

黄芩素介导FAK蛋白调控PI3K/Akt信号通路抑制胃癌 HGC-27细胞增殖和迁移

乔丹, 张晟郡, 王时玉, 姚光媛, 蔡英兰, 陈丽艳, 朴英实*

(延边大学肿瘤研究中心, 民族地区高发肿瘤病理生物学国家民委重点实验室(延边大学), 延边大学
科研创新团队, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的:研究黄芩素介导黏着斑激酶(FAK)调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路影响胃癌HGC-27细胞增殖和迁移的作用和可能的分子机制。方法:使用黄芩素(0、5、15、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理胃黏膜上皮GES-1细胞、胃癌HGC-27细胞48 h, 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖活力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同浓度黄芩素干预对FAK、上皮细胞-间质转化(EMT)及PI3K信号通路相关蛋白表达情况。利用慢病毒转染技术,构建稳定过表达FAK的胃癌HGC-27细胞,Western blot及绿色荧光蛋白(GFP)荧光检测FAK转染情况。细胞分为空载体组、黄芩素组、FAK过表达组和黄芩素处理FAK过表达组;MTT比色法检测细胞增殖活力;平板克隆形成实验观察克隆形成能力;Transwell迁移实验检测细胞迁移能力;Western blot检测EMT及PI3K信号通路相关蛋白表达情况。结果:与空白组比较,黄芩素(15、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组可明显抑制胃癌HGC-27细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$),并呈剂量依赖性,而对胃黏膜上皮GES-1细胞则未见明显抑制作用,黄芩素(5、15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)还可下调磷酸化(p)-FAK蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。慢病毒转染HGC-27细胞后,与空载体组比较,FAK过表达组中FAK蛋白的相对表达量明显升高,GFP荧光拍照显示空载体组和FAK过表达组中HGC-27细胞均带有绿色荧光。MTT比色法、平板克隆形成实验及Transwell迁移实验检测结果显示,与空载体组比较,黄芩素组对HGC-27细胞的增殖、克隆形成和迁移具有抑制作用,FAK过表达组促进胃癌细胞的增殖、克隆形成和迁移能力。与FAK过表达组比较,使用黄芩素处理FAK过表达组则会抑制FAK增强的细胞增殖和迁移能力($P<0.05$)。与空白组比较,黄芩素(15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可明显上调胃癌HGC-27细胞E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达,下调波形蛋白(Vimentin)、Snail、p-PI3K和p-Akt蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$);与空载体组比较,FAK过表达组细胞E-cadherin蛋白表达下调,p-FAK、Vimentin和Snail蛋白表达上调,且p-FAK/FAK、p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt明显增加($P<0.05$),加入黄芩素处理后这一现象会被逆转。结论:黄芩素可介导FAK调控PI3K/Akt信号通路影响胃癌HGC-27细胞的增殖和迁移进程。

[关键词] 黄芩素; 胃癌; 黏着斑激酶(FAK); 细胞增殖; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0073-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220622

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1148.002.html>

[网络出版日期] 2022-01-13 16:31

Baicalein Mediated FAK Protein Regulates PI3K/Akt Signaling Pathway to Inhibit Proliferation and Migration of Gastric Cancer HGC-27 Cells

QIAO Dan, ZHANG Sheng-jun, WANG Shi-yu, YAO Guang-yuan, CAI Ying-lan, CHEN Li-yan,
PIAO Ying-shi*

(Cancer Research Center of Yanbian University, Key Laboratory of Pathobiology (Yanbian University),
State Ethnic Affairs Commission, Research and Innovation Group of Yanbian University, Yanji 133002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the possible molecular mechanism of baicalin (BAI)-mediated focal

[收稿日期] 2021-11-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860651);吉林省大学生创新创业计划训练项目(202110184010)

