

异钩藤碱调节 EGFR/FAK 信号通路对肝癌细胞增殖、迁移和 5-FU 耐药性的影响

李海燕^{1, 2}, 栗昭生^{2, 3}, 赵 龙¹, 金春花¹, 张鼎鹏^{2, 4*}

1. 牡丹江医学院附属红旗医院 药学部, 黑龙江 牡丹江 157000

2. 牡丹江医学院 第一临床医学院, 黑龙江 牡丹江 157011

3. 牡丹江医学院附属红旗医院 神经内科, 黑龙江 牡丹江 157000

4. 牡丹江医学院附属红旗医院 普外二科, 黑龙江 牡丹江 157000

摘要: 目的 探讨异钩藤碱调节表皮生长因子受体 (EGFR)/局部黏着斑激酶 (FAK) 信号通路对肝癌细胞增殖、迁移和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐药性的影响。方法 取对数生长期的 HepG2 细胞, 分为对照组, 异钩藤碱低、中、高浓度 (32.5、65.0、130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 异钩藤碱 (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + EGFR 激活剂 NSC228155 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组; 对数生长期的 5-FU 耐药肝癌细胞系 HepG2/5-FU 分为对照组、异钩藤碱 (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、异钩藤碱 (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、异钩藤碱 (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NSC228155 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。给药处理 24 h, 对照组不给药。EdU 染色、CKK-8 检测 HepG2 或 HepG2/5-FU 细胞增殖; 划痕实验检测 HepG2 或 HepG2/5-FU 细胞迁移; Western blotting 检测细胞中细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、迁移侵袭增强因子 1 (MIEN1)、P-糖蛋白 (P-gp)、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达。结果 与对照组相比, 异钩藤碱低、中、高浓度组 EdU 阳性率、吸光度 (A_{450}) 值、划痕愈合率、CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达显著降低, 且呈浓度相关性 ($P < 0.05$); 与异钩藤碱 130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 异钩藤碱 + NSC228155 组 HepG2 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率、CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 5-FU 组 HepG2/5-FU 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率、P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与异钩藤碱组、5-FU 组相比, 异钩藤碱 + 5-FU 组 HepG2/5-FU 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率、P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与异钩藤碱 + 5-FU 组相比, 异钩藤碱 + 5-FU + NSC228155 组 HepG2/5-FU 细胞 EdU 阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率、P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白显著上调 ($P < 0.05$)。结论 异钩藤碱抑制 HepG2 细胞增殖、迁移及降低 5-FU 耐药性的机制可能与阻断 EGFR/FAK 通路有关。

关键词: 异钩藤碱; 肝癌; 表皮生长因子受体/局部黏斑激酶 (EGFR/FAK) 通路; 增殖; 迁移; 5-FU 耐药性; P-糖蛋白 (P-gp)

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 06-1267-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.011

Effects of isorhynchophylline on proliferation, migration, and 5-FU resistance of liver cancer cells by regulating EGFR/FAK signaling pathway

LI Haiyan^{1, 2}, LI Zhaosheng^{2, 3}, ZHAO Long¹, JIN Chunhua¹, ZHANG Naipeng^{2, 4}

1. Department of Pharmacy, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China

2. First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China

3. Department of Neurological Internal Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China

4. Department of Second General Surgery, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of isorhynchophylline (isorhy) on the proliferation, migration, and 5-FU resistance of liver cancer cells by regulating the epidermal growth factor receptor (EGFR)/focal adhesion kinase (FAK) signaling pathway.

收稿日期: 2024-03-14

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (2023-KYYWF-0959)

第一作者: 李海燕 (1986—), 女, 朝鲜族, 硕士, 主管药师, 主要从事药学研究。E-mail: yynd51@163.com

*通信作者: 张鼎鹏 (1982—), 男, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆肿瘤研究。E-mail: yynd51@163.com

Methods Logarithmic phase HepG2 cells were divided into control group, low, medium, and high concentration groups of isorhy (32.5, 65.0, 130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the high concentration group of isorhy (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + EGFR activator NSC228155 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Logarithmic phase 5-FU-resistant hepatocellular carcinoma cell line HepG2/5-FU was divided into control group, isorhy (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, 5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, isorhy (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and isorhy (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NSC228155 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. The cells were treated with drugs for 24 hours, and the control group was not treated. EdU staining and CCK-8 were applied to detect HepG2 or HepG2/5-FU cell proliferation. Scratch experiment was applied to detect the migration of HepG2 or HepG2/5-FU cells. Western blotting was applied to detect cyclinD1, MIEN1, P-glycoprotein (P-gp), p-EGFR, and p-FAK proteins in cells. **Results** Compared with the control group, the EdU positive rate, A_{450} value, scratch healing rate, CyclinD1, MIEN1, p-EGFR, and p-FAK protein expression of HepG2 cells in isorhy group were reduced, in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with isorhy (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, the EdU positive rate, A_{450} value, scratch healing rate, CyclinD1, MIEN1, p-EGFR, and p-FAK protein expression of HepG2 cells in isorhy (130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NSC228155 group were increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the EdU positive rate, scratch healing rate, A_{450} value, P-gp, p-EGFR, and p-FAK protein expression of HepG2/5-FU cells in the 5-FU group were reduced ($P < 0.05$). Compared with the isorhy group or 5-FU group, the EdU positive rate, A_{450} value, scratch healing rate, P-gp, p-EGFR, and p-FAK protein expression of HepG2/5-FU cells in the isorhy + 5-FU group were reduced ($P < 0.05$). Compared with the isorhy+5-FU group, the positive rate of EdU, A_{450} value, scratch healing rate, P-gp, p-EGFR, and p-FAK protein expression in HepG2/5-FU cells in the isorhy+5-FU+NSC228155 group were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Isorhy may inhibit proliferation, migration, and reduce 5-FU resistance of HepG2 cells by blocking the EGFR/FAK pathway.

