·专题研究：中医药调节肿瘤微环境相关研究·

藤梨根调控 IL－17 信号通路影响胃癌细胞迁移与凋亡*

曹洋[1]，董博[2]，刘莹[3]，岳广欣[4]，申力[4]

1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 西安交通大学附属红会医院，陕西 西安 710054；3. 中国中医科学院中药研究所，北京 100700；4. 中国中医科学院中医基础理论研究所，北京 100700

摘要：目的：采用网络药理学和细胞实验探讨藤梨根（Tengligen，TLG）调控白细胞介素（interleukin，IL）－17 信号通路治疗胃癌的作用机制。方法：通过中医药整合药理学研究平台（Integrative Pharmacology－based Research Platform of Traditional Chinese Medicine，TCMIP）筛选藤梨根的活性成分和靶点，借助 GeneCards、Uniprot 数据库查找胃癌的靶点，并利用 Venny 2.1.0 获取两者的交集靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库，构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络。通过 Cytoscape 3.10.1 软件进行网络拓扑学分析，根据 Degree 值筛选核心靶点。利用 DAVID 数据库进行基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。将 25 只 SD 大鼠随机分为空白组 5 只和藤梨根组（0.312 5 g·kg^{-1}）20 只，连续灌胃 5 d，制备空白血清和含药血清。将 HGC－27 细胞分为对照组、空白血清组、12% 藤梨根含药血清组（TLG－L）、24% 藤梨根含药血清组（TLG－M）及 48% 藤梨根含药血清组（TLG－H），采用 Transwell 实验检测细胞的迁移能力，流式细胞仪检测细胞凋亡，ELISA 法检测上清液中肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、IL－6、IL－1β 含量，Western blot 法检测 IL－17A、核转录因子－κB（nuclear transcription factor－κB，NF－κB）、基质金属蛋白酶－9（matrix metalloproteinase－9，MMP－9）蛋白表达水平。结果：藤梨根靶点 159 个，胃癌靶点 1 010 个，两者的交集靶点 95 个。藤梨根治疗胃癌的核心靶点包括肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53）、IL－6、B 淋巴细胞瘤－2（B－cell lymphoma－2，BCL2）、MMP－9、TNF 等。KEGG 分析得到 123 条通路，包括 IL－17 信号通路、PI3K－Akt 信号通路、HIF－1 信号通路等。与空白血清组比较，TLG－L 组、TLG－M 组、TLG－H 组细胞迁移数目减少、细胞凋亡率升高（$P<0.01$）。与对照组比较，空白血清组细胞上清液中 TNF－α、IL－6 含量升高（$P<0.01$）。与空白血清组比较，TLG－L 组、TLG－M 组、TLG－H 组细胞上清液中 IL－1β、TNF－α、IL－6 含量升高（$P<0.01$）。与对照组比较，空白血清组细胞 MMP－9 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与空白血清组比较，TLG－M 组、TLG－H 组细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。结论：藤梨根可能通过槲皮素、β－谷甾醇、谷固醇等成分，调控 IL－17 信号通路，从而发挥抑制胃癌细胞迁移，并促进其凋亡的作用。

关键词：藤梨根；胃癌；HGC－27 细胞；IL－17 通路；网络药理学；槲皮素；细胞迁移；细胞凋亡
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.03.075
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2025）03－0465－09

Tengligen（Radix Actinidiae Chinensis）Affecting Gastric Cancer Cell Migration and Apoptosis by Modulating IL－17 Signaling Pathway

CAO Yang[1]，DONG Bo[2]，LIU Ying[3]，YUE Guangxin[4]，SHEN Li[4]

1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine，Xianyang Shaanxi China 712046；2. Red Cross Hospital，Xi′an Jiaotong University，Xi′an Shaanxi China 710054；3. Institute of Traditional Chinese Medicine，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing China 100700；4. Institute of Basic Theory of Chinese Medicine，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing China 100700

*基金项目：中国中医科学院科技创新工程“中药药性学学科”重大攻关项目（CI2021A03809）；国家自然科学基金面上项目（82074398）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目（YZX－202407）；中国中医科学院科技创新工程项目中医理论传承与创新专项项目（KYG－202406）

Abstract: Objective: To explore the mechanism of action of Tengligen (TLG) in regulating interleukin (IL) -17 signaling pathway in treatment of gastric cancer by using network pharmacology and cellular experiments. Methods: The active components and targets of Tengligen (TLG) were screened by Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine (TCMIP), and the active components and targets of TLG were identified by GeneCards, Uniprot database to find the targets of gastric cancer, and utilized Venny 2.1.0 to obtain the intersecting targets of the two. The intersecting targets were imported into the STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network. The network topology was analyzed by Cytoscape 3.10.1 software, and the core targets were screened according to the Degree value. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed using the DAVID database. Twenty-five SD rats were randomly divided into 5 in the blank group and 20 in the Tengligen group (0.312 5 g·kg^{-1}), and the blank serum and drug-containing serum were prepared by consecutive gastric gavage for 5 d. The cells of HGC-27 cells were divided into control cells and HGC-27 cells. Tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-6 and IL-1β were detected in the supernatant with ELISA, and IL-17A, nuclear transcription factor-κB (NF-κB), matrix metalloproteinase-9 (matrix-κB), IL-1β, NF-κB, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein expression level were detected with Western blot. Results: There were 159 targets of Garcinia cambogia, 1010 targets of gastric cancer, and 95 intersecting targets of both. The core targets of Tengligen for gastric cancer treatment included tumor protein 53 (TP53), IL-6, B-cell lymphoma-2 (BCL2), MMP-9, TNF, etc. KEGG analysis yielded 123 pathways, including IL-17 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, etc. Compared with the blank serum group, the number of cell migration was reduced, and the apoptosis rate was increased in the TLG-L, TLG-M and TLG-H groups ($P<0.01$). Compared with the control group, TNF-α and IL-6 content in the cell supernatant of the blank serum group was elevated ($P<0.01$). Compared with the blank serum group, the content of IL-1β, TNF-α and IL-6 in the cell supernatant of TLG-L, TLG-M and TLG-H groups was elevated ($P<0.01$). Compared with the control group, the level of MMP-9 protein expression in the cells of the blank serum group was reduced ($P<0.01$). Compared with the blank serum group, the cellular IL-17A, NF-κB and MMP-9 protein expression levels were reduced in the TLG-M and TLG-H groups ($P<0.05$). Conclusion: Tengligen may regulate IL-17 signaling pathway through quercetin, β-sitosterol, and glutathione, thus exerting the effects of inhibiting migration and promoting apoptosis of gastric cancer cells.

