

• 药理与临床 •

荔枝核总黄酮调控 Skp2-p21/p53 信号轴抑制非小细胞肺癌的增殖和转移

任 红^{1,2}, 李小兰^{2,3#}, 蒋 琳^{1,2}, 韩瑶瑶^{2,3}, 廖韵诺^{2,3}, 付杰军^{2*}, 郭宏伟^{2,3*}

1. 广西医科大学第一临床医学院, 广西 南宁 530021

2. 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室&广西中药组效学重点实验室, 广西 南宁 530021

3. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

摘要:目的 探讨荔枝核 *Litchi Semen* 总黄酮 (total flavonoids from *Litchi Semen*, TFLS) 抑制非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的作用及其潜在的分子机制。方法 TFLS 作用于 NSCLC 细胞后, 采用 CCK-8 法、平板克隆形成实验、Wound healing 和 Transwell 实验分别考察细胞的增殖、迁移及侵袭能力。网络药理学方法预测 TFLS 中可能发挥作用的活性成分、作用靶点及相关作用通路; 流式细胞术检测 TFLS 对 A549 细胞周期和凋亡的影响; Western blotting 检测转移、周期以及凋亡相关蛋白的表达情况。分子对接技术预测 TFLS 靶向细胞周期 S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase associated protein 2, Skp2) 治疗 NSCLC 的潜在活性成分。药物亲和反应的靶点稳定性 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 实验进一步检测槲皮素、表儿茶素与 Skp2 的结合作用。结果 TFLS 可显著抑制 NSCLC 细胞 H1437、H358、A549 和 H1299 的体外增殖及 A549 细胞的克隆形成能力 ($P<0.05$); TFLS 可抑制 A549 细胞的迁移 ($P<0.05$ 、 0.01) 和侵袭 ($P<0.01$), 上调上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) 的表达 ($P<0.05$), 下调波形蛋白 (Vimentin) 的表达 ($P<0.01$)。TFLS 可使 A549 细胞阻滞在 G₂/M 期并诱导其凋亡 ($P<0.05$), 下调细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1) 表达 ($P<0.05$), 上调细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21) 和裂解的多聚 ADP 核糖聚合酶 (cleaved poly ADP-ribose polymerase, cleaved PARP) 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01)。网络药理学预测得到的核心靶点为 Skp2、p53, Western blotting 结果表明 TFLS 可以下调 Skp2 蛋白的表达 ($P<0.01$) 以及上调 p53 蛋白的表达 ($P<0.05$)。分子对接和 DARTS 结果表明, TFLS 中的槲皮素、表儿茶素与 Skp2 有较好的结合能力。结论 TFLS 在体外可以抑制 NSCLC 的生长和转移, 诱导 A549 细胞凋亡, 阻滞细胞在 G₂/M 期, 减弱细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的发生, 其分子机制可能与调控 Skp2-p21/p53 信号轴有关。槲皮素和表儿茶素可能是 TFLS 靶向 Skp2 发挥作用的效应物质。

关键词: 荔枝核总黄酮; 非小细胞肺癌; 细胞周期; 凋亡; 转移; 槲皮素; 表儿茶素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)20-6940-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.011

Total flavonoids from *Litchi Semen* inhibit proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer by regulating Skp2-p21/p53 signaling axisREN Hong^{1,2}, LI Xiaolan^{2,3}, JIANG Lin^{1,2}, HAN Yaoyao^{2,3}, LIAO Yunnuo^{2,3}, FU Jiejun², GUO Hongwei^{2,3}

1. The First Clinical Medical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Key Laboratory of Longevity and Aging-related Diseases of Chinese Ministry of Education & Guangxi Key Laboratory of Component-efficacy Relationship of Traditional Chinese Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82074347); 中央引导地方科技发展资金专项 (防科 ZY20221502); 2022 年青年岐黄学者培养项目; 广西医科大学高水平创新团队及杏湖学者计划**作者简介:** 任 红 (1996—), 女, 硕士研究生, 从事中医药防治肿瘤基础研究。E-mail: 715267414@qq.com

#共同第一作者: 李小兰 (1992—), 女, 博士, 从事中药抗肿瘤药理研究。E-mail: 1147007101@qq.com

***通信作者:** 付杰军, 副研究员, 从事蛋白质泛素化修饰与肿瘤转移研究。E-mail: fujiejun@126.com

郭宏伟, 教授, 博士生导师, 从事中药抗肿瘤药理研究。E-mail: hongweigu@gxmu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the effect and underlying mechanism of total flavonoids from *Litchi Semen* (TFLS) against non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** After treating NSCLC cells with TFLS, the proliferation, migration, and invasion ability of cell were evaluated by CCK-8 assay, cell plate clone formation assay, Wound healing test and Transwell assay, respectively. The possible active ingredients, target and related pathways of the therapeutic efficacy of TFLS were predicted by network pharmacology. The effects of TFLS on A549 cell cycle and cell apoptosis were examined by flow cytometry. Western blotting was conducted to detect the expression levels of proteins related to metastasis, cell cycle, and cell apoptosis. Molecular docking technology was used to predict potential active components of TFLS targeting S-phase kinase associated protein 2 (Skp2) in the treatment of NSCLC. Drug affinity responsive target stability (DARTS) assay was used to further detect the binding effects of quercetin and (-)-epicatechin to Skp2. **Results** TFLS significantly inhibited the *in vitro* proliferation of H1437, H358, A549, and H1299 cells and the clone formation ability of A549 cells ($P < 0.05$). TFLS inhibited migration ($P < 0.05, 0.01$) and invasion ($P < 0.01$) ability of A549 cells by up-regulated the expression of Epithelial cadherin (E-cadherin, $P < 0.05$) and down-regulated the expression of Vimentin ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that TFLS could block A549 cells in G₂/M phase and induce its apoptosis ($P < 0.05$) by down-regulated the expression of Cyclin B1 ($P < 0.05$) and up-regulating the expression of Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) and Cleaved poly ADP-ribose polymerase (Cleaved PARP, $P < 0.05, 0.01$). The core targets Skp2 and p53 predicted by network pharmacology. Western blotting results showed that TFLS could down-regulating the expression of Skp2 ($P < 0.01$) and up-regulate the expression of p53 ($P < 0.05$). Molecular docking and DARTS results showed that quercetin and (-)-epicatechin in TFLS could bind well with Skp2. **Conclusion** TFLS could inhibit the growth and metastasis of NSCLC, induce apoptosis, block cell cycle in G₂/M phase, and weaken the occurrence of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of A549 cells *in vitro*. The molecular mechanism may be related to the regulation of Skp2-p21/p53 signaling axis. Quercetin and (-)-epicatechin may be the effective substances for TFLS targeting Skp2.

Key words: total flavonoids from *Litchi Semen*; non-small cell lung cancer; cell cycle; apoptosis; metastasis; quercetin; (-)-epicatechin

肺癌是癌症相关死亡的主要原因, 2020 年中国癌症死亡人数约 300 万, 其中肺癌人数近 71.5 万, 约占癌症死亡人数的 23.8%^[1]。肺癌按组织病理学分类可分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌, 其中 NSCLC 约占所有肺癌病例的 85%^[2]。尽管靶向和免疫治疗在 NSCLC 中取得了巨大成功, 但依旧存在肿瘤耐药性和化疗药物的不良反应等问题, 在美国肺癌患者 5 年存活率约 20%, 在我国则更低^[3]。因此, 寻找安全、有效的治疗 NSCLC 的药物具有重要意义。荔枝核总黄酮 (total flavonoids from *Litchi Semen*, TFLS) 是从荔枝核中提取出的黄酮类成分, 具有抗肿瘤、抗肝纤维化和急性肝损伤、降血糖等多种药理活性^[4]。课题组前期研究表明, TFLS 可以调控靶向蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Akt/核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 双通路以及通过调控脂质、氨基酸代谢抑制前列腺癌的生长和转移^[5-6], 调控骨微环境抑制前列腺癌的骨内生长^[7], 同时, TFLS 联合紫杉醇可以协同抑制前列腺癌紫杉醇耐药细胞的增殖^[8]。此外, TFLS 还可通过 Notch 同源物 3 (recombinant Notch homolog 3, Notch3) 信号通路调控乳腺癌干性, 进而抑制乳腺癌的体内外生长^[9]。然而, TFLS 是否对

