

基于 TGF-β1 信号通路研究小檗碱联合芒柄花黄素抑制鼻咽癌细胞迁移的作用机制

刘 洁^{1,2}, 史红健^{1,2,3}, 范婧莹^{1,2,3}, 周芳亮^{1,2,3}, 罗晶婧^{1,2,3}, 程 博^{2,3,4}, 王贤文^{2,3,4}, 何迎春^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410021

摘要: 目的 研究小檗碱联合芒柄花黄素对鼻咽癌细胞迁移的影响, 探讨转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 信号通路在其效应中的作用。方法 采用实时无标记细胞功能分析仪监测小檗碱和芒柄花黄素单用及联合使用对鼻咽癌 5-8F、6-10B 细胞增殖的影响; 采用划痕实验和 Transwell 实验检测 TGF-β1 信号通路激活后, 小檗碱联合芒柄花黄素抑制细胞迁移效应的变化; 采用 Western blotting 检测 TGF-β1 信号通路关键蛋白和迁移相关蛋白的表达。结果 与对照组比较, 小檗碱和芒柄花黄素单用可抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖, 小檗碱 (5、10 μmol/L) 和芒柄花黄素 (5、10 μmol/L) 联合作用于 5-8F 和 6-10B 细胞后, 显示小檗碱联合芒柄花黄素抑制鼻咽癌细胞增殖以协同效应为主; 小檗碱联合芒柄花黄素显著降低鼻咽癌细胞 TGF-β1 和 Smad3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。采用 TGF-β1 激活 TGF-β1 信号通路后, 小檗碱联合芒柄花黄素抑制鼻咽癌细胞迁移的效应显著降低 ($P < 0.01$); 与小檗碱 10 μmol/L + 芒柄花黄素 10 μmol/L 组相比, TGF-β1 + 小檗碱 + 芒柄花黄素组细胞 TGF-β1、Smad3、磷酸化细胞外调节激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2, p-ERK1/2) 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (vimentin) 表达水平升高, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达水平降低 ($P < 0.01$)。结论 小檗碱联合芒柄花黄素能够协同抑制鼻咽癌细胞迁移, 其作用机制可能与抑制 TGF-β1 信号通路有关。

关键词: 鼻咽癌细胞; 小檗碱; 芒柄花黄素; 细胞迁移; 转化生长因子-β1 信号通路; 协同效应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2022)10 - 3053 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.015

Mechanism of berberine combined with formononetin on inhibiting migration of nasopharyngeal carcinoma cells based on TGF-β1 signaling pathway

LIU Jie^{1,2}, SHI Hong-jian^{1,2,3}, FAN Jing-ying^{1,2,3}, ZHOU Fang-liang^{1,2,3}, LUO Jing-jing^{1,2,3}, CHENG Bo^{2,3,4}, WANG Xian-wen^{2,3,4}, HE Ying-chun^{1,2,3}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Engineering and Technological Research Center of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine and Visual Function Protection, Changsha 410208, China

4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021, China

Abstract: Objective To study the effect of berberine combined with formononetin on migration of nasopharyngeal carcinoma cells and explore the role of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) signaling pathway in its effect. **Methods** Effects of berberine and formononetin on proliferation of nasopharyngeal carcinoma 5-8F and 6-10B cells were detected by real time cellular analysis technology;

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874408); 国家自然科学基金资助项目 (81973914); 湖南省中医药管理局项目 (2021014, 2021174, 2021184)

作者简介: 刘 洁, 在读博士, 研究方向为中医药防治耳鼻喉疾病。E-mail: 1365524527@qq.com

*通信作者: 何迎春, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治耳鼻喉疾病。E-mail: yingchunhe@aliyun.com

Inhibition of cell migration by berberine combined with formononetin after activation of TGF- β 1 signaling pathway was detected by scratch and Transwell migration assay; Expressions of key proteins in TGF- β 1 signaling pathway and migration related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, berberine and formononetin alone inhibited the proliferation of 5-8F and 6-10B cells. When 5-8F and 6-10B cells were treated with berberine (5, 10 μ mol/L) and formononetin (5, 10 μ mol/L), inhibitory effect of berberine and formononetin on proliferation were mainly synergistic. Berberine combined with formononetin could reduce the expressions of TGF- β 1 and Smad3 in nasopharyngeal carcinoma cells ($P < 0.05, 0.01$). After TGF- β 1 signaling pathway was activated by TGF- β 1, inhibitory effect of berberine combined with formononetin on nasopharyngeal carcinoma cells migration was decreased ($P < 0.01$). And expressions of TGF- β 1, Smad3, phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK1/2) in TGF- β 1+ berberine + formononetin group was up-regulated ($P < 0.05, 0.01$), N-cadherin and vimentin protein expressions were up-regulated, while E-cadherin protein expression was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Berberine combined with formononetin can synergistically inhibit the migration of nasopharyngeal carcinoma cells, its mechanism may be related to the inhibition of TGF- β 1 signaling pathway.