[第一作者] 乔丹,博士,从事肿瘤分子病理生物学研究,E-mail:190423829@qq.com

[通信作者] * 朴英实,博士,教授,从事肿瘤分子病理生物学研究,E-mail:yspiao@ybu.edu.cn

adhesion kinase (FAK) in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway to inhibit the proliferation and migration of gastric cancer HGC-27 cells. **Method:** The gastric epithelial GES-1 cells and gastric cancer HGC-27 cells were respectively treated with BAI (0, 5, 15, 25, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h, and then methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was adopted to detect effect of BAI on cell proliferation. Western blot (WB) was employed to detect the expression of FAK and the proteins related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and PI3K signaling pathway after intervention with different concentrations of BAI. The HGC-27 cells stably overexpressing FAK were constructed with lentivirus-mediated transfection technique, and the transfection of FAK was detected through WB and green fluorescent protein (GFP). The cells were divided into empty vector (NC) group, BAI group, FAK overexpression group, and BAI-treated FAK overexpression group, and cell proliferation activity was detected by MTT assay. The colony formation and cell migration were observed via colony formation assay and Transwell migration assay, respectively. The expression of proteins involved in EMT and PI3K signaling pathways were detected by Western blot. **Result:** Compared with the NC group, BAI (15, 25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the proliferation of HGC-27 cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$) while did not affect that of GES-1 cells. BAI (5, 15 and 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) down-regulated the expression level of p-FAK ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with NC group, FAK overexpression group showed up-regulated expression level of FAK in HGC-27 cells. The HGC-27 cells in both NC group and FAK overexpression group had green fluorescence. Compared with NC group, BAI inhibited the growth, colony formation, and migration, while FAK overexpression promoted those of HGC-27 cells. The treatment of FAK overexpression group with BAI inhibited the enhancement of cell proliferation and migration ($P<0.05$). WB showed that compared with NC group, BAI (15, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly up-regulated the expression of E-cadherin protein and down-regulated that of Vimentin, Snail, p-PI3K, and p-Akt protein in HGC-27 cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with NC group, FAK overexpression group showed down-regulated expression of E-cadherin, up-regulated expression of p-FAK, Vimentin, and Snail, and increased ratios of p-FAK/FAK, p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ($P<0.05$). This phenomenon would be reversed after BAI treatment. **Conclusion:** BAI can affect the proliferation and migration of gastric cancer HGC-27 cells by mediating FAK to regulate PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] baicalein; gastric cancer; focal adhesion kinase (FAK); cell proliferation; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,全球发病率和死亡率均较高,由于胃癌早期的症状不典型,诊断率低容易错过最佳的手术窗口,一旦发现就已经是晚期^[1]。胃癌晚期的治疗主要以手术、放化疗及介入等综合性治疗为主,但放化疗不良反应较大,化疗药物易产生耐药^[2]。因此,低毒高效、药源广泛、多靶点的中草药在防止癌细胞的转移和扩散等方面的研究具有重要的临床意义^[3]。黄芩素又名黄芩苷元,是从中草药唇形科植物高黄芩根部提取的一种黄酮类单体,具有抗炎、抗氧化、抗过敏和抗肿瘤等功效^[4]。研究表明黄芩素在乳腺癌、胰腺癌、宫颈癌和胃癌等多种肿瘤中均具有抑制肿瘤细胞增殖、转移及上皮-间质转化(EMT)进程,促进凋亡等抗肿瘤活性,其作用机制可能与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、蛋白激酶B(Akt)等信号通路相

关^[5-8]。黏着斑激酶(FAK),又称蛋白酪氨酸激酶2(PTK2),是一种非受体的细胞内酪氨酸激酶,是整合素介导信号通路中的重要成员^[9]。FAK通过作用于癌细胞和肿瘤微环境的基质细胞,促进肿瘤的进展、转移及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt、p53、胞外信号调节激酶(ERK)等相关通路的激活^[10]。但目前尚未有研究报道黄芩素与FAK调节胃癌细胞增殖及迁移存在关联。本研究选用人胃癌HGC-27细胞验证黄芩素的抑制胃癌细胞增殖和迁移的作用和机制,并对潜在靶点FAK进行过表达,观察黄芩素干预和过表达FAK对胃癌增殖和迁移的影响及可能的EMT,PI3K/Akt信号通路相关的分子机制。

1 材料

1.1 细胞与药物 人胃黏膜上皮GES-1细胞购自中国吉凯公司,编号GCC-ST0002,人胃癌HGC-27

细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,编号TCHu22。黄芩素购自美国Sigma公司,批号465119,规格500 mg,纯度>98%。

1.2 试剂 RPMI 1640 细胞培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为11879020、R001100、10100147);噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、吉姆萨染色液(中国Solarbio公司,批号分别为M8180、D8371、G8220);RIPA 蛋白裂解液、蛋白标准品(BSA)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏ECL 试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(中国碧云天生物技术研究,批号分别为P0013B、P0007、P0010、P0018S、A0216、A0208); β -肌动蛋白(β -actin)鼠单克隆抗体(中国Elabscience公司,批号EAP1706),E-钙黏蛋白(E-cadherin)、Snail、磷酸化(p)-PI3K、p-FAK、FAK 兔单克隆抗体(美国Cell signaling公司,批号分别为3195S、3879、4228、8556、3285),波形蛋白(Vimentin)、PI3K、Akt、p-Akt 鼠单克隆抗体(美国Proteintech公司,批号分别为10366-1-AP、60225-1-Ig、60203-1-Ig、66444-1-Ig),苏木素染色液(中国Baso公司,批号BA-4021A)。

