DOI:10.16016/j.1000-5404.202103002

吴茱萸碱通过 MAPK 信号通路抑制人胃癌细胞的体外实验研究

千维娜[1],李 治[2],方 瑜[3],姜伊娜[3],肖海娟[1] 712000 陕西 咸阳,陕西中医药大学:附属医院肿瘤科[1],药学院[2],基础医学院[3]

[**摘要**] **目的** 探讨吴茱萸碱通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路对人胃癌细胞的抑制作用。**方法** 应用 MTT 法对 SGC-7901 细胞活性进行评定。以 8、16、32 μmol/L 吴茱萸碱作用胃癌 SGC-7901 细胞(记为 A_1 组,A_2 组,A_3 组),另设置相同浓度吴茱萸碱处理后的细胞,加入 p38 抑制剂(记为 B_1 组,B_2 组,B_3 组),对照组用细胞培养液处理作为空白对照。Annexin V-FITC/PI 法观察细胞凋亡,PI 染色法观察细胞周期,Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、cleaved-caspase-3,划痕愈合实验评价细胞迁移抑制情况,蛋白质印迹法检测 c-dc2、cdc25C、cyclin B1 及 p-ERK、p-p38 蛋白水平表达。**结果** 吴茱萸碱能够阻碍 SGC-7901 细胞增殖,细胞活性随着浓度和时间的增加而降低,24、48 h 的 IC_{50} 分别是 16.78、7.28 μmol/L。与对照组(0.06%)比较,A 组 SGC-7901 细胞凋亡比例(18.72%、31.08%、52.17%)增加,G_2/M 细胞周期阻滞,与 A 组比较,B 组 SGC-7901 细胞凋亡比例减少,G_2/M 细胞周期阻滞减弱,G_2/M 期调控蛋白 cdc2、cdc25C、cyclin B1 水平下调(P 均<0.05)。划痕愈合实验表明 SGC-7901 细胞的细胞划痕愈合率伴随吴茱萸碱浓度升高而降低;与 A 组(59.13%、23.15%、18.31%)比较,B 组细胞划痕愈合率(63.17%、55.27%、34.08%)升高(P<0.05)。Western blot 结果表明吴茱萸碱处理 Bcl-2、cleaved-caspase-3 水平上调,SGC-7901 细胞 MAPK 通路蛋白 p-ERK 水平下调,p-p38 表达水平上调(P<0.05)。与 A 组比较,B 组 cdc2、cdc25C、cyclin B1 表达上调,Bcl-2、cleaved-caspase-3 水平显著下降,MAPK 通路蛋白 p-ERK 水平上调,p-p38 水平下调(P<0.05)。**结论** 吴茱萸碱对胃癌细胞有抑制作用,其机制是通过 MAPK 信号通路下调 p-p38 蛋白、上调凋亡蛋白实现。

[**关键词**] 吴茱萸碱;MAPK;ERK;p38;胃癌细胞;抗肿瘤

[**中图法分类号**] R282.71; R285.5; R735.2 [**文献标志码**] A

Anti-tumor mechanism of evodiamine on gastric cancer cells *in vitro* through MAPK signaling pathway

QIAN Weina[1], LI Zhi[2], FANG Yu[3], JIANG Yina[3], XIAO Haijuan[1] [1]Department of Oncology, Affiliated Hospital, [2]School of Pharmacy, [3]School of Basic Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi Province, 712000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the anti-tumor effect of evodiamine on gastric cancer cells *via* the MAPK signaling pathway. **Methods** MTT assay was used to assess the cell viability of SGC-7901 cells after the treatment of 8, 16 and 32 μmol/L evocarpine (denoted as A_1 group, A_2 group, A_3 group). The effect of p38 inhibitor on the above cells (denoted as B_1 group, B_2 group, B_3 group) were studied. The blank control cell group was the cells treated with culture medium. Annexin V-FITC/PI was used to observe cell apoptosis, PI staining to observe cell cycle, Western blotting to measure apoptosis-related proteins Bcl-2 and cleaved-caspase-3, and scratch healing test to evaluate the inhibitory effect on cell migration. Western blotting was employed to detect the expression levels of c-dc2, cdc25C, cyclin B1, and p-ERK and p-p38. **Results**

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82074255);陕西省自然科学基础研究计划项目(2020JQ-859)

[**通信作者**] 肖海娟,E-mail:daisytcm@hotmail.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Evodiamine negatively inhibited the proliferation of SGC-7901 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. The IC_{50} values at 24 and 48 h were 16.78 and 7.28 μmol/L, respectively. Compared with the control group (0.06%), the apoptotic rate of SGC-7901 cells was increased in groups A_1, A_2 and A_3 (18.72%, 31.08% and 52.17%), and the cells arrested at G_2/M phase. The proportion of apoptotic cells in group B was decreased, there were less cells arrested at G_2/M phase, and the expression of G_2/M phase regulatory proteins CDC2, CDC25C and Cyclin B1 were down-regulated when compared with group A (all $P<0.05$). The scratch healing test showed that the healing rate of SGC-7901 cells was decreased with the increase of evodiamine concentration. Compared with groups A_1, A_2 and A_3 (59.13%, 23.15% and 18.31%), the rate was increased in groups B_1, B_2 and B_3 (63.17%, 55.27%, 34.08%, $P<0.05$). Western blot results indicated that evodiamine treatment induced the up-regulation of Bcl-2 and cleaved caspase-3, down-regulation of p-ERK, and obvious elevation of p-p38 ($P<0.05$). Compared with group A, the expression levels of CDC2, CDC25C and Cyclin B1 were increased, those of Bcl-2 and cleaved caspase-3 were significantly decreased, while that of p-ERK was up-regulated and that of p-p38 was down-regulated in group B ($P<0.05$). **Conclusion** Evodiamine shows anti-tumor effect on gastric cancer cells, and it is realized by the down-regulation of p-p38 protein and up-regulation of apoptosis-related proteins through MAPK signaling pathway.