NSCLC 有抑制作用以及相应的分子机制尚未明晰。因此, 本研究旨在利用网络药理学技术结合现代分子生物学实验探讨 TFLS 治疗 NSCLC 的作用及其分子机制。

1 材料

1.1 细胞株

人源性非小细胞肺癌 A549、H1299、H358 和 H1437 细胞株由“长寿与老年相关疾病”教育部重点实验室提供。

1.2 药品与试剂

荔枝核 (批号 181001) 购于南宁生源中药饮片有限责任公司, 由广西医科大学朱丹教授鉴定为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Soon. 的干燥成熟种子。课题组前期采用乙醇回流提取法和大孔树脂梯度洗脱制备 TFLS, 以儿茶素为对照品, 使用香草醛-盐酸法检测出荔枝核提取物中的总黄酮质量分数为 42.61%, 并通过超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术对 TFLS 的成分进行表征^[5-9]。

DMEM/F12 (批号 319085037)、RPMI-1640 (批号 350006062)、DMEM 培养基 (批号 319006033)、胎牛血清 (批号 086150034) 均购自南京维森特生物技术有限公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒 (批号 AR1199-10) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 细胞凋亡试剂盒 (批号 A20112)、细胞周期检测试

剂盒(批号 A21132)购自杭州联科生物技术股份有限公司;链霉蛋白酶(批号 10165921001)购自瑞士 Roche 公司;M-PERTTM哺乳动物蛋白抽提试剂(批号 YH371252)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;表儿茶素(质量分数 98%,批号 PS010585)购自成都普思生物科技股份有限公司;槲皮素(质量分数 97%,批号 C16371964)、肿瘤蛋白 p53 抑制剂(Pifithrin- β hydrobromide, PFT- β ,批号 C16325420)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin,批号 3195S)、波形蛋白(Vimentin,批号 5741S)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21,批号 19399S)、p27(批号 3686T)、周期蛋白 B1(Cyclin B1,批号 12231T)、p53(批号 9282S)、多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP,批号 9532S)、裂解的多聚 ADP 核糖聚合酶(cleaved PARP,批号 5625T)、细胞周期 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase associated protein 2, Skp2,批号 2652T)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH,批号 2118L)均购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

Multiskan Go 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);IX71 型荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);BD Aria III 型流式细胞分析仪(美国 BD 公司);MiniChemi 化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司);Milli-Q IQ 7000 超纯水仪(美国 Merck Millipore 公司);蛋白电泳仪、Powerpac Basic 型电泳槽和转膜槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

使用完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养人源 NSCLC 细胞株。细胞复苏 24 h 后更换完全培养基,2 d 观察 1 次细胞,待细胞汇合度达 90%左右且细胞状态较好时进行细胞传代。

2.2 TFLS 对 NSCLC 细胞增殖能力的影响

分别取对数生长期的 NSCLC 细胞 H1437、H358、A549 和 H1299,以 1 500 个/孔接种于 96 孔板,给予 TFLS,给药浓度分别为 10、20、40、60、80、120、160 $\mu\text{g/mL}$,同时设置空白组和对照组。加药处理 72 h 后,弃去上清液。每孔加入 100 μL 培养基和 10 μL CCK-8 再孵育 1 h,使用酶标仪在 450 nm 下检测吸光度(A)值,计算细胞相对活力。GraphPad

Prism 8.0 绘制细胞相对活力曲线。

$$\text{细胞相对活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 TFLS 对 A549 细胞克隆形成能力的影响

取对数生长期的 A549 细胞,以 500 个/孔接种于 6 孔板,次日给予 TFLS 处理(10、20 $\mu\text{g/mL}$),同时设置对照组,每隔 3 d 更换 1 次培养液。第 10 天进行固定染色拍照,使用 Image-J 软件计算细胞克隆数目。

2.4 TFLS 对 A549 细胞迁移能力的影响

取对数生长期的 A549 细胞,以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。24 h 后向板中加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的丝裂霉素 C,置于培养箱中孵育 2 h 后,用 10 μL 的枪头在细胞生长单层垂直划线,使用 D-PBS 洗涤细胞 2 次。再用 5、10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 TFLS 处理细胞,同时设置对照组。分别于 0、12、24 h 后取出 6 孔板,观察细胞迁移情况并拍照,使用 Image-J 软件对图片进行处理分析,并计算伤口愈合率。

$$\text{伤口愈合率} = 12 \text{ h 或 } 24 \text{ h 的伤口面积} / 0 \text{ h 的伤口面积}$$

2.5 TFLS 对 A549 细胞侵袭能力的影响

取对数生长期的 A549 细胞铺于 6 cm 培养皿中,24 h 后加入 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 TFLS 处理 72 h 后,重悬计数,配制 5×10^5 个/mL 的细胞悬液,取 200 μL 接种于 Transwell 上室,下室中加入 800 μL 含 20% FBS 的培养基;共培养 24 h 后,将下室细胞固定染色,倒置显微镜下拍照。每个小室随机选择 3 个视野,用 Image-J 软件计数后进行统计学分析。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 NSCLC 靶点信息的收集 利用人类基因组注释数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>),以“non-small cell lung cancer”为关键词搜索与 NSCLC 相关的靶标基因,选取“relevance score > 50”的基因作为 NSCLC 的潜在靶点。

2.6.2 TFLS 潜在靶基因预测 本研究通过对 TFLS 进行成分表征^[9]并结合文献报道^[10]共得到 36 个化学成分,通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>)和 Coremine 数据库 (<https://www.coremine.com/>)预测 TFLS 的活性成分作用靶点,种属关系选择为人类,以“probability*”值 ≥ 0 和 $P < 0.05$ 作为标准筛选出关键靶点。

2.6.3 TFLS 抗 NSCLC 靶点收集 TFLS 活性成分作用靶点与 NSCLC 相关的靶点导入 Venny 2.1.0 中,映射筛选出共同靶点,作为 TFLS 抗 NSCLC 的靶点。

2.6.4 蛋白质-蛋白质相互作用分析 将上述筛选出的共同靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 得到靶标蛋白相互作用关系, 保存为 TSV 格式文件, 制作网络图。再对 Degree 值大小进行降序排列, 排名前 10 的靶点作为核心靶标。

2.6.5 核心靶标功能分析 用 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 做核心基因的 GO 功能富集分析, 将 $P < 0.01$ 和 $FDR < 0.01$ 作为筛选原则, 将筛选后的数据作为本研究中 GO 功能富集分析的最终结果。根据 P 值从小到大排序对 GO 结果的前 15 条通路做可视化处理。

2.6.6 TFLS 抗 NSCLC 的活性成分分析 TFLS 和 NSCLC 共有的经过筛选的 10 个核心靶标所对应的化学成分可能为 TFLS 发挥治疗 NSCLC 作用的潜在活性成分。

2.6.7 网络图的构建及分析 本研究中“TFLS-成分网络”“成分-靶点网络”“NSCLC 及其对应的靶点网络”“成分-靶点-通路网络”等网络通过 Cytoscape 3.2.1 可视化分析。

2.7 TFLS 对 A549 细胞周期的影响

取对数生长期的 A549 细胞, 以 6×10^5 个/皿接种于 6 cm 培养皿, 24 h 后, 分别加入 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 TFLS 继续培养 72 h 后消化离心, 用预冷 PBS 清洗重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 取 100 μL 的细胞悬液, 分别加入 5 μL 的 PI 和 7-AAD 染料, 室温避光孵育 15 min, 细胞经带滤芯的流式管滤过后, 采用流式细胞分析仪进行检测。

2.8 TFLS 对 A549 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 A549 细胞, 以 6×10^5 个/皿接种于 6 cm 培养皿, 待细胞贴壁, 分别加入 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 TFLS 继续培养 72 h 后消化离心, 取 1.5×10^5 个细胞, 用预冷的 D-PBS 缓冲液重悬轻洗 2 次, 离心收集细胞并于 500 μL 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 中混匀, 加入 10 μL Annexin V-FITC 染色液和 5 μL PI 染色液, 室温避光孵育 15 min, 细胞经带滤芯的流式管滤过后, 采用流式细胞分析仪进行检测。