Key words: nasopharyngeal carcinoma cells; berberine; formononetin; cell migration; transforming growth factor- β 1 signaling pathway; synergistic effect

鼻咽癌在我国南方高发,是起源于鼻咽黏膜上皮的头颈部恶性肿瘤。目前,鼻咽癌的治疗方法主要有放疗、化疗、分子靶向治疗、免疫疗法、手术治疗等^[1],但这些疗法仍有其局限性,复发和转移仍是鼻咽癌患者死亡的主要因素。长期经验和研究表明,中医药在防治鼻咽癌过程中疗效显著,安全性高,且能够改善放化疗不良反应,增强放化疗敏感性^[2-3]。

本研究选取的单体小檗碱和芒柄花黄素是抗鼻咽癌复方益气解毒方^[4]君药黄连和黄芪的主要活性成分之一,小檗碱是一种异喹啉类生物碱,是抗肿瘤中药黄连的主要活性成分^[5],黄连苦寒,归心、脾、胃、肝、胆、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,广泛应用于湿疹湿疮、消渴、血热出血、痈肿疔疮等多种疾病;小檗碱联合人参皂苷 Rg₃能够抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡^[6]。芒柄花黄素是一种植物雌激素,是黄芪的主要活性成分,黄芪味甘,微温,归脾、肺经,具有固表益卫、利水消肿、补气生阳和托毒生肌之功效,为扶正固本的常用中药。在肿瘤研究中,芒柄花黄素能够发挥抗氧化、抑制肿瘤血管生成、调控信号转导、改善机体微环境等作用^[7],且能诱导鼻咽癌细胞凋亡^[8]。研究表明,中药单体联合应用能够增强抗肿瘤细胞增殖、抑制迁移和侵袭等作用^[9],据此推测小檗碱与芒柄花黄素联合应用抑制鼻咽癌细胞增殖和迁移效果较单药更佳。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)主要参与细胞增殖、分化及免疫调节等过程,既可以在正常细胞中参与细胞正常生理过程,当肿瘤发生时,又可以作为促肿瘤因子推动肿瘤细胞的恶化,参与细胞外基质降解、上皮间质转化、新生血管生成,提高恶性肿瘤迁移和侵袭能力。大

量研究表明, TGF- β 与肿瘤细胞转移过程特别是上皮间质化过程关系密切,促进鼻咽癌细胞产生免疫逃逸,发生转移^[10-11];且研究发现,小檗碱和芒柄花黄素均可通过调控 TGF- β 相关信号通路发挥抗肿瘤作用^[12-14]。因此,本研究通过探讨小檗碱联合芒柄花黄素对鼻咽癌细胞中 TGF- β 1信号通路的影响,对研究鼻咽癌转移的机制及防治有重要意义。

目前,国内外研究主要围绕中药单体单用或联合化疗药开展研究,而2个单体联合运用的研究报道较少,已有研究发现单体联合治疗肿瘤较单药效果更好^[6],因此,本研究以高转移潜能的5-8F细胞和低转移潜能的6-10B细胞为研究对象,拟观察小檗碱联合芒柄花黄素对鼻咽癌细胞增殖的影响,明确2药联用抗鼻咽癌细胞效应;并加入 TGF- β 1信号通路激活剂确定小檗碱联合芒柄花黄素是否通过抑制 TGF- β 1信号通路调控下游蛋白E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin),从而发挥抑制鼻咽癌细胞迁移的效应。

1 材料

1.1 细胞株

人鼻咽癌细胞株 5-8F、6-10B 购自商城北纳联生物科技有限公司,由本实验室传代培养。

1.2 药品与试剂

对照品小檗碱(批号 S01A10K94340,质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花黄素(批号 H06S9Z69494,质量分数 $\geq 98\%$)、4%多聚甲醛组织细胞固定液(批号 21238567)购自上海源叶生物科技有限公司;5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu,批号 M19018073)购自大连美仑生物技术有限公司;TGF- β 1(批号 1218209)购自美国 PeproTech 公司;TGF- β 受体1型抑制剂

LY3200882(批号 C24H29N5O3)购自美国 Targetmol 公司;胎牛血清(批号 42A0378K)购自美国 Gibco 公司;RPMI 1640 培养基(批号 AE24464298)购自美国 Hyclone 公司;结晶紫染色液(批号 625O041)购自北京索莱宝科技有限公司;磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2, p-ERK1/2)抗体(批号 24)、 β -actin 抗体(批号 18)购自美国 CST 公司;TGF- β 1 抗体(批号 GR3252552-1)、E-cadherin 抗体(批号 GR3209210-8)、N-cadherin 抗体(批号 GR3245174-3)、vimentin 抗体(批号 GR3230520-16)购自英国 Abcam 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗鼠抗体(批号 D00115-03)、HRP 标记的山羊抗兔抗体(批号 C70426-05)购自美国 Licor 公司。

1.3 仪器

CKX31 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);HERAcell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);5415R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);AL104 型电子分析天平(美国 Mettler Toledo 公司);xCELLigence RTCA DPlus 实时无标记细胞功能分析仪(real time cellular analysis technology, RTCA, 艾森生物科技公司);Odyssey CLx 双色红外荧光成像系统(美国 Licor 公司);Cytation™ 5 细胞成像多功能检测系统(美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 RTCA 监测细胞增殖

