胃复方调控HIF-1α/VEGF信号通路抑制胃癌细胞增殖及血管生成机制研究

孙蕊，李东芳

湖南省肿瘤医院，湖南 长沙 410006

［摘要］**目的：**观察不同浓度胃复方水提物（WFF）对人胃癌HGC-27细胞的增殖抑制作用，进一步探讨WFF调控HIF-1α/VEGF信号通路的作用机制。**方法：**采用不同浓度（1.2 mg/mL、1.3 mg/mL、1.4 mg/mL、1.5 mg/mL、1.6 mg/mL、1.7 mg/mL、1.8 mg/mL）的WFF，CCK-8法寻找最佳干预浓度并观察不同的干预组别［非特异性对照组（NC组）、WFF组、WFF+HIF-1α过表达质粒组、WFF+2-MeOE2（HIF-1α抑制剂）组、HIF-1α过表达质粒组、2-MeOE2组、甲磺酸阿帕替尼组］对HGC-27细胞增殖的影响；运用血管生成实验观察不同组别对胃癌细胞血管生成能力的影响；进一步采用Western blot法观察不同组别［NC组、WFF组、WFF+HIF-1α过表达质粒组、WFF+2-MeOE2组（HIF-1α抑制剂）、HIF-1α过表达质粒组、2-MeOE2组］对HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白表达的影响。**结果：**CCK-8法验证了WFF与NC组比较，对HGC-27细胞增殖具有抑制作用，差异有统计学意义（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。与NC组比较，WFF组、WFF+HIF-1α过表达质粒组、WFF+2-MeOE2（HIF-1α抑制剂）组、2-MeOE2组、甲磺酸阿帕替尼组对HGC-27细胞增殖具有抑制作用，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与WFF组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组细胞活性增高，差异有统计学意义（$P<0.01$），WFF+2-MeOE2组活性降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与HIF-1α过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组有效抑制了HGC-27细胞增殖，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与2-MeOE2组比较，WFF+2-MeOE2组有效抑制了HGC-27细胞增殖，差异有统计学意义（$P<0.01$）。血管生成实验验证了WFF有效降低了人胃癌HGC-27细胞血管生成能力，除HIF-1α过表达质粒组外，其余各组与NC组比较，均降低了HGC-27细胞血管生成能力，差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。与WFF组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组，成管数目、交叉点、网眼数及长度增多，差异有统计学意义（$P<0.01$），WFF+2-MeOE2组，成管数目、交叉点、网眼数及长度减少，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与HIF-1α过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组成管数目、交叉点、网眼数及长度减少，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与2-MeOE2组比较，WFF+2-MeOE2组成管数目、网眼数及长度减少，差异有统计学意义（$P<0.01$）。Western blot法验证了WFF下调了HIF-1α、VEGFA、VEGFR-2、Ki-67、PCNA的蛋白表达（$P<0.05$），并分别与HIF-1α过表达质粒、2-MeOE2有不同程度的拮抗、协同作用。**结论：**WFF可能通过抑制HIF-1α/VEGF信号通路发挥抑制胃癌细胞增殖及抗血管生成的作用。

［关键词］胃癌；胃复方；增殖；抗血管生成；HIF-1α/VEGF

［中图分类号］R735.2 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）17-0157-08

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.17.029

Study on the Mechanism of Weifufang Regulating HIF-1α/VEGF Signaling Pathway to Inhibit the Proliferation and Angiogenesis of Gastric Cancer Cells

SUN Rui, LI Dongfang

Hu'nan Cancer Hospital, Changsha Hu'nan 410006, China

Abstract: Objective: To observe the inhibitory effect of different concentrations of Weifufang water

［收稿日期］2023-04-21
［修回日期］2023-06-19
［基金项目］湖南省中医药管理局科研计划项目重点课题（C2022007）；湖南省“十四五”第一批中医药领军人才和学科带头人培养项目（湘中医药〔2022〕4号）；湖南省2022年科药联合基金项目（2022JJ80077）
［作者简介］孙蕊（1995-），女，在读硕士研究生，E-mail：2285442177@qq.com。
［通信作者］李东芳（1971-），女，主任医师，E-mail：kekou3190@163.com。