[**Key words**] evodiamine; MAPK; ERK; p38; gastric cancer cells; anti-tumor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82074255) and the Project of Natural Basic Research Plan of Shaanxi Province (2020JQ-859). Corresponding author: XIAO Haijuan, E-mail: daisytcm@hotmail.com

胃癌是常见恶性肿瘤疾病,与饮食习惯、环境密切相关[1-2]。临床治疗胃癌方法众多,内镜治疗仅限于淋巴结转移之前;手术根治性切除部位范围大,患者恢复时间长,且术后仍需放化疗防止癌症复发;而化疗药物长期作用于人体,副作用会影响骨髓、肝肾功能[3-4]。故抗肿瘤研究的焦点集中于植物有效成分,中药疗法被广泛用于肿瘤治疗[5]。吴茱萸碱作为中药有效成分[6],对多种恶性肿瘤有较好的抗肿瘤效果[7-8],但吴茱萸碱诱导胃癌细胞凋亡的机制尚未明确。肿瘤细胞增殖及侵袭与信号通路密切相关,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)与癌细胞信号传递有关[9]。吴茱萸碱作为中药有效物质对多种癌症有抑制效果,故本研究用吴茱萸碱作用胃癌 SGC-7901 细胞,探究吴茱萸碱通过 MAPK 通路对人胃腺癌 SGC-7901 细胞抗肿瘤作用,进一步阐明吴茱萸碱抗肿瘤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

SGC-7901 细胞购自安妍生物有限公司。

1.2 药品与试剂

吴茱萸碱(成都瑞芬斯生物公司,纯度>98%);胎牛血清(杭州江滨生物公司);MTT 试剂(南京化学试剂公司);Annexin V-FITC/PI 试剂盒(常州百代生物公司);ELISA 试剂盒(上海睿时生物公司);DMSO(Sigma 公司);cdc2、cdc25C、cyclinB1、ERK、p-ERK、p-38、p-p38、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、GAPDH 抗体(沈阳万类生物公司);RIPA 裂解液(武汉友联特生物公司);山羊抗兔 IgG 抗体(成都苏净科学器材公司);DMEM 培养基、胰酶(HyClone 公司)。

1.3 仪器

HERAcell 2401 型细胞培养箱(上海巴玖实业公司);Multiskan FC 型酶标仪(青岛正恒试验设备公司);Sorvall ST 16R 型离心机(西安康睿商贸公司);C6 型流式细胞仪(无锡凯派克斯公司);电泳系统(杭州正迈科技公司);iBright CL750 型凝胶成像仪(成都一科仪器设备公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养条件 SGC-7901 细胞:37 ℃、5% CO_2、10%胎牛血清。

1.4.2 MTT 法检测细胞活性 SGC-7901 细胞培养至对数生长期后接种至 96 孔板内。滴加不同梯度吴茱萸碱(浓度梯度 0.5、1、2、4、8、16、32、64 μmol/L),20 μL 培养基孵育 2 d,弃培养基内药液,MTT 溶液孵育 4 h 后去溶液加 150 μL DMSO,490 nm 测光密度值。对照组无吴茱萸碱处理,空白孔滴加 DMSO。用如下公式计算细胞活性,GraphPad prism8 软件计算 24、48 h 的半数致死量 IC_{50}。细胞活性 = $D(490)_{实验组} - D(490)_{空白组}$ / $D(490)_{对照组} - D(490)_{空白组} \times 100\%$

1.4.3 Annexin V-FITC/PI 法评价细胞凋亡 对数

生长期 SGC-7901 细胞接种于 12 孔板上。加入含浓度为 8、16、32 μmol/L 吴茱萸碱不完全培养基 1 mL(记为 A_1 组,A_2 组,A_3 组),另设置相同浓度梯度处理的细胞加入阿帕替尼培养液 20 mg/L(记为 B_1 组,B_2 组,B_3 组),孵育 12 h,收集细胞,按说明书操作,加入结合液、Annexinv-FITC 溶液和 PI 溶液混匀,暗处孵育 20 min,检测,无吴茱萸碱处理作为对照组观察各组细胞凋亡情况。

1.4.4　流式细胞仪检测细胞周期　　对数生长期 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板上。分组与标记同 1.4.3,孵育 24 h,收集细胞,PBS 洗涤 3 次,70% 乙醇固定 1.5 h。按照说明书步骤将 RNase A、碘化丙啶(PI)与细胞混合 0.5 h,温度恒定 37 ℃,以不含吴茱萸碱的不完全培养基处理作为对照组,观察细胞周期。

1.4.5　Western blot 检测 Bcl-2、Cleaved-caspase-3 水平　　取对数生长期细胞,接种于 6 cm^2 的培养瓶,待细胞 60%~70% 融合时弃去培养基,分组与标记同 1.4.3,置于 5% CO_2、37 ℃ 培养箱孵育 36 h。加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒定量。再加入适量的蛋白缓冲液,沸水高温变性,取 40 μg 蛋白,电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭 30 min,加入 Bcl-2(1∶500)、cleaved-caspase-3(1∶500) GAPDH(1∶1 000) 4 ℃孵育 12 h;TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 lgG 二抗(1∶5 000),孵育 1.5 h,化学发光仪曝光显影,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

