

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.07.012

胃肠安对人胃癌细胞侵袭转移及 RUFY3、MAPKs 通路的影响

李佳^{1,2}, 陈伟霞¹, 李朝燕¹, 赵爱光[✉]

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市宛平南路 725 号, 200023; 2. 河南省郑州市中医院)

摘要 目的 探讨胃肠安抑制胃癌侵袭转移的作用及可能作用机制。方法 采取细胞增殖实验筛选胃肠安进行实验的药物浓度。实验分为空白组, 胃肠安高、低剂量组, 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 组。细胞培养 24 h 后胃肠安高、低剂量组用拟筛选浓度的胃肠安 100 μ l 进行干预, 5-FU 组加入 32 mg/L 5-FU 注射液 100 μ l, 空白组给予无血清培养基 100 μ l。采用 CCK8 法检测细胞增殖的变化, 划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测胃癌细胞迁移和侵袭能力; 采用免疫印迹法检测 RUN 和 FYVE 结构域蛋白 3 (RUFY3)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK)、促分裂原活化蛋白激酶 (MEK)、磷酸化促分裂原活化蛋白激酶 (p-MEK)、Twist1、E-钙粘蛋白、波形蛋白、N-钙粘蛋白、血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 蛋白表达水平。结果 筛选出 500 mg/L 和 1000 mg/L 浓度的胃肠安为胃肠安低、高剂量组给药量。给药 48 h 时胃肠安高、低剂量组和 5-FU 组细胞迁移率均明显低于空白组 ($P < 0.01$)。胃肠安高剂量组、5-FU 组穿膜细胞数显著低于空白组和胃肠安低剂量组 ($P < 0.01$)。胃肠安高、低剂量组侵袭抑制率分别为 54.11%、7.65%, 5-FU 组侵袭抑制率为 47.88%。与空白组比较, 胃肠安低剂量组 p-ERK、Twist1 蛋白表达降低, E-钙粘蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 胃肠安高剂量组 RUFY3、p-ERK、p-MEK、Twist1、N-钙粘蛋白及波形蛋白表达降低, E-钙粘蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与胃肠安低剂量组比较, 胃肠安高剂量组 RUFY3、p-MEK、N-钙粘蛋白表达降低更明显 ($P < 0.05$)。结论 胃肠安可抑制胃癌的侵袭转移, 并且以 1000 mg/L 浓度效果最好, 其机制可能是通过调控 RUFY3、MAPKs 通路来调节侵袭转移相关蛋白和抑制胃癌细胞上皮-间充质转化。

关键词 胃肠安; 胃癌; 侵袭转移; RUN 和 FYVE 结构域蛋白 3; 丝裂原活化蛋白激酶

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率均约占世界的 50%, 胃癌的侵袭转移是胃癌治疗失败的根本原因^[1]。胃癌的侵袭转移是一个多步骤、多因素共同参与的复杂过程, 有效抑制侵袭转移是胃癌治疗的重点^[2]。研究表明, RUN 和 FYVE 结构域蛋白 3 (RUFY3) 与肿瘤的侵袭转移密切相关, 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 通路介导了一系列的肿瘤生物学功能, 包括肿瘤侵袭转移、血管生成等^[3-5]。前期研究发现, 胃肠安能减少胃癌术后患者的复发转移率, 延长生存期, 改善

生活质量^[6-7]。本研究探讨了胃肠安抑制胃癌侵袭转移的作用及其潜在的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人胃癌细胞株 MKN45 由华东理工大学药学院刘建文课题组惠赠。

1.2 药物

胃肠安处方: 太子参 12 g, 炒白术 12 g, 茯苓 15 g, 姜半夏 9 g, 陈皮 9 g, 红藤 30 g, 野葡萄藤 30 g, 牡蛎 30 g, 夏枯草 9 g, 壁虎 3 条, 绿萼梅 9 g。中药饮片来自上海中医药大学附属龙华医院中药房, 第一煎处方饮片加 10 倍水回流抽滤, 第二煎加 8 倍水抽滤, 合并滤液, 将滤液浓缩, 干燥至清膏, 干燥机将清膏冷冻至粉末, 将上述粉末过 80 目筛, 混

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700605); 国家科技重大专项 (2017ZX09304001); 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDX2015068)

