

秦皮素通过下调 p70S6K 抑制人黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭研究

兰楠¹, 吕志阳¹, 周雨晴², 韩延南¹, 王明心¹, 彭忠禄^{2*}, 樊竑冶^{1*}

1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

2. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423099

摘要: 目的 研究秦皮素对人黑色素瘤 A375 细胞的增殖、迁移、侵袭的影响及其作用机制。方法 A375 细胞给予秦皮素和核糖体 S6 蛋白激酶 (ribosome S6 protein kinase, P70S6K) 抑制剂 PF-4708671 进行干预, 采用细胞计数法考察秦皮素和 PF-4708671 对 A375 细胞增殖能力的影响; 采用 Western blotting 法检测秦皮素和 PF-4708671 对 mTORC1/p70S6K/S6 通路关键蛋白及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的影响; 采用细胞划痕实验和 Transwell 实验考察秦皮素和 PF-4708671 对 A375 细胞迁移和侵袭的影响。结果 秦皮素与 PF-4708671 均可显著抑制 A375 细胞的增殖、迁移和侵袭 ($P < 0.05$ 、 0.01)。秦皮素与 PF-4708671 均显著抑制 p70S6K/S6 通路活性, 下调间质细胞标志蛋白和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 秦皮素可能通过下调 p70S6K 抑制 A375 细胞的增殖、迁移与侵袭。

关键词: 秦皮素; 黑色素瘤; A375 细胞; p70S6K; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6254-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.015

Fraxetin inhibits proliferation, migration and invasion of human melanoma cells by down-regulating p70S6K

LAN Nan¹, LYU Zhi-yang¹, ZHOU Yu-qing², HAN Yan-nan¹, WANG Ming-xin¹, PENG Zhong-lu², FAN Hong-ye¹

1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. School of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423099, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of fraxetin on proliferation, migration and invasion of human melanoma A375 cells. **Methods** A375 cells were treated with fraxetin and ribosomal S6 protein kinase (P70S6K) inhibitor PF-4708671 for intervention, the effect of fraxetin and PF-4708671 on proliferation of A375 cells was measured by cell counting. Western blotting was used to detect the effect of fraxetin and PF-4708671 on expressions of mTORC1/p70S6K/S6 signaling pathway key proteins and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins in A375 cells. Wound healing assay and Transwell assay were used to detect the effect of fraxetin and PF-4708671 on migration and invasion of A375 cells. **Results** Fraxetin and PF-4708671 significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of A375 cells ($P < 0.05$, 0.01). Fraxetin and PF-4708671 significantly inhibited the p70S6K/S6 pathway activity, down-regulated the expressions of mesenchymal proteins and matrix metalloproteinases ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Fraxetin may inhibit the proliferation, migration and invasion of A375 cells by down-regulating p70S6K.

Key words: fraxetin; melanoma; A375 cells; p70S6K; proliferation; migration; invasion

黑色素瘤是一种侵袭性强、致死率高的恶性皮肤癌。转移是造成黑色素瘤致死率高的主要原因之一^[1]。黑色素瘤对传统治疗手段易产生耐药性且预后差, 其发病率和死亡率逐年升高^[2]。虽然近年来

靶向治疗和免疫疗法取得了一些进展, 但其疗效有限^[3-4], 因此亟待开发新的药物和方法治疗黑色素瘤。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是细胞生长和代谢的主要调节

收稿日期: 2021-03-02

基金项目: 湖南省药学会应用特色学科资金资助项目 (湘教通[2018]469号); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010316013G)

作者简介: 兰楠 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤与免疫。Tel: 17302518763 E-mail: 17302518763@163.com

*通信作者: 樊竑冶, 女, 博士, 副教授, 主要从事细胞与分子免疫研究。E-mail: changqingshu2004@126.com

彭忠禄, 男, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤与免疫研究。E-mail: pengzhonglu@163.com