实验分组如下:对照组、小檗碱(5、10、20、40 μ mol/L)组及芒柄花黄素(5、10、20、40 μ mol/L)组和 5-Fu (2 μ g/mL)组。在 RTCA 专用培养板中加入 50 μ L 培养液,置于 RTCA 测量基线,取处于对数生长期的细胞制成 5000 个/mL 的细胞悬液,接种于培养板中,设置参数,开始监测。在细胞生长到达平台期之前加入不同浓度药物后继续监测。

根据实验结果选取小檗碱和芒柄花黄素的联用浓度(小檗碱 5 μ mol/L+芒柄花黄素 5 μ mol/L、小檗碱 5 μ mol/L+芒柄花黄素 10 μ mol/L、小檗碱 10 μ mol/L+芒柄花黄素 5 μ mol/L、小檗碱 10 μ mol/L+芒柄花黄素 10 μ mol/L),采用 RTCA 监测联合用药对 5-8F、6-10B 细胞增殖的影响。运用 CompuSyn 软件分析联合指数(combination index, CI)值,大于 1 视为拮抗效应,等于 1 为叠加效应,小于 1

为协同效应^[15]。

2.2 划痕实验检测细胞迁移

实验分组如下:对照组、TGF- β 1 (10 ng/mL)组、TGF- β 1+小檗碱(10 μ mol/L)+芒柄花黄素(10 μ mol/L)组、小檗碱(10 μ mol/L)+芒柄花黄素(10 μ mol/L)组和 LY3200882 (10 μ mol/L)组。将细胞划痕插件置于 24 孔板中,常规消化细胞后收集沉淀,用 RPMI 1640 基础培养液重悬细胞,调整密度至 1×10^5 个/mL,将悬液加入插件孔内及外周,待细胞贴壁且密度饱和后,取出插件,用 PBS 洗净漂浮的细胞,再加入不同浓度的药物。TGF- β 1 和 LY3200882 粉末溶于二甲基亚砜,使用时用 RPMI 1640 培养基稀释至工作浓度,TGF- β 1+小檗碱(10 μ mol/L)+芒柄花黄素(10 μ mol/L)组先提前 1 h 加入 TGF- β 1 (10 ng/mL)激活,再加入小檗碱和芒柄花黄素。置于 Cytation™ 5 细胞成像多功能检测系统上监测,计算细胞相对迁移率。

细胞相对迁移率=各药物组迁移的宽度/对照组迁移的宽度

2.3 Transwell 实验检测细胞迁移

先将 500 μ L 含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液加入 Transwell 小室下层浸润底膜,常规消化细胞,离心,收集细胞,RPMI 1640 基础培养液重悬,调整密度至 1×10^5 个/mL,在小室上层加入 100 μ L 细胞悬液。将 24 孔板置于培养箱中 2 h,待细胞贴壁后,按“2.2”项下分组加入不同浓度的药物,再在小室下层加入 300 μ L 培养基使小室内外液面处于同一水平。处理 24 h 后,用吸引器轻轻吸去小室上层的液体,加入 4%多聚甲醛固定 20 min,用棉签轻轻擦去底膜上层未迁移的细胞。加入 500 μ L 5%结晶紫染色液,30 min 后,弃染色液,用 PBS 冲洗 2 遍,于 Cytation™ 5 细胞成像多功能检测系统拍照,计算细胞相对迁移率。

细胞相对迁移率=各药物组迁移的细胞数/对照组迁移的细胞数

2.4 Western blotting 检测蛋白表达

药物干预鼻咽癌细胞后,提取总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,按 80 μ g 的质量配置 25 μ L 上样体系,然后置于金属浴 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,冷却后离心 1 min 备用。配制 8%分离胶和 5%的浓缩胶,加入样品开始电泳。电泳结束后电转移至 PVDF 膜,于封闭液中室温封闭 1 h;孵育一抗过夜后,孵育二抗,最后置于 Odyssey 双色红外

荧光成像仪上，框选合适的区域开始扫膜，然后用 ImageStudio 软件分析条带信号值。

2.5 统计方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析，计量资料若服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，满足方差齐性，则用 LSD 检验，方差不齐用 Dunnett T3 检验；若不服从正态分布，则用秩和检验。采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

3 结果

3.1 RTCA 监测小檗碱联合芒柄花黄素对 5-8F、6-10B 细胞增殖的影响

如图 1-A、B 和图 2-A、B 所示，根据不同浓度药物对应的增殖曲线，不同浓度小檗碱和芒柄花黄素单用均可抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖；如图 1-C 和图 2-C 所示，小檗碱联合芒柄花黄素可抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖。如表 1 所示，不同浓度的小檗

