

• 药理与临床 •

基于 PI3K/Akt 通路研究鹿药皂苷 japonicoside B 调节上皮细胞间充质转化过程抑制肝癌细胞生长和转移的机制

崔誉文¹, 张东东^{2,3}, 李玉泽^{2,3}, 汤海峰⁴, 何昊^{1*}, 宋小妹^{2,3*}

1. 西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西省中医药管理局 太白七药研究与应用重点研究室, 陕西 咸阳 712046

4. 空军军医大学 药学系, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 探讨鹿药皂苷 JapB (JaB) 抑制肝癌细胞生长和转移的作用及机制。方法 以人肝癌 SMMC-7721 和 HepG2 细胞为研究对象, 设置对照组和 JaB (2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$) 组, 采用 Transwell 小室实验检测细胞迁移、侵袭能力; 扫描电镜观察细胞形态变化; Western blotting 检测上皮细胞间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路相关蛋白表达。以裸鼠移植瘤模型和裸鼠肝癌肺转移模型为研究对象, 设置模型组及 JaB 组 (5、10 mg/kg) 和 5-氟尿嘧啶 (10 mg/kg) 组, 观察 JaB 对体内肿瘤生长和肺转移的影响; 免疫组化法检测肿瘤组织中 Ki67 表达; Western blotting 检测凋亡、EMT 过程和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较, JaB 显著抑制肝癌细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.01$), 上调 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达 ($P < 0.01$), 下调 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 和 Snail、Slug、Twist 表达 ($P < 0.01$); JaB 干预后, 肝癌细胞形态发生变化, 由梭型或伸展状态逐渐变圆, 伪足变短消失; PI3K 抑制剂 LY294002 处理肝癌细胞后, 效果与 JaB 相似, 均可抑制 PI3K 磷酸化 ($P < 0.01$), 同时上调 E-cadherin 表达 ($P < 0.01$), 下调 N-cadherin 表达 ($P < 0.01$), 从而抑制 EMT 过程。裸鼠移植瘤模型中, 与模型组比较, JaB 能够明显抑制肿瘤生长 ($P < 0.01$), 其中 JaB 高剂量 (10 mg/kg) 组抑制肿瘤生长作用最为显著, 效果优于 5-氟尿嘧啶 ($P < 0.01$); JaB 组肿瘤组织中 Ki67、B 细胞淋巴瘤 2 蛋白 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 表达显著降低 ($P < 0.01$), 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-asparate protease-3, cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 表达显著升高 ($P < 0.01$), Akt 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 与细胞实验结果一致, JaB 可能通过调节 Akt 的磷酸化影响 PI3K/Akt 通路活性, 进一步抑制 EMT 过程。裸鼠肝癌肺转移模型中, JaB 显著抑制肝癌细胞肺转移的发生, 与模型组比较, JaB 组肿瘤组织中 Ki67、N-cadherin、Snail、Slug、Twist 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), E-cadherin 表达显著升高 ($P < 0.01$), Akt 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肿瘤细胞 EMT 过程受到了抑制。结论 JaB 通过调控 PI3K/Akt 通路, 上调 E-cadherin, 抑制 N-cadherin 以及 Snail、Slug、Twist 等转录因子表达来提高细胞间的黏附力, 并抑制其向间质细胞转化, 逆转了 EMT 过程, 从而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭, 以及其在体内生长和转移, 进而发挥抗肿瘤的作用。

关键词: 鹿药; japonicoside B; 肝癌细胞; 上皮-间充质转化; 细胞迁移; 细胞侵袭; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)23-8584-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.23.011

Mechanism of japonicoside B in inhibiting growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by regulating epithelial-mesenchymal transition based on PI3K/Akt pathway

CUI Yuwen¹, ZHANG Dongdong^{2,3}, LI Yuze^{2,3}, TANG Haifeng⁴, HE Hao¹, SONG Xiaomei^{2,3}

1. School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

收稿日期: 2025-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973192); 西安医学院校级科研项目 (2020DOC31); 陕西省教育厅青年创新团队项目 (22JP076); 西安医学院科技能力提升计划 (2022NLTS061); 国家中管局中药化学高水平重点学科建设项目 (zyyzdk-2023202)

作者简介: 崔誉文, 副教授, 研究方向为中药药效与作用机制。E-mail: cuiyuwen@xiyi.edu.cn

*通信作者: 何昊, 教授, 硕士生导师, 从事中药生物活性及作用机制研究。E-mail: hehao313@163.com

宋小妹, 教授, 硕士生导师, 从事中药及复方的临床合理应用等研究。E-mail: songxiaom@126.com

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
3. Key Laboratory of Research and Application of “Taibai Qi Yao”, Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
4. Department of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect and mechanism of japonicoside B (JaB) in *Smilacina japonica* on the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells (HCC). **Methods** SMMC-7721 and HepG2 cells were used as the research objects, and control group and JaB (2.5, 5.0 μ mol/L) groups were set up. Transwell chamber experiments were used to detect migration and invasion ability of cells; Cellular morphological changes were observed using scanning electron microscopy; Western blotting was used to detect the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway related protein expressions. Nude mouse transplant tumor models and nude mouse liver cancer lung metastasis models were used as research objects, model group, JaB (5, 10 mg/kg) groups and 5-fluorouracil (10 mg/kg) group were set up to observe the effects of JaB on tumor growth and lung metastasis *in vivo*; Immunohistochemistry was used to detect Ki67 expression in tumor tissues; Western blotting was used to detect apoptosis, EMT process and PI3K/Akt pathway related protein expressions. **Results** Compared with control group, JaB significantly inhibited the migration and invasion of HCC ($P < 0.01$), up-regulated the expression of E-cadherin ($P < 0.01$), and down-regulated the expressions of N-cadherin and Snail, Slug, Twist ($P < 0.01$); After JaB intervention, the morphology of HCC was changed, gradually becoming round from spindle shaped or stretched state, and pseudopodia became shorter and disappeared; After treating with PI3K inhibitor LY294002, the effect was similar to that of JaB, both of which could inhibit PI3K phosphorylation ($P < 0.01$), while up-regulating E-cadherin expression ($P < 0.01$) and down-regulating N-cadherin expression ($P < 0.01$), thereby inhibiting the EMT process. In the nude mouse transplant tumor model, compared with model group, JaB could significantly inhibit tumor growth ($P < 0.01$), among which the high-dose JaB (10 mg/kg) group had the most significant inhibitory effect on tumor growth, with a better effect than 5-fluorouracil ($P < 0.01$); The expressions of Ki67 and B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2) in tumor tissues of JaB group were significantly reduced ($P < 0.01$), while the expressions of cleaved cysteine aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3), cleaved Caspase-9 and Bcl-2 associated X protein (Bax) were significantly increased ($P < 0.01$). The phosphorylation level of Akt was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), which was consistent with the results of cell experiments, JaB may affect the PI3K/Akt pathway activity by regulating Akt phosphorylation, further inhibiting the EMT process. In the nude mouse liver cancer lung metastasis model, JaB significantly inhibited the occurrence of liver cancer cell lung metastasis. Compared with model group, the expressions of Ki67, N-cadherin, Snail, Slug and Twist in tumor tissue of JaB group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.01$), and the phosphorylation level of Akt was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the EMT process of tumor cells was inhibited. **Conclusion** JaB enhances intercellular adhesion and inhibits their transformation into interstitial cells by regulating PI3K/Akt pathway, up-regulating E-cadherin, inhibiting N-cadherin as well as transcription factors such as Snail, Slug, and Twist, and reversing the EMT process, and then inhibits the migration and invasion of liver cancer cells, as well as their growth and metastasis *in vivo*, thereby exerting anti-tumor effects.