1.4.6　划痕愈合实验评价细胞迁移　　对数生长期 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板中。用 10 μL 移液器枪头在 SGC-7901 细胞表面进行划痕,分组与标记同 1.4.3,继续孵育 24 h,显微镜观察 0、24 h 划痕的宽度。以不含吴茱萸碱的不完全培养基处理作为对照组,比较各组划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.4.7　Western blot 检测蛋白水平　　接种 SGC-7901 细胞至 6 孔板。分组与标记同 1.4.3,孵育 24 h,收集细胞并提取蛋白。经凝胶电泳分离、转膜,一抗 4 ℃孵育 12 h,洗膜并加二抗 37 ℃孵育 1 h,洗膜进行显影,图像处理软件分析。以不含吴茱萸碱的不完全培养基处理作为对照组,对比 cdc2、cdc25C、cyclinB1、p-ERK 及 p-p38 蛋白水平。

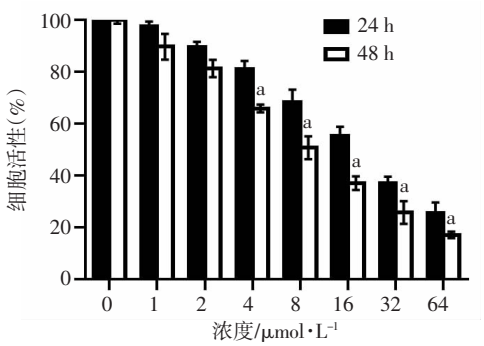
1.5　统计学分析

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件分析,两两比较用 t 检验,多组比较用方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　吴茱萸碱影响 SGC-7901 细胞增殖

SGC-7901 细胞经吴茱萸碱处理 24 h 及 48 h 的细胞活性见图 1。结果表明,SGC-7901 细胞活性随着吴茱萸碱浓度的增加而降低。吴茱萸碱处理 SGC-7901 细胞 48 h 的细胞毒性大于 24 h 的细胞毒性。使用 GraphPad prism 软件计算得出吴茱萸碱对 SGC-7901 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 16.78 μmol/L,48 h 的 IC_{50} 为 7.28 μmol/L。



a: $P<0.05$, 与 24 h 比较

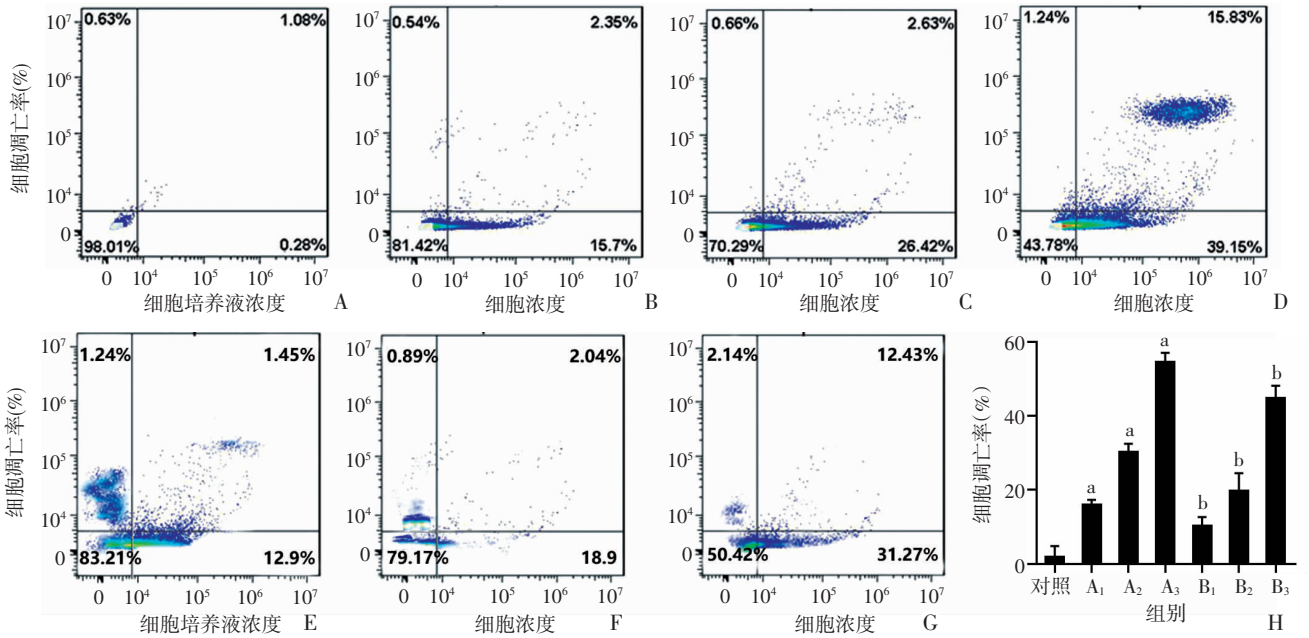
图 1　吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响
($n=6, \bar{x}\pm s$)

2.2　吴茱萸碱影响 SGC-7901 细胞凋亡

采用流式细胞仪评价吴茱萸碱在 8、16、32 μmol/L 浓度下对 SGC-7901 细胞凋亡的影响。吴茱萸碱处理后,细胞凋亡率增加,显著促进 SGC-7901 细胞凋亡($P<0.05$),且作用效果与浓度有关。与未添加 p38 抑制剂比较,各浓度下 SGC-7901 细胞凋亡率下降($P<0.05$),见图 2。