Key words: isorhynchophylline; liver cancer; epidermal growth factor receptor/focal adhesion kinase (EGFR/FAK) pathway; proliferation; migration; 5-FU resistance; P-glycoprotein (P-gp)

肝癌是最常见的原发性肝恶性肿瘤类型,是世界范围内癌症相关死亡的第3大原因,易发生转移、复发且预后差^[1-4]。由于肝癌是一种隐匿的肿瘤,大多数患者确诊时已为晚期,只能接受全身治疗^[5]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是临床上常用于治疗肝癌的化疗药物,其可通过抑制胸苷酸合成酶活性以及结合DNA和RNA序列触发细胞凋亡,进而发挥抗癌作用。然而,5-FU诱导的多重耐药性通常发生在肝癌的治疗中^[6]。化疗耐药性已成为肝癌复发和转移的主要原因之一^[7]。因此,必须找到安全有效的药物来逆转化疗耐药性。异钩藤碱是一种四环吡啶氧化生物碱,具有抗增殖、抗炎等作用^[8]。已有研究报道,异钩藤碱可以抑制肝癌细胞转移、增殖及多药耐药^[9-10],但具体机制尚不完全明确。相关研究显示,表皮生长因子受体(EGFR)/局部黏着斑激酶(FAK)通路的阻断可以抑制肝癌细胞的增殖、迁移行为^[11]。异钩藤碱对肝癌细胞增殖、迁移、化疗耐药性的影响是否与调控EGFR/FAK通路有关尚不清楚。本研究拟从体外细胞水平上探究异钩藤碱对肝癌细胞行为的影响及作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌细胞系 HepG2 及 5-FU 耐药肝癌细胞系 HepG2/5-FU 购自美国 ATCC 细胞库。

1.2 试剂

异钩藤碱(四川精萃天成药科技有限公司,质量分数 98.0%,批号 20230609); EGFR 激活剂 NSC228155(美国 MCE 公司,批号 HY-101084); 5-FU(麦克林化学试剂有限公司,质量分数 99.0%,批号 20230609); EdU 细胞增殖检测试剂盒(广州复能基因有限公司,批号 A006); CCK-8 试剂盒(上海宇淳生物科技有限公司,批号 103629); 兔源一抗细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、迁移侵袭增强因子 1(MIEN1)、P-糖蛋白(P-gp)、p-EGFR、p-FAK、EGFR、GAPDH、FAK 及二抗(英国 Abcam 公司,批号依次为 ab16663、ab168086、ab261736、ab40815、ab81298、ab32198、ab8245、ab76496、ab6721)。

1.3 主要仪器

CFM-200 型荧光显微镜(日本徕卡公司); S8131X 型光学显微镜(上海斯玄检测设备有限公司); DYCP-38C 型蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组、给药

HepG2、HepG2/5-FU 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。取对数生长期的 HepG2 细胞,分为对照组,异钩藤碱低、中、高浓度(32.5、65.0、130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[9]组,异钩藤碱(130.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + EGFR 激活剂 NSC228155 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[12]组。对照组 HepG2 细胞不做任何处理,异钩藤碱与

NSC228155同时给药24 h。

将处于对数生长期的HepG2/5-FU细胞分为对照组、异钩藤碱($130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、5-FU($60\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[13]组、异钩藤碱($130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU($60\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、异钩藤碱($130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 5-FU($60\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NSC228155($2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。对照组HepG2/5-FU细胞不做任何处理,其他组药物处理24 h。

2.2 细胞增殖的EdU染色检测

将HepG2或HepG2/5-FU细胞(每孔 4×10^4 个)接种于96孔板中,按照“2.1”项操作处理完成后,加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EdU溶液在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下处理2 h。再加入Click反应液室温孵育30 min,PBS洗涤3次,细胞用DAPI($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)在室温下染色10 min,使用荧光显微镜成像。数据分析采用Image J软件。

2.3 细胞增殖的CCK-8检测

将HepG2或HepG2/5-FU细胞接种于96孔板(每孔 4×10^4 个),按照“2.1”项操作处理完成后,用 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8试剂孵育2 h后测定450 nm波长处的吸光度(A)值。

