

## 缓激肽 B1 受体拮抗剂 ELN441958 通过调节 Akt/FoxO3a 信号通路对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

孙杉杉<sup>1</sup>, 陆梅<sup>2</sup>, 高新富<sup>2</sup>, 吕光耀<sup>2</sup>, 赵宝磊<sup>3</sup>, 吕文文<sup>2</sup>

(1. 滨州医学院附属医院肿瘤科, 山东 滨州 256600; 2. 滨州医学院附属医院药学部, 山东 滨州 256600; 3. 滨州医学院附属医院肝胆外科, 山东 滨州 256600)

**[摘要]** **目的:** 探讨缓激肽 B1 受体 (B1R) 拮抗剂 ELN441958 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用及其对蛋白激酶 B (Akt) /叉头框 O 3a (FoxO3a) 信号通路的调控机制, 阐明 B1R 拮抗剂 ELN441958 在肝癌中的抗肿瘤作用。**方法:** HepG2 细胞经不同剂量 (0、2.5、5.0、10.0 和 20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ELN441958 处理 24、48 和 72 h 后, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 作为对照组, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组细胞增殖抑制率。将 HepG2 细胞分为对照组、5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组、10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组, 采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色检测各组 HepG2 细胞的 EdU 阳性细胞率, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率及处于不同细胞周期的细胞比例, 免疫荧光法检测各组 HepG2 细胞中 B1R 蛋白表达水平, Western blotting 法检测各组 HepG2 细胞中 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4)、B1R、Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、FoxO3a 和磷酸化 FoxO3a (p-FoxO3a) 蛋白表达水平。将 HepG2 细胞分为对照组、B1R 激动剂 des-Arg9-BK (1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  des-Arg9-BK) 组和 BK+ELN441958 组, Western blotting 法检测各组 HepG2 细胞中 Bcl-2、Bax、Cyclin D1、CDK4、Akt、p-Akt、FoxO3a 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平。将 HepG2 细胞分为对照组、Akt 激动剂 SC79 组和 SC79+ELN441958 组, Western blotting 法检测各组 HepG2 细胞中 Bcl-2、Bax、Cyclin D1、CDK4、Akt、p-Akt、FoxO3a 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平。**结果:** CCK-8 法, 与对照组比较, 当作用时间相同, HepG2 细胞增殖抑制率随 ELN441958 剂量升高而明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 当 ELN441958 剂量相同时, HepG2 细胞增殖抑制率随作用时间增加而明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。ELN441958 作用 24、48 和 72 h 的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别为 ( $21.4\pm 1.1$ )、( $10.5\pm 0.3$ ) 和 ( $3.2\pm 0.3$ )  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与对照组比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞的 EdU 阳性细胞率明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。流式细胞术, 与对照组比较, 不同剂量 ELN441958 组 HepG2 细胞凋亡率明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),  $G_0/G_1$  期细胞百分率明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。Western blotting 法, 与对照组比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 Bcl-2、CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。免疫荧光法, 与对照组比较, 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R 荧光强度明显降低 ( $P<0.01$ )。Western blotting 法, 与对照组比较, 10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), 5、10 和 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与 B1R 激动剂 des-Arg9-BK 组

[收稿日期] 2025-01-29 [录用日期] 2025-03-24

[基金项目] 山东省科技厅自然科学基金项目 (ZR2021MH173); 山东省卫健委齐鲁卫生与健康杰出青年人才项目 (鲁卫人才字 [2020] 3号)

[作者简介] 孙杉杉 (1998—), 女, 山东省烟台市人, 在读硕士研究生, 主要从事抗肿瘤药物筛选及机制方面的研究。

[通信作者] 吕文文, 副主任药师, 硕士研究生导师 (E-mail: byyxlw@126.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

比较, BK+ELN441958 组 HepG2 细胞中 Bcl-2、CDK4、Cyclin D1、B1R、p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 SC79 组比较, SC79+ELN441958 组 HepG2 细胞中 Bcl-2、CDK4、Cyclin D1、B1R、p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。结论: B1R 拮抗剂 ELN441958 能够抑制 HepG2 细胞增殖, 并诱导 HepG2 细胞凋亡和 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期阻滞, 其作用机制可能与调节 Akt/FoxO3a 信号轴有关。