Key words: *Smilacina japonica* A. Gray; japonicoside B; hepatocellular carcinoma cells; epithelial-mesenchymal transition; cell migration; cell invasion; PI3K/Akt pathway

肝癌是临床常见的消化系统肿瘤之一，世界卫生组织数据显示，2022 年全球肝癌新发约 865 269 例，其中我国约占 42.4%。在我国，肝癌的发病率位列常见恶性肿瘤第 5 位，致死率则高居第 2 位，对人民健康构成了严重威胁^[1]。肝癌早期症状不明显，是一种典型的炎症-癌症转化肿瘤^[2]。我国的肝癌患者也常见伴随乙肝病毒感染、肝硬化等，就诊时大多数为中晚期，手术根治性切除机会小，需要结合化学治疗、辐射治疗以及新型靶向药物治疗等，但因此带来的不良反应和经济负担常常影响后续治疗^[3]。近年来，中医药在预防和治疗肝癌方面展现出独特的优势，其相关研究也取得长足进展，对

减轻患者症状、延长患者生存期起到了关键的作用。

鹿药属 *Smilacina* Desf. 植物隶属于百合科 (Liliaceae)，约有 25 种，主要分布于亚洲、美洲和欧洲，我国有 16 种，广泛分布于西南部、西北部及东北部^[4-5]。鹿药 *Smilacina japonica* A. Gray 为百合科鹿药属多年生草本植物，分布于河北、山西、陕西、四川、甘肃、河南等省，为传统药用植物，且具有食用历史，其地上部分茎叶嫩苗是民间山野菜，其地下干燥根及根茎入药，在秦巴山区又名偏头七、螃蟹七、白窝儿七、狮子七等^[6]。当地居民常用其治疗风湿、痈肿、瘀伤等，是秦巴特色草药资源“太白七药”之一^[7]。现代研究表明，鹿药含有皂

苷、黄酮等化学成分，具有抗真菌、抗氧化、抗肿瘤等药理活性，药用价值高^[8-10]。鹿药兼具有药用和食用价值，但目前国内外对鹿药的研究多集中在植物学特性、生药鉴定、营养元素测定等方面，对其化学成分的系统研究及生物活性和作用机制研究较少。课题组前期研究发现，从鹿药中分离得到的皂苷 japonicoside B (JaB) 具有诱导肝癌细胞凋亡及细胞周期阻滞作用^[11-12]。

上皮细胞间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是上皮来源恶性肿瘤细胞在早期具备迁移和侵袭能力的关键。E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 作为 EMT 过程关键蛋白，其作用主要是维持上皮细胞表型，使细胞不易发生迁移和侵袭；而 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 作用则相反，可使肿瘤细胞间黏附作用减弱，上皮特性降低，细胞迁移侵袭能力增强^[13-14]。磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路参与肿瘤细胞增殖、分化等过程，能够活化上调 Snail1 和 Slug 等 EMT 相关转录因子，引起 E-cadherin 等表达下调，N-cadherin、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、MMP9 等表达上调并获得间质表型，从而促进 EMT 的发生，促进细胞迁移和侵袭^[15-16]。基于此，本研究进一步考察 JaB 体外对人肝癌细胞迁移、侵袭等的干预作用，以及在 JaB 干预下 EMT 过程中相关蛋白表达变化，同时关注该过程中 PI3K/Akt 通路的调节作用，探讨 JaB 在人肝癌 SMMC-7721 和 HepG2 细胞迁移和侵袭过程中的作用和机制，为鹿药及其成分在癌症治疗中的应用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

SMMC-7721 和 HepG2 细胞购自美国 ATCC。SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 40 只，4~6 周龄，体质量 18~20 g，由空军军医大学实验动物中心提供，许可证号 SCXK (陕) 2019-001。动物于实验前适应性饲养 3 d，每日给予标准食物和饮水，保持光照和避光循环饲养 (10 h/14 h)，室温 (25±2) °C。本研究经西安医学院实验伦理委员会批准 (批准号 XYLS2020018)。

1.2 药品与试剂

JaB 结构式见图 1，由本课题组从鹿药 (偏头七) 中分离得到，经 HPLC 分析，质量分数>98%^[11]；

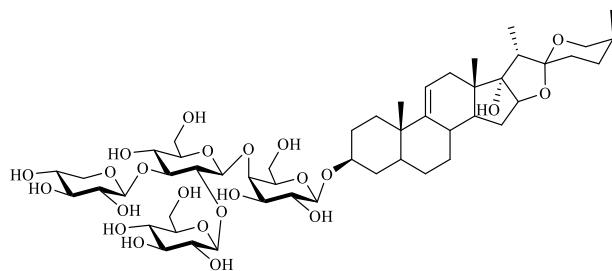


图 1 JaB 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of JaB

5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu, 批号 F6627, 质量分数>98%) 购自江苏倍达医药科技有限公司； RPMI 1640 培养基 (批号 2075140) 购自美国 Hyclone 公司；胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 SA20119) 购自兰州民海生物工程有限公司；胰蛋白酶 (批号 20164920) 购自美国 Amresco 公司；二甲基亚砜 (批号 D2650) 购自天津市巴斯夫化工试剂有限公司；Matrigel 基质胶 (批号 356234)、Transwell 小室购自美国 Corning 公司；显色试剂盒 (批号 2122B0423)、细胞裂解液 (批号 112520200718) 购自上海碧云天生物技术有限公司；Bradford 法蛋白定量试剂盒 (批号 C05-02001) 购自北京博奥森生物技术公司；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶制剂盒 (批号 02241250) 购自北京索莱宝科技有限公司；聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (批号 0000316706) 购自美国 Millipore 公司；E-cadherin 抗体 (批号 BS72286)、N-cadherin 抗体 (批号 BS90914)、Snail 抗体 (批号 BS8479)、Slug 抗体 (批号 BS6108)、Twist 抗体 (批号 BS80430)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-asparagine protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 CC02082)、cleaved Caspase-8 抗体 (批号 GB2052)、cleaved Caspase-9 抗体 (批号 CT2126)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 BS65629)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体 (批号 BS90121)、β-actin 抗体 (批号 CD2068) 购自美国 Bioworld 公司；PI3K 抗体 (批号 9449T)、Akt 抗体 (批号 4228P)、p-Akt 抗体 (批号 4356S)、Ki67 抗体 (批号 9449) 购自美国 CST 公司；抗小鼠二抗 (批号 BS2045)、抗兔二抗 (批号 CH2037) 购自美国 Bioworld 公司；PI3K 抑制剂 LY294002 (批号 268995) 购自美国

MCE 公司。

1.3 仪器

SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); BP211DAL-105 型电子分析天平(上海光正医疗仪器有限公司); 0-150 型游标卡尺(青海麦克龙测量技术有限公司); MCO-15AC 型 CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司); YXQ-LS-50S II型高压灭菌锅(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); UPT-IV-5T 型超纯水机(成都超纯科技有限公司); ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统、Trans-blot SD 型转膜仪、Mini-PROTEAN 型电泳仪、Model 550 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司); Ti-U 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); CX-200 型扫描电子显微镜(韩国 COXEM 公司); T25 型匀浆机(德国 IKA 公司); 5418R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SMMC-7721 和 HepG2 细胞用含 10% FBS 和 100 U/mL 青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养基, 置于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中培养。

2.2 Transwell 小室实验检测细胞迁移能力

JaB 对 SMMC-7721 细胞的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀) 值为 (7.50±0.32) μmol/L, 对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 值为 (8.97±0.71) μmol/L^[12]。选择 JaB 对细胞增殖抑制率<30%的浓度, 以排除药物对细胞增殖的影响进而影响侵袭、迁移。故采用 2.5、5.0 μmol/L JaB 进行实验。