* 通讯作者: 2538312201@qq.com, (021) 64385700

合器混匀, 提取物制颗粒, 以上制备工艺由江阴天江药业有限公司提供 (批号: 1507342), 临用时用 PBS 溶解, 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌。5-氟尿嘧啶 (5-FU) 注射液, 购自上海旭东海普药业有限公司 (批号: 090906), 每支 10 ml。

1.3 主要试剂及仪器

RUFY3 抗体 (批号 A12896), 美国 ABelone 公司; 磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK, 批号 4370)、促分裂原活化蛋白激酶 (MEK, 批号 9126)、磷酸化促分裂原活化蛋白激酶 (p-MEK, 批号 9154)、Twist1 (批号 46702), 美国 CST 公司; E-钙粘蛋白抗体 (批号 AW5389)、波形蛋白抗体 (批号 AP2739B), 美国 Abgent 公司; N-钙粘蛋白抗体 (批号 AF4039), 美国 Affinity 公司; 血管内皮生长因子 (VEGF, 批号 2445)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2, 批号 13132)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9, 批号 15561)、二抗 (批号 SA00001-1), 美国 Proteintech 公司; CCK8 试剂盒 (批号 CK04), 日本同仁公司; RPMI1640 培养基 (批号 RNBG5440), 美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (批号 0270106), 美国 GIBCO 公司; 吉姆萨染液 (批号 60529), 上海翊圣生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (批号 WB0105), 上海威奥生物公司。

CO₂ 培养箱 (BB 5060 型), Thermo 公司; 多功能酶标仪 (Infinite F200 型), 瑞士 TECAN 公司; 划痕实验专用培养插件 (货号: 81176), 德国 IBIDI 公司; 预包被 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室 (批号 354480), 美国 Corning 公司; 荧光倒置显微镜 (DMI3000B 型), 德国 Leica 公司; 化学发光成像系统 (EC3 410 型), 美国 UVP 公司。

1.4 胃肠安药物浓度筛选

采取细胞增殖实验, 取对数生长期的 MKN45 细胞, 按照 8×10^3 个/100 μl 的浓度接种到 96 孔板中, 培养 24 h。每孔中分别加入不同浓度 (0、500、1000、1500、2000 mg/L) 的胃肠安, 设置 5 个复孔, 培养 24、48、72 h; 加入 10 μl CCK8, 继续孵育 2 h 后, 震荡混匀, 在 450 nm 波长下用酶标仪进行检测其吸光度值, 并根据吸光度值计算肿瘤细胞的存活率, 细胞存活率 = 实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。细胞存活率为 50% 时, 所对应胃肠安的最佳半数抑制浓度。

1.5 细胞划痕实验

实验分为空白组, 胃肠安高、低剂量组, 5-FU 组。取对数生长期的 MKN45 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释成 7×10^5 个/ml

密度细胞悬液; 6 孔板中加入划痕实验专用培养插件, MKN45 细胞 70 μl 接种于 6 孔板中间的培养插件, 培养箱中孵育 24 h 后用镊子移除插件即可产生 500 μm 宽度的划痕; 胃肠安高、低剂量组加入筛选浓度的胃肠安, 5-FU 组加入 32 mg/L 5-FU 注射液, 空白组加入无血清培养基, 加样量各 100 μl , 培养 48 h, 设 3 个复孔, 分别于 24 h、48 h 拍照记录, 采用 WimScratch Image Analysis11.0 进行图像分析。在划痕每侧边缘均匀选取 30 个点后取其中线代表划痕, 测量划痕间距, 并用以下公式计算迁移率: 细胞迁移率 = [边缘距离 (0 h) - 边缘距离 (24 h/48 h)] / 边缘距离 (0 h) $\times 100\%$ 。

1.6 Transwell 侵袭实验

提前准备预包被 Matrigel 胶的 Transwell 小室进行水化; 实验分组及给药同上, 干预 24 h 后, 收集细胞用无血清培养基制成 1×10^5 个/ml 密度的 MKN45 单细胞悬液, 设 3 个复孔; Transwell 上室中加入 100 μl MKN45 单细胞悬液, 下室中加入 600 μl 的 30% 胎牛血清的培养基, 培养 24 h; 棉签拭去小室上面的细胞, 吉姆萨染液染色 20 min 后, 自来水清洗晾干, 显微镜下观察穿膜细胞数, 共计数 5 个视野 ($\times 100$), 取平均值, 计算侵袭抑制率: 侵袭抑制率 = (对照组侵袭细胞数 - 实验组侵袭细胞数) / 对照组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 细胞中 RUFY3、MAPKs 通路蛋白及上皮-间充质转化相关蛋白表达