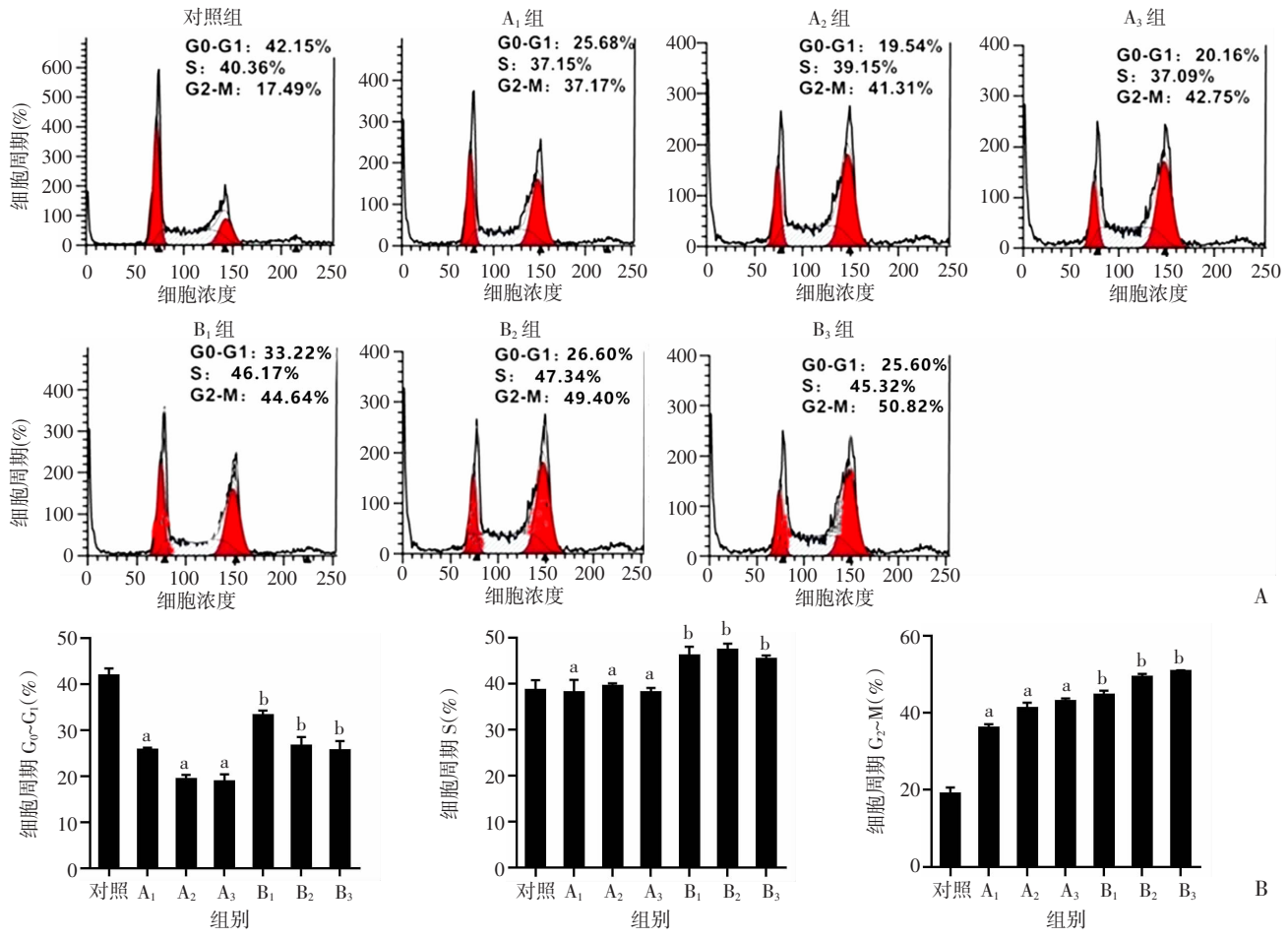
2.3　吴茱萸碱对细胞周期的影响

采用流式细胞仪检测吴茱萸碱在 8、16、32 μmol/L 浓度下对 SGC-7901 细胞周期的影响。SGC-7901 细胞经 8、16、32 μmol/L 吴茱萸碱处理 G_2/M 期细胞比例提高,作用效果与浓度有关,G_0/G_1 期细胞所占百分比下降($P<0.05$)。与 A 组相比,B 组各组细胞 G_2/M 期细胞比例减少($P<0.05$),见图 3。为了进一步验证吴茱萸碱对细胞周期 G_2/M 的阻滞作用,调控 G_2/M 细胞周期相关蛋白(cdc2、cdc25C、cyclin B1),使用 Western blot 检测,与对照组相比,A 组经吴茱萸碱处理 24 h 后,cdc2、cdc25C、cyclin B1 的表达水平显著降低($P<0.05$),与 A 组比较,增加抑制剂后 cdc2、cdc25C、cyclin B1 表达显著升高($P<0.05$),表明吴茱萸可能通过下调 cdc2、cdc25C、cyclin B1 蛋白水平,诱导 SGC-7901 细胞 G_2/M 期阻滞,见图 4。



