

· 经典名方 ·

基于 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路研究小陷胸汤调控 Ca²⁺ 载量抑制 MGC-803 细胞侵袭迁移和上皮间质转化作用

丁芮¹, 周鹏^{1,2,3}, 王翔¹, 汤同娟¹, 王恩宇¹, 洪星辉^{1,2,3}, 王靓^{1,2,3}, 黄金玲^{1,2,3*}

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230012;

2. 安徽省中医药科学院中西医结合研究所, 合肥 230012;

3. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] 目的:探讨小陷胸汤对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导胃癌 MGC-803 细胞侵袭转移及上皮间质转化的影响,并探讨其可能的机制。方法:通过 CB-DOCK 在线平台(<http://clab.labshare.cn/cb-dock/>)预测小陷胸汤与活化 T 细胞核转录因子(NFAT)分子对接。使用质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TGF- β_1 建立人胃癌 MGC-803 细胞侵袭转移模型,将 MGC-803 细胞分为空白组、模型组、小陷胸汤组($0.1, 0.2, 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),为进一步探讨 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路在小陷胸汤抑制胃癌中的关键参与作用,将 Wnt5a 过表达质粒转染 MGC-803 细胞,分为空白质粒组、Wnt5a-OE 组、空白质粒+小陷胸汤($0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组和小陷胸汤($0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组。分别使用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法、Transwell 小室实验、划痕愈合实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)、免疫荧光法检测 MGC-803 细胞活力、侵袭能力、迁移能力、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、锌指蛋白(Snail)、Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路关键蛋白 Wnt5a、钙调神经磷酸酶(CaN)、NFAT1、磷酸化(p)-NFAT1 和 NFAT1 核蛋白表达以及细胞 Ca²⁺ 浓度变化。结果:分子对接提示小陷胸汤作用于 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路。与模型组比较,小陷胸汤($0.1, 0.2, 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)能明显促进 MGC-803 细胞活力的丧失,可通过基质凝胶侵入 Transwell 下室抑制细胞,并以剂量依赖性的方式减缓细胞划痕愈合,并促进 E-cadherin 的表达,抑制 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达($P<0.05, P<0.01$)。进一步实验表明,与模型组比较,小陷胸汤可以抑制 Wnt5a、CaN、NFAT1 和 p-NFAT1 的表达,降低 NFAT1 核表达和 NFAT1 介导的转录活性,从而降低细胞 Ca²⁺ 浓度,且可逆转 Wnt5a 的作用($P<0.05, P<0.01$)。结论:小陷胸汤可通过 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 通路减弱人胃癌 MGC-803 细胞的侵袭转移和上皮间质转化(EMT),从而减弱 TGF- β_1 诱导的促瘤作用。这提示小陷胸汤可能通过调节胃癌的侵袭、转移和 EMT 来预防和治疗胃癌。

[关键词] 小陷胸汤; 胃癌; 侵袭转移; 上皮间质转化; Wnt5a/Ca²⁺/活化 T 细胞核因子(NFAT)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)12-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220727

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1445.008.html>

[网络出版日期] 2022-01-29 17:05

Xiao Xianxiong Tang Regulates Ca²⁺ Load and Inhibits Epithelial-mesenchymal Transition, Invasion, and Migration of MGC-803 Cells: Based on Wnt5a/ Ca²⁺/NFAT Signaling Pathway

DING Rui¹, ZHOU Peng^{1,2,3}, WANG Xiang¹, TANG Tong-juan¹, WANG En-yu¹,

HONG Xing-hui^{1,2,3}, WANG Liang^{1,2,3}, HUANG Jin-ling^{1,2,3*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute of Integrated Traditional

Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China)

[收稿日期] 2021-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573864)

[第一作者] 丁芮,在读博士,从事中药复方抗肿瘤作用研究,E-mail:584831330@qq.com

[通信作者] *黄金玲,教授,博士生导师,从事中药抗肿瘤作用及其分子机制研究,E-mail:jinling6181@126.com

[Abstract] Objective: To explore the effect of Xiao Xianxiong tang (XXXT) on the transforming growth factor (TGF)- β_1 -induced invasion, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer MGC-803 cells and the underlying mechanism. **Method:** The molecular docking between XXXT and nuclear factor of activated T cells (NFAT) was performed by CB-DOCK (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/>). The invasion and metastasis model of MGC-803 cells was established with $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 . MGC-803 cells were classified into blank group, model group, $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ XXXT group, $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ XXXT group, and $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ XXXT group. For further clarifying the key role of Wnt5a/ Ca^{2+} /NFAT signaling pathway in the inhibition of XXXT on gastric cancer, MGC-803 cells were transfected with Wnt5a overexpression plasmid, and then the cells were classified into blank plasmid group, Wnt5a-OE group, blank plasmid + XXXT ($0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and Wnt5a-OE + XXXT ($0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) group. Cell viability was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, cell invasion and migration ability by Transwell invasion assay and wound healing assay, expression of EMT-related proteins (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail) and Wnt5a/ Ca^{2+} /NFAT signaling pathway-related key proteins [Wnt5a, calcineurin (CaN), NFAT1, and p-NFAT1] by Western blot, and changes in intracellular Ca^{2+} concentration by immunofluorescence assay. **Result:** Molecular docking suggested that XXXT acted on Wnt5a/ Ca^{2+} /NFAT signaling pathway. XXXT ($0.1, 0.2, 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly promoted the loss of MGC-803 cell viability ($P<0.05, P<0.01$). It inhibited cells from invading the transwell lower chamber and slowed down the healing of cell wounds in a dose-dependent manner ($P<0.05, P<0.01$). Moreover, it promoted the expression of E-cadherin while suppressed the expression of N-cadherin, Vimentin, and Snail ($P<0.05, P<0.01$). Further experiments showed that XXXT could inhibit the expression of Wnt5a, CaN, NFAT1, and p-NFAT1, and reduce the nuclear expression of NFAT1 and the transcription activity mediated by NFAT1, so as to reduce the cellular Ca^{2+} concentration ($P<0.05, P<0.01$). XXXT can reverse the effect of Wnt5a ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** XXXT can attenuate the invasion, metastasis, and EMT of MGC-803 cells via the Wnt5a/ Ca^{2+} /NFAT pathway, thereby weakening the tumor-promoting effect of TGF- β_1 . In summary, XXXT may exert therapeutic effect on gastric cancer by regulating the invasion, metastasis, and EMT of gastric cancer cells.