2.4 细胞迁移的划痕实验检测

将HepG2或HepG2/5-FU细胞接种于6孔板(每孔 5×10^3 个), $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养至细胞融合度 $>90\%$ 。使用 $200\ \mu\text{L}$ 移液管尖端在细胞单层上划痕1次。PBS洗涤3次后,按照“2.1”项操作处理完

成后,在0 h、24 h时用光学显微镜对细胞进行成像。

划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度

2.5 细胞中 CyclinD1、MIEN1、P-gp、p-EGFR、p-FAK蛋白表达的Western blotting检测

将各组HepG2或HepG2/5-FU细胞用RIPA缓冲液裂解并提取总蛋白,取 $40\ \mu\text{g}$ 蛋白经电泳、转膜、封闭后,在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下将膜与一抗CyclinD1(1:2 000)、MIEN1(1:2 000)、P-gp(1:3 000)、p-EGFR(1:4 000)、p-FAK(1:4 000)、GAPDH(1:5 000)、EGFR(1:3 000)、FAK(1:5 000)过夜孵育,再与二抗(1:5 000)孵育1 h。ECL试剂用于检测蛋白条带,Image J软件计算蛋白灰度值。

2.6 统计学分析

用GraphPad Prism 8.0.2进行统计分析,数据表示为 $\bar{x}\pm s$,单因素方差分析以及事后snk- q 检验用于多组比较。

3 结果

3.1 异钩藤碱对HepG2细胞增殖的影响

与对照组相比,异钩藤碱低、中、高浓度组EdU阳性率及 A_{450} 值显著降低,且呈浓度相关性($P<0.05$);与异钩藤碱 $130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,异钩藤碱+NSC228155组细胞EdU阳性率以及 A_{450} 值显著升高($P<0.05$),见图1和表1。

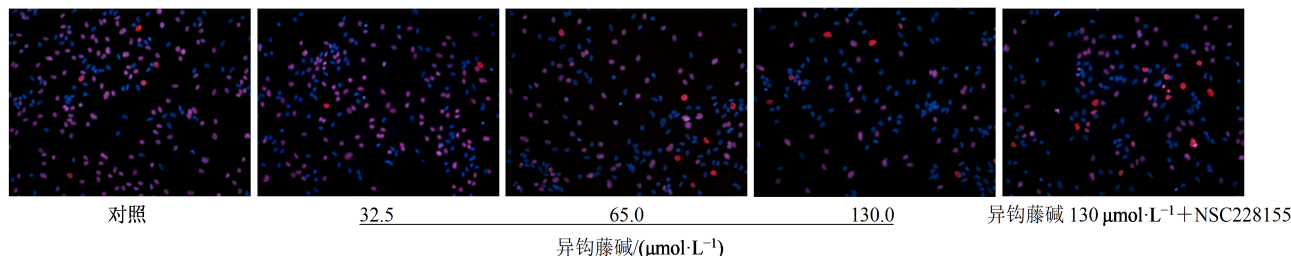


图1 HepG2细胞增殖的EdU染色检测(×400)

Fig. 1 EdU staining detection of HepG2 cell proliferation (×400)

3.2 异钩藤碱对HepG2细胞迁移的影响

与对照组相比,异钩藤碱低、中、高浓度组划痕愈合率显著降低且呈浓度相关性($P<0.05$);与异钩藤碱 $130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,异钩藤碱+NSC228155组HepG2细胞划痕愈合率显著升高($P<0.05$),见图2和表2。

3.3 异钩藤碱对HepG2细胞中MIEN1、CyclinD1蛋白及EGFR/FAK通路蛋白的影响

与对照组相比,异钩藤碱低、中、高浓度组CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK蛋白表达显著下调,且呈浓度相关性($P<0.05$);与异钩藤碱

$130\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,异钩藤碱+NSC228155组HepG2细胞中CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK蛋白表达显著升高($P<0.05$),见图3和表3。

3.4 异钩藤碱对HepG2/5-FU细胞5-FU耐药性的影响

与对照组相比,5-FU组HepG2/5-FU细胞EdU阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率显著降低($P<0.05$);与异钩藤碱组、5-FU组相比,异钩藤碱+5-FU组HepG2/5-FU细胞EdU阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率显著降低($P<0.05$);与异钩藤碱+5-FU组相比,异钩藤碱+5-FU+NSC228155组HepG2/5-FU细胞

表1 各组HepG2细胞EdU阳性率、 A_{450} 值比较($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Comparison of EdU positive rate and A_{450} value of HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	EdU 阳性率/%	A_{450} 值
对照	—	68.86 $\pm$ 3.56	1.16 $\pm$ 0.14
异钩藤碱	32.5	54.69 $\pm$ 2.67*	0.97 $\pm$ 0.07*
	65.0	43.68 $\pm$ 2.23*	0.83 $\pm$ 0.06*
	130.0	27.76 $\pm$ 1.53*	0.45 $\pm$ 0.04*
异钩藤碱+NSC228155	130.0+2	46.64 $\pm$ 2.11 [#]	0.85 $\pm$ 0.08 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与异钩藤碱 130 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs isorhynchophylline 130 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

