

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.04.012

# 参芪抑瘤方含药血清对胃癌细胞 AGS 细胞周期及 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响

魏娜<sup>1</sup>, 郭崇元<sup>2</sup>, 白敏<sup>1</sup>, 安耀荣<sup>1</sup>, 张司朝<sup>1</sup>, 武李阳<sup>1</sup>, 段永强<sup>3</sup>✉

1. 甘肃中医药大学甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃省兰州市定西东路 35 号, 730000; 2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室; 3. 宁夏医科大学中医学学院

**[摘要]** **目的** 从无翅型 MMTV 整合位点家族成员 (Wnt) / $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 通路探讨参芪抑瘤方治疗胃癌前病变 (PLGC) 的可能作用机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测胃癌细胞 AGS 细胞存活率筛选参芪抑瘤方含药血清干预时间及 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂 XAV939 干预浓度。实验将 AGS 细胞分为胃癌细胞组 (15% 空白血清)、抑制剂组 (筛选浓度的 XAV939)、参芪抑瘤方高剂量组 (12% 参芪抑瘤方含药血清+3% 空白血清)、参芪抑瘤方中剂量组 (6% 参芪抑瘤方含药血清+9% 空白血清)、参芪抑瘤方低剂量组 (3% 参芪抑瘤方含药血清+12% 空白血清), 每组设 3 个复孔。分别培养 24 h、48 h 通过细胞划痕实验检测细胞迁移、侵袭能力; 培养筛选干预时间后流式细胞术检测细胞周期, 荧光免疫法检测增殖细胞核抗原 (Ki67) 蛋白水平, 蛋白免疫印记法检测 Wnt、 $\beta$ -catenin、糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )、核内 T 细胞特异性因子 (TCF) 蛋白水平, 实时荧光定量 PCR 法检测 Wnt、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、TCF mRNA 表达。**结果** 筛选出参芪抑瘤方含药血清干预时间为 48 h 和 XAV939 干预浓度为 20  $\mu$ mol/L 用于后续实验。与胃癌细胞组同时间点比较, 除 24 h 参芪抑瘤方低剂量组之外, 参芪抑瘤方各剂量组 24 h、48 h 细胞划痕迁移率均降低 ( $P<0.05$ )。与参芪抑瘤方低剂量组同时间点比较, 参芪抑瘤方高、中剂量组 24 h 及参芪抑瘤方高剂量组 48 h 细胞划痕迁移率均降低 ( $P<0.05$ )。与胃癌细胞组比较, 参芪抑瘤方高剂量组和抑制剂组 Wnt、 $\beta$ -catenin、TCF 蛋白水平及其相应的 mRNA 表达降低, Ki67 蛋白水平及细胞周期 S 期、G2 期比例亦降低, GSK-3 $\beta$  蛋白水平、GSK-3 $\beta$  mRNA 表达及 G1 期比例升高 ( $P<0.05$ )。与抑制剂组比较, 参芪抑瘤方高剂量组 G1 期比例降低、G2 期比例升高 ( $P<0.05$ ), 而 Wnt、 $\beta$ -catenin 蛋白水平其相应的 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** 参芪抑瘤方含药血清可以抑制胃癌细胞 AGS 的迁移、侵袭能力, 将细胞周期阻滞在 G1 期, 其机制可能与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路有关。

**[关键词]** 胃癌前病变; 参芪抑瘤方; 胃癌细胞; 细胞迁移; 细胞周期; 无翅型 MMTV 整合位点家族成员;  $\beta$ -连环蛋白

胃癌作为最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在我国列居第二位<sup>[1]</sup>。胃癌的发生多经历慢性非萎缩性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌的进展过程, 其中慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生被称为胃癌前病变 (precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)<sup>[2]</sup>。PLGC 的早期诊断和治疗是防止疾病进展、降低胃

癌风险的关键。PLGC 的发生发展受家族史、饮食、饮酒和幽门螺旋杆菌 (HP) 感染等因素影响, 其中 HP 是导致 PLGC 出现的主要原因<sup>[3]</sup>, 但由于耐药率的增高以及抗生素带来的不良反应, 在一定程度上限制了临床疗效。参芪抑瘤方由《金匱要略》当归贝母苦参丸加减化裁而成, 具有益气扶正、清热解毒、化痰散结之效。本课题组前期研究证实, 参芪抑瘤方能够有效减轻 PLGC 患者胃脘部痞塞闷堵、胀满不适的症状<sup>[4]</sup>, 并对胃癌细胞的异常增殖具有一定的抑制作用<sup>[5]</sup>。近年来, 有研究证实无翅

基金项目: 甘肃省科技计划项目 (20JR10RA314); 宁夏自然科学基金 (2023AAC03170)

✉ 通讯作者: dyqgs2008@163.com

型 MMTV 整合位点家族成员 (Wnt) / $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路是 PLGC 和胃癌的关键通路之一, 该通路可以通过抑制细胞增殖, 起到治疗 PLGC 和胃癌的作用<sup>[6]</sup>。本研究从 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路探讨参芪抑瘤方治疗 PLGC 的可能作用机制, 为参芪抑瘤方的后续研究和临床应用提供实验依据。本实验由甘肃中医药大学动物伦理委员会批准 (批件号: SY2024-228)。

## 1 材料及方法

### 1.1 动物及细胞

20 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 6~8 周龄, 体质量 ( $180 \pm 220$ ) g, 甘肃中医药大学实验中心繁殖, 实验动物许可证号: SCXK (甘) 2020-0001。饲养于甘肃中医药大学实验中心, 温度  $22 \sim 25$  °C, 湿度 50%~70%, 干燥通风, 光照 12 h 明暗交替, 自由进食饮水。人胃癌细胞 AGS, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (批号: L870417020810)。