[Keywords] Xiao Xianxiong tang; gastric cancer; invasion and metastasis; epithelial-mesenchymal transition; Wnt5a/ Ca^{2+} / nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling pathway

胃癌(GC)是最常见的胃肠道恶性肿瘤之一。国际癌症研究机构(IARC)关于GC病例的最新数据显示,2018年新增100万例,死亡约78万例。与2012年全球93万多例新发GC病例比较,GC发病率明显上升,GC已成为第五大高发癌症,且死亡率位居世界第三^[1]。目前,虽然手术、放疗、化疗、免疫治疗和分子靶向治疗可以缓解GC患者的临床症状,但由于缺乏可靠的早期标志物和晚期诊断,GC患者的预后并未得到根本改善^[2]。侵袭、转移和复发被认为是癌症患者治疗失败并最终导致死亡的最重要的决定因素^[3]。侵袭转移是GC患者复发和死亡的基础。上皮间质转化(EMT)已被证实是GC细胞侵袭转移的关键环节,使GC细胞更具侵袭性^[4]。在EMT过程中,上皮细胞表型转化通过细胞极性的丧失和上皮标记物E-钙黏蛋白(E-cadherin)的抑制发生。上皮细胞通过获得间充质标记物N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin),成为

间充质细胞,细胞间黏附减少,运动增强,最终使GC细胞获得侵袭转移能力^[5]。EMT也受到多种途径的调控,其中Wnt5a/ Ca^{2+} /活化T细胞核转录因子(NFAT)信号通路是调节EMT过程的重要途径之一^[6-7]。癌细胞Wnt5a/ Ca^{2+} /NFAT信号通路异常激活可导致下游EMT相关蛋白的高表达,增强侵袭转移性能^[8-9]。大量临床报道证实中药方剂对GC有治疗作用^[10-11]。小陷胸汤出自《伤寒论》,由黄连、半夏和瓜蒌组成,临床上广泛用于治疗各种恶性肿瘤,具有广泛的实践基础,且此方有效性已经被相关的药理研究证实^[12-15]。小陷胸汤含有靶向多种与肿瘤相关的病理通路的天然化合物^[16-18]。本课题组前期体内实验研究发现加味小陷胸汤方可通过经典Wnt信号通路有效抑制GC细胞的EMT及侵袭迁移,但经方小陷胸汤在GC发生发展中的分子机制尚不清楚。考虑到人GC MGC-803细胞的侵袭转移作用以及小陷胸汤通过调节侵袭转移能力治疗GC的潜

力,本研究基于前期研究成果建立 TGF- β_1 诱导 MGC-803 细胞侵袭转移细胞模型。通过研究 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 参与侵袭和迁移的信号通路,进一步探讨其潜在机制。

1 材料

1.1 细胞株 人 GC 细胞株 MGC-803 购自中国科学院上海细胞库,编号 H001,传至 7~8 代。

1.2 药物与试剂 瓜蒌、半夏、黄连饮片均购自安徽普仁药业有限公司,批号分别为 2003101、2010132、2007211,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为道地药材,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》标准。制备方法为水提醇沉法^[19],按饮片-水 1:10 质量比煎煮 45 min,3 次后将所得药液合并浓缩至 35.8%,待冷却后加入乙醇(浓缩液中乙醇终体积分数为 75%),封口冷藏 24 h,用无菌纱布滤过,用 75% 乙醇再次洗涤沉淀,得到精制液,70 °C 旋转蒸发回收乙醇后,85 °C 蒸发浓缩药液并冷冻成干燥粉末,每克粉末含生药 10.38 g,封口避光保存。DMEM/High Glucose(美国 HyClone 公司,批号 8119064),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国 Abmole 公司,批号 M4852),TGF- β_1 、Lipofectamine 2000 Reagent、OPTI-MEM(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 2209775、2102758、2125763),Transwell 小室(美国 Coning 公司,批号 353097),Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号 BD356234),胎牛血清(FBS)、细胞渗透性荧光探针(Fluo-4)、青-链霉素溶液、胰蛋白酶、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为 20200930、082019261365、062019181134、052019120482、052319190729),细胞蛋白提取、细胞磷酸化蛋白提取、细胞核蛋白提取试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,批号分别为 BB20050、BB20051、BB20052),E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、锌指蛋白(Snail)、Wnt5a、钙调神经磷酸酶(CaN)、NFAT1、 β -肌动蛋白(β -actin)、PCNA 一抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 06、07、11、12、13、14、15、18、19),磷酸化(p)-NFAT1 一抗(北京安诺伦生物科技有限公司,批号 1913064),ECL 化学发光试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 QE228005),结晶紫(北京索莱宝科技有限公司,批号 20200525),合成并克隆到 pcDNA 3.1 载体的 Wnt5a 过表达质粒由安徽通用生物公司提供。

1.3 仪器 Forma 370 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司),Tanon5200 化学发光成像系统(上海天能科

技有限公司),PowerPac 型电泳转膜仪、SDS-PAGE 型凝胶电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),Olympus BX51 型正置显微镜、u-HGLGPS 型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯有限公司)。

2 方法

2.1 小陷胸汤主要有效成分的对接预测 利用 CB-DOCK 平台预测蛋白空腔,计算空腔中心的大小,最后进行配体与受体的分子对接。NFAT(PDB ID: 2AS5)的蛋白质三维结构从 PDB 数据库(<http://www1.rcsb.org/>)^[20]下载。将 NFAT 的 PDB 格式和 SDF 格式的小陷胸汤主要组分输入 CB-DOCK 进行分子对接^[21]。配体类型设置为“spacefill”,受体类型设置为“cartoon”。

2.2 细胞培养 采用含 10% FBS、100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基,37 °C、5% CO₂ 培养 MGC-803 细胞,选取对数生长期细胞进行实验。

2.3 细胞转染 根据说明书使用 Lipofectamine 2000 Reagent 进行 Wnt5a 过表达质粒转染,转染 6 h 后替换新鲜培养基。细胞转染 24 h,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 pcDNA 3.1-Wnt5a 的转染效率,收集用于后续检测。将空载体 pcDNA3.1 作为阴性对照,按照上述操作重复 Lipofectamine 2000 试剂转染。

2.4 模型复制 参考文献[19]调整人 GC MGC-803 细胞密度至 5×10⁵ 个/mL,TGF- β_1 (10 μ g·L⁻¹)处理对数生长期 MGC-803 细胞 24 h,建立细胞侵袭迁移及 EMT 模型。

2.5 分组及处理 参考相关文献[22-23],将 MGC-803 细胞暴露于 10 μ g·L⁻¹ TGF- β_1 。24 h 后,将 MGC-803 细胞分为空白组、模型组、小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)。为进一步探讨 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路在小陷胸汤抑制 GC 中的关键参与作用,将 Wnt5a 过表达质粒转染 MGC-803 细胞,分为空白质粒组、Wnt5a-OE 组、空白质粒+小陷胸汤组(0.4 g·L⁻¹)和 Wnt5a-OE+小陷胸汤组(0.4 g·L⁻¹)。

2.6 细胞活力检测 参照说明书将 MGC-803 细胞接种于 96 孔板,密度为 2×10⁴ 个/孔。细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 环境,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L 孵育 1.5 h,用微孔板读卡器测定 490 nm 处吸光度 A。

2.7 小陷胸汤对人 GC MGC-803 细胞侵袭、迁移能力的影响

2.7.1 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 基质胶均匀包被 Transwell 小室,置于细胞培养箱中 4 h 待凝固;用无血清的 DMEM 培养液将

对数生长期 MGC-803 细胞调整至 1×10^5 个/mL, 接种于 24 孔板内, 按照前述 2.4 项下模型复制方法进行造模, 用 2.5 项下分组及处理方法处理细胞, 继续培养 24 h; 预冷 4% 多聚甲醛固定 Transwell 小室外下室细胞, 清洗后将其浸泡于 0.1% 结晶紫染液中 20 min 染色, 清洗多余染液后置于载玻片上部, 于显微镜下观察各组染色是否均匀, 随机选取 5 个视野拍照, 并记录各组细胞穿过 Matrigel 胶侵袭进入 Transwell 下室的数目。实验反复 3 次。侵袭抑制率 = $1 - (\text{药物组穿膜细胞数} - \text{空白组穿膜细胞数}) / (\text{模型组穿膜细胞数} - \text{空白组穿膜细胞数}) \times 100\%$ 。