[关键词] ELN441958; 肝肿瘤; 蛋白激酶 B; 叉头框 O 3a; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R965 [文献标志码] A

## Inhibitory effect of Bradykinin 1 receptor antagonist ELN441958 on proliferation of HepG2 cells by regulating Akt/ FoxO3a signaling pathway

SUN Shanshan<sup>1</sup>, LU Mei<sup>2</sup>, GAO Xinfu<sup>2</sup>, LYU Guangyao<sup>2</sup>, Zhao Baolei<sup>3</sup>, LYU Wenwen<sup>2</sup>

(1. Department of Oncology, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China;

2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China;

3. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the inhibitory effect of the bradykinin B1 receptor (B1R) antagonist ELN441958 on the growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its regulatory mechanism on the protein kinase B (Akt)/forkhead box O3a (FoxO3a) signaling pathway, and to clarify the anti-tumor effect of the B1R antagonist ELN441958 in liver cancer. **Methods:** After the HepG2 cells were treated with different doses (0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of ELN441958 for 24, 48, and 72 h, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 was regarded as control group. CCK-8 method was used to detect the inhibitory rate of proliferation of the cells in various groups. The HepG2 cells were divided into control group, 5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group, 10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group, and 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining was used to detect the EdU positive cell rates of the HepG2 cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups and the proportions of the cells at different cell cycles; immunofluorescence method was used to detect the expression level of B1R protein in the HepG2 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cyclin D1 (Cyclin D1), cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), B1R, Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), FoxO3a, and phosphorylated FoxO3a (p-FoxO3a) proteins in the HepG2 cells in various groups. The HepG2 cells were divided into control group, B1R agonist des-Arg9-BK (1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  des-Arg9-BK) group, and BK+ELN441958 group; Western blotting method was used to detect the expression levels of Bcl-2, Bax, Cyclin D1, CDK4, Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a proteins in the HepG2 cells in various groups. The HepG2 cells were divided into control group, Akt agonist SC79 group, and SC79+ELN441958 group; Western blotting method was used to detect the expression levels of Bcl-2, Bax, Cyclin D1, CDK4, Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a proteins in the HepG2 cells in various groups. **Results:** The CCK-8 assay results showed that compared with control group, when the action time was the same, the inhibitory rate of proliferation of the HepG2 cells was significantly increased with the increase of ELN441958 dose ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); when the dose of ELN441958 was the same, the inhibitory rate of proliferation of the HepG2 cells was significantly increased with the extension of action time ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values of ELN441958 at 24, 48, and 72 h were (21.4 $\pm$ 1.1),

( $10.5 \pm 0.3$ ), and ( $3.2 \pm 0.3$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Compared with control group, the EdU positive cell rates of the HepG2 cells in 5.0, 10.0, and 15.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ELN441958 groups were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The flow cytometry results showed that compared with control group, the apoptotic rates of the HepG2 cells in different doses of ELN441958 groups were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the percentages of the cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Bcl-2, CDK4, and Cyclin D1 proteins in the HepG2 cells in 5.0, 10.0 and 15.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ELN441958 groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression level of Bax protein was significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The immunofluorescence results showed that compared with control group, the fluorescence intensity of B1R in the HepG2 cells in 15.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ELN441958 group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of B1R, p-Akt, and p-FoxO3a proteins in the HepG2 cells in 10.0 and 15.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ELN441958 groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the expressions p-Akt, and p-FoxO3a proteins were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) compared with B1R agonist des-Arg9-BK group, the expression levels of Bcl-2, CDK4, Cyclin D1, B1R, p-Akt, and p-FoxO3a proteins in the HepG2 cells in BK+ELN441958 group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression level of Bax protein was significantly increased ( $P < 0.01$ ); compared with SC79 group, the expression levels of Bcl-2, CDK4, Cyclin D1, B1R, p-Akt, and p-FoxO3a proteins in the HepG2 cells in SC79+ELN441958 group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression level of Bax protein was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The B1R antagonist ELN441958 can inhibit the proliferation of HepG2 cells, and induce the apoptosis and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell cycle arrest of HepG2 cells, and its mechanism may be related to the regulation of Akt/FoxO3a signaling axis.