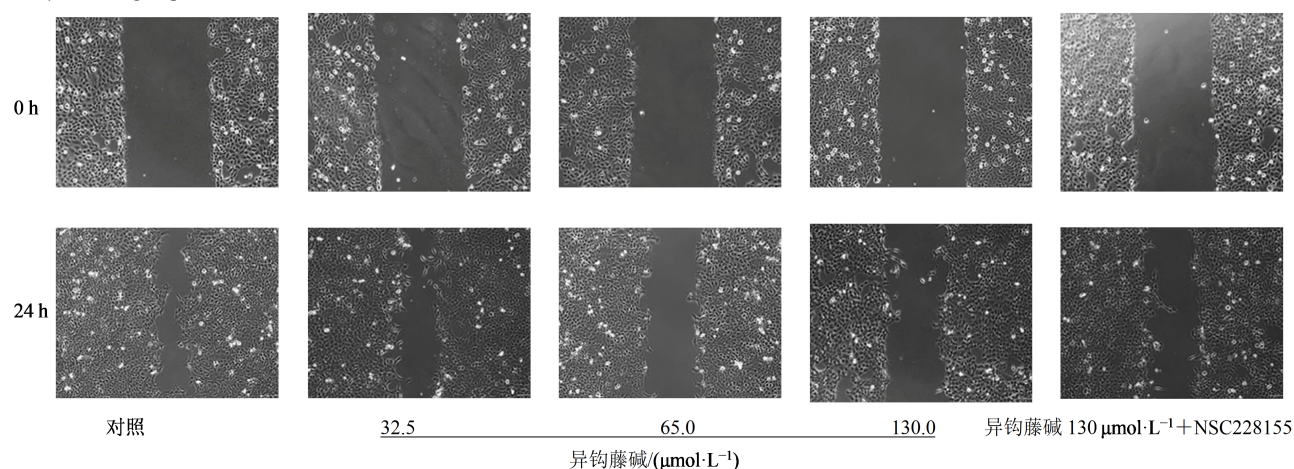


图2 HepG2细胞迁移的划痕实验检测($\times 200$)

Fig. 2 Scratch test detection of HepG2 cell migration ($\times 200$)

表2 各组HepG2细胞划痕愈合率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Comparison of scratch healing rates of HepG2 cells in all groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	划痕愈合率/%
对照	—	71.15 $\pm$ 3.69
异钩藤碱	32.5	58.88 $\pm$ 2.54*
	65.0	41.15 $\pm$ 2.36*
	130.0	25.56 $\pm$ 1.44*
异钩藤碱+NSC228155	130.0+2	43.68 $\pm$ 2.07 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与异钩藤碱 130 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs isorhynchophylline 130 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

4 讨论

近年来,尽管肝癌治疗有所改善,但由于复发风险高,预后仍然很差^[14]。此外,化疗的疗效往往受到耐药的限制^[15]。因此,对强效化疗药物的探索可为肝癌的治疗提供新的选择。

异钩藤碱具有多种生物活性,如抗增殖、抗迁移等^[16]。据报道,异钩藤碱可抑制血小板源性生长

EdU 阳性率、 A_{450} 值、划痕愈合率显著升高($P < 0.05$),见图4、5和表4。

3.5 异钩藤碱对 HepG2/5-FU 中 P-gp 蛋白及 EGFR/FAK 通路蛋白表达的影响

与对照组相比,5-FU 组 P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达下调($P < 0.05$);与异钩藤碱组、5-FU 组相比,异钩藤碱+5-FU 组 HepG2/5-FU 细胞中 P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与异钩藤碱+5-FU 组相比,异钩藤碱+5-FU+NSC228155 组 HepG2/5-FU 中 P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达上调($P < 0.05$),见图6和表5。