### 1.2 药物

参芪抑瘤方组成: 黄芪 30 g, 当归 20 g, 山慈菇 10 g, 土贝母 10 g, 苦参 15 g, 八月札 30 g, 莪术 10 g, 半枝莲 20 g, 白术 18 g, 枳壳 12 g, 人参 15 g。饮片购自甘肃中医药大学附属医院中药房, 并经甘肃中医药大学中药生药学教研室鉴定为正品。将上述药材置于瓦罐中, 加入总药量 10 倍量水浸泡 30 min, 大火煮沸后, 小火煎煮 30 min, 用过滤筛滤出药液。再次煎煮时加入 6 倍量水煮沸后, 小火煎煮 20 min。将两次滤液混合, 浓缩至含生药剂量 6.0 g/ml。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂 XAV939 (美国 Selleck Chemicals LLC 公司, 批号: S118006)。

### 1.3 主要试剂及仪器

Ham's F-12 基础培养基、AGS 专用培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号分别为 WH3624C061、WH2524C281); 胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液、CCK8 试剂盒 (西安奥锐精创生物科技有限公司, 批号分别为 A24B231、A23H211、A25A30); 二甲基亚砜 (DMSO)、增殖细胞核抗原 (Ki67) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 CR2209006、GB111141); 细胞周期试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号: A405443); Wnt、糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )、 $\beta$ -catenin 抗体 (美国 Gene Tex 公司, 批号分别为 822200064、40051、42564); 核内 T 细胞特异性因子 (TCF) 抗体、羊抗兔二抗 (江苏亲

科生物研究中心有限公司, 批号分别为 36e6141、56j9958); GAPDH (美国 ImmunoWay 公司, 批号: B1501); 戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: WS20051230); BCA 蛋白浓度试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20230321); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, 批号分别为 M1307141、H4318040、H5310690]。

R21G 型高速冷冻离心机 (日本日立公司); PowerPac Basic 型电泳仪装置 (美国 Bio-Rad 公司); GeLVision 6000Plus 型化学发光成像系统 (广州博鹭腾生物科技有限公司); LightCycler96 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Roche 公司); BD FACSAria III 型流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司); ICX41 型倒置荧光显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司)。

### 1.4 含药血清的制备

20 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组和参芪抑瘤方组各 10 只, 根据临床等效剂量<sup>[7]</sup>计算得出参芪抑瘤方组大鼠给药剂量为 39.9 g/(kg·d) 灌胃, 空白组大鼠给予 0.7 ml/(100 g·d) 的生理盐水灌胃。早晚各 1 次, 连续灌胃 7 天。末次给药 2 h 后使用 3% 戊巴比妥钠 5 ml/kg 麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 2 h,  $4$  °C、3000 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 15 min 后取血清, 经  $56$  °C 水浴锅灭活 30 min, 置于  $-20$  °C 冰箱保存备用。

### 1.5 细胞培养和分组

将冻存的 AGS 细胞置于  $37$  °C 水浴锅中快速解冻后, 置于 5 ml 离心管内, 再加入 1 ml 的完全培养基 (10% FBS 和 1% 青链霉素双抗),  $4$  °C、3000 r/min 离心 5 min, 离心半径 7.5 cm, 弃上清, 加入完全培养基后重悬混匀, 每 1 ml 悬液吸入 1 个 T25 培养瓶内, 每个培养瓶中再加入 4 ml 完全培养基, 置于细胞培养箱 ( $37$  °C、5%  $\text{CO}_2$ ) 中, 每 2 天换液 1 次, 每 3~4 天传代 1 次。待细胞长至 70%~80% 时将 AGS 细胞分为胃癌细胞组, 抑制剂组, 参芪抑瘤方高、中、低剂量组。

### 1.6 观察指标及方法

1.6.1 参芪抑瘤方含药血清干预时间筛选 采用 CCK-8 法检测 AGS 细胞存活率。将培养瓶中的细胞消化后计数, 按照每孔 2000~3000 个细胞加入 96 孔板中, 分为胃癌细胞组和参芪抑瘤方高、中、低剂量组, 每组设 6 个复孔。参芪抑瘤方高剂量组加入含 12% 参芪抑瘤方含药血清+3% 空白血清的培

培养基，参芪抑瘤方中剂量组加入含 6% 参芪抑瘤方含药血清+9% 空白血清的培养基，参芪抑瘤方低剂量组加入含 3% 参芪抑瘤方含药血清+12% 空白血清的培养基，参芪抑瘤方高、中、低剂量组参芪抑瘤方含药血清分别占总血清的 80%、40%、20%；胃癌细胞组加入含 15% 空白血清的培养基。设 3 个 96 孔板分别培养 24、48、72 h，加入 10 μl/孔 CCK-8 试剂，置于培养箱孵育 1~4 h 后，用酶标仪在 450 nm 波长处测各孔 OD 值，细胞存活率=（各含药血清孔 OD 值-空白孔 OD 值）/（空白血清孔 OD 值-空白孔 OD 值）。筛选细胞存活率最低且与相邻时间点比较差异有统计学意义的时间点为最佳干预时间。

1.6.2 抑制剂干预浓度筛选 按照每孔 2000~3000 个细胞加入 96 孔板中，XAV939 分别按 0、10、20、40、80、160 μmol/L 加入孔板，各浓度设 6 个复孔，每孔 200 μl 总体积。将两个 96 孔板置于培养箱中分别孵育 24 h 和 48 h。筛选最接近半数抑制浓度（IC<sub>50</sub>）的 XAV939 浓度为最佳干预浓度。