Key words: Tengligen (Radix actinidiae chinensis); gastric cancer; HGC-27 cells; IL-17 pathway; network pharmacology; quercetin; cell migration; cell apoptosis

胃癌作为一种全球范围内常见的恶性肿瘤，其年新发病例数约为 100 万例，我国胃癌的发病人数和死亡人数分别占全球的 44.0% 和 48.6%[1]。尽管手术、化疗、靶向治疗、免疫检查点抑制剂等多种治疗方案不断更新与发展，对胃癌患者大有裨益，但患者的 5 年生存率仅为 35.1%，且预后欠佳[2]。

中医药在控制胃癌的侵袭转移，实现减毒增效、延长生存期、提高胃癌患者生活质量等方面发挥重要作用[3]。藤梨根，又称猕猴桃根，为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃（Actinidia chinensis Planch.）的干燥根，具有清热解毒、活血消肿、祛风利湿的功效，是治疗胃肠肿瘤的代表性药物。前期研究表明，藤梨根有效成分可抑制胃癌 BGC-823、MKN-7、MGC803 和 SGC-7901 细胞的迁移，诱导细胞凋亡[4]。猕猴桃根多糖可抑制小鼠胃癌腋下瘤的生长及皮下荷瘤的进展，同时抑制胃癌细胞的侵袭、迁移及上皮间质转化[5]。藤梨根的有效成分熊果酸可通过抑制胃癌细胞上皮-间质转化，有效遏制细胞的增殖和迁移[6]。藤梨根可通过下调 B 细胞淋巴瘤/白血病-2（B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2）、核转录因子-κB p65（nuclear factor-κB p65, NF-κB p65）以及基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9, MMP-9）蛋白表达，上调半胱氨酸蛋白酶-3（cysteine protease-3, Caspase-3）蛋白表达，抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt）信号通路，从而改善肿瘤微环境中的炎症细胞、炎症因子和趋化因子状态，发挥抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡及激发细胞失巢凋亡等作用[7]。因此，本研究通过网络药理学和细胞实验验证，探索藤梨根水煎液治疗胃癌的作用机制，为藤梨根在胃癌临床治疗中的应用提供依据。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 SD 雄性大鼠 25 只，6～8 周龄，体质量（200±20）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0010，动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物房。本实验由中国中医科学院中医基础理论研究所伦理委员会审核批准，伦理批号：IBTCM-CACMS21-2403-07。

1.2　细胞　人胃癌细胞株 HGC-27 购自武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：CL-0107。

1.3　主要试剂　藤梨根(浙江中医药大学中药饮片厂有限公司,批号:221101);HGC－27 细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CM－0107);CCK－8 试剂盒、结晶紫染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号:CA1210、G1061);Annexin V－FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号:C1062L);人白细胞介素(interleukin,IL)－6 ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM－0049H2);IL－17a 抗体、NF－κB p65 抗体、MMP－9 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:26163－1－AP、10745－1－AP、10375－2－AP);无蛋白快速封闭液、快速转膜液、预染彩虹蛋白 marker、5×蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白定量/体积分数测定试剂盒、蛋白酶抑制剂混合物、RIPA 裂解液、飞克特超敏 ECL 发光液(大连美仑生物科技有限公司,货号:MA0406、MA0121－2、MA0342－1、MA0003、MA0082－2、MB2678－1、MA0152、MA0186－2)。

1.4　仪器　多功能提取罐(上海达程有限公司,型号:DC－NSG－130);旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);冷冻干燥机(美国 SP 公司,型号:AD2.0EL);凝胶成像系统、电泳仪(美国伯乐生命医学产品有限公司,型号:8187、PowerPacBasic);酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:3020199)。

2　方法

2.1　网络药理学方法

2.1.1　藤梨根治疗胃癌的潜在靶点预测　通过中医药整合药理学研究平台(Integrative Pharmacology－based Research Platform of Traditional Chinese Medicine,TCMIP)筛选藤梨根的活性成分及相关靶点。通过 GeneCards(https://www.genecards.org)、Uniprot 数据库(https://www.uniprot.org)查找胃癌的疾病靶点,利用 Venny 2.1.0 在线工具(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html)将藤梨根靶点与胃癌靶点取交集,得到共同靶点进行下一步分析。

2.1.2　藤梨根治疗胃癌的核心靶点筛选　将胃癌与藤梨根的交集靶点导入 STRING 数据库(https://string－db.org/),构建蛋白质－蛋白质相互作用(protein－protein interaction,PPI)网络,设置物种为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值为 0.900,保存结果为 TSV 格式输出。将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.10.1 软件(http://www.cytoscape.org/)进行网络拓扑学分析,按照 Degree 值(靶点之间的连接度)进行排序,筛选核心靶点。

