

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.01.002

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211021.1140.003.html>(2021-10-21)

左金丸调控 AMPK/mTOR 通路介导的自噬
途径逆转胃癌耐药机制研究*

刘 艳,孙 健[△]

(上海中医药大学附属曙光医院检验科 201203)

[摘要] **目的** 探讨左金丸对胃癌细胞自噬及耐药性的影响,并分析可能机制。**方法** 体外培养人胃癌细胞株 SNU-1、SNU-1/5-氟尿嘧啶(5-FU)细胞,采用四甲基偶氮唑盐法检测 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞存活率,并计算药物半数抑制浓度(IC₅₀);将 5-FU 处理的细胞分为 SNU-1 组、SNU-1/5-FU 组、左金丸组和左金丸联合自噬激活剂组。采用流式 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡率;透射电镜下观察各组细胞自噬体并计算自噬体中自噬泡占细胞浆总面积百分比;免疫印迹法检测凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)]、自噬相关蛋白微管相关蛋白[1 轻链 3- I (LC3- I)、LC3- II 、家蚕隔离体蛋白 1 (p62)]及 AMP 激活蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)通路相关蛋白水平。**结果** SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞 IC₅₀ 分别为 19.05、45.07 μg/mL,耐药指数为 2.36;与 SNU-1 组比较,SNU-1/5-FU 组细胞凋亡率、Bcl-2、p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达均明显降低,Bax、LC3- II /LC3- I 比值、p-AMPK/AMPK 表达均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 SNU-1/5-FU 组比较,左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率、Bcl-2、p62、p-mTOR/mTOR 蛋白水平均明显升高,自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积、Bax、LC3- II /LC3- I 比值、p-AMPK/AMPK 表达均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率、Bcl-2、p62、p-mTOR/mTOR 水平均明显降低,自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积、Bax、LC3- II /LC3- I 比值、p-AMPK/AMPK 表达均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 左金丸可抑制 SNU-1/5-FU 细胞增殖并诱导凋亡,减弱 SNU-1/5-FU 细胞对 5-FU 的耐药性,可能是通过抑制 AMPK/mTOR 通路活化进而抑制细胞自噬实现的。

[关键词] 左金丸;自噬;胃癌细胞;耐药;AMP 激活蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)01-0006-06

Study on mechanism of Zuojin Pill in reversing drug resistance of gastric cancer
by regulating AMPK/mTOR pathway-mediated autophagy approach*

LIU Yan,SUN Jian[△]

(Department of Clinical Laboratory,Affiliated Shuguang Hospital,Shanghai University of
Traditional Chinese Medicine,Shanghai 201203,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Zuojin Pill on autophagy and drug resistance of gastric cancer cells,and to analyze the possible mechanism. **Methods** Human gastric cancer cell lines SNU-1 and SNU-1/5-FU were cultured in vitro. The survival rates of SNU-1 and SNU-1/5-FU cells were detected by MTT assay,and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated;the cells treated with 5-FU were divided into the SNU-1 group,SNU-1/5-FU group,Zuojin Pill group and Zuojin Pill + autophagy activator group. The apoptotic rate of SNU-1/5-FU cells in each group was detected by the flow-based Annexin V-FITC/PI double staining;the autophagosomes in each group were observed under transmission electron microscope and the percentage of autophagic vesicles in the total cytoplasmic area was calculated;the levels of apoptosis related proteins [B-cell lymphoma-2 (Bcl-2),Bcl-2 associated X protein (Bax)],autophagy related proteins [microtubule-associated protein 1 light chain 3- I (LC3- I),microtubule-associated protein 1 light chain

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82074185)。 作者简介:刘艳(1975—),主管技师,本科,主要从事检验医学研究。 [△] 通信作者,E-mail:yamaca@163.com。