1.6.3 细胞划痕实验检测 AGS 细胞迁移、侵袭能力 取对数期生长的 AGS 细胞，以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞铺于 6 孔板中，每组设 3 个复孔。置于培养箱中，待其贴壁后融合率为 90%~100% 时，用 200 μl 移液器枪头匀速且垂直于孔板划 3 条平行直线，弃掉原培养基，用 PBS 清洗 3 遍。按照分组加入各组已配好的培养基，其中胃癌细胞组和参芪抑瘤方高、中、低剂量组同 1.6.1，抑制剂组加入筛选浓度的 XAV939。立即在显微镜下进行拍照，记为 0 h 的图像，后分别在 24 h 和 48 h 进行拍照。划痕迁移率（%）= [（0 h 划痕面积-目标时点划痕面积）/0 h 划痕面积] ×100%。

1.6.4 流式细胞术检测 AGS 细胞周期变化 将 1×10<sup>6</sup> 个 AGS 细胞接种于 6 孔板上，培养 24 h 后，用 PBS 清洗 2 遍。按照分组加入各组已配好的培养基（分组及给药剂量同 1.6.3），每组 3 个复孔。培养 48 h 后，按照细胞周期检测试剂盒说明书进行预处理，用流式细胞仪检测各组细胞周期，Flowjo 10.8 软件分析数据。

1.6.5 荧光免疫法检测 AGS 细胞中 Ki67 蛋白水平 取对数生长期的 AGS 细胞，置于载玻片上进行培养，待细胞贴壁长至 70%~80% 时，按照分组加入各组已配好的培养基（同 1.6.3），每组 3 个样本量，培养 48 h 后，用 4% 多聚甲醛固定，然后封闭、加入一抗 Ki67（1：1000），4℃过夜后洗涤，

加入二抗（1：5000）孵育 50 min，洗涤，加入 DAPI 染色 10 min，封片后在显微镜下进行图片采集，使用 Image J 1.53 软件得出光密度值（IOD）。

1.6.6 RT-qPCR 法检测 AGS 细胞中 *Wnt*、*β-catenin*、*GSK-3β*、*TCF* mRNA 表达 T25 培养瓶中细胞贴壁长至 70%~80% 时，按照分组加入各组已配好的培养基（同 1.6.3），每组 3 个样本量。培养 48 h 后，用移液枪将 T25 培养瓶中的培养基抽取干净，加入 1 ml PBS 洗涤后，按照 RNA 提取试剂盒说明书加入适量裂解液反复吹打混匀，直至看不到细胞团为止，收集至离心管中，提取各组细胞中的总 RNA，逆转录为 cDNA，反应条件为 25℃ 5 min、55℃ 15 min、85℃ 5 min，进行扩增，反应条件为 95℃ 预反应 5 min、95℃ 变性 10 s、60℃ 退火延伸 30 s，共循环 40 次。以 *GAPDH* 为内参，采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 *Wnt*、*β-catenin*、*GSK-3β*、*TCF* mRNA 表达量。引物由上海百赛生物科技股份有限公司合成，序列见表 1。

表 1 *Wnt*、*β-catenin*、*GSK-3β*、*TCF* mRNA 引物序列  
Table 1 *Wnt*, *β-catenin*, *GSK-3β*, *TCF* mRNA primer sequence

| 引物               |    | 序列                     | 碱基数 |
|------------------|----|------------------------|-----|
| <i>GSK-3β</i>    | 正向 | TGGTAGAAACCTGAGCCACTGA | 22  |
|                  | 反向 | AAACGGCATAACCCCTTGTA   | 21  |
| <i>TCF</i>       | 正向 | TTCCCGGACAACTTCCAGA    | 20  |
|                  | 反向 | ATGAGCAGATTGAAGCGGAGTA | 23  |
| <i>Wnt</i>       | 正向 | GCAGCTGTGATGATGTGGAATG | 23  |
|                  | 反向 | TCAATGGCTCCACGACAGAGA  | 21  |
| <i>β-catenin</i> | 正向 | CATCTAGCTCGGGATGTTTAC  | 22  |
|                  | 反向 | TCCTTGCTCTGAGCAAGTTTAC | 22  |
| <i>GAPDH</i>     | 正向 | GCACCGTCAAGGCTGAGAAC   | 20  |
|                  | 反向 | TGGTGAAGACGCCAGTGA     | 19  |

注：*GSK-3β*，糖原合成酶激酶 3β；*TCF*，T 细胞特异性因子；*Wnt*，无翅型 MMTV 整合位点家族成员；*β-catenin*，β-连环蛋白。

1.6.7 Western Blot 法检测 AGS 细胞中 *Wnt*、*β-catenin*、*GSK-3β*、*TCF* 蛋白水平 T25 培养瓶中细胞贴壁长至 70%~80% 时，按照分组加入各组已配好的培养基（同 1.6.3），每组 3 个样本量。培养 48 h 后取各组细胞，加入裂解液，冰上裂解 30 min，反复吹打后收集液体，离心取上清，进行 BCA 定量。电泳、转膜后在室温下封闭 2 h，加入一抗 *Wnt*（1：1000）、*β-catenin*（1：1000）、*GSK-3β*（1：1000）、*TCF*（1：1000），4℃过夜，洗膜后加入二抗（1：5000）孵育 1 h，洗膜 3 次后加发光液进行曝光，采集图像，使用 Image J 1.53 软件分析各蛋白条带灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法检验, 方差不齐时采用 Tamhane  $T^2$  法检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参芪抑瘤方含药血清干预时间筛选结果

表 2 示, 与胃癌细胞组同时间点比较, 参芪抑瘤方各剂量组各时间点细胞存活率均降低 ( $P<0.05$ ); 与参芪抑瘤方低剂量组同时间点比较, 除 72 h 参芪抑瘤方中剂量组之外, 其余各时间点参芪抑瘤方中、高剂量组细胞存活率均降低 ( $P<0.05$ ); 与参芪抑瘤方中剂量组同时间点比较, 参芪抑瘤方高剂量组 24 h、48 h 细胞存活率均降低 ( $P<0.05$ )。与本组 24 h 比较, 参芪抑瘤方各剂量组 48 h、72 h 细胞存活率均下降 ( $P<0.05$ ), 参芪抑瘤方各剂量组 48 h 与 72 h 比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。由于 48 h 与 72 h 的细胞存活率无明显差异, 故后续实验除细胞划痕实验外均选用 48 h 为干预时间点。