2.1.3　基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析　将交集靶点输入 DAVID 数据库中,分析生物过程(biological process,BP)、细胞组分(cell component,CC)、分子功能(molecular function,MF)及 KEGG 信号通路。按照 $P<0.05$ 进行筛选,将 Count 值排名前 10 位的结果导入微生信分析平台(http://www.bioinformatics.com.cn)绘制气泡图。

将藤梨根活性成分、核心靶点、重要通路等导入 Cytoscape 3.10.1 软件,构建“活性成分－靶点－通路－疾病”网络。

2.2　细胞实验方法

2.2.1　药物制备　藤梨根饮片加入 12 倍水浸泡 1 h,采用多功能提取罐提取 1 h,重复提取 2 次,合并滤液。于旋转蒸发仪浓缩药液至质量体积分数为 2 g·mL^{-1},4 000 r·min^{-1}离心 20 min 去除杂质,取上清。减压浓缩,冷冻干燥。每克藤梨根水提物对应 14.1 g 藤梨根饮片,将藤梨根水提物加入适量蒸馏水溶解。

2.2.2　含药血清制备　将 25 只 SD 大鼠随机分为空白组 5 只和藤梨根组 20 只(0.312 5 g·kg^{-1}),每日灌胃 1 次,连续 5 d。末次灌胃 1 h 后,使用戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血,静置 2 h,4 ℃ 3 500 r·min^{-1} 离心 15 min,取上清,放于－80 ℃冰箱保存。

2.2.3　细胞培养　使用 RPMI－1640、20% FBS 及 1% P/S 配成的完全培养基培养 HGC－27 细胞,隔天换液。当细胞长到 80% 时,胰酶消化 1 min,1 200 r·min^{-1} 离心 3 min,进行传代。

2.2.4　CCK－8 法检测细胞活性　取生长状态良好的 HGC－27 细胞接种于 96 孔板上,每孔 5×10^4 个细胞,24 h 后分别加入 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 及 100% 藤梨根含药血清,并设置空白孔与对照孔。培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK－8 溶液,继续培养 1 h、1.5 h、2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值。

2.2.5　细胞分组及给药　将 HGC－27 细胞分为对照组(含 20% FBS 的完全培养基)、空白血清组(含 20% 空白血清的完全培养基)、12% 藤梨根含药血清组(TLG－L)、24% 藤梨根含药血清组(TLG－M)及 48% 藤梨根含药血清组(TLG－H)。

2.2.6　Transwell 迁移实验检测细胞的迁移能力　在 6 孔板中接种 1×10^5 个 HGC－27 细胞培养 24 h,按上述分组干预 24 h 后,用不含血清的

DMEM 培养基调整细胞密度为 25×10^7 mL^{-1}。Transwell 上室加入 100 μL 细胞悬液，Transwell 下室加入 500 μL 完全培养基，37 ℃培养箱培养 24 h、48 h。培养后弃去培养基，PBS 漂洗 2 次，将 500 μL 4% 多聚甲醛加入下室固定 15 min，PBS 漂洗 3 次，加入 0.1% 结晶紫染色 10 min，PBS 漂洗 3 次洗去结晶紫。用湿润的棉签轻轻擦拭上室除去多余的结晶紫，晾干后在显微镜下观察并随机选取 3 个视野进行拍照。

2.2.7　流式细胞术检测细胞凋亡　将 HGC－27 细胞接种于 6 孔板上，每孔 1×10^5 个细胞，培养 24 h 后根据上述分组干预 24 h，收集细胞。取 5 万～10 万个重悬的细胞，加入 195 μL Annexin V－FITC 结合液、5 μL Annexin V－FITC 及 10 μL 碘化丙啶染色液混匀，室温避光孵育 10～20 min，立即用流式细胞仪检测。

2.2.8　ELISA 法检测细胞上清中 TNF－α、IL－6、IL－1β 含量　将 HGC－27 细胞接种于 6 孔板上，每孔 1×10^5 个细胞，培养 24 h 后根据上述分组干预 24 h，取细胞上清。根据 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作，并于 450 mm 波长处测定各孔光密度值。

2.2.9　Western blot 法检测细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白表达水平　将 HGC－27 细胞接种于 6 孔板上，每孔 1×10^5 个细胞，培养 24 h 后根据上述分组干预 24 h，收集细胞进行裂解并提取蛋白。采用 BCA 法测定蛋白体积分数，95 ℃加热 10 min，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转移到聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜上，在室温下用无蛋白快速封闭液封闭 10 min。加入 IL－17A（1∶2 000）、NF－κB（1∶2 000）、MMP－9（1∶2 000）一抗，TBST 洗涤 5 次，每次 5 min；室温孵育二抗 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。用 ECL 显影液在 Chemi Doc XRS＋凝胶成像系统中进行显影和成像。获得图像后，用 Image J 软件进行分析。

2.2.10　统计学方法　采用 SPSS 27.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据服从正态分布，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较若方差齐时采用 *LSD* 检验，方差不齐采用 *Tamhane's* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学研究结果

3.1.1　藤梨根的主要活性成分及作用靶点　利用 TCMIP 数据库筛选出藤梨根主要活性成分为槲皮素、β－谷甾醇、谷固醇、芦荟大黄素、儿茶素、表儿茶素等，潜在靶点 159 个。

