

穿破石总黄酮通过 VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路抑制血管瘤内皮细胞增殖、迁移和血管生成

谈发明^{1,2}, 赵志伟², 张 颖³, 刘 杰³, 石孟琼^{1*}, 孟子元³, 杨文雁², 李浩然², 谈燕清², 许 杰², 张继红², 潘朝旺^{4*}

1. 三峡大学基础医学院, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学中医医院, 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 药食同源大健康产品开发利用宜昌市重点实验室, 湖北 宜昌 443002

4. 鄂州职业大学医学院, 湖北 鄂州 436000

摘要: 目的 探讨穿破石总黄酮 (total flavonoids from *Maclura cochinchinensis*, TFMC) 对血管瘤内皮细胞 (hemangioma endothelial cells, HemECs) 增殖、迁移及血管生成的影响及作用机制。方法 设置对照组、TFMC (40 $\mu\text{g/mL}$) 组、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抑制剂 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 抑制剂 LW6 (30 $\mu\text{mol/L}$) 组、TFMC+LY294002 组、TFMC+LW6 组、PI3K 激动剂 740Y-P (15 $\mu\text{mol/L}$) 组、HIF-1 α 激动剂 DMOG (0.5 $\mu\text{mol/L}$)、TFMC+740Y-P 组和 TFMC+DMOG 组。HemECs 给予药物干预 24 h 后, 收集上清液和细胞。采用 MTT 法检测细胞增殖能力; 克隆形成实验检测克隆形成能力; 划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭; AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡; PI 染色检测细胞周期; 免疫荧光法检测细胞线粒体膜电位和细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 比色法和 ELISA 法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和细胞中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、纤连蛋白 (fibronectin, FN)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及 MMP-9 含量; 血管生成实验检测细胞成管能力; qRT-PCR 和 Western blotting 测定迁移、侵袭、VEGF/VEGFR2 和 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/HIF-1 α 信号通路相关基因和蛋白表达。结果 与对照组比较, TFMC、LY294002 和 LW6 可显著抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭和成管能力, 促进细胞凋亡、LDH 释放和 G₀/G₁ 期阻滞, 升高细胞内 ROS 水平, 降低线粒体膜电位和细胞中 VEGF、VEGFR2、FN、MMP-2 及 MMP-9 含量, 下调迁移、侵袭、VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路相关基因和蛋白表达 ($P<0.01$)。与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 或 LW6 联用可进一步加重这种改变 ($P<0.01$)。相反, 740Y-P 和 DMOG 则可以恶化上述变化; TFMC 与 740Y-P 或 DMOG 联用可逆转这种改变 ($P<0.01$)。结论 TFMC 可抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭及血管生成, 其作用机制与抑制 VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路激活密切相关。

关键词: 穿破石总黄酮; 血管瘤内皮细胞; 增殖; 迁移; 血管生成; VEGF/VEGFR2 信号通路; PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路; 花旗松素; 柑桔素; 桂木生黄素; 异胡椒酮 B; 山柰酚; 槲皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-9027-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.015

Total flavonoids from *Maclura cochinchinensis* inhibits proliferation, migration and angiogenesis in hemangioma endothelial cells by suppressing VEGF/VEGFR2 and PI3K/Akt/HIF-1 α pathway

TAN Faming^{1,2}, ZHAO Zhiwei², ZHANG Ying³, LIU Jie³, SHI Mengqiong¹, MENG Ziyuan³, YANG Wenyan², LI Haoran², TAN Yanqing², XU Jie², ZHANG Jihong², PAN Zhaowang⁴

收稿日期: 2025-09-14

基金项目: 宜昌市医疗卫生研究项目 (A22-2-059, A23-1-066); 湖北省科技厅重点研发项目 (2025BCB067); 湖北省科技厅重点研发大健康计划项目 (2022BCE017); 湖北省卫生健康委员会中医药重点项目 (ZY2023Z015); 湖北省卫生健康委员会中医药面上项目 (ZY2025M038); 湖北省科技厅自然科学基金项目 (2025AFB805, 2025AFB839, 2025AFD301, 2025AFD294, 2023AFB600, 2022CFB357, 2022CFB427); 湖北省卫生健康委员会科研资助项目 (WJ2023M153); 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心开放基金 (SXZ202303, SXZ202308, SXZ202311)

作者简介: 谈发明 (1971—), 本科, 主任药师, 主要从事中药肿瘤药理学研究。E-mail: 826266152@qq.com

***通信作者:** 石孟琼 (1971—), 高级实验师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: shm0212@126.com

潘朝旺 (1973—), 硕士, 副教授, 主要从事中药药理研究。E-mail: 455128707@qq.com

1. Basic Medical College of China Three Gorges University, Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Yichang 443002, China
2. Traditional Chinese Medicine Hospital of China Three Gorges University, Hubei Clinical Research Center for Functional Digestive Diseases of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China
3. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang Laboratory of Development and Utilization of Health Products with Drug and Food Homology, China Three Gorges University, Yichang 443002, China
4. Medical College of Ezhou Vocational University, Ezhou 436000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of total flavonoids from *Maclura cochinchinensis* (TFMC) on proliferation, migration and angiogenesis of hemangioma endothelial cells (HemECs). **Methods** Control group, TFMC (40 $\mu\text{g/mL}$) group, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) group, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) inhibitor LW6 (30 $\mu\text{mol/L}$) group, TFMC + LY294002 group, TFMC + LW6 group, PI3K agonist 740Y-P (15 $\mu\text{mol/L}$) group, HIF-1 α agonist DMOG (0.5 $\mu\text{mol/L}$), TFMC + 740Y-P group and TFMC + DMOG group were set up. After 24 h of drug intervention with HemECs, the supernatant and cells were collected. MTT assay was used to test cell viability. Clony formation assay was utilized to detect the colony formation ability. Cell scratch and Transwell was used to test cell migration and invasion. AnnexinV FITC/PI double staining was utilized to detect cell apoptosis. PI staining was utilized to test cell cycle. Immunofluorescences were used to detect mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) level in HemECs. Colorimetric and ELISA methods were utilized to test the level of lactate dehydrogenase (LDH) in supernatant and levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), fibronectin (FN), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in cells. Angiogenesis assays was used to detect the anti-angiogenic ability of cells. qRT-PCR and Western blotting were used to measure the expressions of migration, invasion, VEGF/VEGFR2 and PI3K/protein kinase B (Akt)/HIF-1 α signaling pathways related genes and proteins. **Results** Compared with control group, TFMC, LY294002 and LW6 significantly inhibited the proliferation, migration, invasion and angiogenesis of HemECs, promoted cell apoptosis, LDH release and G₀/G₁ phase arrest, elevated intracellular ROS level, reduced mitochondrial membrane potential and VEGF, VEGFR2, FN, MMP-2 and MMP-9 contents in HemECs, down-regulated the expressions of migration, invasion, VEGF/VEGFR2 and PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway related genes and proteins ($P < 0.01$). Compared with TFMC group, the combination of TFMC with LY294002 or LW6 could further exacerbate this change ($P < 0.01$). On the contrary, 740Y-P and DMOG could worsen the above changes; The combination of TFMC with 740Y-P or DMOG could reverse this change ($P < 0.01$). **Conclusion** TFMC could inhibit the proliferation, migration, invasion and angiogenesis of HemECs, and its mechanism is closely related to the inhibition of VEGF/VEGFR2 and PI3K/Akt/HIF-1 α pathway activation.

Key words: total flavonoids from *Maclura cochinchinensis*; hemangioma endothelial cells; proliferation; migration; angiogenesis; VEGF/VEGFR2 signaling pathway; PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway; axifolin; naringenin; artocarpesin; isocudranixanthone B; kaempferol; quercetin

血管瘤 (haemangiomas, HAs) 是一种婴幼儿常见的良性血管肿瘤, 可发生在婴幼儿的头部、面部、颈部、四肢和内脏等各个部位。通常 HAs 的大多数病变可以自发缩小, 但仍有 10%~15% 婴幼儿的 HAs 病变会出现潜在并发症, 如永久性畸形、溃疡、疤痕、出血、视力障碍、气道阻塞、充血性心力衰竭等, 严重者甚至可能危及生命^[1]。尽管手术、激光、放射和激素、干扰素、长春新碱、 β 受体阻滞剂等治疗手段可以遏制 HAs, 但是对于眼、耳、鼻等特殊部位的 HAs 难以用手术进行根除, 常见的激素治疗不良反应较大。因此, 亟需寻找一种新的非手术治疗方法^[2]。

内皮细胞是构成 HAs 的主要细胞类型之一, 未

成熟内皮细胞积聚是增殖性 HAs 的核心特征^[3]。研究表明, 血管瘤内皮细胞 (hemangioma endothelial cells, HemECs) 组织病理学的独特特征是血管内皮细胞过度增殖和血管快速生长^[4]。肿瘤细胞需要血管生成来提供必需的营养和氧气, 以实现持续增殖^[5]。肿瘤微血管密度高的患者复发疾病风险增加, 总体生存率降低^[6]。因此, 血管生成已被公认为是肿瘤的独立危险因素和重要的预后标志物。最新研究发现, 在实体瘤中, 肿瘤细胞分泌的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 与内皮细胞膜上的血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 结合, 促进内皮细胞活化和血管生成; 进

一步研究证实 VEGF/VEGFR2 分泌通路催化了磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路的磷酸化, 促进了缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 核移位, 从而促进细胞增殖和血管生成^[7-8]。Zhang 等^[9]研究发现在敲除 HIF-1 α 后, HemECs 的存活率、增殖、侵袭、迁移和内皮小管生成均受到抑制, 凋亡加剧, 细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期, VEGF 和 VEGFR2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低; 而 HIF-1 α 的过表达则逆转了这些趋势。Pan 等^[10]研究发现, 普萘洛尔可抑制去甲肾上腺素诱导的 HemECs 细胞周期进程、侵袭和血管生成, 下调细胞中 PI3K/Akt/内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) /VEGF 通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达, 降低一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和 VEGF 水平; Lou 等^[11]和 Zhao 等^[12]发现枸杞多糖和鬼臼毒素 C 环修饰酯衍生物对 HemECs 显示出强大的抗增殖和促凋亡活性, 证实与抑制 VEGF、VEGFR2 和 PI3K/Akt 通路相关基因的表达有关。由此可见, VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路异常激活与 HAs 发生发展密切相关, 靶向 VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路可为 HAs 提供一种有效的治疗手段。

