寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠肿瘤生长及糖酵解相关蛋白的影响

王 芳[1]， 王辛宇[2]， 王立振[2]， 杨 敏[1,2*]
(1. 内蒙古医科大学药学院，内蒙古 呼和浩特 010110；2. 国家卫生健康委员会核医学重点实验室，江苏省分子核医学重点实验室，江苏省原子医学研究所，江苏 无锡 214063)

摘要：目的 探讨蒙药寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响及对糖酵解相关蛋白的调控作用。**方法** 建立 HGC-27 胃癌荷瘤小鼠模型，随机分为模型组、蒙药组、西药组、联合组，分别给予生理盐水、寒水石小灰散（375 mg/kg 灌胃，每天 1 次）、5-氟尿嘧啶（5-Fu）注射液（62.5 mg/kg 腹腔注射，每周 1 次）、寒水石小灰散（375 mg/kg灌胃，每天 1 次）和 5-Fu 注射液（62.5 mg/kg 腹腔注射，每周 1 次）联合干预，每天监测小鼠体质量、瘤体积，计算抑瘤率。在第 0、4、8、15、22、30 天进行^{18}F-FDG microPET 显像，HE 染色观察肿瘤组织，免疫组化检测 GLUT1 表达，蛋白免疫印迹法检测 PI3K、Akt、P-Akt、mTOR、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达。**结果** 与模型组比较，西药组小鼠体质量降低（$P<0.05$），蒙药组与联合组小鼠体质量无明显变化（$P>0.05$）。各治疗组对肿瘤生长均有抑制作用（$P<0.05$，$P<0.01$），肿瘤生长抑制率依次为联合组>西药组>蒙药组>模型组。^{18}F-FDG microPET 扫描结果显示，随着治疗时间延长，各治疗组小鼠的肿瘤放射性摄取值（%ID/g）持续降低，在治疗第 8 天开始有显著性差异（$P<0.05$），联合组小鼠摄取值降低最明显（$P<0.05$）。HE 染色显示模型组肿瘤组织血管丰富，坏死率低，显著低于其他治疗组。免疫组化观察 GLUT1 在模型组高表达，而在其他治疗组低表达（$P<0.05$，$P<0.01$）。与模型组比较，各治疗组 PI3K、P-Akt、HIF-1α、GLUT1 表达降低（$P<0.01$）。**结论** 寒水石小灰散对 HGC-27 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长有一定抑制作用，且能协同增强化疗效果，其抗肿瘤机制可能与影响糖代谢及下调 PI3K、P-Akt、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达有关。

关键词：寒水石小灰散；胃癌；糖酵解；^{18}F-FDG microPET；PI3K；P-Akt；HIF-1α；GLUT1
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2023)01-0228-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.042

胃癌是常见的胃肠道恶性肿瘤之一，据统计，在我国胃癌的发病率排第二位，死亡率占第三位[1]。胃癌初期症状隐匿，常会错失手术机会，其他放化疗等治疗方式的疗效有限，并且化疗药物的毒副作用会严重影响患者生存质量，限制了其应用[2-3]。因此，寻找一种低毒有效的药物治疗方案显得尤为重要。许多研究者将注意力转向传统民族医药，以期获得更好的治疗效果[4]。

蒙成药寒水石小灰散是由北寒水石、光明盐、麦冬、硼砂、荜茇和硫磺 6 味药焖制煅烧而成[5]，出自《诊治明医典》[6]，具有消食、除痞的功效[7]，常用于治疗胃溃疡、胃炎、胃癌等消化系统疾病，虽价格低廉，但疗效可观[6]。临床前研究表明寒水石小灰散不仅能增强机体的免疫应答，还可以通过诱导癌细胞凋亡，抑制血管生成等作用而影响肿瘤生长[8-9]。肿瘤的发生发展过程中伴随着代谢途径的重塑，癌细胞更喜欢糖酵解来产生能量，糖酵解的减弱或抑制可以有效预防某些癌症的发展[10]。鉴于目前寒水石小灰散对人胃癌细胞的糖酵解相关机制的研究尚未见报道，本实验以 HGC-27 荷瘤小鼠模型为研究对象，观察寒水石小灰散对糖酵解相关蛋白的影响，结合 microPET、免疫组化、Western blot 等方法探讨其可能的机制，为蒙药寒水石小灰散防治肿瘤奠定生物学基础。

