

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.005

· 基础研究 ·

## 齐墩果烷型五环三萜协同 miR-451 抑制胃癌 AGS 细胞的增殖和迁移及其可能的机制

孙卉, 华维维, 陈溪雯, 李雅娟, 覃薇, 殷梓辛, 赵雅, 刘延庆, 钱亚云(扬州大学 医学院 中西医结合学系, 江苏扬州 225009)

**[摘要]** **目的:** 探索南蛇藤提取物齐墩果烷型五环三萜(28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid)协同 miR-451 对人胃癌 AGS 细胞增殖、迁移的影响及其可能的分子机制。**方法:** 用 miR-451 过表达慢病毒感染 AGS 细胞, 并用盐酸多西环素(DOX) 10 或 100 ng/ml 诱导 24 h, 构建过表达 miR-451 的细胞 AGS/miR-451<sup>+</sup>。采用 10、20、40、80、160 μmol/L 的齐墩果烷型五环三萜处理 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞, MTT 法、划痕实验分别检测细胞增殖和迁移能力的变化, WB 法检测细胞中 mTOR 通路及凋亡相关蛋白表达水平的变化。**结果:** 成功构建过表达 miR-451 的 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞。与未加药对照组相比, 齐墩果烷型五环三萜处理后 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞的增殖抑制率均呈时间和浓度依赖性升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 细胞迁移率均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。齐墩果烷型五环三萜处理组细胞中, mTOR 信号通路相关蛋白的表达量均有所降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 凋亡相关蛋白中, Bcl2 的表达量下降, BAX、caspase-3、caspase-1 及细胞色素 c 的表达量升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论:** 齐墩果烷型五环三萜能够协同 miR-451 抑制人胃癌 AGS 细胞的增殖与迁移, 其机制可能与影响凋亡和 mTOR 信号通路相关蛋白的表达有关。

**[关键词]** 齐墩果烷型五环三萜; miR-451; 胃癌; AGS 细胞; 增殖; 迁移; 凋亡; mTOR

**[中图分类号]** R735.2; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)11-1081-06

## 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid and miR-451 synergistically inhibit the proliferation and migration of gastric cancer AGS cells and its possible mechanism

SUN Hui, HUA Weiwei, CHEN Xiwen, LI Yajuan, QIN Wei, YIN Zixin, ZHAO Ya, LIU Yanqing, QIAN Yayun (Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the synergistic effect of 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid and miR-451 on the proliferation and migration of human gastric cancer AGS cells and its possible molecular mechanism. **Methods:** AGS cells were infected with miR-451 overexpression lentivirus and induced with DOX (10 or 100 ng/ml) for 24 h to construct AGS/miR-451<sup>+</sup> cells overexpressing miR-451. AGS/miR-451<sup>+</sup> cells were treated with 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid of 10, 20, 40, 80, 160 μmol/L. The changes in proliferation and migration ability of cells were detected by the MTT method and the scratch test, respectively; WB method was used to detect the changes in the expression levels of mTOR signaling pathway-related and apoptosis-related proteins in cells. **Results:** AGS/miR-451<sup>+</sup> cells overexpressing miR-451 were successfully constructed. Compared with the untreated control group, the proliferation inhibition rate of AGS/miR-451<sup>+</sup> cells in the 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid treatment group increased in a time- and concentration-dependent manner ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the cell migration rate was significantly reduced ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). In the cells treated with 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid, the expression of mTOR signaling pathway-related proteins was reduced ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); among the apoptosis pathway-related proteins, the expression of Bcl2 was decreased, but the expression of BAX, caspase-3, caspase-1, and cytochrome c was increased ( $P<0.05$  or 0.01). **Conclusion:** The 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic and miR-451 can synergistically inhibit the proliferation and migration of human gastric cancer AGS cells. The mechanism may be related to their regulation of apoptosis signaling pathway- and mTOR signaling pathway-related proteins.