取对数生长期的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞, 调整细胞密度, 吸取 0.2 mL 细胞悬液(无血清)接种于 24 孔板的 Transwell 小室的上室中, 使细胞密度为 4×10⁴ 个/孔, 小室下层相应加入含 30% FBS 的培养基 600 μL, 将 Transwell 小室置于培养箱中培养。给药组分别给予含 2.5、5.0 μmol/L JaB 的培养基(30% FBS), 对照组加入不含药物的培养基, 作用 24 h, 弃去 Transwell 小室内外液体, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL, 在室温条件下固定 15 min。随后用 PBS 缓冲液浸泡洗涤 3 次, 在小室中加入 0.1% 结晶紫 1 mL, 室温条件下染色 10 min, 随后 PBS 浸泡洗涤 3 次, 棉签擦除掉小室上室中的细胞, 于倒置显微镜下观察并拍照。

2.3 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力

在-20 °C 取出 Matrigel 基质胶, 4 °C 融化, 置

于冰浴操作; 用无血清的 4 °C 预冷细胞培养基稀释 Matrigel 胶(培养基: 基质胶=9:1); 取 100 μL 稀释的基质胶加到 Transwell 上室中, 置于 37 °C 培养箱中孵育至少 1~2 h, 使基质胶充分凝胶。按“2.2”项下方法进行处理, 于倒置显微镜下观察并拍照。

2.4 扫描电镜观察细胞形态

取对数生长期的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞, 消化、离心、重悬成单细胞悬液, 将灭菌后的细胞爬片置于 24 孔板底部, 细胞以 2×10⁴ 个/孔接种于含有无菌细胞爬片的 24 孔板中。培养 24 h 后, 更换为含 2.5、5.0 μmol/L JaB 的培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 作用 24 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 漂洗细胞 3 次, 加入 1 mL 2% 戊二醛于 24 孔板中, 固定细胞, 培养板放入 4 °C 冰箱过夜, 制样后于扫描电镜下观察并拍照。

2.5 Western blotting 检测细胞中 EMT 过程和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达

取对数生长期的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞, 以 1×10⁶ 个/孔均匀铺于 6 孔板内, 培养 24 h, 设置对照组和给药组, 对照组加入培养基, 给药组加入等体积含 2.5、5.0 μmol/L JaB 的培养基, 作用 48 h 后收集细胞, 提取总蛋白。

为考察 PI3K/Akt 通路的作用, 给予 PI3K 抑制剂 LY294002 进行机制研究。设置对照组、LY294002 (2 μmol/L) 组、JaB (5 μmol/L) 组和 LY294002+JaB 组, 提前 2 h 给予 LY294002, 再给予 JaB 作用 24 h 后收集细胞, 提取总蛋白。

蛋白定量后, 蛋白样品经 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 10% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温孵育 2 h; TBST 洗涤后, 采用化学发光仪显影。

2.6 裸鼠移植瘤模型观察 JaB 对肿瘤生长的影响

取雄性裸鼠 20 只, 适应性饲养 3 d 后, sc SMMC-7721 细胞 (2×10⁶ 个/只), 接种 4 d 后可见直径约为 5 mm 的皮下结节, 说明裸鼠移植瘤模型建立成功。随机分为模型组及 JaB 低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组和 5-Fu (10 mg/kg) 组, 每组 5 只。连续 ig 给药 30 d, 每 2 天测量肿瘤长径和短径, 并称定裸鼠体质量。

2.7 免疫组化法检测肿瘤组织中 Ki67 的表达

实验结束后, 分离肿瘤组织, 常规脱水后进行石蜡包埋, 制作石蜡切片, 脱蜡至水。用 30% H₂O₂

于避光条件下处理切片 10 min；蒸馏水洗涤 3 次，每次 3 min；滴加 50 mg/mL 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭液，室温下封闭 30 min；滴加 Ki67 抗体 (1:200)，4 °C 孵育过夜；PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，滴加二抗，室温孵育 30 min；PBS 洗涤 3 次，每次 2 min，滴加 SABC 溶液，室温孵育 20 min；PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，使用二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒显色，于显微镜下观察并拍照，采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对阳性结果区域进行扫描统计。

2.8 Western blotting 检测肿瘤组织中凋亡和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达

取各组裸鼠肿瘤组织，使用蛋白裂解液匀浆提取蛋白，每 0.1 克肿瘤组织加 1 mL 裂解液，冰浴下匀浆；匀浆完成后继续冰浴裂解 30 min，每隔 10 min 振摇 1 次；4 °C、12 000 r/min 离心 20 min，取上清，按比例加入 5×上样缓冲液，混匀后煮沸 5 min 使蛋白变性，冷却后于-20 °C 保存。采用 Western blotting 法检测肿瘤组织中 Akt、p-Akt、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、cleaved Caspase-9、Bax、Bcl-2 的表达。

2.9 裸鼠肝癌肺转移模型观察 JaB 对肝癌细胞肺转移的影响

取雄性裸鼠 20 只，适应性饲养 3 d 后，尾 iv 0.2 mL SMMC-7721 细胞悬液 (5×10^5 个/只) [17-18]。随机分为模型组及 JaB 低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组和 5-Fu (10 mg/kg) 组，每组 5 只。接种 3 d 后开始 ig 给药，1 次/d，连续给药 30 d，每 2 天称定裸鼠体质量。实验结束后，分离肺部组织，观察药物对肝癌细胞肺转移的影响。取肿瘤组织，按“2.7”

项下检测肿瘤组织中 Ki67 表达，按“2.8”项下检测肿瘤组织中 EMT 过程和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 JaB 对 SMMC-7721 和 HepG2 细胞迁移能力的影响

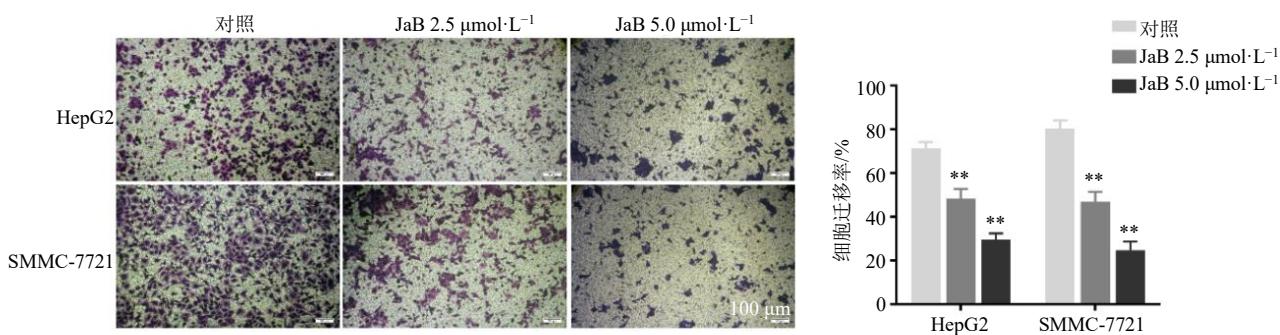
肿瘤细胞的迁移能力往往异常增强，在肿瘤转移中起到重要作用，是其穿越组织屏障的基础。Transwell 小室具有通透性膜结构，可观察细胞穿过通透性膜到达小室下方的能力强弱。通过在 Transwell 小室中接种 SMMC-7721 和 HepG2 细胞，再使用 2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 JaB 干预细胞 24 h 后，发现 JaB 可显著抑制 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的迁移 ($P < 0.01$ ，图 2)，且呈剂量相关性。

3.2 JaB 对 SMMC-7721 和 HepG2 细胞侵袭能力的影响

在 Transwell 小室半透膜上方铺以基质胶，接种细胞于基质胶上，细胞被小室下方的高浓度血清所驱动，促进 MMPs 的分泌，降解基质胶后细胞穿过半透膜抵达小室下方，完成侵袭过程。如图 3 所示，JaB 能够显著抑制 SMMC-7721 和 HepG2 细胞侵袭 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性。

3.3 JaB 对 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

EMT 发生过程中，细胞丧失了上皮特征，获得了间充质特征，表现为细胞间去黏连化、黏附度降



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 图 2~5 同。

** $P < 0.01$ vs control group, same as Figs. 2~5.

图 2 JaB 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞迁移的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of JaB on migration of HepG2 and SMMC-7721 cells ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