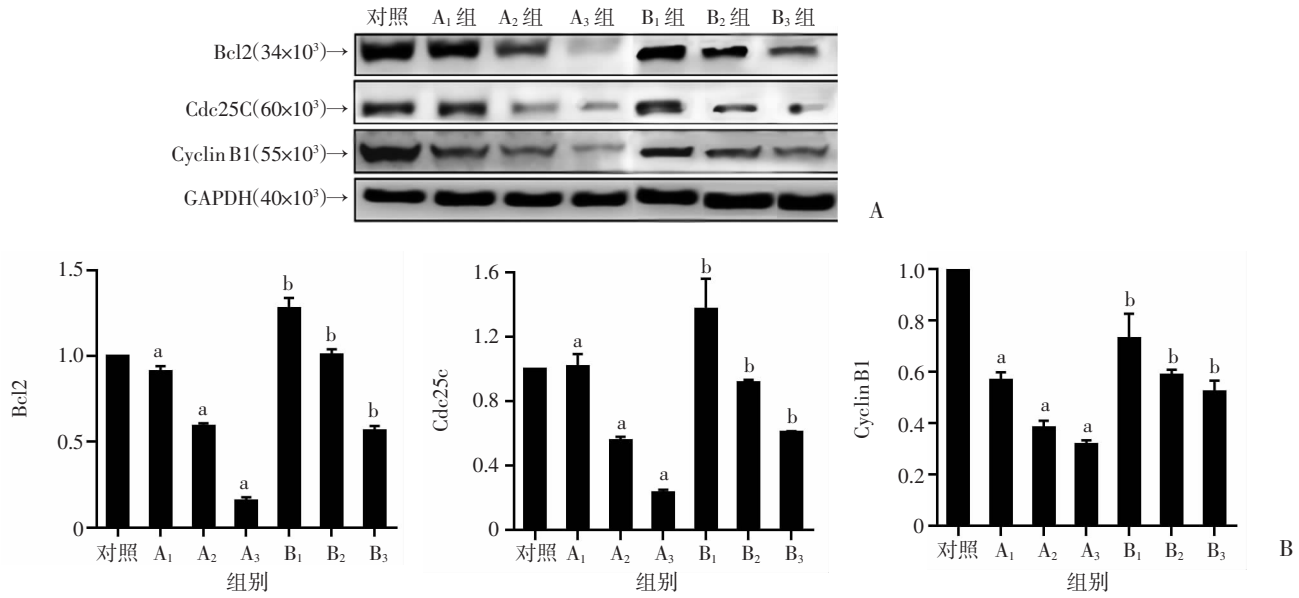
A~G 分别为流式检测对照、A_1、A_2、A_3、B_1、B_2、B_3 组胃癌 SGC-7901 细胞凋亡率;H:各组胃癌 SGC-7901 细胞凋亡率统计结果
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 2 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡率的影响 ($n=6, \bar{x}\pm s$)



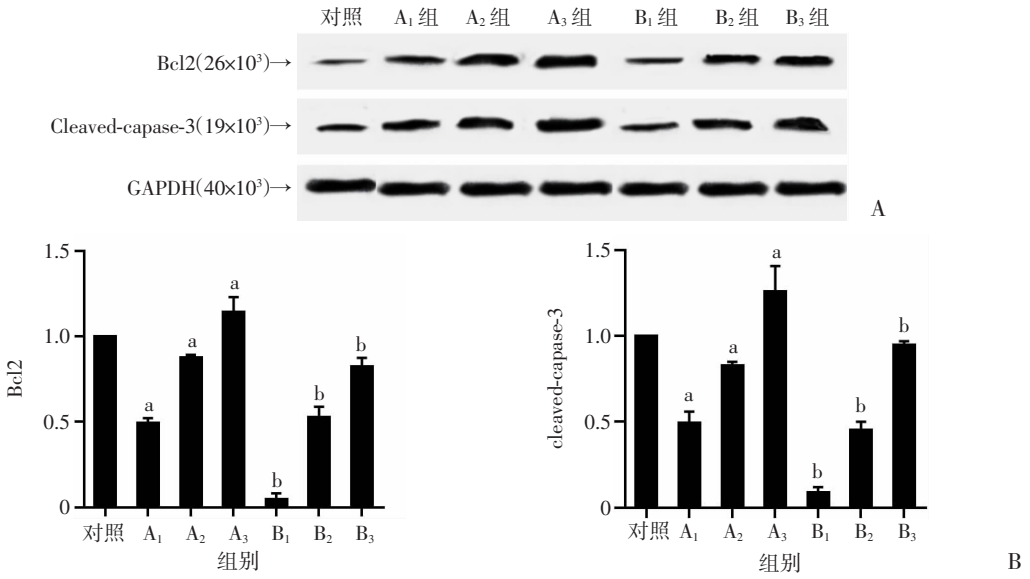
A:流式检测各组 SGC-7901 细胞周期;B:各组 SGC-7901 细胞周期统计结果;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 3 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞周期的影响 ($n=6, \bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测各组胃癌 SGC-7901 细胞周期蛋白;B:各组胃癌 SGC-7901 细胞周期蛋白半定量结果;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 4 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞周期蛋白的影响 ($n=6,\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测各组胃癌 SGC-7901 细胞相关凋亡蛋白水平;B:各组胃癌 SGC-7901 细胞相关凋亡蛋白水平半定量结果;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 5 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞相关凋亡蛋白水平的影响 ($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.4 细胞凋亡相关蛋白水平