1 材料

1.1 *细胞株* 人胃癌 HGC-27 细胞株，购自中国科学院上海细胞库。

1.2 *动物* 50 只 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠，6 周龄，体质量 18~24 g，购自常州卡文斯实验动物有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（苏）2016-0010。

1.3 *试剂与药物* 寒水石小灰散（国药准字 Z20027785，批号 190319），购自内蒙古库伦蒙药有限公司。异氟烷（上海雅培制药有限公司），用于小鼠麻醉和安乐死。氟尿嘧啶（5-Fu）注射液（规格 10 mL∶0.25 g，批号 1805041），购自天津金耀药业有限公司；0.9% 氯化钠注射液（规格500 mL∶4.5 g，批号 1907051701），购自石家庄四药有限公司；^{18}F-FDG 由无锡市第四人民医院提供；RPMI

收稿日期：2021-06-03
基金项目：江苏省创新能力建设计划项目（BM2018023）；江苏省医学创新团队资助项目（CXTDA2017024）
作者简介：王 芳（1989—），女（蒙古族），硕士，从事蒙药抗肿瘤机制研究。Tel：15047319960，E-mail：wangfang430@126.com
*通信作者：杨 敏（1972—），女，研究员，博士生导师，从事分子探针的开发及在肿瘤、神经系统诊疗中的应用研究。Tel：13701516659，E-mail：yangmin@jsinm.org

1640 培养基，购自美国 Thermo Fisher 公司；胎牛血清，购自美国 Genial 公司；Akt、p-Akt（Thr308）、PI3K、mTOR、HIF-1α、重组 anti-glucose transporter GLUT1 抗体，购自英国 Abcam 公司；通用型二抗试剂盒、二氨基联苯胺（DAB）、异氟烷，购自上海雅培制药有限公司。其他试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器 Micro PET 仪（德国 Siemens 公司）；小动物麻醉机（SAR-830/P 型，美国 CWE 公司）；HPLC 紫外检测器（2487 型，美国 Waters 公司）；HPLC 放射性检测器（美国 Perkin Elmer 公司）；倒置相差荧光显微镜（显微镜 IX51、荧光 TH4-200，日本 Olympus 公司）；小型 Trans-Blot 转印槽、Gel Doc XR$^+$凝胶成像系统（170-3930 型、170-8195 型，美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 HGC-27 胃癌裸鼠移植瘤模型制备 HGC-27 细胞于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下，在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基中培养，收集对数生长期的细胞，制备密度为 5×10^7/mL 的细胞悬液，胰岛素针抽取 0.2 mL 注射到裸鼠的右侧腋窝皮下，建立胃癌裸鼠移植瘤模型，所有操作均在无菌超净台内进行。造模后每天用游标卡尺测量肿瘤最大径，待其达 0.6～0.8 cm 时进行实验[11]。

2.2 分组及给药 荷瘤鼠随机分为 4 组，即模型组、蒙药组、西药组、联合组，每组 6 只。蒙药组每天灌胃给予 375 mg/kg寒水石小灰散混悬液（相当于临床等效剂量，称取寒水石小灰散 112.5 mg，溶于 3 mL 蒸馏水中，灌胃前摇匀，使其成均匀混悬液，每只荷瘤裸鼠给予 0.2 mL）；西药组小鼠每周腹腔注射 62.5 mg/kg 氟尿嘧啶；联合组每周腹腔注射 62.5 mg/kg 氟尿嘧啶，同时灌胃给予375 mg/kg 寒水石小灰散混悬液；模型组每天灌胃等量生理盐水，连续 30 d。

