

【 实验研究 】

基于多途径协同的砂生槐总生物碱抗肝癌作用及机制研究

程雅青¹, 孔宪梅^{1#}, 娘加先², 王丽娟², 章 勇³, 陈永娟¹, 张发斌^{1*}, 胡春晖^{4*}

1. 青海大学 医学院公共卫生系, 青海 西宁 810001

2. 青海省藏医院, 青海 西宁 810001

3. 青海大学 临床医学院, 青海 西宁 810001

4. 青海大学 药学院, 青海 西宁 810001

摘要:目的 探究砂生槐总生物碱(TA-SM)体内、体外抗肝细胞癌的作用及作用机制。方法 体外实验以 HepG2 和 Huh-7 细胞为研究对象, 采用 CCK-8 法、克隆形成实验、细胞划痕实验、侵袭实验和流式细胞术评价 TA-SM 对 2 种肝癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡和细胞周期进程的影响; 随后运用蛋白质组学数据依赖采集(DIA)检测技术和分子对接技术等生物信息学分析手段, 探究 TA-SM 对 HepG2 细胞内蛋白表达水平的影响并探讨可能的信号通路; 应用 Western blotting 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验验证 TA-SM 对 Hippo 通路关键靶点蛋白——含 WW 域转录调节蛋白 1(WWTR1)、转录增强因子 4(TEAD4)、丝氨酸/苏氨酸激酶 25(STK25)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 38(STK38L)的影响。采用裸鼠建立 HepG2 细胞的人源肿瘤细胞系异种移植(CDX)模型, 血常规、生化指标、主要脏器病理检测评估 TA-SM(50 mg·kg⁻¹)体内抗肿瘤的安全性; 记录裸鼠体质量、肿瘤体积、肿瘤质量变化; Western blotting、qRT-PCR、免疫组化、免疫荧光法检测肿瘤组织 WWTR1、TEAD4、STK25、STK38L 表达变化; 免疫组化和免疫荧光检测肿瘤组织 CD31、CD34、血管内皮生长因子(VEGF)表达变化; 免疫荧光检测细胞增殖抗原(Ki67)表达变化。**结果** TA-SM 通过浓度和时间相关方式抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖、迁移及侵袭, 还可以通过阻滞 HepG2 的 G₁、G₂ 期和 Huh-7 细胞的 G₂ 期, 诱导细胞凋亡(P<0.05、0.01、0.001)。蛋白质组学结果显示, TA-SM 作用于 HepG2 细胞与 TNF 信号通路、Hippo 信号通路、p53 信号通路相关。分子对接结果显示 TA-SM 中 4 种主要生物碱(苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和槐定碱)与 Hippo 通路关键靶点(TK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4)的亲合力较好, 具有很强的结合活性。与对照组比较, TA-SM 在体外显著上调 STK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4 蛋白和基因表达(P<0.05、0.01、0.001)。在裸鼠 CDX 模型中, TA-SM 抗肿瘤安全性良好; 与对照组比较, 肿瘤体积显著降低(P<0.001), STK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4 表达显著升高, CD31、CD34、VEGF、Ki67 表达显著降低(P<0.05、0.01、0.001)。**结论** TA-SM 通过激活 Hippo 信号通路, 抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并诱导细胞凋亡。此外, TA-SM 还能协同阻滞 HepG2 和 Huh-7 细胞周期, 抑制新生血管生成相关因子以及肿瘤增殖因子的表达, 从多途径发挥其抗肝癌作用。

关键词: 砂生槐总生物碱; Hippo 信号通路; 多途径协同抗癌; 人源肿瘤细胞系异种移植; 血管内皮生长因子; 细胞增殖抗原
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)04-1110-20

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.003

Evaluation of anti-hepatocellular carcinoma effect and mechanism of action of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* indicus based on multi-pathway synergistic effects

CHENG Yaqing¹, KONG Xianmei¹, NIANG Jiaxian², WANG Lijuan², ZHANG Yong³, CHEN Yongjuan¹, ZHANG Fabin¹, HU Chunhui⁴

收稿日期: 2025-10-31

基金项目: 青海省科学技术厅资助(2025-ZJ-965J)

作者简介: 程雅青(1998—), 女, 公共卫生硕士研究生, 研究方向为慢性病防治。

#共同第一作者: 孔宪梅(1998—), 女, 公共卫生硕士, 研究方向为慢性病防治。

*通信作者: 张发斌(1970—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为慢性病防治与地方病研究。E-mail: FB.Zqhmcfb@126.com

胡春晖(1984—), 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 研究方向为物理药剂。E-mail: CH.H.chunhuihu@qhu.edu.cn

1. Department of Public Health, Qinghai University, Xining 810001, China
2. Qinghai Provincial Tibetan Hospital, Xining 810001, China
3. School of Clinical Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China
4. School of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract: Objective To investigate the *in vivo* and *in vitro* anti-hepatocellular carcinoma effects and mechanisms of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* (TA-SM). **Methods** *In vitro* experiments were conducted using HepG2 and Huh-7 cells as the research subjects. The effects of TA-SM on the proliferation, migration, invasion, apoptosis and cell cycle progression of the two liver cancer cell lines were evaluated by CCK8 assay, colony formation assay, cell scratch assay, invasion assay and flow cytometry. Subsequently, proteomics data-dependent acquisition (DIA) detection technology and molecular docking technology and other bioinformatics analysis methods were used to explore the effects of TA-SM on the protein expression levels in HepG2 cells and to discuss the possible signaling pathways. Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) experiments were used to verify the effects of TA-SM on the key target proteins of the Hippo pathway - WWTR1, TEAD4, STK25, and STK38L. A human tumor cell line xenograft (CDX) model of HepG2 cells was established in nude mice. The safety of TA-SM ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) *in vivo* was evaluated by blood routine, biochemical indicators, and pathological examination of major organs. The changes in body weight, tumor volume, and tumor mass of nude mice were recorded. Western blotting, qRT-PCR, immunohistochemistry, and immunofluorescence were used to detect the expression changes of WWTR1, TEAD4, STK25, and STK38L in tumor tissues. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to detect the expression changes of CD31, CD34, vascular endothelial growth factor (VEGF), and tumor proliferation antigen (Ki67) in tumor tissues. **Results** TA-SM inhibited the proliferation, migration, and invasion of HepG2 and Huh-7 cells in a concentration- and time-dependent manner. It also induced cell apoptosis by blocking the G₁ and G₂ phases of HepG2 cells and the G₂ phase of Huh-7 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Proteomics results showed that TA-SM acted on HepG2 cells and was related to the TNF signaling pathway, Hippo signaling pathway, and p53 signaling pathway. Molecular docking results showed that the four main alkaloids in TA-SM (matrine, oxymatrine, sophoridine, and sophoramine) had good affinity with the key targets of the Hippo pathway (STK25, STK38L, WWTR1, and TEAD4) and had strong binding activity. Compared with the control group, TA-SM significantly upregulated the protein and gene expression of STK25, STK38L, WWTR1, and TEAD4 *in vitro* ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In the nude mouse CDX model, TA-SM had good anti-tumor safety. Compared with the control group, the tumor volume was significantly reduced ($P < 0.001$), and the expression of STK25, STK38L, WWTR1, and TEAD4 was significantly increased, while the expression of CD31, CD34, VEGF, and Ki67 was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** TA-SM inhibits the proliferation, migration, and invasion of HepG2 and Huh-7 cells by activating the Hippo signaling pathway and inducing apoptosis. It also synergistically disrupts the cell cycle in both cell lines and suppresses the expression of tumor proliferation and angiogenesis-related factors. These findings suggest that TA-SM exerts anti-hepatocellular carcinoma effects through multiple, complementary mechanisms.

Key words: total alkaloids of *Sophora moorcroftiana*; Hippo signaling pathway; multi-pathway synergistic anti-cancer; xenograft of human tumor cell lines; vascular endothelial growth factor; Ki67

肝细胞癌因其高致死率位居癌症相关死亡原因的第 3 位^[1], 具有起病隐匿、复发率高、预后不良等特点^[2-3]。由于我国人口基数相对较大, 肝细胞癌生存率极低 (12.1%)^[4], 中国肝细胞癌负担贡献了全球负担的近一半^[5], 且在肝细胞癌确诊初期阶段, 仅有不足 3 成病例符合根治性干预指征^[6]。目前, 肝细胞癌的治疗方法以系统抗肿瘤治疗为主, 如肝切除术、肝移植术、化疗和放疗等^[7], 此方法具有控制疾病进展及延长病人生存时间的优势^[8]。但在中国, 超过 50% 的肝细胞癌患者在初诊时已处于中、晚期阶段^[9-10], 因此化疗成为其主要治疗

手段, 但这常常导致严重的不良反应, 复发转移率较高。

天然活性物质在抗肿瘤方面作用显著, 具有活性强、低毒、安全性好等优势^[11], 而且天然产物与其他药物相比表现出多组分、多通道、多靶点的药理作用^[12], 具有良好的应用前景和研究价值^[13]。中国 2024 年发布的《原发性肝癌诊疗指南》已将中药干预纳入规范化治疗体系^[14-16]。大量研究表明, 部分植物药及其复方对肝细胞癌具有显著的抑制作用, 能够通过多种机制如调节肿瘤微环境、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制转移等^[17]

干预肝癌的发生与发展。另外,植物药还在降低不良反应、增强免疫力等方面表现出独特优势^[18]。

砂生槐系豆科槐属植物,主要分布于中国的西藏拉萨、日喀则等地,具有极强的防风固沙、保持水土功能。砂生槐种子中提取得到的砂生槐总生物碱(TA-SM)作为其主要活性物质,具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫等多种作用^[19-20],可治疗肝癌^[21]、肺癌^[22]、结肠癌^[23]、以及消化不良^[24]等,是一种极为宝贵的药用植物资源。本课题组前期已构建了TA-SM成分的HPLC-DAD定量分析体系,成功实现其中4类特征性生物碱的同步分离、鉴定,包括苦参碱(MT)、氧化苦参碱(OMT)、槐果碱(SPC)及槐定碱(SPD);然后对其提取工艺进行了优化^[25],并建立了4种生物碱的体内含量检测方法^[26]。有研究发现,MT对多种肿瘤细胞均有抑制作用,且所用MT浓度低于化疗药物浓度^[27],诱导肝癌细胞凋亡^[28]。OMT被广泛用于治疗病毒性肝炎^[29-30],还可以通过限制促炎细胞因子的表达来减轻肝纤维化^[31]。SPC可协同增强体内外奥沙利铂抑制大肠癌肝转移^[32],也具有抗肿瘤特性^[33]。而SPD也早在2005年就被中国食品药品监督管理局(CFDA)批准用来防治各种不良恶性肿瘤^[34],如抑制乐伐替尼耐药性肝细胞癌的进展^[35],且对正常的非致瘤细胞无毒^[36]。课题组前期研究还发现,TA-SM抗新生血管生成的效果远优于阳性对照索拉非尼^[37]。

然而,关于TA-SM治疗肝细胞癌的作用机制几乎未见报道。因此,本研究首先通过体外实验证明TA-SM对肝细胞癌的治疗效果,随后采用数据依赖采集(DIA)蛋白质组学技术揭示了TA-SM治疗肝细胞癌的潜在关键靶点及信号通路。通过分子对接技术进行验证,并结合体内、体外实验进一步证实了相关信号通路,为肝细胞癌的治疗提供新的理论依据和实践指导。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

砂生槐种子购自西藏林芝地区,经青海大学医学院药学系杨仕斌副教授鉴定,确认为豆科槐属植物砂生槐 *Sophora moorcroftiana* (Benrh.) Baker. 的干燥种子^[38]。

索拉非尼(SOR,批号20230607,质量分数98%)购自北京偶合科技有限公司;DMEM培养基(货号PM150210)、胰酶(货号PB180225)、胎牛血清(FBS,货号164210-50)、青霉素-链霉素溶液