穿破石为桑科柘属植物构棘 *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner 或柘树 *M. tricuspidata* Carr. 的根, 性凉, 味淡、微苦, 具有祛风利湿、清热解毒、活血通经等功效, 主要用于风湿关节疼痛、跌打损伤、肺结核、黄疸型肝炎肝脾肿大及胃、十二指肠溃疡等疾病的治疗^[13]。穿破石总黄酮 (total flavonoids from *Maclura cochinchinensis*, TFMC) 是其重要的活性成分, Rueankham 等^[14]研究发现 TFMC 对急性髓系白血病 AML 细胞具有显著的细胞毒性、抗氧化、抗炎和抗细胞迁移活性, 可显著促进 AML 细胞凋亡, 并将其阻滞于 G₂/M 期, 下调 VEGF/PI3K/Akt 通路相关蛋白表达, 上调线粒体介导的凋亡通路相关基因的表达; Lee、Chien、Promden 和 Sainz-hernández 等^[15-18]研究发现 TFMC 或其中的成分对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB435 细胞具有较好的抗增殖、迁移和抑制血管生成活性, 可抑制 iNOS、环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、p-PI3K、p-Akt 和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphorylated mammalian rapamycin target protein, p-mTOR) 的表达, 并证实其机制与阻滞细

胞周期、抑制炎症反应、抑制 VEGF/PI3K/Akt 通路和激活线粒体凋亡通路密切相关。Nakashima 等^[19]研究发现 TFMC 及其中 gerontoxanthone B 对 HemECs 具有较好的抗增殖、迁移和血管生成活性, 然而其确切的机制尚不清楚。基于此, 本研究以 HemECs 为研究对象, 评估 TFMC 对 HemECs 增殖、侵袭和血管生成的抑制作用, 并从 VEGF/VEGFR2 和 PI3K/AKT/HIF-1 α 途径深入探讨其可能的作用机制, 旨在为 TFMC 作为潜在 HAs 治疗药物的开发提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 细胞

人血管瘤内皮细胞 HemECs (批号 20240921-083) 购自上海泽叶生物科技有限公司。

1.2 药材

穿破石购自湖北省五峰稷源中药材种植基地, 经三峡大学汪鋈植教授鉴定为桑科柘属植物构棘 *M. cochinchinensis* (Lour.) Corner 的根。

1.3 药品与试剂

TFMC (批号 2024092601, 质量分数为 98.52%) 由本实验室从穿破石中分离制备而得; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 6120541)、MTT (批号 320168) 购自美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基 (批号 621035)、胎牛血清 (批号 10569-157B)、线粒体膜电位 (JC-1) 检测试剂盒 (批号 T7526)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (DCFH-DA, 批号 S0019) 购自美国 Gibco 公司; PI3K 抑制剂 LY294002 (批号 S8738)、HIF-1 α 抑制剂 LW6 (批号 541852S) 购自美国 Selleck 公司; PI3K 激动剂 740Y-P (批号 HY-P0175)、HIF-1 α 激动剂 DMOG (批号 HY-G0149) 购自美国 MedChemExpress 公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (批号 CA1023)、PI 试剂盒 (批号 CA0572) 购自上海康朗生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 20241124) 购自南京建成生物工程研究所; 纤连蛋白 (fibronectin, FN)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 试剂盒 (批号分别为 202503215、20250319、20250318) 购自深圳达科为生物技术公司; VEGF、VEGFR2、PI3K、Akt、mTOR、HIF-1 α 、FN、MMP-2、MMP-9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物 (批号分别为 A0250314、A0250321、

A0250315、A0250318、A0250320、A0250312、A0250311、A0250317、A0250310、A0250309)及 DEPC 水(批号 20250229)、TRIzol(批号 12236752)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Taq DNA 聚合酶(批号 603524)、Prime Script™ RT reagent kit(批号 602637)购自日本 TaKaRa 公司; VEGF、p-VEGFR2、VEGFR2、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、HIF-1 α 、FN、MMP-2、MMP-9、 β -actin、GADPH 抗体(批号分别为 sc-16324、sc-3478S、sc-32267、sc-2738S、sc-20254、sc-2547S、sc-23561、sc-31839、sc-3047S、sc-24250、sc-10435、sc-4623S、sc-2074S、sc-4368S、sc-2542S)购自美国 CST 公司; DyLight™ 550、DyLight™ 488、DyLight™ 405 荧光二抗(批号分别为 2503471S、2523492S、2503218S)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 抗荧光淬灭剂(批号 20250324)购自北京索莱宝科技有限公司; HRP 标记 IgG 抗体(批号 ab35479)购自英国 Abcam 公司; 蛋白提取试剂盒(批号 P0267)和 ECL 发光试剂盒(批号 P0358)购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

VORTEX-6 型涡旋仪(美国 Aoran 公司); MA54 型电子天平[梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; 5427R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); HVA-110 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); Infinite 200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); FACSCanto™ II 型流式细胞仪(美国 BD 公司); MA200 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); OLS3100 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); Nano Drop One 型核酸测定仪(美国 Thermo 公司); CFX Opus 96 型实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DY CZ-24A/B 型转膜电泳槽、DY CZ-20G 型电泳仪、DY CZ-40S 型垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司); Tanon MINI Space2000 型凝胶成像分析系统(上海天能生命科学有限公司)。

2 方法

2.1 TFMC 的制备和含量测定

取干燥的穿破石粗粉 1.0 kg, 加入 75%乙醇 28 L 回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 回收乙醇, 得总浸膏 87 g。加蒸馏水充分溶解浸膏, 滤过。取滤液, 调 pH 4~5, 选用 AB-8 型大孔吸附

树脂纯化, 上样, 体积流量 4~5 mL/min, 上样后静止 12 h, 先用 3 倍树脂体积的 30%乙醇洗脱, 而后用 4 倍树脂体积的 70%乙醇洗脱, 体积流量 2~3 mL/min, 收集 70%乙醇的洗脱液, 回收乙醇后, 减压浓缩干燥。采用 HPLC 法进行含量测定, GL Sciences InertSustain AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~25 min, 5%~15% A; 25~55 min, 15%~25% A; 55~60 min, 25%~5% A; 60~65 min, 5% A。体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 230 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L。结果显示, 花旗松素、柑桔素、桂木生黄素、异胡椒酮 B、山柰酚、槲皮素的质量分数分别为(15.81 \pm 0.24)%、(28.32 \pm 1.25)%、(3.06 \pm 0.51)%、(4.63 \pm 0.49)%、(9.08 \pm 0.13)%、(17.85 \pm 0.40)%。

2.2 TFMC、LY294002、LW6、740Y-P、DMOG 母液的配制

精密称取适量 TFMC、LY294002、LW6、740Y-P、DMOG 样品, 分别用细胞级别 DMSO 溶解为 20 mg/mL、40 mmol/L、10 mmol/L、30 mmol/L 和 10 mmol/L 的母液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 使用时用培养基稀释。

2.3 细胞培养

HemECs 用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。隔天换 1 次培养液, 待细胞生长至对数生长期时, 用胰酶消化细胞, 制成悬液后, 接种于培养板中用于后续实验。

2.4 细胞活力测定

将 HemECs 以 6 \times 10³ 个/孔接种于 96 孔板中培养 24 h 后, 用 TFMC (5、10、20、40、60、80 μ g/mL) 处理 24、48 h, 对照组加入不含药物的培养基, 于超净台中避光操作每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 放入培养箱继续培养 4 h, 用 200 μ L 移液枪吸尽培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 于微孔振荡板上以 500 r/min 速度振荡 5 min, 采用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 平板克隆实验

将处于对数生长期的 HemECs 以 1 \times 10³ 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 设置对照组和 TFMC (10、20、40 μ g/mL) 组。TFMC 组加入相应药物处理细胞, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h

后, 更换为完全培养基继续培养 14 d, 每 3 天更换 1 次培养基。培养结束后, 依次用 4% 多聚甲醛固定、0.1% 结晶紫染色、PBS 溶液清洗后, 拍照, 用 Image J 软件计数。

2.6 划痕和 Transwell 侵袭实验

2.6.1 划痕实验 将处于对数生长期的 HemECs 以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中培养 24 h, 设置对照组和 TFMC (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 组。用 200 μL 枪头尖端在每个培养板上刮取融合的细胞单层, 制成划痕, 并在划痕区域的孔上做好标记。用 PBS 冲洗去除漂浮细胞后, TFMC 组加入相应药物处理细胞, 对照组加入不含药物的培养基, 分别在划痕后 0、24 h, 置于倒置显微镜下固定视野拍摄照片, 用 Image J 软件计算细胞迁移率。

细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积

2.6.2 Transwell 侵袭实验 将处于对数生长期的 HemECs 以 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板中培养 24 h, 设置对照组和 TFMC (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 组, TFMC 组加入相应药物处理细胞 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。收集细胞, 用无血清培养基将细胞浓度调节至 2×10^5 个/mL 单细胞悬液。向 24 孔板下室中加入 600 μL 完全培养基, 上室加入 100 μL 预冷基质胶, 待其凝固后, Transwell 上室加入 200 μL 单细胞悬液 (2×10^5 个/mL), 于培养箱中培养 24 h 后, 取出小室, PBS 洗涤, 于 4% 多聚甲醛中固定 20 min 后晾干, 用 0.1% 结晶紫染料染色, 置于倒置显微镜下观察并拍照, 用 Image J 软件计算各组侵袭细胞数量。