2.7.2 划痕愈合实验检测细胞迁移能力 在 6 孔板背面每间隔 0.8 cm 画直线, 将对数生长期 MGC-803 细胞调整至 1.0×10^6 个/孔, 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁; 按照 2.4 项下模型复制方法进行造模, 观察细胞密度达到 90% 时进行划痕, 选取划痕区域拍照, 并记录 0 h 各组细胞划痕面积; 按照 2.5 项下分组及处理方法处理细胞, 再次选取划痕区域拍照, 记录 24 h 各组细胞划痕面积。用 Image J 软件分析 0、24 h 各组 MGC-803 细胞划痕图片, 并计算细胞划痕愈合率。划痕愈合率 = $(0 \text{ h 细胞划痕愈合面积} - 24 \text{ h 细胞划痕愈合面积}) / 0 \text{ h 细胞划痕愈合面积} \times 100\%$ 。

2.8 Western blot 检测 EMT 和 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路关键蛋白 提取各组细胞蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度, 电泳, 转膜及封闭, 孵育一抗 (1:1 000), 4 °C 过夜, 二抗 (1:2 万) 孵育 2 h, 发光显影, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 免疫荧光法检测细胞内 Ca²⁺ 浓度变化 参考

文献[24]将细胞接种于 96 孔板中, 加入 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fluo-4 和 HBSS 溶液共同孵育 30 min。将 1 体积的胎牛血清加入 100 体积 HBSS 溶液混匀, 继续孵育 40 min, 每孔加入 HEPES buffer saline 100 μL 摇晃清洗 2 min, 3 次, 继续培养 10 min, 对该细胞进行 Ca²⁺ 浓度检测。激发波长为 494 nm, 发射波长为 516 nm, 用 Image J 软件分析荧光强度变化。用 Fo 表示细胞外荧光强度数值, F 表示细胞内检测到的荧光强度数值。荧光强度 $\Delta F/F_0 = (F - F_0) / F_0$ 。

2.10 统计学处理 统计分析采用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件。所有数据比较均采用单因素方差进行统计分析, 进行 S-N-K 检验。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小陷胸汤主要组分与 NFAT 对接 分子对接表明, 小陷胸汤的主要成分与 NFAT 具有良好的结合活性。黄芩苷的 VINA 评分接近 MA242 (NFAT 抑制剂), 排名靠前的化合物为槲皮素和羟基芫花素。结果表明, 小陷胸汤可能作用于 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路。小陷胸汤主要组分与 NFAT 对接、MA242 和小陷胸汤前 3 个有效组分与 NFAT 分子对接图见增强出版附加材料。

3.2 小陷胸汤对 MGC-803 细胞增殖抑制作用 小陷胸汤对 GC 细胞的增殖具有抑制作用, 24 h 与空白组比较, 小陷胸汤组细胞存活率均降低。考虑到对细胞的抑制和损伤作用, 在后续实验中设置小陷胸汤组, 使用小陷胸汤 0.1、0.2、0.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度梯度进行干预。见表 1。

表 1 小陷胸汤对 MGC-803 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Xiao Xianxiongtang on proliferation ability of MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

| 组别 | 质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 24 h 细胞存活率 | 48 h 细胞存活率 | 72 h 细胞存活率 |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| 空白组 | | 100.00 \pm 0.12 | 100.00 \pm 2.63 | 100.00 \pm 4.21 |
| TGF- β_1 组 | | 100.00 \pm 0.54 | 104.00 \pm 4.21 | 109.00 \pm 2.32 |
| 小陷胸汤组 | 0.1 | 95.28 \pm 0.25 ²⁾ | 88.43 \pm 1.45 | 91.94 \pm 1.96 |
| | 0.2 | 86.52 \pm 1.45 ²⁾ | 76.88 \pm 2.38 | 81.53 \pm 1.35 |
| | 0.3 | 80.97 \pm 6.13 ³⁾ | 55.82 \pm 2.89 | 41.81 \pm 2.43 |
| | 0.4 | 74.60 \pm 4.69 ³⁾ | 47.61 \pm 3.64 | 18.96 \pm 2.89 |
| | 0.5 | 70.09 \pm 3.48 | 41.94 \pm 6.21 | 15.42 \pm 3.45 |
| | 0.6 | 68.28 \pm 2.56 | 35.73 \pm 3.54 | 13.80 \pm 2.35 |
| | 0.7 | 59.93 \pm 2.92 | 26.73 \pm 4.26 | 9.93 \pm 3.64 |
| | 0.8 | 50.51 \pm 1.38 | 16.73 \pm 1.68 | 4.24 \pm 3.92 |

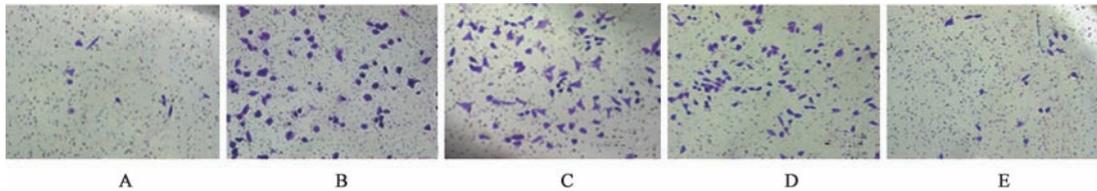
注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2-表 5 同)

3.3 小陷胸汤抑制 TGF- β_1 诱导的 MGC-803 细胞的侵袭和迁移能力 TGF- β_1 处理 MGC-803 细胞 24 h

后, 与空白组比较, TGF- β_1 组部分细胞由椭圆形变为扁梭形, 细胞间隙明显增大, 呈现明显的 EMT 细

胞形态;与TGF- β_1 组比较,小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)扁梭形细胞及细胞间隙明显减少。表明小陷胸汤能明显抑制TGF- β_1 介导MGC-803细胞EMT形态改变。与空白组比较,TGF- β_1 组细胞穿过基质凝胶侵入Transwell下室的MGC-803细胞数量

增多及划痕愈合率显著上升,差异有统计学意义($P<0.01$);与TGF- β_1 组比较,小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)细胞侵入Transwell下室数目显著减少,划痕愈合率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见图1、图2和表2。



注:A. 空白组;B. TGF- β_1 组;C~E. 小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)(图2-图5同)

图1 小陷胸汤对TGF- β_1 诱导的MGC-803细胞侵袭能力的影响(结晶紫,×100)

Fig. 1 Effect of Xiao Xianxiong Tang on invasion ability in TGF- β_1 -treated MGC-803 cells (crystal violet, ×100)

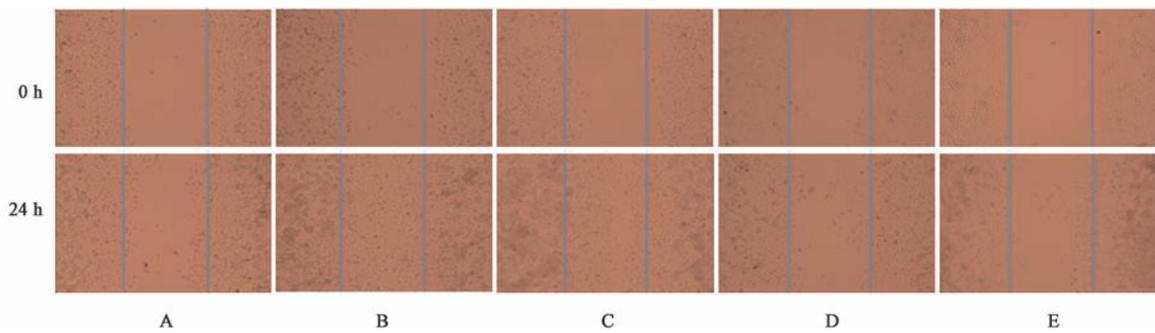


图2 小陷胸汤对TGF- β_1 诱导的MGC-803细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 2 Effect of Xiao Xianxiong Tang on migration ability in TGF- β_1 -treated MGC-803 cells (inverted microscope, ×200)