3-Ⅱ (LC3-Ⅱ), sequestosome-1 (p62)] and AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) pathway related proteins were detected by Western blot. **Results** IC₅₀ of SNU-1 and SNU-1/5-FU cells were 19.05 μg/mL and 45.07 μg/mL, respectively, with a resistance index of 2.36; compared with those in the SNU-1 group, the apoptosis rate, Bcl-2, p62 and p-mTOR/mTOR protein expression in the SNU-1/5-FU group were significantly decreased, Bax, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio and p-AMPK/AMPK expression were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); compared with the SNU-1/5-FU group, the apoptosis rate, Bcl-2, p62 and p-mTOR/mTOR protein levels in the Zuojin Pill group and Zuojin Pill+ autophagy activator group were significantly increased ($P < 0.05$), the number of autophagosomes, total area of autophagic vesicles/cytoplasm, Bax, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio and p-AMPK/AMPK expression were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); compared with the Zuojin Pill group, the apoptosis rate, Bcl-2, p62 and p-mTOR/mTOR levels in the Zuojin Pill+ autophagy activator group were significantly decreased, the number of autophagosomes, total area of autophagic vesicles/cytoplasm, Bax, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio and p-AMPK/AMPK expression were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Zuojin Pill can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SNU-1/5-FU cells, weaken the resistance of SNU-1/5-FU cells to 5-FU, which may be achieved by inhibiting the activation of AMPK/mTOR pathway and then inhibiting autophagy.

[Key words] Zuojin Pill; autophagy; gastric cancer cells; drug resistance; AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway

胃癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,早期发病隐匿,缺乏有效诊断指标,大多数患者确诊时往往已是中晚期,并出现远处转移症状,具有高病死率且预后差等特点^[1-2]。目前主要采取手术及放、化疗等手段治疗,其中 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是进展期胃癌常用的一线基础化疗药物,但随着用药时间的延长,患者易出现耐药现象,不利于化疗的持久进行^[3]。因此,如何逆转胃癌化疗耐药仍是国内外学者研究的热点。自噬是参与细胞生长、分化及死亡,维持细胞内环境稳态的重要调控机制^[4]。张玉梅等^[5]研究表明,抑制胃癌 BGC823 细胞自噬能诱导细胞凋亡,增加细胞化疗敏感性。有研究表明,胃黏膜损伤是胃癌癌前病变的主要表现^[6]。左金丸是中医经典名方,方中主药黄连和吴茱萸的主要成分小檗碱、吴茱萸次碱等均能保护胃黏膜,对防治胃癌具有一定的作用^[7]。既往研究表明,左金丸可抑制胃癌耐药细胞 SGC-7901/顺铂(DDP)的增殖,增加化疗敏感性^[8]。戚笑笑^[9]研究表明,左金丸能显著抑制饥饿状态肺癌 A549 细胞自噬,抑制细胞增殖。目前,有关左金丸对胃癌耐药影响的相关机制尚未明确,因此,本研究探讨左金丸对胃癌细胞耐药及自噬的影响,以期有效提高胃癌化疗效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人胃癌细胞株 SNU-1(bio-73415)购自北京百欧博伟生物技术有限公司。5-FU 注射液(0.25 g/10 mL)购自山西亚宝药业集团股份有限公司;雷帕霉素(YT1833, 25 mg)购自北京伊塔生物科技有限公司;