extract (WFF) on the proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells, and to further explore the mechanism of the regulation of HIF-1α/VEGF signaling pathway by WFF. **Methods:** Used different concentrations (1.2 mg/mL, 1.3 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.7 mg/mL, 1.8 mg/mL) of WFF. CCK-8 method was used to find the optimal intervention concentration and observe the effects of different intervention groups [non-specific control group (NC group), WFF group, WFF + HIF-1α overexpression plasmid group, WFF+2-MeOE2 (HIF-1α inhibitor) group, HIF-1α overexpression plasmid group, 2-MeOE2 group, Apatinib Mesylate group] on proliferation of HGC-27 cells. Angiogenesis experiment was used to observe the effect of different groups on the angiogenesis ability of gastric cancer cells. Western blot method was used to observe the effects of different groups [NC group, WFF group, WFF+HIF-1α overexpression plasmid group, WFF+2-MeOE2 (HIF-1α inhibitor), HIF-1α overexpression plasmid group, 2-MeOE2 group] on the expression of HIF-1α/VEGF signaling pathway-related proteins. **Results:** CCK-8 method verified that compared with NC group, WFF inhibited HGC-27 cell proliferation, the difference was significant ($P<0.01$), and it was dose-dependent. Compared with NC group, WFF group, WFF + HIF-1α overexpression plasmid group, WFF + 2-MeOE2 (HIF-1α inhibitor) group, 2-MeOE2 group, Apatinib Mesylate group had a statistically significant inhibitory effect on the proliferation of HGC-27 cells, the difference was significant ($P<0.01$). Compared with WFF group alone, the activity of cells in WFF + HIF-1α overexpression plasmid group increased, the difference was statistically significant ($P<0.01$), and the activity in WFF + 2-MeOE2 group decreased, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with HIF-1α overexpression plasmid group, WFF + HIF-1α overexpression plasmid group effectively inhibited the proliferation of HGC-27 cells, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with 2-MeOE2 group, WFF + 2-MeOE2 group effectively inhibited the proliferation of HGC-27 cells, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The angiogenesis experiment verified that WFF effectively reduced the angiogenesis capacity of human gastric cancer HGC-27 cells, except HIF-1α overexpression plasmid group, the other groups decreased the angiogenesis capacity of HGC-27 cells compared with NC group, the difference was statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with WFF group, the number of component tubes, crossing points, mesh number and length increased in WFF + HIF-1α overexpression plasmid group ($P<0.01$), and the number of tubes, crossing points, mesh number and length decreased in WFF+2-MeOE2 group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with HIF-1α overexpression plasmid group, WFF+HIF-1α overexpression plasmid group composition tube number, crossing points, mesh number and length decreased, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with 2-MeOE2 group, the number of WFF+2-MeOE2 group component tubes, mesh number and length decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). Western blot verified that the WFF down-regulated the protein expressions of HIF-1α, VEGFA, VEGFR-2, Ki-67 and PCNA ($P<0.05$), and had antagonistic and synergistic effects with HIF-1α overexpression plasmid and 2-MeOE2, respectively. **Conclusion:** WFF may inhibit the proliferation and anti-angiogenesis of gastric cancer cells by inhibiting HIF-1α/VEGF signaling pathway.

Keywords: Gastric cancer; Weifufang; Proliferation; Anti-angiogenesis; HIF-1α/VEGF

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤之一，作为世界第五大癌症，全球每年有超过1万人新诊断出胃癌，尽管在过去5年中全球发病率和死亡率有所下降，但胃癌仍然是癌症相关死亡的第三大原因，其

高发病率和高死亡率俨然成为威胁人类健康的重要因素[1]。胃癌的现代医学治疗以手术为首选，多以根治性或姑息性手术为主，并结合辅助化疗以及放疗、靶向药物治疗和免疫治疗[2]。部分患者即使在行手术治疗后，也有较大概率复发与转移，治疗效果并不理想，因此防治复发转移，稳定病情就显得尤为重要[3]。中医药作为重要的辅助手段在增加患者对药物的敏感性、缓解临床症状、增效减毒、稳定肿瘤、延长生存期等方面疗效显著[4]，近些年在临床中逐渐被认可。

胃复方是黎月恒教授临床多年总结的经验方，对治疗胃癌具有较好的临床疗效。课题组前期临床研究[5-8]佐证了胃复方改善患者生活质量及减轻药物毒副反应的效果，而基础研究[9-12]进一步探索了胃复方抗胃癌的物质基础和作用机制。课题组前期生物信息分析，核心靶点追溯胃复方发挥作用较大的成分分别为槲皮素(Quercetin)、木樨草素(Luteolin)、山柰酚(Kaempferol)、β-谷甾醇(Beta-Sitosterol)、异鼠李素(Isorhamnetin)等。网络药理学 KEGG 富集分析发现胃复方抗胃癌的作用机制可能与 HIF-1 信号通路相关，且该通路位列前 3 名，富集程度及可信度较高(见图 1)，基于此，本课题开展体外实验研究探讨胃复方抑制胃癌细胞增殖及血管生成的作用机制。

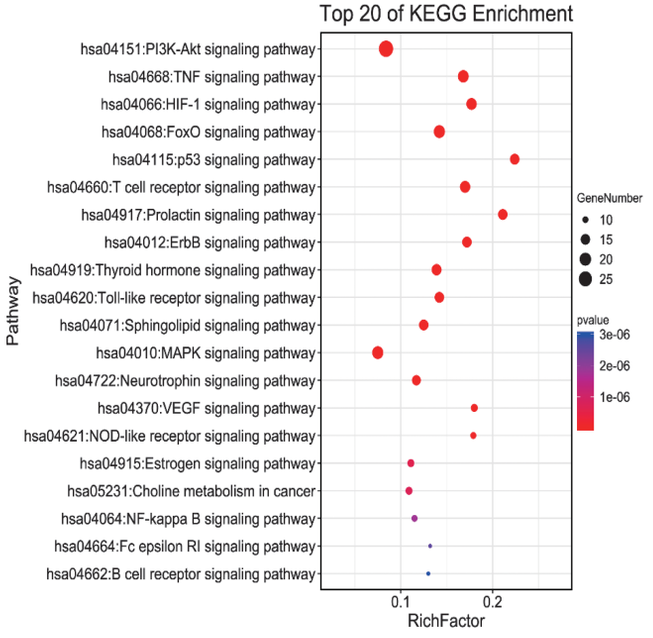


图 1　KEGG 富集分析高级气泡图(摘自本课题组前期研究结果，已发表，尚未见刊)