表2 小陷胸汤对TGF- β_1 诱导的MGC-803细胞侵袭和迁移能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Xiao Xianxiong Tang on invasive and migration ability of MGC-803 cells mediated by TGF- β_1 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | 细胞侵袭数/个 | 划痕愈合率/% |
|------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 10.88±2.54 | 10.58±1.03 |
| TGF- β_1 组 | | 116.02±9.00 ¹⁾ | 70.62±3.63 ¹⁾ |
| 小陷胸汤组 | 0.1 | 78.45±5.42 ²⁾ | 62.30±1.37 ²⁾ |
| | 0.2 | 53.28±3.54 ³⁾ | 34.04±4.28 ³⁾ |
| | 0.4 | 30.45±5.28 ³⁾ | 20.88±3.56 ³⁾ |

3.4 小陷胸汤调控EMT标记蛋白的表达 与空白组比较,TGF- β_1 组细胞E-cadherin蛋白表达显著降

低,N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达显著升高($P<0.01$);与TGF- β_1 组比较,小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)促进细胞E-cadherin表达,降低N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白水平($P<0.05, P<0.01$)。见表3、图3。

3.5 小陷胸汤调控Wnt5a、CaN、NFAT1的表达水平及细胞内Ca²⁺载量变化 与空白组比较,TGF- β_1 组细胞Wnt5a、CaN、NFAT1水平及细胞内Ca²⁺载量升高($P<0.01$);与TGF- β_1 组比较,小陷胸汤组(0.1、0.2、0.4 g·L⁻¹)Wnt5a、CaN、NFAT1水平及细胞内Ca²⁺降低($P<0.05, P<0.01$)。见图4、图5和表4。

表3 小陷胸汤对TGF- β_1 诱导的MGC-803细胞EMT标记蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Xiao Xianxiong Tang on expression of EMT marker protein of MGC-803 cells mediated by TGF- β_1 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | E-cadherin/ β -actin | N-cadherin/ β -actin | Snail/ β -actin | Vimentin/ β -actin |
|------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 1.24±0.05 | 0.85±0.21 | 0.64±0.13 | 0.74±0.18 |
| TGF- β_1 组 | | 0.50±0.12 ¹⁾ | 1.01±0.16 ¹⁾ | 1.12±0.14 ¹⁾ | 1.35±0.17 ¹⁾ |
| 小陷胸汤组 | 0.1 | 0.58±0.02 ²⁾ | 0.99±0.24 ²⁾ | 1.01±0.18 ²⁾ | 1.18±0.07 ²⁾ |
| | 0.2 | 0.74±0.21 ³⁾ | 0.84±0.76 ³⁾ | 0.80±0.46 ³⁾ | 0.98±0.25 ³⁾ |
| | 0.4 | 0.98±0.08 ³⁾ | 0.83±0.47 ³⁾ | 0.64±0.57 ³⁾ | 0.79±0.29 ³⁾ |

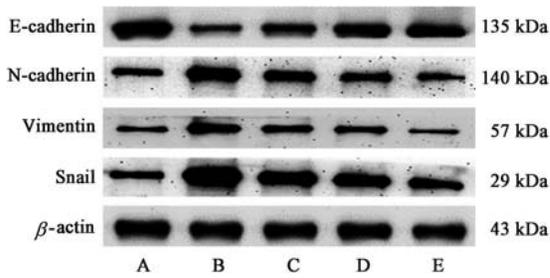


图3 TGF-β₁诱导的MGC-803细胞EMT标记蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of EMT marker proteins in TGF-β₁-treated MGC-803 cells

3.6 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导MGC-803细胞侵袭和迁移的影响 与空白组比较,Wnt5a组有更

多细胞通过基质凝胶侵入Transwell下腔,划痕愈合率升高($P<0.01$)。与Wnt5a组比较,空白质粒+小陷胸汤组($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和Wnt5a+小陷胸汤组($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞侵入Transwell下室数量和划痕愈合率减少和降低($P<0.05, P<0.01$)。见表5和图6、图7。

3.7 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导MGC-803细胞EMT标记蛋白表达的影响 与空白组比较,Wnt5a组E-cadherin降低,N-cadherin、Vimentin、Snail升高($P<0.01$)。与Wnt5a组比较,空白质粒+小陷胸汤组($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和Wnt5a+小陷胸汤组($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)E-cadherin表达上调,N-cadherin、Vimentin和Snail表达下调($P<0.05, P<0.01$)。见表6和图8。

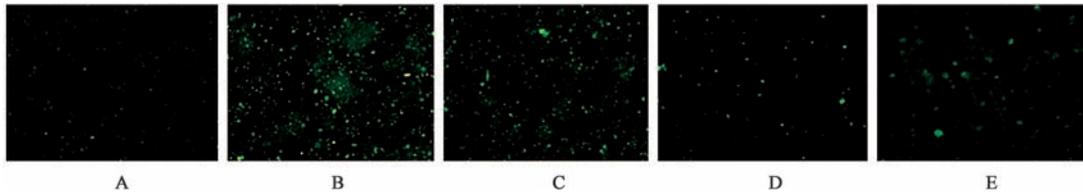


图4 小陷胸汤对TGF-β₁诱导的MGC-803细胞内Ca²⁺载量的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 4 Xiao Xianxiongtang regulated changes of intracellular Ca²⁺ concentration in TGF-β₁-treated MGC-803 cells(IF,×100)

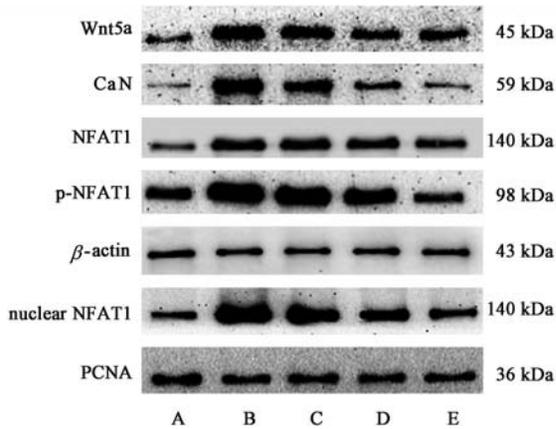


图5 TGF-β₁诱导的MGC-803细胞EMT标记蛋白表达水平电泳
Fig. 5 Electrophoresis of EMT marker proteins in TGF-β₁-treated MGC-803 cells

Wnt5a组Wnt5a、CaN、NFAT、p-NFAT活性增强,NFAT核转运活跃,胞内Ca²⁺载量升高($P<0.01$)。与Wnt5a组比较,空白质粒+小陷胸汤($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组和Wnt5a-OE+小陷胸汤($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组Wnt5a、CaN、NFAT、p-NFAT的表达降低、NFAT的核转运减少以及细胞内Ca²⁺载量降低($P<0.05, P<0.01$)。见图9、图10和表7。