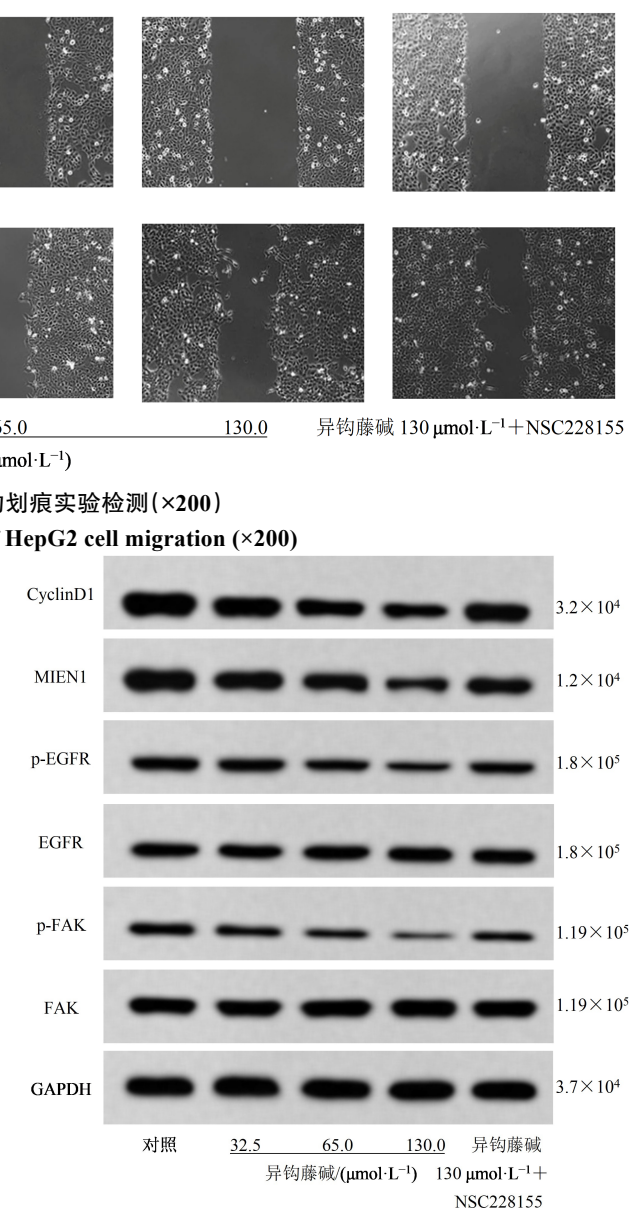


图3 HepG2细胞中CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK蛋白表达

Fig. 3 CyclinD1, MIEN1, p-EGFR and p-FAK protein expression in HepG2 cells

表 3 各组 HepG2 细胞中 CyclinD1、MIEN1、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of CyclinD1, MIEN1, p-EGFR and p-FAK protein in HepG2 cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)					
组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CyclinD1/GAPDH	MIEN1/GAPDH	p-EGFR/EGFR	p-FAK/FAK
对照	—	1.73±0.22	1.26±0.14	0.90±0.07	0.61±0.05
异钩藤碱	32.5	1.38±0.14 [*]	1.03±0.12 [*]	0.81±0.06 [*]	0.52±0.05 [*]
	65.0	1.08±0.08 [*]	0.84±0.07 [*]	0.67±0.05 [*]	0.36±0.03 [*]
	130.0	0.71±0.06 [*]	0.51±0.04 [*]	0.52±0.03 [*]	0.15±0.01 [*]
异钩藤碱+NSC228155	130.0+2	1.25±0.11 [#]	0.94±0.08 [#]	0.71±0.05 [#]	0.38±0.03 [#]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与异钩藤碱 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较:[#] $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs isorhynchophylline 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

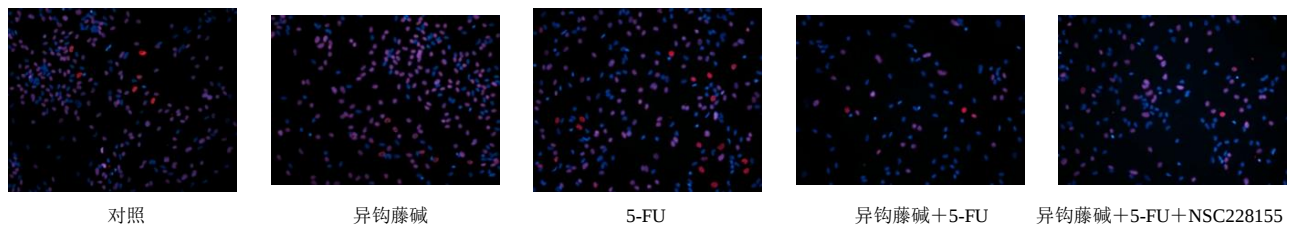


图 4 HepG2/5-FU 细胞增殖的 EdU 染色检测(×400)

Fig. 4 EdU staining detection of HepG2/5-FU cell proliferation (×400)

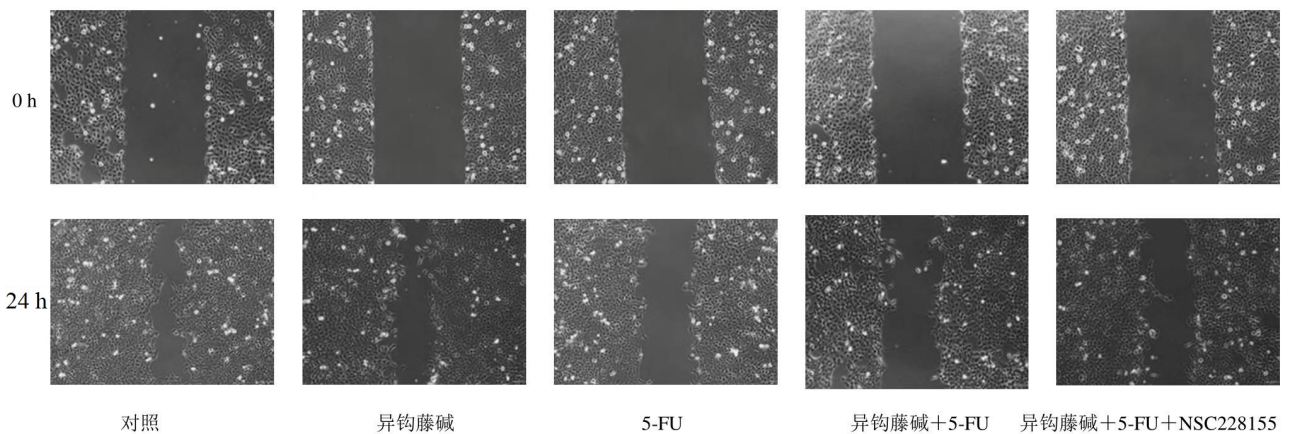


图 5 HepG2/5-FU 细胞迁移的划痕实验检测(×200)