2.9 Western blotting 检测

取对数生长期的 A549 细胞, 以 6×10^5 个/皿接种于 6 cm 培养皿, 待细胞贴壁后, 用 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的 TFLS 处理细胞。药物作用 72 h 后, 弃去培养基, 轻洗细胞。采用 RIPA 裂解法提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 调整各组蛋白浓度调成 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 加热变性。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, 封闭后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育一抗 (1:1 000), 洗膜后孵育二抗 (1:30 000) 1 h, 洗膜后使用 MiniChem 扫膜仪进行扫描显影。使用 Image-J 软件分析目的条带和内参蛋白的灰度值。

2.10 分子对接

利用 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库, 检索到 Homo sapiens 的 Skp2 晶体结构, 选择 Skp2 (PDB 2C9W) 蛋白作为分子对接的晶体结构。利用 Maestro 软件的 Protein Preparation 模块对 Skp2 蛋白晶体结构进行预处理, 残基修复、结构校正、氢键优化、溶剂去除和能量最小化, 将处理后的蛋白结构选为受体, 使用 Grid Generation 模块对受体进行晶格建立, 生成 Grid 文件用于分子对接。

使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载小分子化合物的 sdf 文件, 再使用带有 OPLS3e 力场的 LigPrep 模块对配体进行离子化和能量最小化。预处理的蛋白质 (Grid 文件) 和配体在 Ligand Docking 模块中对接, 使用 Glide 模块得到对接结果, 最后使用 Pymol 软件将对接结果进行可视化分析。

2.11 药物亲和反应的靶点稳定性 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 实验

采用 DARTS 实验考察槲皮素、表儿茶素和 Skp2 的结合作用。用 M-PER 裂解缓冲液冰上裂解 A549 细胞 30 min, 提取蛋白。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min, 离心 20 min, 将上清转移至新的 EP 管中。蛋白上清液分为对照组 (0.1% DMSO 溶液)、槲皮素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组、表儿茶素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。用 BCA 试剂盒进行蛋白定量分析, 将链酶蛋白酶与蛋白以 1:20 000 的质量比混合, 室温处理 10 min, 随后样品加入上样缓冲液, 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。后续进行 Western blotting 实验验证。

2.12 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One way ANOVA), 两两比较方差齐采用 LSD 检验, 若方差不齐则采用 Tamhane's T2 (M) 检验。

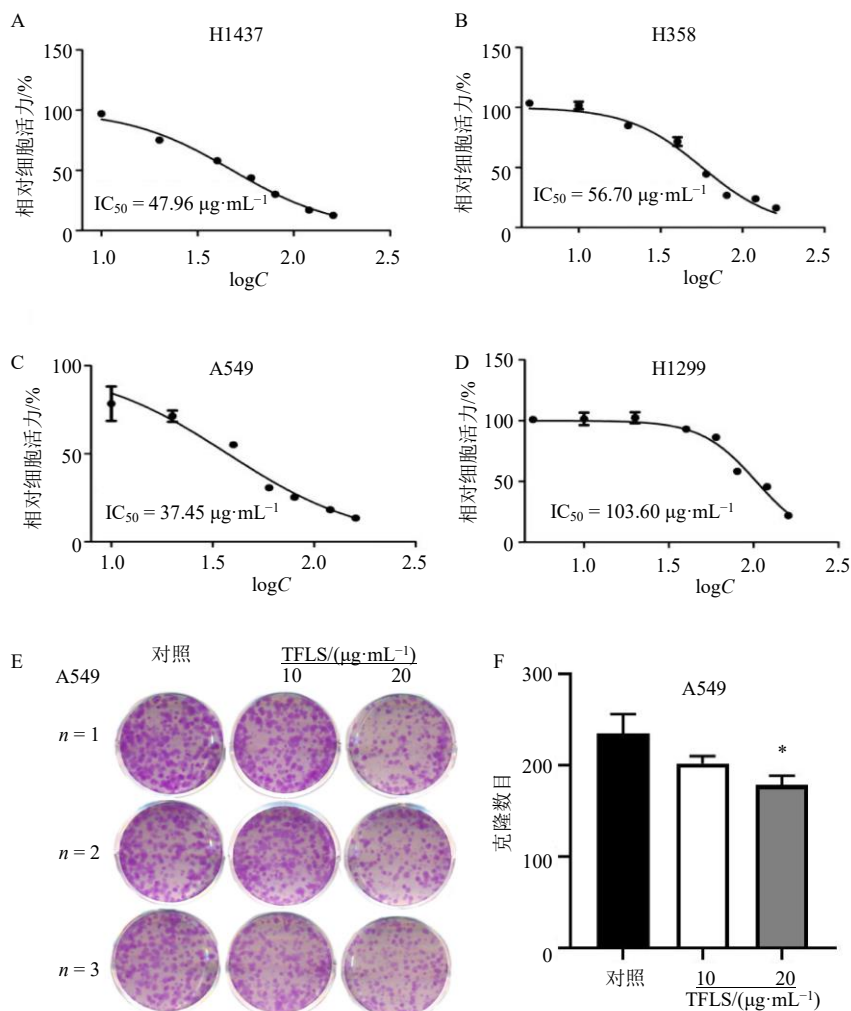
3 结果

3.1 TFLS 对 NSCLC 细胞体外增殖能力的影响

本研究采用 CCK-8 法检测了 TFLS 对 H1437、H358、A549 和 H1299 细胞增殖能力的影响。结果表明, TFLS 对 4 种 NSCLC 细胞均展示了不同程度

的增殖抑制作用,并呈现一定的质量浓度相关性。在作用 72 h 后,TFLS 对 H1437、H358、A549 及 H1299 细胞的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值分别为 47.96、56.70、37.45、103.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1-A~D)。采用 A549 细胞进行平

板克隆形成实验,结果显示 A549 细胞经不同质量浓度 (10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) TFLS 处理 10 d 后,与对照组比较,TFLS 高剂量组可显著抑制 A549 细胞的克隆形成数目 ($P < 0.05$),提示 TFLS 可抑制 NSCLC 细胞的体外增殖 (图 1-E、F)。



A~D-不同质量浓度 TFLS 分别对 H1437、H358、A549、H1299 细胞增殖能力的影响; E-TFLS 对 A549 细胞克隆形成能力的影响; F-TFLS 对 A549 细胞克隆数目统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

A—D-effects of different mass concentrations of TFLS on proliferation ability of H1437, H358, A549 and H1299 cells; E-effects of TFLS on clone formation ability of A549 cells; F-statistical graph of clone number of A549 cells treated with different concentrations of TFLS; * $P < 0.05$ vs control group.