**KEYWORDS** ELN441958; Liver neoplasms; Protein kinase B; Forkhead box O3a; Apoptosis; Cell cycle

肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 2020年我国癌症数据统计结果显示: 中国癌症发病率中肝癌位居第5位, 而死亡率高居第2位<sup>[1]</sup>。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 占有肝癌病例的90%以上, 其治疗方式主要以手术、免疫治疗放射治疗和化学治疗为主<sup>[2]</sup>。肝癌患者常在晚期被确诊, 有效治疗药物较为匮乏, 预后较差。因此, 寻找较低全身毒性和较少不良反应的抗癌药物以期获得更好的预后成为目前肝癌治疗的研究热点。异吲哚酮是生物碱、药物和天然产物中常见的分子骨架。异吲哚酮结构类化合物具有显著的生物活性, 如抗炎、抗菌和抗病毒活性<sup>[3]</sup>, 防治心血管疾病<sup>[4-5]</sup>, 抗肿瘤活性<sup>[6-7]</sup>及神经保护活性<sup>[8]</sup>等。异吲哚酮化合物 ELN441958 是一种缓激肽 B1 受体(bradykinin B1 receptor, B1R)拮抗剂<sup>[9]</sup>, B1R拮抗剂具有抗炎<sup>[10]</sup>和镇痛<sup>[11]</sup>作用, 且对子宫内膜异位症也起到一定的治疗作用<sup>[12]</sup>。目前 B1R拮抗剂已被证实在多种肿瘤<sup>[13-14]</sup>中具有治疗作用, 其作用机制可能与磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B

(protein kinase B, Akt) 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) 信号通路等有关<sup>[15]</sup>。但 B1R拮抗剂 ELN441958 在肝癌中的作用鲜有报道, 为了明确其体外抗肝癌活性及相关机制, 本研究通过探讨 B1R拮抗剂 ELN441958 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用及其对 Akt/叉头框 O 3a (forkhead box O3a, FoxO3a) 信号通路的调控机制, 阐明 B1R拮抗剂 ELN441958 在肝癌中的抗肿瘤作用, 为该化合物在肝癌治疗方面的应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人 HCC 细胞系(HepG2 细胞) 购自武汉 Procell 生物科技有限公司。纯度大于 98% 的索拉非尼(Sorafenib) 购自上海 Yuanye 生物技术有限公司, 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)、ELN441958、B1R 激动剂 des-Arg9-Bradykinin 和 Akt 激动剂 SC79 购自美国 MCE 生物公司, Annexin V/PI 试剂盒购自南京 Vazyme 生物技术有限公司, 细胞周期检测试剂盒购自江苏 KeyGEN BioTECH 有限公司。B 细

胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (Cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、FoxO3a、磷酸化 FoxO3a (phosphorylated FoxO3a, p-FoxO3a) 和过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, Akt 和磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 一抗购自美国 Abcam 技术公司, GAPDH 抗体购自沈阳万类生物科技有限公司。酶标仪 (型号 357-906872, 美国 Thermo Multiskan FC), 倒置荧光显微镜 (型号: IX51, 日本 Olympus 公司), 凝胶成像仪 (型号: ChemiDocXRS+, 美国 Bio-Rad 公司)。

**1.2 细胞培养** 将 HepG2 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM 培养基 (以下简称 DMEM 完全培养基) 中, 于培养箱 (37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养条件) 中培养, 每 2~3 d 换液 1 次, 待细胞生长至对数生长期时进行实验。

### 1.3 CCK-8 法检测各组 HepG2 细胞增殖抑制率

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以  $2 \times 10^3$  个细胞的密度均匀接种于 96 孔细胞培养板中, 置于培养箱中培养 24 h 后, 向各组分别加入 0、2.5、5.0、10.0 和 20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958, 每组设 3 个复孔, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组作为对照组。作用 24、48 和 72 h 后, 吸除细胞培养液, 向每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  10% 的 CCK-8 溶液, 置于培养箱 (37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养条件) 中继续孵育 2 h, 观察到颜色变化后使用酶标仪在波长 450 nm 处测量吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率 =  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。利用 GraphPad Prism 9 软件计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