采用 Western Blot 法检测, 实验分组及给药同上, 每组 6 个样本。取对数生长期的 MKN45 细胞以 3×10^5 个/ml 的密度铺于 6 孔板, 24 h 后进行干预。作用 48 h 后, 弃去培养基, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白, BCA 法检测样品蛋白浓度。配胶、SDS-PAGE 电泳、20v 转膜至 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h、加入 RUFY3、p-ERK、MEK、p-MEK、Twist1、E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、波形蛋白一抗孵育过夜、二抗 (1 : 2000) 室温孵育 2 h。用化学发光法显色, 凝胶成像系统分析结果。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量/同一样本内参表达量。

1.8 细胞中 VEGF、MMP2、MMP9 蛋白表达

采用 Western Blot 法检测, 分组、给药及检测方法同上, 按照试剂盒说明书步骤进行。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 均数间多重比较采用 LSD、SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异具有

统计学意义。

2 结果

2.1 胃肠安药物浓度筛选结果

图 1 示, 随着药物浓度和作用时间增加, 抑制 MKN45 细胞增殖作用逐渐增强, 呈时间和浓度依赖性效应关系。其最佳半数抑制浓度为 1014 mg/L (48 h)。为进一步观察胃肠安对胃癌细胞侵袭转移的影响, 后续实验分别采用 500 mg/L 和 1000 mg/L 浓度的胃肠安进行干预, 分别设为胃肠安低、高剂量组。

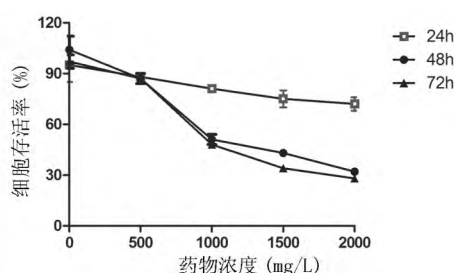


图 1 不同浓度胃肠安对 MKN45 细胞存活率影响曲线图

2.2 各组 MKN45 给药不同时间细胞迁移率比较

表 1 示, 空白组给药 48 h 时细胞迁移率明显高于本组给药 24 h 时 ($P < 0.01$)。给药 24 h 时与空白组比较, 胃肠安高剂量组和 5-FU 组细胞迁移率降低 ($P < 0.01$), 而胃肠安低剂量组细胞迁移率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 48 h 时胃

表 1 各组 MKN45 给药不同时间细胞迁移率比较 (%) ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h
空白组	3	32.80 ± 4.55	70.20 ± 2.45 [▲]
胃肠安低剂量组	3	37.42 ± 4.28	40.53 ± 5.74 [*]
胃肠安高剂量组	3	21.25 ± 5.07 ^{*△}	27.95 ± 4.47 ^{*△}
5-FU 组	3	15.07 ± 2.85 ^{*△}	21.77 ± 1.66 ^{*△}

注: 与空白组比较, $*$ $P < 0.01$; 与胃肠安低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.01$ 。

表 3 各组细胞 RUFY3、MAPK 通路及上皮-间充质转化相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	RUFY3	p-ERK	p-MEK	MEK
空白组	6	0.86 ± 0.06	0.97 ± 0.18	0.96 ± 0.07	1.34 ± 0.02
胃肠安低剂量组	6	0.61 ± 0.16	0.26 ± 0.07 [*]	0.67 ± 0.04	1.11 ± 0.08
胃肠安高剂量组	6	0.18 ± 0.14 ^{*△}	0.11 ± 0.12 [*]	0.23 ± 0.11 ^{*△}	0.95 ± 0.10
5-FU 组	6	0.92 ± 0.06 [▲]	1.01 ± 0.08 [▲]	1.22 ± 0.07 [▲]	1.64 ± 0.02

组别	样本数	Twist1	E-钙粘蛋白	N-钙粘蛋白	波形蛋白
空白组	6	1.07 ± 0.08	0.34 ± 0.07	0.77 ± 0.06	1.60 ± 0.06
胃肠安低剂量组	6	0.51 ± 0.18 [*]	0.88 ± 0.09 [*]	0.59 ± 0.03	1.49 ± 0.09
胃肠安高剂量组	6	0.43 ± 0.11 [*]	0.73 ± 0.18 [*]	0.09 ± 0.02 ^{*△}	1.04 ± 0.04 [*]
5-FU 组	6	0.70 ± 0.08	1.04 ± 0.07 [*]	1.07 ± 0.06 ^{△▲}	1.28 ± 0.16