图 1 TFLS 抑制 NSCLC 细胞的增殖

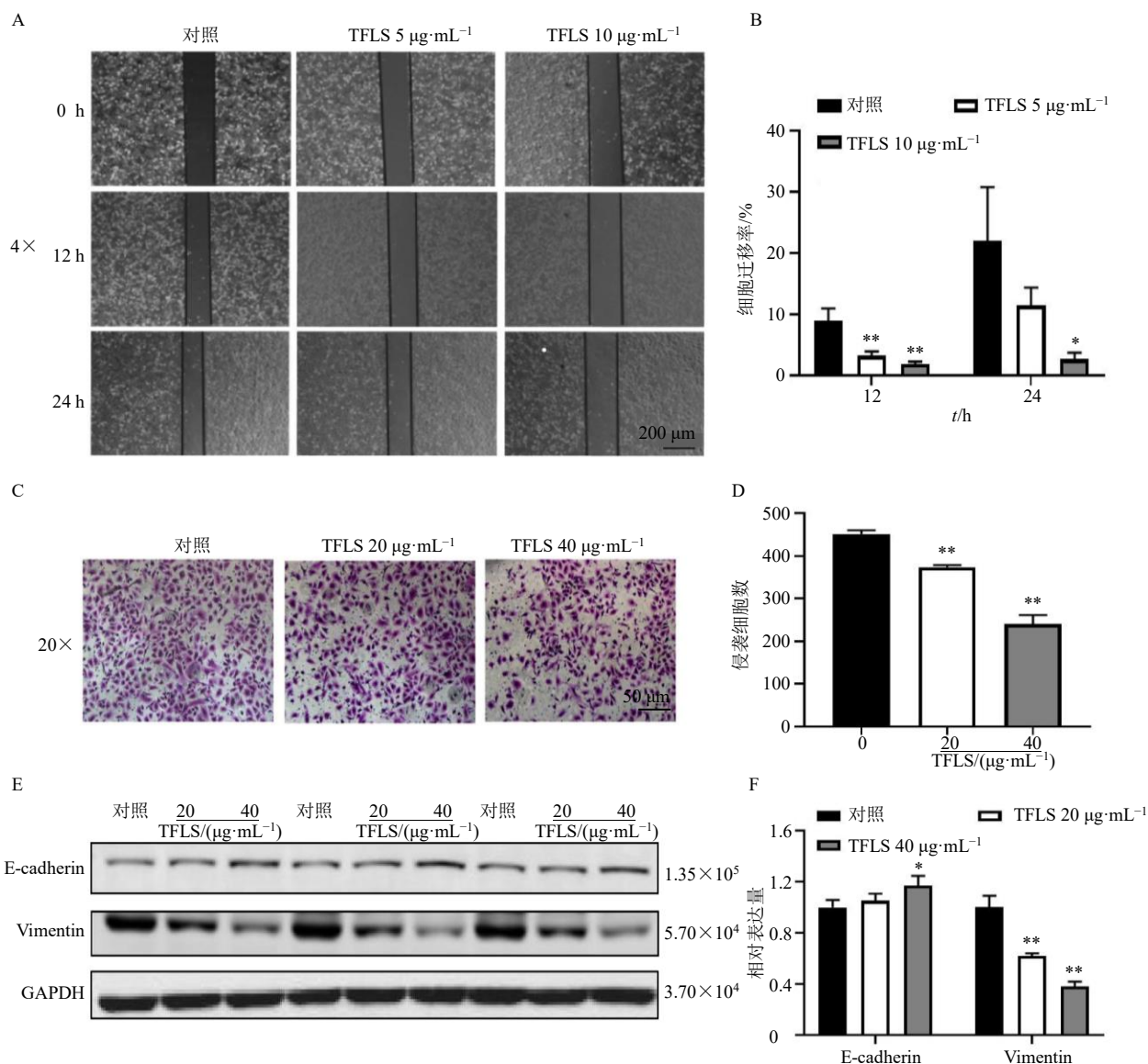
Fig. 1 TFLS inhibited proliferation of NSCLC cells

3.2 TFLS 对 A549 细胞转移能力的影响

为探究 TFLS 对 NSCLC 细胞转移能力的影响,本研究通过划痕实验观察 TFLS 对 A549 细胞的迁移能力的影响。如图 2-A、B 所示,与对照组比较,经不同质量浓度 TFLS (5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 12 h 后,细胞迁移率均明显降低 ($P < 0.01$),处理 24 h 后,高剂量组可明显抑制 A549 细胞的迁移能力 ($P <$

0.05)。同时,本研究采用 Transwell 实验检测了 TFLS 对 A549 细胞侵袭能力的影响。如图 2-C、D 所示,不同质量浓度的 TFLS 作用 72 h 后,与对照组比较,下室的 A549 细胞数量显著减少 ($P < 0.01$)。

上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤转移的标志之一。为了探讨 TFLS 对 A549 细胞的转移抑制作用是否与 EMT



A、B-TFLS 对 A549 细胞迁移能力的影响；C、D-TFLS 对 A549 细胞侵袭能力的影响；E、F-TFLS 对 A549 细胞中 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响，与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

A, B-effect of TFLS on migration of A549 cell; C, D-effect of TFLS on invasive ability of A549 cells; E, F-effect of TFLS on the expression of E-cadherin and Vimentin proteins in A549 cells, * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

图 2 TFLS 抑制 A549 细胞的转移

Fig. 2 TFLS inhibited metastasis of A549 cells

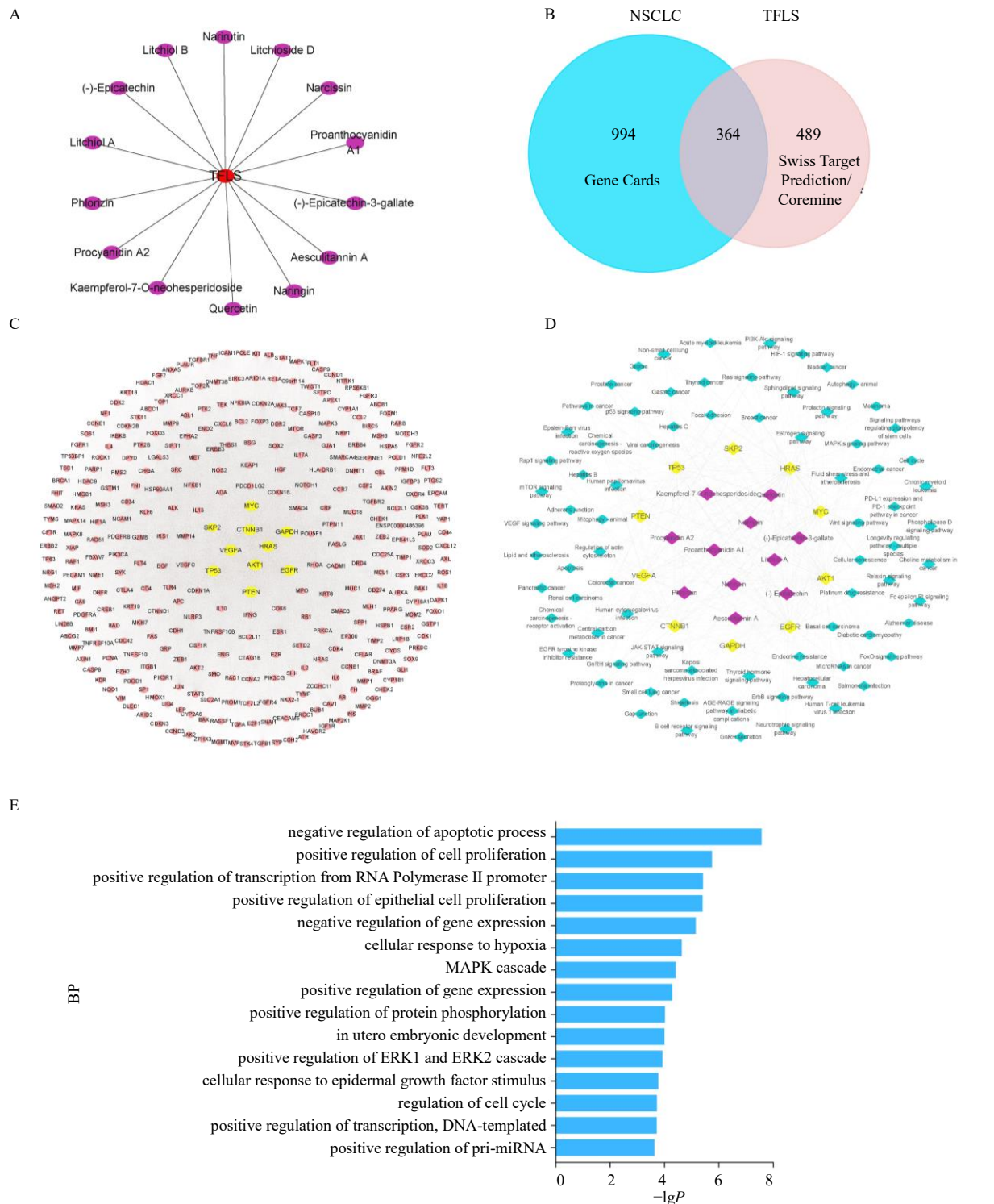
有关，本研究运用 Western blotting 法检测 A549 细胞中 EMT 相关标记蛋白 E-cadherin、Vimentin 的表达量。如图 2-E、F 所示，TFLS 可显著下调 Vimentin 蛋白的表达 ($P<0.01$)，高剂量组可显著上调 E-cadherin 蛋白的表达 ($P<0.05$)。结果表明，TFLS 抑制 A549 细胞的转移可能与抑制细胞的 EMT 相关。