**1.4 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色检测各组 HepG2 细胞的 EdU 阳性细胞率** 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔  $3 \times 10^3$  个细胞的密度均匀接种于 96 孔细胞培养板中, 分为 0、5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组为对照组, 干预 48 h 后进行实验。配置工作液, 37 °C 预热后均匀地加入上述 96 孔细胞培养板中, 置于培养箱中继续孵育 2 h 进行 EdU 标记。标记完成后, 去除培养液, 每孔加入 1 mL 固定液室温固定 15 min。

固定完成后, 洗涤液洗涤 3 次, 每孔加入 1 mL 通透液室温孵育 15 min。去除通透液, 洗涤液洗涤 2 次。最后配制反应液加入 96 孔细胞培养板中, 室温避光孵育 30 min。孵育结束后吸除反应液, 洗涤液洗涤 3 次。使用 Hoechst33342 进行细胞核染色, 室温避光孵育 10 min。孵育完成后用洗涤液洗涤 3 次, 即可进行荧光检测。采用 Image J 软件定量分析各组 HepG2 细胞的 EdU 阳性细胞数和总细胞数, 计算 EdU 阳性细胞率。EdU 阳性细胞率 = EdU 阳性细胞数 / 总细胞数  $\times 100\%$ 。

### 1.5 Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞术检测各组 HepG2 细胞凋亡率

细胞分组见“1.4”。将处于对数生长期的 HepG2 细胞均匀地接种于 6 孔细胞培养板中, 置于培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 按照分组方法进行给药处理 48 h。收集细胞, 使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬细胞进行计数。取含  $5 \times 10^4$  个细胞的细胞悬液离心, 去除上清液后, 使用 195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 5  $\mu\text{L}$  的 Annexin V-FITC 和相应体积的 PI 染料, 室温避光孵育, 10 min 后将其置于冰浴中, 上机检测, 使用流式细胞术分析细胞凋亡情况。细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率。

### 1.6 流式细胞术检测各组 HepG2 细胞周期分布

细胞分组见“1.4”。将处于对数生长期的 HepG2 细胞均匀地接种于 6 孔细胞培养板中, 置于培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 按照分组方法进行给药处理 48 h。收集各组细胞, PBS 缓冲液洗涤后, 使用 70% 乙醇重悬, 置于 4 °C 固定过夜。固定完成后进行离心并用 PBS 缓冲液再次洗涤。洗涤完成后加入含 RNaseA 的 PI 溶液, 37 °C 避光孵育 30 min 后即可上机检测。用流式细胞仪分析染色细胞, 使用 Modfit 5.0 软件分析细胞周期分布。

**1.7 免疫荧光法检测各组 HepG2 细胞中 BIR 蛋白表达水平** 将处于对数生长期的 HepG2 细胞均匀地接种于 6 孔细胞培养板中, 置于培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 分为 0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组为对照组, 干预 48 h 后使用多聚甲醛固定细胞, 固定后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。使用 10% 的山羊血清在 37 °C 下封闭细胞 30 min。加入特异性一抗, 在 4 °C 下孵育过夜。采用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加入荧光标记的二抗, 在 37 °C 下孵育 1 h, 使用 4', 6-二脒

基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核进行染色,避光保存10 min。PBS缓冲液洗涤3次,在载玻片上滴加抗荧光淬灭剂,将爬片覆盖在含抗荧光淬灭剂的封片剂上。将准备好的载玻片放在激光共聚焦显微镜下检测,分析实验结果。