3.1.2　藤梨根与胃癌的交集靶点　通过 GeneCards、Uniprot 数据库得到胃癌靶点 1 010 个，其与藤梨根的交集靶点 95 个，见图 1。

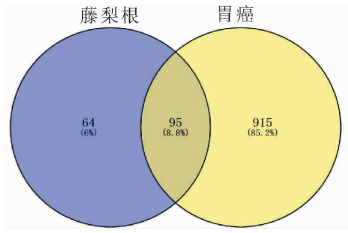


图 1　藤梨根与胃癌交集靶点韦恩图

3.1.3　藤梨根治疗胃癌的核心靶点　PPI 网络包括 95 个节点和 1 932 条边，平均节点度为 40.7，平均局部聚类系数为 0.747。藤梨根治疗胃癌的核心靶点包括肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53）、IL－6、B 淋巴细胞瘤－2（B－cell lymphoma－2，BCL2）、MMP－9、TNF 等，见图 2。

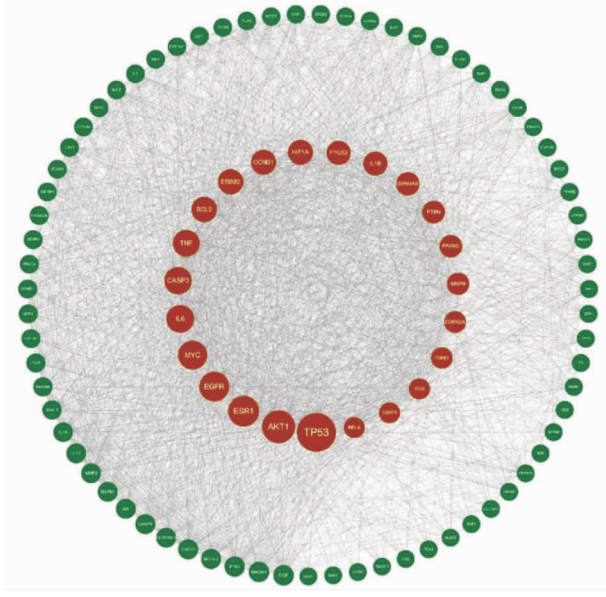
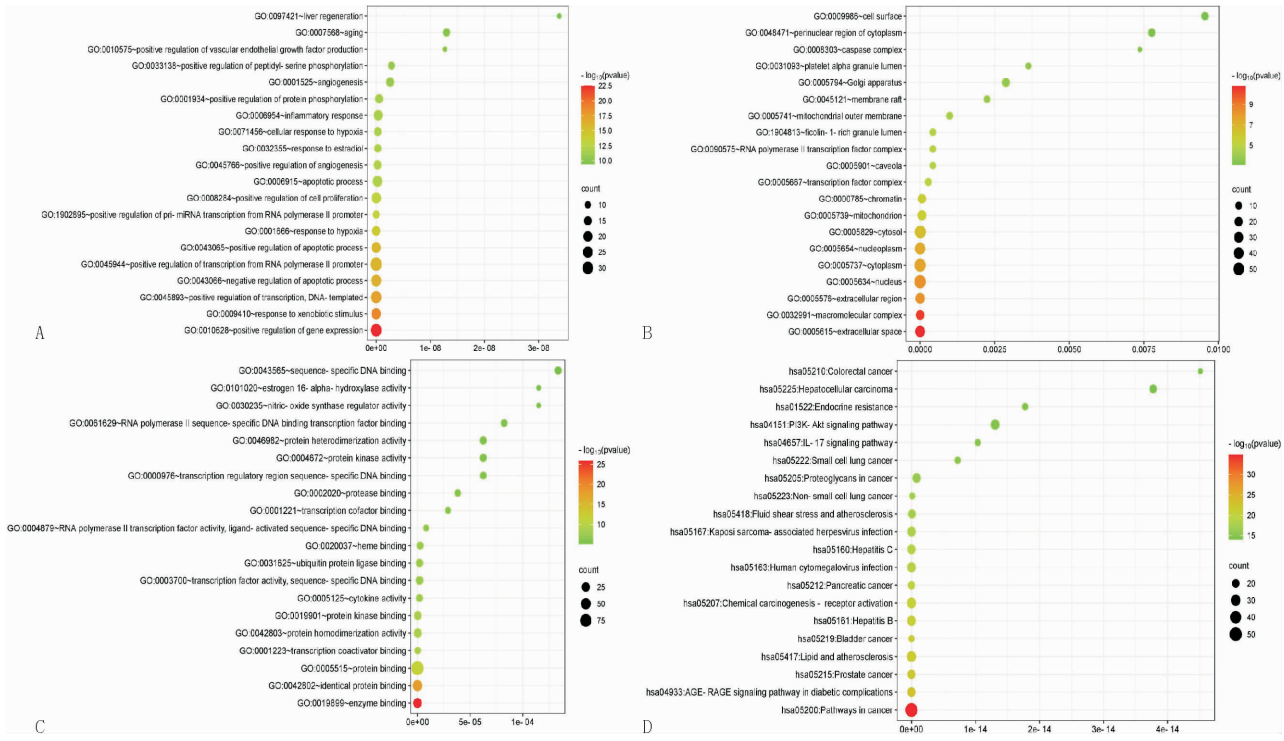


图 2　PPI 网络图

3.1.4　GO 和 KEGG 富集分析　GO 富集分析得到 640 条 BP，主要包括基因表达的正调控、对外源性刺激的反应、转录的正调控、DNA 模板化等；60 条 CC，主要包括细胞外空间、高分子复合物、细胞核等；20 条 MF，主要包括酶结合、相同的蛋白质结合、蛋白质结合等。KEGG 分析共得到 123 条通路，与胃癌细胞凋亡与迁移最相关的通路包括 IL－17 信号通路、PI3K－Akt 信号通路、HIF－1 信号通路等，见图 3。“活性成分－靶点－通路－疾病”网络见图 4。