黄连药材(190973)、吴茱萸药材(200508)均购自亳州市誉仁堂药业有限公司;左金丸醇提物制备方法为分别取黄连、吴茱萸药材 1 800、300 g,加 8 倍量 75%乙醇,回流提取 2 次(每次 1 h),合并提取液并回收乙醇,减压干燥,得左金丸醇提物干粉 558 g,回收率为 26.57%。5-3-2(4,5-二甲基噻唑-2)-2-四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 1120-02-1)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(CA1020)均购自美国 Sigma 公司;兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, BYFG-70R-36053)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax, ATA25290)、RM-9106 微管相关蛋白 1 轻链 3-Ⅰ(microtubule-associated protein 1 light chain 3-Ⅰ, LC3-Ⅰ)抗体(H00008650-A01)、LC3-Ⅱ(FNab04717)、家蚕隔离体蛋白 1(sequestosome-1, p62)抗体(H00008650-A01)、AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抗体(ab51520)、p-AMPK 抗体(ATA32549)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR, ATA33361)、p-mTOR(IC194464)、山羊抗兔 HRP(F030222)二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。荧光倒置显微镜(型号 CKX41-A32FL/PH)购自上海巴玖实业有限公司;流式细胞仪(型号 CytoFLEX)购自美国 Beckman 公司;Tecna 20 U-Twin 型透射电镜购自美国 ThermoFisher 公司;酶标仪(型号 ELx800)购自上海嘉鹏科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人 SNU-1 细胞株培养于含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 37 ℃ 饱和湿度、5% 二氧化碳及 95% 氧气培养箱中, 进行传代培养, 每 2~3 天换液, 利用 5-FU 浓度梯度法建立 5-FU 耐药细胞株, 以 4.0 μg/mL 5-FU 维持细胞耐药性。SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞均采用 5-FU 培养, 进行后续实验。

1.2.2 细胞分组及处理

取对数生长期的 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞, 均在培养基中加入终质量浓度为 0、10、20、30、40、50 μg/mL 的 5-FU 溶液, 培养 48 h。采用 MTT 法检测细胞耐药性, 将细胞接种于 24 孔板(2.5×10⁵ 个/孔) 进行培养, 分别培养 48 h 后向各孔加入 MTT(5 g/L) 20 μL, 4 h 后弃上清液, 加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO), 振荡、溶解。在酶标仪 490 nm 处测定各孔细胞吸光度(A)值, 重复 3 次, 取平均值, 绘制生长曲线, 细胞存活率(%)=(药物处理组 A 值/药物未处理组 A 值)×100%。采用线性回归法计算药物半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC₅₀)。采用 SNU-1 细胞 IC₅₀ 时的 5-FU 质量浓度(19.05 μg/mL) 溶液处理 SNU-1(SNU-1 组)、SNU-1/5-FU(SNU-1/5-FU 组)细胞, 处理后的 SNU-1/5-FU 细胞分为左金丸组(加入含 100 μg/mL 左金丸溶液^[8] 培养基继续培养 48 h)和左金丸联合自噬激活剂组(加入含 100 μg/mL 左金丸溶液及 250 nmol/L 自噬激活剂——雷帕霉素^[10] 培养基, 继续培养 48 h)。收集细胞供后续实验。

1.2.3 流式细胞术检测 SNU-1/5-FU 细胞凋亡率

取 1.2.2 项培养 48 h 的各组 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞接种于 24 孔板(2.5×10⁵ 个/孔), 参照 Annexin-V FITC/PI 试剂盒说明书, 以 5 μL PI、5 μL AnnexinV-FITC 双染试剂 4 ℃ 避光染色 30 min, 稀释; 采用流式细胞仪检测 SNU-1/5-FU 细胞凋亡率。每组设 6 个复孔, 重复 3 次。

1.2.4 透射电镜下观察自噬体

收集 1.2.2 项培养 48 h 的各组 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞分别接种于 24 孔板(2.5×10⁵ 个/孔), 胰酶消化(0.25%), 细胞密度达 70%~80% 时刮取细胞, 离心 10 min, 细胞沉淀采用磷酸盐缓冲溶液清洗, 2.5% 戊二醛固定, 4 ℃ 冰箱保存过夜, 50% 乙醇常规脱水, 环氧树脂包埋, 60 ℃ 聚合 48 h, 切片(厚度 80 nm), 枸橼酸铅染色, 置于透射电镜下观察自噬体, 采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件检测, 计算自噬体自噬泡/细胞质总面积。

