

皖南蝮蛇抑瘤组分-I通过调控RAI14抑制顺铂耐药胃癌细胞的增殖与侵袭

李艳宇, 李晨, 戴传君, 郭润之, 韩浩宇, 卢林明, 周芳芳, 支慧
皖南医学院病理教研室, 安徽 芜湖 241002

摘要:目的 探讨皖南蝮蛇抑瘤组分-I(AHVAC-I)对顺铂耐药胃癌细胞增殖、侵袭能力的影响及其可能的作用机制。方法 药物浓度递增法构建顺铂耐药胃癌细胞(MKN-28/DDP), 细胞克隆实验和CCK-8实验观察AHVAC-I对MKN-28/DDP增殖能力的影响;将细胞分为对照组(用不含药物的培养基处理)和AHVAC-I处理组(含2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AHVAC-I的培养基)。细胞划痕实验和Transwell实验检测AHVAC-I对MKN-28/DDP侵袭能力的影响;Western blot检测AHVAC-I对MKN-28/DDP上皮-间充质转化的影响;定量PCR与Western blotting实验检测视黄酸诱导蛋白14(RAI14)的表达水平。结果 相较于对照组,2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AHVAC-I可显著抑制MKN-28/DDP细胞的增殖能力与侵袭能力,差异有统计学意义($P<0.05$);与MKN-28细胞相比,MKN-28/DDP细胞RAI14的表达水平增加了2.15倍($P<0.01$);与对照组相比,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AHVAC-I处理后RAI14在MKN-28/DDP细胞的表达即降低了25%($P<0.01$);提高RAI14的表达可恢复因AHVAC-I而抑制的MKN-28/DDP细胞的增殖与侵袭。结论 AHVAC-I可通过下调RAI14的表达抑制胃癌顺铂耐药细胞的增殖与侵袭。

关键词:皖南蝮蛇抑瘤组分-I;胃癌;顺铂耐药;增殖;侵袭;视黄酸诱导蛋白14

Antitumor component-I in *Agkistrodon halys* venom inhibits proliferation and migration of cisplatin-resistant gastric cancer cells by downregulating RAI14

LI Yanyu, LI Chen, DAI Chuanjun, GUO Runzhi, HAN Haoyu, LU Linming, ZHOU Fangfang, ZHI Hui
Department of Pathology, Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

Abstract: Objective To evaluate the inhibitory effect of antitumor component-I in *Agkistrodon halys* venom (AHVAC-I) on proliferation and migration of cisplatin-resistant gastric cancer cells and explore the underlying mechanism. **Methods** Cisplatin-resistant MKN-28 (MKN-28/DDP) cells were obtained by continuous exposure of MKN-28 cells to stepwise-increasing concentrations of cisplatin. MKN-28/DDP cells were treated with different concentrations of AHVAC-I, and the changes in proliferation, migration and invasion of the cells were examined with colony-forming assay, CCK-8 assay wound-healing assay, and Transwell assay. Western blotting was performed to examine the effect of AHVAC-I on expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers of MKN-28/DDP cells; the changes in protein and mRNA expression of retinoic acid induced 14 (RAI14) was detected with Western blotting and qRT-PCR. **Results** Treatment with 2, 4, and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AHVAC-I significantly inhibited proliferative, migratory and invasion abilities and reduced the expressions of EMT markers in MKN-28/DDP cells. Compared with MKN-28 cells, MKN-28/DDP cells showed an increased expression of RAI14, which was significantly lowered after treatment with AHVAC-I. Supplementation with exogenous RAI14 obviously attenuated the inhibitory effect of AHVAC-I on proliferation and migration of MKN-28/DDP cells. **Conclusion** AHVAC-I decreases proliferation and invasion of MKN-28/DDP cells by downregulating RAI14 expression.

Keywords: *Agkistrodon halys* venom; gastric cancer; cisplatin resistance; invasion; proliferation; retinoic acid induced 14

胃癌作为高发生率和高致死率的重大疾病之一,严重威胁着人类健康^[1]。因早期症状不明显,多数胃癌患者在确诊时已经进入进展期^[2]。术后化疗是治疗进展期胃癌患者的重要方式,顺铂(DDP)是胃癌术后常用的化疗药物。然而,临床研究发现伴随着疗程的持续,部分胃癌

患者出现DDP耐药,且DDP耐药的胃癌患者对二线化疗药物的敏感性也会降低,预后差^[3,4]。因此,深入系统筛选并研发出能够逆转DDP耐药或增强化疗敏感性的新药,成为当前临床研究亟待突破的重要科学问题。

顺铂耐药机制多样,如药物外排增加、药物摄取减少、药物失活、肿瘤细胞DNA突变、肿瘤细胞上皮-间充质转化(EMT)增强^[5]。研究证实EMT是逆转肿瘤细胞DDP耐药的重要靶点^[6]。新近研究发现影响肿瘤细胞EMT的视黄酸诱导蛋白14(RAI14)^[7]不仅在胃癌组织中有高表达,且它的高表达与肿瘤细胞的化疗耐药有关^[8]。我们推测RAI14可以通过影响胃癌细胞的EMT,促进胃癌细胞产生顺铂耐药。

蛇毒是一种复杂的天然毒性的化合物,主要由多肽、酶类、蛋白质和其他具有生物活性的小分子物质构

收稿日期:2025-06-04

基金项目:国家自然科学基金(21906122);芜湖市应用基础研究项目(22030122010);安徽省高等学校科学研究项目(2024AH051899);皖南医学院中青年科研基金(WK202217);皖南医学院大学生创新训练项目(22101010240)

Supported by National Natural Science Foundation of China(21906122)

作者简介:李艳宇,在读硕士研究生,E-mail:liy5658@163.com;李晨,在读本科生,E-mail:2468391839@qq.com。李艳宇、李晨为共同第一作者