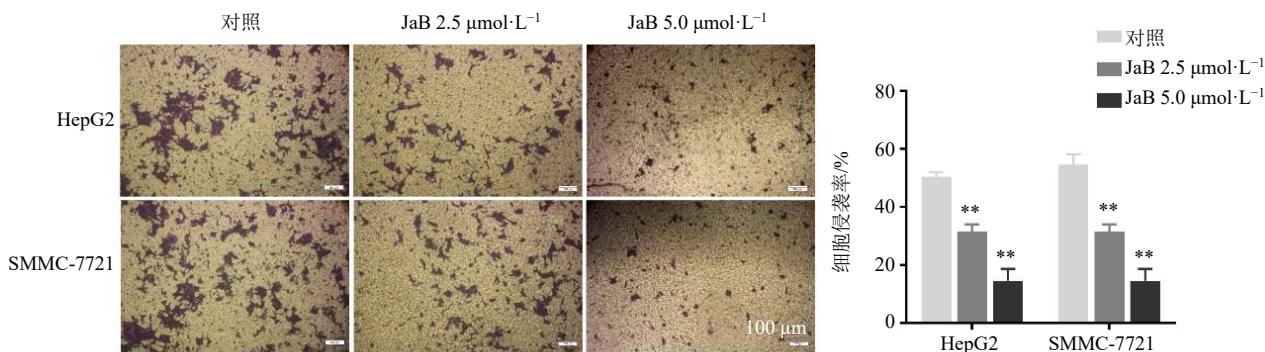


图 3 JaB 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞侵袭的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Effect of JaB on invasion of HepG2 and SMMC-7721 cells ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

低, 获得更强的侵袭运动能力, 迁移运动特性增强。EMT 过程由多种转录因子驱动, 如 Snail 家族、Twist 家族等, 这些转录因子能够抑制上皮样标志蛋白 E-cadherin 表达。Snail 家族主要包括 Snail1 和 Slug 等, Twist 家族转录因子包括 Twist1 和 Twist2 等。这些转录因子的变化使得上皮细胞标记物 E-cadherin 表达下调或逐渐消失, 并获得间质表型, 如间质细胞标记物 N-cadherin 的表达上调。如图 4

所示, 与对照组比较, JaB (2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$) 组 E-cadherin 表达显著升高 ($P < 0.01$), 而间质样标志蛋白 N-cadherin 和 Snail、Slug、Twist 表达显著降低 ($P < 0.01$), 表明 JaB 通过上调 E-cadherin 表达, 下调 N-cadherin 及相关转录因子 Snail、Slug、Twist 表达来提高细胞间的黏附力, 并抑制其向间质细胞转化, 最终阻断 EMT 过程, 从而发挥抑制肝癌细胞迁移和侵袭的作用。

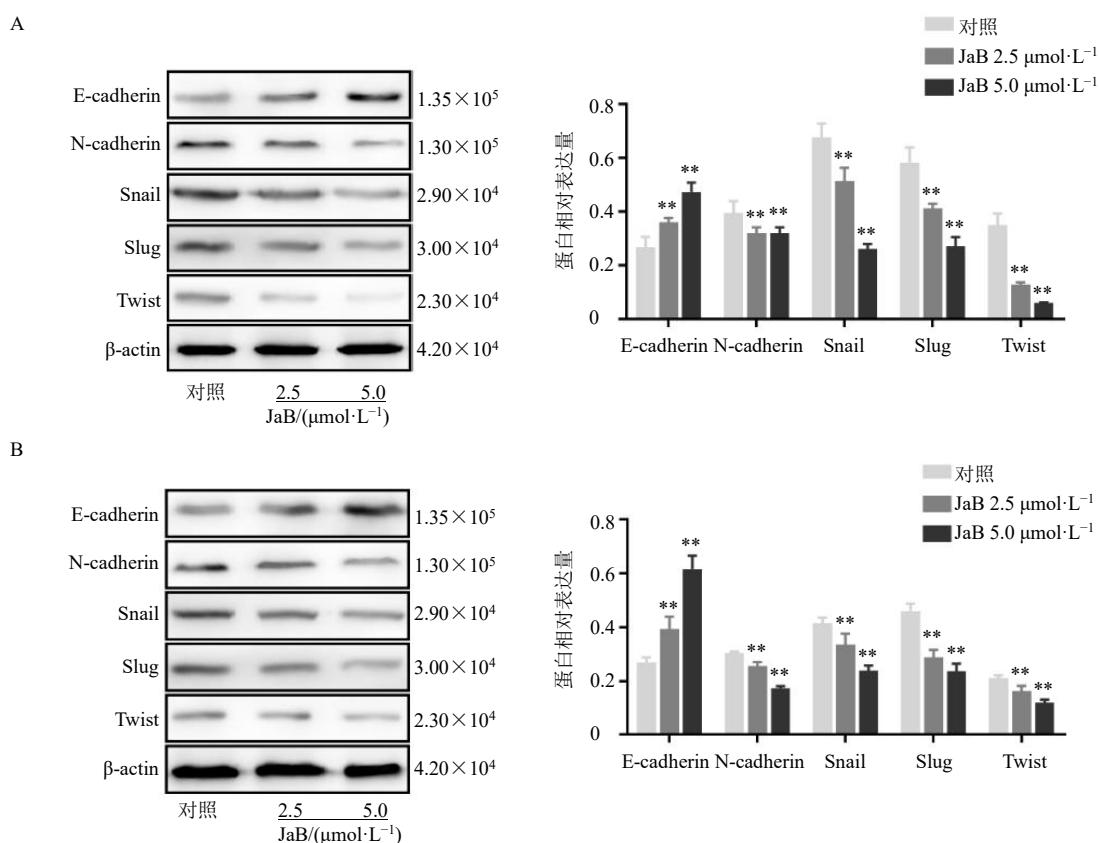


图 4 JaB 对 HepG2 (A) 和 SMMC-7721 (B) 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 4 Effect of JaB on EMT-associated protein expressions in HepG2 (A) and SMMC-7721 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 JaB 通过调节 PI3K/Akt 通路干预 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 EMT 过程

如图 5 所示, 给予 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 SMMC-7721 和 HepG2 细胞后, 效果与 JaB 相似, 均显著抑制 PI3K 磷酸化 ($P < 0.01$), 同时上调 E-cadherin 表达 ($P < 0.01$), 下调 N-cadherin 表达 ($P < 0.01$), 从而抑制 EMT 过程, 抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。使用 LY294002 预处理 2 h 后, 再使

用 JaB 干预, 也得到相似的结果, 但与单用 LY294002 或 JaB 比较无显著性差异。以上结果提示, JaB 可能通过调节 PI3K/Akt 通路干预 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 EMT 过程, 从而抑制迁移和侵袭。

3.5 JaB 对 SMMC-7721 和 HepG2 细胞形态的影响

为进一步研究 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的形态学改变, 使用扫描电镜进行观察。如图 6 所示, $2.5 \mu\text{mol/L}$ JaB 处理 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 24 h