因子,可感知和整合多种营养和环境因素来平衡营养供应并调控细胞生长。mTORC1蛋白复合物由mTOR和其他组分组成,具有促进合成代谢的作用,而核糖体蛋白S6的磷酸化常被用来指示mTORC1的活性^[5]。mTOR信号转导异常见于多种癌症,并与癌症的耐药性、转移、侵袭及预后等密切相关,S6的过度磷酸化与恶性黑色素瘤显著相关^[6]。此外,mTORC1通过激活核糖体S6蛋白激酶(ribosome S6 protein kinase, P70S6K)诱导黑色素瘤发生上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[7]。尽管雷帕霉素已用于治疗胰腺癌,但雷帕霉素、依维莫司和替西罗莫司(mTORC1抑制剂)等在临床试验中缺乏对黑色素瘤的客观反映^[8]。

秦皮素是从中药秦皮中提取出的一种天然香豆素类化合物,具有抗菌、抗氧化、神经保护和肿瘤抑制等多种药理学活性,具有良好的药物研究和临床应用价值^[9]。秦皮素对乳腺癌、非小细胞肺癌、结肠腺癌等肿瘤细胞的增殖、迁移具有明显的抑制或促凋亡作用^[10-12],但其对黑色素瘤细胞的作用鲜有报道。本研究探讨了秦皮素对人黑色素瘤A375细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制,为秦皮素治疗黑色素瘤的临床应用提供理论支持与参考。

1 材料

1.1 细胞

A375细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

秦皮素(质量分数>98%,批号B20990)购自上海源叶生物公司;p70S6K特异性抑制剂PF-4708671(质量分数>99%,批号HY-15773)购自美国MedChemExpress公司;DMEM培养基(批号8121025)、胎牛血清(批号2232246)购自美国Gibco公司;Matrigel基质胶(批号9168007)、Transwell小室(批号07920027)购自美国Corning公司;p-mTOR抗体(批号11221)购自美国Signalway Antibody公司;p70S6K抗体(批号2708)、p-p70S6K抗体(批号9234)、S6抗体(批号2217)、p-S6抗体(批号2211)购自美国CST公司;基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP2)抗体(批号AB92536)购自英国Abcam公司;MMP9抗体(批号00673298)、vimentin抗体(批号6619511)购自美国Affinity Biosciences公司;N-cadherin抗体(批号00059228)、HPR标记的羊抗兔IgG抗体(批号SA00001-4)购自美国Proteintech Group公司;

β -actin抗体(批号AB0035)购自上海Abways Technology公司。

1.3 仪器

311型气套CO₂培养箱、MSC Advantage 1.5生物安全柜(美国Thermo Fisher Scientific公司);ECLIPSE Ts2倒置显微镜(日本Nikon公司);Mini-Protein Tetra垂直电泳槽、湿式转印槽(美国Bio-Rad公司);5200 Multi化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

A375细胞用含10%胎牛血清、100 μ g/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基,于37 $^{\circ}$ C、95%相对湿度、5% CO₂恒温培养箱中培养。

2.2 细胞计数法检测细胞增殖

取处于对数生长期的A375细胞,以 2.5×10^5 /mL接种至96孔板中,200 μ L/孔,培养过夜,待细胞贴壁后加入药物,使秦皮素终浓度为25、50、100、200 μ mol/L,对照组加入含有等体积药物溶媒的培养基。每个浓度设置3个复孔,继续培养48 h后,弃去培养基,胰酶消化后用血球计数板对每孔细胞密度进行计数,计算每孔细胞数量。

2.3 细胞克隆形成实验

取处于对数生长期的A375细胞,以500/孔接种于6孔板中,培养48 h后加入药物,使秦皮素终浓度为40、60、80 μ mol/L,对照组加入含有等体积药物溶媒的培养基。每3天更换培养基和药物,当培养皿中出现肉眼可见的克隆斑时(约14 d)停止培养;弃去培养液,用PBS溶液洗涤2次后加入1.5 mL 4%多聚甲醛固定30 min,再用0.1%结晶紫染液染色20 min后流水清洗,待其自然风干后,拍照记录。