2.2 抑制剂干预浓度筛选结果

表 3 示, 除 24 h、10  $\mu\text{mol/L}$  外, 抑制剂各浓度干预的细胞存活率均低于同时间点 0  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ )。48 h 时, 除 0  $\mu\text{mol/L}$  外, 各浓度干预的细胞存活率均低于本浓度 24 h ( $P<0.05$ )。48 h 的  $\text{IC}_{50}$  值约为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 因此选择此浓度进行后续实验。

2.3 各组 AGS 细胞不同时间划痕迁移率比较

表 4 示, 与胃癌细胞组同时间点比较, 参芪抑瘤方高、中剂量组及抑制剂组 24 h, 参芪抑瘤方各剂量组及抑制剂组 48 h 划痕迁移率降低 ( $P<0.05$ ); 与抑制剂组同时间点比较, 24 h、48 h 参芪抑瘤方各剂量组划痕迁移率升高 ( $P<0.05$ ); 与参芪抑瘤方低剂量组同时间点比较, 参芪抑瘤方高、中剂量组 24 h, 参芪抑瘤方高剂量组 48 h 划痕迁移率均降低 ( $P<0.05$ ); 与参芪抑瘤方中剂量组同时间点比较, 参芪抑瘤方高剂量组 24 h、48 h 细胞划痕迁移率降低 ( $P<0.05$ ); 与本组 24 h 比较, 除参芪抑瘤方低剂量组之外, 其余各组细胞划痕迁移率均升高 ( $P<0.05$ )。各组不同时间 AGS 细胞迁移侵袭情况见图 1。

表 4 各组 AGS 细胞不同时间划痕迁移率比较

Table 4 Comparison of the migration rate of AGS cells with different time scratches in each group (% ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 孔数 | 24 h                           | 48 h                             |
|-----------|----|--------------------------------|----------------------------------|
| 胃癌细胞组     | 3  | 56.19±5.37                     | 72.00±4.58 <sup>a)</sup>         |
| 抑制剂组      | 3  | 20.52±1.91 <sup>a)</sup>       | 28.57±0.96 <sup>a)e)</sup>       |
| 参芪抑瘤方低剂量组 | 3  | 50.54±3.79 <sup>b)</sup>       | 58.12±6.43 <sup>a)b)</sup>       |
| 参芪抑瘤方中剂量组 | 3  | 42.80±4.65 <sup>a)b)c)</sup>   | 51.45±5.57 <sup>a)b)c)</sup>     |
| 参芪抑瘤方高剂量组 | 3  | 30.82±2.82 <sup>a)b)c)d)</sup> | 39.80±4.35 <sup>a)b)c)d)e)</sup> |

注: a) 与胃癌细胞组同时间点比较,  $P<0.05$ ; b) 与抑制剂组同时间点比较,  $P<0.05$ ; c) 与参芪抑瘤方低剂量组同时间点比较,  $P<0.05$ ; d) 与参芪抑瘤方中剂量组同时间点比较,  $P<0.05$ ; e) 与本组 24 h 比较,  $P<0.05$ 。

表 2 各组 AGS 细胞不同时间细胞存活率比较

Table 2 Comparison of the survival rate of AGS cells at different times in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 孔数 | 24 h                          | 48 h                             | 72 h                          |
|-----------|----|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 胃癌细胞组     | 6  | 1.00±0.06                     | 1.00±0.03                        | 1.00±0.07                     |
| 参芪抑瘤方低剂量组 | 6  | 0.90±0.01 <sup>a)</sup>       | 0.84±0.01 <sup>a) d)</sup>       | 0.82±0.06 <sup>a) d)</sup>    |
| 参芪抑瘤方中剂量组 | 6  | 0.84±0.03 <sup>a) b)</sup>    | 0.78±0.01 <sup>a) b) d)</sup>    | 0.77±0.06 <sup>a) d)</sup>    |
| 参芪抑瘤方高剂量组 | 6  | 0.76±0.03 <sup>a) b) c)</sup> | 0.73±0.04 <sup>a) b) c) d)</sup> | 0.72±0.06 <sup>a) b) d)</sup> |

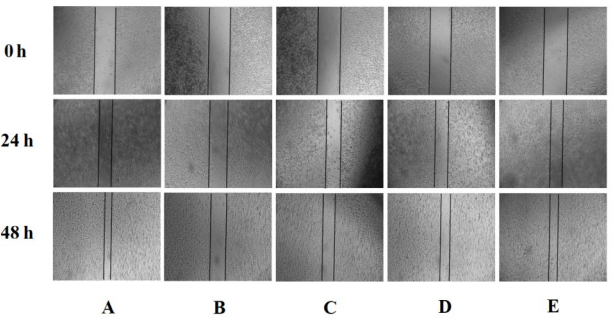
注: a) 与胃癌细胞组同时间点比较,  $P<0.05$ ; b) 与参芪抑瘤方低剂量组同时间点比较,  $P<0.05$ ; c) 与参芪抑瘤方中剂量组同时间点比较,  $P<0.05$ ; d) 与本组 24 h 比较,  $P<0.05$ 。