注: RUFY3, RUN 和 FYVE 结构域蛋白 3; p-ERK, 磷酸化细胞外信号调节激酶; MEK, 促分裂原活化蛋白激酶; p-MEK, 磷酸化促分裂原活化蛋白激酶; 与空白组比较, $*$ $P < 0.01$; 与胃肠安低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$; 与胃肠安高剂量组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

肠安高、低剂量组和 5-FU 组迁移率均明显低于空白组 ($P < 0.01$), 且胃肠安高剂量组细胞迁移率亦低于胃肠安低剂量组 ($P < 0.01$), 胃肠安高剂量组与 5-FU 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组细胞侵袭能力比较

表 2 示, 胃肠安高剂量组、5-FU 组穿膜细胞数显著低于空白组和胃肠安低剂量组 ($P < 0.01$), 胃肠安高剂量组与 5-FU 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。胃肠安高、低剂量组侵袭抑制率分别为 54.11%、7.65%, 5-FU 组侵袭抑制率为 47.88%。

表 2 各组细胞穿膜细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	穿膜细胞数
空白组	3	117 ± 7
胃肠安低剂量组	3	109 ± 8
胃肠安高剂量组	3	54 ± 7 ^{*△}
5-FU 组	3	61 ± 4 ^{*△}

注: 与空白组比较, $*$ $P < 0.01$; 与胃肠安低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

2.4 各组细胞中 RUFY3、MAPKs 通路及上皮-间充质转化相关蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 胃肠安低剂量组 p-ERK、Twist1 蛋白表达降低, E-钙粘蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 胃肠安高剂量组 RUFY3、p-ERK、p-MEK、Twist1、N-钙粘蛋白及波形蛋白表达降低, E-钙粘蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 5-FU 组 E-钙粘蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与胃肠安低剂量组比较, 胃肠安高剂量组 RUFY3、p-MEK、N-钙粘蛋白表达降低更明显 ($P < 0.05$)。5-FU 组 RUFY3、p-ERK、p-MEK、N-钙粘蛋白表达高于胃肠安高剂量组, p-ERK、N-钙粘蛋白表达高于低剂量组 ($P < 0.05$)。各组 MEK 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组细胞中 VEGF、MMP2 和 MMP9 蛋白表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 胃肠安高剂量组 VEGF 蛋白表达降低, 5-FU 组 VEGF 蛋白表达升高, 胃肠安高、低剂量组和 5-FU 组 MMP2、MMP9 表达均降低 ($P < 0.05$)。胃肠安高剂量组 VEGF 表达明显低于胃肠安低剂量组和 5-FU 组 ($P < 0.05$)。胃肠安高、低剂量组和 5-FU 组 MMP2、MMP9 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组细胞 VEGF、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	VEGF	MMP2	MMP9
空白组	6	0.41 ± 0.03	0.56 ± 0.08	0.69 ± 0.05
胃肠安低剂量组	6	0.37 ± 0.04 [△]	0.21 ± 0.12*	0.23 ± 0.09*
胃肠安高剂量组	6	0.12 ± 0.06*	0.23 ± 0.11*	0.22 ± 0.07*
5-FU 组	6	0.86 ± 0.05* [△]	0.19 ± 0.09*	0.18 ± 0.06*

注: VEGF, 血管内皮生长因子; MMP2, 基质金属蛋白酶 2; MMP9, 基质金属蛋白酶 9; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与胃肠安高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医学将胃癌归属于“胃脘痛”“反胃”“积聚”等范畴。前期研究^[1]认为, 胃癌的主要病机以脾虚为本, 热毒、湿阻、痰凝、气滞、血瘀为标, 治以健脾益气、清热解毒、化痰祛湿、软坚散结, 确立了胃肠安方。方中太子参、白术、茯苓共为君药, 发挥健脾理气之功效; 红藤、野葡萄藤、壁虎清热解毒; 牡蛎、夏枯草软坚化痰, 绿萼梅、姜半夏、陈皮和胃理气。全方共奏健脾理气、清热解毒、软坚化痰之效。本研究结果显示, 胃肠安高剂量组和 5-FU 组均可降低细胞迁移率和穿膜细胞数, 且两组效果相当, 说明 1000 mg/L 胃肠安抑制肿瘤细胞的转移效果不劣于 5-FU 注射液。