4 讨论

侵袭转移是癌症恶性发展的一种标志,能促进癌细胞从原发肿瘤中分离出来,侵袭基底膜,并通过血管和淋巴管扩散,不断形成新的癌转移,侵袭周围组织并向远处的活性部位迁移^[3]。EMT是促进GC侵袭转移的首要步骤,已被证实在促进GC侵袭转移中起关键作用^[4]。EMT发生时,细胞黏附和连接的重要组分E-cadherin的表达通常是受损的,

3.8 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞Wnt5a/Ca²⁺/NFAT通路的影响 与空白组比较,

表4 小陷胸汤对TGF-β₁诱导的MGC-803细胞Wnt5a、CaN、NFAT1表达水平及胞内Ca²⁺载量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Xiao Xianxiongtang regulated expression levels of Wnt5a、CaN、NFAT1 and changes of intracellular Ca²⁺ concentration in TGF-β₁-treated MGC-803 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

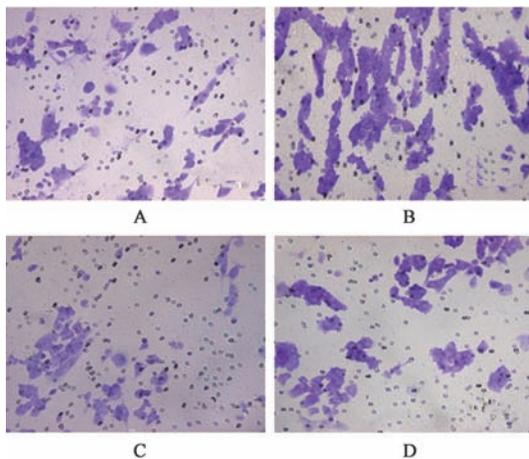
| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | Wnt5a/β-actin | CaN/β-actin | NFAT1/β-actin | p-NFAT1/β-actin | 核NFAT1/PCNA | Ca ²⁺ 荧光强度 |
|----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 0.75±0.05 | 0.57±0.16 | 0.42±0.12 | 0.78±0.17 | 0.45±0.85 | 15.12±7.48 |
| TGF-β ₁ 组 | | 1.20±0.16 ¹⁾ | 0.99±0.12 ¹⁾ | 0.83±0.16 ¹⁾ | 1.52±0.18 ¹⁾ | 1.04±0.68 ¹⁾ | 60.52±4.15 ¹⁾ |
| 小陷胸汤组 | 0.1 | 1.10±0.17 ²⁾ | 0.90±0.16 ²⁾ | 0.75±0.09 ²⁾ | 1.38±0.65 ²⁾ | 0.95±0.89 ²⁾ | 40.54±2.13 ²⁾ |
| | 0.2 | 0.95±0.02 ³⁾ | 0.80±0.23 ³⁾ | 0.69±0.19 ³⁾ | 1.02±0.56 ³⁾ | 0.73±0.34 ³⁾ | 36.45±8.79 ³⁾ |
| | 0.4 | 0.79±0.12 ³⁾ | 0.62±0.67 ³⁾ | 0.50±0.15 ³⁾ | 0.85±0.74 ³⁾ | 0.59±0.31 ³⁾ | 21.54±8.96 ³⁾ |

表 5 小陷胸汤对 Wnt5a 过表达诱导的 MGC-803 细胞侵袭和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Xiao Xianxiong tang on invasion and migration ability in Wnt5a-induced MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 细胞侵袭数/个 | 划痕愈合率/% |
|-------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 空白质粒组 | | 55.33±6.41 | 32.12±4.10 |
| Wnt5a 组 | | 130.45±5.13 ¹⁾ | 69.53±6.54 ¹⁾ |
| 空白质粒+小陷胸汤组 | 0.4 | 36.54±4.52 ²⁾ | 25.49±5.40 ²⁾ |
| Wnt5a+小陷胸汤组 | 0.4 | 64.15±5.40 ³⁾ | 39.52±4.15 ³⁾ |

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与 Wnt5a 组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01 (表 6-表 8 同)



注: A. 空白质粒组; B. Wnt5a 组; C. 空白质粒+小陷胸汤组 (0.4 g·L⁻¹); D. Wnt5a+小陷胸汤组 (0.4 g·L⁻¹) (图 7-图 9 同)

图 6 小陷胸汤对 Wnt5a 过表达诱导的 MGC-803 细胞侵袭的影响 (结晶紫, ×100)

Fig. 6 Effect of Xiao Xianxiong tang on invasion ability in Wnt5a-induced MGC-803 cells (crystal violet, ×100)

N-cadherin 和 Vimentin 的表达增强, 导致细胞间黏附减少, 促进了肿瘤细胞的浸润和转移, 从而进一步加速 GC 发展^[25]。Vimentin 是纤维蛋白家族的主要功能成员, 具有维持细胞完整性和抗应激的功能。Vimentin 的过度上调常提示肿瘤生长, 侵袭及

预后不良^[26]。Snail 是重要的调节因子, 促进细胞间黏附丧失和增强细胞的运动性。Snail 作为 E-cadherin 的负调控因子, 通过激活间充质基因的表达, 促进细胞向间充质状态过渡, 与肿瘤分级、侵袭转移增强呈正相关^[5]。

Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号转导轴被认为在调节 EMT 程序和增强癌细胞侵袭转移表型中发挥重要作用^[6-9]。Wnt5a 是一种重要的肿瘤信号转导调节因子, 通过调节 GC 中整合素黏附转换率来促进侵袭和迁移^[27]。上调 Wnt5a 已被证明可诱导炎症因子的分泌, 而炎症因子的持续存在与癌症高度相关, 而敲除 Wnt5a 可显著降低转移性癌症负担^[28-29]。Ca²⁺被称为第二信使, 通过调节细胞活化、分裂、增殖、凋亡和基因转录等生物学过程, 发挥转导信号的作用。CaN 在细胞内 Ca²⁺浓度升高时被激活, 而完全激活需要钙调蛋白 (CaM) 的参与^[30]。CaN 能直接将 Ca²⁺与蛋白质磷酸化状态联系起来, 涉及广泛的信号转导过程, 并在多种恶性肿瘤中激活, 包括 GC^[31-32]。经典的 NFATC 信号通路参与 Ca²⁺/CaN 轴的调节, Ca²⁺/CaN 是 NFAT 激活的主要通路。当细胞内游离 Ca²⁺继续积累, CaN 被刺激与 NFAT 的 NHR 位点结合, 导致 NFAT 的去磷酸化和降解, 使胞浆内 NFAT 集聚到细胞核, 增强其与 DNA 的结合性, 从而调节多种细胞因子的转录表达水平^[33]。NFAT 是一种 DNA 结合因子, 存在于 T 细胞中, 响应外界刺激, 通过参与 T 细胞和其他免疫细胞的激活和分化, 发挥其转录调控作用^[34-35]。NFAT 通过调控癌症的发生、侵袭、免疫激活或抑制发挥免疫调节转录的生物学作用, NFAT 信号调节失调参与多种癌症的恶性转化和进化^[36-37]。NFAT 过表达已被证实有助于基因转录、ECM 合成和重塑, 而 NFAT 沉默的癌细胞的增殖和侵袭能力也被显著抑制^[38-39]。在本研究中发现, 小陷胸汤能逆转 TGF-β₁ 诱导的