3.3 网络药理学分析结果

本研究以生物利用度大于 0.15 为筛选条件，最终

得到了原花青素 A2、原花青素 A1、七叶连环素 A、荔枝酚 A、荔枝酚 B、表儿茶素没食子酸酯、槲皮素、山柰酚 7-O-新橙皮糖苷、柚皮苷、荔枝皂苷 D、水仙苷、根皮苷、表儿茶素及芸香柚皮苷 14 个黄酮类成分。

通过 SwissTargetPrediction 数据库和 Coremine 数据库对上述 14 个黄酮类成分的作用靶点进行预测，去重后共找到 1 358 个靶点。通过 Cytoscape 3.2.1 软件构建“TFLS-成分”网络关系图 (图 3-A)。



A-TFLS 主要有效成分网络关系图, 红色节点代表 TFLS, 紫色节点代表 14 个主要成分; B-NSCLC 靶点基因与 TFLS 成分靶点韦恩图; C-靶点蛋白相互作用网络图, 黄色代表 Top 10 基因; D-成分-基因-通路功能图, 紫色代表 TFLS 中的潜在活性成分, 黄色代表关键靶点, 蓝色代表富集到的通路; E-GO 生物过程富集分析柱状图。

A-main active component network diagram of TFLS, red nodes represent TFLS, purple nodes represent 14 major components; B-venn diagram of the intersection of common targets between NSCLC and TFLS components; C-target protein interaction network diagram, yellow nodes represent Top 10 genes; D-component-gene-pathway diagram, purple nodes represent potentially active components in TFLS, yellow nodes represent key targets, and blue nodes represent enriched pathways; E-histogram of GO bioprocess enrichment analysis.

图 3 网络药理学预测结果

Fig. 3 Predicted results of network pharmacology

GeneCards 数据库查询到 NSCLC 的靶点为 853 个。将 TFLS 成分对应的靶点与 NSCLC 相关靶点进行交集后, 获得共有靶标 364 个(图 3-B), 即为 TFLS 抗 NSCLC 的潜在作用靶点。将从 STRING 数据库获得的潜在作用靶标蛋白相互作用关系导入到 Cytoscape 3.2.1 软件中, 构建蛋白-蛋白相互作用网络图(图 3-C), 计算各靶标的 Degree 值。根据自由度值大小筛选出 Top 10 的靶标(TP53、GAPDH、MYC、EGFR、CTNNB1、AKT1、PTEN、HRAS、VEGFA、SKP2)作为关键靶标。通过“有效成分-

靶点”网络关系可分析出这 10 个核心靶标对应了 TFLS 中的 11 个成分(表 1), 这些成分为 TFLS 抗 NSCLC 的潜在有效成分群。

采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建“成分-靶点-信号通路”网络图(图 3-D); 对 10 个共有靶点进行 GO 功能富集分析, 得到 132 条生物过程, 按 *P* 值大小排序, 筛选出前 15 条结果如图 3-E 所示, 其中与细胞凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)、细胞周期调节(regulation of cell cycle)等密切相关。

表 1 10 个核心靶标所对应的 TFLS 中化学成分
Table 1 Ten core targets corresponding to chemical components in TFLS

序号	核心基因	核心基因对应的成分
1	TP53	槲皮素、根皮苷、芸香柚皮苷、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚-7-O-新橙皮糖苷、柚皮苷
2	GAPDH	表儿茶素
3	MYC	表儿茶素没食子酸酯、柚皮苷、槲皮素、根皮苷、表儿茶素
4	EGFR	芸香柚皮苷、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚-7-O-新橙皮糖苷、柚皮苷、槲皮素、根皮苷
5	CTNNB1	根皮苷、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、槲皮素
6	AKT1	槲皮素、芸香柚皮苷、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、柚皮苷
7	PTEN	槲皮素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、柚皮苷
8	HRAS	荔枝酚 A、根皮苷、表儿茶素没食子酸酯、槲皮素、芸香柚皮苷
9	VEGFA	原花青素 A1、表儿茶素没食子酸酯、柚皮苷、七叶连环素 A、芸香柚皮苷、槲皮素、 原花青素 A2、表儿茶素、根皮苷
10	SKP2	表儿茶素、槲皮素

3.4 TFLS 对 A549 细胞周期的影响

网络药理学 GO 功能分析结果显示, TFLS 治疗 NSCLC 的作用与细胞周期以及凋亡等功能密切相关。为了探究 TFLS 抑制 A549 细胞生长的作用是否与调控细胞周期有关, 本研究采用流式细胞术检测了 TFLS 对 A549 细胞周期的影响。如图 4-A、B 所示, 与对照组比较, TFLS 高剂量组中 S 期细胞的比例明显下降($P<0.05$), G_2/M 期的细胞比例显著增加($P<0.05$), 提示 TFLS 可能是通过 G_2/M 期细胞阻滞来发挥抑制 A549 细胞增殖的作用。为了进一步探究 TFLS 诱导的 G_2/M 阻滞的分子机制, 本研究采用 Western blotting 检测 A549 细胞中 Cyclin B1、p21 和 p27 等对 G_2/M 期起重要调控作用的蛋白表达。如图 4-C、D 所示, 高质量浓度的 TFLS 降低 A549 细胞中 Cyclin B1 蛋白的表达($P<0.05$), 增加 p21 蛋白表达($P<0.01$), 但对 p27 蛋白无显著影响。

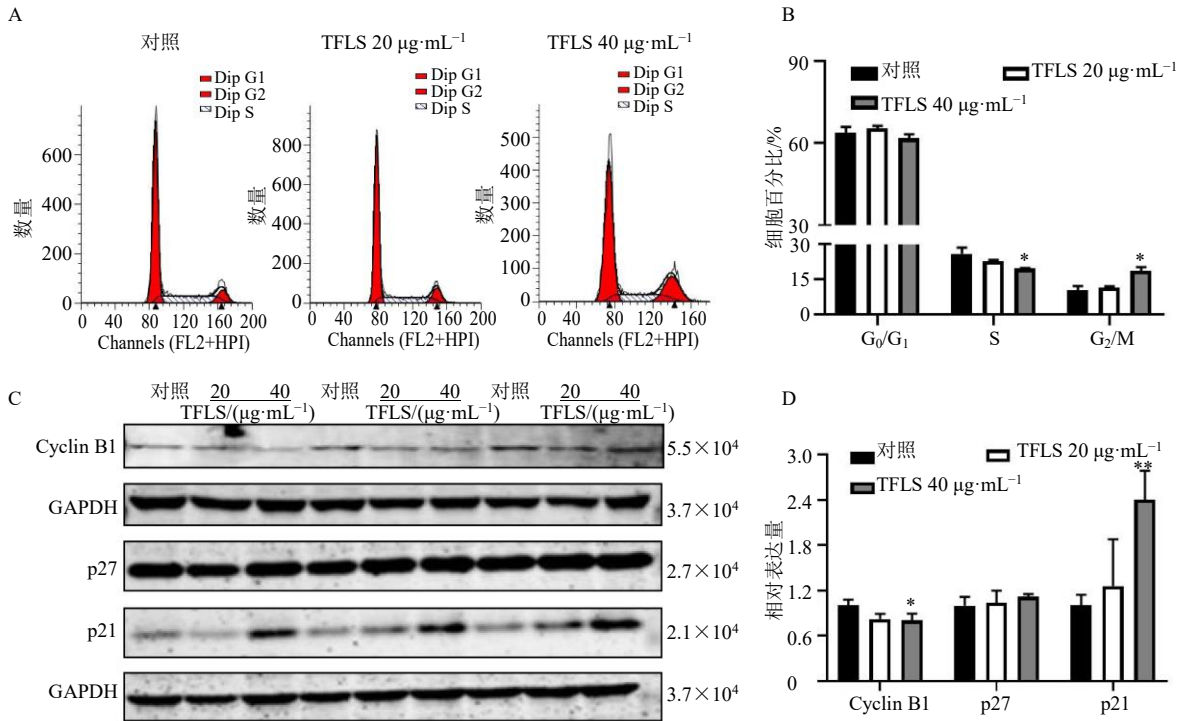
3.5 TFLS 对 A549 细胞凋亡的影响

为了验证 TFLS 是否可以诱导 A549 细胞发生凋亡, 本研究首先采用流式细胞术检测 TFLS 对细胞凋亡的影响, 如图 5-A、B 所示, 与对照组比较,

高质量浓度 TFLS 处理 A549 细胞 72 h 后, 细胞的凋亡率显著升高($P<0.05$)。结果表明, TFLS 能够诱导 A549 细胞凋亡。为了探索 TFLS 诱导 A549 细胞凋亡的机制, 本研究进一步检测 A549 细胞中与凋亡相关的 PARP、cleaved PARP、Bax 蛋白的表达。结果表明, 低剂量的 TFLS 具有下调 cleaved PARP 的趋势, 而高剂量的 TFLS 可以显著上调 cleaved PARP 蛋白的表达($P<0.05$), 对 Bax 和 PARP 蛋白的表达无显著影响(图 5-C、D), 表明 TFLS 可能通过外源性途径诱导 A549 细胞的凋亡。

