亡蛋白,通过形成跨膜通道促进细胞色素C释放,从而启动凋亡级联反应^[19]。本研究通过CCK-8实验和TUNEL凋亡实验发现,复方蜥蜴散联合DDP干预可抑制MKN45/DDP细胞增殖,诱导细胞凋亡;进一步的Western blot实验证明了复方蜥蜴散联合DDP可下调MKN45/DDP细胞中Bcl-2蛋白表达,并上调Bax蛋白表达。这提示复方蜥蜴散可能通过重塑凋亡相关蛋白平衡,恢复耐药细胞的程序性死亡应答能力,从而逆转MKN45/DDP细胞对DDP的耐药性。

NF-κB/SNAI1信号通路是调控肿瘤恶性进展的关键通路之一,广泛参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及耐药等过程^[20]。该信号通路被激活后,NF-κB能直接上调转录因子SNAI1表达,诱导EMT,这也是驱动肿瘤细胞侵袭与转移的关键环节^[20]。另外,SNAI1可抑制凋亡相

关蛋白的表达,而NF-κB本身也能转录上调多种抗凋亡基因,二者协同作用,可显著降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[21]。研究发现,NF-κB可刺激多种癌细胞株并调控其自噬进程^[22]。本研究通过Western blot实验证实,复方蜥蜴散联合DDP干预可显著下调细胞中p-NF-κB p65、SNAIL蛋白表达。值得注意的是,使用NF-κB特异性激动剂TNF-α激活NF-κB/SNAIL信号通路后,细胞中LC3 II/LC3 I比值和Bax蛋白的相对表达量均明显降低,提示自噬和凋亡水平降低;而复方蜥蜴散可逆转TNF-α下调细胞中LC3 II/LC3 I比值和Bax蛋白表达的效应。这提示复方蜥蜴散可能通过靶向NF-κB/SNAIL信号通路,逆转其对自噬和凋亡的抑制,从而克服MKN45/DDP细胞的耐药性。

综上所述,复方蜥蜴散可能通过抑制NF-κB/SNAIL信号通路,协同诱导细胞凋亡与自噬性死亡,从而逆转MKN45/DDP细胞对DDP的耐药性。但本研究仅聚焦于MKN45/DDP这一种胃癌耐药细胞系,缺乏其他耐药细胞株(如AGS/DDP)的验证,尚需进一步完善;且受实验条件的影响,本研究未能构建裸鼠皮下移植瘤模型进行体内实验证,后续亦需进一步完善。

参考文献

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251):635-648.
- [2] LIU-BURDOWSKI J, PARK J. Treatment of early gastric cancer[J]. Surg Clin North Am, 2025, 105(1):55-63.
- [3] ZAMAME RAMIREZ J A, ROMAGNOLI G G, KANENO R. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy[J]. Life Sci, 2021, 265:118745.
- [4] PATRA S, PRADHAN B, NAYAK R, et al. Apoptosis and autophagy modulating dietary phytochemicals in cancer therapeutics: current evidences and future perspectives[J]. Phytother Res, 2021, 35(8):4194-4214.
- [5] RAVEGNINI G, SAMMARINI G, NANNINI M, et al. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): facing cell death between autophagy and apoptosis[J]. Autophagy, 2017, 13(3):452-463.
- [6] CABANOS H F, HATA A N. Emerging insights into targeted therapy-tolerant persister cells in cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(11):2666.
- [7] 程翻娥,白星,李铮,等.密点麻蜥不同部位调控NF-κB/SNAIL通路干预胃癌顺铂耐药研究[J].中草药,2023,54(15):4920-4927.
- [8] 徐丽华,朱西杰,郭利民,等.朱西杰教授应用蜥蜴治疗胃肠黏膜病变临床经验[J].湖北中医杂志,2012,34(4):29-30.
- [9] 李卫强,兰苗苗,景燕燕,等.复方蜥蜴散基于HIF-1α介导PI3K/AKT通路干预裸鼠胃癌浸润转移[J].中国老年学杂志,2023,43(6):1369-1374.
- [10] 李铮,程翻娥,刘彩月,等.复方蜥蜴散调控PI3K/AKT/MMP通路对胃癌耐药细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J].中药药理与临床,2025,41(1):45-51.
- [11] 林陶秀,张文娟,张悦健,等.最佳中药含药血清浓度的筛选方法研究现状[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(2):195-202.
- [12] RUI X, HUANG Z X, CHEN R, et al. RPS3 promotes the metastasis and cisplatin resistance of adenoid cystic carcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12:804439.
- [13] KRITSCH D, HOFFMANN F, STEINBACH D, et al. Tribbles 2 mediates cisplatin sensitivity and DNA damage response in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2017, 141(8):1600-1614.
- [14] LIU S S, JIANG T X, BU F, et al. Molecular mechanisms underlying the BIRC6-mediated regulation of apoptosis and autophagy[J]. Nat Commun, 2024, 15(1):891.
- [15] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3):460-473.
- [16] SUN C N, CHEN Y X, GU Q Q, et al. UBE3C tunes autophagy via ATG4B ubiquitination[J]. Autophagy, 2024, 20(3):645-658.
- [17] RATHORE R, MCCALLUM J E, VARGHESE E, et al. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)[J]. Apoptosis, 2017, 22(7):898-919.
- [18] VILLANOVA L, CARECCIA S, DE MARIA R, et al. Micro-economics of apoptosis in cancer: ncRNAs modulation of BCL-2 family members[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4):958.
- [19] O'NEILL K L, HUANG K, ZHANG J J, et al. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane[J]. Genes Dev, 2016, 30(8):973-988.
- [20] CHEN Z F, LIU M, LIU X J, et al. COX-2 regulates E-cadherin expression through the NF-κB/Snail signaling pathway in gastric cancer[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1):93-100.
- [21] MUSAVI SHENAS S M H, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. SiRNA-mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters microRNA expression in human urinary bladder cancer cell line[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(5):969-974.
- [22] HU W, CHEN S S, ZHANG J L, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy by suppressing NF-κB activation[J]. Cancer Lett, 2014, 343(2):239-248.

(收稿日期:2025-08-01 修回日期:2025-10-30)

(编辑:林 静)