注：A. BP；B. CC；C. MF；D. KEGG 通路。

图 3　GO 和 KEGG 富集分析气泡图

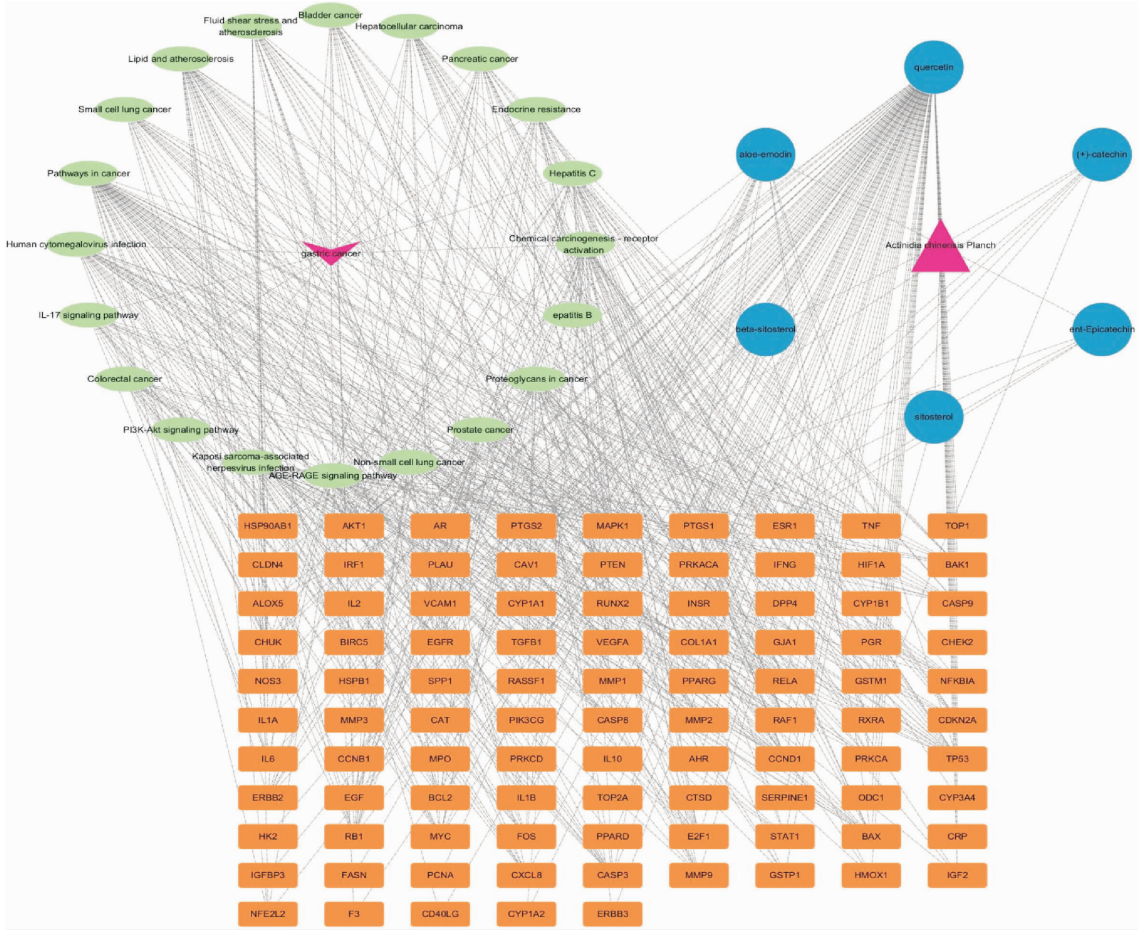


图 4　“活性成分－靶点－通路－疾病”网络图

3.2　细胞实验结果

3.2.1　藤梨根对 HGC－27 细胞活力的影响　不同体积分数的藤梨根含药血清处理 HGC－27 细胞后，细胞存活率下降，并且随着藤梨根含药血清体积分数升高，细胞存活率逐渐下降，见图 5、表 1。藤梨根含药血清体积分数的 IC50 值为 48%，据此将其作为后续药物干预的高体积分数。

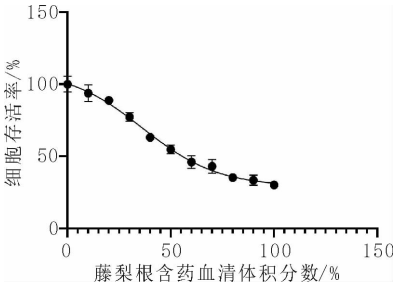
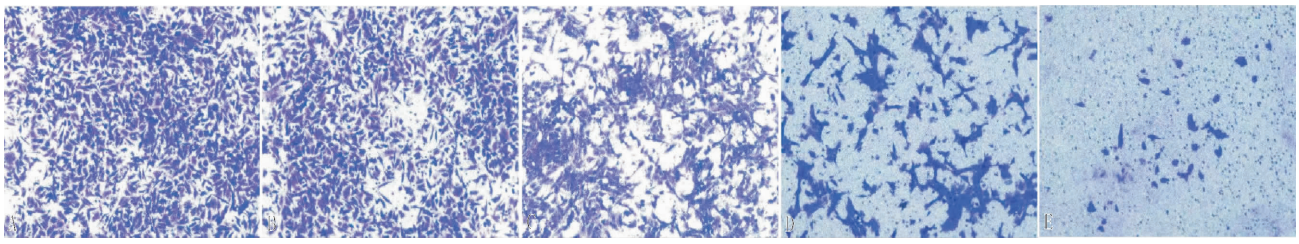