1　材料与方法

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

1.2　药物制备及试剂

1.2.1　中药　参考《天然药物化学》。在湖南省肿瘤医院中药房购置中药饮片黄芪 180 g(批次：201228)、党参 60 g(批次：201231)、茯苓 60 g(批次：211201)、白术 60 g(批次：201229)、香附 60 g(批次：201164)、郁金 60 g(批次：211126)、女贞子 60 g(批次：210004)、菟丝子 60 g(批次：211026)、莪术 60 g(批次：210915)、白花蛇舌草 90 g(批次：201224)、半枝莲 90 g(批次：210326)、甘草 30 g(批次：210830)，按照书中所用方法制备胃复方水提物(WFF)。因在前期预实验时使用胃复方灌胃大鼠制取含药血清进行实验，实验效果并不理想，改用提取物后，预实验数据达到预期效果，故改用 WFF 进行实验。

1.2.2　西药　2-MeOE2(HIF-1α 抑制剂)：将 10 mmol/L 的母液先稀释 100 倍配制成 100 μmol/L 的中间浓度，再将 100 μmol/L 稀释 100 倍配制成 1 μmol/L 的工作浓度。甲磺酸阿帕替尼：将药物碾成粉末后将其配置成 20 mmol/L 的母液，母液稀释 1 000 倍得到浓度为 20 μmol/L 的工作液。

1.2.3　试剂　HIF-1α 过表达质粒(HonorGene 公司，货号：HG-GHO00203)、2-MeOE2(美国 APE×BIO，货号：A4188)、1640 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：PM150110)，胰酶消化液、双抗(青链霉素)、细胞冻存液(长沙艾碧维生物科技有限公司，货号分别为：AWC0238a、AWH0529a、AWC0229)，胎牛血清(美国 Gibco 公司，货号：10099141)，CCK-8 试剂(日本同仁公司，货号：NU679)，结晶紫(北京索莱宝科技有限公司，货号：G1062)，4%多聚甲醛(苏州新赛美生物科技有限公司，货号：N1012)，兔抗 HIF-1α、VEGFA、VEGFR2，鼠抗 β-actin(美国 proteintech 公司，货号分别为 20960-1-AP、19003-1-AP、26415-1-AP、66009-1-Ig)，山羊抗鼠、抗兔二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司，货号分别为：AWS0001、AWS0002)。

1.3　主要实验仪器　超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)，直热式二氧化碳培养箱(上海三藤电子有限公司)，倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司)，低速离心机(广州市知信仪器有

限公司），多功能酶标分析仪（深圳汇松科技发展有限公司），化学发光仪(Minichemi)，精密天平（Ducurser），冷冻干燥机（Thermo）。

1.4 细胞培养 将人胃癌 HGC-27 细胞培养于含10%胎牛血清的 1640 培养基中，置于 37 ℃、5%CO_2的恒温培养箱内培养。

1.5 细胞转染 取出所需的 HIF-1α 过表达质粒，冰上化冻。取 2 个无菌离心管，每管加 95 μL 无血清 1640 培养基，然后往离心管中分别加入 3 μg 的 HIF-1α 过表达质粒和 5 μL 的 Lip2000。轻轻混匀，室温静置 5 min 后 2 管混合，轻轻混匀，共约 200 μL，室温静置 20 min。最后将混合液均匀加到待转染孔中，混匀。37 ℃培养箱中培养 6 h 后，换新鲜完全培养液。

1.6 CCK-8 法检测最佳干预浓度 将 HGC-27 细胞培养至对数期，计数，调整细胞浓度为 1×10^6个/mL，按每孔 200 μL 接种于 96 孔板，隔夜后弃去孔内培养基。以每孔 200 μL 药物给药，给药浓度为依次为 0、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8 mg/mL，于 24 h 避光加入终浓度为 10%的 CCK-8 试剂 100 μL，置于细胞培养箱培养 1 h 后于酶标仪 450 nm 处测定吸光光度值（OD）。细胞活力率=OD 值$_{实验组}$-OD 值$_{空白组}$/OD 值$_{对照组}$-OD 值$_{空白组}$×100%（空白组，无细胞，仅有 CCK-8 试剂）。细胞存活率为 50%时，为 WFF 对应的半数抑制率（IC_{50}），即后续中药干预的终浓度。