2.3 肿瘤体积及生长抑制率测定 药物干预期间每天用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径，计算瘤体积，公式为肿瘤体积=长径×短径^2/2。治疗 30 d 后，处死小鼠，取出肿瘤异种移植物，计算肿瘤生长抑制率，公式为肿瘤生长抑制率=（1−T/C）×100%，其中 T 为治疗组平均瘤重，C 为模型组平均瘤重。

2.4 MicroPET 显像 在治疗第 0、4、8、15、22、30 天进行^{18}F-FDG microPET 扫描。荷瘤鼠在注射、蓄积和扫描期间一直保持异氟醚麻醉状态，并在示踪剂注射前禁食 12 h，扫描前 1 h，经尾静脉注射示踪剂^{18}F-FDG，剂量约为 3.7 MBq（每只 100～200 μL），注射示踪剂 1 h 后，进行 10 min静态 microPET 扫描。通过 Inveon micro PET 程序分析 PET 扫描和图像。

2.5 肿瘤组织的病理学观察 治疗第 30 天，经尾静脉注射^{18}F-FDG microPET 扫描后，立即颈椎脱臼处死小鼠，迅速解剖取出肿瘤组织，采用 4% 多聚甲醛溶液进行固定。

2.5.1 苏木精-伊红（HE）染色 取 4% 多聚甲醛溶液中固定的肿瘤组织样本，经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋后，用组织切片机将样本蜡块以 4 μm 连续切片，烘片后进行 HE 染色，显微镜下观察瘤组织坏死面积、病理变化等。

2.5.2 免疫组织化学（IHC）法检测 GLUT1 蛋白表达 石蜡包埋切片常规脱蜡，加入 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复，用 0.3% 过氧化氢室温孵育 20 min，加入 20% 正常山羊血清孵育 30 min，加入 GLUT1（1∶100）抗体 4 ℃过夜，滴加即用型二抗，DAB 显色，苏木精复染，吹干，树脂固定，光学显微镜下观察。

2.6 Western blot 法检测 PI3K、Akt、p-Akt（Thr308）、mTOR、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达 取肿瘤组织置于匀浆器中，加入 400 μL 裂解液冰上匀浆，反复冻融 3 次后，12 000 r/min 低温离心 15 min，取上清液，即得总蛋白，BCA 法定量。分别取 20 μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳分离，湿法转膜，5% BSA 封闭 1 h，加入 PI3K、Akt、p-Akt（Thr308）、mTOR、HIF-1α、GLUT1 一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜，然后加入二抗室温孵育 2 h，TBST 洗膜后 ECL 曝光。使用凝胶成像分析系统成像，Image J 软件分析灰度值，以 GAPDH 为内参，计算靶蛋白相对表达。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 软件进行处理，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

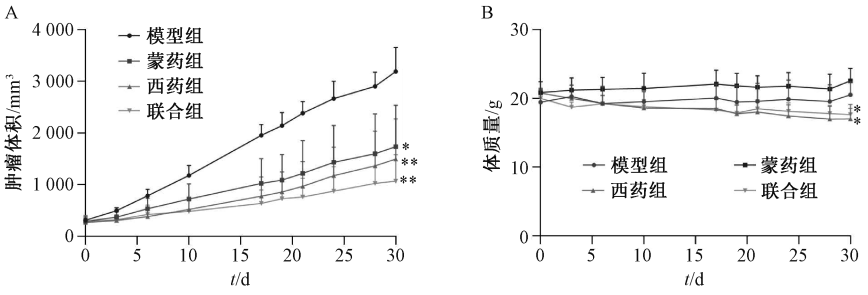
3 结果

3.1 寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠皮下瘤的影响 如图 1A 所示，各治疗组小鼠肿瘤体积增长速度均小于模型组，治疗 30 d 后，与模型组比较，各治疗组均可抑制肿瘤体积增长，其中联合组抑制肿瘤体积增长速度最明显（$P<0.05$，$P<0.01$）。如图 1B 所示，与模型组比较，治疗 30 d 后，西药组小鼠体质量降低（$P<0.05$），蒙药组与联合组小鼠体质量无明显变化（$P>0.05$），提示蒙药的低毒性。如表 1 所示，各给药组瘤块质量均小于模型组（$P<0.05$，$P<0.01$），肿瘤生长抑制率依次为联合组>西药组>蒙药组>模型组。