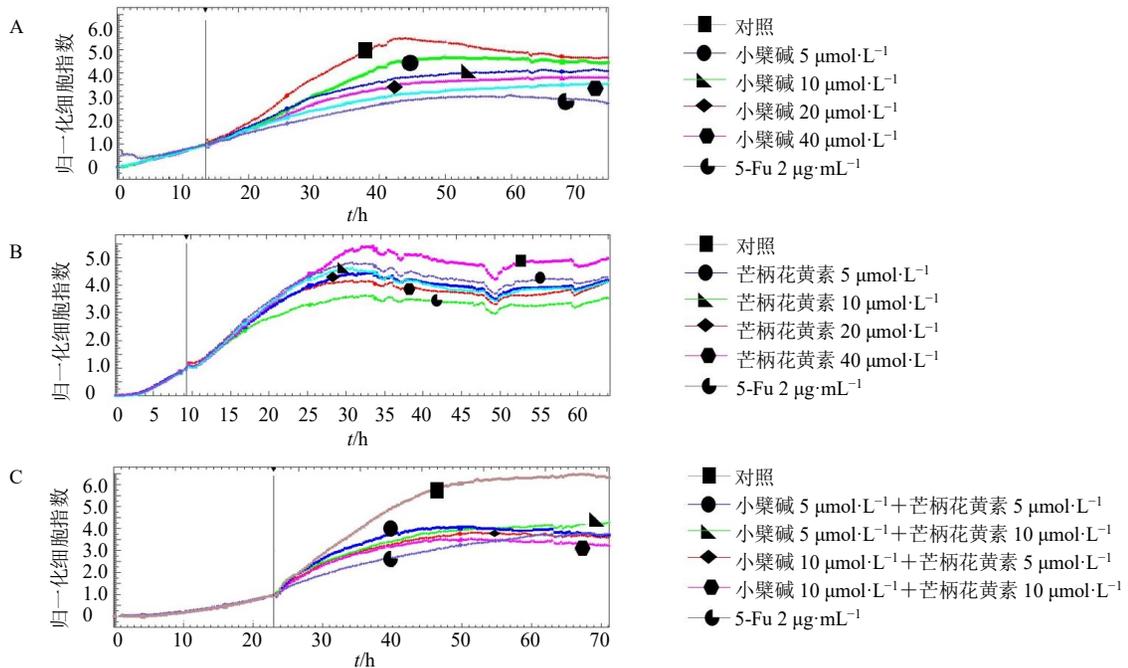


图 1 小檗碱单用 (A)、芒柄花黄素单用 (B) 及联合应用 (C) 对 5-8F 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of berberine (A), formononetin (B) and combined application (C) on proliferation of 5-8F cells

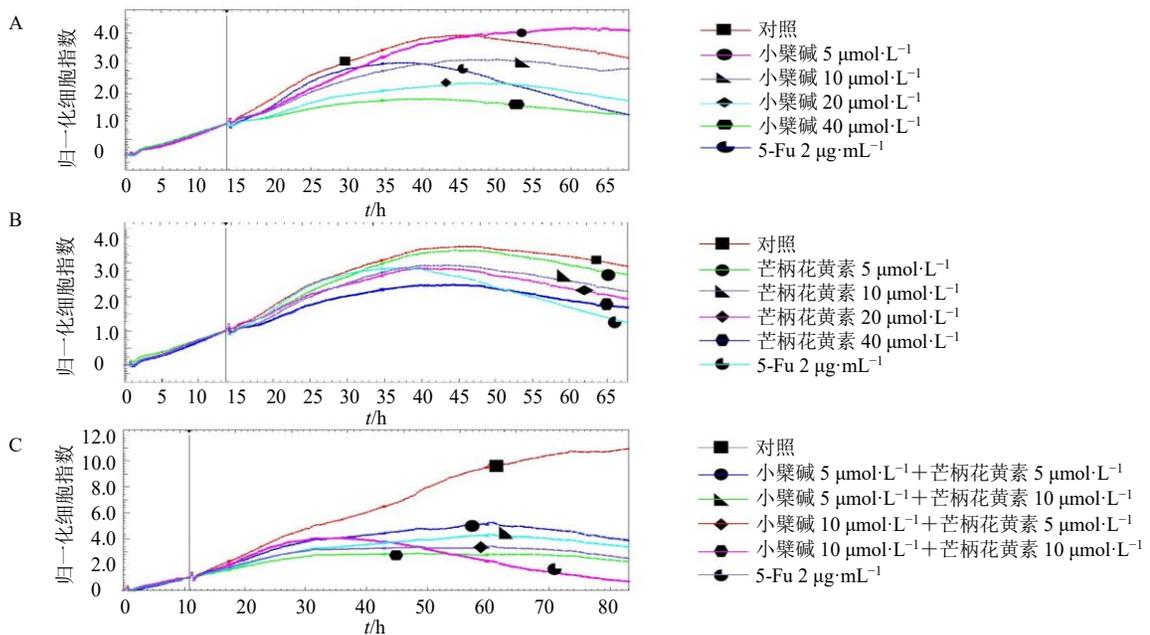


图 2 小檗碱单用 (A)、芒柄花黄素单用 (B) 及联合应用 (C) 对 6-10B 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of berberine (A), formononetin (B) and combined application (C) on proliferation of 6-10B cells

表 1 小檗碱联合芒柄花黄素抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖的 CI 值

小檗碱/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	芒柄花黄素/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	5-8F 细胞 CI 值			6-10B 细胞 CI 值		
		24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
5	5	0.32	0.27	0.30	0.91	0.49	0.71
5	10	0.33	0.45	0.63	0.81	0.50	0.84
10	5	0.23	0.34	0.47	0.64	0.41	1.01
10	10	0.23	0.29	0.44	0.80	0.45	1.11

碱和芒柄花黄素联用对 5-8F 细胞增殖的抑制作用具有协同效应 ($CI < 1$), 但小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $5 \mu\text{mol/L}$ 和小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 在 48 h 对 6-10B 细胞表现为拮抗效应 ($CI > 1$)。根据 RTCA 结果, 选取了具有协同效应且抑制效果较好的小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ 联合芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 作用于细胞 24 h 进行后续研究。