2.4 Western blotting实验

收集对照组及不同浓度秦皮素或PF-4708671(10 μ mol/L)处理48 h后的A375细胞,加入含PMSF的RIPA裂解液提取蛋白,经BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后,加入上样缓冲液煮沸变性10 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,加入封闭液封闭1 h,分别加入对应的抗体于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗涤3次,10 min/次,再加入HPR标记的羊抗兔IgG抗体(1:10 000)于室温孵育2 h, TBST洗涤3次,滴加ECL化学发光液,采用凝胶成像仪显影。

2.5 细胞划痕实验

A375细胞接种于6孔板,待细胞长满时,用灭

菌的 200 μL 枪头垂直于皿底划线, 每孔划 3 道划痕, PBS 清洗 3 次, 加入含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 加入药物使秦皮素终浓度为 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$, PF-4708671 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入含有等体积药物溶媒的培养基, 继续培养 48 h, 于显微镜下拍照, 使用 Image J 软件分析 0 h 和 48 h 所拍照片的划痕面积, 计算划痕愈合率。

划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积

2.6 细胞侵袭实验

用预冷的 DMEM 培养基稀释 Matrigel 基质胶至 230 $\mu\text{g/mL}$, 吸取 100 μL Matrigel 基质胶铺入 Transwell 上室, 于培养箱放置 4 h。取处于对数生长期的 A375 细胞, 调整密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 加入药物使秦皮素终浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 、PF-4708671 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入含有等体积药物溶媒的培养基。吸取 100 μL 上述无血清细胞悬液于 Transwell 上室, 下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的培养基, 培养 18 h。Transwell 小室经 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 用 0.1% 结晶紫染液染色 20 min, 用湿润的棉签擦除 Transwell 膜上层的细胞, 自然风干后, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 秦皮素对 A375 细胞增殖和克隆形成的影响

如图 1-A 所示, 不同浓度秦皮素 (25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A375 细胞 48 h 后, 与对照组比较, 秦皮素显著抑制 A375 细胞的增殖 ($P < 0.05$ 、

0.01), 且呈剂量相关性。经计算, 秦皮素作用于 A375 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 98.03 $\mu\text{mol/L}$, 因此选用 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的秦皮素进行后续实验。细胞克隆形成实验结果见图 1-B, 与对照组比较, 秦皮素显著抑制 A375 细胞克隆形成率 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。表明秦皮素能够抑制 A375 细胞的增殖和克隆形成能力。

3.2 秦皮素对 A375 细胞 p70S6K/S6 信号通路相关蛋白表达的影响

mTORC1/p70S6K/S6 信号通路影响细胞的存活、增殖, 且该通路在黑色素瘤中异常活化。如图 2 所示, 秦皮素 (40、60、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A375 细胞 48 h 后, 对 mTOR 蛋白的磷酸化水平无影响, 但显著下调 p70S6K 及 S6 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 提示秦皮素可能通过抑制 p70S6K/S6 信号通路来抑制 A375 细胞的增殖和克隆形成能力。

3.3 PF-4708671 对秦皮素抑制 A375 细胞增殖和 p70S6K/S6 信号通路相关蛋白表达的影响

为探究秦皮素是否通过 p70S6K/S6 信号通路影响 A375 细胞增殖, 给予秦皮素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 或 p70S6K 特异性抑制剂 PF-4708671 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h, 细胞计数结果见图 3-A, PF-4708671 和秦皮素均可显著抑制 A375 细胞增殖 ($P < 0.01$)。如图 3-B 所示, PF-4708671 显著上调 p70S6K 蛋白磷酸化水平 ($P < 0.01$), 同时下调 S6 蛋白磷酸化水平 ($P < 0.01$), 与文献报道一致^[13]。提示秦皮素可能通过下调 p70S6K/S6 抑制 A375 细胞增殖。