表 3 不同时间各浓度抑制剂干预 AGS 细胞存活率比较

Table 3 Comparison of the survival rate of AGS cells with different concentrations at different times in the inhibitor group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 时间   | 孔数 | 0 $\mu\text{mol/L}$ | 10 $\mu\text{mol/L}$       | 20 $\mu\text{mol/L}$       | 40 $\mu\text{mol/L}$       | 80 $\mu\text{mol/L}$       | 160 $\mu\text{mol/L}$      |
|------|----|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 24 h | 6  | 1.01±0.09           | 0.90±0.06                  | 0.83±0.09 <sup>a)</sup>    | 0.73±0.03 <sup>a)</sup>    | 0.66±0.15 <sup>a)</sup>    | 0.53±0.11 <sup>a)</sup>    |
| 48 h | 6  | 1.00±0.14           | 0.76±0.07 <sup>a) b)</sup> | 0.51±0.07 <sup>a) b)</sup> | 0.41±0.05 <sup>a) b)</sup> | 0.29±0.08 <sup>a) b)</sup> | 0.25±0.10 <sup>a) b)</sup> |

注: a) 与 0  $\mu\text{mol/L}$  同时间点比较,  $P<0.05$ ; b) 与本浓度 24 h 比较,  $P<0.05$ 。



注：A，胃癌细胞组；B，抑制剂组；C，参芪抑瘤方高剂量组；D，参芪抑瘤方中剂量组；E，参芪抑瘤方低剂量组；图中黑线为划痕后细胞迁移、侵袭的最前端。

图1 各组AGS细胞不同时间迁移、侵袭情况（×40）  
Figure 1 Migration and invasion of AGS cells at different times in each group（×40）

2.4 各组AGS细胞周期分布情况比较

表5示，与胃癌细胞组比较，参芪抑瘤方高、中剂量组及抑制剂组细胞周期G1期比例升高，S期、G2期比例降低（ $P<0.05$ ）；与抑制剂组比较，参芪抑瘤方各剂量组细胞周期G1期比例降低、G2期比例升高，参芪抑瘤方中、低剂量组S期比例升高（ $P<0.05$ ）；与参芪抑瘤方低剂量组比较，参芪抑瘤方高、中剂量组细胞周期G1期比例升高、G2期比例降低，参芪抑瘤方高剂量组S期比例降低（ $P<0.05$ ）；与参芪抑瘤方中剂量组比较，参

芪抑瘤方高剂量组细胞周期G1期比例升高，G2期比例降低（ $P<0.05$ ）。

2.5 各组AGS细胞中Ki67、Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF蛋白水平比较

表6示，与胃癌细胞组比较，参芪抑瘤方高剂量组及抑制剂组Ki67、Wnt、β-catenin、TCF蛋白水平降低，GSK-3β蛋白水平升高，参芪抑瘤方中剂量组Ki67、β-catenin蛋白水平降低，GSK-3β蛋白水平升高（ $P<0.05$ ）；与抑制剂组比较，参芪抑瘤方中剂量组GSK-3β蛋白水平降低，Ki67蛋白水平升高，参芪抑瘤方低剂量组Ki67、β-catenin、TCF蛋白水平升高，GSK-3β蛋白水平降低（ $P<0.05$ ）；与参芪抑瘤方低剂量组比较，参芪抑瘤方高剂量组Ki67蛋白水平降低，GSK-3β蛋白水平升高（ $P<0.05$ ）。各组细胞中Ki67蛋白免疫荧光图见图2，各组细胞中Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF蛋白电泳图见图3。

2.6 各组AGS细胞中Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF mRNA表达比较

表7示，与胃癌细胞组比较，参芪抑瘤方高剂量组及抑制剂组Wnt、β-catenin和TCF mRNA表达降低，GSK-3β mRNA表达升高，参芪抑瘤方中剂量组Wnt、β-catenin mRNA表达降低，GSK-3β mRNA

表5 各组AGS细胞周期分布情况比较  
Table 5 Comparison of AGS cell cycle distribution among groups (% ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 孔数 | G1期                               | S期                          | G2期                               |
|-----------|----|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 胃癌细胞组     | 3  | 35.57±1.19                        | 32.10±2.93                  | 27.37±0.64                        |
| 抑制剂组      | 3  | 47.24±1.10 <sup>a)</sup>          | 21.17±2.15 <sup>a)</sup>    | 18.67±1.45 <sup>a)</sup>          |
| 参芪抑瘤方低剂量组 | 3  | 36.97±0.49 <sup>b)</sup>          | 28.93±1.72 <sup>b)</sup>    | 26.63±0.81 <sup>b)</sup>          |
| 参芪抑瘤方中剂量组 | 3  | 40.47±1.00 <sup>a) b) c)</sup>    | 26.80±1.11 <sup>a) b)</sup> | 24.13±1.97 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 参芪抑瘤方高剂量组 | 3  | 43.60±1.51 <sup>a) b) c) d)</sup> | 23.60±0.26 <sup>c)</sup>    | 21.00±0.70 <sup>a) b) c) d)</sup> |

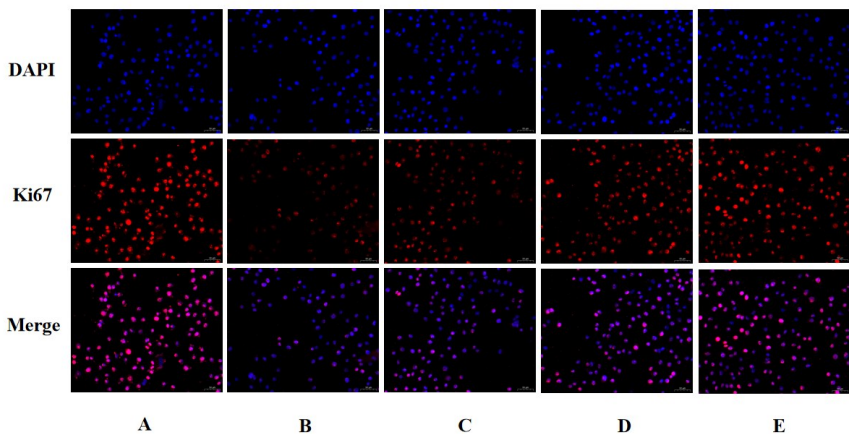
注：a) 与胃癌细胞组比较， $P<0.05$ ；b) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；c) 与参芪抑瘤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与参芪抑瘤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