1.3 仪器 Model371 型恒温二氧化碳(CO₂)细胞培养箱(美国Thermo公司),INFINITE 200 PRO 型全波长多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),SW-CJ-2FD 型细胞超净工作台(中国上海博讯公司),PowerPac Basic 型垂直电泳仪、Trans-Biot Turbo 型转膜仪、ChemiDoc MP 型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),IX73P1F 型奥林巴斯荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组 人胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞用RPMI 1640培养基(含有10%胎牛血清和1%青-链霉素),于5%CO₂,37℃恒温培养箱中常规培养。待细胞融合至70%~80%稳定生长时,取对数生长期细胞进行传代及后续实验。将细胞分成空白组和黄芩素组(5、15、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。慢病毒转染后,将细胞分成空载体组、黄芩素组(25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素处理)、FAK 过表达组和黄芩素+FAK 过表达组。

2.2 质粒构建及转染 Lenti-FAK-GFP 载体及空载体由上海吉凯有限公司设计和包装。将 5×10^4 个细胞接种于6孔板内,慢病毒感染后,使用2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的嘌呤霉素选择单克隆分离株,建立稳定表达的细胞

株。通过GFP 荧光拍照和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其感染效率。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖 取对数生长期细胞,计数,调整细胞悬液的密度为 5×10^4 个/mL,将其接种于96孔板,每孔100 μL ,并且每组设5个复孔,放入细胞培养箱过夜培养。次日加入药物,培养48 h,每孔加入MTT 20 μL ,在培养箱中继续孵育4 h,每孔加入DMSO 100 μL ,全自动酶标仪在490 nm处测定各孔吸光度 A ,并统计分析结果。细胞存活率= $(A_{\text{用药组}}-A_{\text{空白组}})/(A_{\text{溶剂组}}-A_{\text{空白组}})\times 100\%$ 。

2.4 平板克隆形成实验检测细胞集落形成 取对数生长期的HGC-27细胞,常规消化,以每孔500个的细胞密度接种于6孔板中,次日加药,置于37℃,5%CO₂细胞培养箱中培养大约14 d,肉眼观察到形成克隆集落时,清洗,无水甲醛固定,吉姆萨染液染色,待自然干燥后,进行拍照并进行统计分析。

2.5 Transwell 迁移实验检测细胞迁移 取对数生长期的HGC-27细胞,制备 5×10^4 个/mL的细胞悬液,取100 μL 接种于Transwell小室上室内,下室每孔加入含1%胎牛血清的培养液600 μL ,放入细胞培养箱中培养,次日,将下室含1%胎牛血清的培养液换成含10%胎牛血清的培养液,上室进行加药处理,继续培养24~48 h,用多聚甲醛固定,苏木素染色,无水乙醇脱水,取出小室,棉签擦净未迁移的细胞,切下小室薄膜,显微镜下拍照观察并分析结果。

2.6 Western blot 检测相关蛋白表达 取生长稳定良好的HGC-27细胞,铺板,细胞培养过夜;次日加药。48 h后收集各组细胞,用RIPA 蛋白裂解液及磷酸酶抑制剂提取胃癌细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,配制8%~10% SDS-PAGE,取蛋白30 μg 每孔上样,电泳结束后将蛋白转膜至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭反应1 h后,加入一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,清洗,加入二抗(1:1 000),室温反应2 h,TBST 清洗3次于凝胶成像系统进行ECL 曝光成像并拍照。用Image Lab 软件对蛋白条带的灰度值进行分析处理。

2.7 统计学方法 结果均应用SPSS 26.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,单因素方差分析用于多组间数据的比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对正常胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞增殖的影响 将不同浓度黄芩素(5、15、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于正常胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞48 h,与空白组比较,随着

药物浓度的增加,黄芩素组(15、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HGC-27细胞增殖抑制作用逐渐增强($P<0.05$, $P<0.01$),正常胃黏膜上皮GES-1细胞则未见明显抑制作用,提示黄芩素可抑制HGC-27细胞增殖。后续实验采用黄芩素25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行实验,作用时间48 h。见表1。

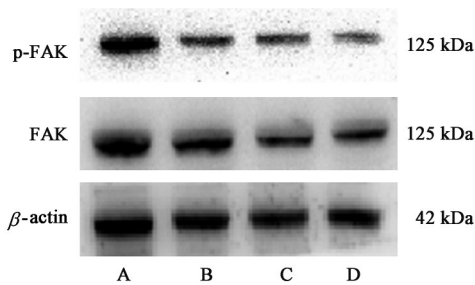
表1 黄芩素对正常胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of baicalein on proliferation of normal gastric epithelial GES-1 cells and gastric cancer HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%	
		GES-1	HGC-27
空白组		100.00±0.00	100.00±0.00
黄芩素组	5	99.36±1.47	91.84±3.53
	15	97.93±2.01	70.16±7.06 ¹⁾
	25	97.47±3.98	51.45±2.11 ²⁾
	50	96.45±1.62	39.28±6.28 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2、表6、表8同)