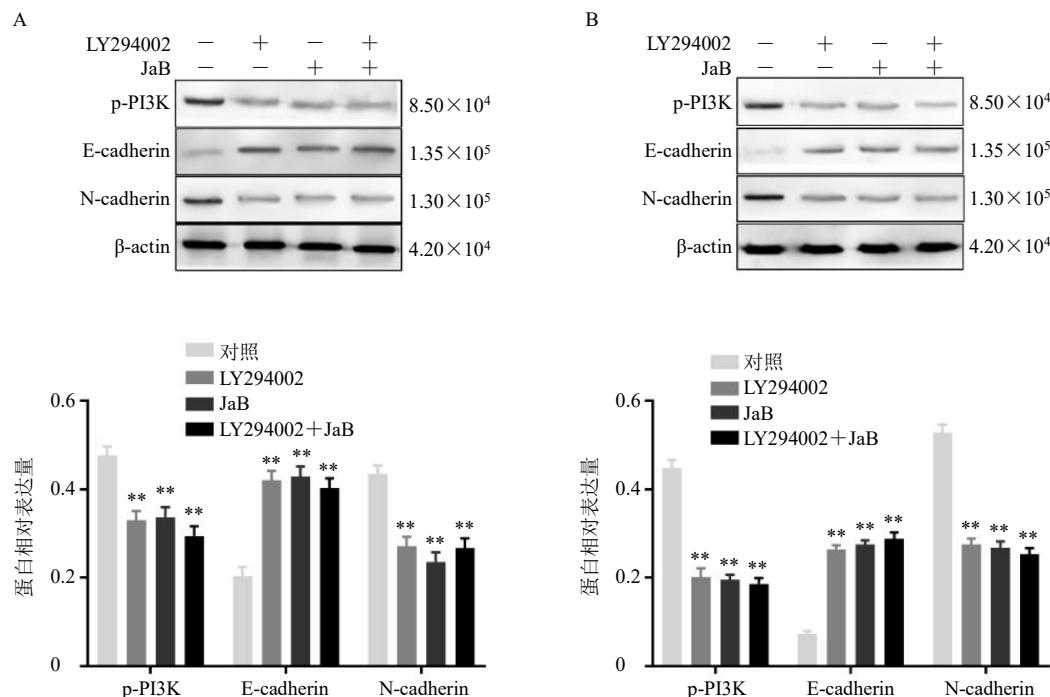


图 5 LY294002 和 JaB 对 SMMC-7721 (A) 和 HepG2 (B) 细胞中 PI3K 及 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of LY294002 and JaB on PI3K and EMT-associated proteins expressions in SMMC-7721 (A) and HepG2 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

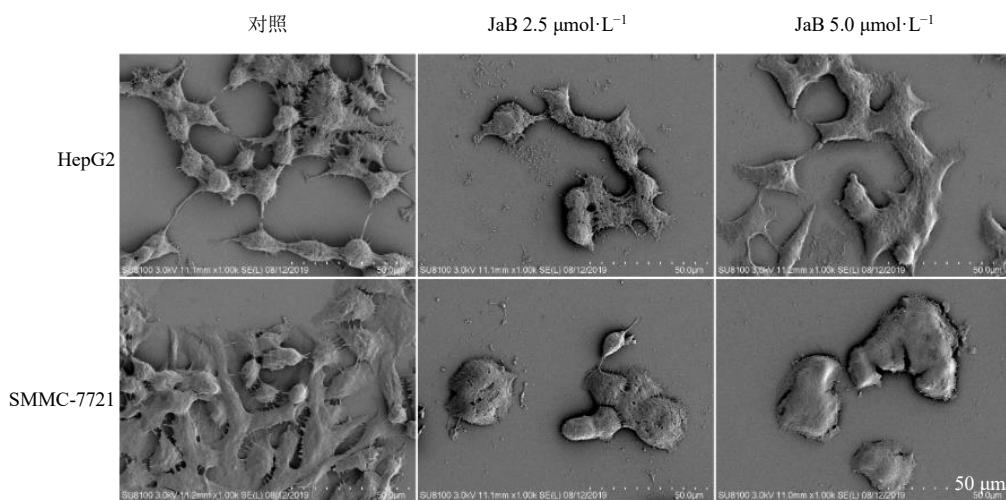


图 6 JaB 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞形态的影响 ($\times 1000$)

Fig. 6 Effect of JaB on morphology of HepG2 and SMMC-7721 cells ($\times 1000$)

后, 细胞伪足明显减少变短; 5.0 $\mu\text{mol/L}$ JaB 处理 24 h 后, 细胞形态发生了更为明显的变化, 表现为细胞伪足明显减少及细胞变圆, 甚至细胞间相互融合。

细胞伪足在肿瘤细胞侵袭和迁移初期发挥了重要作用, 细胞伪足的减少可能是 JaB 抑制肝癌细胞侵袭、迁移的形态学基础。

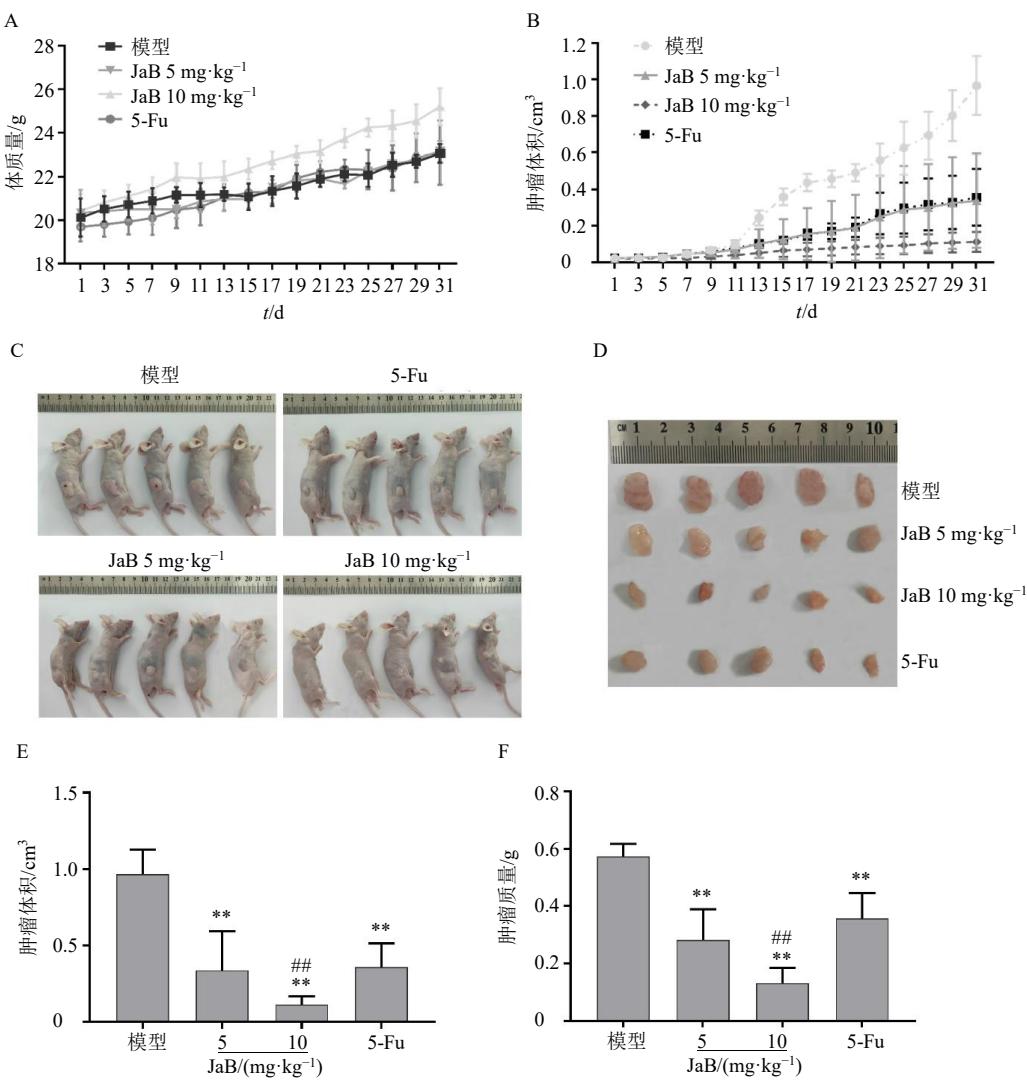
3.6 JaB 抑制荷瘤裸鼠体内移植瘤的生长

为进一步研究 JaB 的体内抗肿瘤效果, 利用裸鼠建立肝癌 SMMC-7721 细胞皮下荷瘤模型, 给予 JaB 干预 30 d, 结果发现, 实验期间各组小鼠体质均缓慢增加 (图 7-A), 组间无显著性差异。5、10 mg/kg 的 JaB 均能显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生