表6 各组AGS细胞中Ki67、Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF蛋白水平比较  
Table 6 Comparison of Ki67, Wnt, β-catenin, GSK-3β, and TCF protein levels in AGS cells of each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 孔数 | Ki67/IOD                    | Wnt/GAPDH               | β-catenin/GAPDH         | GSK-3β/GAPDH               | TCF/GAPDH               |
|-----------|----|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 胃癌细胞组     | 3  | 21.37±4.43                  | 1.79±0.50               | 1.44±0.53               | 0.26±0.21                  | 2.05±0.77               |
| 抑制剂组      | 3  | 3.47±0.52 <sup>a)</sup>     | 0.73±0.35 <sup>a)</sup> | 0.51±0.14 <sup>a)</sup> | 3.40±0.22 <sup>a)</sup>    | 0.48±0.23 <sup>a)</sup> |
| 参芪抑瘤方低剂量组 | 3  | 17.08±3.13 <sup>b)</sup>    | 1.41±0.44               | 1.09±0.26 <sup>b)</sup> | 1.07±0.61 <sup>b)</sup>    | 1.58±0.56 <sup>b)</sup> |
| 参芪抑瘤方中剂量组 | 3  | 13.36±1.04 <sup>a) b)</sup> | 1.23±0.49               | 0.83±0.08 <sup>a)</sup> | 1.78±0.68 <sup>a) b)</sup> | 1.22±0.42               |
| 参芪抑瘤方高剂量组 | 3  | 7.49±1.44 <sup>a) c)</sup>  | 0.80±0.32 <sup>a)</sup> | 0.67±0.16 <sup>a)</sup> | 2.58±0.52 <sup>a) c)</sup> | 0.85±0.30 <sup>a)</sup> |

注：Ki67，增殖细胞核抗原；Wnt，无翅型MMTV整合位点家族成员；β-catenin，β-连环蛋白；GSK-3β，糖原合成酶激酶3β；TCF，T细胞特异性因子。

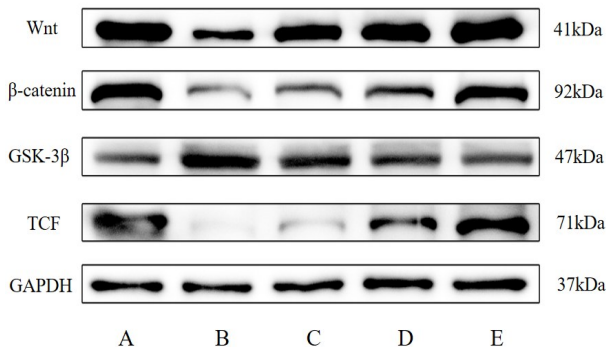
a) 与胃癌细胞组比较， $P<0.05$ ；b) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；c) 与参芪抑瘤方低剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：A，胃癌细胞组；B，抑制剂组；C，参芪抑瘤方高剂量组；D，参芪抑瘤方中剂量组；E，参芪抑瘤方低剂量组；Ki67，增殖细胞核抗原；图中红色荧光为Ki67蛋白。

图2 各组AGS细胞中Ki67蛋白免疫荧光图(×200)

Figure 2 Immunofluorescence of Ki67 protein in AGS cells of each group (×200)



注：Wnt，无翅型MMTV整合位点家族成员；β-catenin，β-连环蛋白；GSK-3β，糖原合成酶激酶3β；TCF，T细胞特异性因子；A，胃癌细胞组；B，抑制剂组；C，参芪抑瘤方高剂量组；D，参芪抑瘤方中剂量组；E，参芪抑瘤方低剂量组。

图3 各组AGS细胞中Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Wnt, β-catenin, GSK-3β, and TCF proteins in AGS cells of each group

表达升高 ( $P<0.05$ )；与抑制剂组比较，参芪抑瘤方各剂量组 *TCF* mRNA 表达升高，*GSK-3β* mRNA 表达降低，参芪抑瘤方中、低剂量组 *Wnt*、*β-catenin*

mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ )；与参芪抑瘤方低剂量组比较，参芪抑瘤方高、中剂量组 *Wnt*、*β-catenin* mRNA 表达降低，*GSK-3β* mRNA 表达升高，参芪抑瘤方高剂量组 *TCF* mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ )；与参芪抑瘤方中剂量组比较，参芪抑瘤方高剂量组 *Wnt*、*β-catenin* mRNA 表达降低，*GSK-3β* mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

中医学将PLGC归为“胃痞”“嘈杂”“虚痞”等范畴，以脾胃虚弱、瘀毒内阻为主要病机，治法当扶正祛邪、化瘀解毒<sup>[8]</sup>。参芪抑瘤方中黄芪补肺健脾，扶正益气，苦参清热燥湿，共为君药；土贝母化痰散结，当归补血活血，山慈菇清热化痰、软坚散结，共为臣药；莪术行气破血、消积止痛，白术健脾益气燥湿，枳壳理气宽中、行滞消胀，共为佐药；八月札活血化瘀、消肿止痛，半枝莲清热解毒、祛痰散瘀，人参补脾益肺、大补元气，共为使药。诸药相配，攻补兼施，共奏益气扶正、清热解