3.4 秦皮素对 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

mTORC1/p70S6K/S6 信号通路与 EMT 相关, 如图 4 所示, 秦皮素 (40、60、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理

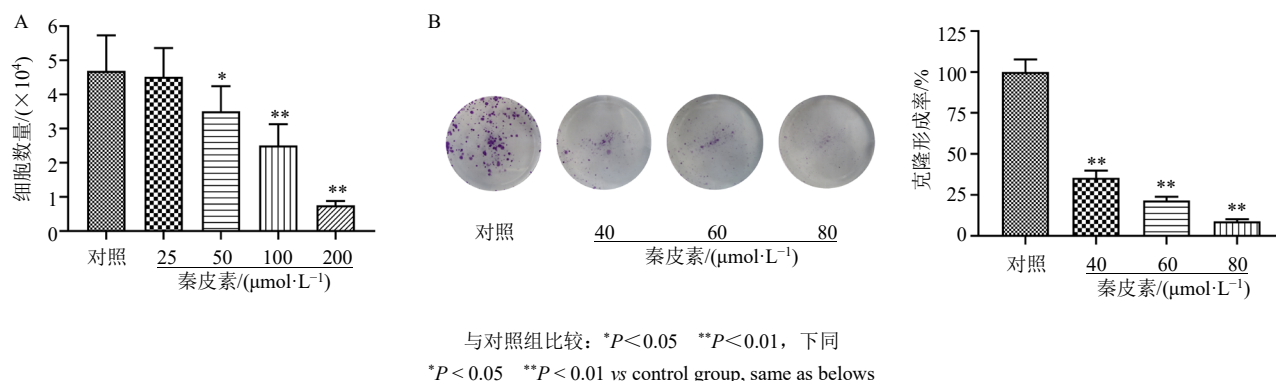


图 1 秦皮素对 A375 细胞增殖 (A) 和克隆形成 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of fraxetin on proliferation (A) and clonality (B) of A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

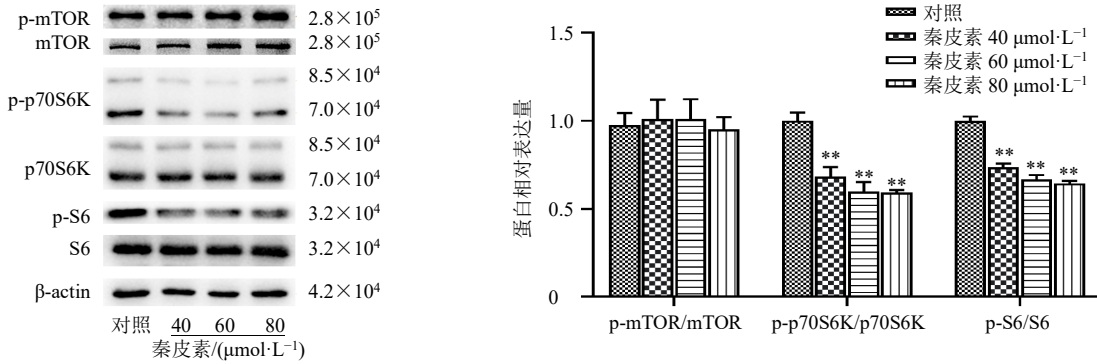


图2 秦皮素对 A375 细胞 p70S6K/S6 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of fraxetin on p70S6K/S6 signaling pathway related proteins expressions in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