1.2.5 免疫印迹法检测凋亡、自噬相关蛋白及 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达情况

收集 1.2.2 项培养 48 h 的各组 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞以 RIPA 裂解并提取总蛋白, 检测浓度及纯度, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法进

行电泳, 转膜, 放入脱脂奶粉(5%)溶液室温封闭 2 h, 分别加入一抗凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)、自噬相关蛋白(LC-3、p62)、AMPK/mTOR 通路相关蛋白(AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR)和内参 β-actin, 均为 1:500 的稀释比, 4 ℃ 过夜, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(1:1000), 室温孵育 1 h, 显影、定影, 分析各蛋白含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析、SNK-q 检验等。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SNU-1/5-FU 细胞耐药性

随 5-FU 质量浓度的增加, SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞增殖率下降, SNU-1 的半数抑制浓度(IC₅₀) 为 19.05 μg/mL, SNU-1/5-FU 的 IC₅₀ 为 45.07 μg/mL, 耐药指数为 2.36。见图 1、表 1。

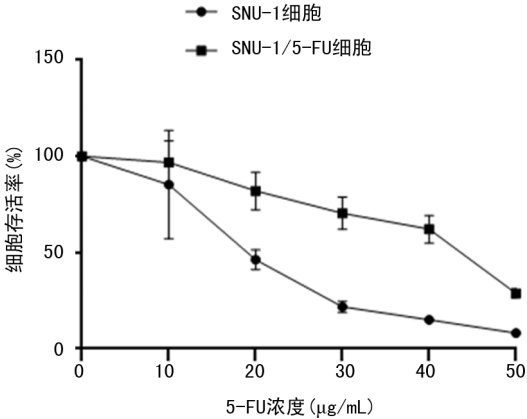


图 1 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞在 5-FU 作用下的细胞存活率

表 1 SNU-1、SNU-1/5-FU 细胞在 5-FU 作用下的细胞存活率($\bar{x} \pm s$)

质量浓度(μg/mL)	存活率(%)	
	SNU-1 细胞	SNU-1/5-FU 细胞
0	100.00±0	100.00±0
10	76.33±9.15	93.77±11.25
20	43.27±5.19	82.12±9.85
30	22.79±2.73	70.38±8.45
40	15.11±1.82	60.15±7.21
50	8.23±0.99	20.77±2.45

2.2 SNU-1/5-FU 细胞凋亡情况

SNU-1 组、SNU-1/5-FU 组、左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率分别为(31.63±3.59)%、(7.58±1.59)%、(21.16±4.31)%、(15.92±3.45)%。与 SNU-1 组比较, SNU-1/5-FU 组细胞凋亡率明显降低, 与 SNU-1/5-FU 组比较, 左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率均明显

升高,与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.3 SNU-1/5-FU 细胞自噬情况

SNU-1 组、SNU-1/5-FU 组、左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组自噬泡/细胞质总面积分别为 $(2.83\pm0.40)\%$ 、 $(8.69\pm1.30)\%$ 、 $(3.98\pm0.56)\%$ 、

$(5.03\pm0.76)\%$ 。与 SNU-1 组比较,SNU-1/5-FU 组自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积均明显增加;与 SNU-1/5-FU 组比较,左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积均明显减少;与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