3.2 Western blotting 检测小檗碱联合芒柄花黄素对 TGF- β 1 信号通路关键蛋白的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 小檗碱联合芒柄花黄素组细胞中 TGF- β 1 和 Smad3 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.3 划痕实验和 Transwell 实验检测 TGF- β 1 信号通路激活后小檗碱联合芒柄花黄素对鼻咽癌细胞迁移的影响

如图 4、5 所示, 与对照组比较, 小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组细胞相对迁移率

明显降低 ($P < 0.01$); 与小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组比较, TGF- β 1 信号通路激活后细胞相对迁移率显著升高 ($P < 0.01$), 表明 TGF- β 1 增强了鼻咽癌细胞的迁移能力。

3.4 TGF- β 1 信号通路激活后小檗碱联合芒柄花黄素对 TGF- β 1 信号通路和迁移相关蛋白的影响

如图 6、7 所示, 与对照组比较, 小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 TGF- β 1、Smad3、p-ERK1/2 及下游蛋白 N-cadherin 和 vimentin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与小檗碱 $10 \mu\text{mol/L}$ + 芒柄花黄素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组比较, TGF- β 1 信号通路激活后 TGF- β 1、Smad3 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 5-8F 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 6-10B 细胞中 vimentin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

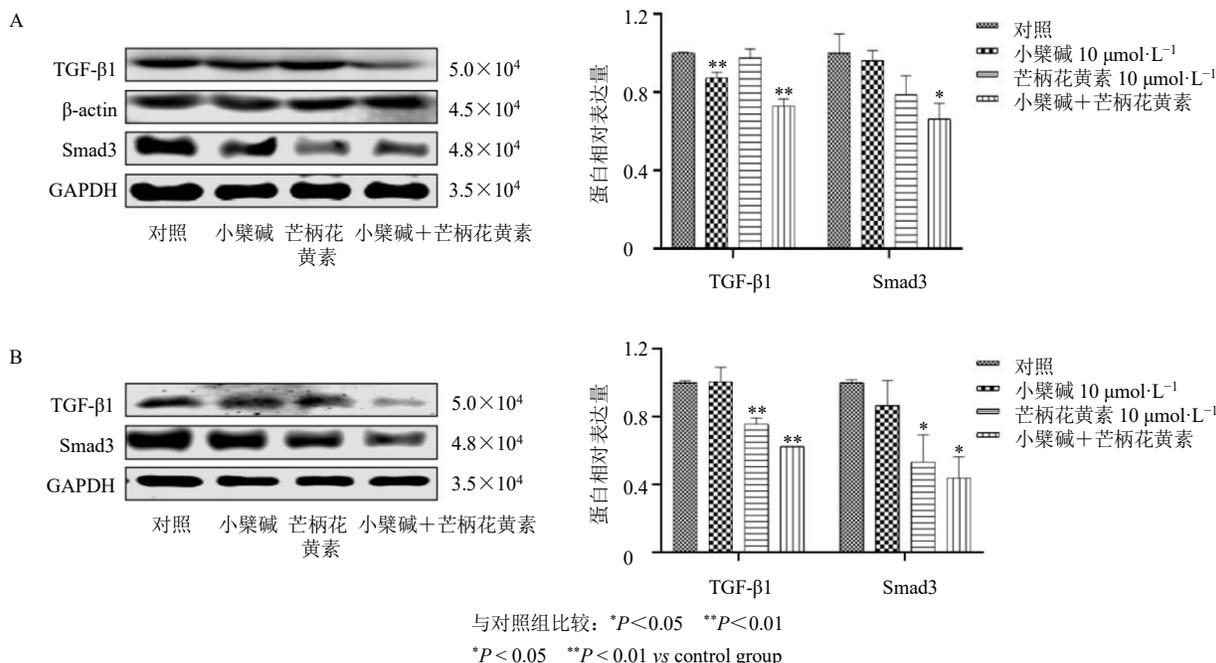
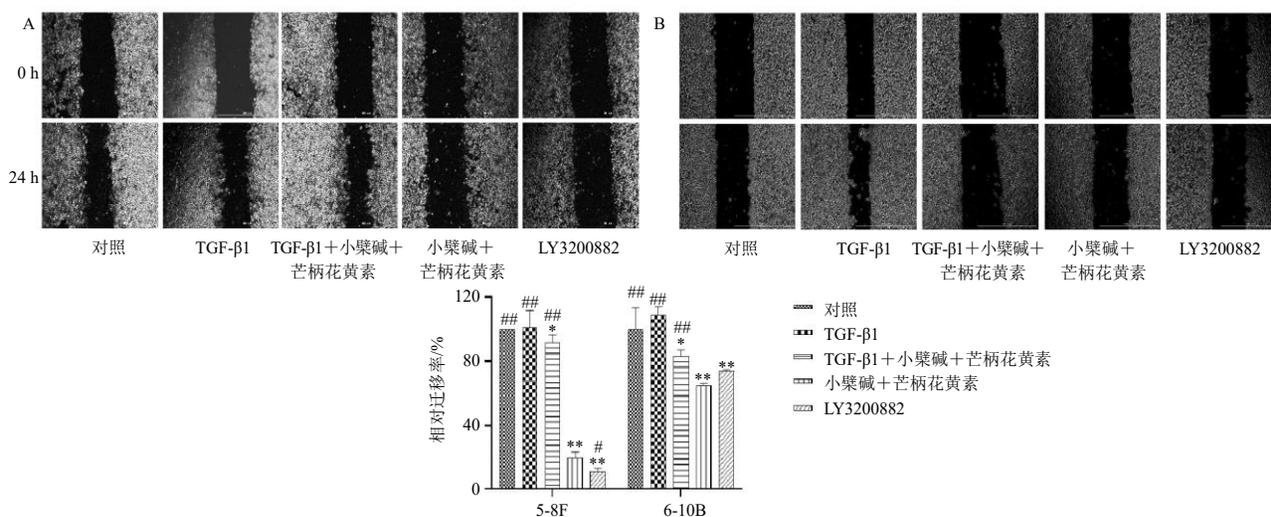