2.7 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡

将处于对数生长期的 HemECs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 设置对照组、TFMC (40 $\mu\text{g/mL}$) 组、PI3K 抑制剂 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、HIF-1 α 抑制剂 LW6 (30 $\mu\text{mol/L}$)、TFMC + LY294002 (40 $\mu\text{g/mL}$ + 20 $\mu\text{mol/L}$) 组和 TFMC + LW6 (40 $\mu\text{g/mL}$ + 30 $\mu\text{mol/L}$) 组^[9,12]。另取 6 孔板接种细胞培养 24 h 后, 设置对照组、TFMC (40 $\mu\text{g/mL}$) 组、PI3K 激动剂 740Y-P (15 $\mu\text{mol/L}$) 组、HIF-1 α 激动剂 DMOG (0.5 $\mu\text{mol/L}$)、TFMC + 740Y-P (40 $\mu\text{g/mL}$ + 15 $\mu\text{mol/L}$) 组和 TFMC + DMOG (40 $\mu\text{g/mL}$ + 0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组^[20-21]。药物干预组加入相应药物处理, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后, 收集细胞, 按照 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒说明书操作, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.8 PI 染色检测细胞周期

将处于对数生长期的 HemECs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照 PI 试剂盒说明书操作, 采用流式细胞仪检测细胞周期。

2.9 免疫荧光检测细胞线粒体膜电位和细胞中 ROS 水平

将处于对数生长期的 HemECs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照 JC-1 和 DCFH-DA 检测试剂盒说明书操作, 检测各组细胞线粒体膜电位和 ROS 水平^[22]。

2.10 细胞上清液中 LDH 活性检测

按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 吸取上清液, 按照试剂盒说明书检测各组细胞 LDH 活性。

2.11 血管生成实验

将处于对数生长期的 HemECs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集各组上清液, 获得条件培养基。HemECs 以 3×10^5 个/孔重悬于 100 μL 不同的条件培养基后, 接种于 Matrigel 包被的 96 孔板中, 培养 10 h。于倒置显微镜下拍照, 通过 Image J 软件计算血管分支点个数、血管连接点个数和血管总长度^[23]。

2.12 细胞中 VEGF、VEGFR2、FN、MMP-2 及 MMP-9 含量检测

将处于对数生长期的 HemECs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照试剂盒说明书检测 VEGF、VEGFR2、FN、MMP-2 和 MMP-9 含量。

2.13 qRT-PCR 检测 HemECs 中 VEGF/VEGFR2、PI3K/Akt/HIF-1 α 通路和迁移、侵袭相关基因表达

按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 HemECs 总 RNA, 用 PrimeScript RT 将其反转录为 cDNA 后, 用 SYBR 荧光染料、高效 PCR 酶在实时定量 PCR 仪上进行扩增, 以 GAPDH 作为内参, 扩增的结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示, 引物序列见表 1^[9,24]。

2.14 Western blotting 检测 HemECs 中 VEGF/VEGFR2、PI3K/Akt/HIF-1 α 通路和迁移、侵袭相关蛋白表达

按照“2.7”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总蛋白, 用核酸测定仪测定蛋白质含量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>VEGF</i>	GGGCAGAATCATCACGAAGT	AAATGCTTTCTCCGCTCTGA
<i>VEGFR2</i>	CAAGTGGCTAAGGGCATGGA	ATTTCAAAGGGAGGCGAGCA
<i>PI3K</i>	CCACGACCATCATCAGGTGAA	CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT
<i>Akt</i>	ATGGCACCTTCATTGGCTAC	AACGGACTTCGGGCTCTTG
<i>mTOR</i>	GCCGCGCGAATATTAAAGGA	CTGGTTTCCTCATTCCGGCT
<i>HIF-1α</i>	GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG	CCTTATCAAGATGCGAACTCACA
<i>FN</i>	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
<i>MMP-2</i>	AGCATGTCCCTACCGAGTCT	CCCTTGCTAGGCTCTGCTA
<i>MMP-9</i>	TCTCTACTGGGCATTAGGG	GTGTCCGAGGAAGATACTTG
<i>GAPDH</i>	AACGGCACAGTCAAGGCTGA	ACG CCAGTAGACTCCACGACAT

烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 VEGF (1:1000)、p-VEGFR2 (1:800)、VEGFR2 (1:800)、p-PI3K (1:600)、PI3K (1:600)、p-Akt (1:800)、Akt (1:1000)、p-mTOR (1:800)、mTOR (1:800)、HIF-1 α (1:800)、FN (1:600)、MMP-2 (1:600)、MMP-9 (1:600) 抗体, 4 °C 孵育过夜; 洗涤后加入二抗, 室温孵育 2 h, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用凝胶成像仪成像, 通过 Image J 软件分析条带灰度值^[8-9,12]。

2.15 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行统计分析, 组间比较用 Student's *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TFMC 对 HemECs 增殖的影响

如图 1-A 所示, 与对照组比较, TFMC 作用 24、48 h 对 HemECs 呈现不同程度的增殖抑制作用, 且具有时间和剂量相关性。经 GraphPad Prism 9 软件计算, 其作用于 HemECs 24、48 h 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 65.90、34.12

$\mu\text{g/mL}$ 。为了排除 TFMC 对 HemECs 的细胞毒性作用对细胞迁移、侵袭及血管新生的影响, 选用 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ TFMC 作用 24 h 进行后续研究。

3.2 TFMC 对 HemECs 克隆形成的影响

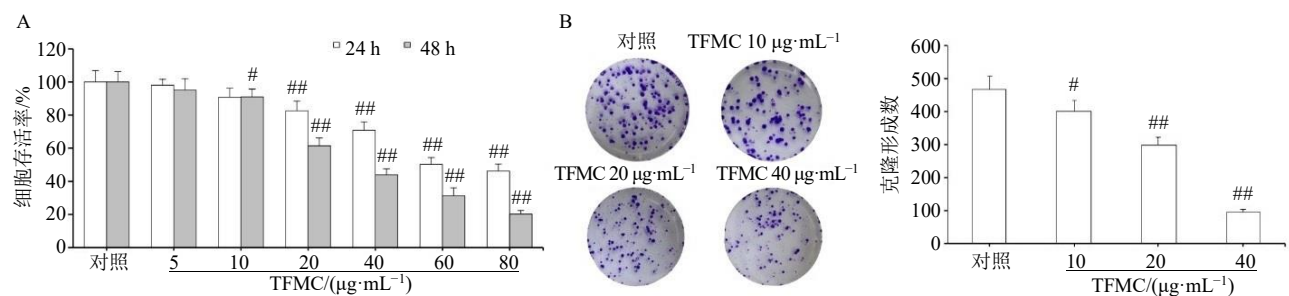
如图 1-B 所示, 与对照组比较, TFMC (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 可显著抑制 HemECs 克隆形成数 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂量相关性, 表明 TFMC 可抑制 HemECs 增殖。

3.3 TFMC 对 HemECs 迁移和侵袭的影响

如图 2-A 所示, 与对照组比较, TFMC (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 组 HemECs 的迁移面积显著减少 ($P < 0.05$ 、0.01)。如图 2-B 所示, 与对照组比较, TFMC (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 组 HemECs 的侵袭细胞数量和侵袭指数明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明 TFMC 可抑制 HemECs 迁移和侵袭能力。

3.4 TFMC 对 HemECs 凋亡和细胞周期的影响

如图 3-A 所示, 与对照组比较, TFMC、LY294002 和 LW6 干预可显著促进 HemECs 凋亡 ($P < 0.01$), 740Y-P 和 DMOG 可显著抑制细胞凋亡 ($P < 0.01$); 与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002

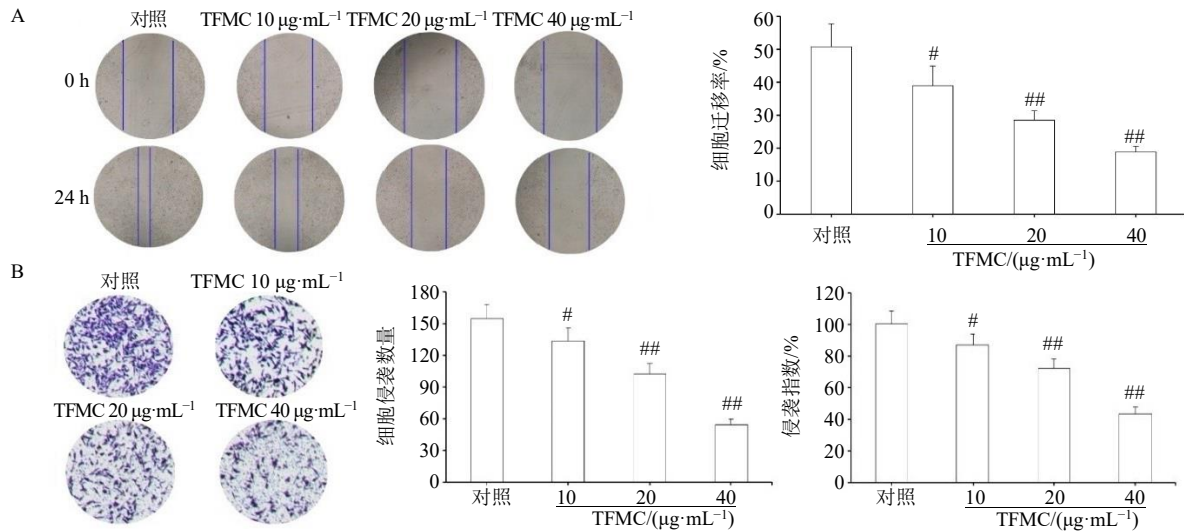


A-TFMC 对 HemECs 存活率的影响; B-TFMC 对 HemECs 克隆形成的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 2 同。

A-effect of TFMC on survival rate of HemECs; B-effect of TFMC on colony formation of HemECs; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as Fig. 2.