长 ($P<0.01$, 图 7-B~F), 其中与 5-Fu 组比较, JaB (10 mg/kg) 组对肿瘤生长的抑制作用更为显著 ($P<0.01$)。

3.7 JaB 抑制荷瘤裸鼠体内移植瘤的增殖

Ki67 是一种增殖相关的核抗原, 代表细胞的增殖指数, 是评价肿瘤细胞增殖能力的标志物之一。Ki67 蛋白表达的阳性率越高, 细胞处于增殖周期的相对比例越高, 肿瘤生长越快。采用免疫组化法检测肿瘤组织 Ki67 的表达变化, 结果如图 8 所示, 与模型组比较, JaB 各剂量组肿瘤组织中 Ki67 表达显著降低 ($P<0.01$), 其中与 5-Fu 组比较, JaB 高剂量组 Ki67 表达显著降低 ($P<0.05$)。

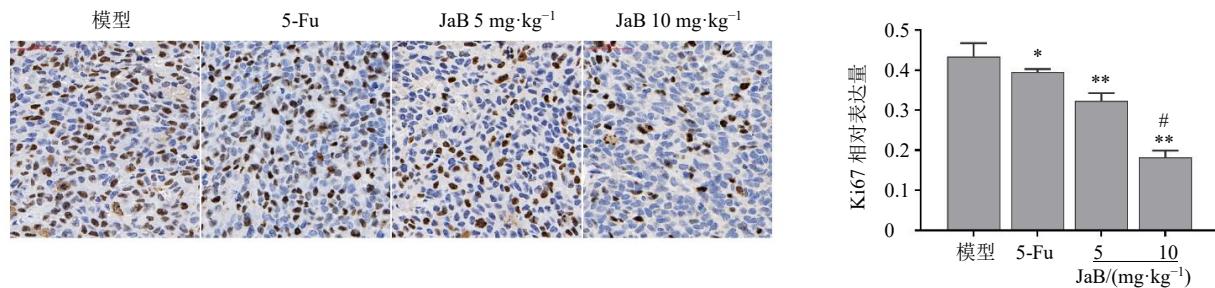


A-小鼠体质量变化; B-小鼠肿瘤体积变化; C~F-实验结束后, 各组小鼠肿瘤体积和肿瘤质量; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 5-Fu 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 图 8~12 同。

A-changes in body weight of mice; B-changes in tumor volume of mice; C~F-after experiment, tumor volume and tumor weight of mice in each group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs 5-Fu group, same as Figs. 8~12.

图 7 JaB 对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

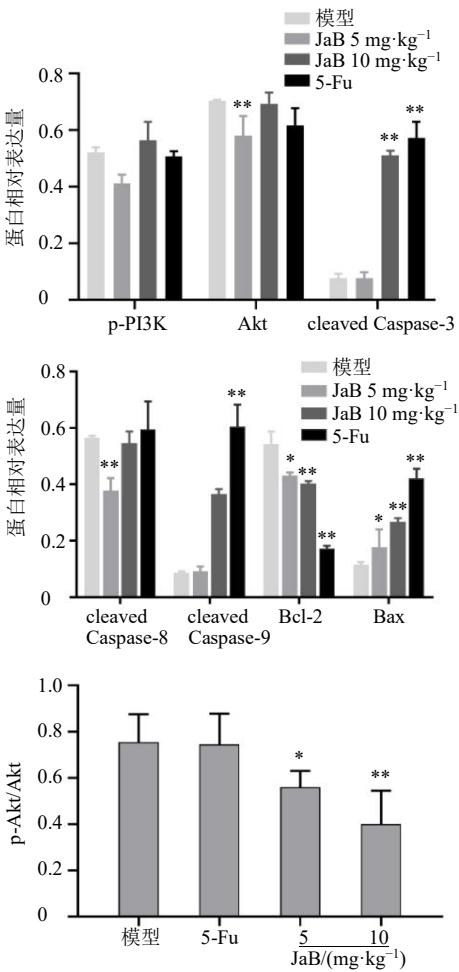
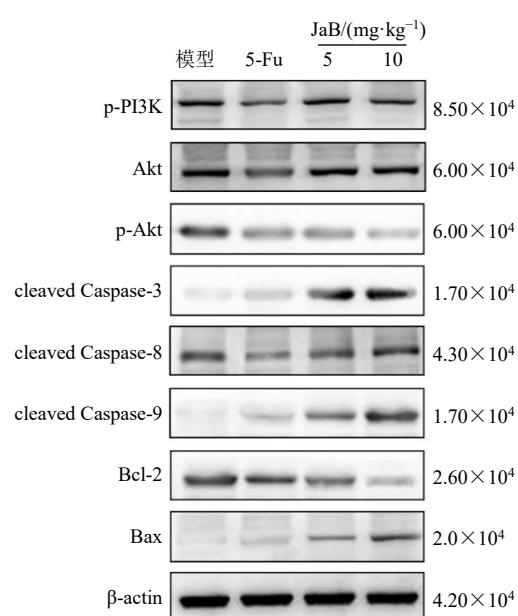
Fig. 7 Effect of JaB on tumor growth of tumor bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

图 8 JaB 对荷瘤裸鼠肿瘤组织中 Ki67 表达的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Fig. 8 Effect of JaB on Ki67 expression in tumor tissue of tumor bearing nude mice ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.8 JaB 对荷瘤裸鼠肿瘤组织中凋亡和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与模型组比较, JaB 各剂量组肿瘤组织中 cleaved Caspase-3 表达显著升高 ($P < 0.01$), JaB 高剂量组 cleaved Caspase-9 表达显著升高 ($P < 0.01$), cleaved Caspase-8 表达呈升高趋势。

此外, JaB 各剂量组促凋亡蛋白 Bax 表达显著升高 ($P < 0.01$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.01$)。JaB 各剂量组 PI3K 及 Akt 总蛋白量无显著性差异, 但 Akt 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示 JaB 可能通过调节 Akt 的磷酸化影响 PI3K/Akt 通路活性, 进而诱导细胞死亡。

图 9 JaB 对荷瘤裸鼠肿瘤组织中凋亡和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Fig. 9 Effect of JaB on apoptosis and PI3K/Akt pathway-associated proteins expressions in tumor tissue of tumor bearing nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.9 JaB 抑制肝癌细胞在裸鼠体内肺转移

3.9.1 JaB 抑制肝癌细胞在裸鼠体内的肺转移 建立肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠体内肺转移模型, 给予 JaB 干预 30 d, 如图 10 所示, 与模型组比较, JaB 显著抑制 SMMC-7721 细胞肺转移的发生。实验期间各组小鼠体质量均缓慢增加, 组间无显著性

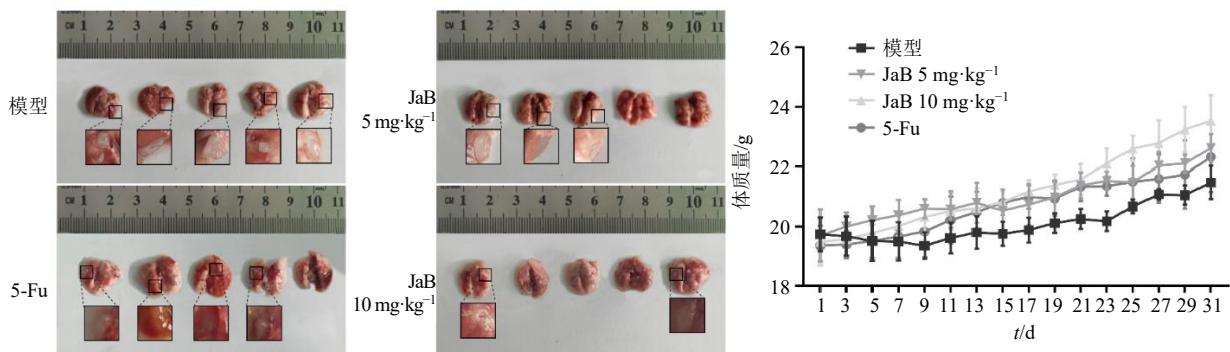


图 10 JaB 抑制肝癌细胞在裸鼠体内的肺转移 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 10 JaB inhibits lung metastasis of liver cancer cells in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