1.7 CCK-8 法检测细胞增殖 实验分组如下：NC 组、WFF 组（IC_{50}）、WFF+HIF-1α 过表达质粒组、WFF+2-MeOE2 组、HIF-1α 过表达质粒组、2-MeOE2 组、甲磺酸阿帕替尼组共 7 组。将 HGC-27 细胞培养至对数期，计数，调整细胞浓度为 1×10^6个/mL，按每孔 200 μL 接种于 96 孔板，隔夜后弃去孔内培养基。基于本课题组前期实验研究数据，选取 24 h 为最佳实验时间，于 24 h 避光加入终浓度为 10%的 CCK-8 试剂 100 μL，置于细胞培养箱培养 2 h 后于酶标仪 450 nm 处测定 OD 值并计算细胞活力率。

1.8 检测胃癌细胞血管生成 HGC-27 细胞分组同 1.7。实验步骤如下：第 1 天，将基质胶、96 孔板和枪头置于 4 ℃冰箱过夜。第 2 天，取出基质胶置于冰盒上，往预冷的 96 孔板每孔加入 70 μL 基质胶至均匀铺满孔，不要有气泡，4 ℃静置 10 min。将其放置于 37 ℃培养箱，30 min。用 0.25%胰酶消化以上处理的细胞，制成细胞悬液，用细胞计数板计数，每孔加入 10 000 个细胞。

1.9 检测胃癌细胞增殖及 HIF-1α/血管内皮生长因子（VEGF）信号通路相关蛋白表达 实验分组为 NC 组、WFF 组（IC_{50}）、WFF+HIF-1α 过表达质粒组、WFF+2-MeOE2 1 μM 组、HIF-1α 过表达质粒组、2-MeOE2 组共 6 组。将各组细胞中蛋白质定量蛋白浓度后，电泳，转膜，然后用 1×PBST 配制 5%脱脂奶粉封闭，将膜浸入后，室温放置 90 min。一抗孵育：用 1×PBST 将一抗按照 1∶1 000 比例稀释，将膜与一抗一起孵育，4 ℃过夜，孵育结束。1×PBST 洗 3 次，每次 10 min。二抗孵育：用 1×PBST 按照 1∶5 000 比例稀释 HRP 标记的二抗，将稀释后的二抗与膜共同室温孵育 90 min。孵育结束，1×PBST 洗 3 次，每次 15 min。显色。

2 统计学方法

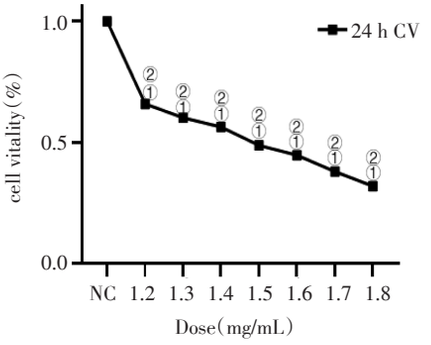
利用 SPSS23.0 和 GraphPad Prism 8.0 对数据进行统计分析及作图，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，若满足正态性分布及方差齐性，应使用单因素方差分析，否则使用 Kruskal-Wallis 检验。$P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 选取胃复方 IC_{50} 为最佳干预浓度 见图 1。CCK-8 结果显示：WFF 对 HGC-27 细胞的增殖有明显抑制作用，随着浓度的增加，细胞活力降低，呈浓度依赖性，WFF 各组与 NC 组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$），且其余各组组间差异具有统计学意义（$P<0.01$）。利用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行统计分析，计算出 IC_{50} 为 1.480 8 mg/mL，与 1.5 mg/mL 较为接近，可信度较高，故取 1.5 mg/mL 作为后续实验 WFF 干预浓度。

3.2 WFF 抑制胃癌细胞增殖 见表 1。与 NC 组比较，WFF 组、WFF+HIF-1α 过表达质粒组、WFF+2-MeOE2 组、2-MeOE2 组细胞活性均有所降低，表明有抑制 HGC-27 细胞增殖的作用，差异有统计学意义（$P<0.01$）；而 HIF-1α 过表达质粒组细胞活性增高，表明有促进 HGC-27 细胞增殖的作用，差异有统计学意义（$P<0.01$），且各组组间差异均有统计学意义（$P<0.01$）。与单用 WFF 组比较，WFF+HIF-1α 过表达质粒组细胞活性增高，差异有统计学意义（$P<0.01$），WFF+HIF-1α 过表达质粒组活性降

低，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与 HIF-1α 过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α 过表达质粒组有效抑制了 HGC-27 细胞增殖，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与 2-MeOE2 组比较，WFF+2-MeOE2 组有效抑制了 HGC-27 细胞增殖，差异有统计学意义（$P<0.01$）。



注：①与 NC 组比较，$P<0.01$；②WFF 各组组间比较，$P<0.01$

图 1　不同浓度 WFF 对人胃癌 HGC-27 细胞的增殖抑制作用

表 1　各组处理人胃癌 HGC-27 细胞后的 OD 及细胞活力率（$\bar{x}\pm s$）

组　别	n	OD	细胞活力率(%)
NC 组	3	1.752 ± 0.04^{②③④}	-
WFF 组	3	0.978 ± 0.05^{①③}	48.74
WFF+HIF-1α 过表达质粒组	3	1.321 ± 0.02^{①②③④}	71.46
WFF+2-MeOE2 组	3	0.720 ± 0.03^{①②③④}	31.60
HIF-1α 过表达质粒组	3	2.036 ± 0.03^{①②④}	118.72
2-MeOE2 组	3	0.907 ± 0.03^{①②③}	44.02
甲磺酸阿帕替尼组	3	0.951 ± 0.14^{①②③④}	46.92