**[Key words]** 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid; miR-451; gastric cancer; AGS cell; proliferation; migration; apoptosis; mTOR

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(11): 1081-1086. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.005]

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金委面上项目资助(No. BK20171290); 江苏省教育厅自然科学基金重大项目资助(No. 19KJA480003)。Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20171290), and the Major Programs of Natural Science Foundation of Higher Education in Jiangsu Province (No. 19KJA480003)

**[作者简介]** 孙卉(1993—), 女, 硕士, 主要从事中西医结合抗肿瘤研究, E-mail: 632886898@qq.com

**[通信作者]** 钱亚云(QIAN Yayun, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合抗肿瘤研究, E-mail: yyqian@yzu.edu.cn

胃癌是最常见的胃上皮组织恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,传统的抗肿瘤治疗和新兴的靶向治疗对部分患者的预后有明显改善,但对伴有转移的患者疗效不佳。近年来的研究<sup>[2]</sup>发现,监测肿瘤相关miRNA、靶蛋白及基因组相关转移基因,有可能为胃癌治疗提供新的突破点。南蛇藤(*Celastrus orbiculatus*)为卫矛科南蛇藤属植物,其提取物有抗肿瘤活性<sup>[3-4]</sup>。本课题组研究<sup>[5-6]</sup>证实,南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)发挥抗肿瘤作用的主要活性物质是南蛇藤总萜。进一步利用超临界萃取的方法优化提取工艺,将南蛇藤乙酸乙酯提取物通过HPLC-UV法分离到更多的单体成分,经过药敏实验<sup>[7]</sup>筛选发现,胃癌细胞对齐墩果烷型五环三萜(28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-2-oic acid)较为敏感,本研究选择该组分进行深入研究。miR-451在胃癌的发生发展中起重要作用,过表达miR-451可将胃癌细胞周期阻滞于G0/G1期,抑制miR-451表达则促进胃癌细胞分裂<sup>[8]</sup>。本研究构建过表达miR-451的人胃癌AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞株,探索齐墩果烷型五环三萜对AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞增殖、凋亡及迁移的影响,并对相关分子机制进行初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

齐墩果烷型五环三萜购自武汉天植生物技术有限公司,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-Fu)注射液购自天津金耀药业有限公司。人胃癌AGS细胞购自中国科学院研究所上海细胞库,用含10%胎牛血清的RPMI 1640常规培养。293 T细胞、*E.coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞和改良型慢病毒小RNA表达载体pTRIPZ(购自美国Open Biosystems公司)<sup>[9]</sup>均为本实验室保存。引物、限制性内切酶Age I和Xho I、T4 DNA聚合酶试剂盒、Taq聚合酶等均购自日本宝生物工程(大连)有限公司,盐酸多西环素(doxycycline hyclate, DOX)和BCA法检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自美国Invitrogen公司,胎牛血清购自美国Hyclone公司,胰蛋白酶、MTT粉均购自美国BD公司。一抗(兔抗人caspase-1、细胞色素c、caspase-3、BAX、Bcl2、mTOR、Akt、p-Akt、4EBP1、PI3K、 $\beta$ -actin抗体)、二抗(抗兔IgG)均购自美国Cell Signaling Technology公司。ChemiDoc XRS<sup>+</sup>型凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司,倒置相差显微镜(CKX41-32PH)购自日本Olympus公司,qPCR仪购自罗氏公司。

### 1.2 过表达miR-451的AGS细胞株的建立

改良型载体pTRIPZ为DOX诱导型慢病毒小

RNA表达载体,主要包括两个表达框:组成型启动子UBC驱动的第三代rtTA蛋白表达框;诱导型四环素应答元件TRE驱动红色荧光蛋白及位于其3'非翻译区(3'-UTR)的基于miR-26b前体茎环结构的miRNA表达框。利用分子克隆的方法,以miR-451成熟体序列替换miR-26b成熟体序列。设计miR-451的pre-miRNA表达序列,化学合成两条分别带有Xho I和Age I酶切位点黏性末端的互补配对单链DNA序列,两链进行退火、加磷后,与pTRIPZ载体上的Xho I和Age I位点连接,得到重组慢病毒表达质粒pTRIPZ-miR-451与两种辅助包装质粒,将上述质粒以Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000法共转染293 T细胞,收集并浓缩富含慢病毒颗粒的细胞上清液,测定病毒滴度。病毒感染AGS细胞后,利用被感染细胞的嘌呤霉素抗性筛选阳性细胞,再经DOX诱导后,表达红色荧光者即为过表达miR-451的AGS细胞,将其命名为AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞。