通信作者:支慧,副教授,硕士生导师,E-mail:Zhi_hui01@hotmail.com

成^[9]。研究证实蛇毒具有直接杀死肿瘤细胞、阻止肿瘤细胞转移^[10]、阻碍肿瘤细胞核酸代谢^[11]、抑制肿瘤内部血管形成^[12]等抗肿瘤效应。皖南蝮蛇毒抑瘤组分-I (AHVAC-I)是皖南医学院蛇毒研究所自皖南蝮蛇蛇毒的粗毒中分离提纯得到的组分^[13]。既往研究发现, AHVAC-I不仅可以促使胃癌细胞MKN-28发生凋亡, 还可显著降低MKN-28细胞的迁移能力^[14]。但是AHVAC-I是否对于胃癌顺铂耐药细胞依然有抑制作用尚不清楚。本研究旨在研究AHVAC-I对顺铂耐药胃癌细胞MKN-28/DDP增殖、侵袭的影响及其作用机制, 为AHVAC-I在胃癌治疗中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 化学试剂与实验材料

AHVAC-I为皖南医学院蛇毒研究所提纯制备的冻干粉, 胃癌细胞株MKN-28(中科院细胞库), DDP (Sigma), RPMI 1640与0.25%胰酶(HyClone), 胎牛血清(Lonsera), CCK8检测试剂(碧云天), 基质胶(ABW), E-cad抗体、N-cad抗体、Vimentin抗体和Snail抗体(碧云天)、Trizol(天根)、cDNA反转录试剂盒及定量PCR检测试剂盒(诺唯赞), RAI14抗体(Abcam), AKT抗体(CST), 磷酸化AKT(AKT-p)抗体(CST), RAI14重组蛋白(Biogradetech)

1.2 MKN-28/DDP细胞构建

取对数生长期的胃癌细胞MKN-28, 胰酶消化后制备成单细胞悬液并接种于培养瓶中。采用DDP持续性接触、浓度渐增诱导法建立胃癌耐药细胞株MKN-28/DDP。经过6个月药物诱导, 胃癌细胞MKN-28能在含有1 μg/mL DDP的1640培养液中稳定生长、传代, 且耐药指数(RI=耐药细胞系IC₅₀/亲本细胞系IC₅₀)>5确定其为耐药细胞MKN-28/DDP。

1.3 CCK8检测

收集对数生长期MKN-28/DDP细胞, 重悬于PBS, 制备成浓度为5×10⁴/mL的细胞悬液。将细胞悬液加入96孔培养板中(100 μL/孔), 37℃、5% CO₂条件下培养24 h后加入不同浓度AHVAC-I, 72 h后加CCK-8试剂(10 μL/孔), 于培养箱内培育1 h, 酶标仪于450 nm波长处检测溶液光密度A_{450nm}。

1.4 集落克隆实验

将MKN-28/DDP细胞以1000/孔接种于六孔板, 待细胞紧贴壁, 用不含药培养液培养3周后, 弃去原有培养基, 用PBS溶液洗去脱落的细胞和残留的培养基。在孔内加入4%的多聚甲醛固定液, 固定20 min后, 弃掉固定液, 用PBS清洗2遍, 再加入0.1%的结晶紫溶液, 染色30 min。用PBS溶液洗去残留的结晶紫溶液后晾干板孔。显微镜下观察并拍照, 采用软件Image J对图片进行集落克隆数量统计。

1.5 划痕实验

在六孔板内置划痕插件, 将2×10⁵细胞铺种于板孔, 待细胞生长至80%融合度后, 取出划痕插件, 加入1 mL含2% FBS的RPMI 1640, 在培养箱中培养24、48、72 h。将每个时间段的六孔板分别置于倒置显微镜下进行拍照, 并采用Image J软件分析处理各个时间段的划痕图片, 计算划痕愈合率。

1.6 Transwell侵袭实验

将基质胶以1:10的比例用不含血清的基础培养基进行稀释。稀释后的基质胶以60 μL/孔的量均匀地加到每个小室内, 将小室置于24孔板板孔内, 37℃恒温箱中放置30 min。待胶凝固后, 将悬于培养液中的2×10⁵细胞加入小室。在放置小室的24孔板板孔中加入500 μL含20% FBS的完全培养基, 置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养。48 h上后清洗小室并将其转移至含有4%多聚甲醛的24孔板中进行细胞固定。20 min后将小室放入含有0.1%结晶紫染液的24孔板中进行染色。30 min后拍照记录并分析实验结果。

1.7 基因表达水平检测

Trizol提取各组细胞总RNA, 反转录后, 进行定量PCR检测。反应条件为: 90℃预变性30 s, 90℃变性10 s, 60℃退火30 s, 进行40个循环。mRNA表达水平以GAPDH为内参, RAI14、GAPDH引物由通用生物公司合成。引物序列: RAI14上游引物: 5'-GTGGATG TGACAGCCCAAGA-3', 下游5'-TTTCCCAGAGCTG TCGACAC-3'; GAPDH上游引物: 5'-AACGGGAAG CTCCTGGCATG-3', 下游5'-TCCACCACCCTGTT GCTGTAG-3'。定量PCR的结果用2^{-ΔΔCT}法分析, 每个样品进行6次重复。

将MKN-28/DDP细胞接种于6孔板, 对细胞进行AHVAC-I处理, 72 h后收集细胞, 裂解细胞提取蛋白。BCA试剂盒定量测定蛋白浓度后将等浓度蛋白转至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1 h后, 按1:1000比例加入GAPDH、RAI14抗体、E-cad抗体、N-cad抗体、Vimentin抗体、Snail抗体、AKT抗体与AKT-p抗体, 4℃孵育过夜。冲洗后, 加入以1:5000比例稀释的HPR标记二抗, 室温下孵育1 h, 洗膜后用ECL化学发光试剂盒显色, 显影。实验均重复3次。

1.8 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行分析并绘图, 符合正态分布的实验计量资料以均数±标准差表示。采用t检验进行两组间比较, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞活力

使用CCK-8检测不同浓度AHVAC-I(1、2、4、8、

16.32 $\mu\text{g/mL}$)处理72 h后的MKN-28/DDP细胞,结果显示4 $\mu\text{g/mL}$ 的AHVAC-I即可显著降低MKN-28/DDP细胞的活力,IC₅₀值为13.55 $\mu\text{g/mL}$ (表1,图1)。前期AHVAC-I的急性毒性实验结果表明最大安全浓度为10.34 $\mu\text{g/mL}$,因此,后续实验中AHVAC-I的最高工作浓度定为8 $\mu\text{g/mL}$ 。