表7 各组AGS细胞中Wnt、β-catenin、GSK-3β、TCF mRNA表达比较

Table 7 Comparison of Wnt, β-catenin, GSK-3β and TCF mRNA expression in AGS cells of each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 孔数 | Wnt                           | β-catenin                     | GSK-3β                           | TCF                           |
|-----------|----|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 胃癌细胞组     | 3  | 1.00±0.06                     | 1.00±0.06                     | 1.00±0.11                        | 1.00±0.15                     |
| 抑制剂组      | 3  | 0.39±0.03 <sup>a)</sup>       | 0.32±0.02 <sup>a)</sup>       | 1.90±0.05 <sup>a)</sup>          | 0.35±0.02 <sup>a)</sup>       |
| 参芪抑瘤方低剂量组 | 3  | 0.96±0.08 <sup>b)</sup>       | 1.00±0.07 <sup>b)</sup>       | 1.03±0.12 <sup>b)</sup>          | 0.92±0.03 <sup>b)</sup>       |
| 参芪抑瘤方中剂量组 | 3  | 0.84±0.04 <sup>a) b) c)</sup> | 0.58±0.04 <sup>a) b) c)</sup> | 1.50±0.04 <sup>a) b) c)</sup>    | 0.69±0.08 <sup>b)</sup>       |
| 参芪抑瘤方高剂量组 | 3  | 0.48±0.06 <sup>a) c) d)</sup> | 0.40±0.03 <sup>a) c) d)</sup> | 1.69±0.03 <sup>a) b) c) d)</sup> | 0.51±0.04 <sup>a) b) c)</sup> |

注：Wnt，无翅型MMTV整合位点家族成员；β-catenin，β-连环蛋白；GSK-3β，糖原合成酶激酶3β；TCF，T细胞特异性因子。

a) 与胃癌细胞组比较， $P<0.05$ ；b) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；c) 与参芪抑瘤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与参芪抑瘤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

毒、化痰散结补之功。

AGS 细胞是人胃腺癌组织中最常见的细胞之一,具有一定的增殖能力和分化潜能,与 PLGC 中细胞的异常增殖和分化状态相似,因此,AGS 细胞在一定程度上可以模拟 PLGC 向胃癌进展过程中的细胞变化,为研究 PLGC 的机制提供了合适的细胞模型<sup>[9]</sup>。基于此,本研究选择 AGS 细胞模型进行 PLGC 的研究。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在胃癌的发生发展中起着关键作用,是调控 PLGC 的关键信号通路之一,该通路的异常激活可导致细胞增殖失控,促进肿瘤的发生和发展<sup>[10]</sup>。当机体处于正常状态,Wnt 信号没有被激活时,该通路处于沉默状态,包括 GSK-3 $\beta$  在内的降解复合物介导  $\beta$ -catenin 的磷酸化,促使其被蛋白酶体识别而降解,从而保证  $\beta$ -catenin 的正常水平。当 Wnt 信号异常激活时,降解复合物的形成受到抑制,导致  $\beta$ -catenin 表达升高,与细胞核内的 TCF/淋巴增强结合因子(LEF)相互作用,从而调节下游靶基因<sup>[11]</sup>。GSK-3 $\beta$  的表达增加与 Wnt 通路的抑制密切相关,该通路受到抑制后,会进一步降低细胞核内  $\beta$ -catenin 的表达,并诱导细胞发生凋亡,同时对细胞的增殖、迁移以及侵袭等行为起到抑制作用,最终发挥出针对 PLGC 的治疗作用<sup>[12]</sup>。Ki67 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的下游靶基因,发挥着调控核分裂与增殖的相关功能,常被视为肿瘤细胞增殖活动的可靠标志物<sup>[13]</sup>,抑制 Ki67 的表达能够显著抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,进而发挥治疗或延缓 PLGC 进展的作用<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示,参芪抑瘤方各剂量组各时间点 AGS 细胞存活率均较胃癌细胞组下降,且随含药血清浓度的增加细胞存活率逐渐降低,提示参芪抑瘤方含药血清可抑制 AGS 细胞增殖,且筛选出本研究后续实验除细胞划痕实验外均选用 48 h 为最佳干预时间点。细胞划痕迁移率除 24 h 参芪抑瘤方低剂量组之外,各剂量组各时间点均较胃癌细胞组下降,提示参芪抑瘤方含药血清可抑制 AGS 细胞迁移与侵袭。参芪抑瘤方高、中剂量组细胞周期 G1 期比例均较胃癌细胞组升高,提示参芪抑瘤方含药血清可将细胞周期阻滞在 G1 期。参芪抑瘤方高剂量组较胃癌细胞组 Wnt、 $\beta$ -catenin、TCF 和 Ki67 蛋白水平及 Wnt、 $\beta$ -catenin、TCF mRNA 表达降低,GSK-3 $\beta$  蛋白水平及其 mRNA 升高,提示参芪抑瘤方高剂量能够通过下调 Wnt、 $\beta$ -catenin、TCF 和 Ki67 的表达,上调 GSK-3 $\beta$  的表达,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路活性,从而发挥抗细胞增殖的作

用。予以 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂 XAV939 进行干预后,同样出现上述结果及趋势,说明参芪抑瘤方与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂 XAV939 有类似作用,即参芪抑瘤方可能通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路来抑制 AGS 细胞增殖、迁移及侵袭,进而发挥治疗 PLGC 的作用。

综上所述,参芪抑瘤方可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路来抑制 AGS 细胞的增殖、迁移与侵袭,将细胞周期阻滞在 G1 期,进而发挥治疗 PLGC 的作用,且以高剂量效果最好。但本研究仅使用通路抑制剂开展了体外实验,在后续研究中我们将会采用 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路关键蛋白敲除的细胞结合参芪抑瘤方含药血清的干预,进一步证实参芪抑瘤方通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路来影响 AGS 细胞的迁移、侵袭和周期。