图 3 小檗碱联合芒柄花黄素对 5-8F (A) 和 6-10B (B) 细胞 TGF- β 1 信号通路关键蛋白的影响

Fig. 3 Effect of berberine combined with formononetin on key proteins of TGF- β 1 signaling pathway in 5-8F (A) and 6-10B (B) cells



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与小檗碱+芒柄花黄素组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs berberine + formononetin group, same as below figures

图4 TGF-β1 信号通路在小檗碱联合芒柄花黄素抑制 5-8F (A) 和 6-10B (B) 细胞迁移中的作用 (划痕实验)

Fig. 4 Role of TGF-β1 signaling pathway in migration of 5-8F (A) and 6-10B (B) cells inhibited by berberine combined with formononetin (scratch test)

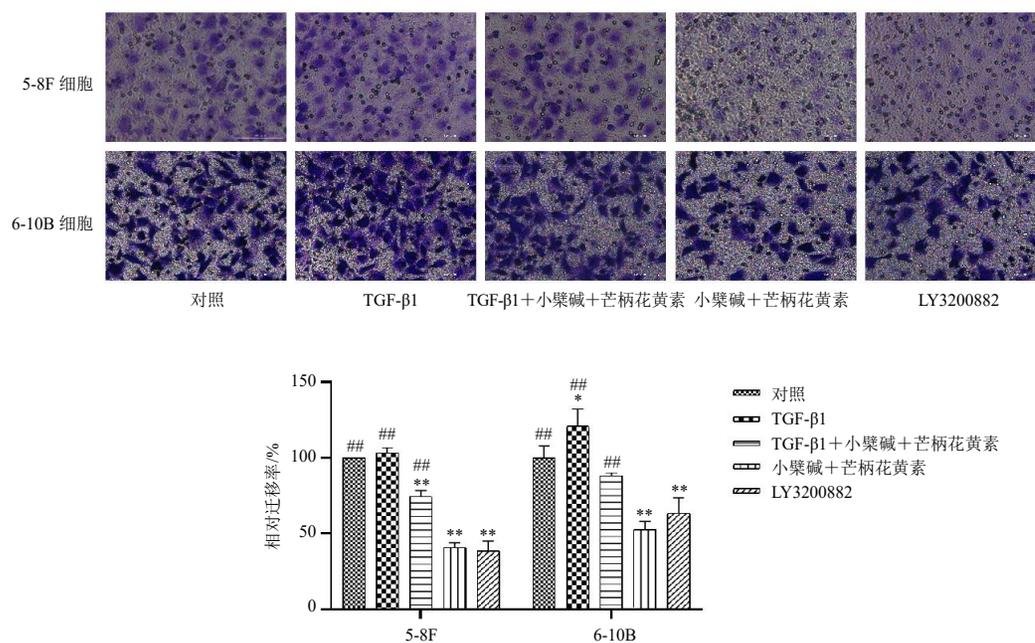


图5 TGF-β1 信号通路在小檗碱联合芒柄花黄素抑制 5-8F 和 6-10B 细胞迁移中的作用 (Transwell 实验)

Fig. 5 Role of TGF-β1 signaling pathway in migration of 5-8F and 6-10B cells inhibited by berberine combined with formononetin (Transwell test)

4 讨论

鼻咽癌复发与远处转移是造成患者死亡的主要原因^[16],也是临床治疗面临的困难之一,尽管放疗化疗能够抑制鼻咽癌,但其作用有限,且由于患者自身状态和耐受力不佳等因素使治疗得不到预期效果。中医药及其单体在防治鼻咽癌转移的研究中

实,中药及其单体用于抑制鼻咽癌细胞迁移和侵袭具有一定的作用,但中药单体联合运用的报道较少,因此本研究选用 2 个单体联用是一个新的研究方向,若 2 药产生协同效应,则能够将更低浓度的药物发挥更高的效应,为临床治疗提供新的实验依据和理论基础。