图 5　藤梨根对 HGC－27 细胞存活率的影响

表 1　藤梨根对 HGC－27 细胞活性的影响（$\bar{x} \pm s$）

含药血清体积分数	n	细胞存活率/%
10%	8	93.85 ± 0.05
20%	8	88.76 ± 0.02
30%	8	77.27 ± 0.03
40%	8	63.21 ± 0.02
50%	8	54.71 ± 0.03
60%	8	46.07 ± 0.04
70%	8	43.01 ± 0.04
80%	8	35.28 ± 0.02
90%	8	33.49 ± 0.03
100%	8	30.16 ± 0.02

3.2.2　藤梨根对 HGC－27 细胞迁移能力的影响　对照组与空白血清组细胞迁移数目比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与空白血清组比较，TLG－L 组、TLG－M 组、TLG－H 组细胞迁移数目减少（$P < 0.01$），见图 6、表 2。



注：A. 对照组；B. 空白血清组；C. TLG－L 组；D. TLG－M 组；E. TLG－H 组。

图 6　各组 HGC－27 细胞迁移实验图

表 2　各组 HGC－27 细胞迁移数目比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	细胞迁移数目/个
对照组	3	1 046.00 ± 32.14
空白血清组	3	1 019.00 ± 60.46
TLG－L 组	3	621.90 ± 116.00**
TLG－M 组	3	339.90 ± 8.35**
TLG－H 组	3	162.50 ± 9.65**

注：与空白血清组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

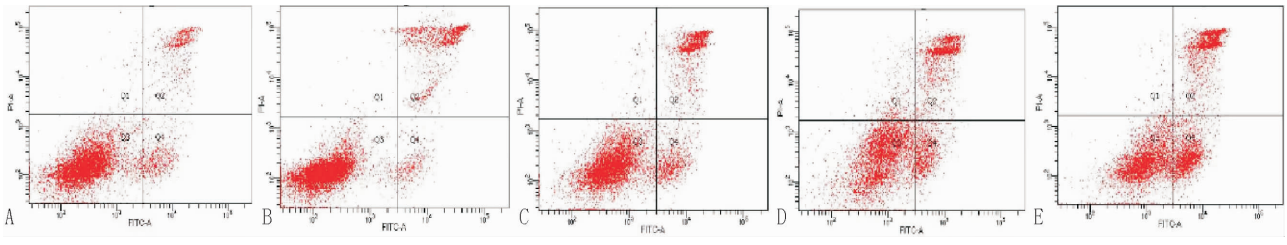
3.2.3　藤梨根对 HGC－27 细胞凋亡的影响　对照组与空白血清组细胞凋亡率比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与空白血清组比较，TLG－L 组、TLG－M 组、TLG－H 组细胞凋亡率升高（$P < 0.01$），见图 7、表 3。

表 3　各组 HGC－27 细胞凋亡率比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	细胞凋亡率/%
对照组	3	17.83 ± 0.65
空白血清组	3	19.37 ± 0.42
TLG－L 组	3	30.90 ± 1.83**
TLG－M 组	3	40.87 ± 0.93**
TLG－H 组	3	48.67 ± 0.74**

注：与空白血清组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

3.2.4　藤梨根对 HGC－27 细胞上清液中 IL－1β、TNF－α、IL－6 含量的影响　与对照组比较，空白血清组细胞上清液中 TNF－α、IL－6 含量升高（$P < 0.01$）。与空白血清组比较，TLG－L 组、TLG－M 组、TLG－H 组细胞上清液中 IL－1β、TNF－α、IL－6 含量升高（$P < 0.01$），见表 4。



注：A. 对照组；B. 空白血清组；C. TLG－L 组；D. TLG－M 组；E. TLG－H 组。

图 7　各组 HGC－27 细胞凋亡流式图

表 4　各组 HGC－27 细胞上清液中 IL－1β、TNF－α、IL－6 含量比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL－1β（ρ/ng·L^{-1}）	TNF－α（ρ/μg·L^{-1}）	IL－6（ρ/μg·L^{-1}）
对照组	3	4.98 ± 0.49	0.80 ± 0.13	0.37 ± 0.02
空白血清组	3	5.61 ± 0.85	4.27 ± 0.52##	1.67 ± 0.10##
TLG－L 组	3	8.67 ± 0.52**	7.42 ± 0.92**	3.05 ± 0.17**
TLG－M 组	3	9.34 ± 0.83**	9.43 ± 0.76**	4.93 ± 0.24**
TLG－H 组	3	10.23 ± 0.50**	11.67 ± 0.93**	6.65 ± 0.53**

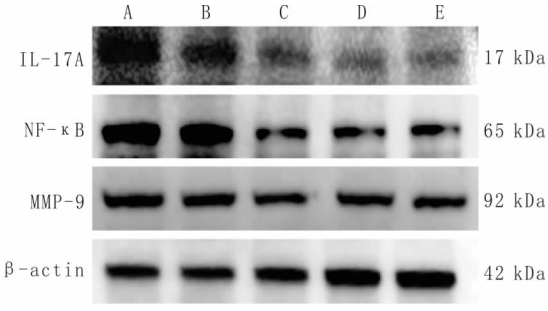
注：与对照组比较，#P < 0.05，##P < 0.01；与空白血清组比较，*P < 0.05，**P < 0.01。

3.2.5　藤梨根对 HGC－27 细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白表达水平的影响　Western blot 显示，与对照组比较，空白血清组细胞 MMP－9 蛋白表达水平降低（P < 0.01）。与空白血清组比较，TLG－L 组细胞 NF－κB 蛋白表达水平降低（P < 0.05）。与空白血清组比较，TLG－M 组、TLG－H 组细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白表达水平降低（P < 0.05），见图 8、表 5。