图 1 TFMC 对 HemECs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of TFMC on proliferation of HemECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

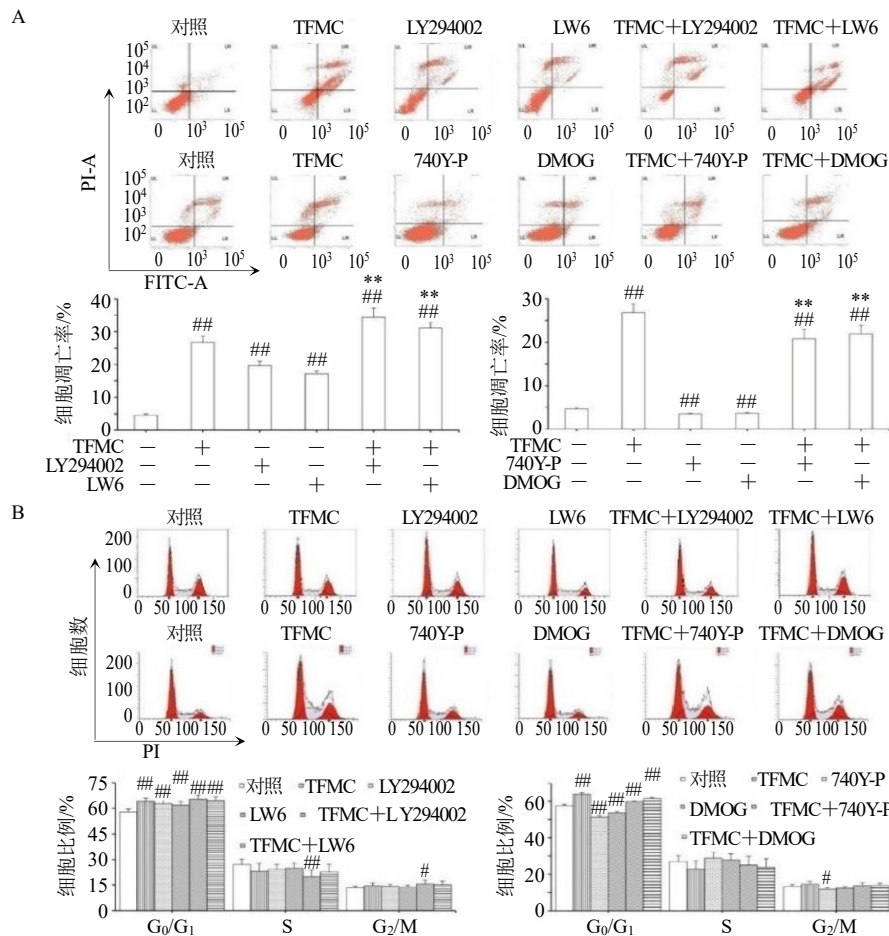


A-划痕实验检测细胞迁移 ($\times 100$); B-Transwell 实验检测细胞侵袭 ($\times 200$)。

A-cell migration detected by scratch assay ($\times 100$); B-cell invasion detected by Transwell assay ($\times 200$).

图 2 TFMC 对 HemECs 迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of TFMC on migration and invasion of HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 TFMC 组比较: ** $P < 0.01$, 图 4~9 同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs TFMC group, same as Figs. 4~9.

图 3 TFMC 对 HemECs 凋亡 (A) 和细胞周期 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of TFMC on apoptosis (A) and cell cycle (B) of HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

和 LW6 联用可进一步促进 HemECs 凋亡 ($P < 0.01$), TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可显著抑制细胞凋亡 ($P < 0.01$)。如图 3-B 所示, 与对照组比较, TFMC、LY294002 和 LW6 可显著增加阻滞在 G_0/G_1 期的细胞数量 ($P < 0.01$), 740Y-P 和 DMOG 可显著降低阻滞在 G_0/G_1 期的细胞数量 ($P < 0.01$); 与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步增加阻滞在 G_0/G_1 期的细胞数量, TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可减少阻滞在 G_0/G_1 期的细胞数量。表明 TFMC 可促进 HemECs 凋亡, 并能将其阻滞在细胞周期的 G_0/G_1 期。

3.5 TFMC 对 HemECs 内 ROS 水平和线粒体膜电位的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, TFMC、LY294002 和 LW6 干预可显著升高 HemECs 内 ROS 水平并降低线粒体膜电位 ($P < 0.01$), 740Y-P 和 DMOG 可显著降低 HemECs 内 ROS 水平并升高线粒体膜电位 ($P < 0.01$); 与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步升高 HemECs 内 ROS 水平并降低线粒体膜电位 ($P < 0.01$), TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可降低 HemECs 内 ROS 水平并升高线粒体膜电位 ($P < 0.01$)。

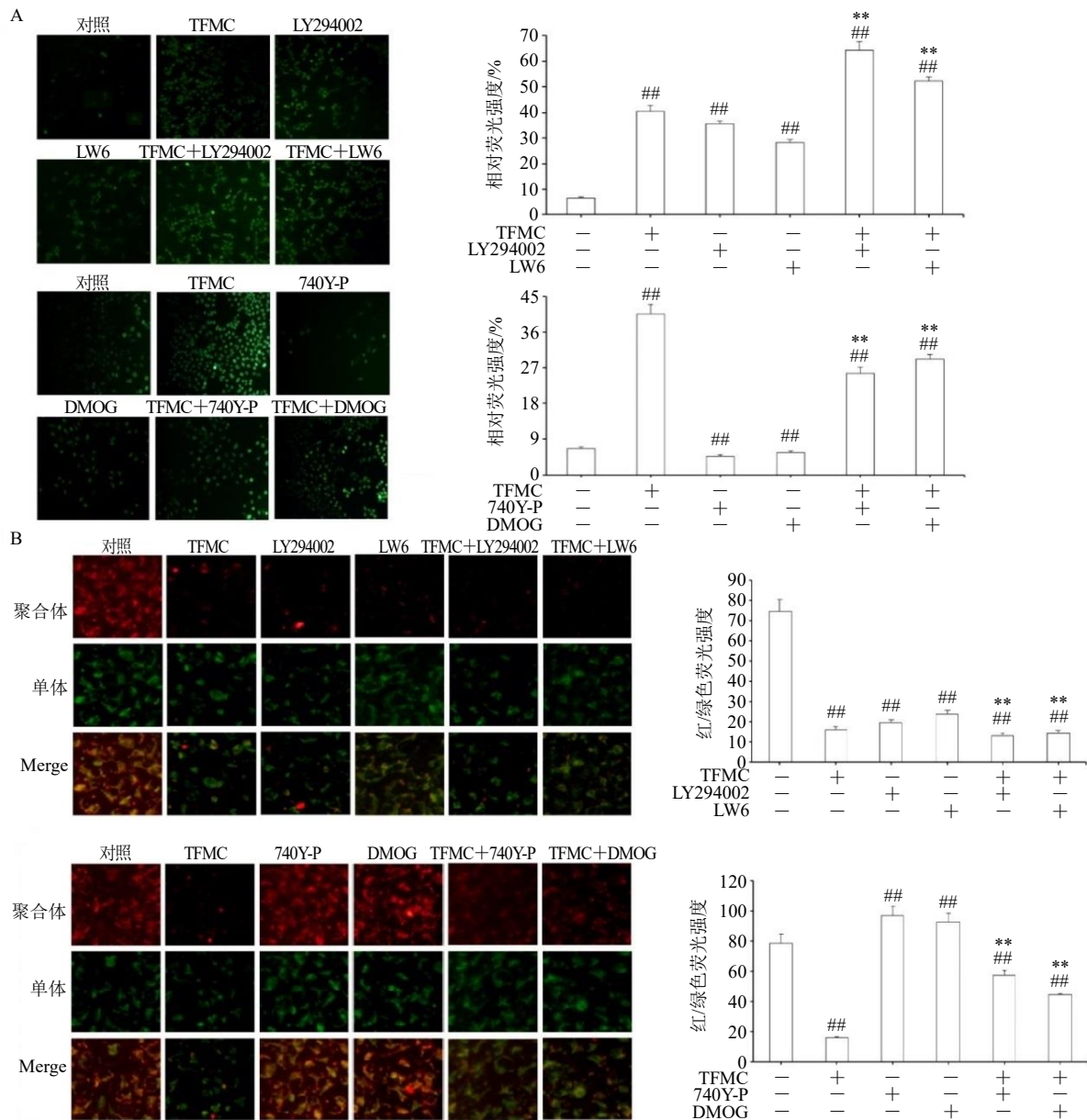


图 4 TFMC 对 HemECs 内 ROS 水平 (A, ×100) 和线粒体膜电位 (B, ×200) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of TFMC on ROS level (A, ×100) and mitochondrial membrane potential (B, ×200) of HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.6 TFMC 对 HemECs 释放 LDH 的影响

如图 5 所示,与对照组比较,TFMC、LY294002 和 LW6 组 LDH 活性明显升高 ($P<0.01$), 740Y-P 和 DMOG 组 LDH 活性显著降低 ($P<0.01$); 与 TFMC 组比较,TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可

进一步促进 HemECs 释放 LDH ($P<0.01$), TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可抑制 LDH 释放 ($P<0.01$)。

3.7 TFMC 对 HemECs 血管生成的影响

如图 6 所示,与对照组比较,TFMC、LY294002

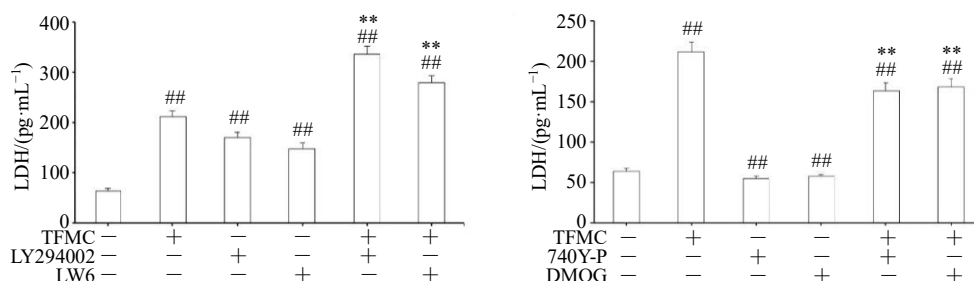


图 5 TFMC 对 HemECs 释放 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Effect of TFMC on LDH release of HemECs ($\bar{x} \pm s, n=5$)