### 1.3 qPCR检测miR-451的表达水平

将对数生长期的AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞分为3组,分别加入0、10和100 ng/ml的DOX,培养24 h后提取RNA,逆转录合成cDNA,用SYBR Green法qPCR检测miR-451的表达水平。Hsa-miR-451-3p上游引物为5'-GCAAACCGTTACCATTACTGAGTTA-3', Hsa-miR-451-5p上游引物为5'-CGTAGCAAGAGACCATTACCATTA-3', miR-451下游引物为qPCR试剂盒中的miR通用下游引物。内参U6引物:上游为5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3',下游为5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3'。PCR总反应体系为10  $\mu$ l,反应条件为95  $^{\circ}$ C预变性30 s、95  $^{\circ}$ C 5 s、60  $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。以未使用DOX诱导的AGS细胞作为对照组。用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算目的基因相对表达量。

### 1.4 MTT实验检测齐墩果烷型五环三萜对AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞增殖的影响

将对数生长期的AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞以5 $\times$ 10<sup>3</sup>个/孔接种于96孔板,加入无血清培养基配制的COE齐墩果烷型五环三萜(10、20、40、80、160  $\mu$ mol/L),分别孵育24、48和72 h后,加入0.5%MTT溶液20  $\mu$ l继续培养4 h。弃上清液,加120  $\mu$ l DMSO溶液,用多功能酶标仪检测490 nm波长处各孔光密度(D)值。增殖抑制率=(1-D<sub>药物组</sub>/D<sub>对照组</sub>) $\times$ 100%。每组设5个复孔,实验重复3次。

### 1.5 细胞划痕实验检测齐墩果烷型五环三萜对AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞迁移的影响

将对数期AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞以2 $\times$ 10<sup>4</sup>个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁、单层细胞长满孔底后,用移液

器吸头在 6 孔板中间划一细痕, 约 2 mm 宽, PBS 冲洗 2 次, 于倒置显微镜下观察划痕内有无细胞并拍照、测量划痕的宽度。分别设置空白对照组 (NC 组, 亲本 AGS 细胞)、AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞未加药组、齐墩果烷型五环三萜 (30、60、90  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组 (COE 组)、阳性对照组 (5-Fu, 25  $\mu\text{g/L}$ )。培养 24 h 后, 再次于倒置显微镜下观察划痕并拍照、测量划痕的宽度。用 ImageJ 图像处理软件分析实验结果、计算划痕愈合率。划痕愈合率 = (0 h 时划痕宽度 - 24 h 时划痕宽度) / 0 h 时划痕宽度  $\times 100\%$ 。

### 1.6 WB 法检测齐墩果烷型五环三萜对 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞中相关蛋白表达的影响

将对数期 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板, 分为 5 组: 阴性对照组 (AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞未加药处理)、齐墩果烷型五环三萜 (30、60、90  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组、阳性对照组 (5-Fu, 25  $\mu\text{g/L}$ )。另设空白对照组 (亲本 AGS 细胞)。加药后培养 24 h, PBS 洗 2 次, 提取细胞的总蛋白并用 BCA 法测定总蛋白浓度。使用 SDS-PAGE 分离蛋白, 再将蛋白条带电转至 PVDF 膜上, 将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2 h, 加入一抗 (1:1 000 稀释), 置于摇床上、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜, TBST 清洗膜 3 次, 加入二抗 (1:2 000 稀释), 室温下孵育 2 h, TBST 清洗 3 次后加入 ECL 试剂使蛋白条带显色, 采集并分析图像, 用 ImageJ 图像处理软件计算目的蛋白的相对表达量。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计软件处理, 符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建过表达 miR-451 的 AGS 细胞

pTRIPZ 载体携带嘌呤霉素抗性基因, 可通过嘌呤霉素压力性筛选获得稳定转染的 AGS 细胞。在没有 DOX 存在的情况下, pTRIPZ 载体中的 rtTA 蛋白表达框不能与应答元件 TRE 结合, 因而不能驱动红色荧光蛋白及 miRNA 的表达; 加入 DOX 后, rtTA 即与 TRE 结合, 驱动红色荧光蛋白及其下游的 miRNA 表达, 红色荧光的强度与 miRNA 的表达量呈正相关。以不同浓度的 DOX (10 或 100 ng/ml) 诱导 miR-451 的表达 24 h, 倒置荧光显微镜下观察细胞红色荧光蛋白的强度, 结果 (图 1) 显示, 视野下所有细胞均能发出明显的红色荧光, 表明已成功构建过表达 miR-451 的 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞; qPCR 法检测细胞中 miR-451 的表达水平, 结果 (图 2) 显示, 用 100 ng/ml DOX 处理 24 h 后, miR-451 的表达量最高, 由此为依据进行后续实验。