(批号WH0022P299)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS,1×)(货号PB180327)、二甲基亚砜(货号D8371)购自北京索莱宝科技有限公司;CCK8试剂盒(货号E-CK-A362)、细胞周期试剂盒(货号E-CK-A351)、细胞凋亡试剂盒(货号E-CK-A211)购自伊莱瑞特生物科技股份有限公司;异丙醇(CAS号67-63-0)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;氯仿(CAS号67-66-3)购自河北一品制药股份有限公司;Modified Trypsin蛋白酶(质谱级,货号YJ-O-002)购自引加生物医药科技有限公司;考马斯亮蓝快速染色液(产品编号P0017B)、预染蛋白Marker(货号26617)购自碧云天生物技术有限公司;氨水(CAS号1336-21-6)购自Sigma公司;蛋白酶抑制剂(目录号B14002)购自美国Selleck公司;Pierce™ BCA Protein Assay Kit(货号23225)、无酶水(货号G4700-500ML)、乙腈(CAS号75-05-8)、甲酸(CAS号64-18-6)、甲醇(CAS号67-56-1)、异丙醇(CAS号67-63-0),LC/MS级,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;含WW域转录调节蛋白1(WWTR1)抗体(货号23306-1-AP)、转录增强因子4(TEAD4)抗体(货号12418-1-AP)、丝氨酸/苏氨酸激酶25(STK25)抗体(货号25821-1-AP)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶38(STK38L)抗体(货号12697-1-AP)、细胞增殖抗原(Ki67)抗体、血管内皮生长因子(VEGF)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;基质胶(2027002)购自碧迪医疗器械有限公司;山羊抗兔IgG(abcam公司,货号ab6721)

1.2 细胞及动物

人肝癌细胞(HepG2和Huh-7)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。将细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的DMEM高糖基础培养基中,培养于含5%二氧化碳、37℃的湿润环境。

SPF级Balb/c雌性裸鼠18只,4周龄,体质量为(10.30±2.60)g,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2020-0009,伦理学审查批号PJ-202502-14。所有裸鼠饲养于中国科学院西北高原生物研究所SPF级实验室。

1.3 主要仪器

罗氏实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪LightCycler 480仪II 96孔,购自上海达迈生物科技有限公司。

2 方法

2.1 TA-SM 的制备

将砂生槐子样品粉碎后过 3 号筛,称取粉末 0.5 g,精密称定,置于 200 mL 蒸馏烧瓶中,加入乙醇(用氨水调节 pH 值至 10)并用玻璃棒搅拌混匀。通过“回流提取-旋转蒸发”的方法,得到 TA-SM 浸膏,接着用 0.9%氯化钠(NaCl)溶液稀释成水剂,具体方法见本课题组前期报道^[26,39]。通过高效液相色谱(HPLC)法^[39]测定了 TA-SM 中 4 种主要生物碱的含量,OMT、SPC、SPD、MT 生物碱的质量分数分别为 59.37、0.99、0.26、15.35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞增殖实验 将 HepG2 和 Huh-7 细胞以每孔 5.0×10^3 个接种于 96 孔板中孵育 24 h,待细胞贴壁后加入不同浓度梯度(1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 TA-SM,对照组不加药,空白组不接种细胞。继续孵育 24 h 后每孔加 10 μL CCK-8 试剂,在避光环境下孵育 1 h 后立即用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.2 克隆形成实验 将细胞密度调整为 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 后培养在 60 mm 培养皿中,每个培养皿中只加入 1 mL 细胞悬液,待肉眼可见白色克隆形成时,实验组中加入含 TA-SM 的完全培养基(HepG2 细胞: 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Huh-7 细胞: 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),对照组则补充等体积完全培养基。继续培养 7~14 d,期间每 3 天换液,并密切观察细胞状态。培养结束后,用 4%的多聚甲醛固定细胞 15~30 min,随后用结晶紫染色 20~30 min,最后用大量 PBS 冲洗掉多余的染液,对所得菌落进行成像和计数。

2.2.3 细胞划痕实验 将 HepG2 和 Huh-7 细胞按每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中,当单层细胞达到 90%汇合时,采用 200 μL 无菌枪头进行机械划痕(每孔 3 条平行划痕),间隔 1 cm,然后用 PBS 洗涤 2 次。每种细胞按不同药物质量浓度加药(HepG2 细胞: 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Huh-7 细胞: 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),随后继续培养,在 0、24、48 h 采集划痕图像,用 Image J 分析数据。

迁移率 = (初始划痕面积 - t 时间划痕面积) / 初始划痕面积

2.2.4 Transwell 侵袭实验 将生长状态良好的 HepG2 和 Huh-7 细胞用无血清培养基进行饥饿化处

理 24 h。将预冷的 Matrigel 胶按 1:40 的比例稀释,并在每孔中加入 40 μL 。随后,将 Transwell 板放入培养箱中静置 30 min,使 Matrigel 胶凝固。待 Matrigel 胶完全凝固后,分别吸取 200 μL 密度为 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 且不含血清的 HepG2 和 Huh-7 细胞悬液,置于上层孔室中,下层孔室中则加入 200 μL 含 20%血清的培养基。待细胞贴壁后,分别在底部小室中填充含有不同质量浓度 TA-SM (HepG2 细胞: 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Huh-7 细胞: 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的培养基,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h 后终止培养。使用 PBS 清洗 3 次,用无菌棉拭子机械去除微孔膜上表面未迁移的细胞,随后用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。再用 PBS 冲洗后,将膜转移至 0.1%结晶紫溶液中染色 30 min,并进行拍照记录迁移细胞的数量。

2.2.5 细胞凋亡实验 将 HepG2 和 Huh-7 细胞以 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别接种于 60 mm 培养皿,待细胞汇合度达 60%~70%时,用不同浓度 TA-SM (HepG2 细胞: 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Huh-7 细胞: 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行干预。24 h 后收集细胞样本,并按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒的说明进行染色,最后通过流式细胞术进行分析。

2.2.6 细胞周期实验 细胞接种及给药操作同“2.2.6”项,给药后 24 h 后收集细胞。随后用预冷 PBS 冲洗 2 次,离心重悬后加入 75%乙醇混匀,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜。根据细胞周期检测试剂盒的操作步骤,利用流式细胞术进行分析。

2.2.7 高分辨质谱数据非依赖型采集(DIA)蛋白质组学检测 取生长状态良好的 HepG2 细胞,以 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 T75 细胞培养瓶中,在汇合度达到 70%~80%时,对照组只进行换液处理,而实验组在换液后加入质量浓度为 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TA-SM,继续培养 24 h。用 PBS 清洗 1~2 遍,轻轻刮下细胞并置于 EP 管内。加入细胞裂解缓冲液,在冰上静置 5 min 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液测定蛋白浓度,并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用过滤器辅助样品制备法对获得的肽段进行洗脱、定量^[40]。将真空冷冻干燥后的肽段用 0.1%甲酸复溶,再进行 LC-MS 分析,采集数据,运用 Spectronaut 软件对 DIA 数据进行分析,并进行后续的蛋白质定量,蛋白质组学测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司协助完成,具体实验步骤参考文献^[6,41-44]。随后利用 DAVID 数据库 (<https://david>。

ncifcrf.gov/) 对差异表达基因进行生物信息学分析, 包括基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。

2.2.8 分子对接 将 TA-SM 的 4 种生物碱成分与筛选出的信号通路中关键节点蛋白进行分子对接。从 Pubchem 数据库中获得各生物碱成分的 3D 结构的 MOL 文件, 并通过 Openbabel 软件转换为 PDB 格式。通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取通路核心靶点的蛋白晶体结构的 PDB 文件 (分辨率 <math>< 2.5^\circ</math>), 并使用 PyMOL 软件对靶蛋白进行预处理, 包括去除结合配体、剔除水分子及加氢操作^[45]。采用 AutoDockTools1.5.7 将蛋白文件转换为 PDBQT 格式, 通过比对原始配体结合模式, 设置对接参数, 筛选出与活性成分结合自由能最低的复合物构象。基于结果判断配体与受体的结合能力: 若结合能 $\leq 0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 证明二者之间可以自发结合; 若结合能 $\leq -20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 证明二者之间的衔接性较好; 若结合能 $\leq -7.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明此物质与关键靶点蛋白有很强的结合活性。运用 PyMOL 软件将对接结果进行可视化。

2.2.9 Western blotting 法 细胞接种及给药操作同“2.2.6”项, 给药后 24 h 后收集细胞。使用 RIPA Lysis Buffer (含 1% PMSF) 提取总蛋白, 并利用 BCA 法对蛋白浓度进行定量。随后通过电泳将目标蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后暴露于一抗, 包括 STK25 (1:6000)、STK38L (1:1500)、WWTR1 (1:6000)、TEAD4 (1:4000) 和 GAPDH (1:40000), 随后将其置于 4 °C 的环境中过夜孵育。次日, 先将 PVDF 膜置于 1×TBST 溶液中清洗, 然后孵育二抗即羊抗兔 IgG-HRP (1:10000) 1 h 后再洗膜 5 次, 共 30 min。使用曝光仪捕获化学发光反应, 用 Image J 对各蛋白条带灰度值进行分析。

2.2.10 qRT-PCR 实验 细胞接种及给药操作同“2.2.6”项, 给药后 24 h 后收集细胞。加入 RNAiso Plus, 室温静置 5 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将上清移至无酶 EP 管中。随后加入与上清等体积氯仿, 混匀后在室温下静置 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。将上层水相移至新的 EP 管中, 加入等体积的异丙醇沉淀 RNA, 然后在 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min。弃去上清液, 用 75% 乙醇洗涤 RNA 2 次后, 在 4 °C 下以 7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃去上清液, 待自然风干后溶解于无酶水中获得总

RNA。使用逆转录试剂盒逆转录成 DNA。最后, 使用 Roche 96 PCR 仪器进行检测。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
STK25	F-5'-GCTCTGAGGACTCTGACATTGATGG-3'
	R-5'-TGCATGCCGCTCTGCTTGTGCTTCTC-3'
STK38L	F-5'-AATGACGGCAGGGACTACAACAAC-3'
	R-5'-TCTGGACCAACCGCACCTCTC-3'
WWTR1	F-5'-TGACCGACGAGCTGCCACTG-3'
	R-5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTGAG-3'
TEAD4	F-5'-CTGGATGTTGGAGTTCTCTGCCTTC-3'
	R-5'-CCACCACCTGCTTGCCGAAAG-3'
GAPDH	F-5'-CGGGAAACTGTGGCGTGAT-3'
	R-5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'

2.3 动物实验

2.3.1 人源肿瘤细胞系异种移植 (CDX) 模型的建立 当 HepG2 肝癌细胞密度达 5.0×10^7 个·mL⁻¹ 时, 在冰浴环境中, 将基质胶与 HepG2 细胞悬液按 1:1 体积比快速混匀, 制备成复合物。通过 sc 方式将复合物注入裸鼠皮下, 注射体积为每只 100 μL (含 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞)。

2.3.2 分组及给药 当肿瘤体积达到 100 mm³ 后^[46-47], 将裸鼠根据随机数字表法随机分为模型组 (给予 0.9% NaCl 溶液)、SOR (50 mg·kg⁻¹) 组^[48]、TA-SM (50 mg·kg⁻¹) 组^[49], 每组 6 只, 每 2 天 ig 给药 1 次。

2.3.3 裸鼠肿瘤检测 实验期间每日监测裸鼠生存状态, 隔日记录裸鼠体质量和肿瘤体积变化。造模第 20 天, 对裸鼠实施安乐死, 分离肿瘤并拍照、称质量、计算肿瘤体积。

$$V = 0.5 \times a \times b^2$$

V 为肿瘤体积; a 为肿瘤长径; b 为肿瘤短径。

2.3.4 血常规、生化指标、主要脏器病理检测 麻醉裸鼠后, 采用心脏穿刺法采集血液样本。血液样本静置 30 min 后, 在 4 °C 条件下, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液并贮存于 -80 °C 冰箱备用。检测血常规指标 [中性粒细胞百分比 (NEU)、白细胞 (WBC)、淋巴细胞百分比 (LYM)、嗜酸性粒细胞百分比 (Eos)、嗜碱性粒细胞百分比 (Bas)、中性粒细胞绝对值 (NEUT)、淋巴细胞绝对值 (LY)、嗜酸性粒细胞绝对值 (EO)、嗜碱性粒细胞绝对值 (BASO)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HB)、血