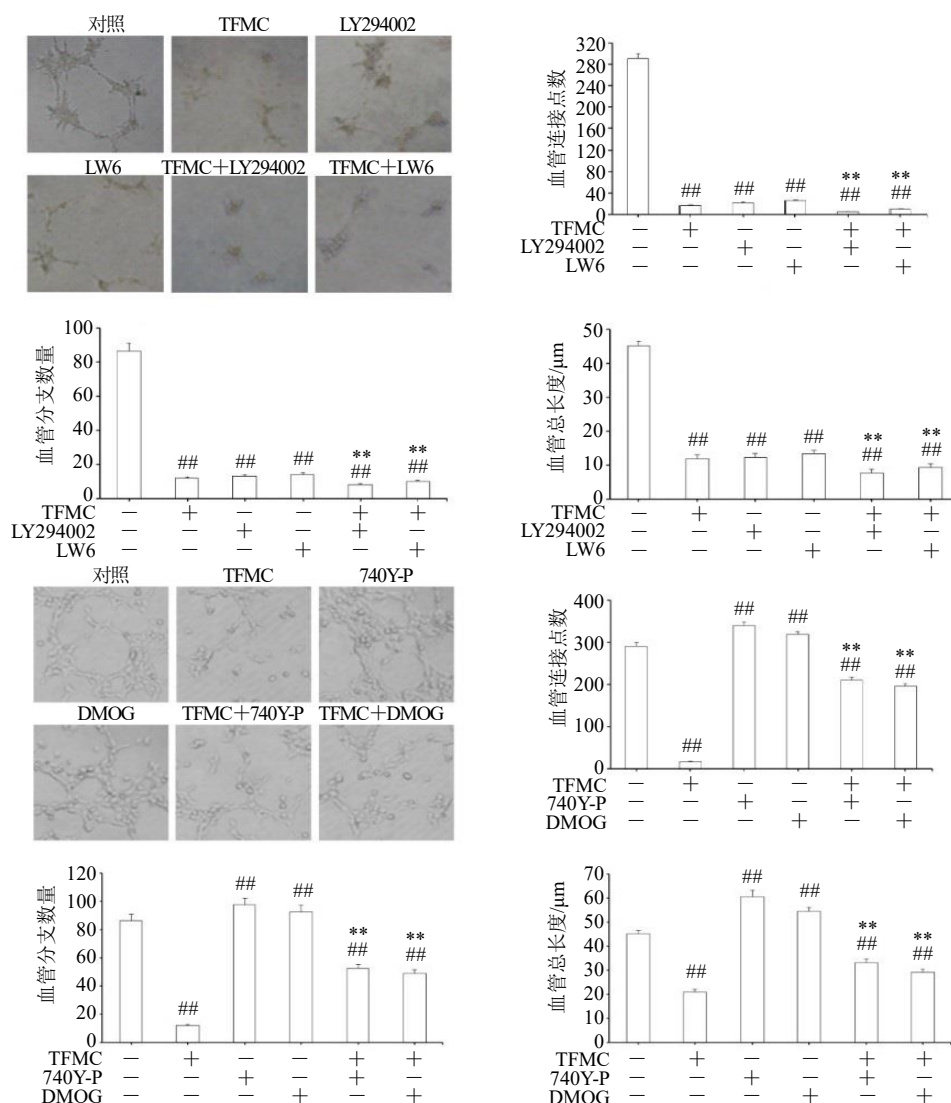


图 6 TFMC 对 HemECs 血管生成的影响 ($\times 200; \bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 6 Effect of TFMC on angiogenesis of HemECs ($\times 200; \bar{x} \pm s, n=5$)

和 LW6 组 HemECs 血管分支数量、连接点数量和总长度明显降低 ($P < 0.01$), 740Y-P 和 DMOG 组 HemECs 血管分支数量、连接点数量和总长度显著升高 ($P < 0.01$); 与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步降低血管分支数量、连接点数量和总长度 ($P < 0.01$), TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可进一步升高血管分支数量、连接点数量和总长度 ($P < 0.01$)。表明 TFMC 可抑制 HemECs 血管生成。

3.8 TFMC 对 HemECs 中 VEGF/VEGFR2 通路相关基因和蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, TFMC、LY294002 和 LW6 组 HemECs 中 VEGF、VEGFR2 分泌, VEGF、

VEGFR2 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达及 p-VEGFR2/VEGFR2 比值明显降低 ($P < 0.01$); 740Y-P 和 DMOG 组 HemECs 中 VEGF、VEGFR2 分泌, VEGF、VEGFR2 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达及 p-VEGFR2/VEGFR2 比值明显升高 ($P < 0.01$)。与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步降低 HemECs 中 VEGF、VEGFR2 分泌, VEGF、VEGFR2 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达及 p-VEGFR2/VEGFR2 比值 ($P < 0.01$); TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可显著升高 HemECs 中 VEGF、VEGFR2 分泌, VEGF、VEGFR2 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达及 p-VEGFR2/VEGFR2 比值 ($P < 0.01$)。

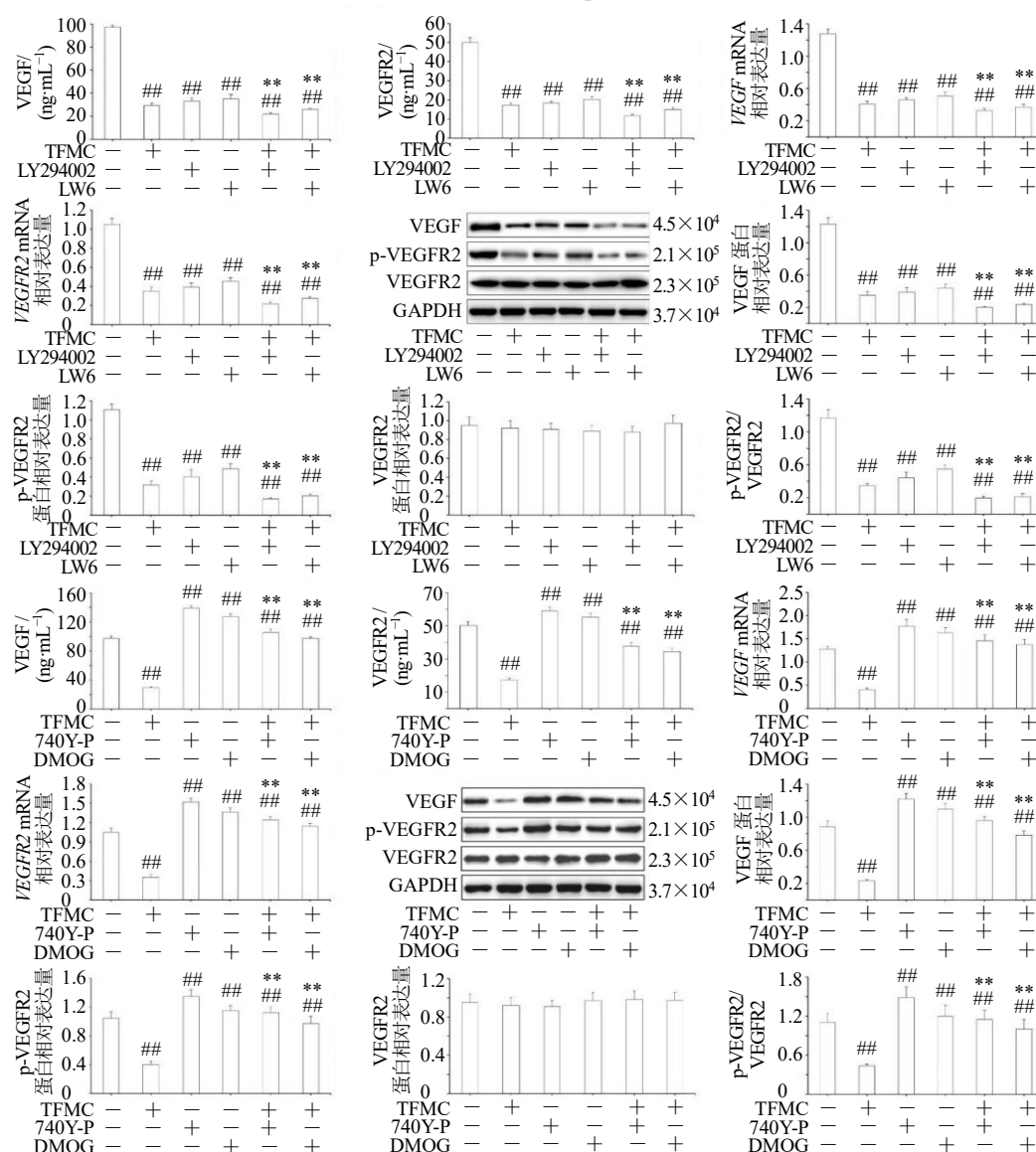


图 7 TFMC 对 HemECs 中 VEGF/VEGFR2 通路相关基因和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of TFMC on gene and protein expressions of VEGF/VEGFR2 pathway in HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.9 TFMC 对 HemECs 中 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路相关基因和蛋白表达的影响

如图 8 所示,与对照组比较,TFMC、LY294002 和 LW6 组 HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR*、*HIF-1 α* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值明显降低 ($P<0.01$); 740Y-P 和 DMOG 组 HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR*、*HIF-1 α* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值显著升高 ($P<$

0.01)。与 TFMC 组比较,TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步降低 HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR*、*HIF-1 α* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值 ($P<0.01$); TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可显著升高 HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR*、*HIF-1 α* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值 ($P<0.01$)。各组间 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* 蛋白表达未见有明显差异。