## 参考文献

- [1]WANG FH, ZHANG XT, LI YF, et al. The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(8): 747-795.
- [2]XU W, LI B, XU M, et al. Traditional Chinese medicine for precancerous lesions of gastric cancer: a review [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112542. doi: 10.1016/j.biopha. 2021. 112542.
- [3]中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告(非根除治疗部分) [J]. 胃肠病学, 2022, 27(5): 289-304.
- [4]齐姗姗,王旭旭,武纪生,等. 参芪抑瘤方联合幽门螺杆菌根治方案对幽门螺杆菌阳性胃癌前病变患者疗效及血清 GAS、TRX-1、C-myc 蛋白表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(2): 194-197.
- [5]马春林,吴红彦,李海龙,等. 参芪抑瘤方药物血清对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(3): 53-56.
- [6]CHEN J, WANG X, ZHANG J, et al. Effects of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2023, 2023: 9824340. doi: 10.1155/2023/9824340.
- [7]施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000: 612.
- [8]张瑞芬,王智业,党林林,等. 慢性萎缩性胃炎中医病因病机及证候分型的研究近况[J]. 中医临床研究, 2022, 14(6): 86-88, 96.
- [9]ZENG Z, NIAN Q, CHEN N, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in gastric precancerous lesions through downregulation of Glut1 and Glut4 [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112086. doi: 10.1016/j.bio-

- pha. 2021. 112086.
- [10] WU Q, MA J, WEI J, et al. lncRNA SNHG11 promotes gastric cancer progression by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin path way and oncogenic autophagy[J]. Mol Ther, 2021, 29(3):1258–1278.
- [11] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, 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.
- [12] LIAO W, WEN Y, WANG J, et al. Gallic acid alleviates gastric precancerous lesions through inhibition of epithelial mesenchymal transition via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302 (Pt A): 115885. doi: 10.1016/j.jep. 2022. 115885.
- [13] ZHU Y, WANG J, WANG J, et al. Application of serum gastric function markers and digestive tumor indices to the diagnosis of early gastric cancer and precancerous lesions[J]. Saudi Med J, 2023, 44(8):795–800.
- [14] ZHANG SX, TIAN W, LIU YL, et al. Mechanism of N-Methyl-N-Nitroso-Urea-Induced gastric precancerous lesions in mice[J]. J Oncol, 2022, 2022:3780854. doi: 10.1155/2022/3780854.

### Effect of *Shenqi Yiliu Formula* (参芪抑瘤方) Drug-Containing Serum on the Cycle of Gastric Cancer Cell AGS and Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway

WEI Na<sup>1</sup>, GUO Chongyuan<sup>2</sup>, BAI Min<sup>1</sup>, AN Yaorong<sup>1</sup>, ZHANG Sichao<sup>1</sup>, WU Liyang<sup>1</sup>, DUAN Yongqiang<sup>3</sup>

1. Gansu Provincial Engineering Laboratory of Traditional Chinese Medicine New Product Creation, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; 2. Key Laboratory of Gansu Provincial Prescription Mining and Innovative Translational Laboratory; 3. Traditional Chinese Medicine College, Ningxia Medical University

**ABSTRACT Objective** To investigate the potential mechanism of *Shenqi Yiliu Formula* (参芪抑瘤方) in treating precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods** The CCK-8 assay was used to determine the optimal intervention time for *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum and the concentration of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibitor XAV939 depends on the survival rate of AGS gastric cancer cell line. AGS cells were divided into the gastric cancer cell group (15% blank serum), inhibitor group (selected concentration of XAV939), high-dose *Shenqi Yiliu Formula* group (12% *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum + 3% blank serum), medium-dose *Shenqi Yiliu Formula* group (6% *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum + 9% blank serum), and low-dose *Shenqi Yiliu Formula* group (3% *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum + 12% blank serum). Each group was tested in triplicate. After culturing for 24 and 48 hours, cell migration and invasion were assessed by scratch assays; after a selected intervention period (48 hours), cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry, Ki67 protein levels were detected by immunofluorescence, the protein levels of Wnt,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ , and intranuclear T-cell specific factor (TCF) were measured by the protein immunoblotting assay, and the mRNA expressions of these above factors were determined by quantitative real-time PCR. **Results** The optimal intervention time for *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum was determined to be 48 hours, and the effective concentration of XAV939 was 20  $\mu$ mol/L. Compared with the gastric cancer cell group, *Shenqi Yiliu Formula* at all doses reduced the cell migration rate at 24 and 48 hours ( $P < 0.05$ ), except for the low-dose group at 24 hours. Compared to the low-dose group at corresponding time points, high- and medium-dose *Shenqi Yiliu Formula* groups showed significantly reduced migration rates, particularly the high-dose group at 48 hours ( $P < 0.05$ ). Compared with the gastric cancer cell group, the high-dose *Shenqi Yiliu Formula* and inhibitor groups exhibited reduced protein and mRNA levels of Wnt,  $\beta$ -catenin, and TCF, along with reduced Ki67 protein levels and a decreased proportion of cells in the S and G2 phases of the cell cycle, but GSK-3 $\beta$  protein levels, GSK-3 $\beta$  mRNA expression, and the proportion of cells in the G1 phase increased ( $P < 0.05$ ). Compared to the inhibitor group, the high-dose *Shenqi Yiliu Formula* group showed a decreased proportion of G1-phase cells and an increased proportion of G2-phase cells ( $P < 0.05$ ), although differences in Wnt and  $\beta$ -catenin protein levels and mRNA expressions were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** *Shenqi Yiliu Formula* drug-containing serum inhibits the migration and invasion of gastric cancer AGS cells and block the cell cycle at G1 phase, and its underlying mechanism may be related to the regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Keywords** precancerous lesions of gastric cancer; *Shenqi Yiliu Formula* (参芪抑瘤方); gastric cancer cells; cell migration; cell cycle; Wnt family;  $\beta$ -catenin

(收稿日期: 2024-10-24; 修回日期: 2024-11-30)

[编辑: 王利芬]