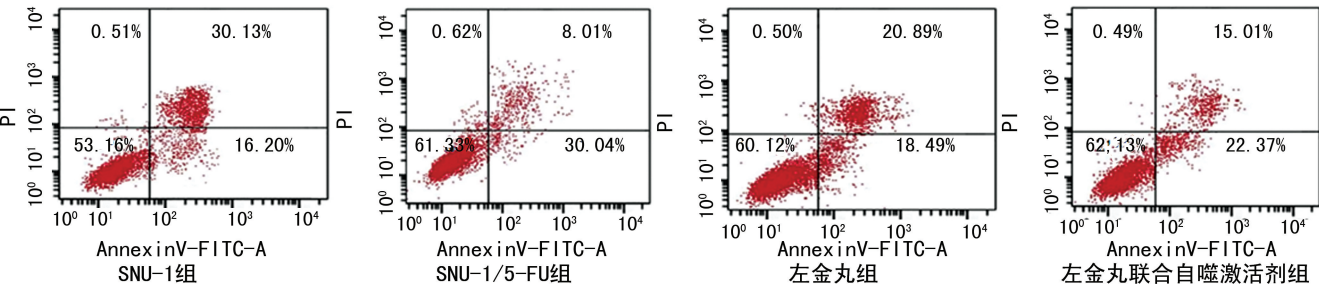


图 2 各组细胞凋亡情况比较

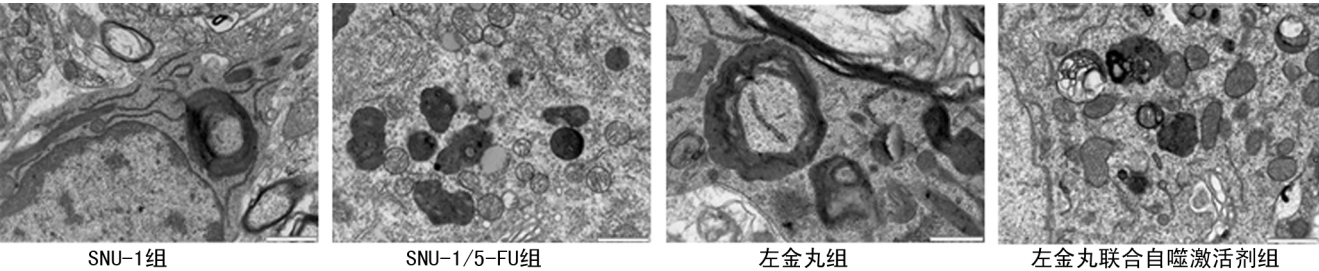


图 3 各组细胞自噬情况比较($\times 200$)

2.4 SNU-1/5-FU 细胞凋亡及自噬相关蛋白表达

与 SNU-1 组比较,SNU-1/5-FU 组细胞 Bax 蛋白、LC3- II /LC3- I 比值均明显升高,Bcl-2、p62 蛋白表达均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 SNU-1/5-FU 组比较,左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组细胞 Bax 蛋白表达、LC3- II /LC3- I 比值均明显降低,Bcl-2、p62 蛋白表达均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组细胞 Bax 蛋白表达、LC3- II /LC3- I 比值均明显升高,Bcl-2、p62 蛋白表达均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4、表 2。

2.5 SNU-1/5-FU 细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达

与 SNU-1 组比较,SNU-1/5-FU 组 SNU-1/5-FU 细胞 p-AMPK/AMPK 表达明显升高,p-mTOR/mTOR 表达明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 SNU-1/5-FU 组比较,左金丸组、左金丸联合自噬激活剂组 p-AMPK/AMPK 表达明显降低,p-mTOR/mTOR 表达明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组 p-AMPK/AMPK 表达明显升高($P<0.05$),p-mTOR/mTOR 表达明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 5、表 3。