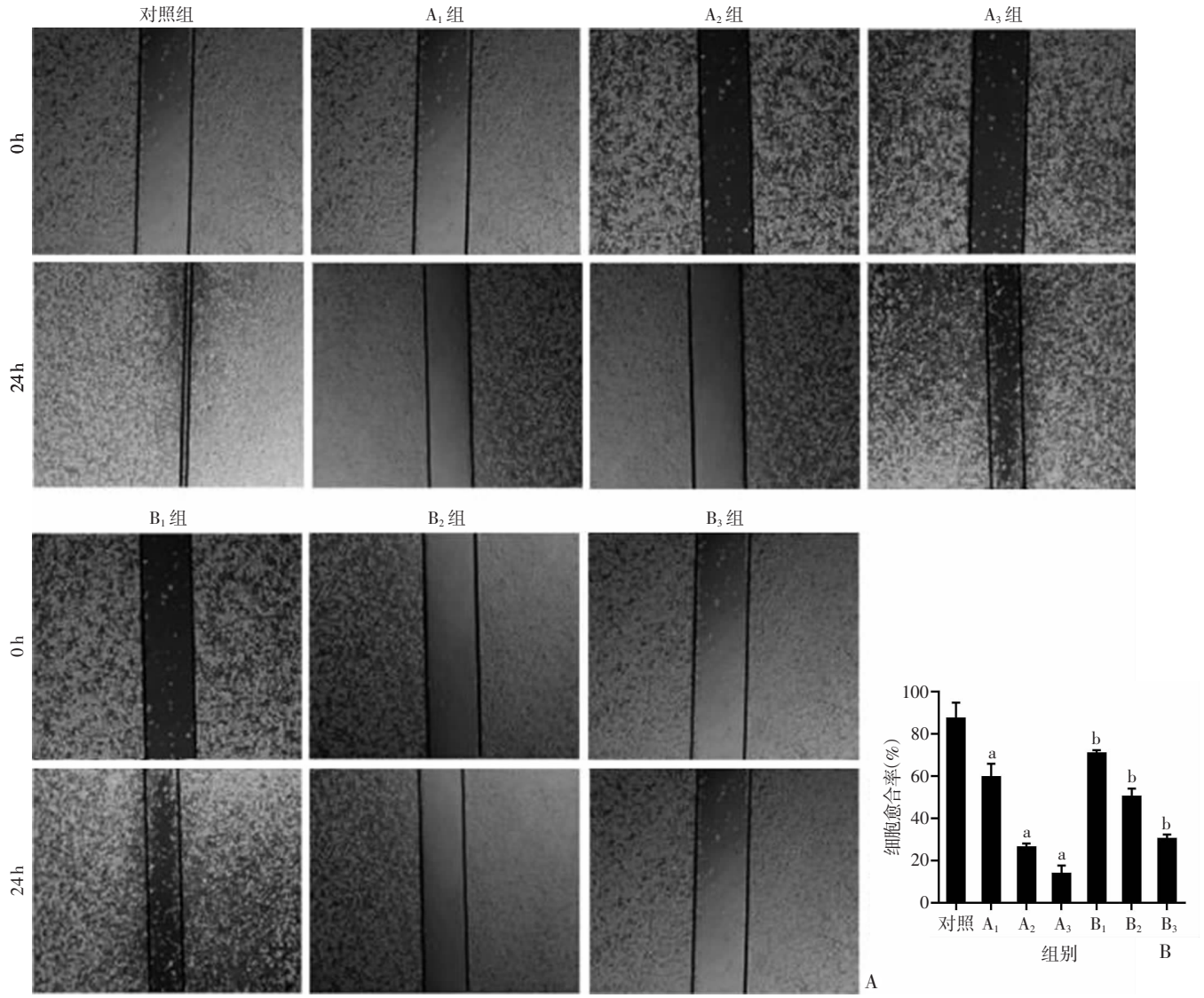
与对照组比较,A 组 Bcl2、cleaved-caspase-3 水平明显增高($P<0.05$);与 A 组比较,B 组 Bcl2、cleaved-caspase-3 水平明显下降($P<0.05$)。见图 5。

2.5 吴茱萸碱对细胞迁移的影响

与对照组比较,A 组吴茱萸碱处理后划痕愈合率逐渐降低($P<0.05$),与 A 组比较,B 组划痕愈合率明显增高($P<0.05$),见图 6。

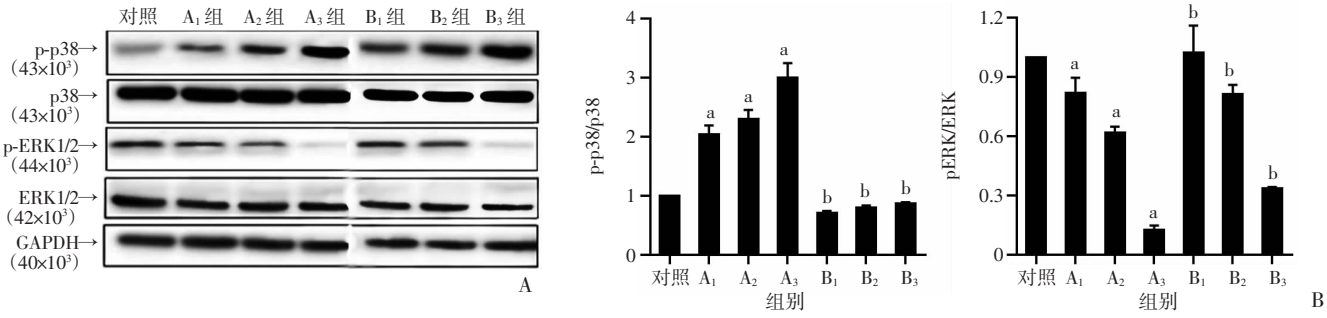
2.6 吴茱萸碱对 MAPK 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,随着吴茱萸碱浓度的增加,A 组 SGC-7901 细胞的 p-ERK 表达逐渐下调,p-p38 表达则呈现上调($P<0.05$),作用效果与浓度有关。与 A 组比较,B 组 p-ERK 表达逐渐上调,p-p38 表达则呈现下调($P<0.05$),见图 7。