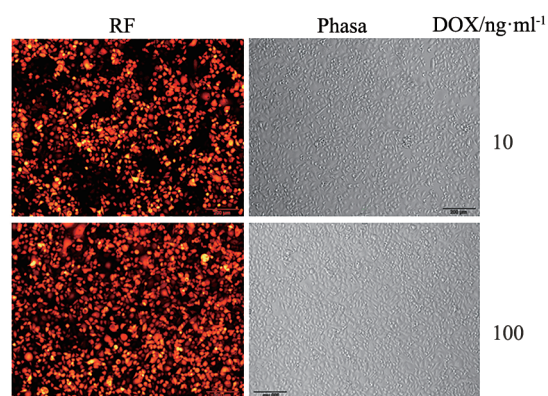


图 1 人胃癌 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞株的建立 ( $\times 200$ )

Fig.1 Construction of human gastric AGS/miR-451<sup>+</sup> cell line ( $\times 200$ )

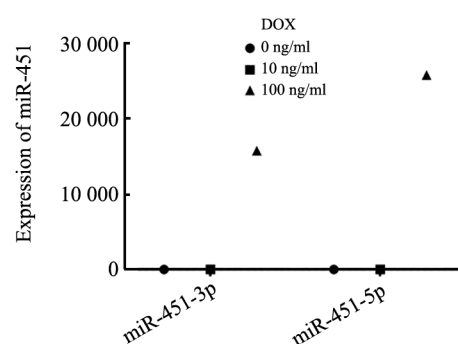


图 2 qPCR 法检测 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞中 miR-451 的表达水平

Fig.2 The expression of miR-451 in AGS/miR-451<sup>+</sup> cells was detected by qPCR

### 2.2 齐墩果烷型五环三萜对 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞增殖的影响

不同浓度 (10、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ ) 的齐墩果烷型五环三萜分别处理 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞 24、48、72 h 后, MTT 法分析药物对细胞增殖能力的影响。结果 (图 3) 显示, 齐墩果烷型五环三萜作用 24 h 后对 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 约为 72.61  $\mu\text{mol/L}$ ; 与未加药对照组相比, 齐墩果烷型五环三萜明显抑制 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 并具有时间和浓度依赖性。

### 2.3 齐墩果烷型五环三萜对人胃癌 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞迁移的影响

细胞划痕实验检测结果 (图 4) 显示, 与 NC 组 (野生型 AGS 细胞) 相比, AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞划痕愈合率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明过表达 miR-451 可抑制人胃癌 AGS 细胞迁移; 加入 30、60、90  $\mu\text{mol/L}$  齐墩果烷型五环三萜处理 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞 24 h 后, 随着药物剂量增加, 细胞划痕愈合率有进一步降低的趋势。

### 2.4 齐墩果烷型五环三萜对 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细胞中 mTOR 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响

WB 法检测细胞中 mTOR 信号通路相关蛋白表

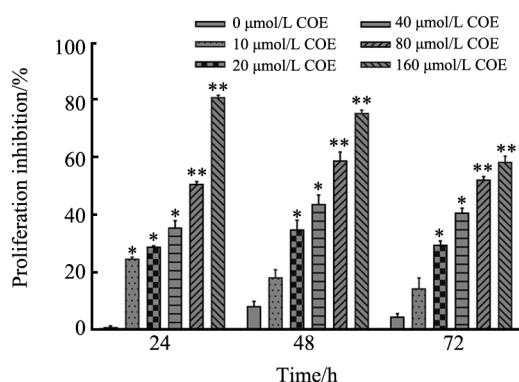
达水平,结果(图5)显示,与空白对照组(亲本 AGS 细胞)相比,AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞中 p-Akt 的表达量显著降低 ( $P<0.05$ );加入齐墩果烷型五环三萜处理后,AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞中 mTOR、AKT、p-Akt、PI3K 和 4EBP1 蛋白的表达量均明显降低,并呈浓度依赖性 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

WB 法检测细胞中凋亡相关蛋白表达,结果(图6)显示,与对照组相比,齐墩果烷型五环三萜处理组 AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞中 Bcl2 的表达量降低, BAX 和 caspase-3、caspase-1 及细胞色素 c 的表达量增加, Bcl2/Bax 比值降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