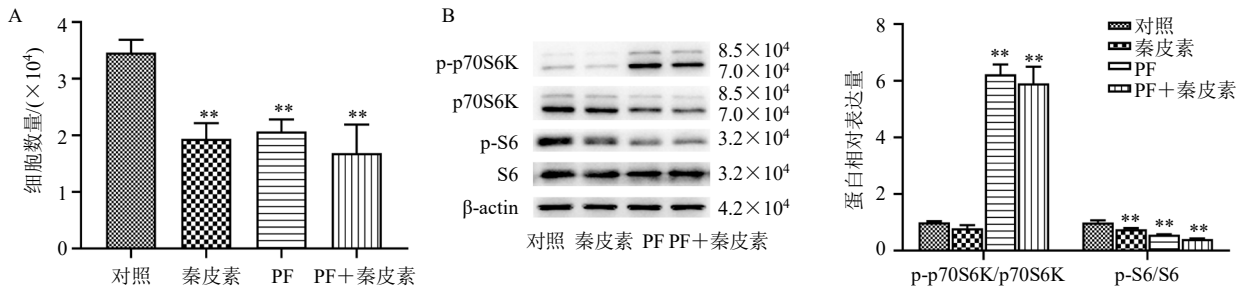


图3 PF-4708671 对秦皮素抑制 A375 细胞增殖 (A) 和 p70S6K/S6 信号通路相关蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of PF-4708671 on inhibition of fraxetin on proliferation (A) and p70S6K/S6 signaling pathway related proteins expressions (B) in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

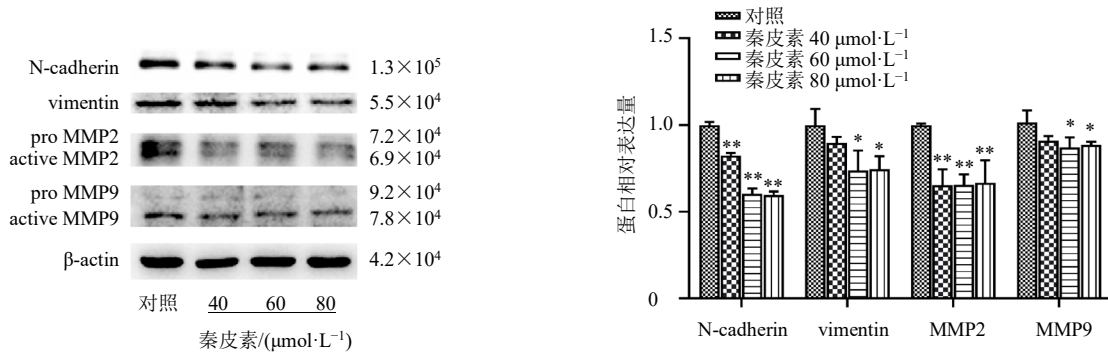


图4 秦皮素对 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of fraxetin on EMT-related proteins expressions in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A375 细胞 48 h 后, 显著下调间质细胞标志物 (N-cadherin、vimentin) 以及 MMP2、MMP9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示秦皮素可能通过影响 EMT 相关蛋白表达抑制 A375 细胞的迁移和侵袭能力。

3.5 PF-4708671 对秦皮素抑制 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 秦皮素 (80 μmol/L) 和 PF-4708671 (10 μmol/L) 处理 A375 细胞 48 h

后, 均显著下调 N-cadherin、vimentin、MMP2、MMP9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示秦皮素可能通过 p70S6K/S6 信号通路影响 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达。

3.6 秦皮素和 PF-4708671 对 A375 细胞迁移的影响

为探究秦皮素对 A375 细胞迁移能力的影响, 同时避免秦皮素的细胞增殖抑制作用对实验结果的干扰, 细胞划痕实验时培养基的血清浓度为 1%。如图 6 所示, 经秦皮素 (40、60、80 μmol/L) 和