A:划痕愈合实验比较各组胃癌 SGC-7901 细胞迁移率;B:各组胃癌 SGC-7901 细胞迁移率统计结果;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 6 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞迁移率的影响 ($n=6,\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测各组 MAPK 蛋白;B:各组 MAPK 蛋白半定量结果;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 A_1 组比较

图 7 吴茱萸碱对人胃癌 SGC-7901 细胞 MAPK 蛋白水平的影响 ($n=6,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

胃癌为我国高发消化系统恶性肿瘤,病死率高[10-12]。癌症诊断与治疗方法的多样性,使胃癌生存率逐步上升[13]。但长期化疗及新辅助治疗可能导致肿瘤细胞耐药,对胃癌患者身心健康极为不利[14]。中医认为中药靶点多,疗效稳定[15],中医中药治疗联合化疗已经成为胃癌患者临床治疗的常规方案,这将是热门研究方向[15]。

吴茱萸归肝、脾、胃、肾经,可散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻[16]。吴茱萸碱源于中药吴茱萸的喹诺酮类生物碱,对结肠癌细胞、恶性黑色素瘤细胞等多种肿瘤细胞有抑制作用[17-18]。本课题从细胞增殖、凋亡、迁移等方面研究吴茱萸碱通过 MAPK 通路对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制机制,结果表明吴茱萸碱对 SGC-7901 细胞具有较强的细胞毒性(24 h 的半数致死量 IC_{50} = 16.78 μmol/L,48 h 的半数致死量 IC_{50} = 7.28 μmol/L)。8、16、32 μmol/L 浓度的吴茱萸碱处理后,能显著增加凋亡细胞比例。

在众多的细胞内信号通路中,MAPK 途径相当重要,涉及多种细胞生命周期的调控[19]。MAPK 以 ERK1/2、JNK、p38-MAPK 与 ERK5 为主要途径,ERK1/2、p38 通路以磷酸化形式(p-ERK1/2、p-p38 等)表现为激活状态[20-22]。MAPK/ERK 通路与癌细胞产生和转移有关[22],MAPK/ERK 激活能提高细胞增殖、侵袭及转移能力,故抑制 MAPK/ERK 信号通路有望发挥抗肿瘤作用[23-24]。MAPK/p38 通路主要与氧化应激和细胞凋亡有关,研究表明 MAPK/p38 通路活化参与细胞氧化应激,加速细胞凋零[25]。且 MAPK/p38 通路在细胞周期阻滞中也发挥着重要作用,p38 磷酸化可下调细胞周期蛋白表达,阻止多种肿瘤细胞的细胞增殖[26]。本课题在研究吴茱萸碱的抗肿瘤活性的基础上,通过 MAPK 信号通路进一步研究吴茱萸碱抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的机制,结果表明 8、16、32 μmol/L 吴茱萸碱处理后,SGC-7901 细胞 p-ERK 水平显著下降,p-p38 水平显著上升,而在相同浓度梯度吴茱萸碱中加入 p38 抑制剂后,p-ERK 水平上调,p-p38 水平下调,提示吴茱萸碱是通过作用于 MAPK/p38 和 MAPK/ERK 信号通路发挥抗肿瘤作用。癌细胞生长与 cdc2、cdc25C、cyclin B1 等蛋白有关,细胞生长抑制会伴随 cdc2、cdc25C、cyclin B1 水平改变[27-28]。本研究中,吴茱萸碱作用下 SGC-7901 细胞 G_2/M 期阻滞,cdc2、cdc25C、cyclin B1 水平下调,这可能与吴茱萸碱上调 MAPK 通路蛋白 p38,下调 ERK 蛋白,从而引起 SGC-7901 胃癌细胞 G_2/M 期阻滞的机制有关。细胞划痕愈合实验证实了 8、16、32 μmol/L 吴茱萸碱均能显著抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的迁移,抑制效果呈现浓度依赖性,可能与吴茱萸碱通过 MAPK 通路引起细胞迁移能力下降有关。

综上所述,体外细胞实验表明,吴茱萸碱通过 MAPK 通路下调人胃癌 SGC-7901 细胞分裂周期蛋白并上调凋亡蛋白,抑制细胞生长,降低胃癌 SGC-7901 细胞迁移能力,促进细胞凋亡,具有较好的抗肿瘤效果。本研究为吴茱萸碱在胃癌的临床应用提供实验基础,同时对 MAPK 信号通路相关的其他癌症抗肿瘤机制研究提供实验设计思路。

参考文献:

[1] YUSEFI A R, BAGHERI LANKARANI K, BASTANI P, *et al*. Risk factors for gastric cancer: a systematic review[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(3): 591-603. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.3.591.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

[3] SONG Z Y, WU Y, YANG J B, *et al*. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317714626. DOI: 10.1177/1010428317714626.

[4] PAULA D P, BRASIL COSTA V I, JORGE R V, *et al*. Impact of protocol change on individual factors related to course of adverse reactions to chemotherapy for breast cancer[J]. Support Care Cancer, 2020, 28(1): 395-403. DOI: 10.1007/s00520-019-04841-x.