3.2 黄芩素对胃癌HGC-27细胞FAK蛋白表达的影响 与空白组比较,黄芩素(5、15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可明显抑制 p-FAK 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$), p-FAK/FAK 明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),并呈浓度依赖性。见图1和表2。



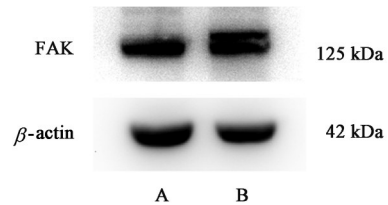
注:A. 空白组;B-D. 黄芩素组(5、15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图6、图8同)

图1 黄芩素作用胃癌HGC-27细胞中FAK蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of baicalcin on FAK protein expression in gastric cancer HGC-27 cells

表2 黄芩素对胃癌HGC-27细胞中FAK蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 2 Effect of baicalcin on FAK protein expression in gastric cancer HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-FAK/ β -actin	FAK/ β -actin	p-FAK/FAK
空白组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
黄芩素组	5	0.62±0.03 ¹⁾	0.90±0.04	0.68±0.05 ¹⁾
	15	0.46±0.12 ¹⁾	0.88±0.06 ¹⁾	0.52±0.11 ¹⁾
	25	0.32±0.04 ²⁾	0.87±0.03 ¹⁾	0.36±0.02 ²⁾

3.3 稳定转染胃癌HGC-27细胞后对FAK蛋白表达及GFP荧光的影响 慢病毒转染HGC-27细胞FAK过表达后,细胞中FAK蛋白的相对表达量显著高于空载体组($P<0.01$)。见图2和表3。GFP荧光拍照显示空载体组和FAK过表达组中HGC-27细胞均带有绿色荧光。见图3。



注:A. 空载体组;B. FAK过表达组(图3同)

图2 慢病毒转染FAK过表达的蛋白电泳

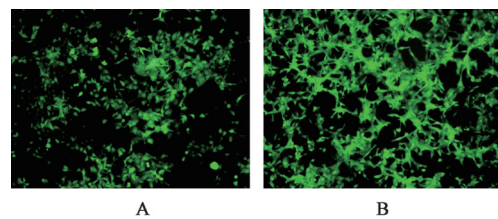
Fig. 2 Electrophoresis of FAK overexpressed proteins transfected by lentivirus

表3 慢病毒转染FAK过表达的蛋白电泳($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of FAK overexpressed proteins transfected by lentivirus ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	FAK/ β -actin
空载体组	1.00±0.06
FAK过表达组	2.22±0.09 ¹⁾

注:与空载体组比较¹⁾ $P<0.01$



注:A. 空载体组;B. FAK过表达组

图3 慢病毒转染FAK过表达(荧光倒置显微镜,×100)

Fig. 3 Overexpression of FAK transfected with lentivirus (fluorescent inverted microscope, ×100)

3.4 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞增殖能力的影响 与空载体组比较,黄芩素组可抑制HGC-27细胞增殖($P<0.05$),FAK过表达组可促进细胞增殖($P<0.05$),使用黄芩素处理FAK过表达组会抑制FAK引起的增强细胞增殖能力($P<0.05$)。见表4。

3.5 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞克隆形成的影响 与空载体组比较,黄芩素组可明显抑制细胞的克隆形成能力,FAK过表达组可使细胞克隆形成能力增加,使用黄芩素处理FAK过表达组细胞则会抑制FAK增加的克隆形成能力。见图4。

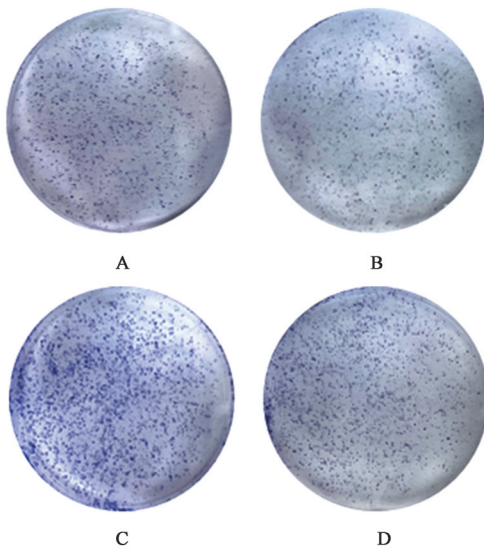
3.6 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞迁移作用的影响 与空载体组比较,黄芩素组可明显抑制细