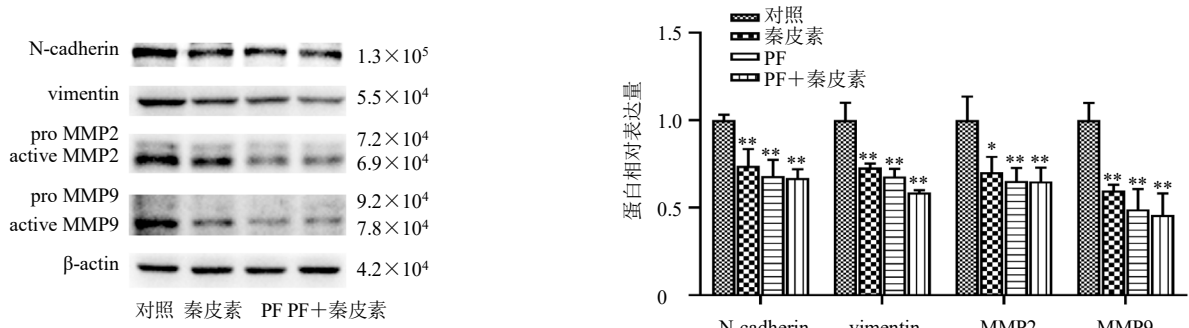


图5 PF-4708671对秦皮素抑制A375细胞EMT相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of PF-4708671 on inhibition of fraxetin on EMT-related proteins expressions in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

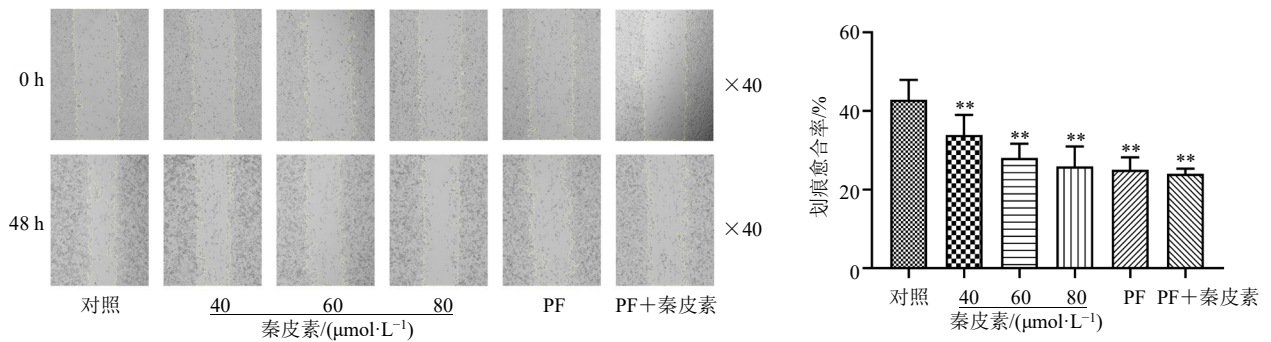


图6 秦皮素和PF-4708671对A375细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of fraxetin and PF-4708671 on migration of A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PF-4708671 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, A375 细胞划痕愈合率显著降低 ($P < 0.01$), 提示秦皮素可能通过 p70S6K/S6 信号通路抑制 A375 细胞迁移。

3.7 秦皮素和 PF-4708671 对 A375 细胞侵袭的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 经秦皮素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 和 PF-4708671 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, A375 细胞转至 Transwell 下室的数量显著降低 ($P < 0.01$), 且二者联用时转移至下室的细胞进一步减少 ($P < 0.01$), 提示秦皮素可能通过 p70S6K/S6 信号通路抑制 A375 细胞的侵袭能力。

4 讨论

黑色素瘤细胞具有增殖速度快、侵袭和转移潜能强、早期易转移等特点。本研究发现, 秦皮素通过抑制 p70S6K 和 S6 的磷酸化水平, 有效地抑制了人黑色素瘤 A375 细胞的增殖、迁移和侵袭, 提示秦皮素有治疗黑色素瘤的潜质。

转移是导致黑色素瘤患者死亡的主要原因。黑色素瘤细胞在转移之前通常会经历 EMT, 表现为上皮细胞特性逐渐消失, 并出现间质细胞特征, 而发生 EMT 的肿瘤细胞更容易发生迁移和侵袭^[14]。