[5] 王晋慧, 吕邵娃, 李孟, 等. 中药有效成分体外抗乳腺癌作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 197-203. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201725.
WANG J H, LYU S W, LI M, *et al*. Anti-breast cancer mechanism of active ingredients of traditional Chinese medicine in vitro[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(17): 197-203. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201725.

[6] 刘丽, 张笑敏, 许浚, 等. 吴茱萸化学成分和药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2689-2702. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.012.
LIU L, ZHANG X M, XU J, *et al*. Chemical components and pharmacological action for Euodiae Fructus and predictive analysis on its Q-marker[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2689-2702. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.012.

[7] 杨华清, 侯俊萍, 孙婷. 吴茱萸碱影响宫颈癌 HeLa 细胞的增殖与凋亡及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(20): 3298-3301. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-

6821.2020.20.031.
YANG H Q, HOU J P, SUN T. Evodiamine affects cervical cancer HeLa cell proliferation and apoptosis and its mechanism[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(20): 3298-3301. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.20.031.

[8] 刘璐, 王雪梅, 王岩, 等. 吴茱萸碱对胶质瘤 SHG-44 细胞凋亡的促进作用及其机制[J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(5): 591-595. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.11853.
LIU L, WANG X M, WANG Y, *et al*. Evodiamine promotes apoptosis of glioma SHG-44 cells and its mechanism[J]. Acta Acad Med Sin, 2020, 42(5): 591-595. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.11853.

[9] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, *et al*. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer[J]. Cancers, 2019, 11(10): 1618. DOI: 10.3390/cancers11101618.

[10] WU H, WANG W, TONG S, *et al*. Nucleostemin regulates proliferation and migration of gastric cancer and correlates with its malignancy[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 17634-17643.

[11] NEVES FILHO E H, DE SANT´ANA R O, NUNES L V, *et al*. Histopathological regression of gastric adenocarcinoma after neoadjuvant therapy: a critical review[J]. APMIS, 2017, 125(2): 79-84. DOI: 10.1111/apm.12642.

[12] SUN Z Q, WANG Q S, YU X B, *et al*. Risk factors associated with splenic hilar lymph node metastasis in patients with advanced gastric cancer in northwest China[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 21358-21364.

[13] SHITARA K, BANG Y J, IWASA S, *et al*. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive gastric cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 382(25): 2419-2430. DOI: 10.1056/NEJMoa2004413.

[14] JIN P, JI X Y, KANG W Z, *et al*. Artificial intelligence in gastric cancer: a systematic review[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(9): 2339-2350. DOI: 10.1007/s00432-020-03304-9.

[15] 袁选举, 邓守恒. 中医药在治疗恶性肿瘤中的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2232-2234.
YUAN X J, DENG S H. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of malignant tumors[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(9): 2232-2234.

[16] 肖洋, 段金芳, 刘影, 等. 吴茱萸炮制方法和功能主治历史沿革[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 223-228. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030223.
XIAO Y, DUAN J F, LIU Y, *et al*. Historic successive changes of euodiae fructus in processing methods and functions[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(3): 223-228. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030223.

[17] LIU N, LI Y X, CHEN G Z, *et al*. Evodiamine induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and necroptosis in human melanoma A-375 cells[J]. Oncol Lett, 2020, 20(4): 121. DOI: 10.3892/ol.2020.11983.

[18] GUAN X Y, ZHENG X T, VONG C T, *et al*. Combined effects of berberine and evodiamine on colorectal cancer cells and cardiomyocytes *in vitro*[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 875: 173031. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173031.

[19] YOU Z, LIU S P, DU J, *et al*. Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: a review[J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(3): 201-205. DOI: 10.1111/jop.12807.

[20] DROSTEN M, BARBACID M. Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors[J]. Cancer Cell, 2020, 37(4): 543-550. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.013.

[21] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, *et al*. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997-2007. DOI: 10.3892/etm.2020.8454.

[22] LOW H B, ZHANG Y. Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer[J]. Immune Netw, 2016, 16(2): 85-98. DOI: 10.4110/in.2016.16.2.85.

[23] PAPA S, CHOY P M, BUBICI C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming[J]. Oncogene, 2019, 38(13): 2223-2240. DOI: 10.1038/s41388-018-0582-8.

[24] HUANG Y Q, ZOU Y, LIN L H, *et al*. miR-101 regulates the cell proliferation and apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma by targeting MEK1 via regulation of the ERK/MAPK signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2019, 41(1): 377-386. DOI: 10.3892/or.2018.6821.

[25] MARTÍNEZ-LIMÓN A, JOAQUIN M, CABALLERO M, *et al*. The p38 pathway: from biology to cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): E1913. DOI: 10.3390/ijms21061913.

[26] STRAMUCCI L, PRANTEDA A, BOSSI G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK_3/MKK_6/p38 MAPK signaling pathway in cancer[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(5): E131. DOI: 10.3390/cancers10050131.

[27] WANG J N, ZHANG Z R, CHE Y, *et al*. Acetyl-macrocalin B, an ent-kaurane diterpenoid, initiates apoptosis through the ROS-p38-caspase 9-dependent pathway and induces G2/M phase arrest via the Chk1/2-Cdc25C-Cdc2/cyclin B axis in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(7): 609-621. DOI: 10.1080/15384047.2018.1449613.

[28] LIU K, ZHENG M Y, LU R, *et al*. The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 213. DOI: 10.1186/s12935-020-01304-w.

(**收稿**:2021-03-01;**修回**:2021-04-27)
(编辑 张 维)