Fig. 5 Scratch test detection of HepG2/5-FU cell migration (×200)

表 4 HepG2/5-FU 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、 A_{450} 值比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of EdU positive rate, A_{450} value and scratch healing rate of HepG2/5-FU cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)				
组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	EdU 阳性率/%	A_{450}	划痕愈合率/%
对照	—	73.36±3.78	1.21±0.13	75.16±3.69
异钩藤碱	130	71.86±2.73	1.19±0.11	73.78±2.85
5-FU	60	53.96±2.68*	0.83±0.10*	51.52±2.73*
异钩藤碱+5-FU	130+60	26.55±1.31 ^{#&}	0.46±0.05 ^{#&}	29.93±1.45 ^{#&}
异钩藤碱+5-FU+NSC228155	130+60+2	33.89±1.41 [@]	0.73±0.06 [@]	37.55±1.26 [@]

与对照组比较:^{*} $P<0.05$;与异钩藤碱组比较:[#] $P<0.05$;与 5-FU 组比较:[&] $P<0.05$;与异钩藤碱+5-FU 组比较:[@] $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs isorhynchophylline group; [&] $P<0.05$ vs 5-FU group; [@] $P<0.05$ vs isorhynchophylline+5-FU group.

因子 BB 诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖^[17]。而关于异钩藤碱对肿瘤细胞增殖影响的研究较少。本研

究显示,异钩藤碱可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移,且呈浓度相关性。另有研究表明,CyclinD1 为

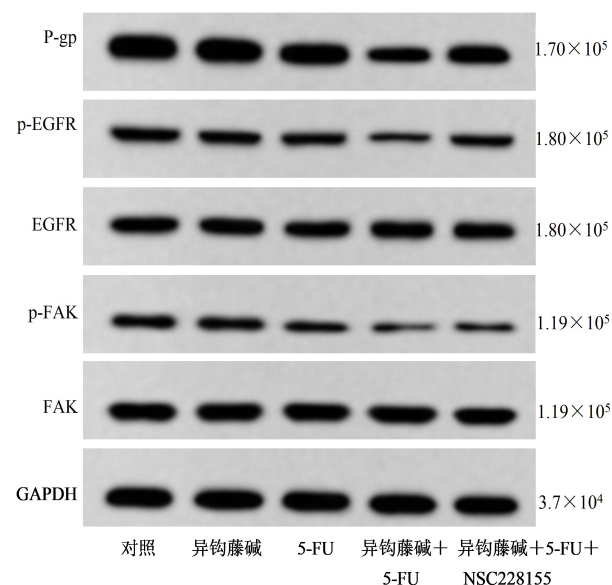


图6 HepG2/5-FU中P-gp、p-EGFR、p-FAK蛋白检测结果

Fig. 6 P-gp, p-EGFR and p-FAK protein expression in HepG2/5-FU cells

表5 各组 HepG2/5-FU 细胞中 P-gp、p-EGFR、p-FAK 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Comparison of P-gp, p-EGFR and p-FAK protein expression in HepG2/5-FU cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	P-gp/GAPDH	p-EGFR/EGFR	p-FAK/FAK
对照	—	1.87±0.16	0.92±0.08	0.69±0.05
异钩藤碱	130	1.85±0.14	0.89±0.07	0.66±0.05
5-FU	60	1.53±0.15*	0.76±0.07*	0.53±0.05*
异钩藤碱+5-FU	130+60	0.81±0.07 [#] &	0.41±0.03 [#] &	0.22±0.02 [#] &
异钩藤碱+5-FU+NSC228155	130+60+2	1.23±0.12 [@]	0.67±0.06 [@]	0.37±0.03 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与异钩藤碱组比较: [#] $P < 0.05$; 与5-FU组比较: [&] $P < 0.05$; 与异钩藤碱+5-FU组比较: [@] $P < 0.05$ 。* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs isorhynchophylline group; [&] $P < 0.05$ vs 5-FU group; [@] $P < 0.05$ vs isorhynchophylline+5-FU group.