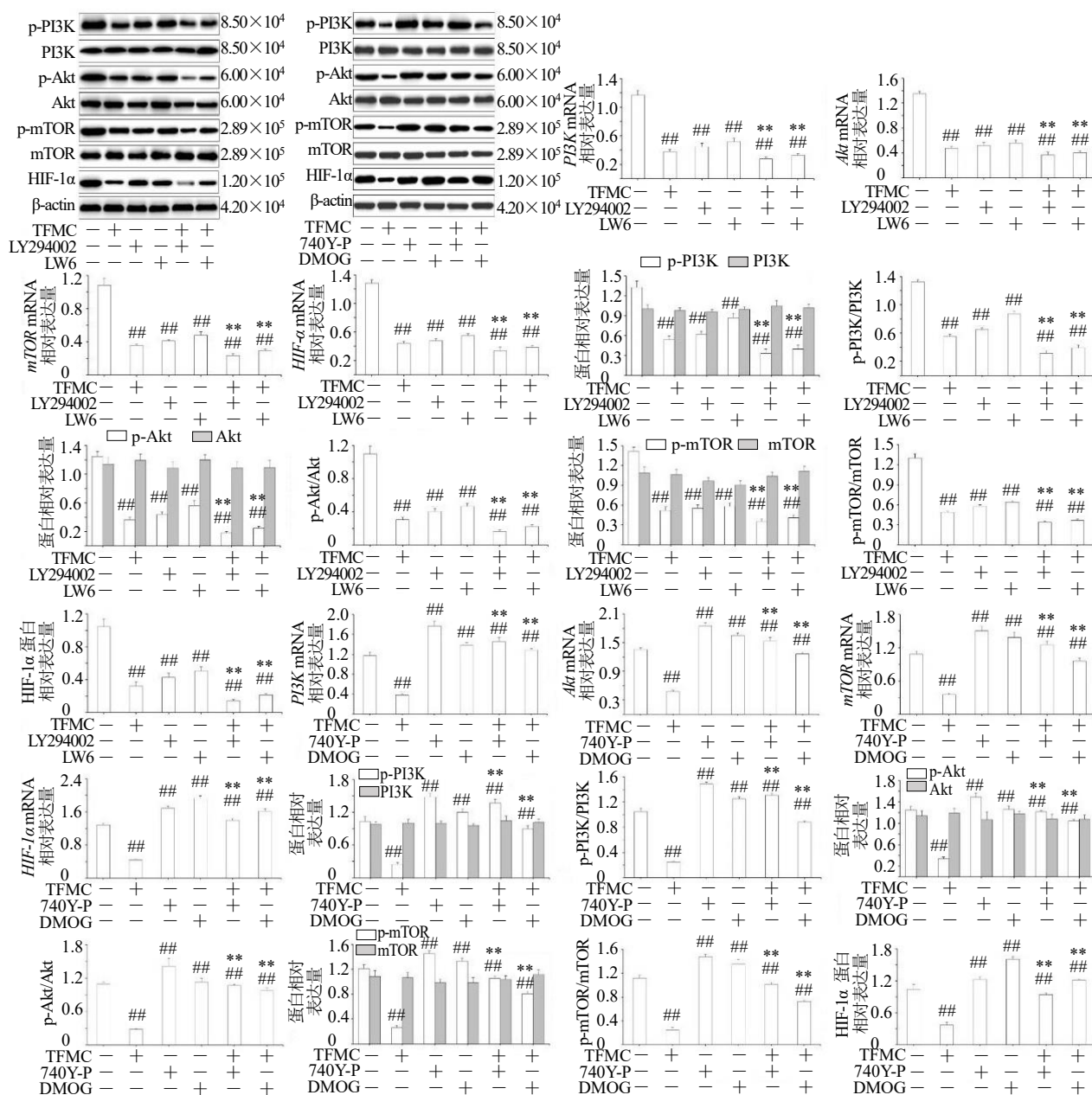


图 8 TFMC 对 HemECs 中 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路相关基因和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effect of TFMC on gene and protein expressions of PI3K/Akt/HIF-1 α pathway in HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.10 TFMC 对 HemECs 中迁移、侵袭相关基因和蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, TFMC、LY294002

和 LW6 组 HemECs 中 FN、MMP-2、MMP-9 分泌, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P<0.01$); 740Y-P 和 DMOG 组 HemECs 中 FN、

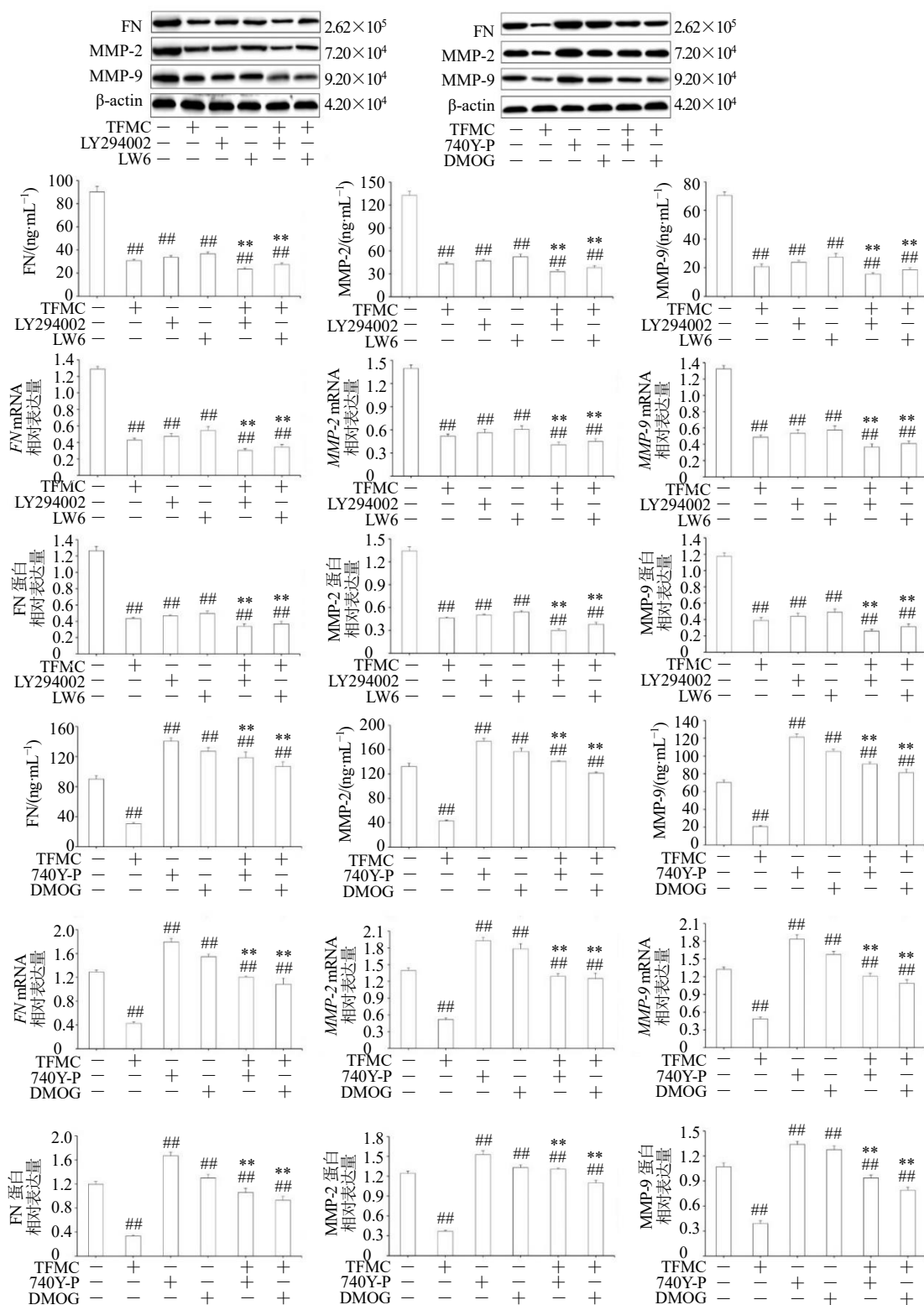


图 9 TFMC 对 HemECs 中迁移、侵袭相关基因和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of TFMC on gene and protein expressions of migration and invasion in HemECs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

MMP-2、MMP-9 分泌, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。与 TFMC 组比较, TFMC 与 LY294002 和 LW6 联用可进一步降低 HemECs 中 FN、MMP-2、MMP-9 分泌, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.01$); TFMC 与 740Y-P 和 DMOG 联用可显著升高 HemECs 中 FN、MMP-2、MMP-9 分泌, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.01$)。

4 讨论

HAs 虽然是一种良性血管肿瘤, 但常常会出现较为严重的并发症, 给患者特别是婴幼儿造成了较大的伤害。当前放化疗和手术方法虽然在一定程度上可以防治, 但是特殊部位的 HAs 化疗药物的不良反应严重影响着婴幼儿的治疗。中医虽无此病名, 但从临床表现似属祖国医学“癥瘕”“积聚”等范畴, 其防治方法有着西医无可比拟的优势。穿破石广泛应用于风湿痹痛和跌打损伤的治疗^[13]。TFMC 为穿破石中一种重要的黄酮类成分^[14], 前期研究发现其对白血病、乳腺癌具有较好的防治作用, 证实其作用机制与阻滞细胞周期、抑制炎症反应及 VEGF/PI3K/Akt 和促进线粒体凋亡通路密切相关^[15-18]; 同时研究还证实 TFMC 及其中成分 gerontoxanthone B 对 HemECs 具有较好的抗增殖、迁移和血管生成活性^[19]。以上研究表明 TFMC 具备作为肿瘤治疗药物的潜质, 值得进一步深入研究。基于上述发现, 本研究以 HemECs 为对象, 开展了其防治 HAs 的机制研究。发现 TFMC、PI3K 抑制剂 LY294002 和 HIF-1 α 抑制剂 LW6 均可显著抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭和成管能力, 促进细胞凋亡、LDH 释放和 G₀/G₁ 期阻滞, 升高细胞内 ROS 水平, 降低线粒体膜电位和细胞中 VEGF、VEGFR2、FN、MMP-2 及 MMP-9 含量, 下调 HemECs 中 VEGF、VEGFR2、PI3K、Akt、mTOR、HIF-1 α 、FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 、FN、MMP-2、MMP-9 蛋白表达及 p-VEGFR2/VEGFR2、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值; TFMC 与 LY294002 或 LW6 联用可进一步加重这种改变。相反, PI3K 激动剂 740Y-P 和 HIF-1 α 激动剂 DMOG 则可以恶化上述变化; TFMC 与 740Y-P 或 DMOG 联用可逆转这种改变。