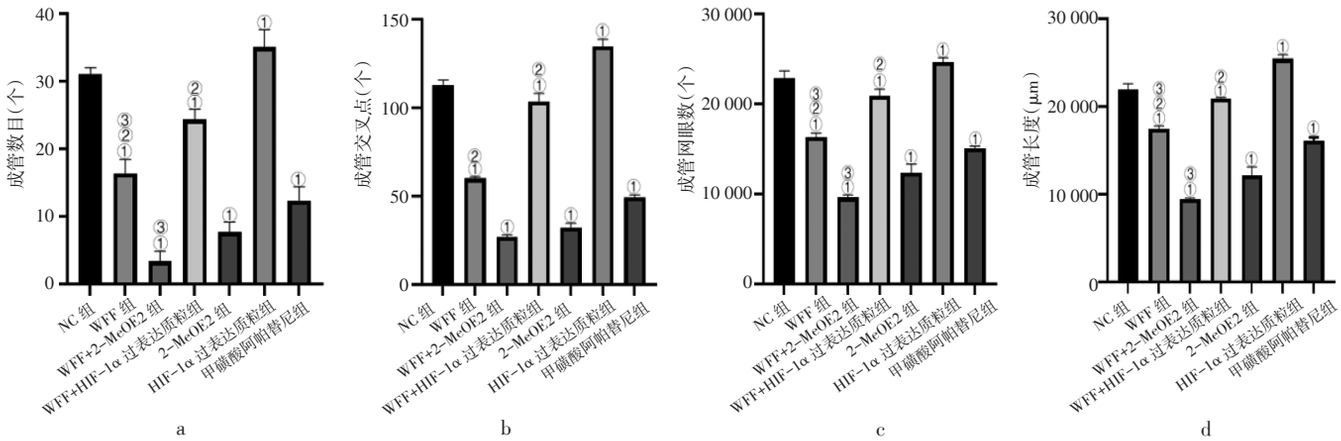
注：①与 NC 组比较，$P<0.01$；②与 WFF 组比较，$P<0.01$；③与 HIF-1α 过表达质粒组比较，$P<0.01$；④与 2-MeOE2 组比较，$P<0.01$

3.3　胃复方水提物抑制胃癌细胞血管生成　血管生成实验结果显示，①成管数目：见图 2a、图 3。与 NC 组比较，过表达 HIF-1α 质粒组成管数目增多，其余各组均有所减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与单用 WFF 组比较，WFF+HIF-1α 过表达质粒组成管数目增多，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 WFF 与 HIF-1α 过表达质粒有拮抗降低成管能力作用；WFF+2-MeOE2 组成管数目减少，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 WFF 与 2-MeOE2 联用具有协同降低成管能力作用。②成管交叉点：见图 2b、图 3。与 NC 组比较，过表达 HIF-1α 质粒组成管交叉点增多，其余各组均有所减少，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与单用 WFF 组比较，WFF+过表达 HIF-1α 质粒组成管交叉点增多，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 WFF 与 HIF-1α 过表达质粒有拮抗降低成管能力作用；WFF+2-MeOE2 组成管交叉点有减少趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）。③成管网眼数、成管长度：见图 2c、图 2d、图 3。与 NC 组比较，过表达 HIF-1α 质粒组成管网眼数、成管长度增多，其余各组均有所减少，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。与单用 WFF 组比较，WFF+过表达 HIF-1α 质粒组成管网眼数、成管长度增多，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 WFF 与 HIF-1α 过表达质粒有拮抗降低成管能力作用；WFF+2-MeOE2 组成管网眼数、成管长度减少，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 WFF 与 2-MeOE2 有协同降低成管能力作用。

3.4　胃复方水提物降低胃癌细胞增殖及 HIF-1α/VEGF 信号通路相关蛋白表达　见图 4、表 2。Western blot 结果显示，①与 NC 组比较，WFF 组均能下调 HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA 的蛋白表达水平，差异有统计学意义（$P<0.01$）。②与 NC 组比较，2-MeOE2 组下调 HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA；HIF-1α 过表达质粒组上调 HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA 的蛋白表达水平，差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。③与 WFF 组比较，加入 HIF-1α 过表达质粒后，HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、PCNA 的蛋白表达水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明 HIF-1α 过表达质粒对抑制蛋白表达有拮抗作用。其中 Ki-67 的蛋白表达水平有升高趋势，但差异无统计学意义。④与 WFF 组比较，加入 2-MeOE2 后，明显下调 HIF-1α、VEGFA、Ki-67、PCNA 的蛋白表达水平，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明 2-MeOE2 对抑制蛋白表达有协同作用。其中 VEGFR2 的蛋白表达水平有下降趋势，但差异无统计学意义。