5-FU疗效不佳,5-FU耐药性是肝癌治疗的持续临床挑战^[22]。本研究以HepG2/5-FU细胞为研究对象探究异钩藤碱($130 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对HepG2/5-FU细胞耐药性的影响,结果显示,异钩藤碱单独处理对HepG2/5-FU细胞增殖、迁移无明显影响。此外,5-FU单独处理抑制了HepG2/5-FU细胞增殖、迁移,且异钩藤碱与5-FU二者联合处理抑制HepG2/5-FU细胞增殖、迁移的效果优于5-FU单独干预,表明异钩藤碱可降低HepG2/5-FU细胞5-FU耐药性。另有研究报道,P-gp是一种膜相关的ATP依赖性转运蛋白,其可将毒素和药物等外源性物质泵出细胞,导致肿瘤细胞耐药^[23]。本研究中的异钩藤碱+5-FU组HepG2/5-FU细胞中P-gp蛋白表达低于5-FU组,再次证实了异钩藤碱对HepG2/5-FU细胞5-FU耐药性的降低作用。提示异钩藤碱可能成为降低肝癌

肿瘤增殖标志物^[18];MIEN1具有促进癌细胞迁移的特性^[19]。本研究显示,与对照组相比,异钩藤碱各浓度组HepG2细胞中CyclinD1、MIEN1蛋白下调,且呈浓度相关性,从蛋白质水平上证实了异钩藤碱对肝癌细胞增殖、迁移的抑制作用。此外,本研究划痕实验采用细胞密度为每孔 5×10^3 个,细胞起始密度小,增殖慢,可忽略药物对细胞增殖的抑制作用,进而可观察药物对细胞迁移的影响,结果显示异钩藤碱对肝癌细胞增殖、迁移具有抑制作用。同时Cyclin D1、PCNA等均为细胞增殖标志物,已有文献报道^[20-21]通过Cyclin D1蛋白来衡量细胞增殖,本研究通过EdU染色、CCK-8检测及Cyclin D1蛋白表达来衡量细胞的增殖行为,未涉及细胞凋亡,故未检测凋亡相关蛋白,后续将进行新的专题进一步深入挖掘细胞凋亡变化。

5-FU是治疗晚期肝癌的有效靶向药物之一,但越来越多的证据表明,肝癌细胞的高耐药性导致

细胞5-FU耐药性的有效药物之一。

EGFR可通过磷酸化下游靶基因FAK参与肿瘤细胞的增殖、迁移等过程^[24]。如激活EGFR/FAK通路可促进非小细胞肺癌进展^[25];抑制EGFR/FAK通路可增强食管鳞状细胞癌细胞的化疗敏感性^[26]。本研究结果与其基本一致,异钩藤碱可抑制HepG2或HepG2/5-FU细胞中p-EGFR、p-FAK蛋白表达,推测异钩藤碱抑制HepG2细胞增殖、迁移及降低5-FU耐药性的机制可能与阻断EGFR/FAK通路有关。为了验证上述推测是否与实际情况相符,本实验用异钩藤碱和EGFR激活剂NSC228155干预HepG2细胞或HepG2/5-FU细胞,结果显示,NSC228155减弱了异钩藤碱对HepG2细胞增殖、迁移的抑制作用,以及异钩藤碱和5-FU联合处理对HepG2/5-FU细胞5-FU耐药性的影响。