血小板计数 (PLT)] 及血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、总胆汁酸 (TBA)、 γ -谷氨酰转移酶 (GGT)、尿素 (UREA)、肌酐 (CREA) 和尿酸 (UA) 的水平。所有指标的检测工作由成都里来生物科技有限公司协助完成。苏木精-伊红 (HE) 染色观察心脏、肝脏、脾脏、肺部、肾脏病理变化。

2.3.5 肿瘤免疫组织化学 将石蜡包埋的组织标本切片, 然后将切片与一抗 (Ki67、CD31、CD34、STK25、STK38L、WWTR1、TEAD4) 在 4 °C 下孵育过夜, 然后与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 在 37 °C 下孵育 50 min。使用二氨基联苯胺 (DAB) 溶液显色, 复染细胞核, 脱蜡封片后进行镜检。

2.3.6 肿瘤免疫荧光染色 将肿瘤组织的石蜡切片脱水处理后进行抗原修复, 然后在切片上标记特定区域, 加入自发荧光淬灭剂作用 5 min 后进行通透和封闭处理。随后加入一抗, 在 4 °C 条件下孵育过夜; 再加入二抗, 共孵育 50 min。随后使用 DAPI 复染细胞核, 封片, 镜检, 拍照。

2.3.7 Western blotting 法 肿瘤组织总蛋白使用 RIPA Lysis Buffer (含 1% PMSF) 提取, 并利用 BCA 法对蛋白浓度进行定量。Western blotting 实验具体操作同“2.2.10”项。

2.3.8 qRT-PCR 实验 肿瘤组织 mRNA 提取及 qRT-PCR 实验具体操作同“2.2.11”项。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 28.0 和 GraphPad Prism10.1.2 软件进行统计分析, 对于正态分布的连续变量, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。对于非正态分布数据, 使用 Mann-Whitney 或 Kruskal-Wallis 检验确定各组之间的显著差异。

3 结果

3.1 TA-SM 体外影响 HepG2 和 Huh-7 细胞的生物学行为

3.1.1 TA-SM 体外抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭 采用 CCK-8 法探讨 TA-SM 对 2 种人源性肝细胞癌细胞系 (HepG2 和 Huh-7) 增殖能力的影响。结果显示 TA-SM 对细胞活力的影响具有剂量相关性 (图 1-A), TA-SM 对 HepG2 和 Huh-7 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 7.37、4.81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, TA-SM 对 Huh-7 的抑制效果优

于 HepG2。后续实验中选择 TA-SM 作用于 HepG2 和 Huh-7 的质量浓度分别为 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

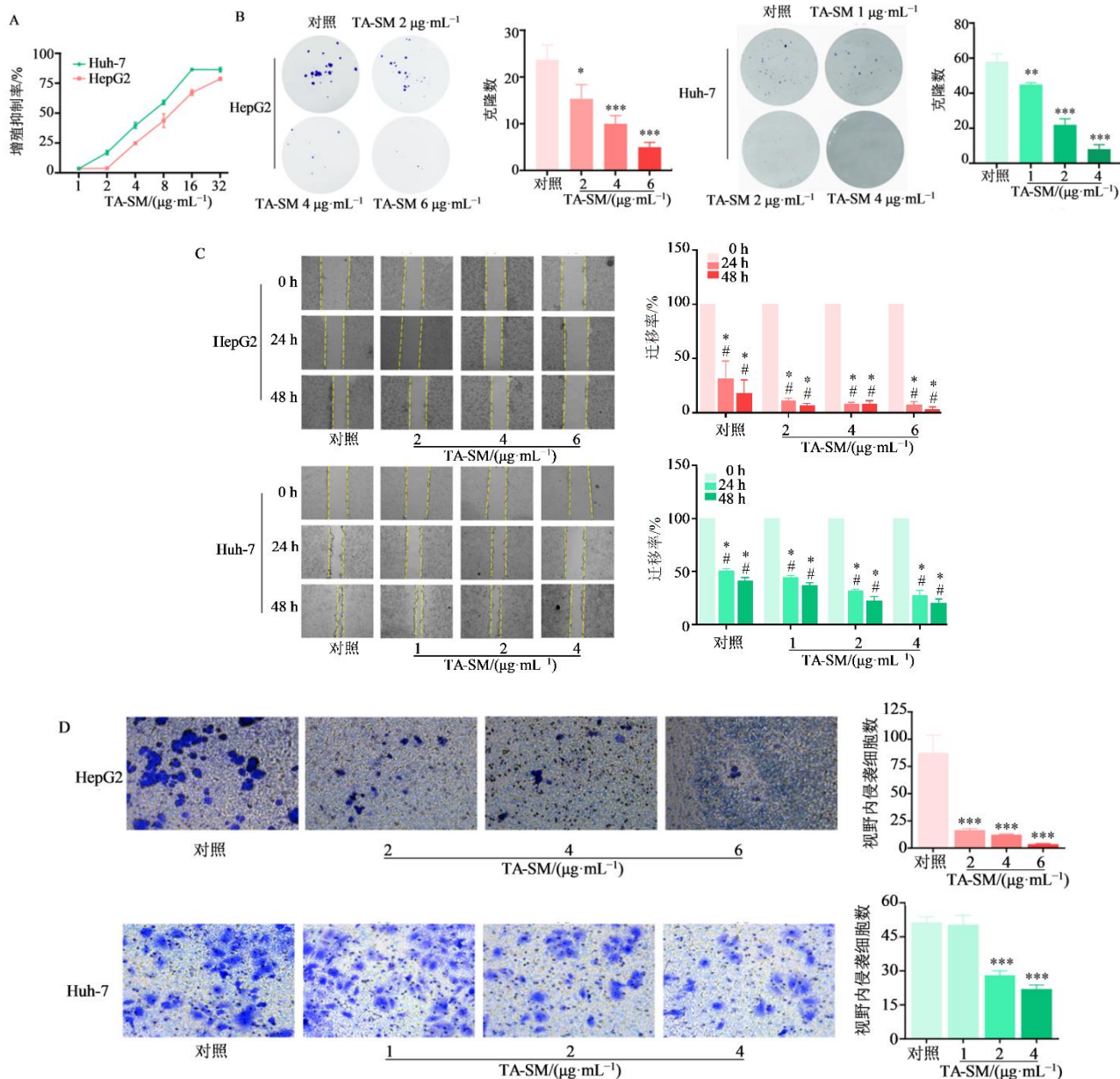
为进一步评估 TA-SM 对细胞增殖能力的影响, 进行了集落形成实验。与对照组相比, HepG2 和 Huh-7 的克隆形成数目均随着 TA-SM 质量浓度的增加而减少 (图 1-B), 证明 TA-SM 抑制 2 种细胞增殖的能力呈现浓度相关性, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

为了评估 TA-SM 对细胞迁移能力的影响, 进行细胞划痕实验 (图 1-C)。与对照组相比, 不同质量浓度 TA-SM 干预 HepG2 细胞后, 在 24、48 h 对应时间段内细胞的迁移率显著降低 ($P < 0.05$); 干预 Huh-7 细胞后, 在 48 h 对应时间段内细胞的迁移率显著降低 ($P < 0.05$)。与 0 h 相比, 不同质量浓度 (从低到高) 的 TA-SM 处理 HepG2 和 Huh-7 48 h 后的迁移率分别为 (11.49 \pm 0.02) % 和 (36.96 \pm 0.03) %、(8.85 \pm 0.01) % 和 (22.89 \pm 0.04) %、(7.69 \pm 0.03) % 和 (20.83 \pm 0.03) %。结果表明, TA-SM 可抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的迁移, 且具有时间和浓度相关性。

本研究还采用 Transwell 实验评估了 TA-SM 对 2 种肝细胞癌细胞侵袭能力的影响 (图 1-D)。与对照组相比, TA-SM 2、4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 HepG2 细胞侵袭数显著降低 ($P < 0.001$), 1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 Huh-7 细胞侵袭数显著降低 ($P < 0.001$)。结果表明, TA-SM 对 2 种细胞侵袭的抑制作用呈浓度相关性, 且对 HepG2 细胞的抑制作用更明显。

3.1.2 TA-SM 对 HepG2 和 Huh-7 细胞凋亡率与周期分布的影响 本研究运用流式细胞术探究 TA-SM 对肝癌细胞凋亡和细胞周期分布的影响 (图 2)。结果表明, TA-SM 呈浓度相关性诱导 HepG2 和 Huh-7 的凋亡, 且与对照组相比, 高质量浓度组差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。当高质量浓度 TA-SM 处理细胞后, HepG2 的凋亡率已超过 50%, 而 Huh-7 仅有 14.5%。

流式细胞术检测细胞周期的分布结果表明, 与对照组相比, TA-SM 4、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 HepG2 细胞 24 h 后, G₁、G₂ 期的数量显著增加 ($P < 0.05$), 且具有浓度相关性; TA-SM 2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 Huh-7 后 G₂ 期细胞数量显著增加 ($P < 0.05$)。表明 TA-SM 通过阻滞 HepG2 的 G₁ 和 G₂ 期, 阻滞 Huh-7 细胞的 G₂ 期发挥抑制增殖作用。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 0 h 组比较: # $P < 0.05$.
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 0 h group.

图 1 TA-SM 体外抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖 (A)、克隆形成 (B)、迁移 (C) 和侵袭 (D) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 TA-SM inhibits proliferation (A), clone formation (B), migration (C) and invasion (D) of HepG2 and Huh-7 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

实验表明,TA-SM 可以抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡以及阻滞细胞周期,证实 TA-SM 在体外具有较好的抗肝癌作用。由于 TA-SM 对 HepG2 细胞的抑制作用更为明显,所以本研究选择 HepG2 细胞进行后续实验。

3.2 样本相关性分析、差异表达蛋白富集分析及分子对接验证

样本相关性分析结果显示,样本相关系数均大于 0.7 (图 3-A),且主成分分析 (PCA) 未发现离

散值 (图 3-B),表明样本是可靠的,可用于后续研究。随后本研究利用 DIA 定量蛋白质组学技术筛选了 TA-SM 作用于 HepG2 细胞的差异表达蛋白谱 (图 3-C),发现给药组共有 816 种蛋白质表达上调,391 种蛋白质表达下调,并对其进行 GO 功能富集分析,提取前 20 个上调及下调的 GO 富集条目进行展示,详细信息见表 2,可以看出上调的蛋白主要参与有丝分裂细胞周期过程、细胞周期调控、补体激活、细胞外区以及细胞外隙等生物学过程,下