3.6 TFLS 对 Skp2 和 p53 蛋白的影响

网络药理学结果显示, Skp2 和 p53 是 TFLS 发挥抑制 A549 细胞增殖作用的 Top 靶点, Skp2 为 S 期激酶相关蛋白 2, 其表达水平随着细胞周期的进展而周期性地改变^[11]。并且 Skp2 表达水平受损, 可导致细胞增殖受损和自发凋亡^[12]。p53 可诱导细胞周期阻滞、细胞衰老和凋亡等^[13]。因此, 本研究采用 Western blotting 检测 Skp2 和 p53 蛋白表达进行验证, 如图 6 所示, TFLS 能够抑制 Skp2 蛋白的表达($P<0.01$), 高剂量时能上调 p53 蛋白的表达水平($P<0.05$)。

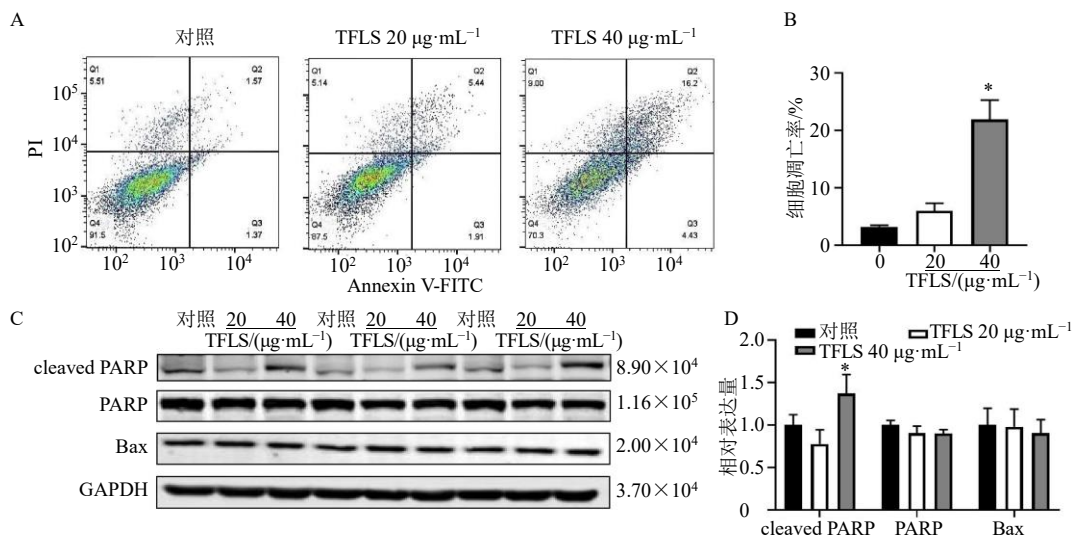


A、B-流式细胞术检测不同浓度 TFLS 作用 72 h 后对 A549 细胞周期影响；C、D-TFLS 对 A549 细胞周期相关蛋白的影响；与对照组比较：
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A, B-effect of different concentrations of TFLS on A549 cells cycle after 72 h through flow cytometry; C, D-effect of TFLS on expression of Cyclin B1, p21 and p27 proteins in A549 cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 4 TFLS 对 A549 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of TFLS on cell cycle in A549 cells



A、B-不同质量浓度 TFLS 对 A549 细胞凋亡的影响；C、D-TFLS 对 A549 细胞中凋亡相关蛋白的影响；与对照组比较： $P < 0.05$ 。

A, B-effect of different mass concentrations of TFLS on apoptosis of A549 cells; C, D-effect of TFLS on apoptosis-related proteins in A549 cells; * $P < 0.05$ vs control group.

图 5 TFLS 诱导 A549 细胞凋亡

Fig. 5 TFLS induced apoptosis of A549 cells

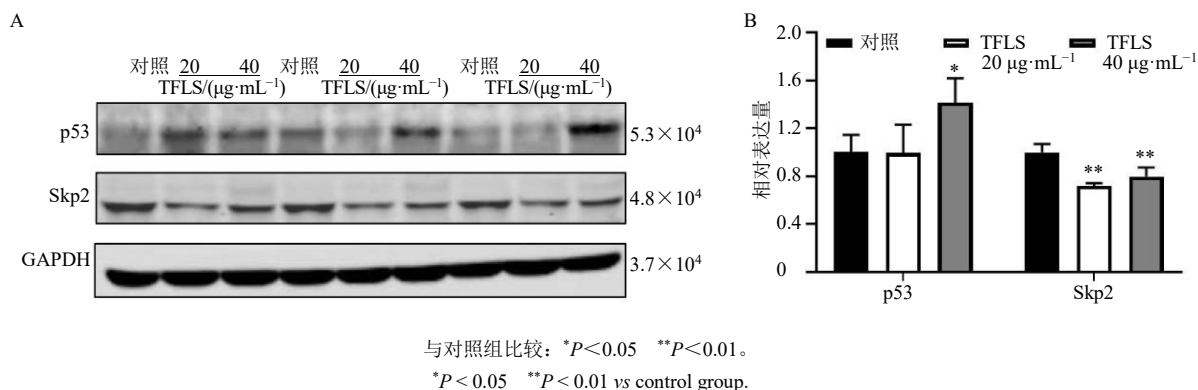


图 6 TFLS 对 A549 细胞中 Skp2 和 p53 蛋白的影响

Fig. 6 Effects of TFLS on Skp2 and p53 proteins in A549 cells

3.7 分子对接结果

为了探讨 Skp2 与 NSCLC 相关有效活性成分的结合能力,本研究采用了分子对接技术测定受体与配体的亲和力情况。结果表明,槲皮素、表儿茶素与 Skp2 蛋白的结合能分别为 -5.299 、 -5.147 kcal/mol (1 kcal= 4.182 kJ),提示存在着稳定的结合。与此同时,根据 Skp2 与槲皮素、表儿茶素分子对接的结合模式可知,槲皮素与 Skp2 中氨基酸 THR-158、LYS-61、TYR-157、GLU-89、ARG-82 存在着氢键作用(图 7-A)。表儿茶素与 Skp2 中氨基酸 LYS-61、GLU-89、ARG-82 存在着氢键作用(图 7-B)。因此,本研究推测 TFLS 中槲皮素、表儿茶素可能是 TFLS 发挥抗 NSCLC 作用的效应物质。

3.8 槲皮素、表儿茶素和 Skp2 的结合作用

DARTS 实验结果表明,与对照组相比,槲皮素、表儿茶素组中因槲皮素、表儿茶素与 Skp2 存在结合而促进了链酶对该蛋白的水解作用,从而使 Skp2 的蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.05$),见图 8。

4 讨论

目前,化疗仍是 NSCLC 的标准治疗手段,尤其是对于无法从靶向治疗中获益的患者。虽然化疗改善了 NSCLC 患者的预后,但肿瘤耐药性仍然是肺癌治疗的主要障碍之一^[14]。因此,寻找和开发治疗 NSCLC 的安全药物是目前亟需解决的关键问题。随着中医药的不断发展,中西医结合在癌症的治疗中凸显出一定的优势,中医药在减轻放化疗的毒副作用、提高生存质量、稳定瘤体、术后防止肿瘤复发转移、延长生存期和提高生存率等方面发挥着重要作用^[15-16]。