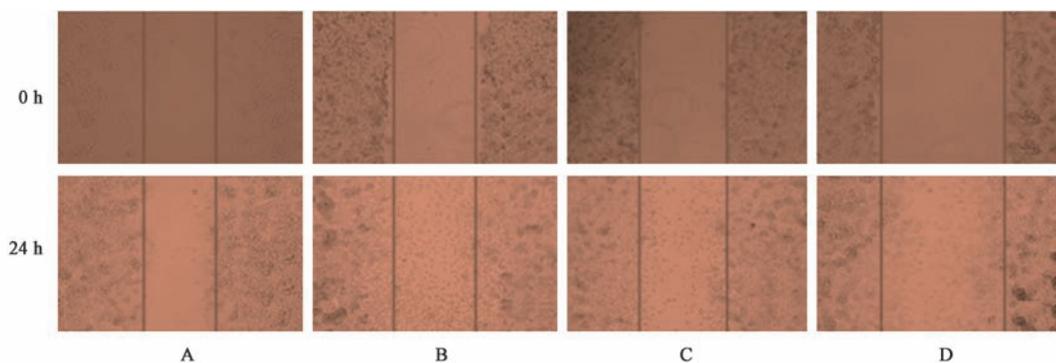


图 7 小陷胸汤对 Wnt5a 过表达诱导的 MGC-803 细胞迁移的影响 (倒置显微镜, ×200)

Fig. 7 Effect of Xiao Xianxiong tang on migration ability in Wnt5a-induced MGC-803 cells (inverted microscope, ×200)

表6 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞EMT标记蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Xiao Xianxiongtang on expression levels of EMT marker proteins in Wnt5a-induced MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | E-cadherin/ β -actin | N-cadherin/ β -actin | Snail/ β -actin | Vimentin/ β -actin |
|-------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白质粒组 | | 1.25±0.52 | 0.67±0.24 | 0.75±5.21 | 0.64±4.30 |
| Wnt5a组 | | 0.71±0.12 ¹⁾ | 1.35±3.41 ¹⁾ | 1.64±4.56 ¹⁾ | 1.15±4.55 ¹⁾ |
| 空白质粒+小陷胸汤组 | 0.4 | 1.54±1.52 ²⁾ | 0.50±0.54 ²⁾ | 0.67±4.18 ²⁾ | 0.85±5.41 ²⁾ |
| Wnt5a+小陷胸汤组 | 0.4 | 1.01±5.24 ³⁾ | 0.77±5.26 ³⁾ | 0.86±5.26 ³⁾ | 0.71±5.63 ³⁾ |

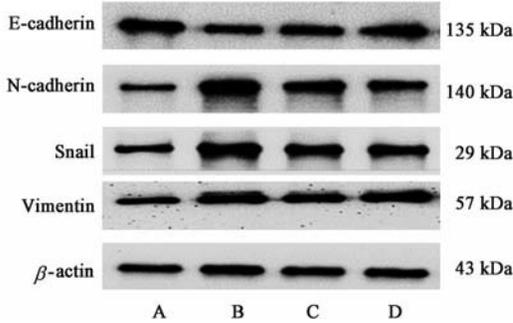


图8 Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞EMT标记蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of EMT marker proteins in Wnt5a-induced MGC-803 cells

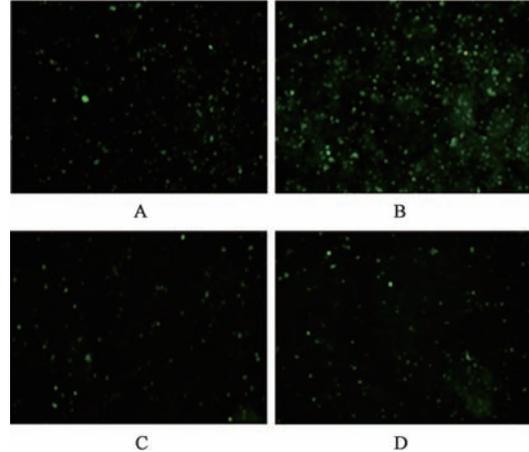


图10 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞Wnt5a/Ca²⁺/NFAT通路的影响

Fig. 10 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT pathway of Xiao Xianxiongtang-mediated on MGC-803 cells induced by Wnt5a

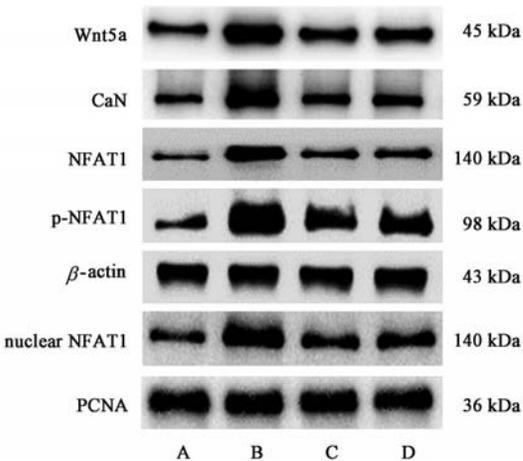


图9 Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞Wnt5a/Ca²⁺/NFAT通路蛋白电泳

Fig. 9 Electrophoresis of Wnt5a/Ca²⁺/NFAT in Wnt5a-induced MGC-803 cells

MGC-803细胞形态学改变,并通过调节EMT过程抑制侵袭和迁移能力。上游机制的特点还有待研究。因此,本研究通过Wnt5a过表达,激活MGC-803细胞中Wnt5a/Ca²⁺/NFAT信号通路,进一步探讨小陷胸汤在GC中的调控作用及潜在机制。

中医认为GC发生多因正气亏损,毒瘀内蕴,情志不畅,饮食不节,劳逸失常,气滞血瘀,寒凝痰阻蕴结于胃,多因素共同作用而形成本病。小陷胸汤出自《伤寒论》,由黄连、半夏和瓜蒌组成,方中黄连气寒味苦,清热燥湿,泻火解毒;半夏气温味辛,化痰和胃,宽胸散结;瓜蒌气寒味甘,清热涤痰,开结

而兼润下。药代动力学研究证实,小陷胸汤含有小檗碱、巴马汀、黄连碱、黄柏酮、槲皮素、黄芩素、黄芩苷、香叶木素、羟基芫花素、 β -谷甾醇、豆甾醇、菠菜甾醇^[40-44]。小陷胸汤主要活性成分具有良好的Ca²⁺调节活性^[45-49]。小檗碱不仅能减轻细胞氧化应激状态,提高钙通道敏感性,升高细胞内Ca²⁺水平,诱导Ca²⁺内流,还可下调Wnt5a水平,上调E-cadherin,从而减弱了GC的侵袭转移表型^[45,50-51]。黄连碱通过电压依赖性的L型Ca²⁺通道(VLCCs)和非选择性阳离子通道(NSCCs)以剂量依赖性的方式改变细胞内Ca²⁺浓度^[52]。槲皮素抑制Wnt5a上调以减轻神经炎症,并通过降低细胞内钙水平调节微白蛋白表达以维持钙稳态^[53-54]。黄芩苷通过增加细胞间Ca²⁺含量和整合游离Ca²⁺来诱导线粒体膜电位的丧失并最终导致线粒体凋亡^[55]。香叶木素抑制了细胞外钙再灌注引起的浓度依赖性收缩^[56]。