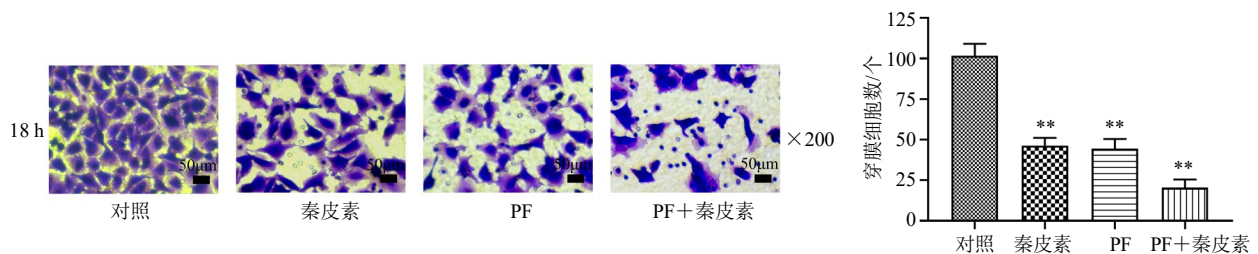


图7 秦皮素和PF-4708671对A375细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of fraxetin and PF-4708671 on invasion of A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

N-cadherin 和 vimentin 是间质细胞标志蛋白,其蛋白表达水平的升高是细胞发生 EMT 的重要特征。N-cadherin 是一种黏附分子,主要介导细胞与细胞间的动态黏附。N-cadherin 表达上调可增强多种上皮癌细胞在体外的迁移和侵袭能力^[15-17]。Vimentin 是中间纤维蛋白最主要的组成成分,与微管、微丝共同构成细胞骨架,参与调控细胞黏附、细胞形状变化和迁移速度。研究表明,在 EMT 过程中,vimentin 表达增加导致细胞黏附性减弱、细胞形态改变、细胞运动性增强^[18]。MMP2 和 MMP9 可促进基底膜以及胞外基质中明胶和胶原蛋白降解,增强细胞侵袭能力;在发生 EMT 的黑色素瘤细胞中,MMPs 表达上调^[19]。本研究发现,秦皮素抑制了 A375 细胞中 N-cadherin、vimentin、MMP2 和 MMP9 蛋白表达,提示秦皮素可能通过抑制 A375 细胞的 EMT 来抑制细胞的迁移和侵袭,从而阻止黑色素瘤细胞转移。

p70S6K 是属于 AGC 激酶家族的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可以被不同的生长因子或胰岛素样因子通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /mTOR 通路磷酸化^[20]。S6 是核糖体 40S 亚基的重要蛋白质组成成分,是 p70S6K 激酶下游的重要靶蛋白。p70S6K/S6 信号通路对肿瘤细胞的增殖、存活、细胞周期进展等有重要作用。抑制 p70S6K 可抑制乳腺癌细胞迁移^[21];敲除 p70S6K 会抑制神经胶质瘤细胞增殖及裸鼠中肿瘤形成^[22];敲除 S6 可以抑制上皮性卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[23]。本研究发现,秦皮素以 p-mTOR 非依赖性的方式下调了 p70S6K 和 S6 的磷酸化水平。为研究秦皮素对 A375 细胞的作用是否依赖于 p70S6K 激酶活性,使用 p70S6K 的特异性抑制剂 PF-4708671 进行对照实验,发现 PF-4708671 上调了 p70S6K 蛋白的磷酸化水平,下调了 S6 蛋白的磷酸化水平,与文献报道一致^[13];PF-4708671 抑制了 A375 细胞的增殖、迁移、侵袭,与秦皮素效果类似,表明秦皮素可能通过 p70S6K/S6 信号通路抑制 A375 细胞的增殖、迁移和侵袭。

p-mTOR 上调表明 mTORC1 活性增加,mTORC1 可以直接磷酸化下游蛋白 p70S6K。本研究结果显示,秦皮素上调 p-mTOR 蛋白表达,下调 p-p70S6K 和 p-S6 蛋白表达。由于蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 是 mTOR 的上游激酶,而 p-S6 能够负反馈抑制 Akt 活性^[24],因此当秦皮素下调 p-S6