表 1 寒水石小灰散对裸鼠肿瘤生长的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	平均体质量/g	瘤块体积/cm^3	瘤块质量/g	抑瘤率/%
模型组	19.96±2.25	3.18±0.40	4.19±0.35	—
蒙药组	21.97±2.24	1.74±0.71*	2.64±0.70*	37.00
西药组	17.00±2.11*	1.49±0.67**	1.61±0.14**	61.57
联合组	17.64±0.90	1.07±0.47**	1.42±0.70**	66.10

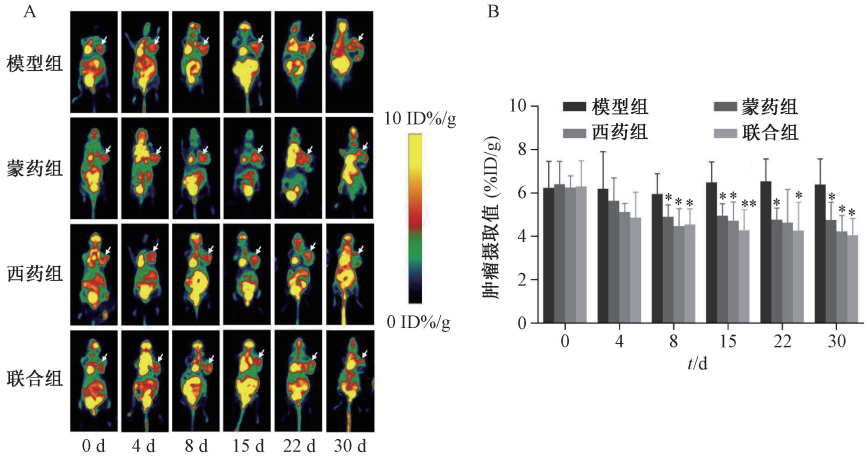
注：与模型组比较，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$。



注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 1　各组小鼠肿瘤体积（A）和体质量（B）（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.2　寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠^{18}F-FDG microPET 影像学的影响　如图 2 所示，与模型组比较，各治疗组肿瘤摄取值在治疗的第 4 天开始降低，第 8 天开始差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）；随着治疗时间的延长，各给药组小鼠肿瘤放射性摄取逐渐减少，其中联合组小鼠摄取值降低最明显。



注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 2　各组 micro PET 影像学（A）及肿瘤摄取值（B）（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.3　寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠皮下肿瘤病理学的影响