胃癌根治术是治疗早期胃癌的方式,晚期胃癌常常伴有广泛转移,传统的抗肿瘤和靶向治疗可以改善患者症状,但对转移患者的预后没有明显的改善<sup>[10-12]</sup>。迄今尚未发现特异性的生物标志物用来进行胃癌早期诊断和预测是否有转移倾向。因此,检测肿瘤相关 miRNA<sup>[13]</sup>、靶蛋白<sup>[14]</sup>及转移相关基因<sup>[15]</sup>可作为治疗胃癌的新突破点。卫矛科中草药南蛇藤的抗炎消肿功效明显<sup>[16-17]</sup>。本课题组研究<sup>[18-19]</sup>表明,南

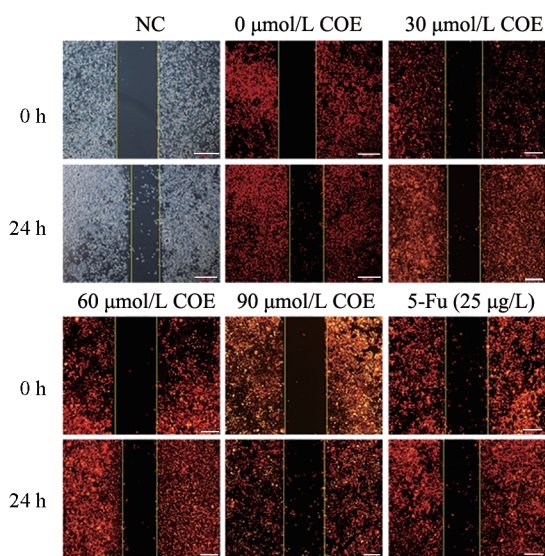
蛇藤提取物有较强的抗肿瘤活性,南蛇藤多萜是南蛇藤提取物抗癌作用的主要物质基础<sup>[20]</sup>,在对分离技术进行优化后,在南蛇藤多萜的基础上又成功分离了多种单体成分,药敏实验显示,齐墩果烷型五环三萜是其中抗肿瘤效果比较突出的一种。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs 0 μmol/L COE group

图3 齐墩果烷型五环三萜对 AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of 28-Hydroxy-3-oxoolean-12-en-29-oic acid on the proliferation of AGS/miR-451<sup>+</sup> cells



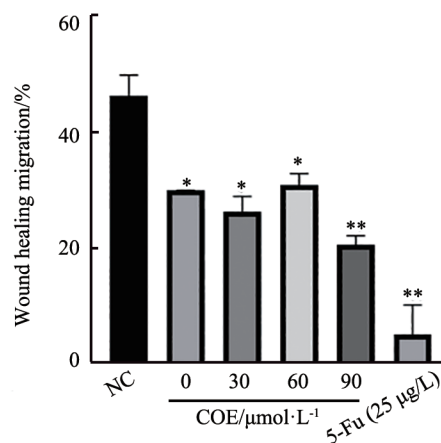
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group

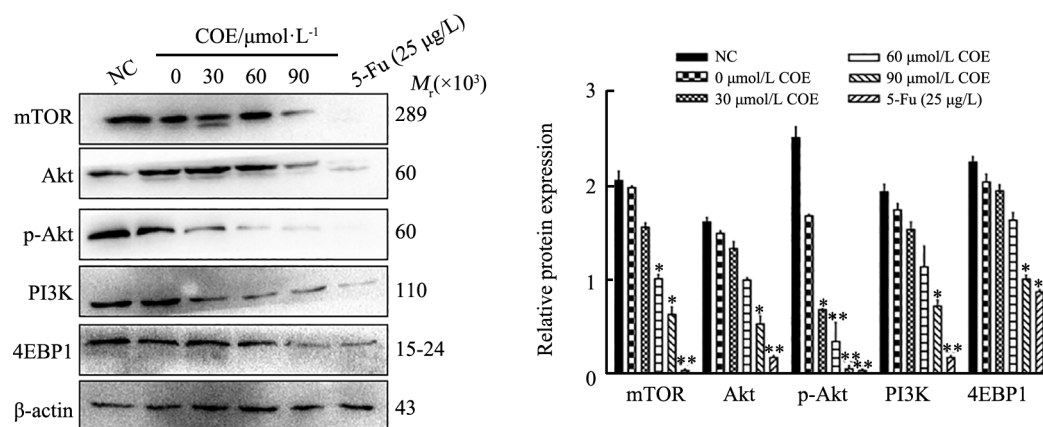
图4 齐墩果烷型五环三萜对 AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞迁移能力的影响(标尺长度为 500 μm)