表 5　各组 HGC－27 细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL－17A/β－actin	NF－κB/β－actin	MMP－9/β－actin
对照组	3	1.36 ± 0.03	1.34 ± 0.03	1.19 ± 0.02
空白血清组	3	1.07 ± 0.08	1.22 ± 0.02	0.89 ± 0.03##
TLG－L 组	3	0.68 ± 0.06	0.88 ± 0.02*	0.87 ± 0.03
TLG－M 组	3	0.55 ± 0.22*	0.71 ± 0.10**	0.70 ± 0.02**
TLG－H 组	3	0.40 ± 0.01**	0.70 ± 0.156**	0.73 ± 0.03**

注：与对照组比较，#P < 0.05，##P < 0.01；与空白血清组比较，*P < 0.05，**P < 0.01。



注：A. 对照组；B. 空白血清组；C. TLG－L 组；D. TLG－M 组；E. TLG－H 组。

图 8　各组 HGC－27 细胞 IL－17A、NF－κB、MMP－9 蛋白条带图

4　讨论

藤梨根具有解毒抗癌的功效，临床中常用于治疗胃癌。本研究采用网络药理学和体外实验的方法探讨藤梨根通过调控 IL－17 信号通路，影响胃癌细胞凋亡与迁移的作用机制。Transwell 实验及流式细胞术检测显示，藤梨根能够抑制 HCG－27 胃癌细胞迁移，促进其凋亡。网络药理学研究表明，藤梨根的主要活性成分为槲皮素、芦荟大黄素、β－谷甾醇、谷固醇、儿茶素、表儿茶素等，藤梨根治疗胃癌的核心靶点为 IL－6、MMP－9、TNF、IL－1β 等，其作用机制可能与调控 IL－17、PI3K－Akt、HIF－1 信号通路有关。据此，本研究主要对上述核心靶点和关键信号通路进行验证。

研究表明，槲皮素通过靶向 SLC1A5，并调节 p－Camk2/p－DRP1 和 NRF2/GPX4 轴诱导胃癌细胞铁死亡[8]。此外，槲皮素可通过调控 Akt－mTOR 信号传导和缺氧诱导因子 1α（hypoxia－inducible factor 1α，HIF－1α）信号途径，激活自噬从而抑制胃癌发展[9]。芦荟大黄素可通过调控人胃癌细胞 MKN45 的 G0/G1 期细胞进程，进而抑制胃癌细胞增殖[10]。β－谷甾醇可通过降低 IL－17、TNF－α 及 MMP－9 水平，抑制炎症反应，从而控制颅内动脉瘤的发展[11]；通过降低 Bcl－2/Bax 比值和损伤 DNA，抑制 SGC－7901 胃癌细胞的增殖[12]。此外，β－谷甾醇可通过调控 AMPK/PTEN/HSP90 信号轴，抑制 AGS 人胃腺癌细胞增殖，从而阻遏异种移植小鼠模型肿瘤的生长[13]。不同体积分数的儿茶素可通过 PI3K/Akt 通路调节细胞周期，有效抑制胃癌细胞的增殖和迁移，并促进胃癌细胞死亡[14]。

肿瘤发展的多细胞环境称为肿瘤微环境，包括免疫细胞、基质细胞、各种信号分子、周围血管以及细胞外基质。由于肿瘤微环境中除癌细胞外的细胞具有更稳定的遗传性质，肿瘤微环境比癌细胞更容易受到药物的影响，故研究人员希望通过靶向肿瘤

微环境的成分，在癌症治疗中产生更多的治疗优势。近年来，肿瘤微环境在肿瘤形成和耐药等方面的关键功能逐渐凸显[15]。除了免疫细胞，肿瘤微环境中诸多因子亦发挥重要作用，如 TNF－α、IL－6、IL－1β、IL－17、NF－κB、MMP－9 均为关键因子。TNF－α 是一种由巨噬细胞/单核细胞在急性炎症期间产生的炎症细胞因子[16]，能诱导胃癌细胞凋亡，抑制细胞生长，并在一定范围内存在剂量效应关系[17]。TNF－α 和 IL－6 均可直接杀伤或抑制肿瘤细胞生长[18]。TNF 诱导坏死或凋亡细胞死亡的特征是细胞肿胀、细胞器破坏和细胞溶解，从而导致细胞促炎因子 IL－6、IL－1β 释放[19]，故细胞凋亡数量与炎症因子呈正相关。本研究结果显示，藤梨根可促进胃癌 HCG－27 细胞分泌 TNF－α、IL－6、IL－1β，提示藤梨根可调控胃癌细胞的炎性微环境。

IL－17 是新型炎症细胞因子家族的成员之一，主要来源于 Th17 细胞和 Tc17 细胞，由六种结构相关的细胞因子 IL－17A（IL－17）、IL－17B、IL－17C、IL－17D、IL－17E（IL－25）和 IL－17F 组成[20]。研究发现，胃癌患者血清和癌组织中 IL－17 表达增加[21－22]，体外 IL－17A 处理可刺激胃癌细胞增殖并抑制其凋亡。IL－17A 的受体 IL－17R 与 NF－κB 激活物 1（Act1）特异性结合后，Act1 通过其特异性序列募集各种 TNF 受体相关因子，从而启动 NF－κB 通路[23]。NF－κB 通路可调控细胞增殖、细胞凋亡和血管生成等多种细胞过程[24]，与胃癌关系密切。IL－17A 可通过激活 NF－κB 途径，上调 MMP－9 水平，从而增强胃癌细胞的迁移和侵袭能力[25]。MMP 的蛋白水解活性和表达水平与肿瘤的生长、局部侵袭和转移相关[26]。其中，MMP－9 在细胞迁移、恶性肿瘤侵袭转移等病理生理过程中发挥重要作用[26]。此外，研究表明 IL－17 通过激活 NF－κB 信号通路，增加 IL－6 表达，从而促进胃癌的侵袭[27]。本研究显示，藤梨根能够抑制 HGC－27 细胞中 IL－17A、NF－κB 和 MMP－9 蛋白表达，提示藤梨根抑制胃癌细胞迁移、促进其凋亡的作用可能通过调控 IL－17 通路实现。