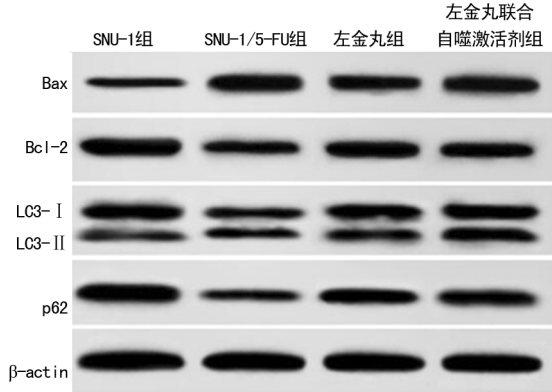


图 4 各组细胞增殖、凋亡及自噬相关蛋白表达比较

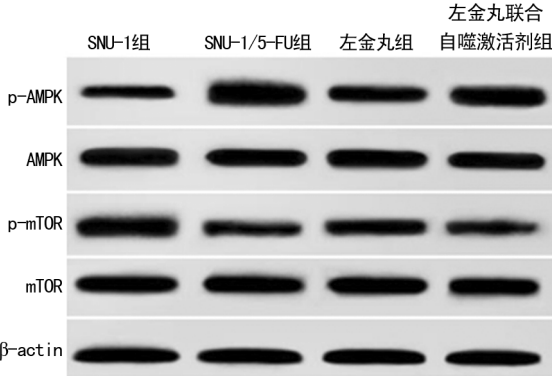


图 5 各组细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达比较

表 2 各组细胞增殖、凋亡及自噬相关蛋白表达比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ (%)	p62/ β -actin
SNU-1 组	0.27 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.18	0.22 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.18
SNU-1/5-FU 组	0.96 $\pm$ 0.14 ^a	0.45 $\pm$ 0.07 ^a	0.97 $\pm$ 0.15 ^a	0.18 $\pm$ 0.05 ^a
左金丸组	0.57 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.81 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.56 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.56 $\pm$ 0.11 ^{ab}
左金丸联合自噬激活剂组	0.72 $\pm$ 0.11 ^{abc}	0.63 $\pm$ 0.09 ^{abc}	0.75 $\pm$ 0.09 ^{abc}	0.33 $\pm$ 0.10 ^{abc}
F	48.348	37.926	62.777	47.340
P	0.001	0.001	0.001	0.001

^a: P<0.05, 与 SNU-1 组比较; ^b: P<0.05, 与 SNU-1/5-FU 组比较; ^c: P<0.05, 与左金丸组比较。

表 3 各组 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-AMPK/ AMPK	p-mTOR/ mTOR
SNU-1 组	0.35 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.16
SNU-1/5-FU 组	1.28 $\pm$ 0.18 ^a	0.45 $\pm$ 0.07 ^a
左金丸组	0.56 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.12 ^{ab}
左金丸联合自噬激活剂组	0.93 $\pm$ 0.15 ^{abc}	0.40 $\pm$ 0.06 ^{abc}
F	62.348	51.035
P	0.001	0.001

^a: P<0.05, 与 SNU-1 组比较; ^b: P<0.05, 与 SNU-1/5-FU 组比较; ^c: P<0.05, 与左金丸组比较。

3 讨 论

胃癌是胃黏膜上皮细胞恶性肿瘤,发病早期症状不典型,大多数患者于中晚期才得以确诊,以致 2 年生存率仅为 10.00%。目前,化疗是治疗晚期胃癌的首选手段,化疗药物主要通过抑制细胞增殖并诱导凋亡对肿瘤细胞发挥细胞毒作用^[11]。胃癌常用一线化疗药物主要以 5-FU 为主,但由于个体差异及胃癌细胞获得性及内在耐药性,使 5-FU 治疗胃癌的总生存率仍较低^[12]。因此,逆转胃癌细胞对 5-FU 耐药性具有较大意义。

左金丸源于《丹溪心法》,由黄连、吴茱萸两味中药材组成,具有清肝泻火、降逆止呕等功效,现代药理研究表明,此方能防治胃癌的发生^[13]。汤庆丰^[14]研究表明,左金丸能促进线粒体转位诱导胃癌 DDP 耐药株 SGC7901/DDP 凋亡,增加细胞化疗敏感性。本研究结果显示, SNU-1/5-FU 细胞 IC50 明显高于其亲本株 SNU-1 细胞,且左金丸联合 5-FU 对 SNU-1/5-FU 细胞凋亡具有促进作用,与汤庆丰^[14]研究结果一致,说明左金丸可能增加胃癌 SNU-1/5-FU 细胞对 5-FU 的化疗敏感性,但相关机制尚有待于深入阐述。