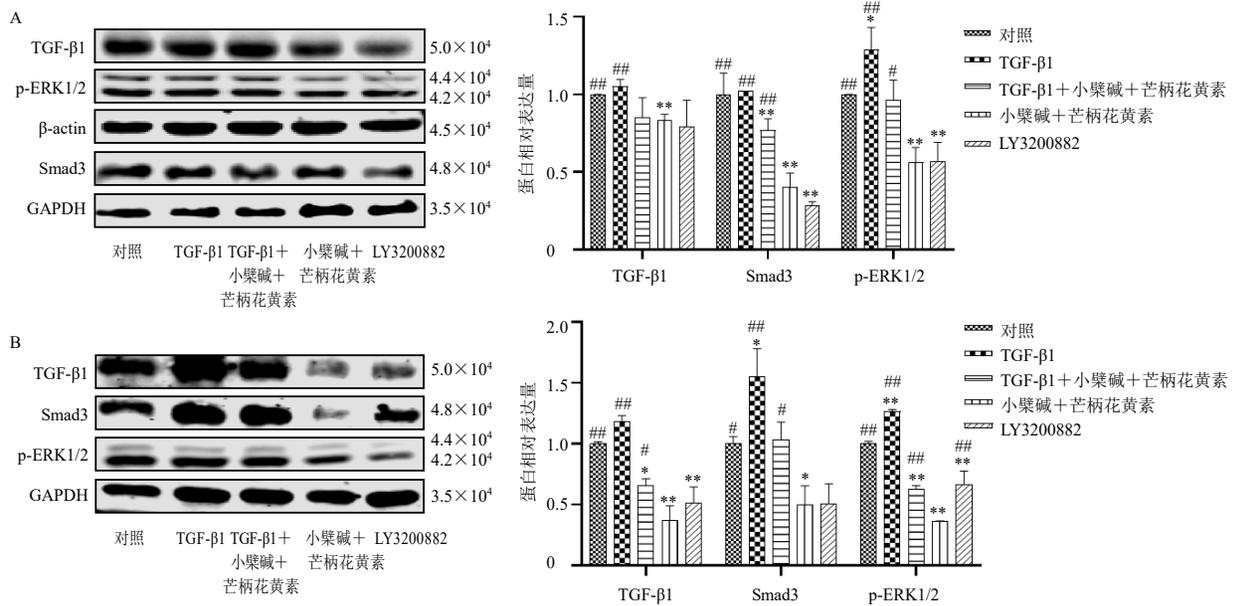


图 6 TGF-β1 信号通路激活后小檗碱联合芒柄花黄素对 5-8F (A) 和 6-10B (B) 细胞 TGF-β1 信号通路关键蛋白的影响
 Fig. 6 Effects of berberine combined with formononetin on key proteins of TGF-β1 signaling pathway in 5-8F (A) and 6-10B (B) cells after activation of TGF-β1 signaling pathway

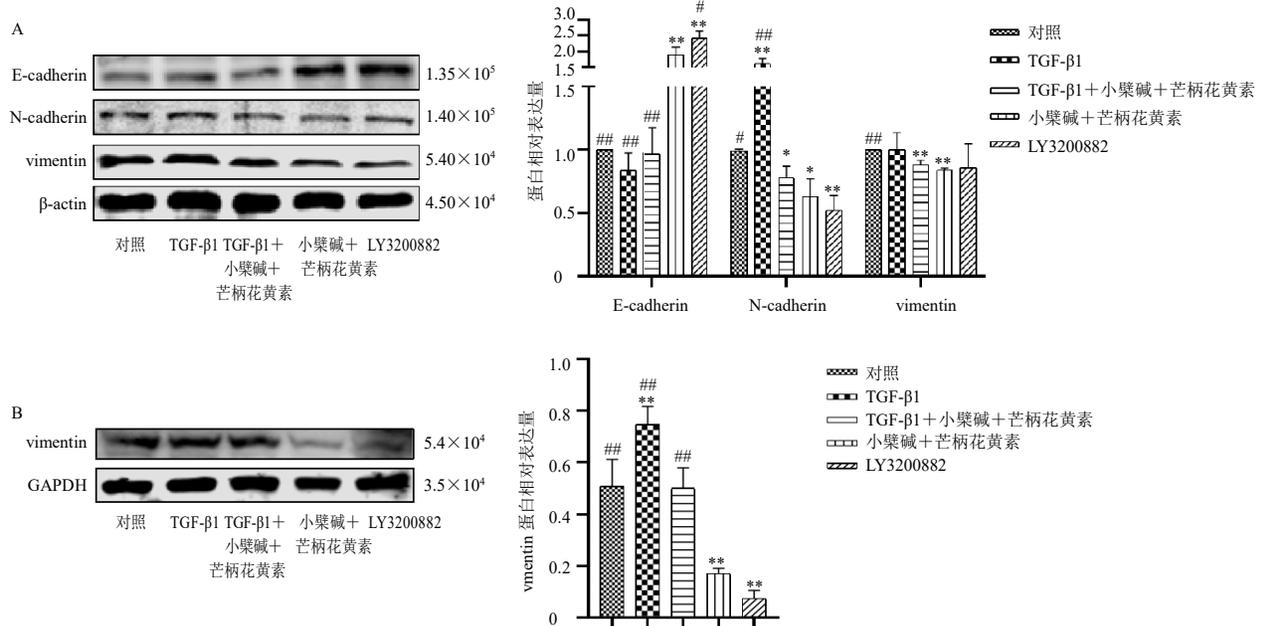


图 7 TGF-β1 信号通路激活后小檗碱联合芒柄花黄素对 5-8F (A) 和 6-10B (B) 细胞迁移相关蛋白的影响
 Fig. 7 Effects of berberine combined with formononetin on migration-related proteins in 5-8F (A) and 6-10B (B) cells after activation of TGF-β1 signaling pathway