采用不同浓度的AHVAC-I(1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)处理MKN-28/DDP细胞72 h后进行细胞集落克隆实验,实验结果显示,与对照组相比,2 $\mu\text{g/mL}$ 的AHVAC-I即可显著抑制MKN-28/DDP细胞形成集落的能力, $P < 0.05$ (图1B、C)。

表1 AHVAC-I对MKN-28/DDP细胞的毒性作用

Tab.1 Toxic effects of AHVAC-I on MKN-28/DDP cells (Mean \pm SD, %)

Group	AHVAC-I ($\mu\text{g/mL}$)					
	1	2	4	8	16	32
Cell viability	104.37 \pm 2.68	100.8 \pm 5.45	85.65 \pm 4.67	85.65 \pm 4.67	46.23 \pm 4.74	3.01 \pm 1.87
<i>t</i>	3.09	0.28	5.82	8.26	23.07	89.64
<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	<0.001	<0.0001

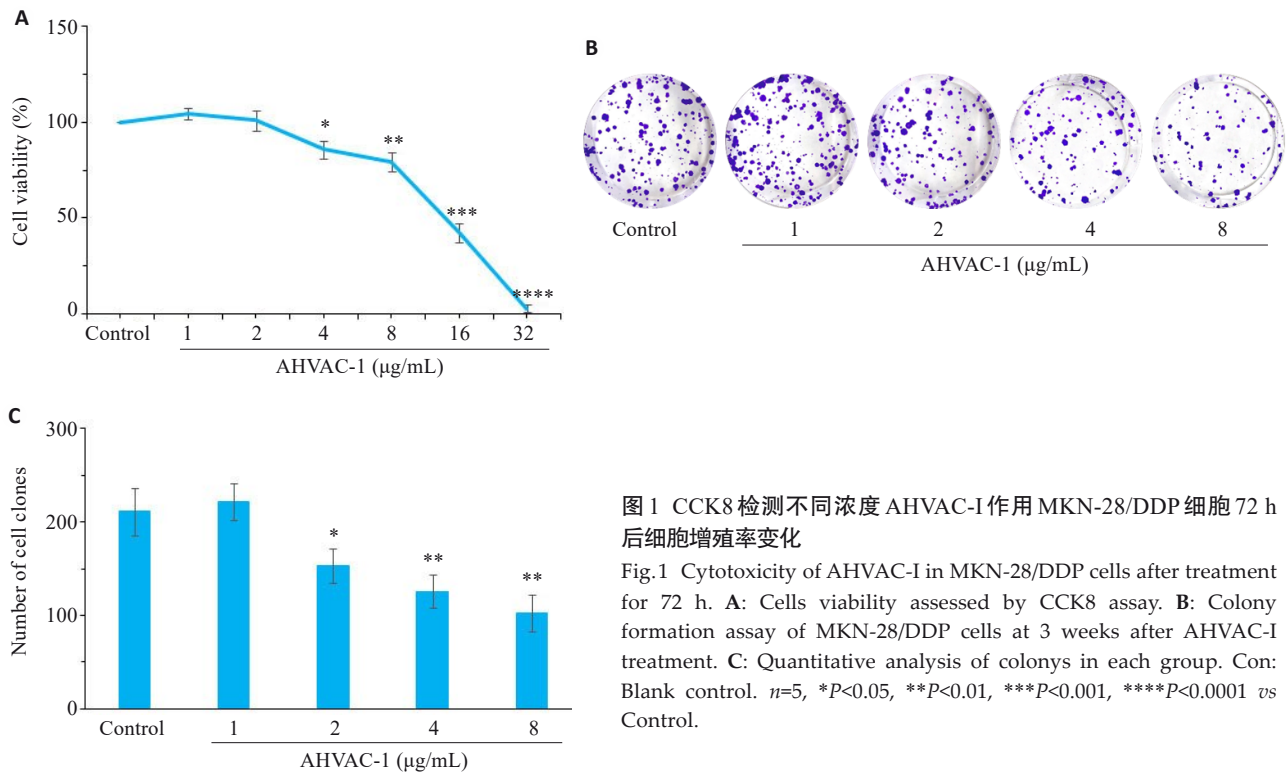


图1 CCK8检测不同浓度AHVAC-I作用MKN-28/DDP细胞72 h后细胞增殖率变化

Fig.1 Cytotoxicity of AHVAC-I in MKN-28/DDP cells after treatment for 72 h. A: Cells viability assessed by CCK8 assay. B: Colony formation assay of MKN-28/DDP cells at 3 weeks after AHVAC-I treatment. C: Quantitative analysis of colonies in each group. Con: Blank control. $n=5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control.

2.2 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞迁移与侵袭能力

不同浓度AHVAC-I(1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)处理MKN-28/DDP细胞72 h,细胞划痕结果表明,与对照组相比,2 $\mu\text{g/mL}$ AHVAC-I处理后细胞的迁移能力即受到了显著抑制($P < 0.05$,图2A、B)。

将被不同浓度AHVAC-I(1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)处理72 h后的MKN-28/DDP细胞放入铺有基质胶的Transwell小室内,48 h后取出小室进行染色观察。结果显示,与对照组相比,1 $\mu\text{g/mL}$ AHVAC-I即可有效减少MKN-28/DDP细胞的穿膜细胞数($P < 0.01$,图2C、D)。

2.3 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞的上皮-间充质转化

不同浓度AHVAC-I(1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)处理MKN-28/DDP细胞72 h,取细胞做Western blotting检测,结果表明上皮细胞标志物E-cad的表达水平明显增高,而间质细胞标志物N-cad、Vimentin、Snail的表达水平显著降低($P < 0.01$,图3)。

2.4 AHVAC-I抑制RAI14在MKN-28/DDP细胞的表达

定量PCR实验结果显示,与对照组相比,RAI14在MKN-28/DDP细胞的表达显著增加($P = 0.0024$,图4A)。定量PCR和Western blotting实验结果表明,72 h后,1 $\mu\text{g/mL}$ AHVAC-I即可显著抑制RAI14在MKN-28/DDP细胞的表达($P = 0.0049$, $P = 0.0006$, $P < 0.05$,图4B~D)。