表达后,其对 Akt 的负反馈抑制作用解除,导致 mTOR 被活化即 p-mTOR 上调。推测秦皮素可能通过与 mTORC1 或其调控因子结合而抑制 mTORC1 活性,从而影响其对 p70S6K 的磷酸化;秦皮素在抑制 mTORC1 活性的同时累积了 mTOR 在 S2448 位点的磷酸化。秦皮素对 mTORC1/p70S6K/S6 信号通路的具体调控机制仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Leonardi G C, Falzone L, Salemi R, *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(4): 1071-1080.
- [2] McCubrey J A, Steelman L S, Kempf C R, *et al.* Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11): 2762-2781.
- [3] Malas S, Harrasser M, Lacy K E, *et al.* Antibody therapies for melanoma: New and emerging opportunities to activate immunity (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 875-886.
- [4] Ascierto P A, McArthur G A, Dréno B, *et al.* Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): Updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(9): 1248-1260.
- [5] Hua H, Kong Q B, Zhang H Y, *et al.* Targeting mTOR for cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 71.
- [6] Karbowiczek M, Spittle C S, Morrison T, *et al.* mTOR is activated in the majority of malignant melanomas [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(4): 980-987.
- [7] Pearlman R L, Montes de Oca M K, Pal H C, *et al.* Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma [J]. *Cancer Lett*, 2017, 391: 125-140.
- [8] Strickland L R, Pal H C, Elmets C A, *et al.* Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals [J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(1): 20-35.
- [9] 杨炳友, 闫明宇, 潘娟, 等. 秦皮化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2016, 33(6): 116-119.
- [10] Liu G D, Liu Z F, Yan Y X, *et al.* Effect of fraxetin on proliferation and apoptosis in breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7374-7378.
- [11] Zhang Y, Wang L, Deng Y, *et al.* Fraxetin suppresses proliferation of non-small-cell lung cancer cells via preventing activation of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2019, 248(1): 3-12.

- [12] Ren S, Xing Y, Wang C, *et al.* Fraxetin inhibits the growth of colon adenocarcinoma cells via the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signalling pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 125: 105777.
- [13] Pearce L R, Alton G R, Richter D T, *et al.* Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1) [J]. *Biochem J*, 2010, 431(2): 245-255.
- [14] Pearlman R L, Montes de Oca M K, Pal H C, *et al.* Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma [J]. *Cancer Lett*, 2017, 391: 125-140.
- [15] Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9): 3819-3825.
- [16] Shintani Y, Hollingsworth M A, Wheelock M J, *et al.* Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11745-11753.
- [17] Klymenko Y, Kim O, Loughran E, *et al.* Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis [J]. *Oncogene*, 2017, 36(42): 5840-5851.
- [18] Sharma P, Alsharif S, Fallatah A, *et al.* Intermediate filaments as effectors of cancer development and metastasis: A focus on keratins, vimentin, and nestin [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 497.
- [19] Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31(Sup1): 177-183.
- [20] Tavares M R, Pavan I C B, Amaral C L, *et al.* The S6K protein family in health and disease [J]. *Life Sci*, 2015, 131: 1-10.
- [21] Khotskaya Y B, Goverdhan A, Shen J, *et al.* S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(4): 361-376.
- [22] Nakamura J L, Garcia E, Pieper R O. S6K1 plays a key role in glial transformation [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6516-6523.
- [23] Yang X, Xu L, Yang Y E, *et al.* Knockdown of ribosomal protein S6 suppresses proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 100.
- [24] Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 179-183.

[责任编辑 李亚楠]