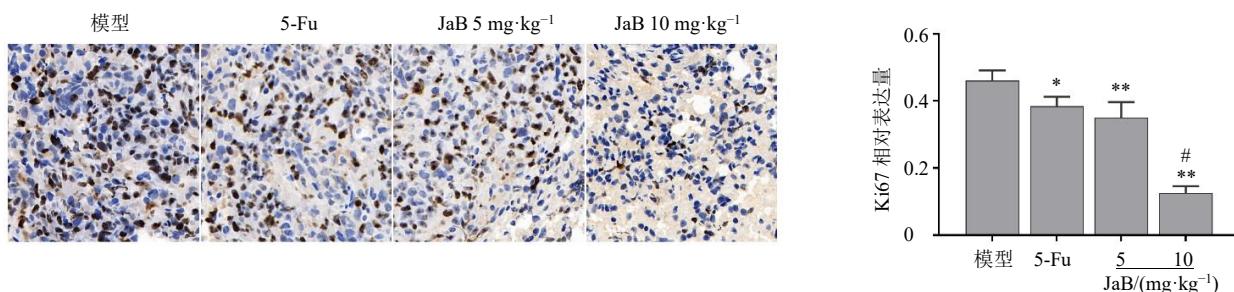


图 11 JaB 对裸鼠肺转移肿瘤组织中 Ki67 表达的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 11 Effect of JaB on Ki67 expression in lung metastatic tumor tissue of nude mice ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.9.3 JaB 对肺转移肿瘤组织中 PI3K/Akt 通路和 EMT 相关蛋白表达的影响 如图 12 所示, 与模型组比较, 给予 JaB 后, 肺转移组织中 E-cadherin 表达显著升高 ($P < 0.01$), N-cadherin、Snail、Slug、Twist 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示肺转移肿瘤组织中肿瘤细胞的 EMT 过程受到了抑制。其中与 5-Fu 组比较, JaB 高剂量组 N-cadherin、Snail、Slug、Twist 表达显著降低 ($P < 0.05$)。PI3K/Akt 通路活化会上调 Snail1 和 Slug 等 EMT 相关转录因子, 引起上皮细胞 E-cadherin 等表达下调或逐渐消失, 从而促进肝癌细胞 EMT 过程, 加速迁移和侵袭。给予 JaB 干预后, Akt 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

肝癌是一种典型的炎症-癌症转化肿瘤, 早期容易被忽视, 就诊时大多数为中晚期, 治疗难度大^[3]。

差异。

3.9.2 JaB 抑制肝癌细胞在裸鼠肺转移组织中的增殖 如图 11 所示, 与模型组比较, JaB 各剂量组肿瘤组织中 Ki67 表达显著降低 ($P < 0.01$), 其中与 5-Fu 组比较, JaB 高剂量组 Ki67 表达显著降低 ($P < 0.05$)。

鹿药传统用于治疗风湿、痈肿、瘀伤等, 现代研究表明, 鹿药及其化学成分具有抗真菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理活性, 对于炎-癌转化型肿瘤可能具有较好疗效。课题组前期从鹿药中分离得到鹿药皂苷 JaB, 并通过体外研究初步发现其可通过调节 PI3K/Akt 通路诱导肝癌细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤的作用^[11-12]。

细胞迁移和侵袭异常是肿瘤细胞转移的标志特征之一, 其涉及细胞中多基因及信号通路传导异常变化的一系列复杂的过程, 其中 EMT 在这一过程中发挥重要的作用^[19]。EMT 是上皮细胞在特定条件下失去其本身上皮细胞特性, 获得间质细胞表型的一种现象, 主要改变在于细胞获得了降解细胞外基质的能力, 同时迁移、侵袭、抗凋亡等能力均增强^[13]。近年研究表明, EMT 在多种上皮肿瘤中均有发现, 在肝癌细胞中, EMT 可以促进侵袭和迁移,

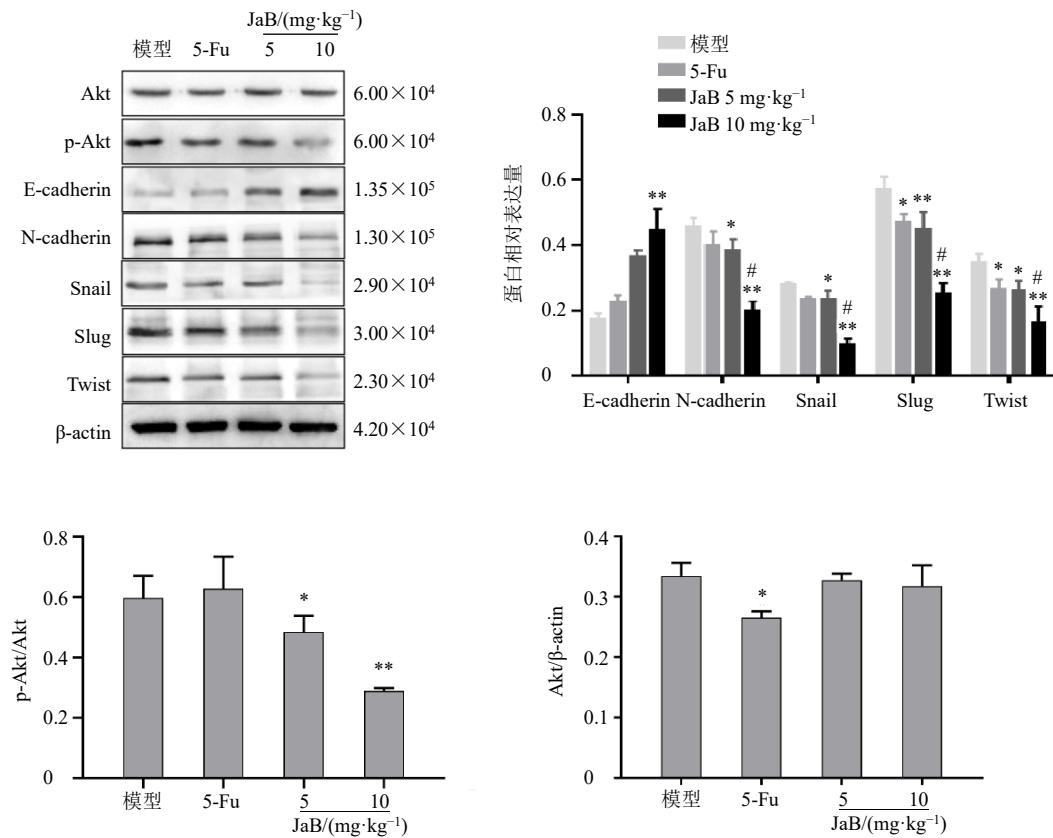


图 12 JaB 对裸鼠肺转移肿瘤组织中 PI3K/Akt 通路和 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 12 Effect of JaB on PI3K/Akt pathway and EMT-associated protein expressions in lung metastatic tumor tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

并与肝癌预后有着密切关系^[20]。EMT 是一个动态的过程, 受多个调控因子及多条信号通路调节, 研究肝癌中 EMT 的调控机制, 将为肝癌的靶向治疗提供理论依据。为考察鹿药皂苷 JaB 对 SMMC-7721 和 HepG2 肝癌细胞迁移和侵袭的作用, 本研究通过 Transwell 迁移、侵袭实验观察 JaB 对细胞迁移、侵袭的影响, 结果显示, JaB 在 2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 可观察到细胞迁移数量明显减少, 提示在 JaB 干预后肝癌细胞迁移能力下降。