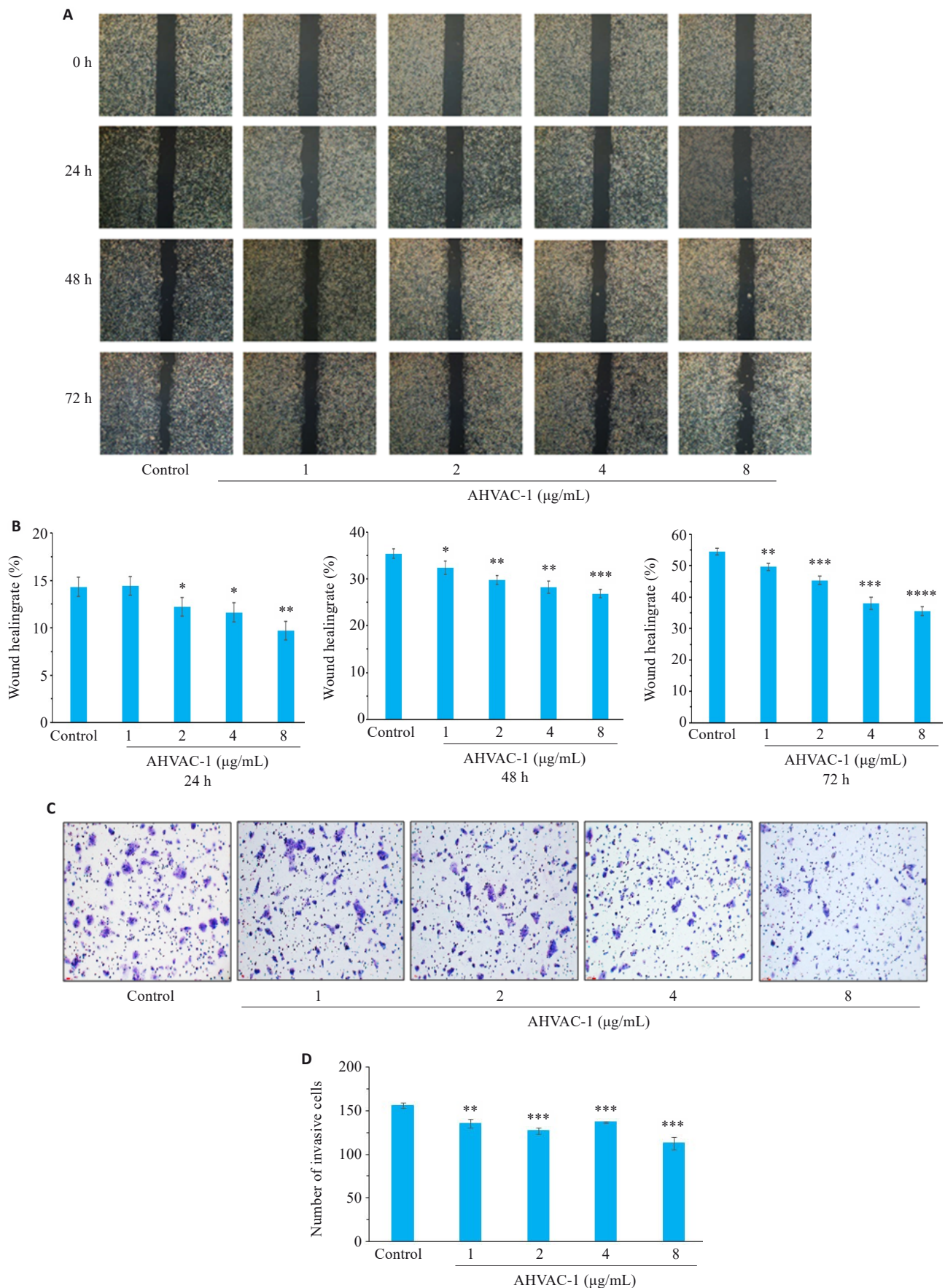


图2 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞迁移与侵袭

Fig.2 Inhibitory effects of AHVAC-I on migration and invasion of MKN-28/DDP cells. **A:** Wounding-healing assay for assessing migration ability of MKN-28/DDP cells (Original magnification: ×40). **B:** Quantitative analysis of migration ability of MKN-28/DDP cells in each group. **C:** Transwell assay for assessing invasion ability of MKN-28/DDP cells (×100). **D:** Quantitative analysis of invading cells in each group, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Control.