表4 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞增殖能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of baicalein on proliferation of gastric cancer cells by inhibiting FAK overexpression ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A_{490}
空载体组		0.68±0.02
黄芩素组	25	0.47±0.07 ¹⁾
FAK过表达组		0.86±0.06 ¹⁾
黄芩素+FAK过表达组	25	0.72±0.05 ²⁾

注:与空载体组比较¹⁾ $P<0.05$;与FAK过表达组比较²⁾ $P<0.05$ (表5、表7、表9同)



注:A.空载体组;B.黄芩素组;C.FAK过表达组;D.黄芩素+FAK过表达组(图5同)

图4 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞克隆形成的影响
Fig. 4 Effect of baicalein inhibiting FAK overexpression on clonogenesis of gastric cancer cells

胞的迁移能力($P<0.05$),FAK过表达组可明显增强细胞的迁移能力($P<0.05$),使用黄芩素处理FAK过表达组细胞则会明显抑制FAK增加的迁移能力($P<0.05$)。见图5,表5。

3.7 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞EMT相关蛋白表达的影响 与空白组比较,黄芩素(15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可上调上皮标志物E-cadherin蛋白表达,并明显下调间质标志物Vimentin和Snail蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。见图6和表6。通过慢病毒转染胃癌HGC-27细胞后,与空载体组比较,FAK过表达组细胞E-cadherin蛋白表达明显下调($P<0.05$),p-FAK、Vimentin和Snail蛋白表达明显上调($P<0.05$),p-FAK/FAK明显升高($P<0.05$),加入黄芩素干预后这一现象会被逆转($P<0.05$)。见图7和表7。

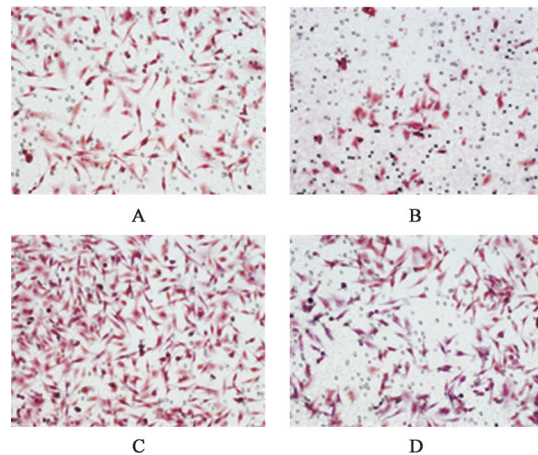


图5 黄芩素抑制FAK过表达对胃癌细胞迁移作用的影响(苏木素, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of baicalein on migration of gastric cancer cells by inhibiting FAK overexpression (hematoxylin, $\times 200$)

表5 黄芩素对FAK过表达胃癌细胞迁移作用的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of baicalein on migration of gastric cancer cells by inhibiting FAK overexpression ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭细胞/%
空载体组		100.00±0.00
黄芩素组	25	68.24±1.27 ¹⁾
FAK过表达组		149.10±1.54 ¹⁾
黄芩素+FAK过表达组	25	112.04±0.03 ²⁾

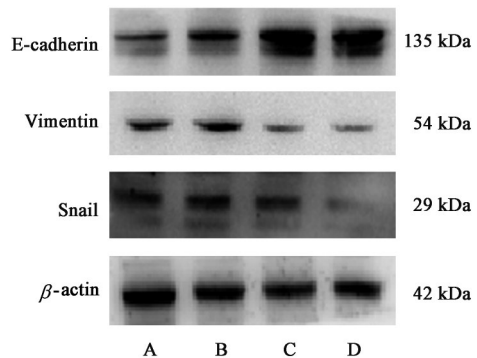


图6 黄芩素作用后胃癌HGC-27细胞EMT相关蛋白表达电泳

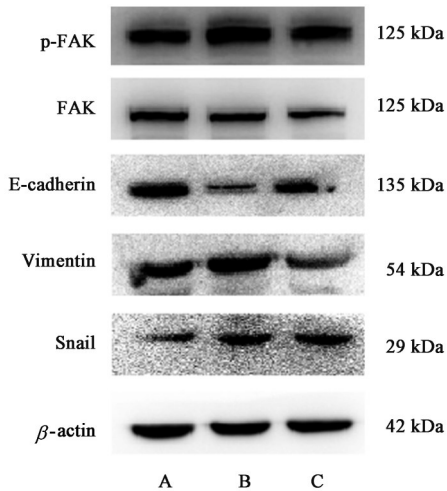
Fig. 6 Electrophoresis of baicalein on expression of EMT-related protein in gastric cancer HGC-27 cells