异钩藤碱抑制 HepG2 细胞增殖、迁移及降低 5-FU 耐药性的机制可能是通过阻断 EGFR/FAK 通路实现的,该研究可能为肝癌的治疗提供新的参考依据。此外 EGFR/FAK 信号通路是否通过调控 P-gp 参与异钩藤碱降低 HepG2 细胞 5-FU 耐药性有待进一步实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王晴晴,黄唯一,胡良昌,等. PTTG1 在肝细胞癌中的分子机制研究 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2023, 56 (4): 30-34.
Wang Q Q, Huang W Y, Hu L C, et al. Study on the molecular mechanism of PTTG1 in hepatocellular carcinoma [J]. Acta Sci Nat Univ Nankaiensis, 2023, 56 (4): 30-34.
- [2] Zhang Y C, Liang J J, Cao N D, et al. ASIC1 α up-regulates MMP-2/9 expression to enhance mobility and proliferation of liver cancer cells via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 778.
- [3] Li Z Y, Hao E W, Cao R, et al. Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. Chin Herb Med, 2022, 14 (4): 479-493.
- [4] 鲍宁,陈子超,赵春芹,等. 黄芪-莪术药对及其活性成分抗肝癌作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5101-5111.
Bao N, Chen Z c, Zhao C q, et al. Research progress on anti-hepatocellular carcinoma mechanisms of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair and its active ingredients
- [5] Yang C, Zhang H L, Zhang L M, et al. Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20 (4): 203-222.
- [6] Shi Y K, Ma J, Chen K E, et al. Konjac glucomannan enhances 5-FU-induced cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells via TLR4/PERK/CHOP signaling to induce endoplasmic reticulum stress [J]. Oncol Res, 2022, 30(4): 201-210.
- [7] Zhan M X, Ding Y F, Huang S Z, et al. Lysyl oxidase-like 3 restrains mitochondrial ferroptosis to promote liver cancer chemoresistance by stabilizing dihydroorotate dehydrogenase [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 3123.
- [8] Wang L H, Gu Z W, Li J, et al. Isorhynchophylline inhibits inflammatory responses in endothelial cells and macrophages through the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23 (1): 80.
- [9] Lee H, Baek S H, Lee J H, et al. Isorhynchophylline, a potent plant alkaloid, induces apoptotic and anti-metastatic effects in human hepatocellular carcinoma cells through the modulation of diverse cell signaling cascades [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1095.
- [10] Huang B Y, Zeng Y, Li Y J, et al. *Uncaria* alkaloids reverse ABCB1-mediated cancer multidrug resistance [J]. Int J Oncol, 2017, 51(1): 257-268.
- [11] Zhang J W, Chen Y D, Lin J, et al. Cyclovirobuxine D exerts anticancer effects by suppressing the EGFR-FAK-AKT/ERK1/2-*slug* signaling pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39 (3): 355-367.
- [12] 王丽,庞静,沈慧,等. 白藜芦醇通过 EGFR/AKT/mTOR 通路改善结直肠癌细胞伊立替康化疗耐药性 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(12): 2280-2287.
Wang L, Pang J, Shen H, et al. Resveratrol ameliorates irinotecan chemoresistance of colorectal cancer cells by down-regulating EGFR/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(12): 2280-2287.
- [13] Chen B, Xu X, Zheng K, et al. Konjac glucomannan reverses multi-drug resistance of HepG2/5-FU cells by suppressing AKT signaling and increasing p53 expression [J]. Oncol Lett, 2020, 20(3): 2105-2112.
- [14] 李赞,孙燕玲,李涛岚,等. 鸦胆子苦醇调节 cGAS-STING 信号通路对肝癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1949-1954.
Li Y, Sun Y L, Li T L, et al. Impacts of brusatol on tumor growth and immune function in hepatoma bearing mice by regulating cGAS-STING signal pathway [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(9): 1949-1954.
- [15] Khaled J, Kopsida M, Lennernäs H, et al. Drug resistance and endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma [J]. Cells, 2022, 11(4): 632.
- [16] Wu Y Y, Bian Y, Fei J, et al. Isorhynchophylline attenuates proliferation and migration of synovial fibroblasts via the FOXC1/ β -catenin axis [J]. Autoimmunity, 2023, 56(1): 2289868.
- [17] 张欣,郭海鹏,王振红,等. 异钩藤碱抑制 PDGF-BB 诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的实验研究 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2014, 52(12): 35-40.
Zhang X, Guo H P, Wang Z H, et al. Effect and mechanism of isorhynchophylline on platelet-derived growth factor(PDGF) -BB-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation [J]. J Shandong Univ Health Sci, 2014, 52(12): 35-40.
- [18] Miao Y, Wang X F, Lai Y F, et al. Targeting the

- mitochondrial calcium uniporter inhibits cancer progression and alleviates cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(1): 82.
- [19] Tripathi A K, Desai P P, Tyagi A, et al. Short peptides based on the conserved regions of MIEN1 protein exhibit anticancer activity by targeting the MIEN1 signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(3): 105680.
- [20] 贾二玲, 丁晓, 綦航. 刺槐素通过调控 LZTFL1 表达抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(4): 767-773.
- Jia E L, Ding X, Qi H. Acacetin inhibits lung cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating LZTFL1 expression [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(4): 767-773.
- [21] 王雪玉, 张一楠, 温廷婕, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 和 AMPK 信号通路探讨小槐花黄酮抑制结肠癌细胞增殖和转移作用 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(7): 1462-1471.
- Wang X Y, Zhang Y N, Wen T J, et al. Study on effect of *Desmodium caudatum* flavones inhibiting proliferation and metastasis on colon cancer cells based on Wnt/ β -catenin and AMPK signaling pathways [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(7): 1462-1471.
- [22] 马璟婷, 周杰, 李彩琳, 等. 美洲大蠊提取物体外对肝癌耐药细胞 BEL-7402/5-FU 自噬和侵袭转移的影响 [J]. *中医药信息*, 2023, 40(12): 23-28, 34.
- Ma J T, Zhou J, Li C L, et al. Effects of extracts from *Periplaneta americana* L. on autophagy, invasion and metastasis of hepatocarcinoma drug-resistant cells BEL-7402/5-FU *in vitro* [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2023, 40(12): 23-28, 34.
- [23] Skinner K T, Palkar A M, Hong A L. Genetics of ABCB1 in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(17): 4236-4255.
- [24] Tseng J C, Wang B J, Wang Y P, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses EGFR/FAK/Akt signaling, migration, and tumor growth of prostate cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154860.
- [25] Zhou J Q, Wang A Q, Cai T T, et al. Integrin $\alpha 3/\alpha 6$ and αV are implicated in ADAM15-activated FAK and EGFR signalling pathway individually and promote non-small-cell lung cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 486.
- [26] Luo Q Y, Zhou S N, Pan W T, et al. A multi-kinase inhibitor APG-2449 enhances the antitumor effect of ibrutinib in esophageal squamous cell carcinoma via EGFR/FAK pathway inhibition [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 183: 114318.

[责任编辑 兰新新]