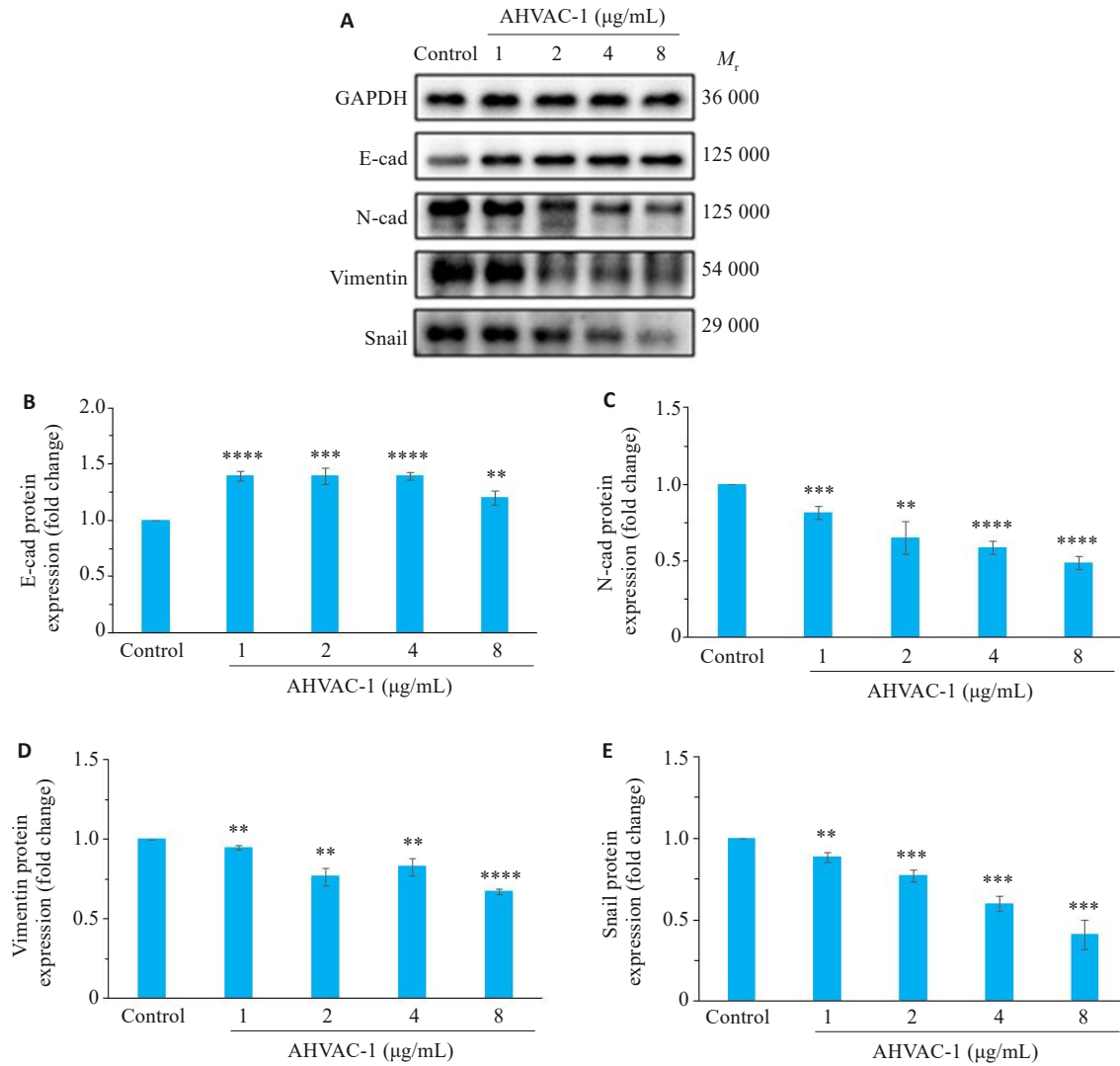


图3 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞上皮间质化

Fig.3 AHVAC-I inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) of MKN-28/DDP cells. **A**: Immunoblots of E-cad, N-cad, vimentin and snail in MKN-28/DDP cells treated with different concentrations of AHVAC-I. **B-E**: Protein expression levels of E-cad, N-cad, vimentin and snail, $n=3$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Control.

2.5 提高RAI14水平可有效削减AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞增殖的能力

蛋白印迹实验结果表明RAI14加入后,因AHVAC-I加入而受到抑制的AKT磷酸化显著增加($P<0.01$,图5A)。同时,细胞集落克隆实验结果显示,与AHVAC-I处理组(MKN-20/DDP^{AHVAC-I})相比,加入RAI14可显著提高MKN-20/DDP^{AHVAC-I}细胞的克隆形成能力显著提升($P<0.01$,图5B、C)。

2.6 提高RAI14可有效削减AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞迁移与侵袭的能力

细胞划痕实验与基质胶小室实验结果显示,与对照组相比,RAI14可有效增加MKN-20/DDP^{AHVAC-I}细胞的迁移与侵袭能力($P<0.01$,图6A~D)。

3 讨论

胃癌是一种由胃黏膜上皮细胞恶变而引发的恶性

疾病。由于胃癌早期的症状不明显,许多患者在确诊病情时已经发展至进展期^[15]。化疗是进展期胃癌的主要治疗手段。作为进展期胃癌常用化疗药物,顺铂可通过干扰癌细胞DNA的复制与修复达到杀灭癌细胞,抑制胃癌细胞转移的效果^[16]。然而伴随着顺铂的持续使用,部分胃癌患者出现了顺铂耐药的现象^[17]。研发出能够逆转铂类化疗药物耐药或增强化疗敏感性的新药,是当前临床研究亟待突破的重要科学问题。

源于动物、植物和矿物的天然小分子化合物,被发现具有克服顺铂耐药的效果。如从大蒜中提取的硫代亚磺酸酯可诱导顺铂耐药肿瘤细胞的凋亡,抑制顺铂耐药细胞的恶性发展^[18]。蛇毒是由毒蛇的毒腺所分泌的一种毒性液体,作为天然化合物,蛇毒组分被发现具有在抗胃癌方面有良好的效应^[19-21]。但是蛇毒是否具有逆转铂类化疗药物耐药的能力,目前尚未见报道。AHVAC-I是由皖南医学院蛇毒研究所通过阴离子层析技术从皖