荔枝核为无患子科植物荔枝 *L. chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子,其性温,味甘、微苦,归肝、肾

经,有行气散结、祛寒止痛之功效^[17]。现代研究表明,荔枝核含有多种成分,具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、抗肝损伤、抗氧化等作用^[10]。在抗肿瘤方面,国内外学者发现荔枝核提取物对人结肠癌、肝癌、宫颈癌细胞等均有不同程度的抑制作用^[18],本课题组前期研究发现,荔枝核正丁醇提取物可抑制前列腺癌细胞的生长(PC3、DU145、C4-2B 和 RM1)和转移(PC3、DU145)^[19],并进一步证实 TFLS 是荔枝核正丁醇提取物中的主要活性成分群,并发现 TFLS 对乳腺癌和前列腺癌具有抑制作用^[5,7,9]。然而,TFLS 抗 NSCLC 的作用及其分子机制有待探讨。因此,本研究旨在进一步研究荔枝核提取物对肺癌的作用及其潜在分子机制,为 TFLS 的开发利用提供依据。

本研究结果表明,TFLS 可以抑制 NSCLC 的体外增殖和克隆形成能力,呈现一定的剂量相关性,并且可以抑制 A549 细胞的迁移和侵袭。EMT 是肿瘤细胞转移的关键过程,在此过程中,上皮细胞获得间充质细胞的特征,细胞运动性和迁移能力增强。同时伴随着上皮标志物 E-cadherin 表达量的降低、间质标志物 Vimentin 表达量升高^[19]。研究表明,EMT 在 NSCLC 细胞的发展和转移中扮演着重要角色^[20]。E-cadherin 在介导细胞间的黏附性中起着重要的作用,当 E-cadherin 表达下调时,可以促进 EMT 的发生与发展^[21]。Vimentin 是细胞骨架的组成部分,Vimentin 下调可以抑制肿瘤的迁移和侵袭^[22]。为进一步探讨 TFLS 抑制 A549 细胞的体外转移是否与抑制 EMT 有关,本研究采用 Western blotting 检测了 TFLS 对 A549 细胞中 EMT 相关蛋白的影响。结果表明,TFLS 可以上调 E-cadherin 的蛋白表达,下调 Vimentin 的蛋白表达,证实了

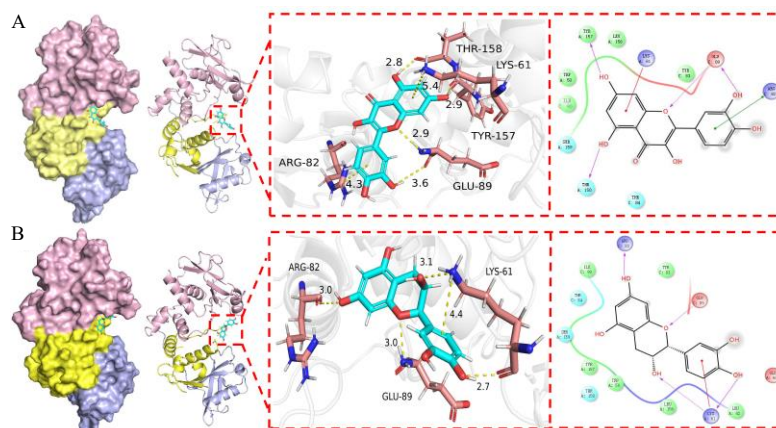


图 7 Skp2 与槲皮素 (A)、表儿茶素 (B) 的结合模式

Fig. 7 Binding mode of Skp2 with quercetin (A) and (-)-epicatechin (B)

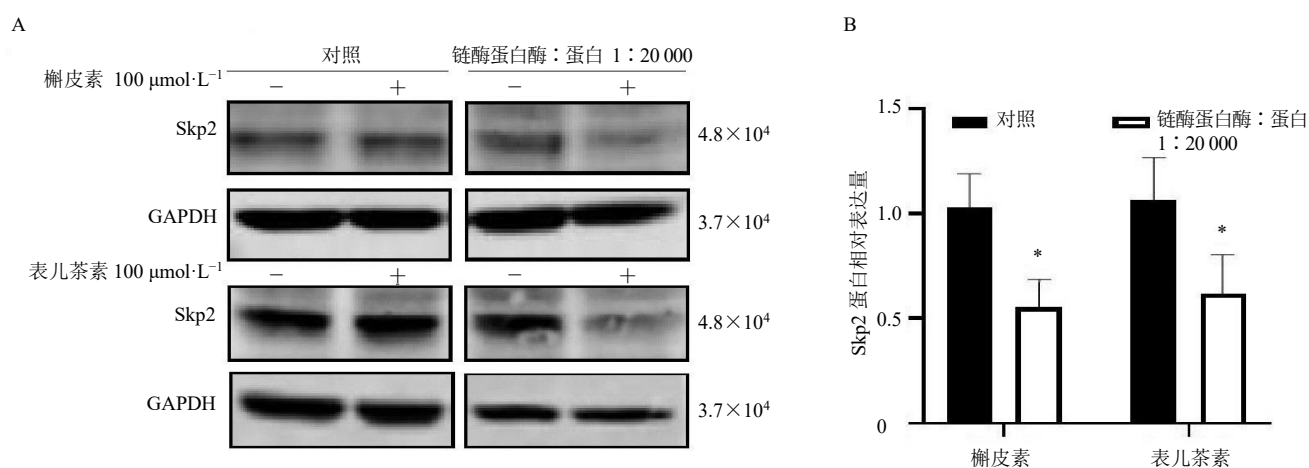
A-槲皮素、表儿茶素对 Skp2 稳定性的影响；B-实验结果统计图，与对照组比较：* $P < 0.05$ 。A-effects of quercetin and (-)-epicatechin on the stability of Skp2; B-statistical plot of experimental results, * $P < 0.05$ vs control group.

图 8 DARTS 实验考察槲皮素、表儿茶素和 Skp2 的结合作用

Fig. 8 Binding effect of quercetin, (-)-epicatechin and Skp2 by DARTS assay

TFLS 可通过影响 A549 细胞的 EMT 过程进而抑制 A549 细胞的转移。

为进一步探讨 TFLS 抑制 NSCLC 细胞的潜在活性成分、作用靶点及信号通路，本研究进行了网络药理学预测，通过查阅文献并联合使用 TCMSP 数据库共得到 36 个荔枝核总黄酮成分，并选取生物利用度大于 0.15 的 14 个成分加以分析，通过蛋白互作网络分析出包括 Skp2、p53 等 10 个核心靶点，对应 TFLS 中的槲皮素、表儿茶素等 11 个成分。通过 GO 功能富集分析结果显示 TFLS 抑制 NSCLC 的增殖可能与细胞周期及凋亡功能等密切相关。

细胞的异常增殖是癌细胞的一个基本特征，它

是由细胞周期调控紊乱及细胞凋亡异常所引起的。因此，为探究 TFLS 是否通过阻滞细胞周期以及诱导细胞凋亡进而抑制细胞增殖，本研究采用流式细胞术检测了 TFLS 对 A549 细胞周期和凋亡的影响，实验结果表明，TFLS 作用在 A549 细胞后主要使其生长阻滞在 G₂/M 期。为探究 TFLS 诱导的 G₂/M 阻滞的分子机制，本研究采用 Western blotting 检测了 A549 细胞中 Cyclin B1、p21 和 p27 等对 G₂/M 期起重要调控作用的蛋白表达情况，结果表明，TFLS 高剂量组（40 μg/mL）能降低 A549 细胞中 Cyclin B1 蛋白的表达水平，增加 p21 的蛋白表达水平。为了验证 TFLS 是否可以诱导 A549 细胞发生凋亡，本研究采用流式细胞术检测 TFLS 对细胞凋亡的影

响,结果表明,TFLS可诱导A549细胞发生晚期凋亡。为探究TFLS诱导A549细胞凋亡的机制,本研究检测了细胞凋亡相关的蛋白PARP、cleaved PARP和Bax的表达,结果表明,高剂量的TFLS能够上调cleaved PARP蛋白的表达。