黏附连接的关键成分E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Snail可间接影响GC的侵袭转移,因此研究了小陷胸汤是否具有抗侵袭性迁移活性。为充分评估小陷胸汤的抑制作用,本研究选择TGF- β ,作为诱导因子,是细胞侵袭和迁移过程的重要诱导剂^[57]。研究结果表明,用小陷胸汤预处理可以抑制

表7 小陷胸汤对Wnt5a过表达诱导的MGC-803细胞Wnt5a/Ca²⁺/NFAT通路的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT pathway of Xiao Xianxiong Tang-mediated on MGC-803 cells induced by Wnt5a ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | Wnt5a/ β -actin | CaN/ β -actin | NFAT1/ β -actin | p-NFAT1/ β -actin | 核NFAT1/PCNA | Ca ²⁺ 荧光强度 |
|-------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白质粒组 | | 0.86±5.41 | 0.65±0.68 | 0.54±0.41 | 0.52±5.41 | 0.42±4.05 | 20.45±8.41 |
| Wnt5a组 | | 1.65±0.16 ¹⁾ | 1.11±0.54 ¹⁾ | 0.95±1.20 ¹⁾ | 1.56±4.15 ¹⁾ | 1.63±1.20 ¹⁾ | 78.50±2.45 ¹⁾ |
| 空白质粒+小陷胸汤组 | 0.4 | 0.94±4.15 ²⁾ | 0.61±1.56 ²⁾ | 0.61±2.30 ²⁾ | 0.75±5.71 ²⁾ | 0.74±2.31 ²⁾ | 30.15±2.52 ²⁾ |
| Wnt5a+小陷胸汤组 | 0.4 | 1.01±1.57 ³⁾ | 0.75±5.16 ³⁾ | 0.68±5.41 ³⁾ | 0.87±4.41 ³⁾ | 0.84±6.54 ³⁾ | 45.23±5.41 ³⁾ |

MGC-803细胞的侵袭和迁移。此外,小陷胸汤还调控EMT相关标志物E-cadherin、N-cadherin和Vimentin的蛋白表达,抑制EMT转录因子Snail的蛋白水平。研究结果提示,小陷胸汤对TGF- β_1 诱导的MGC-803细胞的抑制作用可能与下调侵袭和迁移能力有关,能够有效阻止MGC-803细胞向间质状态转化,从而抑制EMT过程。

小陷胸汤抑制Wnt5a、CaN、NFAT1和p-NFAT1蛋白表达,减少NFAT1核易位,降低细胞内Ca²⁺载量。在此基础上,通过转染Wnt5a过表达载体激活Wnt5a/Ca²⁺/NFAT信号通路。结果表明,小陷胸汤能够抑制Wnt5a和FRZ的结合,激活G蛋白,减少细胞内Ca²⁺的积累,下调CaN、NFAT1和p-NFAT1蛋白的表达,防止NFAT1在细胞质中聚集入核。这也证实了本研究的假设,Wnt5a/Ca²⁺/NFAT在GC的远距离入侵和迁移程序中起着至关重要的作用,提示小陷胸汤可能通过调控Wnt5a/Ca²⁺/NFAT信号通路来抑制MGC-803细胞的入侵和迁移。

本研究报道了小陷胸汤对MGC-803GC细胞侵袭和迁移的抑制作用是通过调控Wnt5a/Ca²⁺/NFAT通路介导的。综上,小陷胸汤通过抑制侵袭和迁移对MGC-803细胞具有显著的抑制作用。此外,Wnt5a过表达增加了MGC-803细胞内Ca²⁺的积累,导致细胞间黏附减少,侵袭迁移增强,这可能是GC发生的原因之一。这些结果表明,小陷胸汤可能是一种治疗GC的潜在有效药物。此外,本研究仍然存在局限性。虽然小陷胸汤的使用由来已久,但本研究只在体外研究了小陷胸汤的抗GC机制,尚未在动物实验中得到验证,进一步实验可在动物体内验证小陷胸汤的作用及其机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *Cancer*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] WANG L, WEN X, LUAN F, et al. EIF3B is associated with poor outcomes in gastric cancer patients and promotes cancer progression via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(1): 7877-7891.

[3] ZHANG X, XUE J, YANG H, et al. TNFAIP6 promotes invasion and metastasis of gastric cancer and indicates poor prognosis of patients [J]. *Tissue cell*, 2021, doi: 10.1016/j.tice.2020.101455.

[4] JI Q, LI Y, ZHAO Q, et al. KLF11 promotes gastric cancer invasion and migration by increasing Twist1 expression [J]. *Neoplasma*, 2019, 66(1): 92-100.

[5] LI S, CONG X, GAO H, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, doi:10.1186/s13046-018-1003-0.

[6] JORDAN N V, PRAT A, ABELL A N, et al. SWI/SNF chromatin-remodeling factor Smarcd3/Baf60c controls epithelial-mesenchymal transition by inducing Wnt5a signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(15): 3011-3025.

[7] CHENG R, SUN B, LIU Z, et al. Wnt5a suppresses colon cancer by inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(12): 1908-1917.

[8] GE Q, HU Y, HE J, et al. Zic1 suppresses gastric cancer metastasis by regulating Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition [J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 2161-2172.

[9] CAI M, SIKONG Y, WANG Q, et al. Gpx3 prevents migration and invasion in gastric cancer by targeting NF- κ B/Wnt5a/JNK signaling [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(4): 1194-1203.

[10] 周蕾,刘嘉湘.刘嘉湘运用小陷胸汤治疗肿瘤相关症状举隅[J].*辽宁中医杂志*,2016,43(3):617-619.

[11] 周佳静,贾英杰.贾英杰教授运用小陷胸汤合苇茎汤治疗肺癌并发恶性胸腔积液经验举隅[J].*西部中医药*,2012,25(4):31-33.