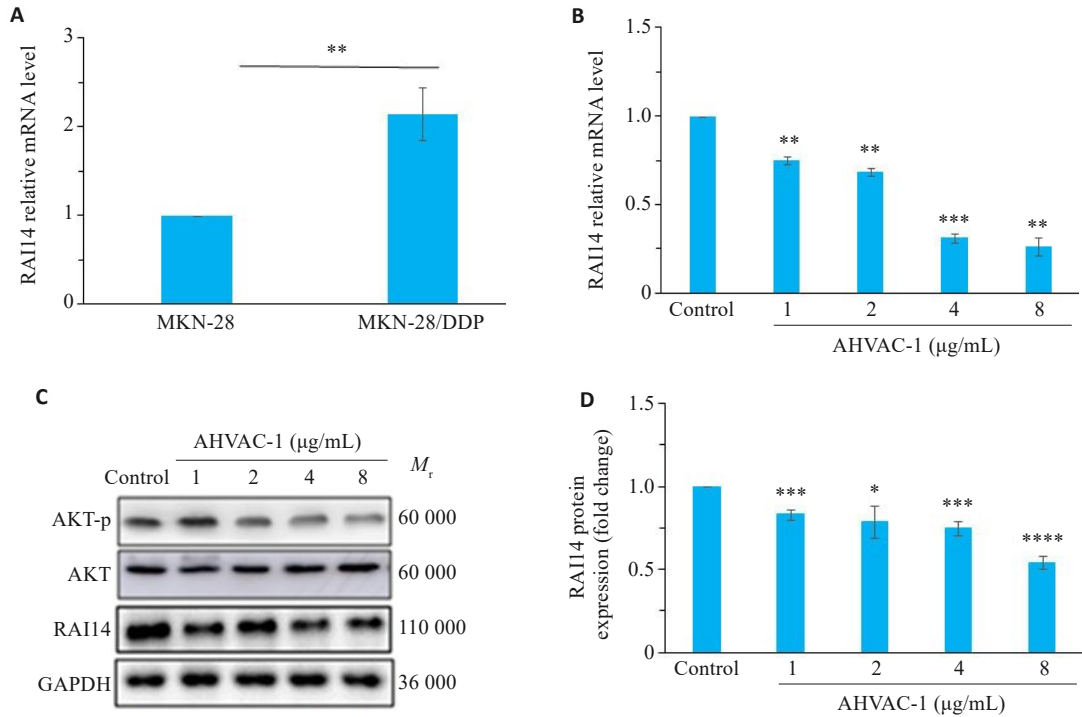


图4 AHVAC-I抑制MKN-28/DDP细胞RAI14表达

Fig. 4 AHVAC-I down-regulates RAI14 expression in MKN-28/DDP cells. **A:** qRT-PCR for detecting RAI14 mRNA expression in MKN-28 cells and MKN-28/DDP cells ($n=6$, $**P<0.01$ vs MKN-28 cells). **B:** qRT-PCR of RAI14 expression in MKN-28/DDP cells treated with different concentrations of AHVAC-I ($n=6$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs blank Control). **C:** Immunoblots of RAI14, AKT and AKT-p in MKN-28/DDP cells treated with different concentrations of AHVAC-I. **D:** Protein expression levels of RAI14 in different groups ($n=3$). $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ vs Control.

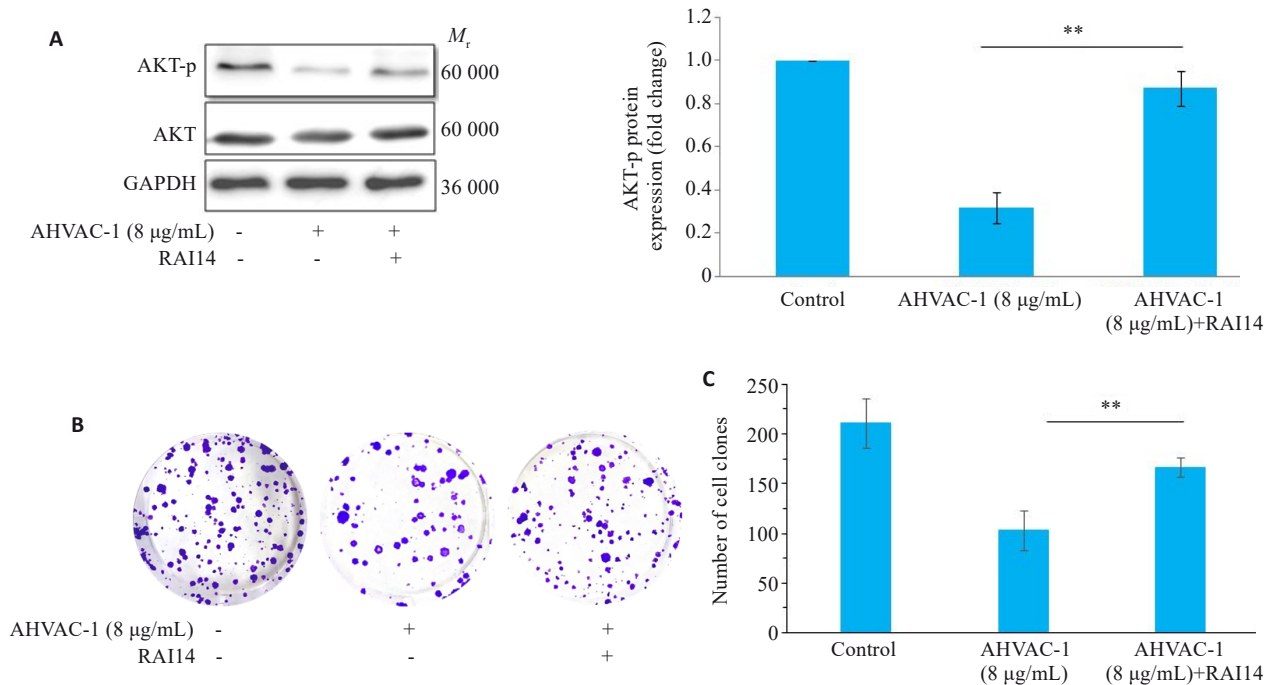
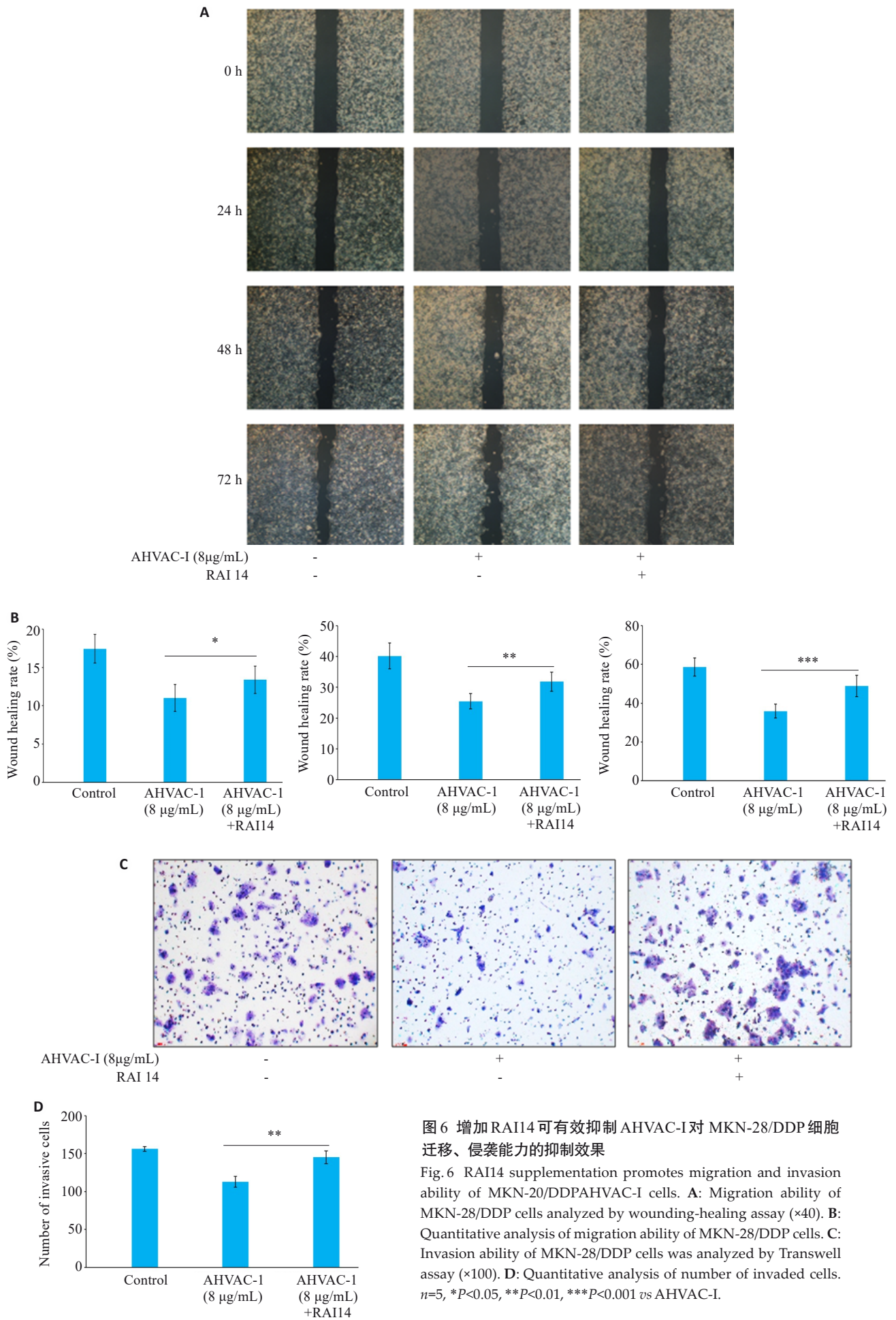