4　讨论

非肿瘤细胞在代谢过程中多以氧化磷酸化途径获能，而癌症细胞与之不同，即使在氧充足的条件下，也多以糖酵解途径获取能量，这一途径被称为有氧糖酵解[13]，通过糖酵解分解葡萄糖，产生大量乳酸，造成乳酸堆积，形成酸性肿瘤微环境，过程中



注：a. ①与 NC 组比较，$P<0.05$；②WFF+HIF-1α 过表达质粒组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$；③WFF+2-MeOE2 组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$。b. ①与 NC 组比较，$P<0.01$；②WFF+过表达 HIF-1α 质粒组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$。c. ①与 NC 组比较，$P<0.05$；②WFF+HIF-1α 过表达质粒组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$；③WFF+2-MeOE2 组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$。d. ①与 NC 组比较，$P<0.05$；②WFF+HIF-1α 过表达质粒组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$；③WFF+2-MeOE2 组与单用 WFF 组比较，$P<0.01$

图 2　各组对胃癌细胞血管生成的影响

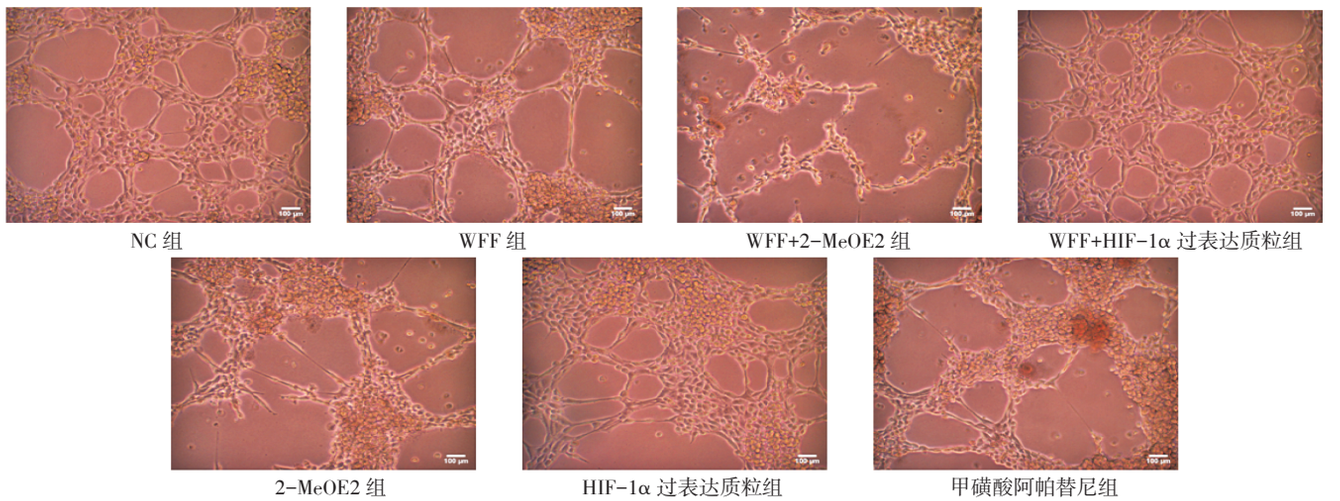


图 3　各组处理人胃癌 HGC-27 细胞后的血管生成情况（标尺 100 μm，光镜倍数：100 倍）

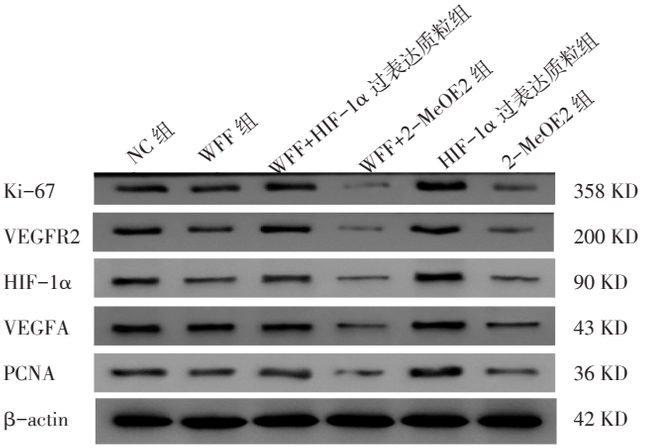


图 4　各组处理 HGC-27 细胞后的蛋白电泳图

产生大量中间产物，促进癌细胞的增殖。缺氧诱导因子（HIFs）家族是正常组织及和肿瘤瘤体适应缺氧环境的多功能转录因子，其本质是一种异源二聚体，由 α 和 β 两个亚基构成[14]。HIF-1α 主要负责 HIF-1 的功能与活性，HIF-1β 负责维持 HIF-1 结构的稳定性[15]。HIF-1α 分布于细胞质内，对氧浓度较为敏感，是调节氧分压，发挥活性最重要的亚单位，常氧环境下，多被蛋白酶体快速水解[16]，在缺氧环境中，HIF-1α 含量累积，转而进入细胞核内与 HIF-1β 结合生成异源二聚体[17]，迅速上调一系列缺氧因子表达，使机体迅速适应缺氧环境，尽可能降