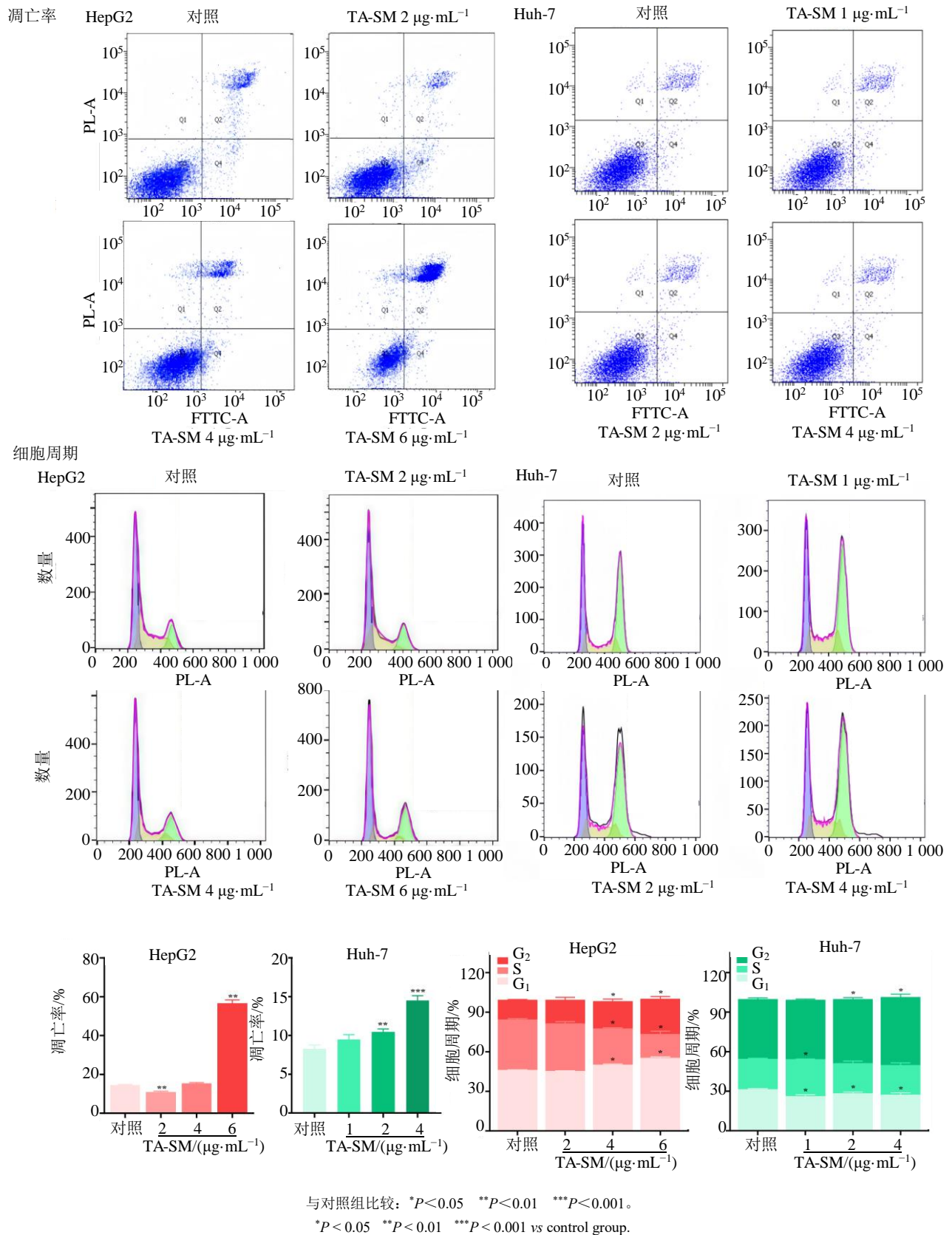
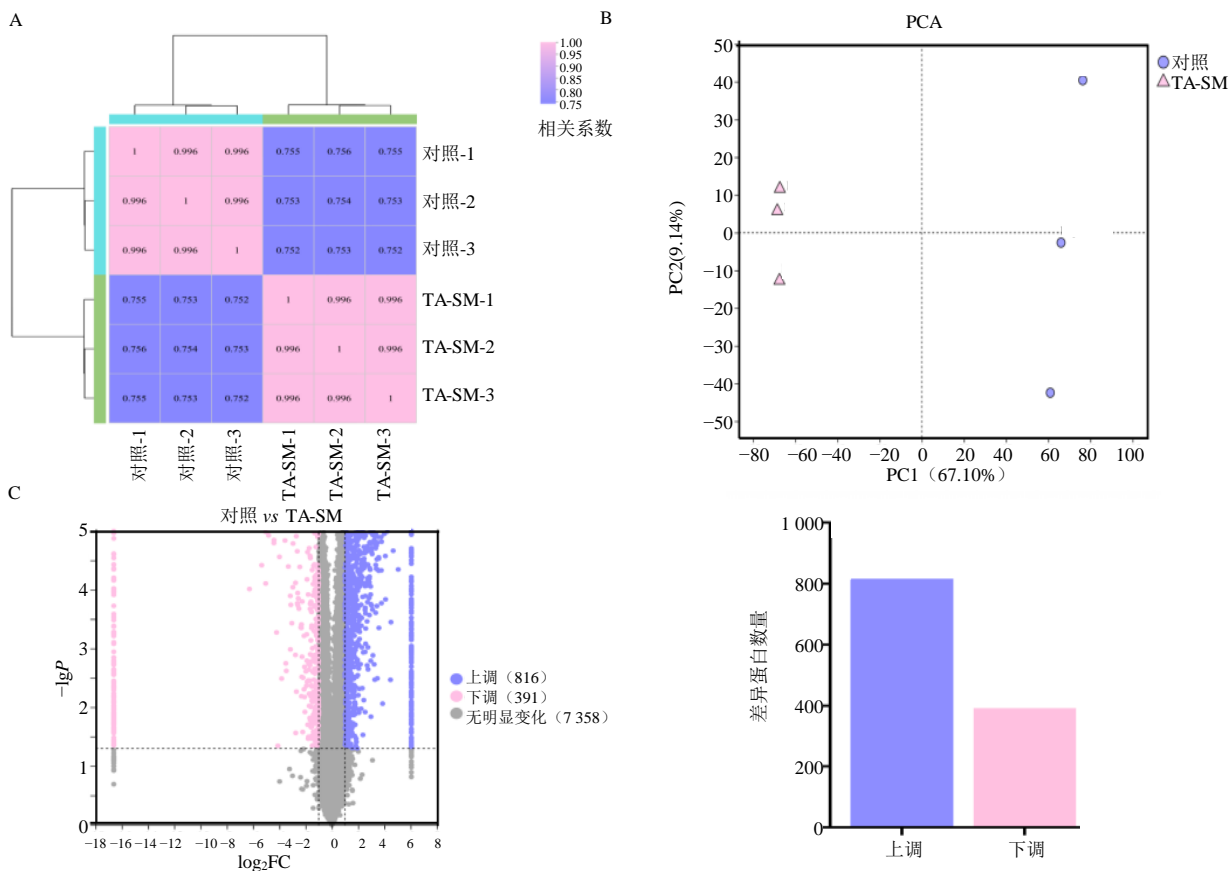


图 2 TA-SM 对 HepG2 和 Huh-7 细胞凋亡率与周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of TA-SM on apoptosis rate and cell cycle distribution of HepG2 and Huh-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A-样本聚类热图; B-PCA 示意图; C-差异蛋白火山图及定量结果。

A-Sample clustering heatmap; B-Schematic diagram of PCA; C-Volcano plot of differential proteins and quantitative results.

图 3 样本差异表达蛋白富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of differentially expressed proteins in samples

表 2 上调/下调差异表达蛋白的前 20 个 GO 富集条目

Table 2 Top 20 GO enrichment entries of up/down-regulated differentially expressed proteins

GO富集条目 (上调)	GO标识符	GO富集条目 (下调)	GO标识符
有丝分裂细胞周期过程	1903047	溶酶体腔	0043202
丝氨酸型内肽酶抑制活性	0004867	有机化合物氧化产能	0015980
细胞周期调控	0051726	氧化还原驱动的跨膜转运活性	0015453
氧载体活性	0005344	细胞外囊泡	1903561
一碳化合物转运	0019755	细胞外细胞器	0043230
二氧化碳运转	0015670	细胞外膜包被细胞器	0065010
补体激活	0006956	氧化还原酶活性	0016491
糖胺聚糖结合	0005539	胞外外来体	0070062
过氧化氢分解代谢过程	0042744	前体代谢物与能量的生成	0006091
微管细胞骨架	0015630	电子转移活性	0009055
细胞氧化物解毒	0098869	胞外区	0005576
含胶原蛋白的细胞外基质	0031012	细胞呼吸作用	0045333
泛素蛋白连接酶活性的正向调控	1904668	杂化电子传递链	0019646
血红蛋白血红蛋白复合物	0031838	呼吸链复合体	0098803
细胞分裂	0051301	细胞器腔	0043233
细胞外基质	0031012	细胞器内腔	0070013
外封装结构	0030312	膜包腔	0031974
胞外区	0005576	有氧呼吸	0009060
血微粒	0072562	电子传递链	0022900
细胞外间隙	1903561	呼吸电子传递链	0022904

调的蛋白主要参与胞外囊泡、胞外的细胞器、氧化还原酶活性、细胞外泌体、细胞器内腔等生物学过程。

对差异表达上调和下调基因进行 KEGG 通路富集分析,取排名前 20 位的通路进行分析,结果表明 TA-SM 主要通过肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、Hippo 信号通路、p53 信号通路和碳代谢等多条通路发挥抗肝癌的作用。具体信息见表 3。

基于与肿瘤进展、癌细胞增殖及侵袭转移等病理过程的相关性,本研究后续选择 Hippo 信号通路进行研究。运用生物信息学筛选出 Hippo 信号通路的关键靶点蛋白,包括 STK25、STK38L、WWTR1、TEAD4 (表 4)。

将上述 Hippo 通路中关键蛋白分别与 MT、OMT、SPC、SPD 进行分子对接,共得到 16 组分子

表 3 前 20 个蛋白质表达上调基因的 KEGG 分析结果

Table 3 KEGG analysis results of top 20 genes with upregulated protein expression

KEGG富集通路	Pathway 标识符	P值	KEGG富集通路	Pathway 标识符	P值
补体和凝血级联反应	hsa04610	5.21 × 10 ⁻¹²	代谢途径	hsa01100	0
金黄色葡萄球菌感染	hsa05150	6.54 × 10 ⁻⁶	氧化磷酸化	hsa00190	0
百日咳	hsa05133	4.83 × 10 ⁻⁶	帕金森病	hsa05012	8.68 × 10 ⁻¹³
疟疾	hsa05144	0.000 171	朊病毒病	hsa05020	5.23 × 10 ⁻¹⁰
酒精性肝病	hsa04936	0.000 254	神经性舞蹈病	hsa05016	5.01 × 10 ⁻¹⁰
孕酮介导的卵母细胞成熟	hsa04914	0.000 507	溶酶体	hsa04142	4.30 × 10 ⁻¹⁰
神经活性配体受体相互作用	hsa04080	0.000 474	生热作用	hsa04714	1.44 × 10 ⁻⁹
非洲锥虫病	hsa05143	0.000 775	糖胺聚糖降解	hsa00531	1.38 × 10 ⁻⁹
p53信号通路	hsa04115	0.002 282	糖尿病心肌病	hsa05415	2.99 × 10 ⁻⁹
Hippo信号通路	hsa04390	0.002 201	辅因子的生物合成	hsa01240	4.28 × 10 ⁻⁹
多物种凋亡	hsa04215	0.002 129	化学致癌作用-活性氧	hsa05208	1.02 × 10 ⁻⁸
系统性红斑狼疮	hsa05322	0.002 879	阿尔茨海默病	hsa05010	3.11 × 10 ⁻⁸
吞噬体	hsa04145	0.003 152	肌萎缩	hsa05014	3.07 × 10 ⁻⁷
军团杆菌病	hsa05134	0.002 047	蛋白酶体	hsa03050	7.24 × 10 ⁻⁷
肺结核	hsa05152	0.003 505	内源性大麻素逆向信号传导	hsa04723	2.11 × 10 ⁻⁶
细胞周期	hsa04110	0.005 538	多种疾病-神经退行性病变通路	hsa05022	5.12 × 10 ⁻⁶
IL-17信号通路	hsa04657	0.005 464	非酒精性脂肪肝	hsa04932	7.49 × 10 ⁻⁶
TNF信号通路	hsa04668	0.006 872	心肌收缩	hsa04260	1.24 × 10 ⁻⁵
致病性大肠杆菌感染	hsa05130	0.008 155	碳代谢作用	hsa01200	4.53 × 10 ⁻⁵
Toll样受体信号通路	hsa04620	0.006 673	抗原加工与呈递	hsa04612	9.26 × 10 ⁻⁵