RUFY3 蛋白参与调控多种细胞活动过程, 过表达 RUFY3 可以诱导细胞周围形成富含 F-actin 的伪足, 从而促进胃癌细胞的侵袭和转移^[2]。我们前期全基因表达谱芯片筛选出包括 45 个以上差异表达基因, 有明显差异的就有 RUFY3^[3]。本研究结果显示, 胃肠安高剂量组可降低 RUFY3 蛋白表达水平, 说明其抑制胃癌的侵袭转移可能与 RUFY3 有关。

MAPKs 是一种胞内的丝/苏氨酸蛋白激酶, 可以从胞质内进入细胞核, 激活下游靶基因, 产生各种肿瘤生物学功能^[4]。MAPKs 亚族与 MAPKs 通路功能密切相关, 包括细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、P38 等亚

族。ERK1/2 这两种形式的 MAPKs 完全符合 MAPKs 的完整激活过程, 即上游因子通过细胞表面络氨酸激酶或 G 蛋白偶联受体激活 Ras, 进而募集 Raf 至细胞膜, 引发 MEK1/2 的磷酸化, 进而激活 ERK1/2, 活化的 ERK1/2 进而可以激活靶基因的转录^[5]。Twist1 作为一种重要的转录调节因子, 可识别靶基因启动子上的 E-box 基序的 DNA 结合序列, 诱导上皮-间充质转换, 肿瘤浸润转移开始^[6]。肿瘤细胞发生上皮-间充质转换的标志为 E-钙粘蛋白下调和 N-钙粘蛋白、波形蛋白的上调, 伴随着侵袭和迁移能力的增强, 促进了肿瘤的转移^[7]。本研究结果显示, 胃肠安高剂量组可降低 RUFY3、p-ERK、p-MEK、Twist1、N-钙粘蛋白及波形蛋白表达量, 增加 E-钙粘蛋白表达, 说明胃肠安抑制胃癌的侵袭转移和上皮-间充质转化改变可能与 MAPKs 通路有关。

血管生成是肿瘤生长和转移的必要条件, VEGF 是促进肿瘤血管新生和转移的关键调控因子^[8]。研究发现, 胃肠安能抑制胃癌荷瘤小鼠的生长转移, 下调肿瘤组织血管密度^[9]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 在降解细胞外基质和基底膜中起重要作用, 其中 MMP2 和 MMP9 可以降解细胞外基质, 极大改变肿瘤的黏性、移动性, 促进侵袭转移^[10]。有研究报道, MAPKs 通路促进肿瘤侵袭转移的作用是通过激活 MMP2、MMP9 引发细胞外基质的降解^[11]。本研究结果显示, 胃肠安高剂量组可有效降低 VEGF、MMP2、MMP9 的表达, 其作用可能与调控 MAPKs 通路有关。

综上所述, 1000 mg/L 胃肠安可有效抑制胃癌的侵袭转移和胃癌细胞的上皮-间充质转化, 其机制可能与 RUFY3、MAPKs 通路有关。

参考文献

- [1] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58.
- [2] 单磊. 胃癌转移分子机制研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2017, 33(10): 121-124.
- [3] XIE R, WANG J, LIU X, et al. RUFY3 interaction with FOXK1 promotes invasion and metastasis in colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3709.
- [4] XIE R, WANG J, TANG W, et al. Ruffy promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2017, 390: 30-38. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.001.
- [5] 和水祥, 张丹, 禄韶英. 胃癌的分子机制及靶向诊断研究进展 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2016, 37(4): 461-472.

④ 朱晓虹,赵爱光,李宏伟,等. 基于健脾为基础的辨证治疗方案对ⅢC期胃癌根治术后患者无病生存期的影响[J]. 中国肿瘤,2016,25(7):569-574.

⑤ ZHAO L, ZHAO AG, ZHAO G, et al. Survival benefit of traditional chinese herbal medicine (a herbal formula for invigorating spleen) in gastric cancer patients with peritoneal metastasis [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2014,2014:625493. doi: 10.1155/2014/625493.

⑥ 赵爱光,赵海磊,杨金坤,等. cDNA 微阵列技术检测胃脘安复方对人胃癌细胞基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2004,12(2):67-70.