自噬对维持细胞内环境稳态及细胞生存具有重要作用,有研究表明,其有助于肿瘤细胞适应营养物质缺乏、低氧及放化疗刺激等恶劣微环境,增加细胞化疗耐药性^[15-17]。自噬激活时 LC3-Ⅰ 与自噬泡表面磷脂乙醇胺结合形成 LC3-Ⅱ, LC3-Ⅱ 含量多少与

自噬泡数量呈正比,可以判断细胞自噬活性的强弱; p62 是自噬底物并可被 LC3-Ⅱ 降解,用于评定自噬活性^[18-19]。李冬冬等^[20]研究表明,抑制 NAC-1 基因表达可有效抑制卵巢癌 DDP 耐药株(SKOV3/DDP)的自噬水平,增加细胞对 DDP 的耐药性。龚永昌等^[21]研究表明,姜黄素可通过抑制胃癌 AGS 细胞自噬诱导细胞凋亡。本研究结果显示,与 SNU-1 组比较, SNU-1/5-FU 组细胞自噬体数量、自噬泡/细胞质总面积、Bax、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比值均明显升高, Bcl-2、p62 表达均明显降低。说明 SNU-1/5-FU 细胞对 5-FU 产生耐药性可能与自噬活性增加有关;而左金丸可明显抑制 SNU-1/5-FU 细胞自噬,且与左金丸组比较,左金丸联合自噬激活剂组细胞凋亡率明显增加、自噬又一定程度被激活,更加说明左金丸可能通过抑制 SNU-1/5-FU 细胞自噬诱导细胞凋亡,逆转 SNU-1/5-FU 细胞化疗敏感性。

AMPK/mTOR 通路是一条重要的自噬调节途径,当细胞受到外界刺激时 AMPK 被激活并发生磷酸化反应,可抑制下游 mTOR 基因磷酸化反应,进而促进自噬级联反应发生^[22]。有研究表明,抑制 TRIM14 表达可明显抑制胃癌 5-FU 耐药细胞株 SGC7901/5-FU 细胞增殖,并诱导细胞凋亡,可能是通过抑制 AMPK/mTOR 通路活化抑制细胞自噬实现的^[23]。本研究结果显示,与 SNU-1 组比较, SNU-1/5-FU 组细胞 p-AMPK/AMPK 表达明显升高, p-mTOR/mTOR 表达明显降低;而左金丸可明显降低 AMPK/p-AMPK 表达,明显升高 p-mTOR/mTOR 表达,说明左金丸可能抑制 AMPK/mTOR 通路活化,增加 SNU-1/5-FU 细胞化疗敏感性,然而加入自噬激活剂后 SNU-1/5-FU 细胞 AMPK/mTOR 通路又一定程度被激活。说明左金丸可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路活化抑制 SNU-1/5-FU 细胞自噬,进而诱导细胞凋亡,增加细胞化疗敏感性。

综上所述,左金丸可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路介导的自噬,诱导 SNU-1/5-FU 细胞凋亡,进而逆转细胞耐药性。然而本研究并未对 SNU-1/5-FU 细胞自噬水平及其与 AMPK/mTOR 通路的具体作用机制进行探讨,后期应深入阐述。