E-cadherin 和 N-cadherin 是 EMT 过程的关键蛋白, Snail、Twist、Slug 等转录抑制因子可参与抑制 E-cadherin 的表达, 这些因子之间又可相互调节, 从而协同调节了 EMT 的整个过程^[21-23], 也标志着肿瘤细胞迁移和侵袭能力的变化^[24]。本研究检测 JaB 干预后 EMT 相关蛋白表达, E-cadherin 在 JaB 作用后表达显著上调, 而 N-cadherin 则呈下降趋势, 提示 JaB 可能通过上调 E-cadherin 表达、下调 N-cadherin 表达, 提高了细胞间黏附能力, 抑制了 EMT 过程, 降低了肿瘤细胞迁移和侵袭的能力; 同时,

JaB 干预后, 细胞中 Snail、Slug、Twist 等转录抑制因子表达也显著降低, 表明 JaB 作用于肝癌细胞可显著上调 E-cadherin 的表达, 抑制 N-cadherin 及 Snail、Slug、Twist 等表达, 阻断了 EMT 过程。PI3K/Akt 通路能够上调 Snail 和 Slug 等 EMT 相关转录因子, 引起上皮细胞 E-cadherin 等表达下调或逐渐消失, 间质细胞标记物 N-cadherin、MMP2、MMP9 等表达上调并获得间质表型, 从而促进肝癌细胞 EMT 的发生, 促进其迁移和侵袭^[14]。本研究中, JaB 抑制了肝癌细胞 EMT 过程, 从而抑制了 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力, 且该作用与其调节 PI3K/Akt 通路相关。

采用裸鼠模型考察了 JaB 的体内抗肿瘤作用, 在 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤实验中, JaB 低剂量 (5 mg/kg) 组对肿瘤的平均抑制率为 65.1%, JaB 高剂量 (10 mg/kg) 组的平均抑制率为 88.3%, 阳性对照药 5-Fu 的平均抑制率为 63.0%, 其中 JaB 高剂量组与 5-Fu 组比较, 具有显著性差异, 说明皂苷 JaB 对裸鼠移植瘤有显著的生长抑制作用。Ki67 是

评价肿瘤细胞增殖的标志物之一, 细胞中 Ki67 蛋白表达的阳性率越高, 其细胞处于增殖周期的相对比例越高, 生长越快^[25]。通过免疫组化法检测裸鼠移植瘤组织中 Ki67 表达, 发现与模型组比较, JaB 组肿瘤组织中 Ki67 表达显著降低, 说明 JaB 可抑制体内肝癌细胞的增殖活力。课题组前期研究发现, JaB 可诱导肝癌细胞发生凋亡, 且与调节 PI3K/Akt 通路功能相关^[12]。因此, 对裸鼠移植瘤组织中凋亡及 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达进行了检测, 结果表明, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 表达显著增加, 但 cleaved Caspase-8 的表达变化不明显, Bax 表达显著升高, 同时 Bcl-2 的表达显著降低。PI3K 及 Akt 总蛋白量在 JaB 作用后无显著性差异, 但其磷酸化形式 p-Akt 蛋白表达水平显著降低。这些结果提示, JaB 可能通过调节 Akt 蛋白的磷酸化影响 PI3K/Akt 通路活性, 从而诱导细胞死亡, 发挥抗肿瘤作用。

肿瘤的转移是肿瘤的一大特点, 也是其难以治疗的原因之一, 其中肺转移较为常见^[26]。本研究在体外细胞实验中发现 JaB 可抑制肝癌细胞的迁移和侵袭后, 继续针对 JaB 体内抗肺转移的作用进行了考察。使用尾 iv 肝癌 SMMC-7721 细胞的方法建立了裸鼠肝癌肺转移模型, 给予 JaB 干预后, 发现 JaB 可显著抑制肺转移的发生; 通过免疫组化法检测转移瘤中 Ki67 表达, 发现 JaB 可显著抑制 Ki67 表达, 说明 JaB 可抑制体内肝癌肺转移细胞的增殖活力。同时, 也检测了肺组织中 EMT 和 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达变化, 提示 JaB 可通过调控 E-cadherin、N-cadherin、Snail、Slug、Twist 等 EMT 过程相关蛋白抑制肿瘤的转移, 同时还可以调节 PI3K/Akt 通路蛋白的磷酸化, 其发挥抑制肿瘤转移的作用可能与此相关。

综上, 鹿药皂苷 JaB 通过调控 PI3K/Akt 通路, 上调 E-cadherin, 抑制 N-cadherin 以及 Snail、Slug、Twist 等转录因子表达来提高细胞间的黏附力, 并抑制其向间质细胞转化, 逆转了 EMT 过程, 从而抑制了肝癌细胞的迁移和侵袭, 以及其在体内的生长和转移, 发挥了抗肿瘤的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Chan S L, Sun H C, Xu Y, et al. The Lancet Commission on addressing the global hepatocellular carcinoma burden: Comprehensive strategies from prevention to treatment [J]. *Lancet*, 2025, 406(10504): 731-778.
- Alawyia B, Constantinou C. Hepatocellular carcinoma: A narrative review on current knowledge and future prospects [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, 24(7): 711-724.
- 曹广文. 我国原发性肝癌的流行病学特征及精准防控 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(11): 1455-1463.
- 傅立国. 中国高等植物 (第十三卷) [M]. 青岛: 青岛出版社, 2002: 191-197.
- 赵淑杰, 杨利民. 鹿药属植物研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2856-2857.
- 张娇, 张欢, 杨帆, 等. 偏头七的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2017, 40(5): 120-122.
- 宋小妹, 刘海静. 太白七药研究与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 269-272.
- 张欣, 刘媛媛, 李玉泽, 等. 管花鹿药中 2 个新的甾体皂苷 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6375-6379.
- 赵淑杰, 洪波, 韩忠明, 等. 鹿药化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 332-335.
- Liu W, Sun B Z, Yang M M, et al. Antifungal activity of crude extract from the rhizome and root of *Smilacina japonica* A. Gray [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 5320203.
- Cui Y W, Yang X J, Zhang D D, et al. Steroidal constituents from roots and rhizomes of *Smilacina japonica* [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 798.
- 崔誉文, 宋小妹, 汤海峰, 等. 鹿药皂苷 japonicoside B 通过调节 PI3K/AKT 通路诱导人肝癌细胞凋亡和周期阻滞的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(5): 837-848.
- Mittal V. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395-412.
- Maharati A, Moghbeli M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 201.
- Cao Z Q, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109320.
- Chen X F, Liu P G, Sheng N, et al. Arctigenin inhibits the progression of colorectal cancer through epithelial-mesenchymal transition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2024, 19(9): e0308947.
- 朱杨壮壮, 邹纯朴, 陈晓, 等. 小鼠肿瘤肺转移模型及其应用进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14):

25-31.

[18] Wieckowski S, Hemmerle T, Prince S S, *et al*. Therapeutic efficacy of the F8-IL2 immunocytokine in a metastatic mouse model of lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2015, 88(1): 9-15.

[19] Novikov N M, Zolotaryova S Y, Gautreau A M, *et al*. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(1): 102-114.

[20] Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84.

[21] Wang Y F, Dong C F, Zhou B P. Metabolic reprogram associated with epithelial-mesenchymal transition in tumor progression and metastasis [J]. *Genes Dis*, 2019, 7(2): 172-184.

[22] Wang Y F, Shi J, Chai K Q, *et al*. The role of snail in EMT and tumorigenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 963-972.

[23] Brabertz S, Schuhwerk H, Brabertz T, *et al*. Dynamic EMT: A multi-tool for tumor progression [J]. *EMBO J*, 2021, 40(18): e108647.

[24] Loh C Y, Chai J Y, Tang T F, *et al*. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118.

[25] Miller I, Min M W, Yang C, *et al*. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1105-1112.

[26] Fares J, Fares M Y, Khachfe H H, *et al*. Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 28.

[责任编辑 李亚楠]