3.3.1　HE 染色　模型组肿瘤组织内小面积坏死，肿瘤细胞排列紧密，核染色深，核异型性明显；蒙药组肿瘤组织可见部分不规则的凝固性坏死区域，癌细胞分散排列；西药组及联合组肿瘤组织内可见大面积不规则的凝固性坏死区，血管稀少，见图 3。

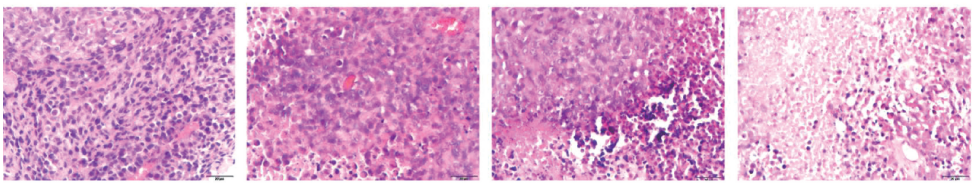


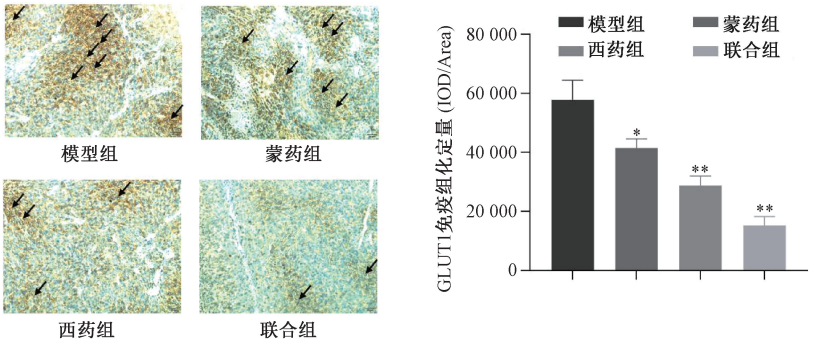
图 3　各组肿瘤组织 HE 染色（×400）

3.3.2　IHC 染色　肿瘤组织中 GLUT1 表达均呈阳性，且 GLUT1 在模型组高表达，而在其他治疗组表达降低（$P<0.05$，$P<0.01$），半定量结果与 microPET 显像结果一致，见图 4。

3.4　寒水石小灰散对 HGC-27 荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达的影响　与模型组比较，各给药组小鼠肿瘤组织 p-Akt、PI3K、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达均降低（$P<0.01$），其中联合组蛋白表达降低最多，其次为阳性药物组，见图 5~6。

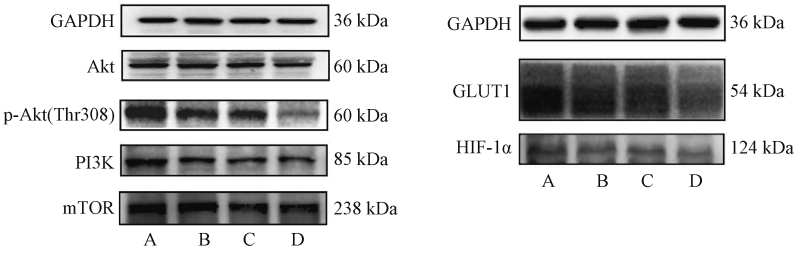
4　讨论

蒙医学认为胃癌是由于恶血与黄水增盛，由巴达干、赫依作用而凝结并淤积于胃而形成的胃血痞，可以使用寒水石小灰散进行医治[12]。寒水石小灰散在蒙医临床常用于治疗消化系统恶性肿瘤，对于中晚期胃癌疗效观察发现蒙西药联合治疗组患者的 1 年生存率、生活质量改善率及相关不良反应均优于单独西药组[13]。本研究对 HGC-27 胃癌荷瘤小鼠模型进行抗肿瘤疗效监测，验证了寒水石小灰散具有一定抗癌活性，同时发现寒水石小灰散联合西药 5-Fu



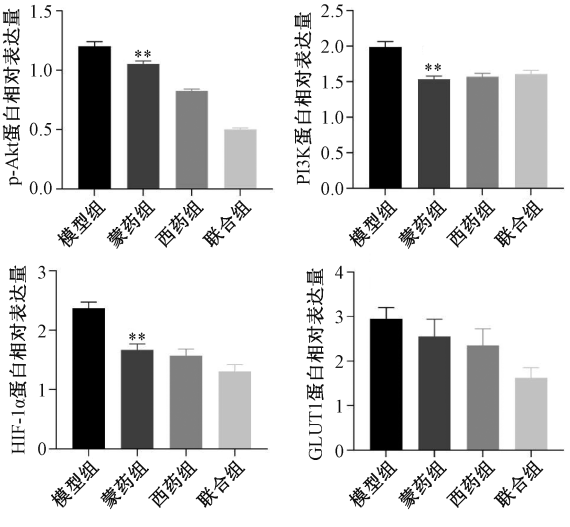
注：黑色箭头指示阳性表达。与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 4 各组肿瘤组织 GLUT1 蛋白表达（×400，$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



注：A 为模型组，B 为蒙药组，C 为西药组，D 为联合组。

图 5 各组肿瘤组织 Akt、p-Akt、PI3K、mTOR、HIF-1α、GLUT1 蛋白印迹图



注：与模型组比较，** $P<0.01$。

图 6 各组肿瘤组织 p-Akt、PI3K、HIF-1α、GLUT1 蛋白表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