3.8 黄芩素抑制FAK过表达对PI3K通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,黄芩素组(15、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)抑制胃癌HGC-27细胞p-PI3K和p-Akt蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。见图8和表8。通过慢病毒转染胃癌HGC-27细胞,与空载体组比较,FAK过表达组细胞p-FAK/FAK、p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt明显增加($P<0.05$),而加入黄芩素干预后这一现象会被逆转($P<0.05$)。见图9和表9。

表6 黄芩素对胃癌 HGC-27 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of baicalein on expression of EMT-related protein in gastric cancer HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HGC-27		
		E-cadherin/ β -actin	Vimentin/ β -actin	Snail/ β -actin
空白组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
黄芩素组	5	1.17±0.19	0.74±0.24	0.65±0.10
	15	1.35±0.31 ¹⁾	0.49±0.18 ¹⁾	0.54±0.16 ¹⁾
	25	1.99±0.23 ²⁾	0.24±0.12 ²⁾	0.42±0.19 ²⁾



注:A. 空载体组;B. FAK 过表达组;C. 黄芩素+FAK 过表达组(图9同)

图7 黄芩素抑制 FAK 过表达胃癌细胞 EMT 相关蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of baicalein inhibiting FAK overexpression on EMT-related protein expression in gastric cancer cells

4 讨论

近几年来,我国胃癌的发病率虽然逐步出现下

表7 黄芩素抑制 FAK 过表达胃癌细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Effect of baicalein inhibiting FAK overexpression on EMT-related protein expression in gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-FAK/ β -actin	FAK/ β -actin	p-FAK/FAK	E-cadherin/ β -actin	Vimentin/ β -actin	Snail/ β -actin
空白组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
FAK 过表达组		2.81±0.02 ¹⁾	0.99±0.03	2.83±0.11 ¹⁾	0.10±0.02 ¹⁾	2.75±0.01 ¹⁾	2.85±0.06 ¹⁾
黄芩素+FAK 过表达组	25	1.35±0.04 ²⁾	0.94±0.12	1.43±0.05 ²⁾	0.40±0.10 ²⁾	0.78±0.09 ²⁾	1.71±0.08 ²⁾

表8 黄芩素对 PI3K 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Effect of baicalein on protein expression of PI3K pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-PI3K/ β -actin	PI3K/ β -actin	p-PI3K/PI3K	p-Akt/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/Akt
空白组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
黄芩素组	5	0.87±0.02	0.98±0.01	0.88±0.07	0.87±0.11	1.12±0.04	0.77±0.05
	15	0.61±0.03 ¹⁾	0.95±0.05	0.64±0.06 ¹⁾	0.55±0.01 ¹⁾	1.11±0.12	0.49±0.09 ¹⁾
	25	0.20±0.05 ²⁾	0.89±0.10	0.22±0.38 ²⁾	0.14±0.03 ²⁾	0.91±0.04	0.15±0.01 ²⁾

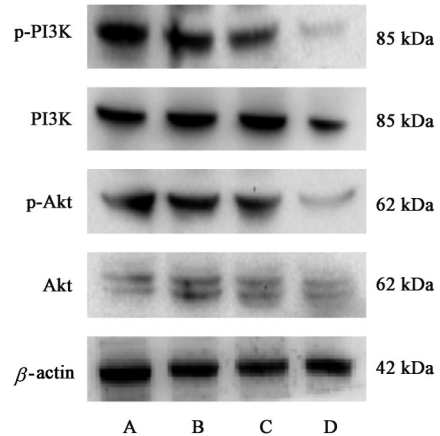


图8 黄芩素对 PI3K 通路蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of baicalein on protein expression of PI3K pathway

降的趋势,但其发病水平依然较高,由于胃癌的早期诊断比较困难,其发生的原因也与细胞的异常分化、增殖、迁移等方面相关^[11-12]。因此进一步探究治疗胃癌可能发生的机制,对改善胃癌患者的生活质量和提高患者的生存率具有极为重要的意义。

黄芩素是一种从唇形科高黄色植物的根部黄芩根中分离的黄酮类化合物,可通过多种途径及多种靶点抑制肿瘤细胞的增殖和迁移。近年来,黄芩素的抗肿瘤活性受到广泛关注,在包括肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中均具有抗肿瘤活性^[13]。其抗肿瘤作用的主要分子机制包括抑制几种周期蛋白或周期蛋白依赖性激酶(CDKs)调节细胞周期,减弱 MAPK、Akt 或 mTOR 活性,通过降低 MMP-2/MMP-9 表达抑制肿瘤侵袭转移^[14-16]等。其对肿瘤发生的影响成为研究热点之一,抗癌作用的靶点机