[12] 郭麒,喻嵘,肖碧跃,等.国医大师熊继柏运用小陷胸

- 汤合方治疗恶性肿瘤经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(3): 271-273.
- [13] 骆学新, 洪国标, 童海江. 加味小陷胸汤联合顺铂胸腔内化疗治疗恶性胸腔积液的疗效及对相关因子的影响[J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(4): 242-243.
- [14] 王彬彬, 沈敏鹤, 吴良村. 吴良村应用小陷胸汤治疗胰腺癌经验[J]. 中医杂志, 2018, 59(2): 108-110.
- [15] 姚鹏宇, 刘芳, 吕翠霞. 陶汉华教授基于“气血水并调”理论运用小陷胸合四君子汤加减治疗肺癌经验[J]. 西部中医药, 2021, 34(1): 37-40.
- [16] ZHEN J, CHEN W, LIU Y, et al. Baicalin protects against acute pancreatitis involving JNK signaling pathway via regulating miR-15a [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(1): 147-161.
- [17] SONG L, ZHU S, LIU C, et al. Baicalin triggers apoptosis, inhibits migration, and enhances anti-tumor immunity in colorectal cancer via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Food Biochem*, 2021, 2021: e13703.
- [18] LIU Y, HUA W, LI Y, et al. Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2019.113776.
- [19] 丁芮, 葛瑞瑞, 王恩宇, 等. 加味小陷胸汤水提物通过 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路抑制 TGF- β_1 介导的人胃癌 MGC-803 细胞上皮-间质转化及侵袭迁移[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 37-46.
- [20] WU Y, BORDE M, HEISSMEYER V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT [J]. *Cell*, 2006, 126(2): 375-387.
- [21] LIU Y, GRIMM M, DAI W T, et al. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 138-144.
- [22] LIN M H, GUO X H, QIAO L X, et al. Effect of overexpression of apoptosis-stimulating protein 2 of p53 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells induced by transforming growth factor- β_1 and its mechanism [J]. *Chin J Hepatol*, 2019, 27(11): 890-895.
- [23] BRYUKHOVETSKIY I, SHEVCHENKO V, ARNOTSKAYA N, et al. Transforming growth factor- β mimics the key proteome properties of CD133⁺ differentiated and CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2020, 151(2): 219-242.
- [24] PENG S, SONG C, LI H, et al. Circular RNA SNX29 sponges miR-744 to regulate proliferation and differentiation of myoblasts by activating the Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16(2): 481-493.
- [25] MEHRALIKHANI A, MOVAHEDI M, LARYPOOR M, et al. Evaluation of the effect of on the expression of E-cadherin, dysadherin and Ki-67 in BALB/C mice with 4T1 model of breast cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(2): 318-328.
- [26] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(18): 3033-3046.
- [27] ASTUDILLO P. Wnt5a signaling in gastric cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(3): 110.
- [28] ASEM M, YOUNG A M, OYAMA C, et al. Host Wnt5a potentiates microenvironmental regulation of ovarian cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(5): 1156-1170.
- [29] LUO J, LIU L, SHEN J, et al. miR-576-5p promotes epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer by targeting the Wnt5a-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2): 94.
- [30] CHIODONI C, DI MARTINO M T, ZAZZERONI F, et al. Cell communication and signaling: how to turn bad language into positive one [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 128.
- [31] PARK Y J, YOO S A, KIM M, et al. The role of calcium-calcineurin-NFAT signaling pathway in health and autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2020, 11(2): 195.
- [32] XIN B, JI K Q, LIU Y S, et al. Higher expression of calcineurin predicts poor prognosis in unique subtype of ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 75.
- [33] GRAEF I A, CHEN F, CHEN L, et al. Signals transduced by Ca²⁺/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature [J]. *Cell*, 2001, 105(7): 863-875.
- [34] LEE H S, JEONG G S. Aromadendrin inhibits T cell activation via regulation of calcium influx and NFAT activity [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4590.
- [35] ZHANG L, DAVIES J S, SERNA C, et al. Enhanced efficacy and limited systemic cytokine exposure with membrane-anchored interleukin-12 T-cell therapy in murine tumor models [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000210.

- [36] XIN B, JI K Q, LIU Y S, et al. NFAT overexpression correlates with CA72-4 and poor prognosis of ovarian clear-cell carcinoma subtype [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(3):745-756.
- [37] WANG W, ZAFAR A, RAJAEI M, et al. Two birds with one stone: NFAT1-MDM2 dual inhibitors for cancer therapy [J]. *Cells*, 2020,9(5):1176.
- [38] LIU Y, LIANG T, QIU X, et al. Down-regulation of Nfatc1 suppresses proliferation, migration, invasion, and warburg effect in prostate cancer cells [J]. *Med Sci Monit*, 2019,25(2):1572-1581.
- [39] HUANG B, HE Y, LI S, et al. The RCAN1.4-calcineurin/NFAT signaling pathway is essential for hypoxic adaptation of intervertebral discs [J]. *Exp Mol Med*, 2020,52(5):865-875.
- [40] YU M, REN L, LIANG F, et al. Effect of epiberberine from *Coptis chinensis* Franch on inhibition of tumor growth in MKN-45 xenograft mice [J]. *Phytomedicine*, 2020,76(4):153216.
- [41] 王恩宇,王景辉,丁芮,等.“黄连-半夏”药对治疗胃癌的网络药理学研究和实验验证[J]. *中国中药杂志*,2020,45(8):1779-1788.
- [42] DU Z, WANG Q, MA G, et al. Inhibition of Nrf2 promotes the antitumor effect of Pinelliae Rhizome in papillary thyroid cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(8):13867-13877.
- [43] KU J M, HONG S H, KIM H I, et al. Synergistic anticancer effect of combined use of *Trichosanthes kirilowii* with cisplatin and pemetrexed enhances apoptosis of H1299 non-small-cell lung cancer cells via modulation of ErbB3 [J]. *Phytomedicine*, 2020, 66(21):153109.
- [44] HUNSAKUNACHAI N, NUENGCHAMNONG N, JIRATCHARIYAKUL W, et al. Pharmacokinetics of cucurbitacin B from *Trichosanthes cucumerina* L. in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):157.
- [45] YONG J, ZU R, HUANG X, et al. Synergistic effect of berberine hydrochloride and fluconazole against candida albicans resistant isolates [J]. *Front Microbiol*,2020,11(5):1498.
- [46] PAUL M, HEMSHEKHAR M, KEMPARAJU K, et al. Berberine mitigates high glucose-potentiated platelet aggregation and apoptosis by modulating aldose reductase and NADPH oxidase activity [J]. *Free Radic Biol Med*,2019,130(4):196-205.
- [47] FAN J, LI B R, ZHANG Q, et al. Pretreatment of IEC-6 cells with quercetin and myricetin resists the indomethacin-induced barrier dysfunction via attenuating the calcium-mediated JNK/Src activation [J]. *Food Chem Toxicol*,2021,147(2):111896.
- [48] HUANG K H, CHEN C Y, CHANG C Y, et al. The synergistic effects of quercetin-containing 3D-printed mesoporous calcium silicate/calcium sulfate/poly-ε-caprolactone scaffolds for the promotion of osteogenesis in mesenchymal stem cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2021,120(8):1627-1634.
- [49] SAUL D, WEBER M, ZIMMERMANN M H, et al. Effect of the lipoxygenase inhibitor baicalein on bone tissue and bone healing in ovariectomized rats [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2019,16(6):4.
- [50] SONG J, TANG Z, LI H, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis of diabetic erectile dysfunction and an intervention with berberine [J]. *J Sex Med*,2019,16(11):1708-1720.
- [51] HU Q, LI L, ZOU X, et al. Berberine attenuated proliferation, invasion and migration by targeting the AMPK/HNF4α/Wnt5a pathway in gastric carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2018,9(6):1150.
- [52] WEN N, XUE L, YANG Y, et al. Coptisine, a protoberberine alkaloid, relaxes mouse airway smooth muscle via blockade of VDLCCs and NSCCs [J]. *Biosci Rep*,2020,40(2):BSR20190534.
- [53] YANG Y, LIU X, WU T, et al. Quercetin attenuates AZT-induced neuroinflammation in the CNS [J]. *Sci Rep*,2018,8(1):6194.
- [54] PARK D J, KANG J B, SHAH F A, et al. Quercetin attenuates the reduction of parvalbumin in middle cerebral artery occlusion animal model [J]. *Lab Anim Res*,2021,37(1):9.
- [55] ZHU Y, FANG J, WANG H, et al. Baicalin suppresses proliferation, migration, and invasion in human glioblastoma cells via Ca²⁺-dependent pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12(2):3247-3261.
- [56] AHMAD T, SHAH A J, KHAN T, et al. Mechanism underlying the vasodilation induced by diosmetin in porcine coronary artery [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020; 884(2):173400.
- [57] JIANG X, ZHANG Z, SONG C, et al. Glaucocalyxin A reverses EMT and TGF-β₁-induced EMT by inhibiting TGF-β₁/Smad2/3 signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 307(10):158-166.

[责任编辑 张丰丰]