表2 各组处理HGC-27细胞的相对灰度值表达($\bar{x}\pm s$，n=3)

组 别	HIF-1α	VEGFA	VEGFR2	Ki-67	PCNA
NC组	1	1	1	1	1
WFF组	0.53±0.08②④⑤	0.49±0.15②⑤	0.52±0.00②④⑤	0.68±0.07②④⑤	0.65±0.12②④⑤
WFF+HIF-1α过表达质粒组	0.93±0.08③④⑤	0.74±0.16②③④⑤	0.85±0.08③④⑤	0.81±0.12①④⑤	0.88±0.11③④⑤
WFF+2-MeOE2组	0.24±0.13②③⑤	0.14±0.02②③④⑤	0.13±0.05②④⑤	0.14±0.09②③⑤	0.24±0.16②③⑤
HIF-1α过表达质粒组	1.46±0.09②③④	1.32±0.01②③④	1.33±0.11②③④	1.17±0.15①③④	1.49±0.10②③④
2-MeOE2组	0.37±0.07②③⑤	0.34±0.09②⑤	0.29±0.08②③⑤	0.29±0.01②③⑤	0.38±0.14②③⑤

注：①与NC组比较，P<0.05；②与NC组比较，P<0.01；③与WFF组比较，P<0.05；④与WFF+2-MeOE2组比较，P<0.05；⑤HIF-1α过表达质粒组比较，P<0.05

低缺氧对组织、细胞带来的影响[18]。

VEGF家族是一类血管调节因子[19]，瘤体内发生缺氧，HIF-1被激活，刺激VEGF发挥功能，促进癌细胞增殖，也使得瘤体内新生血管生长，肿瘤得以快速生长[20]。在缺氧调节VEGF途径中，HIF-1起核心纽带的作用，HIF-1能与VEGF基因的缺氧反应元件中的共有序列结合，在转录水平增加VEGF的表达，通过促VEGF mRNA的转录和增强VEGF mRNA的稳定性，上调VEGF蛋白表达水平，促进肿瘤的血管生成[21]。MU G等[22]研究显示，钙调蛋白2(CALM2)表达升高，调节HIF-1/VEGFA轴并增强巨噬细胞极化，从而促进胃癌细胞转移和血管生成。HIF-1α/VEGF通路在本课题组前期网络药理学研究发现的通路中排名第三，可见与胃癌的发生、发展、转移、预后等生物学行为密切相关。

本研究CCK-8结果显示，与NC组比较，WFF组、WFF+HIF-1α过表达质粒组、WFF+2-MeOE2组、2-MeOE2组、甲磺酸阿帕替尼组均对HGC-27细胞增殖具有抑制作用。与单用WFF组比较，WFF+2-MeOE2组的细胞活性更低，抑制作用更明显，说明2-MeOE2具有抑制HGC-27细胞增殖的作用；WFF+HIF-1α过表达质粒组的细胞活性增高，抑制作用降低，说明HIF-1α过表达质粒具有促进HGC-27细胞增殖的作用。与单用HIF-1α过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组的细胞活性降低，说明HIF-1α过表达质粒与WFF联用对HGC-27细胞增殖有拮抗抑制作用；与单用2-MeOE2组比较，WFF+2-MeOE2组的细胞活性更低，说明2-MeOE2与WFF联用对HGC-27细胞增殖有协同抑制作用。

血管生成实验验证了胃复方水提物有效降低了人胃癌HGC-27细胞血管生成能力，实验数据表明，除HIF-1α过表达质粒组外，其余各组与NC组比较，均降低了HGC-27细胞血管生成能力。与单用WFF组比较，WFF+2-MeOE2组成管数目、交叉点、网眼数及长度减少，说明2-MeOE2可降低HGC-27细胞成管的能力；WFF+HIF-1α过表达质粒组成管数目、交叉点、网眼数及长度增多，说明HIF-1α过表达质粒可提高HGC-27细胞成管的能力。与HIF-1α过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组成管数目、交叉点、网眼数及长度减少，说明HIF-1α过表达质粒与WFF联用对HGC-27细胞的成管能力有拮抗降低作用；与2-MeOE2组比较，WFF+2-MeOE2组成管数目、网眼数及长度减少，说明2-MeOE2与WFF联用对HGC-27细胞的成管能力有协同降低作用。

Western blot显示，与NC组比较，WFF作用HGC-27细胞后下调了HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA的蛋白表达。与单用WFF组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组的蛋白表达均有所升高，说明HIF-1α过表达质粒可上调HGC-27细胞HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA的蛋白表达；WFF+2-MeOE2组蛋白表达均有所降低，说明2-MeOE2作为HIF-1α的抑制剂，不仅可以下调HIF-1α的表达，也可下调VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA的蛋白表达。与HIF-1α过表达质粒组比较，WFF+HIF-1α过表达质粒组的蛋白表达均有所降低，说明WFF可直接调控HIF-1α、VEGFA、VEGFR2、Ki-67、PCNA等因子，下调各因子蛋白的表达，同时说明HIF-1α过表达质粒与WFF联用对HGC-27细胞各蛋白的表达有拮抗下调作用；与2-MeOE2组比较，WFF+2-MeOE2组的蛋白表达均有所降低，说