图5 增加RAI14可有效抑制AHVAC-I对MKN-28/DDP细胞增殖能力的抑制效果

Fig. 5 RAI14 supplementation promotes proliferation of AHVAC-I-treated MKN-20/DDP ($MKN-20/DDP^{AHVAC-I}$) cells. **A:** Immunoblots of AKT and AKT-p in $MKN-20/DDP^{AHVAC-I}$ cells treated with RAI14 ($n=3$). **B, C:** Colony-forming assay showing restored proliferation ability of $MKN-20/DDP^{AHVAC-I}$ cells after RAI14 treatment ($n=5$). $**P<0.01$ vs AHVAC-I.



南蝮蛇蛇毒的粗毒中分离提纯得到的抗肿瘤成分。既往研究已经发现AHVAC-I可以抑制胃癌细胞MKN-28的迁移能力^[13]。但是AHVAC-I对顺铂耐药的胃癌细胞是否依然具有抑制效应,尚不清楚。本研究实验结果表明,与对照组相比,AHVAC-I处理72 h后,MKN-28/DDP细胞无论是增殖能力,还是侵袭能力均受到显著抑制,且呈现剂量依赖效应,提示AHVAC-I具有抑制顺铂耐药胃癌细胞恶性发展的效应,有望改善顺铂耐药的胃癌患者的生存。

EMT的增强与胃癌顺铂耐药呈正相关^[22]。肿瘤细胞的EMT受多种基因的调控,其中RAI14被发现可通过Akt/Cyclin D1增强肿瘤细胞的EMT,促进肿瘤细胞的侵袭^[8]。RAI14是驱动蛋白家族的成员,有六个锚蛋白重复序列和两个螺旋结构^[23],在多种恶性肿瘤组织中异常表达^[24-27]。高表达的RAI14不仅可以通过激活STAT3,减少caspase3的活化,抑制肿瘤细胞的凋亡,提高肿瘤细胞的增殖能力^[28],还可通过上调c-MYC表达促进肿瘤细胞的迁移^[29]。新近研究发现RAI14在顺铂耐药的胃癌患者的肿瘤组织中高表达^[30],且可通过激活AKT通路诱导肿瘤细胞发生耐药^[31-33]。由此,RAI14已被认为是可以克服化疗耐药治疗恶性肿瘤的有效药物靶标^[34]。本研究结果显示,RAI14在顺铂耐药胃癌细胞MKN-28/DDP中的表达显著高于非顺铂耐药的MKN-28胃癌细胞,而AHVAC-I的处理可以显著降低RAI14在MKN-28/DDP细胞的表达及AKT的磷酸化。为进一步证实RAI14在AHVAC-I抑制MKN-28/DDP恶性发展中的重要作用,我们将RAI14补入。实验结果表明增加RAI14可显著增加了AKT磷酸化,并有效削弱AHVAC-I抑制MKN-28/DDP增殖与侵袭的效应。这一结果提示,AHVAC-I可以通过下调RAI14的表达来抑制胃癌顺铂耐药细胞的恶性进展。