**1.8 Western blotting法检测各组HepG2细胞中相关蛋白表达水平** 细胞分组见“1.4”。将处于对数生长期的HepG2细胞均匀地接种于6孔细胞培养板中,置于培养箱中培养,待细胞贴壁后,按照分组方法给予药物处理48 h。用PBS缓冲液洗涤3次后,收集细胞沉淀。将蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和放射免疫沉淀分析(radio immunoprecipitation assay, RIPA)缓冲液以1:1:100的比例混匀配置蛋白裂解液。向每组细胞沉淀分别加入150  $\mu\text{L}$ 上述裂解液,冰上裂解30 min后离心收集上清液。向收集的上清液中加入1/4体积的5 $\times$ Loading Buffer,涡旋充分混匀并于95  $^{\circ}\text{C}$ 金属浴煮10 min,进行蛋白变性处理。总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,转移至聚二偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用5%脱脂牛奶封闭2 h后,于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗(Bcl-2、Bax、Cyclin D1、CDK4、p-Akt、FoxO3a和p-FoxO3a的稀释比例均为1:1 000, Akt和GAPDH的稀释比例为1:10 000)。16~18 h后回收一抗并使用1 $\times$ 含吐温的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)洗膜6次,每次5 min。室温孵育二抗(稀释比例为1:1 000),1 h后再次洗膜6次,每次5 min,配置显影液后,即可上机显影,观察免疫反应条带。使用Image J软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋

白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。同时将HepG2细胞分为对照组、B1R激动剂des-Arg9-BK组和BK+ELN441958组,其中对照组采用不加药物的空白培养基,B1R激动剂des-Arg9-BK组加入1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BK, BK+ELN441958组加入1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BK和15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958,采用Western blotting法检测各组HepG2细胞中相关蛋白表达水平。将HepG2细胞分为对照组、SC79组和SC79+ELN441958组,对照组采用不加药物的空白培养基,SC79组加入10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SC79, SC79+ELN441958组加入10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SC79和15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958,采用Western blotting法检测各组HepG2细胞中相关蛋白表达水平。

**1.9 统计学分析** 采用Graphpad Prism 9软件进行统计学分析。各组细胞增殖抑制率、EdU阳性细胞率、细胞凋亡率以及HepG2细胞中Bcl-2、Bax、Cyclin D1、CDK4、Akt、p-Akt、FoxO3a和p-FoxO3a蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 $t$ 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组HepG2细胞增殖抑制率、 $\text{IC}_{50}$ 和EdU阳性细胞率** CCK-8法检测结果显示:与对照组比较,5.0、10.0和20.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958组处理HepG2细胞24、48和72 h时细胞增殖抑制率明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表1。不同剂量ELN441958作用于HepG2细胞24、48和72 h的 $\text{IC}_{50}$ 分别为(21.4 $\pm$ 1.1)、(10.5 $\pm$ 0.3)和(3.2 $\pm$ 0.3)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表1 各组HepG2细胞增殖抑制率

Tab.1 Inhibitory rates of proliferation of cells in various groups

Group	Inhibitory rate of proliferation			
	(t/h)	24	48	72
Control		0	0	0
ELN441958( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
2.5		9.13 $\pm$ 0.79	10.38 $\pm$ 3.46	46.36 $\pm$ 3.67
5.0		15.25 $\pm$ 3.76*	23.10 $\pm$ 0.87 $\Delta$	55.62 $\pm$ 4.65 $\Delta\Delta$
10.0		26.26 $\pm$ 1.34**	44.83 $\pm$ 2.04** $\Delta\Delta$	78.36 $\pm$ 0.94** $\Delta\Delta$
20.0		51.33 $\pm$ 1.07**	80.60 $\pm$ 0.86** $\Delta\Delta$	91.82 $\pm$ 0.47** $\Delta\Delta$

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs 24 h group.

EdU 染色检测结果显示: 与对照组 (31.78%±1.67%) 比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组处理 48 h 后 EdU 阳性细胞率 (21.86%±0.78%、17.67%±0.67% 和 6.98%±1.07%) 明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且随着药物剂量升高, 降低越明显。见图 1。