Skp2也称为p45或FBXL1,是F-box蛋白家族的成员之一,以Skp2-Skp1-Cullin-1-F-box(SCF)泛素连接酶四元复合物的形式参与泛素化、细胞周期控制和信号转导^[23-25]。p53是一种肿瘤抑制因子,在细胞周期停滞和细胞凋亡,中发挥着重要的作用^[26],乙酰化是p53稳定和激活所必需^[27]。研究表明,Skp2与E1A结合蛋白p300(E1A binding protein p300, p300)形成复合物,阻断其与p53的相互作用,从而抑制p300介导的p53乙酰化^[28-29]。p21是Skp2的蛋白底物,Skp2以泛素化的形式促进其降解^[30]。CDKN1A基因编码p21蛋白,是p53介导的细胞周期阻滞的主要诱导基因^[31-32]。p21与Cyclin B/CDK1相互作用导致G₂/M细胞周期阻滞^[33]。p53通过激活PARP,从而诱导细胞发生凋亡^[34]。为探讨TFLS体外是否是通过调控Skp2和p53的表达,阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡,本研究通过Western blotting实验检测了TFLS干预后的A549细胞中Skp2和p53的表达情况,发现TFLS可明显上调p53的表达,下调Skp2的表达。因此,本研究推断TFLS对A549细胞的抑制作用可能与调控Skp2-p21/p53信号轴有关(图9)。

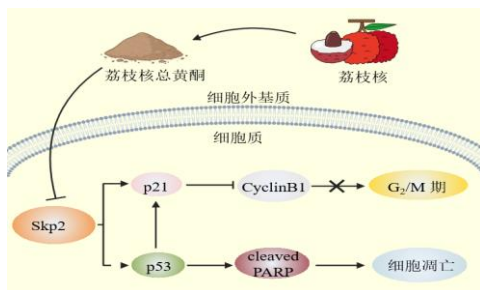


图9 TFLS抑制A549细胞生长的分子机制

Fig.9 Molecular mechanism of TFLS against A549 cells

同时,本研究采用p53活性抑制剂PFT-β进行了挽救实验,结果显示PFT-β干预后不能回调TFLS引起的细胞增殖和转移的抑制作用。本研究推测TFLS可通过多成分、多靶点和多途径发挥作用,p53是其调节的蛋白之一,但并不是其发挥作用的唯一信号通路。为了探讨TFLS的药效物质基础,本研究采用分子对接预测了Skp2与其相关有效活

性成分的结合能力,结果表明,槲皮素、表儿茶素和Skp2具有较好的结合能,进而本研究进行DARTS实验证实了槲皮素、表儿茶素与Skp2存在结合作用。据此,本研究推测槲皮素和表儿茶素可能是TFLS靶向Skp2发挥作用的效应物质。

综上,TFLS在体外可以抑制NSCLC的生长和转移,诱导A549细胞凋亡,阻滞细胞在G₂/M期,减弱细胞EMT的发生,其分子机制可能与调控Skp2-p21/p53信号轴有关。槲皮素和表儿茶素可能是TFLS靶向Skp2发挥作用的效应物质。然而,TFLS在体内是否可以抑制NSCLC的生长和转移,TFLS是否通过泛素化途径促进Skp2的降解发挥作用以及槲皮素、表儿茶素与Skp2的结合亲和力和结合的具体氨基酸作用位点仍需进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13.
- [2] Zhang S Y, Lu Y Y, He X L, *et al.* Lutein inhibits tumor progression through the ATR/Chk1/p53 signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(4): 1260-1273.
- [3] Cao M M, Li H, Sun D Q, *et al.* Current cancer burden in China: Epidemiology, etiology, and prevention [J]. *Cancer Biol Med*, 2022, 19(8): 1121-1138.
- [4] Cao S S, Han Y Y, Li Q F, *et al.* Mapping pharmacological network of multi-targeting Litchi ingredients in cancer therapeutics [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 451.
- [5] Chang M, Zhu D, Chen Y J, *et al.* Total flavonoids of Litchi seed attenuate prostate cancer progression via inhibiting AKT/mTOR and NF-κB signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 758219.
- [6] Cui D X, Luo Z, Liu X, *et al.* Combination of metabolomics and network pharmacology analysis to decipher the mechanisms of total flavonoids of Litchi seed against prostate cancer [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(7): 951-968.
- [7] Zhang W Q, Chen T, Yang P L, *et al.* Total flavonoids of Litchi chinensis Sonn. seed inhibit prostate cancer growth in bone by regulating the bone microenvironment via inactivation of the HGFR/NF-κB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117327.
- [8] 张维权, 李小兰, 薛薇, 等. 荔枝核总黄酮联合紫杉醇对前列腺癌耐药细胞的增殖抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(4): 528-534.

- [9] Liao Y N, Luo Z, Liu Y, *et al.* Total flavonoids of *Litchi* seed attenuate stem cell-like properties in breast cancer by regulating Notch3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116133.
- [10] Ibrahim S R M, Mohamed G A. *Litchi chinensis*: Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 492-513.
- [11] Wirbelauer C, Sutterlüty H, Blondel M, *et al.* The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: Evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts [J]. *EMBO J*, 2000, 19(20): 5362-5375.
- [12] Meng J, Ding Y, Shen A G, *et al.* Overexpression of PPAR γ can down-regulate Skp2 expression in MDA-MB-231 breast tumor cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 345(1/2): 171-180.
- [13] Bieging K T, Mello S S, Attardi L D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(5): 359-370.
- [14] 赵林林, 孔凡铭, 杨仕蕊, 等. 987 例晚期非小细胞肺癌化疗患者的生存分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(8): 2651-2666.
- [15] Kong F M, Wang C R, Zhao L L, *et al.* Traditional Chinese medicines for non-small cell lung cancer: Therapies and mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(4): 509-515.
- [16] 赵林林, 王艳亭, 孔凡铭, 等. 7 种常用口服中成药辅助治疗晚期非小细胞肺癌患者的回顾性研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(16): 5119-5127.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 255.
- [18] Lin C C, Chung Y C, Hsu C P. Anti-cancer potential of litchi seed extract [J]. *World J Exp Med*, 2013, 3(4): 56.
- [19] Guo H W, Luo H, Yuan H B, *et al.* *Litchi* seed extracts diminish prostate cancer progression via induction of apoptosis and attenuation of EMT through Akt/GSK-3 β signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41656.
- [20] Zhu X, Chen L J, Liu L, *et al.* EMT-mediated acquired EGFR-TKI resistance in NSCLC: Mechanisms and strategies [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1044.
- [21] 马旭冉, 王敦方, 冯雪, 等. 基于 Wnt 信号通路研究黄芩汤干预炎症微环境下结肠癌细胞上皮间质转化与细胞周期进程的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(7): 2155-2162.
- [22] 刘洁, 史红健, 范婧莹, 等. 基于 TGF- β 1 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 [J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3053-3060.
- [23] Bai C, Sen P, Hofmann K, *et al.* SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box [J]. *Cell*, 1996, 86(2): 263-274.
- [24] Craig K L, Tyers M. The F-box: A new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999, 72(3): 299-328.
- [25] Hershko D D. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer [J]. *Cancer*, 2008, 112(7): 1415-1424.
- [26] Chen J D. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(3): a026104.
- [27] Ito A, Lai C H, Zhao X, *et al.* p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2 [J]. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1331-1340.
- [28] Kitagawa M, Lee S H, McCormick F. Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300 [J]. *Mol Cell*, 2008, 29(2): 217-231.
- [29] Inuzuka H, Gao D M, Finley L W, *et al.* Acetylation-dependent regulation of Skp2 function [J]. *Cell*, 2012, 150(1): 179-193.
- [30] Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, *et al.* Role of the SCF Skp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 25752-25757.
- [31] el-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 817-825.
- [32] Hernández Borrero L J, El-Deiry W S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188556.
- [33] Dash B C, El-Deiry W S. Phosphorylation of p21 in G₂/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(8): 3364-3387.
- [34] Wiman K G. P53 talks to PARP: The increasing complexity of p53-induced cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(11): 1438-1439.

[责任编辑 罗 曦]