缺氧是导致肿瘤内皮细胞迁移、凋亡敏感性和血管生成的关键刺激因素^[25]。HIF-1 α 是缺氧诱导的血管生成的重要调节因子, 而缺氧是各种缺氧实体

瘤中主要的促血管生成因子, HIF-1 α 的过表达会促进 VEGF 表达和 HemEC 生长^[9,26]; Lou 等^[27]和 Maimaiti 等^[28]研究发现姜黄素可通过抑制 HIF-1 α /VEGF 通路激活来抗 HemECs 增殖, 沉默 HIF-1 α 可抑制 HemEC 的存活和迁移; Chen 等^[29]进一步研究发现普萘洛尔通过 HIF-1 α 依赖机制抑制 HAs 增殖、血管生成和迁移。由此可见, HIF-1 α 的参与使得 HemEC 更具攻击性的行为。本研究发现在给予 TFMC 或 HIF-1 α 抑制剂 LW6 后, HemECs 的存活率、增殖、迁移、侵袭和成管能力均受到抑制, 导致凋亡加剧和 HemECs 阻滞在 G₀/G₁ 期, LDH 释放和 ROS 升高、线粒体膜电位降低, 细胞中 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白表达明显降低; TFMC 和 LW6 联用则进一步降低上述变化。在给予 HIF-1 α 抑制剂 DMOG 后, 则呈现相反的改变。上述结果表明 TFMC 可通过干预 HIF-1 α 来促进 HemECs 凋亡, 抑制其增殖、迁移、侵袭和成管能力。

HAs 是由 HemECs 过度增殖形成的肿瘤, VEGF/VEGFR2 通路的激活在此过程中扮演着重要角色, 具体表现为 VEGF 与 VEGFR2 的结合导致 VEGFR2 细胞质结构域中特定酪氨酸残基的自磷酸化, 抑制 VEGF/VEGFR2 通路是阻碍肿瘤生长的有效途径^[30-31]。Zhang 等^[9]研究发现敲除 HIF-1 α 后, HemECs 中 VEGF、VEGFR2 mRNA 表达和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达水平降低, 细胞增殖、存活率、迁移、侵袭和成管能力受到抑制; 通过沉默 HemEC 中的 HIF-1 α 并同时转染 pcDNA3.1 VEGF 进一步研究发现, 在转染 pcDNA3.1 VEGF 后, HemECs 中的 VEGF、VEGFR2 mRNA 表达和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达水平升高, HemECs 的 G₀/G₁ 期阻滞减少, 其增殖、存活率、迁移、侵袭和成管能力得以提升; 相反, VEGF 的缺失抑制白细胞介素-6 诱导的 HAs 增殖、迁移、侵袭和成管能力^[32-33]。上述研究表明, VEGF/VEGFR2 通路激活可促进 HemECs 的增殖、迁移、侵袭、成管能力等恶性行为。本研究发现 HemECs 中 VEGF、VEGFR2 含量, VEGF、VEGFR2 mRNA 和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达较高, 其细胞增殖、迁移、侵袭和成管能力强悍; 给予 TFMC、LY294002、LW6 干预及 TFMC 和 LY294002 或 LW6 联用后, HemECs 中 VEGF、VEGFR2 mRNA 表达和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达降低, G₀/G₁ 期阻滞的细胞增加, 其增殖、迁移、侵袭和成管能力等恶性行为得到了有效遏制。而给予 740Y-P、DMOG 干

预后, HemECs 中 *VEGF*、*VEGFR2* mRNA 表达和 VEGF、p-VEGFR2 蛋白表达升高, G₀/G₁ 期阻滞的细胞降低, 其增殖、迁移、侵袭和成管能力等恶性行为得到了促进; TFMC 和 740Y-P 或 DMOG 联用后, 上述变化得到了逆转。

近年来, 学者们研究发现 PI3K/Akt/mTOR 通路在调节各种细胞功能中起着重要作用, 包括代谢、生长、增殖、存活、转录和蛋白质合成^[34]; 该通路也是人类癌症中最常见的失调信号通路, 对肿瘤细胞的代谢、增殖和细胞存活等基本细胞功能和迁移、侵袭和成管能力等恶性行为有着广泛影响^[35-36]。Longatto-Filho 等^[37]研究发现宫颈癌患者的癌组织中存在 VEGF/VEGFR2 自分泌通路, 它可通过催化 PI3K/Akt/mTOR 通路的磷酸化, 从而促进细胞增殖和血管生成等多种作用; Liu 等^[8]进一步研究发现沉默宫颈癌 HeLa 细胞 VEGF 或用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后, 细胞中 VEGFR2、PI3K、Akt 和 mTOR 的磷酸化水平、VEGF 表达和细胞的迁移、侵袭和成管能力明显降低; Li 等^[26]和 Ji 等^[38]研究发现, HemECs 中 VEGF/VEGFR2 通路被激活后, 可通过激活其下游的 PI3K/Akt/mTOR 通路触发多种下游信号, 进而促进血管生成; Pan、Lou 和 Medici 等^[10-11,39]进一步研究发现, HemECs 在给予枸杞多糖、雷帕霉素、普萘洛尔和 LY294002 处理后, 细

胞中 PI3K、Akt 和 mTOR 的磷酸化水平和细胞的迁移、侵袭和成管能力明显降低; 相反, HemECs 在给予 Akt 激动剂 IGF-1 后, 上述变化被逆转。由此可见, PI3K/Akt/mTOR 通路激活在 HemECs 迁移、侵袭和血管生成及 HAs 发病机制中发挥着重要作用。本研究发现在给予 TFMC、PI3K 抑制剂 LY294002 后, HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值明显降低; TFMC 和 LY294002 联用则进一步降低上述变化。而给予 PI3K 激动剂 740Y-P 干预后, HemECs 中 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值明显升高; TFMC 和 740Y-P 联用后, 上述变化得到了逆转。上述结果表明 TFMC 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路的激活来抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭和成管能力 (图 10)。

FN 是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的重要成分, 也是 ECM 成分间的支架, 在促进 ECM 聚集及炎症细胞趋化和肿瘤细胞迁移和侵袭过程中发挥着重要作用^[40-41]; 此外, FN 还可以诱导 MMP (如 MMP-2、MMP-9) 的表达, 来促进肿瘤细胞的转移、侵袭和血管生成^[42]。研究发现橙皮油素和加蓬酸可显著抑制黑色素瘤 B16F10 细胞迁移、侵袭

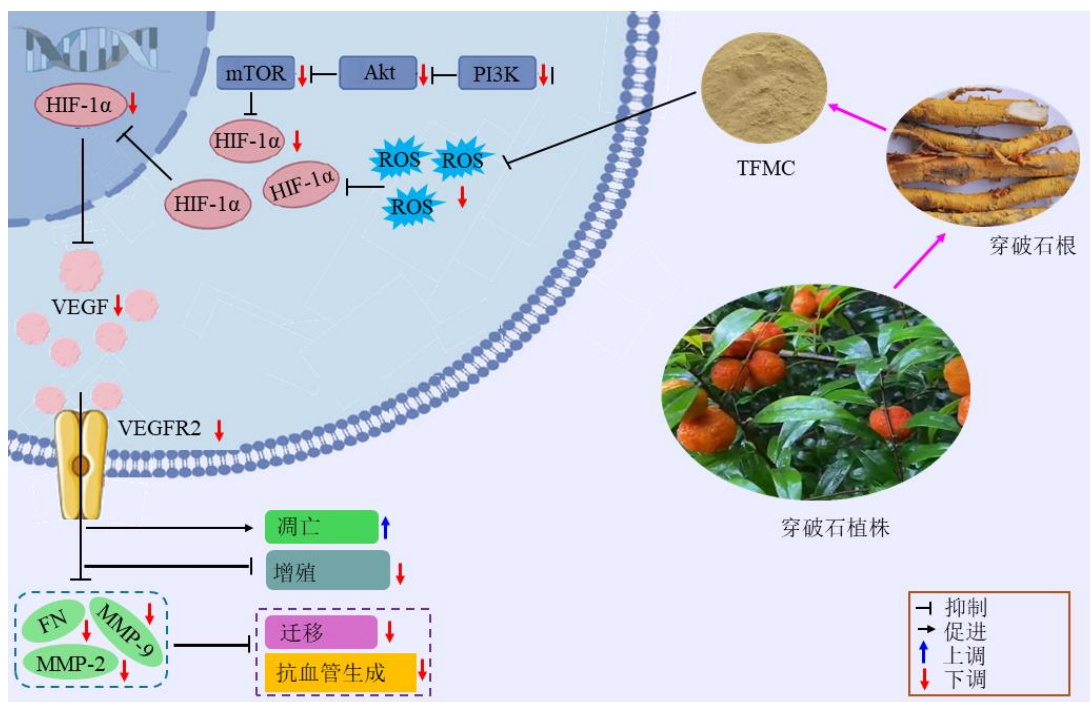


图 10 TFMC 抑制 HemECs 增殖、迁移和血管生成的作用机制

Fig. 10 Mechanisms of TFMC restraining proliferation, migration and angiogenesis in HemECs