Fig.4 Effect of 28-Hydroxy-3-oxoolean-12-en-29-oic acid on the migration of AGS/miR-451<sup>+</sup> cells (Scale bar=500 μm)

mTOR 可调节肿瘤细胞的增殖、生长、存活及血管生成,PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路参与多种肿瘤细胞的侵袭转移过程<sup>[21-23]</sup>。miRNA 是影响肿瘤进展的重要因素<sup>[24]</sup>。研究<sup>[25]</sup>发现,miR-451 在胃肿瘤细胞中表达降低。miR-451 能否靶向 mTOR,抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,迄今还未探明。本研究通过构建慢病毒载体将 miR-451 质粒转染至人胃癌 AGS 细胞中,获得稳定过表达 miR-451 的 AGS/miR-451<sup>+</sup> 细

胞。通过该细胞模型研究齐墩果烷型五环三萜协同 miR-451 抑制胃癌细胞迁移的作用。实验结果显示,齐墩果烷型五环三萜明显抑制 AGS/miR-451<sup>+</sup>细胞的增殖和迁移。但是,这些研究仅限于体外实验,本课题组后续将建立动物模型以更深入地研究齐墩果烷型五环三萜对肿瘤的侵袭和转移的影响,为新型抗肿瘤药物的研究提供充分的实验依据。

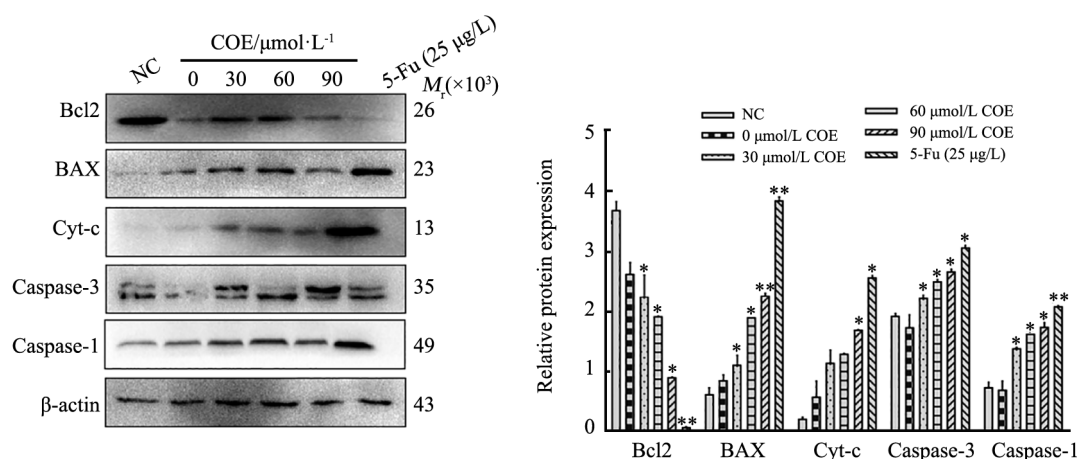




\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  COE group

图5 mTOR 信号通路相关蛋白的表达

Fig.5 The expression of mTOR signaling pathway related proteins



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  COE group

图6 凋亡通路相关蛋白的表达

Fig.6 The expression of apoptosis pathway-related proteins

[参考文献]

[1] KARIMI P, ISLAMI F, ANANDASABAPATHY S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(5): 700-713. DOI:10.1158/1055-9965.epi-13-1057.

[2] REN C, CHEN H, HAN C, et al. High expression of miR-16 and miR-451 predicating better prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12): 2489-2496. DOI: 10.1007/s00432-016-2243-z.

[3] 钱亚云, 严妍, 侯晶晶, 等. 南蛇藤提取物靶向 mTOR 抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的迁移能力的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(2): 362-369. DOI:10.11842/wst.20190120001.

[4] QIAN Y, YANG T, ZHAO X, et al. Celastrus orbiculatus extracts induce apoptosis in mTOR-overexpressed human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 328 [2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30526568/>. DOI:10.1186/s12906-018-2397-0.

[5] QIAN Y, YAN Y, LU H, et al. Celastrus orbiculatus extracts inhibit the

metastasis through attenuating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human gastric cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(14): 1754-1761. DOI:10.2174/1871520619666190731162722.