表 4 Hippo 通路关键靶点蛋白

Table 4 Key target proteins of Hippo pathway

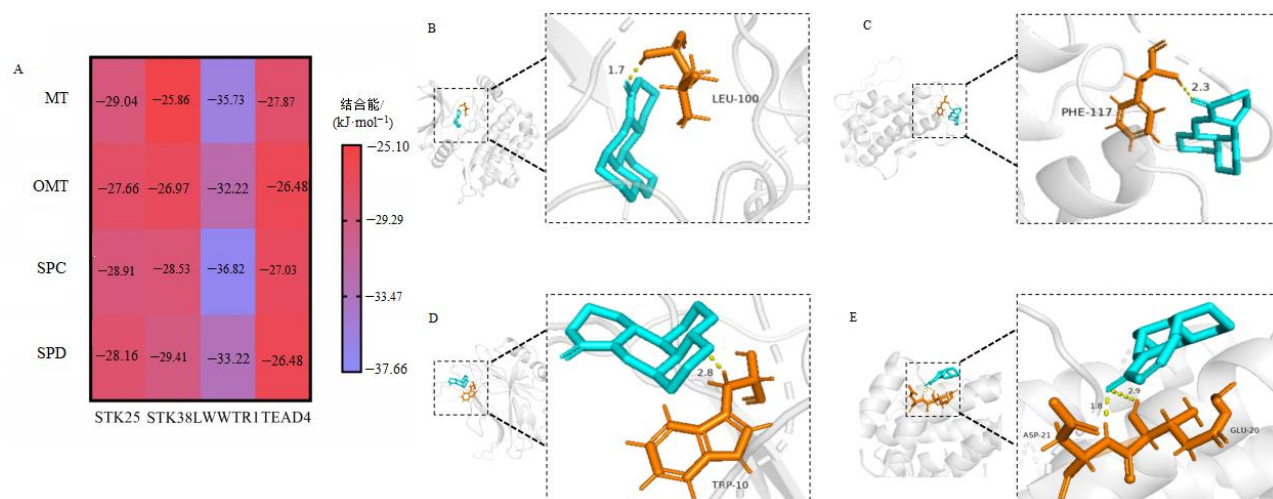
蛋白名称	检索号	log ₂ FC	P值
STK25	A0A0S2Z4Y2	7.273	0.008 36
STK38L	Q9Y2H1	1.036	0.001 72
WWTR1	Q9GZV5	1.061	0.001 17
TEAD4	A0A0A0MRF3	1.164	0.028 78

对接结果(图 4-A)。分子对接结果显示,4 种 TA-SM 与 Hippo 通路上关键靶点的结合能均小于 -20.92 kJ·mol⁻¹,表明 TA-SM 与受体蛋白形成的构象能较低,结合活性较高。利用 Pymol 将每种蛋白与对应生物碱结合能最低的构象进行可视化,可以看出 MT 与 STK25 在 LEU-100 处形成氢键作用(图

4-B),结合能为-29.04 kJ·mol⁻¹;SPD 与 STK38L 在 PHE-117 处形成氢键作用(图 4-C),结合能为 -29.41 kJ·mol⁻¹;MT 与 TEAD4 在 TRP-10 处形成氢键作用(图 4-D),结合能为-27.87 kJ·mol⁻¹;SPC 和 WWTR1 在 GLU-20 和 ASP-21 处形成氢键作用(图 4-E),结合能为-36.82 kJ·mol⁻¹。

3.3 Hippo 通路关键蛋白和 mRNA 表达水平

Western blotting 结果显示,在体外细胞实验中,与对照组相比,TA-SM 4、6 μg·mL⁻¹ 组 STK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4 4 种蛋白的相对表达量显著上升(P<0.05、0.01、0.001),呈 TA-SM 质量浓度相关性上升趋势(图 5-A、B),其中 STK25



A-生物碱与关键靶点对接结合能热图; B-MT 与 STK25 的 LEU-100 结合模式图; C-SPD 与 STK38L 的 PHE-117 结合模式图; D-MT 与 TEAD4 的 TRP-10 结合模式图; E-SPC 与 WWTR1 的 GLU-20 和 ASP-21 结合模式图; 左图为整体视图, 右图为局部视图, 图中天蓝色 stick 为小分子, 银白色 cartoon 为蛋白, 黄色线表示氢键作用。

A-Heat map of the binding energy between the alkaloid and the key target; B-Binding mode diagram of MT with LEU-100 of STK25; C-Binding mode diagram of SPD with PHE-117 of STK38L; D-Binding mode diagram of MT with TRP-10 of TEAD4; E-Binding mode diagram of SPC with GLU-20 and ASP-21 of WWTR1; The left image is an overall view, while the right image is a partial view. In the images, the sky blue stick represents the small molecule, the silver cartoon represents the protein, and the yellow line indicates hydrogen bonding.

图 4 Hippo 信号通路关键靶点和生物碱的分子对接结果

Fig. 4 Results of molecular docking between key targets of Hippo signaling pathway and alkaloid

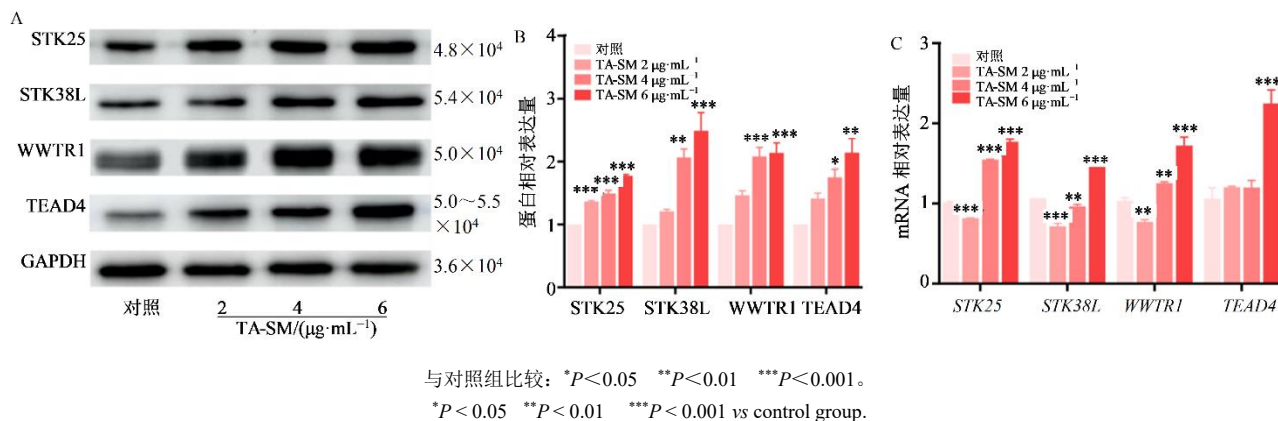


图 5 Hippo 通路关键蛋白 (A、B) 和 mRNA (C) 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Expression levels of key proteins (A and B) and mRNA (C) in Hippo pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的变化最为显著 ($P < 0.001$)。结果表明, TA-SM 作用于 HepG2 细胞后可以激活 Hippo 信号通路中相关蛋白的表达, 证实 TA-SM 可能通过激活 Hippo 信号通路抑制肝细胞癌的进展。

qRT-PCR 结果表明, TA-SM 的浓度从 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加至 $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, *STK25*、*STK38L*、*WWTR1* mRNA 的相对表达水平分别由 0.82 ± 0.00 、 0.77 ± 0.12 和 0.77 ± 0.03 增加至 1.77 ± 0.03 、 1.30 ± 0.24 和 1.72 ± 0.11 , 与对照组相比, TA-SM $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *STK25*、*STK38L*、*WWTR1*、*TEAD4* mRNA 的相对表达水平

显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 5-C)。这与 Western blotting 的结果一致, 证实 TA-SM 抗肝癌作用与 Hippo 信号通路关系密切。

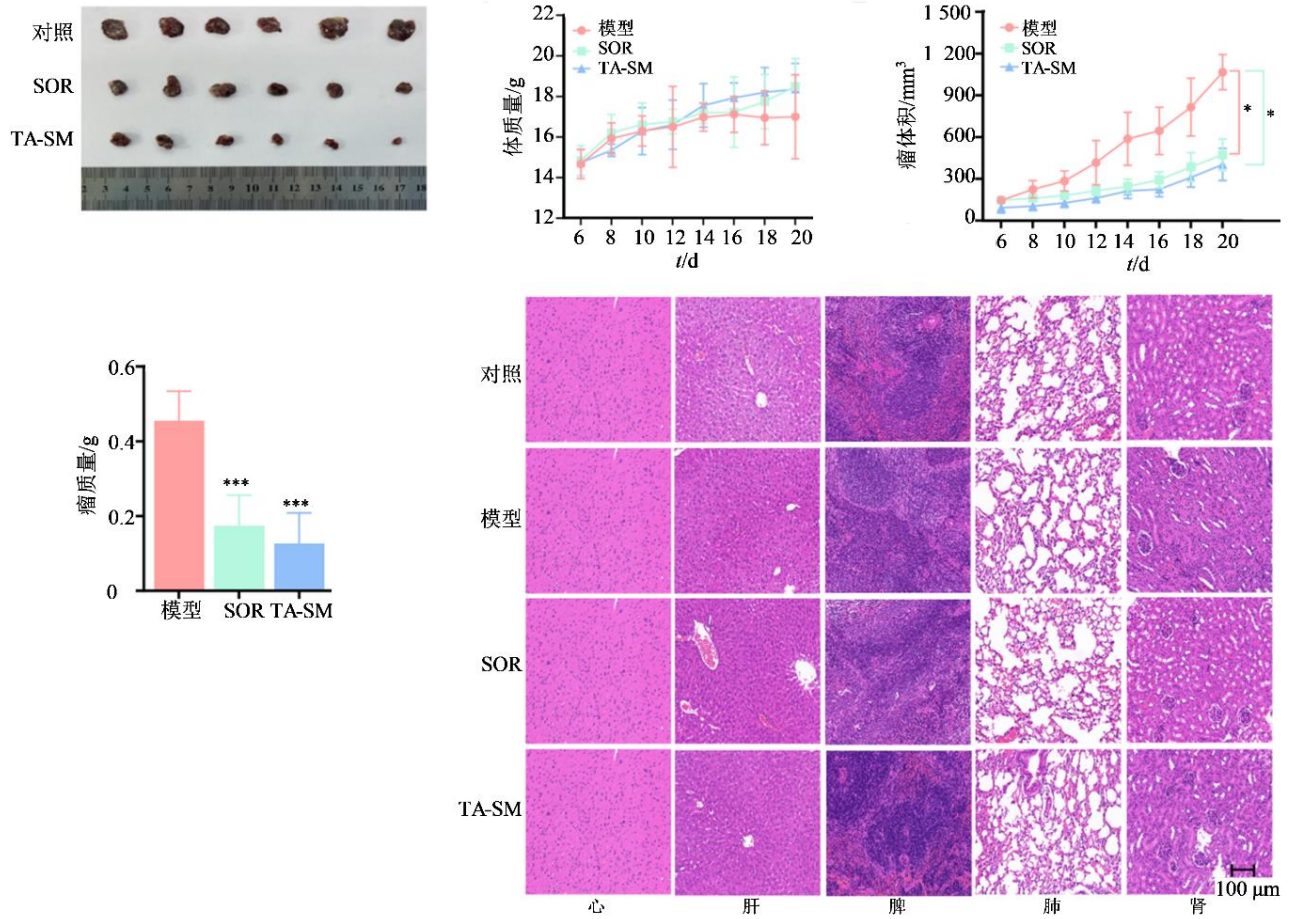
3.4 体内抗癌效果和安全性评价

如图 6 所示, 给药期间各组裸鼠的体质量虽呈上升趋势, 但各组间无统计学差异。给药期间, 模型组的肿瘤体积从 $(147.51 \pm 11.17) \text{mm}^3$ 增加至 $(960.59 \pm 150.89) \text{mm}^3$, SOR 组的肿瘤体积从 $(149.51 \pm 18.74) \text{mm}^3$ 增加至 $(385.97 \pm 178.70) \text{mm}^3$, 而 TA-SM 组的肿瘤体积从 $(141.43 \pm 7.10) \text{mm}^3$ 增

加至 (264.81 ± 168.82) mm³, 与模型组比较, SOR 组和 TA-SM 组变化显著 (P < 0.05、0.001), TA-SM 组裸鼠肿瘤的体积和质量均最小。结果表明,

TA-SM 的抗肝细胞癌效果优于 SOR 组。

表 5、6、7 结果表明, 与模型组相比, TA-SM 组 NEU 含量低于 SOR 组 (P < 0.05), 其他血常规



与模型组比较: *P < 0.05 ***P < 0.001。
*P < 0.05 ***P < 0.001 vs model group.