⑦ TENG F, XU Z, CHEN J, et al. DUSP1 induces apatinib resistance by activating the MAPK pathway in gastric cancer [J]. Oncol Rep,2018,40(3):1203-1222.

⑧ TAI KY, SHIEH YS, LEE CS, et al. Ax1 promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of

NF-kappa B and Brg-1 [J]. Oncogene,2008,27(29):4044-4055.

⑨ 杨东运,吴祥松,王拥卫. Twist 与肿瘤关系的研究进展[J]. 西医学综述,2017,23(4):694-698.

⑩ LI SL, CHEN X, WU T, et al. Knockdown of TMPRSS3 inhibits gastric cancer cell proliferation, invasion and EMT via regulation of the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways [J]. Biomed Pharmacother,2018,107:841-848. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.023.

⑪ 华宗荣,李妍晨,刘瑶,等. VEGF 在胃癌中的研究进展[J]. 赣南医学院学报,2017,37(1):154-157.

⑫ 周浩. “胃脘安”对胃癌模型小鼠肿瘤的抑制作用及其机理的初步研究[J]. 江苏中医药,2007,39(10):70-72.

⑬ LV Y, ZHAO X, ZHU L, et al. Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis [J]. Theranostics,2018,8(10):2830-2845.

Effects of *Weichang'an* (胃脘安) on Invasion and Metastasis of Human Gastric Cancer Cells and Pathway of RUFY3 and MAPKs

LI Jia^{1,2}, CHEN Weixia¹, LI Chaoyan¹, ZHAO Aiguang¹

(1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200023; 2. Zhengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Henan Province)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of *Weichang'an* (胃脘安) on the invasion and metastasis of gastric cancer and its possible mechanism. **Methods** The cell proliferation assay was used to screen the drug concentration of *Weichang'an*. Samples were divided into blank group, *Weichang'an* high dose group, *Weichang'an* low dose group and 5-FU group. After cell culture for 24 h, the *Weichang'an* high and low dose groups were treated with the screening concentration of *Weichang'an* 100 μ l for intervention. The 5-FU group was added with 32 mg/L 5-FU injection 100 μ l. The blank group was treated with serum-free culture base 100 μ l. The cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK8) method, and the migration and invasion ability of gastric cancer cells were detected by scratch test and Transwell invasion assay. RUN and FYVE domain protein 3 (RUFY3), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), mitogen-activated protein kinase (MEK), phosphorylated mitogen-activated protein kinase (p-MEK), Twist1, E-cadherin, vimentin, N-cadherin, vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) protein expression levels were detected by Western blot. **Results** The concentrations of 500 mg/L and 1000 mg/L *Weichang'an* were screened and set as *Weichang'an* low and high treated dose. After drug administration for 48 h, the cell migration rate of *Weichang'an* high, low dose group and 5-FU group was significantly lower than that of the blank group ($P < 0.01$). The number of transmembrane cells in the *Weichang'an* high dose group and 5-FU group was significantly lower than that in the blank group and *Weichang'an* low dose group ($P < 0.01$). The invasive inhibition rates of *Weichang'an* high and low dose groups were 54.11% and 7.65%, respectively, and the invasion inhibition rate of 5-FU group was 47.88%. Compared with the blank group, the expression of p-ERK and Twist1 protein was decreased in *Weichang'an* low dose group, and the expression of E-cadherin protein was increased ($P < 0.05$). The expression of RUFY3, p-ERK, p-MEK, Twist1, N-cadherin and Vimentin protein in the *Weichang'an* high dose group was decreased, and the expression of E-cadherin protein was increased ($P < 0.05$). Compared with *Weichang'an* low dose group, the expression of RUFY3, p-MEK and N-cadherin protein in *Weichang'an* high dose group was more significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Weichang'an* can inhibit the invasion and metastasis of gastric cancer, and the effect is best at the concentration of 1000 mg/L. The mechanism may be related to the regulation of invasion and metastasis-related proteins and inhibition of epithelial mesenchymal transition in gastric cancer cells by regulating RUFY3 and MAPKs pathways. **Keywords** *Weichang'an* (胃脘安); gastric cancer; invasion and metastasis; RUN and FYVE domain protein 3; mitogen-activated protein kinase

(收稿日期: 2018-07-26; 修回日期: 2018-10-12)

编辑: 邓 媛