明2-MeOE2与WFF联用对HGC-27细胞各蛋白的表达有协同下调作用。本研究提示WFF可能通过抑制HIF-1α/VEGF信号通路，发挥抑制胃癌细胞增殖及抗血管生成的作用。

综上所述，本研究显示WFF可抑制人胃癌HGC-27细胞增殖及血管生成，且能够抑制胃癌增殖及HIF-1α/VEGF信号通路相关蛋白的表达，说明WFF发挥抑制胃癌细胞增殖及抗血管生成的作用可能与通过抑制HIF-1α/VEGF信号通路有关。在未来，WFF更深层次的作用机制需要进一步进行实验探讨。

[参考文献]

[1] THRIFT A P，EL-SERAG H B. Burden of Gastric Cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2020，18(3)：534-542.

[2] 谢通，王雅坤，沈琳. 2022年度胃癌治疗进展[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志，2023，9(1)：1-6.

[3] 杨雪松，季科，季加孚. 我国早期胃癌的外科治疗现状和面临的若干问题[J]. 腹部外科，2022，35(6)：381-385，391.

[4] 罗亚娟，岳红梅，何含含. 中药在抗肿瘤综合治疗中的作用[J]. 东南大学学报(医学版)，2016，35(2)：289-291.

[5] 樊江丽，李东芳，焦蕉，等. 胃复方联合化疗对中晚期脾虚瘀毒型胃癌患者生活质量的影响[J]. 中医杂志，2015，56(2)：120-123.

[6] 李东芳，樊江丽，王云启，等. 胃复方干预治疗脾虚瘀毒型中晚期胃癌临床研究[J]. 中国中医药信息杂志，2015，22(3)：20-24.

[7] 李东芳，王云启，周珉，等. 中西医结合治疗中晚期胃癌的临床观察[J]. 四川中医，2012，30(11)：88-89.

[8] 李红梅. 胃复方治疗晚期胃癌48例临床观察[J]. 湖南中医杂志，2001，4(6)：8-9

[9] 何寄琴，唐继云，张顺荣，等. 胃复方对裸鼠胃癌BGC-823移植瘤及PPARγ表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2018，26(6)：500-506，511.

[10] 胡亚，李东芳. 胃复方含药血浆对胃癌SGC-7901细胞株增殖及PPARγ基因活性的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2016，24(3)：178-181.

[11] 张顺荣，李东芳，何寄琴，等. 胃复方对人胃癌BGC-823细胞移植瘤裸鼠作用及其对c-Myc、人端粒酶逆转录酶基因表达的影响[J]. 世界中医药，2019，14(10)：2618-2622.

[12] 张顺荣，李东芳，何寄琴，等. 胃复方含药血浆对人胃癌BGC-823细胞增殖及垂体瘤转化相关基因表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2020，26(2)：212-216.

[13] YUAN L W，YAMASHITA H，SETO Y. Glucose metabolism in gastric cancer：The cutting-edge[J]. World J Gastroenterol，2016，22(6)：2046-2059.

[14] UCARYILMAZ METIN C，OZCAN G. The HIF-1α as a Potent Inducer of the Hallmarks in Gastric Cancer[J]. Cancers (Basel)，2022，14(11)：2711.

[15] 梁慧颖，曹明芳. 缺氧诱导因子-1α在渗出性老年性黄斑变性中的研究进展[J]. 中医药临床杂志，2023，35(1)：189-195.

[16] LI M，LI G，YANG X，et al. HIF in Gastric Cancer：Regulation and Therapeutic Target[J]. Molecules，2022，27(15)：4893.

[17] 胡松青，池菊芳，郭航远. 缺氧诱导因子-1在心血管疾病中的作用机制研究进展[J]. 浙江医学，2022，44(21)：2341-2344，2354.

[18] 陈丽君，张慧芳，陈娟霞，等. HIF-1α、hs-CRP对COPD疾病进展的临床意义[J]. 宁夏医学杂志，2022，44(12)：1061-1063.

[19] 黄涛，罗聪，罗玉佳，等. 超顺磁性脂质体载血管内皮细胞生长因子沉默基因对骨肉瘤细胞影响[J]. 中国临床药理学杂志，2022，38(22)：2693-2697.

[20] 杨媛，王岚. 血管内皮生长因子在胃癌诊疗中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志，2022，14(11)：2018-2022.

[21] 孙旭东，欧希龙，关云艳，等. HIF-1α与VEGF165在胃癌的表达及其意义[J]. 江苏医药，2011，37(11)：1288-1290，1236.

[22] MU G，ZHU Y，DONG Z，et al. Calmodulin 2 Facilitates Angiogenesis and Metastasis of Gastric Cancer via STAT3/HIF-1A/VEGF-A Mediated Macrophage Polarization[J]. Front Oncol，2021，11：727306.

(责任编辑：吴凌，李海霞)