图 6 TA-SM 体内抗肝癌的安全性评价 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Safety evaluation of TA-SM against hepatocellular carcinoma *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 5 裸鼠血液常规检测指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Routine blood test parameters in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	NEU/%	WBC/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	LYM/%	Eos/%	Bas/%	NEUT/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
模型	—	51.20 ± 7.58	2.38 ± 1.17	41.83 ± 9.3	1.47 ± 0.49	0.73 ± 0.93	1.09 ± 0.44
SOR	50	69.23 ± 10.54	1.48 ± 2.08	29.39 ± 7.42	3.07 ± 1.91	0.43 ± 0.06	0.90 ± 1.16
TA-SM	50	47.33 ± 3.57*	2.23 ± 0.95	38.93 ± 8.14	2.07 ± 0.84	0.17 ± 0.15	1.06 ± 0.48

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	LY/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	EO/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	BASO/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	RBC/ (×10 ¹² ·L ⁻¹)	HB/ (g·L ⁻¹)	PLT/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
模型	—	0.93 ± 0.82	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01	8.31 ± 0.47	142.00 ± 13.75	591.33 ± 5.86
SOR	50	0.47 ± 0.69	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01	11.18 ± 2.27	144.67 ± 9.50	604.33 ± 49.54
TA-SM	50	0.92 ± 0.52	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00	8.22 ± 0.92	129.33 ± 17.47	607.67 ± 6.66

与 SOR 组比较: *P < 0.05。

*P < 0.05 vs SOR group.

表 6 裸鼠肝功能检测指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Liver function test indicators in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	TBA/ (μmol·L ⁻¹)	GGT/ (U·L ⁻¹)
模型	—	27.73±5.66	25.33±10.07	115.87±4.50	6.60±3.00	9.87±0.61	30.67±8.33
SOR	50	32.67±0.46	21.00±1.00	147.03±8.43*	4.57±0.21	13.50±0.89*	12.33±1.53*
TA-SM	50	28.40±2.80	13.33±6.11	144.00±6.80*	5.53±1.42	10.80±0.00#	14.00±2.00*

与模型组比较: * $P<0.05$; 与 SOR 组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs model group; # $P<0.05$ vs SOR group.

表 7 裸鼠肾功能检测指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Renal function test parameters in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	UREA/ (mmol·L ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	UA/ (mmol·L ⁻¹)
模型	7.01±0.89	110.60±1.40	150.00±22.00
SOR	6.70±0.07	17.00±0.53*	471.33±9.87*
TA-SM	7.32±1.19	112.00±6.80#	208.00±12.00*#

与模型组比较: * $P<0.05$; 与 SOR 组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs model group; # $P<0.05$ vs SOR group.

指标在不同组别中均无异常且无统计学差异 ($P>0.05$)。肝、肾功能评价显示, SOR 组 ALT、AST、TBA 含量均高于 TA-SM 组; TA-SM 组 UREA 含量与其他组相差无几, CREA 接近对照组, UA 水平低于 SOR 组, 均在正常范围内。经 HE 染色后, 心脏、肝脏、脾脏、肺部、肾脏均未观察到明显的病理变化 (图 6), 表明 TA-SM 的体内生物安全性良好。

再次运用 Western blotting 和 qRT-PCR 法来验证 Hippo 信号通路是否可以在 TA-SM 的干预下发挥抗肝细胞癌作用。SOR 组和 TA-SM 组在肿瘤组织中 STK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4 蛋白的相对表达量分别为 1.09±0.35 和 1.99±0.48、1.66±0.17 和 2.57±0.57、2.13±0.31 和 3.68±0.86 以及 1.77±0.25 和 2.17±0.27, 与模型组相比, TA-SM 组均显著增加 ($P<0.05$)。与 SOR 组相比, TA-SM 组肿瘤组织中 STK25、STK38L、WWTR1 3 种蛋白的表达均显著增加 ($P<0.05$)。同时还发现, 与模型组相比, 经 TA-SM 处理后 STK25、STK38L、WWTR1 和 TEAD4 mRNA 的相对表达量均有所增加 ($P<0.05, 0.01, 0.001$), 与 SOR 组相比, TA-SM 处理后 STK25、WWTR1 和 TEAD4 mRNA 的表达显著增加 ($P<0.05, 0.001$)。结果表明, TA-SM 可

以促进 Hippo 信号通路中相关蛋白及基因的表达 (图 7-A、B)。

随后对肿瘤组织中特异性蛋白进行了免疫组化和免疫荧光染色。免疫组化染色结果显示, 与对照组比较, TA-SM 组 STK25、WWTR1、TEAD4 的表达增加 ($P<0.05$), 但未发现 STK38L 的表达 (图 7-C、D)。免疫荧光染色结果与免疫组化基本一致, 但发现 STK38L 整体表达量较低, 且未发现 TEAD4 的表达 (图 8)。这可能是不同的实验方法检测灵敏度不同所致。

课题组前期研究证实 TA-SM 在体外模型中具有抗新生血管生成的作用^[49], 因此本研究接下来评估了 TA-SM 在体内是否同样具有抗血管生成的作用。结果显示, 与对照组比较, TA-SM 组可显著降低 CD31 以及 VEGF 的表达 ($P<0.05, 0.01$) (图 7-C、D 和图 8), 这进一步证实了 TA-SM 可以抑制新生血管生成, 表明抗新生血管生成作用可能是 TA-SM 抗肝癌的作用机制之一。此外本研究又对肿瘤组织中 Ki67 的含量进行了测定, 结果显示, 经 TA-SM 处理后 Ki67 的表达量较模型组显著下降 ($P<0.01$), 效果优于 SOR 组 (图 8), 表明 TA-SM 抑制肿瘤细胞增殖的能力优于 SOR。

4 讨论

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 已有大量研究结果表明, 多种类型生物碱均具有抗肿瘤作用^[50-52]。有研究发现, MT 通过抑制蛋白激酶 B (Akt)/糖原合成酶激酶-3β (GSK3β)/β 连环蛋白 (β-catenin) 信号通路, 降低 β-catenin 的转录活性, 从而抑制肝癌细胞的增殖并诱导凋亡^[53]。谢小青等^[54]研究发现 MT 诱导肝癌细胞凋亡、抑制细胞增殖可能与 P38、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路有关。龙义熙等^[55]研究发现, OMT 可以通过下调 γ 干扰素 (IFN-γ) 的表达, 抑

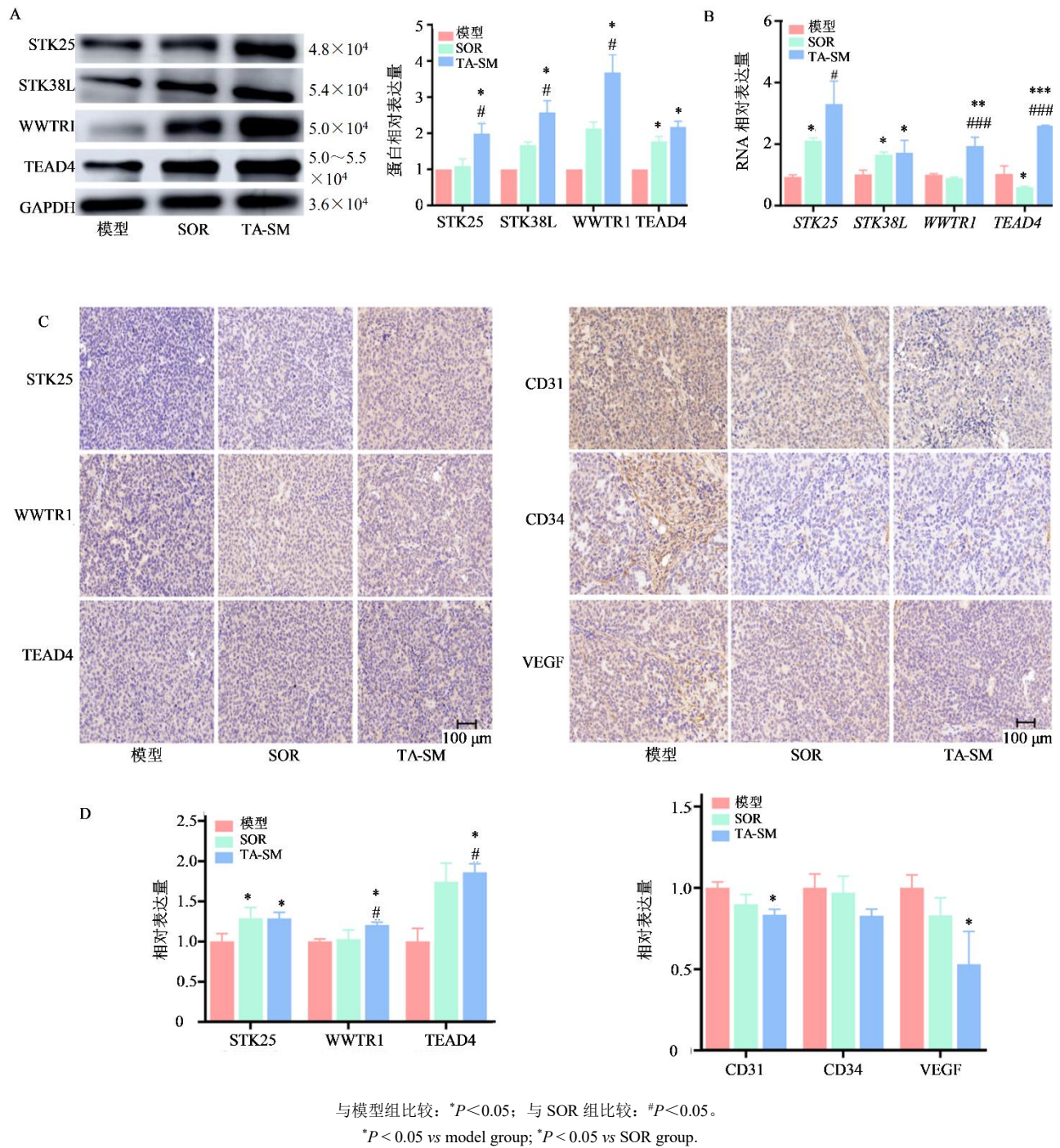
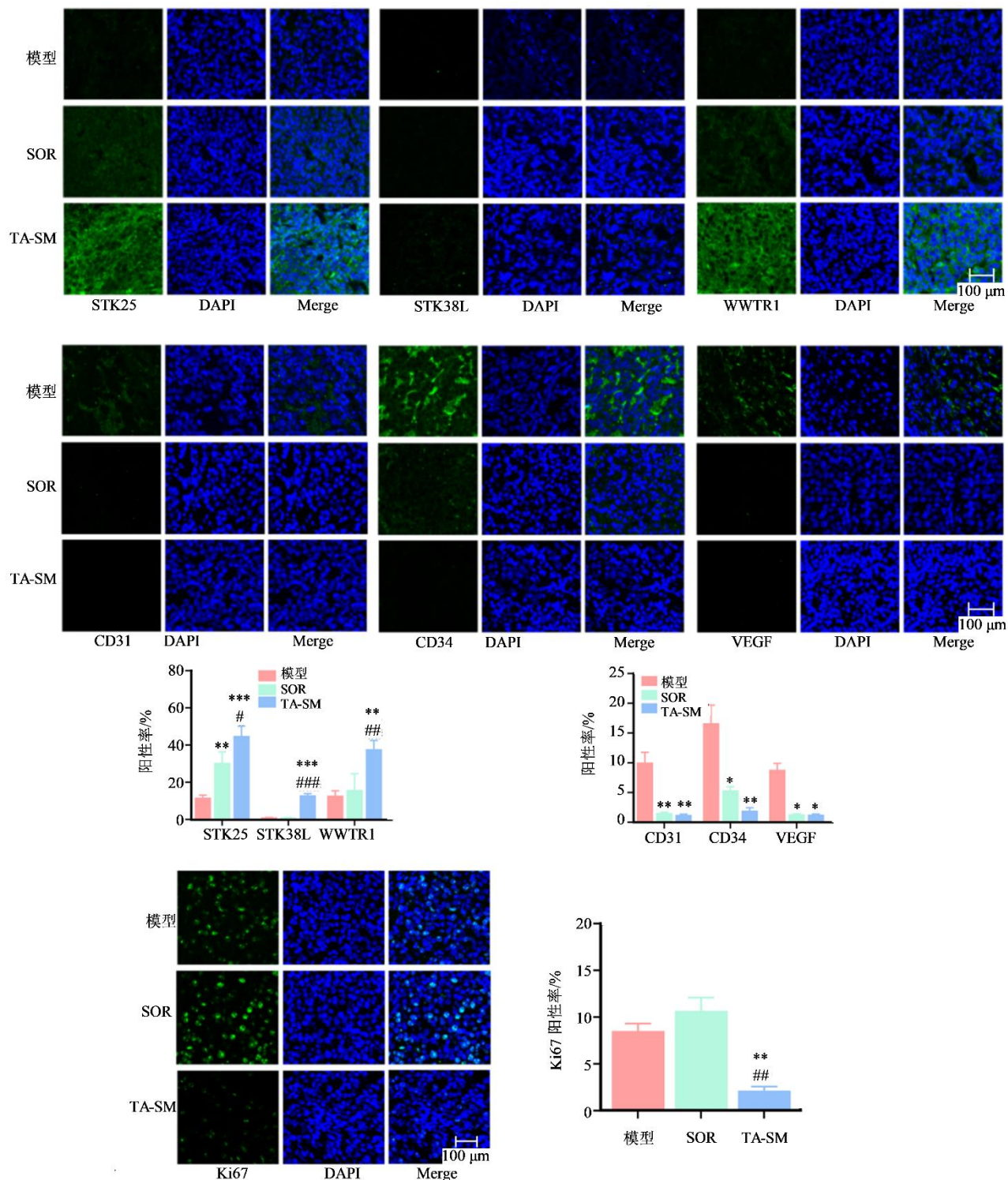