和成管能力, 且与抑制 FN、MMP-2、MMP-9 活性及降低 FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达有关^[43-44]。临床研究也证实, FN、MMP-2、MMP-9 表达与乳腺浸润性导管癌患者和结肠癌患者的生存率负相关, 与淋巴结转移密切相关, 研究表明它们的高表达是乳腺浸润性导管癌、结肠癌预后不良的指标^[45-46]。由此可见, FN、MMP-2、MMP-9 在肿瘤的转移、侵袭过程中扮演重要角色^[47]。本研究发现 TFMC、LY294002 和 LW6 干预可显著降低 HemECs 中 FN、MMP-2、MMP-9 含量, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达; TFMC 和 LY294002 或 LW6 联用可进一步降低以上指标的表达水平。而给予 740Y-P、DMOG 干预可显著升高 HemECs 中 FN、MMP-2、MMP-9 含量, FN、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达; TFMC 和 740Y-P 或 DMOG 联用后, 上述变化得到了逆转。此结果与其抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭和成管能力, 促进其凋亡的结果相一致。

综上, TFMC 可抑制 HemECs 增殖、迁移、侵袭和血管生成, 其作用机制与抑制 VEGF/VEGFR2 和 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路激活密切相关。本研究为阐明 TFMC 抗肿瘤机制提供了新视角, TFMC 有望成为治疗 HAs 的新型候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sun B, Dong C X, Lei H Z, *et al.* Propranolol inhibits proliferation and induces apoptosis of hemangioma-derived endothelial cells via Akt pathway by down-regulating Ang-2 expression [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 316: 108925.
- [2] Novoa M, Baselga E, Beltran S, *et al.* Interventions for infantile haemangiomas of the skin [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 4(4): CD006545.
- [3] Chen J, Wu D, Dong Z Q, *et al.* The expression and role of glycolysis-associated molecules in infantile hemangioma [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118215.
- [4] Wang S Q, Ren L, Shen G G, *et al.* The knockdown of MALAT1 inhibits the proliferation, invasion and migration of hemangioma endothelial cells by regulating miR-206/VEGFA axis [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 51: 101540.
- [5] Dewangan J, Srivastava S, Mishra S, *et al.* Salinomycin inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 α /VEGF mediated tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 201, 164(6): 326-335.
- [6] Monk B J, Willmott L J, Sumner D A. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(2): 181-186.
- [7] Hu W H, Duan R, Xia Y T, *et al.* Binding of resveratrol to vascular endothelial growth factor suppresses angiogenesis by inhibiting the receptor signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(4): 1127-1137.
- [8] Liu S T, Ai Z Y, Hu Y, *et al.* Ginseng glucosyl oleanolate inhibit cervical cancer cell proliferation and angiogenesis via PI3K/AKT/HIF-1 α pathway [J]. *NPJ Sci Food*, 2024, 8: 105.
- [9] Zhang W P, Sun L, Gao H X, *et al.* Mechanism of the HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 pathway in the proliferation and apoptosis of human haemangioma endothelial cells [J]. *Int J Exp Pathol*, 2023, 104(5): 258-268.
- [10] Pan W K, Li P, Guo Z T, *et al.* Propranolol induces regression of hemangioma cells via the down-regulation of the PI3K/Akt/ENOS/VEGF pathway [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2015, 62(8): 1414-1420.
- [11] Lou L, Chen G, Zhong B, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide induced apoptosis and inhibited proliferation in infantile hemangioma endothelial cells via down-regulation of PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20191182.
- [12] Zhao Y, Li D Y, Han Y, *et al.* The ester derivatives obtained by C-ring modification of podophyllotoxin-induced apoptosis and inhibited proliferation in hemangioma endothelial cells via downregulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 99(6): 828-838.
- [13] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-9 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1088.
- [14] Rueankham L, Panyajai P, Saiai A, *et al.* Biological activities of extracts and compounds from Thai Kac-Lae (*Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner) [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 191.
- [15] Lee K S, Lee M G, Nam K S. Evaluation of the antimetastatic and anticancer activities of morin in HER2-overexpressing breast cancer SK-BR-3 cells [J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(1): 126.
- [16] Chien T V, Anh N T, Thanh N T, *et al.* Two new prenylated isoflavones from *Maclura cochinchinensis* collected in Hoa Binh province Vietnam [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(2): 212-218.
- [17] Promden W, Chanvorachote P, Viriyabancha W, *et al.* *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner heartwood extracts containing resveratrol and oxyresveratrol inhibit melanogenesis in B16F10 melanoma cells [J]. *Molecules*,

- 2024, 29(11): 2473.
- [18] Sainz-Hernández J C, Rueda-Puente E O, Cornejo-Ramírez Y I, *et al.* Biological application of the allopathic characteristics of the genus *Maclura*: A review [J]. *Plants*, 2023, 12(19): 3480.
 - [19] Nakashima K I, Ogiwara T, Hirai T, *et al.* Gerontoxanthone B from *Maclura cochinchinensis* var. *gerontogea* exhibits anti-inflammatory potential as an aryl hydrocarbon receptor agonist [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(16): 4253-4258.
 - [20] 方玲, 袁思雨, 彭灿, 等. 基于 HIF-1 α /SLC7A11 轴介导肝星状细胞铁死亡探讨香芹酚抗肝纤维化的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5494-5502.
 - [21] 张磊, 邓雪春, 鲜明. 低氧与 DMOG 对 BMSCs 成脂分化影响的对比研究 [J]. *医学研究与战创伤救治*, 2024, 37(2): 113-119.
 - [22] 黄家俊, 吴迪友, 陶广义, 等. 牛膝多糖通过 SIRT3/Parkin 调控的线粒体自噬减轻 IL-1 β 诱导的大鼠髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎性小体活化 [J]. *中草药*, 2025, 56(5): 1652-1666.
 - [23] 赵婷婷, 王兆洪, 林胜璋. 人参皂苷 Rg₃ 通过 PI3K 途径抑制胰腺癌细胞上皮间质转化及血管生成拟态 [J]. *中草药*, 2024, 55(18): 6261-6268.
 - [24] Wang J Z, Wang A L, He H B, *et al.* Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108692.
 - [25] Li X W, Chen C H, Dai Y, *et al.* Cinobufagin suppresses colorectal cancer angiogenesis by disrupting the endothelial mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor 1 α axis [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1724-1734.
 - [26] Li P, Guo Z T, Gao Y, *et al.* Propranolol represses infantile hemangioma cell growth through the β 2-adrenergic receptor in a HIF-1 α -dependent manner [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3099-3107.
 - [27] Lou S H, Wang Y F, Yu Z J, *et al.* Curcumin induces apoptosis and inhibits proliferation in infantile hemangioma endothelial cells via downregulation of MCL-1 and HIF-1 α [J]. *Medicine*, 2018, 97(7): e9562.
 - [28] Maimaiti A, Aierken Y, Zhou L, *et al.* Inhibiting interleukin-6/signal transducers and activators of transduction-3/hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway suppressed the growth of infantile hemangioma [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2023, 33(2): 158-166.
 - [29] Chen Y Z, Bai N, Bi J H, *et al.* Propranolol inhibits the proliferation, migration and tube formation of hemangioma cells through HIF-1 α dependent mechanisms [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(12): e6138.
 - [30] Ou J M, Yu Z Y, Qiu M K, *et al.* Knockdown of VEGFR2 inhibits proliferation and induces apoptosis in hemangioma-derived endothelial cells [J]. *Eur J Histochem*, 2014, 58(1): 2263.
 - [31] Han J M, Choi Y S, Dhakal D, *et al.* Novel nargenicin A1 analog inhibits angiogenesis by downregulating the endothelial VEGF/VEGFR2 signaling and tumoral HIF-1 α /VEGF pathway [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(8): 252.
 - [32] Fu X Y, Zhai S T, Yuan J. Interleukin-6 (IL-6) triggers the malignancy of hemangioma cells via activation of HIF-1 α /VEGFA signals [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 841: 82-89.
 - [33] Jinnin M, Medici D, Park L, *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1236-1246.
 - [34] Li Y L, Huang T F, Fu Y, *et al.* Antitumor activity of a novel dual functional podophyllotoxin derivative involved PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0215886.
 - [35] Götting I, Jendrosseck V, Matschke J. A new twist in protein kinase B/Akt signaling: Role of altered cancer cell metabolism in Akt-mediated therapy resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8563.
 - [36] Gao T, Zhang X H, Zhao J, *et al.* SIK2 promotes reprogramming of glucose metabolism through PI3K/AKT/HIF-1 α pathway and Drp1-mediated mitochondrial fission in ovarian cancer [J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 89-101.
 - [37] Longatto-Filho A, Pinheiro C, Martinho O, *et al.* Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 212.
 - [38] Ji Y, Chen S Y, Li K, *et al.* Signaling pathways in the development of infantile hemangioma [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 13.
 - [39] Medici D, Olsen B R. Rapamycin inhibits proliferation of hemangioma endothelial cells by reducing HIF-1-dependent expression of VEGF [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42913.
 - [40] Lin T C, Yang C H, Cheng L H, *et al.* Fibronectin in cancer: Friend or foe [J]. *Cells*, 2019, 9(1): 27.
 - [41] Rick J W, Chandra A, Dalle Ore C, *et al.* Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral

- effects, and therapeutic implications [J]. *Semin Oncol*, 2019, 46(3): 284-290.
- [42] Padežnik T, Oleksy A, Cokan A, *et al.* Changes in the extracellular matrix in endometrial and cervical cancer: A systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5463.
- [43] Hosseini F, Ahmadi A, Hassanzade H, *et al.* Inhibition of melanoma cell migration and invasion by natural coumarin auraptene through regulating EMT markers and reducing MMP-2 and MMP-9 activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 971: 176517.
- [44] Azad M, Hosseini F, Hassanzade H, *et al.* Galbanic acid suppresses melanoma cell migration and invasion by reducing MMP activity and downregulating N-cadherin and fibronectin [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(8): 5779-5788.
- [45] Min K W, Kim D H, Do S I, *et al.* Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and-9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. *APMIS*, 2014, 122(12): 1196-1206.
- [46] Yang B, Tang F Q, Zhang B C, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2014, 12: 24.
- [47] Yang M H, Jung S H, Um J Y, *et al.* Daidzin targets epithelial-to-mesenchymal transition process by attenuating manganese superoxide dismutase expression and PI3K/Akt/mTOR activation in tumor cells [J]. *Life Sci*, 2022, 295: 120395.

[责任编辑 李亚楠]