综上所述，藤梨根可能通过槲皮素、β－谷甾醇、谷固醇等成分，调控 IL－17 信号通路，从而发挥抑制胃癌细胞迁移，并促进其凋亡的作用。

参考文献：

[1]HE F F, WANG S M, ZHENG R S, et al. Trends of gastric cancer burdens attributable to risk factors in China from 2000 to 2050[J]. Lancet Reg Health West Pac, 2024, 44: 101003.

[2]周俊. 胃癌治疗研究十年回顾和现状[J]. 实用肿瘤杂志, 2024, 39(3): 202－208.

[3]匡子禹, 王佳曦, 曹璐畅, 等. 中医药治疗局部可切除胃癌的现状与思考[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(12): 211－215.

[4]张广顺, 张光霁, 廖广辉, 等. 藤梨根总三萜化合物通过下调 N－Cadherin、Snail 抑制 BGC－823 胃癌细胞侵袭的体内外实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1188－1192.

[5]申力, 张光霁, 张广顺, 等. 猕猴桃多糖对前胃癌 MFC 细胞及其原位移植瘤细胞凋亡的影响[J]. 中草药, 2014, 45(5): 673－678.

[6]LI J, DAI C, SHEN L. Ursolic acid inhibits epithelial－mesenchymal transition through the axl/NF－κB pathway in gastric cancer cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 2474805.

[7]夏婷婷, 王颖. 藤梨根从“痰”论治恶性肿瘤的研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(7): 702－706.

[8]DING L X, DANG S W, SUN M J, et al. Quercetin induces ferroptosis in gastric cancer cells by targeting SLC1A5 and regulating the p－Camk2/p－DRP1 and NRF2/GPX4 Axes[J]. Free Radic Biol Med, 2024, 213: 150－163.

[9]WANG K, LIU R, LI J Y, et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt－mTOR－ and hypoxia－induced factor 1α－mediated signaling[J]. Autophagy, 2011, 7(9): 966－978.

[10]CHIHARA T, SHIMPO K, BEPPU H, et al. Effects of Aloe－emodin and emodin on proliferation of the MKN45 human gastric cancer cell line[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(9): 3887－3891.

[11]YANG Q, YU D L, ZHANG Y. β－sitosterol attenuates the intracranial aneurysm growth by suppressing TNF－α－mediated mechanism[J]. Pharmacology, 2019, 104(5/6): 303－311.

[12]ZHAO Y H, CHANG S K C, QU G, et al. Beta－sitosterol inhibits cell growth and induces apoptosis in SGC－7901 human stomach cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(12): 5211－5218.

[13]SHIN E J, CHOI H K, SUNG M J, et al. Anti－tumour effects of beta－sitosterol are mediated by AMPK/PTEN/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 152: 60－70.

[14] DING Y, LI H, CAO S S, et al. Effects of catechin on the malignant biological behavior of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2024, 490: 117036.
[15] YANG P Z, YANG W T, WEI Z, et al. Novel targets for gastric cancer: the tumor microenvironment (TME), N6-methyladenosine (m6A), pyroptosis, autophagy, ferroptosis and cuproptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 163: 114883.
[16] IDRISS H T, NAISMITH J H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(3): 184-195.
[17] 高友兵，熊静，李海波，等. 肿瘤坏死因子-α 诱导人胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 河南肿瘤学杂志，2002，15(6)：417-418.
[18] LIMA A C, AMORIM D, LARANJEIRA I, et al. Modulating inflammation through the neutralization of Interleukin-6 and tumor necrosis factor-α by biofunctionalized nanoparticles[J]. J Control Release, 2021, 331: 491-502.
[19] BEYAERT R, FIERS W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not[J]. FEBS Lett, 1994, 340(1/2): 9-16.
[20] GU C F, WU L, LI X X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling[J]. Cytokine, 2013, 64(2): 477-485.
[21] 陈锦霞，单保恩，李清靖，等. IL-17 及其相关分子在胃癌组织中的表达和相关性分析[J]. 肿瘤学杂志，2019，25(6)：537-540.
[22] 周勇旭，张岩，张霞，等. 胃癌患者血清 IL-17 表达及与 VEGF 相关性分析[J]. 哈尔滨医科大学学报，2018，52(4)：354-357.
[23] HUANGFU L J, LI R Y, HUANG Y M, et al. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 402.
[24] HOESEL B, SCHMID J A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 86.
[25] NILAND S, RISCANEVO A X, EBLE J A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 146.
[26] WANG Y D, WU H, WU X L, et al. Interleukin 17A promotes gastric cancer invasiveness via NF-κB mediated matrix metalloproteinases 2 and 9 expression[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e96678.
[27] 牛世伟，龚红霞，付晓燕. IL-17 及其介导的信号通路在胃癌中的研究进展[J]. 医学研究生学报，2022，35(6)：660-663.

收稿日期：2024-12-01
作者简介：曹洋(1999-)，女，河南封丘人，硕士研究生，主要从事胃癌机制研究。
通信作者：申力(1978-)，女，天津人，医学博士，副研究员，主要从事中医方证基础研究。E-mail：shenli1116@126.com
编辑：刘凯歌