图 7 肿瘤组织 Hippo 通路关键蛋白、基因表达水平 (A、B) 及免疫组化 (C、D) 检测 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 7 Detection of key proteins and gene expression levels (A, B) of Hippo pathway in tumor tissues, as well as immunohistochemistry (C, D) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

制肝癌细胞中程序性死亡配体-1 (PD-L1)、溶质载体家族成员 SLC7A11 (xCT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 等铁死亡相关蛋白的表达, 进而促进肝癌细胞的铁死亡。也有研究表明^[56], SPC 通过对髓分化因子 88 (MyD88) 依赖途径的 Toll 样受体 (TLR) 4 通路负性调节, 下调 ERK、JNK、p38 和

IKK 的磷酸化水平, 降低促纤维化和炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的表达, 减少细胞周期蛋白 D1 和增殖细胞核抗原的表达, 抑制肝星状细胞的激活, 进而减轻肝纤维化。吴黎川等^[57]通过研究发现, SPD 衍生物能抑制肝癌细胞体外迁移与侵袭。本研究使用体外细胞实验、生物信息学分析技术和体内模型



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 SOR 组比较: # $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; # $P < 0.05$ vs SOR group.

图 8 肿瘤切片的免疫荧光图像 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Immunofluorescence images of tumor sections ($\bar{x} \pm s, n=6$)

研究了 TA-SM 对肝细胞癌的作用, 发现 TA-SM 对 HepG2 和 Huh-7 2 种肝细胞癌及 Balb/c 裸鼠的 CDX

模型具有显著的抑制作用, 这表明 TA-SM 可能通过调控 Hippo 信号通路发挥抗肝细胞癌的作用。上

述研究结果进一步证实了, TA-SM 通过多组分、多通道、多靶点共同发挥抗肝细胞癌的作用。

目前的研究结果表明 TA-SM 对 HepG2 和 Huh-7 2 种肝肿瘤细胞均具有明显的抑制作用, 这与 Zhang 等^[58]所得结论一致, 进一步支持 TA-SM 作为潜在抗肝癌药物的有效性。但值得注意的是, TA-SM 对 Huh-7 细胞的迁移抑制效果更优, 这可能与 HepG2 细胞的“小岛状”生长模式导致细胞间黏附力增强有关。低浓度药物处理后, HepG2 细胞的凋亡率相对减少, 推测其原因是低浓度药物处理后, 细胞的生长被抑制, 而对照组由于没有药物干扰, 细胞因生长迅速而发生拥挤及营养竞争, 导致细胞的凋亡率比低浓度药物组高。当高浓度药物处理细胞后, HepG2 的凋亡率已超过 50%, 而 Huh-7 仅有 14.5%, 推测 TA-SM 更易触发 HepG2 细胞的 DNA 损伤应答来增强凋亡效应。TA-SM 对 HepG2 细胞 G₁ 期和 G₂ 期的双重阻滞作用可能是其强效抑制增殖的关键机制; 而 Huh-7 细胞仅表现为 G₂ 期阻滞, 提示 TA-SM 可能通过不同细胞周期调控蛋白影响细胞周期进程。

蛋白质组学已在基础生物学研究、疾病机制与诊断等多个领域得到广泛应用^[59], 它能够解析细胞信号通路、代谢网络以及蛋白质相互作用网络, 揭示生命活动的分子机制^[60]。DIA 检测技术全面的数据采集方式使得 DIA 技术在探究药物与癌细胞之间的作用机制方面具有广泛的应用前景^[61]。GO 富集分析和 KEGG 分析结果发现, TA-SM 可能通过调控 Hippo 信号通路抑制肝癌。且已有研究证明, Hippo 途径是肝脏大小、再生、发育、代谢和稳态的关键调节因子, Hippo 途径中的异常可导致常见肝脏疾病的发展, 如脂肪肝疾病和肝细胞癌^[62]。已有研究证明索拉非尼可以通过 Hippo 信号通路克服肝细胞癌的耐药性^[63]。本研究也通过 Western blotting 和 qRT-PCR 实验从蛋白以及基因的方面进行了验证, 结果表明, TA-SM 确实可以调控 Hippo 信号通路且具有浓度相关性。分子对接验证结果显示, SM 主要生物碱与 Hippo 通路关键靶点 STK25、STK38L、WWTR1、TEAD4 均具有良好的结合力, 表明 TA-SM 可以发挥抗肝细胞癌的功效。

裸鼠 CDX 模型在探究药物对恶性肿瘤的作用中具有广阔的应用前景和显著的优势^[64]。本研究通过构建裸鼠皮下 CDX 模型证实 TA-SM 的体内抗肝细胞癌作用, 其抑瘤率与阳性对照药物 SOR 等效,

能够显著延缓肿瘤的生长。SOR 在治疗过程中会引起肝功能异常, 表现出 AST 水平升高, 这可能会影响肝脏对胆汁酸的合成、分泌和排泄功能, 导致胆汁酸在血液中的浓度升高。SOR 治疗组的裸鼠血清尿酸水平明显升高, 其原因可能在于 SOR 会降低肾小球滤过率或导致肾小管重吸收功能异常, 影响尿酸正常排泄, 最终引起尿酸含量升高。相反, TA-SM 治疗后的裸鼠并未出现此种情况。

本课题组前期研究已证明 TA-SM 具有抗血管生成作用, SOR 也可以通过抗新生血管生成抑制肿瘤生长^[37]。因此, 本研究又对血管生成相关因子 CD31、CD34、VEGF 进行了检测。CD31 作为血管内皮细胞特异性跨膜蛋白, 其表达下调可直接影响血管内皮完整性^[65]; 而 VEGF 作为促血管生成核心调控因子, 其水平降低可有效阻断内皮细胞增殖信号传导^[66]。两者在 TA-SM 作用下的协同性抑制现象, 提示 TA-SM 可能通过干预 VEGF/血小板内皮细胞黏附分子 1 (PECAM-1) 信号轴, 进而破坏血管生成过程中内皮细胞的活化、迁移及管腔形成等关键生物学过程。CD34 作为内皮祖细胞动员标志物的表达抑制, 进一步佐证 TA-SM 可通过多靶点干预阻断血管新生微环境中的细胞招募过程^[67]。

Ki67 是一种广泛用于评估细胞增殖活性的核蛋白分子标志物, 其生物学功能与细胞周期调控密切相关^[68]。Ki67 指数越高, 提示肿瘤细胞增殖越活跃, 通常与更高的恶性程度、侵袭性及不良预后相关^[69]。经过 TA-SM 处理后, 肿瘤组织中 Ki67 的表达量明显下降, 且效果优于 SOR, 这也证明 TA-SM 在体内抑制肿瘤细胞增殖效果更好。

志谢: 青海大学药学院、公共卫生系以及中国科学院西北高原生物研究所提供实验平台

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Jiang L L, Liang R, Luo Q, et al. Targeting FTO suppresses hepatocellular carcinoma by inhibiting ERBB3 and TUBB4A expression [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 226: 116375.
- [3] Zheng S H, Gu Y X, Qi W Y, et al. Traditional Chinese

- medicine for liver cancer treatment: Network pharmacology research [J]. *Curr Top Med Chem*, 2025, 25(26): 3027-3041.
- [4] Li K X, Xiao K M, Zhu S J, et al. Chinese herbal medicine for primary liver cancer therapy: Perspectives and challenges [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 889799.
- [5] Shi J F, Cao M M, Wang Y T, et al. Is it possible to halve the incidence of liver cancer in China by 2050? [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(5): 1051-1065.
- [6] Chen S Y, Siedhoff H R, Zhang H, et al. Low-intensity blast induces acute glutamatergic hyperexcitability in mouse hippocampus leading to long-term learning deficits and altered expression of proteins involved in synaptic plasticity and serine protease inhibitors [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 165: 105634.
- [7] Xu A X, Zhao Z F, Zhu L, et al. Promise and challenges of traditional Chinese medicine, specifically *Calculus bovis*, in liver cancer treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(40): 4380-4385.
- [8] Rose M G, Kennedy E B, Abou-Alfa G K, et al. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: ASCO guideline update clinical insights [J]. *JCO Oncol Pract*, 2024, 20(8): 1035-1039.
- [9] Wu L, Zhang Y M, Ren J. Targeting non-coding RNAs and N(6)-methyladenosine modification in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 223: 116153.
- [10] Xia C F, Basu P, Kramer B S, et al. Cancer screening in China: A steep road from evidence to implementation [J]. *Lancet Public Health*, 2023, 8(12): e996-e1005.
- [11] 徐兴阳, 徐宁, 李久明, 等. 天然产物中抗肿瘤活性成分研究新进展 [J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2022, 37(1): 26-29.
- Xu X Y, Xu N, Li J M, et al. Research progress of antitumor active ingredients in natural products [J]. *J Inn Mong Minzu Univ Nat Sci*, 2022, 37(1): 26-29.
- [12] Song L, Zhang W, Tang S Y, et al. Natural products in traditional Chinese medicine: Molecular mechanisms and therapeutic targets of renal fibrosis and state-of-the-art drug delivery systems [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116039.
- [13] Liu X C, Wang X B. Recent advances on the structural modification of parthenolide and its derivatives as anticancer agents [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20(11): 814-829.
- [14] 黄菊, 张玮扬, 邹灿, 等. 甘草黄酮类成分抗肿瘤研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(4): 1456-1466.
- Huang J, Zhang W Y, Zou C, et al. Research progress of anti-tumor effect of licorice flavonoids [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(4): 1456-1466.
- [15] 徐思怡, 刘思璐, 尹双双, 等. 吴茱萸碱抗肿瘤的药理活性及作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(9): 3390-3400.
- Xu S Y, Liu S L, Yin S S, et al. Research advances in antitumor pharmacological activities and mechanisms of evodiamine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(9): 3390-3400.
- [16] Zhu L R, Li S S, Zheng W Q, et al. Targeted modulation of gut microbiota by traditional Chinese medicine and natural products for liver disease therapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1086078.
- [17] Li Q R, Cao M M, Lei L, et al. Burden of liver cancer: From epidemiology to prevention [J]. *Chin J Cancer Res*, 2022, 34(6): 554-566.
- [18] Liao X, Bu Y, Jia Q G. Traditional Chinese medicine as supportive care for the management of liver cancer: Past, present, and future [J]. *Genes Dis*, 2020, 7(3): 370-379.
- [19] 赵年寿, 纪鹏, 魏彦明, 等. 砂生槐生物碱成分测定、提取工艺及生物活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(9): 1614-1620.
- Zhao N S, Ji P, Wei Y M, et al. Research progress in the determination, extraction process and biological activity of alkaloids from *Sophora moorcroftiana* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2020, 32(9): 1614-1620.
- [20] Ji P, Zhao N S, Wu F L, et al. Mechanisms predictive of Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* alkaloids for treatment of lung cancer based on the network pharmacology and molecular docking [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 47.
- [21] Huang Z C, Li H W, Li Q H, et al. Matrine suppresses liver cancer progression and the Warburg effect by regulating the circROBO1/miR-130a-5p/ROBO1 axis [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(10): e23436.
- [22] Zhang H, Chen L L, Sun X P, et al. Matrine: A promising natural product with various pharmacological activities [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 588.
- [23] Du Q, Lin Y D, Ding C P, et al. Pharmacological activity of matrine in inhibiting colon cancer cells VM formation, proliferation, and invasion by downregulating claudin-9 mediated EMT process and MAPK signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2787-2804.
- [24] Yuan R Y, Dongzhi Z, Guo W, et al. Hepatoprotective effect of *Sophora moorcroftiana* (Benth.) Benth. x baker seeds *in vivo* and *in vitro* [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(6): 2535-2544.
- [25] 胡春晖, 张发斌. Box-Behnken 响应面法优化砂生槐子中总生物碱的提取工艺 [J]. *中成药*, 2016, 38(9): 2063-