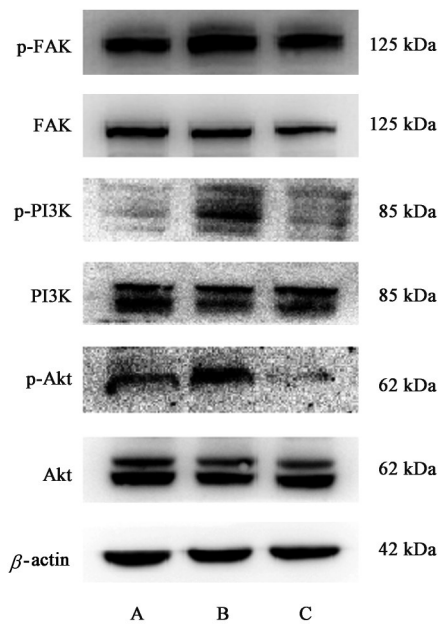


图9 黄芩素抑制FAK过表达对PI3K通路蛋白表达电泳
Fig. 9 Electrophoresis of baicalein inhibits effect of FAK overexpression on PI3K pathway protein expression

表9 黄芩素对FAK过表达PI3K通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 9 Baicalein inhibits effect of FAK overexpression on PI3K pathway protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-FAK /FAK	p-PI3K /PI3K	p-Akt /Akt
空载体组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
FAK过表达组		2.81±0.11 ¹⁾	5.07±0.71 ¹⁾	3.11±0.43 ¹⁾
黄芩素+FAK 过表达组	25	1.24±0.05 ¹⁾	1.72±0.57 ²⁾	0.31±0.10 ²⁾

制和信号通路的研究取得了突破性进展。研究报道称黄芩素可抑制肿瘤炎症的早期发展,通过相关信号通路抑制细胞增殖并诱导肿瘤细胞分化和凋亡的活性等^[17-18]。前期研究表明黄芩素抑制胃癌增殖迁移与诱导肿瘤凋亡及抑制肿瘤EMT相关^[19]。

FAK是一类胞质非受体蛋白酪氨酸激酶,属于蛋白酪氨酸激酶超家族,因而也称为PTK2。FAK是肿瘤微环境中细胞信号传导的多功能调节因子,也是一种过度表达的细胞质蛋白酪氨酸激酶,在肺癌、肝癌等肿瘤组织中过表达^[20-22]。FAK在受到刺激后与FK受体发生结合,继而引发黏着斑结构中靶蛋白的磷酸化,并介导FAK/PI3K及FAK/Ras/MAPK等多种信号传导通路,是细胞内外信号出入的枢纽^[23]。在肿瘤细胞中过表达的FAK可促进细胞的迁移和侵袭、增殖、血管生成和EMT^[24-25]。研究显示,FAK在人舌鳞状细胞癌中高表达,并且在人舌鳞状细胞癌CAL27细胞中FAK基因过表达能

有效增强细胞的增殖、侵袭能力^[26]。

PI3K/Akt信号通路参与了许多重要的细胞过程,并且在多种癌症中过度活跃,促进细胞增殖和转移、抑制细胞凋亡等多种生物学过程,抑制该通路被认为是癌症治疗的新靶点^[27]。研究发现,中草药有效成分佛手柑内酯通过抑制PI3K/Akt信号通路调节人肝癌HepG2和Hep3B细胞增殖及诱导凋亡的机制^[28]。研究表明,一种脂质信号分子可以通过激活FAK/PI3K/Akt信号通路诱导乳腺癌细胞EMT进程^[29]。黄芩素是否可以通过PI3K/Akt信号通路介导FAK表达来调控胃癌细胞尚不清楚。

本研究结果显示,黄芩素可显著抑制胃癌HGC-27细胞的增殖、迁移能力,并可抑制p-FAK蛋白表达。因此,本研究构建FAK过表达细胞,并予以黄芩素干预观察了FAK过表达及黄芩素干预对细胞增殖、迁移及PI3K/Akt信号通路的影响。与空载体组比较,FAK过表达组可促进胃癌细胞的增殖、克隆形成能力及迁移能力,并可增加EMT及PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达,而使用黄芩素干预FAK过表达组则会抑制FAK增加细胞增殖和迁移的能力及EMT和PI3K/Akt信号通路蛋白的磷酸化水平,进而抑制胃癌细胞恶性生物学行为。综上所述,黄芩素可明显抑制胃癌HGC-27细胞的增殖和迁移,FAK基因过表达能有效增强胃癌HGC-27细胞的增殖能力,而黄芩素可介导FAK调控PI3K/Akt信号通路进而影响胃癌细胞的增殖迁移进程。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[2] SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317714626.