TGF-β1 是 TGF-β 超家族中研究最多的因子，也是与肿瘤转移最密切的因子，郭巧娟^[17]研究表明 TGF-β1 水平与鼻咽癌远处转移相关。本研究首先通过 RTCA 初步证实小檗碱联合芒柄花黄素能够抑制鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞增殖，且以协同效应为主

(CI<1)，且 2 药联用能够抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路的活性。研究显示，Smad3 参与了 TGF-β1 介导的上皮间质转化，促进肿瘤迁移和侵袭^[18-19]。TGF-β1/ERK1/2 途径属于非 Smad 依赖性 TGF-β 信号通路，TGF-β1 可以激活 MAPK/ERK 信号通路，

其中以 ERK1/2 为主, 引起一系列级联反应并产生相应的生物学行为^[20]。本研究在药物联用的基础上, 加入了 TGF- β 1 组, 发现 TGF- β 1 的活性提高能够促进 Smad3 和 p-ERK1/2 水平的上调, 同时抑制下游蛋白 E-cadherin 表达, 提高 N-cadherin 和 vimentin 的表达水平, 并减弱小檗碱联合芒柄花黄素对这些蛋白的调节效应; 并且 TGF- β 1 信号通路激活后明显降低了小檗碱联合芒柄花黄素抑制鼻咽癌细胞迁移的效应。

综上所述, 小檗碱联合芒柄花黄素通过干预 TGF- β 1, 进一步抑制 Smad3 的表达水平和 ERK1/2 的磷酸化, 提高上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin 表达水平, 降低 N-cadherin、vimentin 的表达水平并抑制鼻咽癌细胞迁移。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 丁锴, 陈仁杰. 鼻咽癌的治疗进展 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2021, 41(6): 921-926.
- [2] 黄维, 赵迪, 蒋云飞, 等. 二黄二冬汤防治鼻咽癌放疗患者放射性脑损伤 [J]. 中医学报, 2021, 36(11): 2470-2474.
- [3] 高宏敏, 李建光, 刘建平, 等. 华蟾素胶囊对中晚期鼻咽癌放疗治疗的增敏作用及对患者血清 MIP-3 α 、cystatinA 表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(7): 45-49.
- [4] 胡晶, 戴娜, 徐冰雁, 等. 益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1221-1227.
- [5] 孙强, 何曼, 张梦, 等. 小檗碱抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 603-612.
- [6] 周芳亮, 胡晶, 蔺婷, 等. PI3K/Akt 信号通路在小檗碱联合人参皂苷 Rg₃ 诱导鼻咽癌细胞凋亡中的调控作用 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(1): 43-52.
- [7] 王茹月, 叶雨. 芒柄花黄素应用于抗癌药物开发的研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(2): 183-187.
- [8] 祁承林, 梁娟, 李恒, 等. 芒柄花黄素对人鼻咽癌细胞株 HONE1 凋亡的诱导作用及其机制探讨 [J]. 山东医药, 2016, 56(11): 5-7.
- [9] 李惠, 沈凯凯. 中药抗肿瘤联合用药研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(3): 90-94.
- [10] 黄中, 邵汛帆, 郑乃莹. VEGF 基因调控 TGF- β 1 信号转导通路在鼻咽癌转移中的机制及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(6): 991-994.
- [11] 刘洁, 徐冰雁, 胡晶, 等. 鼻咽癌转移相关的信号通路 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2019, 27(3): 237-240.
- [12] 任志涛. 小檗碱对 TGF- β 1 诱导 A549 细胞上皮间质转化和 MRC-5 细胞转分化及细胞信号通路相关蛋白的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [13] 陈春苗, 张国哲, 刘平平, 等. 小檗碱通过 TGF- β /Smad 通路抑制 TGF- β 1 诱导的人肝癌 HepG2 细胞上皮间质转化的研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 261-267.
- [14] 牛永莉, 贾晓波, 王艳. 芒柄花素调控 miR-19b-3p/TGF- β /Smad2 信号通路影响卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(10): 1068-1075.
- [15] Fu J N, Zhang N, Chou J H, *et al.* Drug combination *in vivo* using combination index method: Taxotere and T607 against colon carcinoma HCT-116 xenograft tumor in nude mice [J]. *Synergy*, 2016, 3(3): 15-30.
- [16] 黄蕾, 王丽君, 黄生富. 196 例鼻咽癌患者的预后及死亡原因分析 [J]. 江苏医药, 2016, 42(21): 2353-2355.
- [17] 郭巧娟. TGF- β 1 相关信号通路的基因多态性与鼻咽癌患者远处转移风险的关联性研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [18] 刘康, 范小宇, 彭力. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨扶正解毒散结方对原发性肝癌患者细胞免疫状态、肿瘤微环境的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(5): 330-335.
- [19] Lou C J, Zhang F Y, Yang M, *et al.* Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50956.
- [20] 吕川. MSC 旁分泌 TGF- β 通过 ERK1/2 信号通路诱导黑色素瘤 EMT 的作用研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2020.

[责任编辑 李亚楠]