- 2066.
- Hu C H, Zhang F B. Optimization of extraction process of total alkaloids from *Sophora Japonica* by box-behken response surface methodology [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(9): 2063-2066.
- [26] 甘雪辉, 胡春晖, 都涛, 等. 砂生槐子总生物碱水剂和生物黏附片的 pH 转换两步溶出实验及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 702-709.
- Gan X H, Hu C H, Du T, et al. Study on pH conversion two-step dissolution and pharmacokinetics of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* aqueous solution and biological adhesive tablets [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(4): 702-709.
- [27] Zhang X, Xu H, Bi X Y, et al. Src acts as the target of matrine to inhibit the proliferation of cancer cells by regulating phosphorylation signaling pathways [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 931.
- [28] Wang B L, Wang H H, Zhao Q, et al. Matrine induces hepatocellular carcinoma apoptosis and represses EMT and stemness through microRNA-299-3p/PGAM1 axis [J]. Growth Factors, 2022, 40(5/6): 200-211.
- [29] Ding Y Q, Li N, Sun J H, et al. Correction to: Oxymatrine inhibits bocavirus MVC replication, reduces viral gene expression and decreases apoptosis induced by viral infection [J]. Virol Sin, 2019, 34(6): 729.
- [30] Lou D, Fang Q, He Y H, et al. Oxymatrine alleviates high-fat diet/streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 J mice by modulating oxidative stress, inflammation and fibrosis [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116491.
- [31] Chan Y T, Wang N, Tan H Y, et al. Targeting hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis by natural products: Is it the dawning of a new era? [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 548.
- [32] Yang Y S, Wen D, Zhao X F. Sophocarpine can enhance the inhibiting effect of oxaliplatin on colon cancer liver metastasis-*in vitro* and *in vivo* [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(6): 1263-1274.
- [33] Wei S C, Xiao J S, Ju F, et al. A review on the pharmacology, pharmacokinetics and toxicity of sophocarpine [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1353234.
- [34] 李雪梅, 吴运光, 潘达鑫, 等. 新型抗肿瘤药槐定碱 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8): 654-657.
- Li X M, Wu Y G, Pan D X, et al. Sophoridine is a new antitumor medicine with new molecular structure [J]. Chin J New Drugs, 2006, 15(8): 654-657.
- [35] Zhao Z W, Zhang D K, Wu F Z, et al. Sophoridine suppresses lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma growth by inhibiting RAS/MEK/ERK axis via decreasing VEGFR2 expression [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 549-560.
- [36] Wang R, Liu H W, Shao Y Y, et al. Sophoridine inhibits human colorectal cancer progression via targeting MAPKAPK2 [J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(12): 2469-2479.
- [37] 孔宪梅, 都涛, 胡春晖, 等. 藏药砂生槐子总生物碱对血管内皮细胞新生血管生成的作用及对 VEGF-A、VEGF-R2 表达的影响 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2025, 46(1): 23-32.
- Kong X M, Du T, Hu C H, et al. Effects of total alkaloids from Xizang medicine *Sophora moorcroftiana* on the angiogenesis of vascular endothelial cells and the expression of VEGF-A and VEGF-R2 [J]. Chin High Alt Med Biol, 2025, 46(1): 23-32.
- [38] 胡春晖, 杨涛, 李永平, 等. 砂生槐子总生物碱纯化工工艺的优化 [J]. 中成药, 2016, 38(10): 2157-2162.
- Hu C H, Yang T, Li Y P, et al. Optimization of the purification of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* seeds [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(10): 2157-2162.
- [39] 胡春晖, 张发斌, 丁李, 等. 高效液相色谱法测定藏药砂生槐子中 4 种生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 430-434.
- Hu C H, Zhang F B, Ding L, et al. HPLC determination of four alkaloids in Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* seeds [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(3): 430-434.
- [40] Davalieva K, Kiprijanovska S, Dimovski A, et al. Comparative evaluation of two methods for LC-MS/MS proteomic analysis of formalin fixed and paraffin embedded tissues [J]. J Proteomics, 2021, 235: 104117.
- [41] Balázs A, Millar-Büchner P, Müllleder M, et al. Age-related differences in structure and function of nasal epithelial cultures from healthy children and elderly people [J]. Front Immunol, 2022, 13: 822437.
- [42] Mun D G, Vanderboom P M, Madugundu A K, et al. DIA-based proteome profiling of nasopharyngeal swabs from COVID-19 patients [J]. J Proteome Res, 2021, 20(8): 4165-4175.
- [43] Ren Y, Yu G, Shi C P, et al. Majorbio Cloud: A one-stop, comprehensive bioinformatic platform for multiomics analyses [J]. Imeta, 2022, 1(2): e12.
- [44] Tian W M, Zhang N, Jin R H, et al. Immune suppression in the early stage of COVID-19 disease [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5859.
- [45] Mooers B H M. Shortcuts for faster image creation in PyMOL [J]. Protein Sci, 2020, 29(1): 268-276.
- [46] 杜忠良, 崔东娟, 王利萍. 黄芩素抑制 HepG2 肝癌细

- 胞裸鼠移植瘤生长及其机制研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(11): 848-854.
- Du Z L, Cui D J, Wang L P. Inhibition effect and mechanisms of baicalein on the growth of HepG2 hepatocellular carcinoma cells xenograft model in nude mice and its mechanism [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2020, 27(11): 848-854.
- [47] 文丽梅, 张嘉伟, 陈樟, 等. 毛蕊花糖苷联合 Ly294002 对人肝细胞癌裸鼠移植瘤的协同增效作用研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(15): 904-911.
- Wen L M, Zhang J W, Chen Z, et al. Study on synergistic effect of acteoside combined with Ly294002 on transplanted human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2023, 30(15): 904-911.
- [48] Lin Z Y, Niu Y, Wan A, et al. RNA m(6) A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy [J]. EMBO J, 2020, 39(12): e103181.
- [49] 高攀, 潘汝翀, 张发斌, 等. 砂生槐子总生物碱生物粘附片与阿苯达唑联合用药治疗继发性小鼠泡球蚴病的疗效 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2021, 42(1): 47-52.
- Gao P, Pan R C, Zhang F B, et al. Therapeutic effects of bioadhesive tablets of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* and albendazole on secondary alveolar echinococcosis in mice [J]. Chin High Alt Med Biol, 2021, 42(1): 47-52.
- [50] Cai C Y, Yang D J, Cao Y, et al. Anticancer potential of active alkaloids and synthetic analogs derived from marine invertebrates [J]. Eur J Med Chem, 2024, 279: 116850.
- [51] Wang L, Jiang Q H, Chen S Y, et al. Natural epidithiodiketopiperazine alkaloids as potential anticancer agents: Recent mechanisms of action, structural modification, and synthetic strategies [J]. Bioorg Chem, 2023, 137: 106642.
- [52] Zhang D Q, Kanakkanthara A. Beyond the paclitaxel and Vinca Alkaloids: Next generation of plant-derived microtubule-targeting agents with potential anticancer activity [J]. Cancers, 2020, 12(7): 1721.
- [53] 杜海涛, 王琳, 丁洁, 等. 分子对接在中药开发的应用现状与挑战 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(3): 671-680.
- Du H T, Wang L, Ding J, et al. Application status and challenges of molecular docking in development of traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(3): 671-680.
- [54] 谢小青, 杨晓娟, 卢利霞, 等. 苦参碱通过 P38 MAPK 和 JNK 信号通路抑制肝癌细胞增殖的分子机制研究 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2022, 48(1): 38-43.
- Xie X Q, Yang X J, Lu L X, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by regulating P38 MAPK/JNK signaling pathways [J]. J Lanzhou Univ Med Sci, 2022, 48(1): 38-43.
- [55] Lei G, Mao C, Horbath A D, et al. BRCA1-mediated dual regulation of ferroptosis exposes a vulnerability to GPX4 and PARP co-inhibition in BRCA1-deficient cancers [J]. Cancer Discov, 2024, 14(8): 1476-1495.
- [56] Qian H, Shi J, Fan T T, et al. Sophocarpine attenuates liver fibrosis by inhibiting the TLR4 signaling pathway in rats [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1822-1832.
- [57] 吴黎川, 谈振凯, 覃业浩, 等. 槐定碱衍生物抑制肝癌细胞迁移与侵袭研究 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2025, 43(2): 207-220.
- Wu L C, Tan Z K, Qin Y H, et al. Sophoridine derivative against liver cancer cell migration and invasion [J]. J Guangxi Norm Univ Nat Sci Ed, 2025, 43(2): 207-220.
- [58] Zhang H, Yang L Y, Wang Y C, et al. Oxymatrine alleviated hepatic lipid metabolism via regulating miR-182 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Life Sci, 2020, 257: 118090.
- [59] Shuken S R. An introduction to mass spectrometry-based proteomics [J]. J Proteome Res, 2023, 22(7): 2151-2171.
- [60] Risha Y, Minic Z, Ghobadloo S M, et al. The proteomic analysis of breast cell line exosomes reveals disease patterns and potential biomarkers [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13572.
- [61] Cang S, Liu R, Jin W, et al. Integrated DIA proteomics and lipidomics analysis on non-small cell lung cancer patients with TCM syndromes [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 126.
- [62] Driskill J H, Pan D J. The hippo pathway in liver homeostasis and pathophysiology [J]. Annu Rev Pathol, 2021, 16: 299-322.
- [63] Gao R Z, Kalathur R K R, Coto-Llerena M, et al. YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to Sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis [J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(12): e14351.
- [64] Stribbling S M, Ryan A J. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research [J]. Nat Protoc, 2022, 17(9): 2108-2128.
- [65] Wang Y, Dong L Y, Zhong H, et al. Extracellular vesicles (EVs) from lung adenocarcinoma cells promote human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) angiogenesis through yes kinase-associated protein (YAP) transport [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(10): 2110-2118.
- [66] Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: Opportunities and challenges [J]. Nat Rev Clin Oncol,

- 2018, 15(5): 325-340.
- [67] Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García M P, et al. Comparison of the behavior of perivascular cells (pericytes and CD34⁺ stromal cell/telocytes) in sprouting and intussusceptive angiogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9010.
- [68] Li L T, Jiang G, Chen Q, et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review) [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1566-1572.
- [69] Boughey J C, Hoskin T L, Goetz M P. Neoadjuvant chemotherapy and nodal response rates in luminal breast cancer: Effects of age and tumor Ki67 [J]. Ann Surg Oncol, 2022, 29(9): 5747-5756.

[责任编辑 兰新新]



• 公益广告 •