对 HGC-27 异种移植瘤的疗效优于单独使用 5-Fu。

目前研究认为，肿瘤细胞即使是氧气供应充足的条件下也主要是以糖酵解而非线粒体的氧化磷酸化提供能量，这种异常代谢现象被称为有氧糖酵解即 Warburg 效应[14]。正电子发射断层扫描（PET）是临床应用最成熟的无创分子影像技术，可以非侵入性地实时可视化生物体内的病理、生理进程[15]。^{18}F-氟代脱氧葡萄糖（^{18}F-FDG）为葡萄糖的类似物，是临床上一种应用很广泛的代谢显像剂。葡萄糖代谢的动态变化可以作为肿瘤细胞生长的潜在生物标志物，^{18}F-FDG PET 显像可以检测体内葡萄糖代谢变化[16]。本研究发现，与模型组比较，寒水石小灰散组肿瘤放射性摄取值持续降低，联合组小鼠肿瘤摄取值降低最明显。治疗第 30 天，离体肿瘤组织 GLUT1 蛋白半定量结果与 microPET 显像结果一致，这提示寒水石小灰散可能通过抑制糖酵解的进程来调控肿瘤细胞的能量代谢，表明其抗肿瘤作用机制可能与影响葡萄糖代谢有关。肿瘤细胞的过度生长会导致细胞微环境缺氧[17]，慢性缺氧会出现在坏死中心的周围区域[18]。本研究通过 microPET 技术观察到了肿瘤中心部分的坏死，且蒙药组坏死面积小于模型组，HE 染色与 microPET 显像结果一致，提示蒙药可能通过改善肿瘤细胞内的缺氧环境来降低糖代谢水平。

糖酵解的增加意味着更多的葡萄糖需要被转运，细胞外的葡萄糖摄取由葡萄糖转运蛋白（GLUT）介导，其中 GLUT1 负责基础的葡萄糖摄取并广泛表达于各种组织，也是目前研究较多的蛋白[19]。为了进一步阐明寒水石小灰散抑制胃癌细胞有氧糖酵解的作用机制，本研究继续对肿瘤组织中 GLUT1 及其上游通路相关蛋白进行了检测。HIF-1α 在肿瘤组织缺氧环境中的表达明显升高[17]，研究表明 HIF-1α 可以通过多种途径参与胃癌的发病机制，在胃癌患者的肿瘤组织及血清中高表达[20]，其也是糖酵解的关键调节酶之一[21]，活化的 HIF-1α 可以上调 GLUT1 的表达，增加癌细胞对葡萄糖的摄取[22]。HIF-1α 上游磷脂酰肌醇-3 激酶（PI3K）/丝氨酸苏氨酸激酶（Akt）信号通路是调节细胞生长过程的重要通路，该通路的异常活化不仅促进细胞异常生长、增殖、分化，而且可以介导糖酵解的发生[23]。本研究发现，蒙药组可以降低肿瘤组织 PI3K、p-Akt、HIF-

1α、GLUT1 蛋白表达，初步验证了寒水石小灰散对糖酵解过程的调控可能与其降低 GLUT1 及上游相关蛋白表达有关。

综上所述，蒙药寒水石小灰散可以抑制肿瘤的糖酵解过程，从而抑制肿瘤细胞增殖，其影响糖酵解过程的机制可能与降低 PI3K、p-Akt、HIF-1α 表达，进而减少糖酵解相关蛋白 GLUT1 的表达有关。本研究为寒水石小灰散发挥抗肿瘤作用做出了新的探索，进一步为寒水石小灰散临床治疗胃癌提供了新的理论依据，对后续深入研究蒙药抗肿瘤作用机制具有一定的参考意义。

参考文献：

[1] 郑荣寿，孙可欣，张思维，等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志，2019，41(1)：19-28.

[2] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3) [J]. *Gastric Cancer*，2011，14(2)：11-123.