[6] QIAN Y Y, SHI Y Y, LU S H, et al. Extracts of Celastrus orbiculatus inhibit cancer metastasis by down-regulating epithelial-mesenchymal transition in hypoxia-induced human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(5): 334-341. DOI: 10.1007/s11655-018-2562-9.

[7] CHU Z W, WANG H B, NI T Y, et al. 28-hydroxy-3-oxoolean-12-en-29-oic acid, a triterpene acid from Celastrus orbiculatus extract, inhibits the migration and invasion of human gastric cancer cells in vitro[J/OL]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3513 [2021-03-22]. <https://doi.org/10.3390/molecules24193513>. DOI:10.3390/molecules24193513.

[8] YOU W D, XU L, ZHANG X, et al. High-throughput screening identifies miR-451 as a pleiotropic modulator that suppresses gastric cancer metastasis[J]. *SLAS TECHNOLOGY: Transl Life Sci Innov*, 2017, 22(2): 136-143. DOI:10.1177/22111068216675858.

[9] ZHAO Y, LIN J M, XU B Y, et al. MicroRNA-mediated repression of nonsense mRNAs[J/OL]. *eLife*, 2014, 3: e03032 [2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107276/>. DOI: 10.7554/

- eLife.03032.
- [10] 钱亚云, 曹玲, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物增强抑癌基因 Maspin 抑制人胃癌细胞株 MGC803 侵袭能力的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(11): 2470-2474. DOI: 10.11842/wst.2014.11.032.
- [11] WU X, TAO P, ZHOU Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20741-20750. DOI:10.18632/oncotarget.15119.
- [12] ZHANG X, WANG S, WANG H, et al. Circular RNA circNRIP1 Acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the Akt1/mTOR pathway[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 20. DOI:10.1186/s12943-018-0935-5.
- [13] ALESSANDRINI L, MANCHI M, DE RE V, et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1683 [2021-03-22]. <https://doi.org/10.3390/ijms19061683>. DOI:10.3390/ijms19061683.
- [14] 钱亚云, 李文原, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物靶向 mTOR 抑制人肝癌 HepG2 细胞侵袭与转移能力的研究[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4831-4837. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.019.
- [15] JIANG F, SHEN X B. miRNA and mRNA expression profiles in gastric cancer patients and the relationship with circRNA[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(6): 879-886. DOI:10.4149/neo\_2018\_181211n952.
- [16] JIN F, ZHU G, LI D, et al. Celastrus orbiculatus extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human esophageal squamous carcinoma ECA-109 cells in vitro via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1591-1599. DOI: 10.3892/ol.2017.7459.
- [17] QIAN Y Y, ZHANG H, HOU Y, et al. Celastrus orbiculatus extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas in vitro and in vivo[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(10): 752-760. DOI:10.1007/s11655-011-0819-7.
- [18] 王海波, 顾昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1345-1350. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.016.
- [19] WANG W, ZHOU Y, YAO Q, et al. Celastrus orbiculatus extract potentiates the sensitivity of cisplatin via caspase-dependent apoptosis in gastric cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(15): 2206-2211. DOI:10.2174/1871520618666180911110124.
- [20] 于耀洋, 赵佳, 李向楠. 南蛇藤提取物联合 miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2371-2376. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.
- [21] BERTACCHINI J, HEIDARI N, MEDIANI L, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR network for treatment of leukemia[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(12): 2337-2347. DOI:10.1007/s00018-015-1867-5.
- [22] XIA P, XU X Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(5): 1602-1609.
- [23] RONCOLATO F, LINDEMANN K, WILLSON M L, et al. PI3K/Akt/mTOR inhibitors for advanced or recurrent endometrial cancer[J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 10(10): CD012160 [2021-03-22]. <https://europepmc.org/article/MED/31588998>. DOI: 10.1002/14651858.CD012160.pub2.
- [24] HE X, ZOU K. MiRNA-96-5p contributed to the proliferation of gastric cancer cells by targeting FOXO3[J]. *J Biochem*, 2020, 167(1): 101-108. DOI:10.1093/jb/mvz080.
- [25] KIM M, TAN Y S, CHENG W C, et al. miR144 and miR451 regulate human erythropoiesis via RAB14[J]. *Br J Haematol*, 2015, 168(4): 583-597. DOI:10.1111/bjh.13164.

[收稿日期] 2021-07-22

[修回日期] 2021-09-23

[本文编辑] 黄静怡