[3] LIU J, WANG S, ZHANG Y, et al. Traditional Chinese medicine and cancer: History, present situation, and development[J]. Thorac Cancer, 2015, 6(5): 561-569.

[4] TUAN P A, KIM Y B, KIM J K, et al. Molecular characterization of carotenoid biosynthetic genes and carotenoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Excli J, 2014, 14(8): 146-157.

[5] 刘英香,王丽辉,李晓惠,等. 黄芩素通过抑制YAP入核调控三阴乳腺癌细胞克隆形成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 70-75.

[6] LI J, YAN L J, LUO J H, et al. Baicalein suppresses

- growth of non-small cell lung carcinoma by targeting MAP4K3 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110965.
- [7] PHAN T, NGUYEN V H, SALAZAR M A, et al. Inhibition of autophagy amplifies baicalein-induced apoptosis in human colorectal cancer [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, doi: 10.1016/j.omto.2020.08.016.
- [8] LI P, HU J, SHI B, et al. Baicalein enhanced cisplatin sensitivity of gastric cancer cells by inducing cell apoptosis and autophagy via Akt/mTOR and Nrf2/Keap 1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(3):320-327.
- [9] SUN C, YUAN H, WANG L, et al. FAK promotes osteoblast progenitor cell proliferation and differentiation by enhancing Wnt signaling [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(12): 2227-2238.
- [10] 季婧, 马玉泽, 郝慧芳, 等. 不同亚细胞定位的黏着斑激酶对肿瘤的调控机制[J]. *生命科学*, 2020, 32(1): 1-8.
- [11] 周家琛, 郑荣寿, 庄贵华, 等. 2000-2015年中国肿瘤登记地区胃癌发病趋势及年龄变化[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2020, 34(1): 1-5.
- [12] 李健, 马麒, 任瑾, 等. 胃癌影响因素研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2020, 34(5): 466-470.
- [13] KUO Y T, LIU C H, WONG S H, et al. Small molecules baicalein and cinnamaldehyde are potentiators of measles virus-induced breast cancer oncolysis [J]. *Phytomedicine*, 2021, doi: 10.1016/j.phymed.2021.153611.
- [14] WU J Y, TSAI K W, LI Y Z, et al. Anti-bladder-tumor effect of baicalein from *scutellaria baicalensis georgii* and its application *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/579751.
- [15] GUO Z, HU X, XING Z, et al. Baicalein inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via the caveolin-1/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1/2): 111-119.
- [16] CHANDRASHEKAR N, SELVAMANI A, SUBRAMANIAN R, et al. Baicalein inhibits pulmonary carcinogenesis-associated inflammation and interferes with COX-2, MMP-2 and MMP-9 expressions *in vivo* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1): 10-21.
- [17] MA D H, CHEN S N, WANG H M, et al. Baicalein induces apoptosis of pancreatic cancer cells by regulating the expression of miR-139-3p and miR-196b-5p [J]. *Front Oncol*, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.653061.
- [18] REN M M, ZHAO Y, HE Z Q, et al. Baicalein inhibits inflammatory response and promotes osteogenic activity in periodontal ligament cells challenged with lipopolysaccharides [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1):43.
- [19] 孙沛林, 朴日龙, 王莹, 等. 黄芩素抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(3):417-422.
- [20] 杨长春. 黏着斑激酶信号转导及生物学效应[J]. *医学综述*, 2010, 16(12): 1779-1782.
- [21] ZHOU B, WANG G Z, WEN Z S, et al. Somatic mutations and splicing variants of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(2): 195-204.
- [22] NA S, WANG H, BANK T, et al. FAK and β -catenin cooperate to induce hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2019, 70(5): 1631-1645.
- [23] SCHALLER M D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 7): 1007-1013.
- [24] JEAN C, CHEN X L, NAM J O, et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(2): 247-263.
- [25] ZANG D, ZHANG C, LI C, et al. LPPR4 promotes peritoneal metastasis via Sp1/integrin α /FAK signaling in gastric cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 1026-1044.
- [26] 陈凯, 李张维, 廖晓颖, 等. 过表达 FAK 对人舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞增殖及侵袭的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37(10): 1202-1206.
- [27] HUANG H, PARK S, ZHANG H B, et al. Targeting Akt with costunolide suppresses the growth of colorectal cancer cells and induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 114.
- [28] 赵丽萍, 王超, 田男, 等. 佛手柑内酯通过 PI3K/Akt 信号通路诱导人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 73-78.
- [29] LUO J, YAO J F, DENG X F, et al. 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin α v β 3 and activating FAK/PI3K/Akt signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 23.

[责任编辑 张丰丰]