[3] Chang J S，Choi Y，Shin J，*et al*. Patterns of care for radiotherapy in the neoadjuvant and adjuvant treatment of gastric cancer：A twelve-year nationwide cohort study in Korea[J]. *Cancer Res Treat*，2018，50(1)：118-128.

[4] 乌仁曹布道. 蒙药抗肿瘤机制研究概况[J]. 中国民族民间医药，2017，26(1)：41-43.

[5] 李敬芬，王 栋，林 燕. 蒙成药寒水石小灰散中含水硫酸钙的含量测定[J]. 中国民族医药杂志，2007，13(12)：47；75.

[6] 赵立元，徐易得，王一博，等. 蒙药寒水石化灰小剂的研究进展[J]. 中国民族医药杂志，2013，19(6)：66-70.

[7] 胡密霞，周昊霏，王美玲，等. 蒙药寒水石的研究进展[J]. 中国民族医药杂志，2014，20(9)：34-36.

[8] 陆景坤，徐易德，赵立元，等. 蒙药寒水石化灰小剂药效学研究[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2014，16(1)：63-67.

[9] 赵立元，陆景坤，孙 鹏，等. 蒙药寒水石化灰小剂对 S-180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用相关研究[J]. 中华中医药杂志，2016，31(12)：5232-5236.

[10] Li H Y，Fu L，Liu B，*et al*. Ajuba overexpression regulates mitochondrial potential and glucose uptake through YAP/Bcl-xL/GLUT1 in human gastric cancer[J]. *Gene*，2019，693：16-24.

[11] 靳俊峰，欧小波，阮 媛，等. 人胃癌 HGC-27 裸鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. 遵义医学院学报，2015，38(1)：29-31.

[12] 信莎莎，白 埔，董 玉. 蒙药抗肿瘤研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报，2015，37(S1)：122-126.

[13] 萨仁格日乐. 壮西音灰剂联合化疗对中晚期胃癌疗效观察[J]. 中国民族医药杂志，2011，17(5)：6-7.

[14] 石文静，谭佳妮，沈卫星，等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(20)：120-125.

[15] Pillarsetty N，Jhaveri K，Taldone T，*et al*. Paradigms for precision medicine in epichaperome cancer therapy[J]. *Cancer Cell*，2019，36(5)：559-573.

[16] Chen Y，Wang L，Liu H，*et al*. PET imaging on dynamic metabolic changes after combination therapy of paclitaxel and the traditional Chinese medicine in breast cancer-bearing mice[J]. *Mol Imaging Biol*，2018，20(2)：309-317.

[17] Liu W，Chen X，He Y Q，*et al*. TNF-α inhibits xenograft tumor formation by A549 lung cancer cells innude mice *via* the HIF-1α/VASP signaling pathway[J]. *Oncol Rep*，2019，41(4)：2418-2430.

[18] Yang M，Gao H K，Sun X L，*et al*. Multiplexed PET probes for imaging breast cancer early response to VEGF121/rGel treatment[J]. *Mol Pharm*，2011，8(2)：621-628.

[19] 李晓芸，卞 卡. 中药干预肿瘤 Warburg 效应的研究进展[J]. 上海中医药大学学报，2017，31(1)：87-99.

[20] Zhang J J，Xu J，Dong Y H，*et al*. Down-regulation of HIF-1α inhibits the proliferation，migration，and invasion of gastric cancer by inhibiting PI3K/Akt pathway and VEGF expression[J]. *Biosci Rep*，2018，38(6)：BSR20180741.

[21] Gao T，Zhang X H，Zhao J，*et al*. SIK2 promotes reprogramming of glucose metabolism through PI3K/Akt/HIF-1α pathway and Drp1-mediated mitochondrial fission in ovarian cancer[J]. *Cancer Lett*，2020，469：89-101.

[22] Kitajima Y，Miyazaki K. The critical impact of HIF-1a on gastric cancer biology[J]. *Cancers* (*Basel*)，2013，5(1)：15-26.

[23] 袁 维，王云莲，王晓艳. 肿瘤与糖酵解[J]. 医学信息，2014(2)：493.