参考文献

- [1] CHEN P, LIN Y, ZHENG K, et al. Risk factors of gastric cancer in high-risk region of China: a population-based case-control study[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(3): 775-781.
- [2] GRIFFIN S M, RAIMES S A. Proton pump inhibitors may mask early gastric cancer. Dyspeptic patients over 45 should undergo endoscopy before these drugs are started[J]. *BMJ*, 1998, 317(7173): 1606-1612.
- [3] CHENG T, SHAN Y, HUIQIN J, et al. A meta-analysis: methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in gastric cancer patients treated with 5-Fu based chemotherapy predicts serious hematologic toxicity but not prognosis[J]. *J Cancer*, 2018, 9(6): 1057-1066.
- [4] MILLER B C, ZHAO Z, STEPHENSON L M, et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development[J]. *Autophagy*, 2008, 4(3): 309-314.
- [5] 张玉梅, 林方方, 冯凡, 等. RNA 干扰 ATG16L1 抑制人胃癌细胞 BGC823 自噬并促进顺铂诱导的细胞凋亡[J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(8): 636-642.
- [6] 郑嘉怡, 赵自明, 潘华峰, 等. 胃癌前病变脾虚证大鼠胃黏膜病变的病理与超微结构研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 1730-1735.
- [7] 谢亚非. 柴胡疏肝散合左金丸加减治疗慢性糜烂性胃炎分析[J]. *中国实用医药*, 2018, 13(4): 90-92.
- [8] 孙梦瑶, 王丹丹, 吴秋雪, 等. 左金丸对胃癌耐药细胞 SGC-7901/DDP 增殖和糖酵解的抑制作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(1): 77-81.
- [9] 戚笑笑. 反左金丸抗肿瘤和抗转移的机制研究[D]. 开封: 河南大学, 2015.
- [10] 张怡, 靳晓飞, 周晓红, 等. 黄芪甲苷调控自噬抑制缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 519-524.
- [11] KANG L L, HAO X W, TANG Y P, et al. Elevated level of Vav1 was correlated with advanced biological behavior and poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *Inte J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(1): 391-398.
- [12] KAWADA J, NISHINO M, HATA T, et al. A case of effective palliative care with cart for refractory ascites associated with cancerous peritonitis of gastric cancer[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2018, 45(4): 700-702.
- [13] 褚璨灿, 师为人, 陈云志, 等. 左金丸临床应用与实验研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2019, 35(5): 626-629.
- [14] 汤庆丰. ROCK/PTEN/PI3K 介导的 cofilin-1 线粒体转位在左金丸逆转胃癌耐药中的作用[D]. 上海: 上海中医药大学, 2017.
- [15] 潘安萍, 朱建伟, 杨跃. 沉默 β -catenin 表达对胃癌细胞 5-Fu 敏感性的影响[J]. *浙江临床医学*, 2018, 20(12): 1931-1933.
- [16] LI J, WANG Q, CAI H, et al. FGF1 improves functional recovery through inducing PRDX1 to regulate autophagy and anti-ROS after spinal cord injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5): 2727-2738.
- [17] SUN W, LI Y, WWI S. miR-4262 regulates chondrocyte viability, apoptosis, autophagy by targeting SIRT1 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with osteoarthritis[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 1119-1128.
- [18] MARAGHECHI H, AVET F, WONG H, et al. Performance of Limestone Calcined Clay Cement (LC3) with various kaolinite contents with respect to chloride transport[J]. *Materials Struct*, 2018, 125(5): 1251-1255.
- [19] 鲍丽雅, 黄婷婷, 赵艳, 等. 幽门螺杆菌毒力蛋白 CagA 对胃癌细胞线粒体自噬相关蛋白表达的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(12): 1394-1397.
- [20] 李冬冬, 钟洁, 王莉, 等. NAC-1 通过自噬介导卵巢癌细胞顺铂耐药的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(1): 14-17.
- [21] 龚永昌, 陈圣敏, 楚敏, 等. 姜黄素对人胃癌 AGS 细胞自噬流的作用[J]. *中成药*, 2018, 40(3): 699-702.
- [22] HUANG X, WU H, JIANG R, et al. The antidepressant effects of α -tocopherol are related to activation of autophagy via the AMPK/mTOR pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833(1): 1-7.
- [23] XIAO F, OUYANG B, ZOU J, et al. Trim14 promotes autophagy and chemotherapy resistance of gastric cancer cells by regulating AMPK/mTOR pathway[J]. *Drug Devel Res*, 2020, 66(8): 1-6.