综上所述,本研究通过探究AHVAC-I抑制RAI14在顺铂耐药胃癌细胞的表达,有效减弱顺铂耐药胃癌细胞MKN-28/DDP细胞的增殖、迁移与侵袭能力。这一结果揭示了AHVAC-I具有改善顺铂耐药的能力,为深入研究天然药物AHVAC-I在肿瘤临床治疗中的潜在应用奠定了坚实的实验基础。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
 [2] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10060): 2654-2664.
 [3] Cheng J, Cai M, Shuai XM, et al. First-line systemic therapy for

advanced gastric cancer: a systematic review and network meta-analysis[J]. Ther Adv Med Oncol, 2019, 11: 1758835919877726.
 [4] Lordick F, Lorenzen S, Yamada Y, et al. Optimal chemotherapy for advanced gastric cancer: is there a global consensus? [J]. Gastric Cancer, 2014, 17(2): 213-25.
 [5] Kulus M, Farzaneh M, Bryja A, et al. Phenotypic transitions the processes involved in regulation of growth and proangiogenic properties of stem cells, cancer stem cells and circulating tumor cells [J]. Stem Cell Rev Rep, 2024, 20(4): 967-79.
 [6] Wang J, Ma YZ, Guo M, et al. Salvianolic acid B suppresses EMT and apoptosis to lessen drug resistance through AKT/mTOR in gastric cancer cells[J]. Cytotechnology, 2021, 73(1): 49-61.
 [7] Gu M, Zheng W, Zhang M, et al. Downregulation of RAI14 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells[J]. J Cancer, 2019, 10(25): 6341-8.
 [8] Zhang R, Hu M, Chen HN, et al. Phenotypic heterogeneity analysis of APC-mutant colon cancer by proteomics and phosphoproteomics identifies RAI14 as a key prognostic determinant in east asians and westerners[J]. Mol Cell Proteomics, 2023, 22(5): 100532.
 [9] Gold BS, Dart RC, Barish RA. Bites of venomous snakes[J]. N Engl J Med, 2002, 347(5): 347-56.
 [10] Sasovsky DJ, Angelina E, Leiva LC, et al. Comparative *in vitro* and *in silico* analysis of the ability of basic Asp49 phospholipase A₂ and Lys49-phospholipase A₂-like myotoxins from *Bothrops diporus* venom to inhibit the metastatic potential of murine mammary tumor cells and endothelial cell tubulogenesis: Asp49 vs Lys49 phospholipases A₂: Inhibition of metastasis and angiogenesis[J]. Chem Biol Interact, 2024, 402: 111217.
 [11] Giordano G, Pancione M. MHC class III lymphocyte antigens 6 as endogenous immunotoxins: Unlocking immunotherapy in proficient mismatch repair colorectal cancer[J]. WIREs Mech Dis, 2024, 16(1): e1631.
 [12] Vyas VK, Brahmabhatt K, Bhatt H, et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2013, 3(2): 156-62.
 [13] 王晓庆, 支 慧, 胡浩然, 等. 皖南蝮蛇抑瘤组分 I 急性毒理研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2022, 43(3): 44-8.
 [14] 黄小梅, 支 慧, 陈 浩, 等. 皖南蝮蛇毒抑瘤组分- I 对胃癌MKN-28细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(3): 270-6.
 [15] Zhang C, Li D, Yu R, et al. Immune landscape of gastric carcinoma tumor microenvironment identifies a peritoneal relapse relevant immune signature[J]. Front Immunol, 2021, 12: 651033.
 [16] Kang YK, Chin K, Chung HC, et al. S-1 plus leucovorin and oxaliplatin versus S-1 plus cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer (SOLAR): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(8): 1045-56.
 [17] 皇甫娟, 张 强, 魏祯瑶, 等. 基于p53介导自噬通路探讨臭椿酮对顺铂耐药胃癌细胞株耐药性的影响[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(6): 1112-8.
 [18] Hong YS, Ham YA, Choi JH, et al. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines[J]. Exp Mol Med, 2000, 32(3): 127-34.
 [19] 鲁 珏, 徐飞鹏. 白眉蝮蛇蛇毒细胞毒素对胃癌细胞的杀伤作用及对

- 细胞超微结构的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(4): 335-7.
- [20] 鲁珏, 徐飞鹏. 白眉蝮蛇毒细胞毒素H1对实验性大鼠胃癌抑制作用的实验研究[J]. 第四军医大学学报, 2009(11): 975-7.
- [21] 韦敏, 宋慧, 班建东, 等. 神经生长因子的提取及其对MGC-803细胞的凋亡作用[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(4): 526-9.
- [22] Ebrahimi N, Manavi MS, Faghihkorasani F, et al. Harnessing function of EMT in cancer drug resistance: a metastasis regulator determines chemotherapy response[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(1): 457-79.
- [23] Kutty RK, Kutty G, Samuel W, et al. Molecular characterization and developmental expression of *NORPEG* a novel gene induced by retinoic acid[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2831-40.
- [24] Xiao Y, Zhang H, Du G, et al. RAI14 Is a Prognostic Biomarker and Correlated With Immune Cell Infiltrates in Gastric Cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*. 2020, 19: 1533033820970684.
- [25] Hawkins SM, Loomans HA, Wan YW, et al. Expression and functional pathway analysis of nuclear receptor NR2F2 in ovarian cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(7): E1152-62.
- [26] Paez AV, Pallavicini C, Schuster F, et al. Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell-cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2570.
- [27] Yuan CZ, Hu H, Kuang MY, et al. Super enhancer associated *RAI14* is a new potential biomarker in lung adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105251-61.
- [28] Wang JL, Cai Y, Luo JD, et al. RAI14 silencing suppresses progression of esophageal cancer *via* the STAT3 pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(18): 18084-98.
- [29] Xu J, Shi PF, Xia FW, et al. RAI14 promotes melanoma progression by regulating the FBXO32/c-MYC pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 12036.
- [30] Zhou J, Yong WP, Yap CS, et al. An integrative approach identified genes associated with drug response in gastric cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(4): 441-51.
- [31] O'Donnell KA, Keng VW, York B, et al. A Sleeping Beauty mutagenesis screen reveals a tumor suppressor role for Ncoa2/Src-2 in liver cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(21): E1377-86.
- [32] Ono K, Demchak B, Ideker T. Cytoscape tools for the web age: D3.js and cytoscape.js exporters[J]. *F1000Res*, 2014, 3: 143.
- [33] Tang Y, Li M, Wang JX, et al. CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67-72.
- [34] Cui RL, Zou J, Zhao Y, et al. The dual-crosslinked prospective values of RAI14 for the diagnosis and chemosurveillance in triple negative breast cancer[J]. *Ann Med*, 2023, 55(1): 820-36.

(编辑:余诗诗)