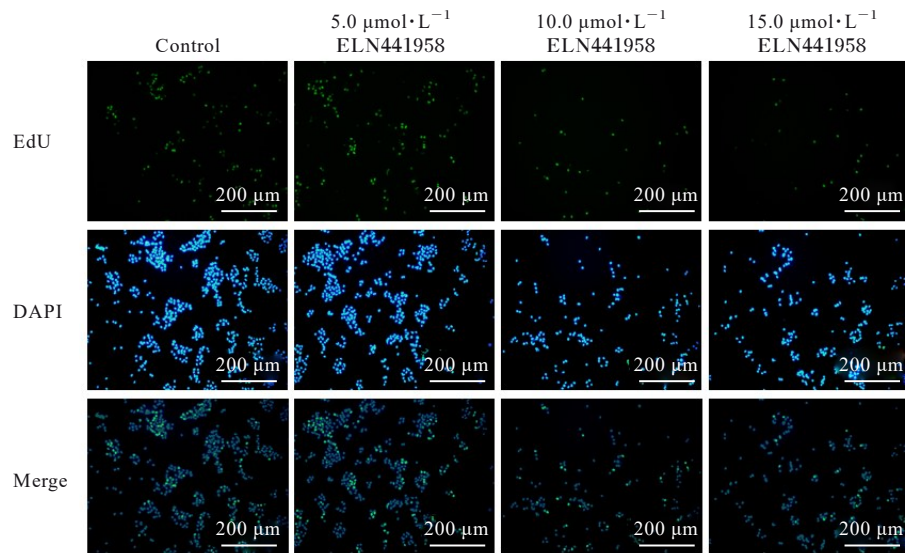


图1 EdU 染色检测各组 HepG2 细胞 EdU 阳性细胞

Fig. 1 EdU positive HepG2 cells detected by EdU staining in various groups

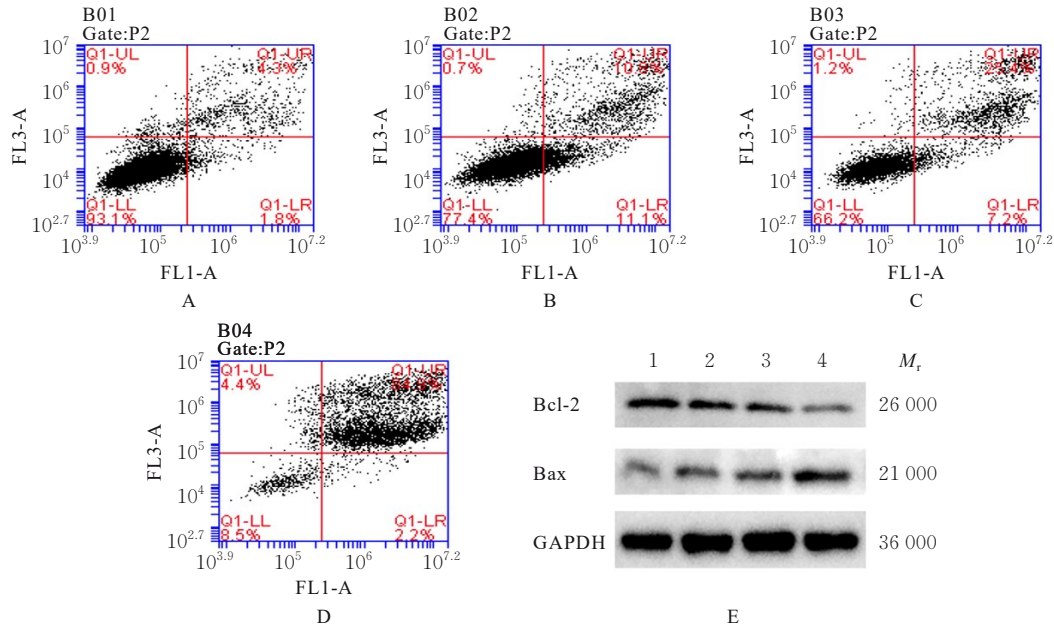
**2.2 各组 HepG2 细胞凋亡率以及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平** Annexin V-PI 染色法检测结果显示: 与对照组 (6.10%±0.87%) 比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组细胞凋亡率 (21.90%±1.06%、32.60%±1.54% 和 87.10%±0.97%) 增加了 3.6~14.2 倍 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ) (图 2A~2D), 且比例随药物剂量的增加而明显升高。Western blotting 法检测结果显示: 与对照组 (Bax: 1.00±0.04; Bcl-2: 1.00±0.06) 比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组处理 48 h 后, HepG2 细胞中 Bax (1.16±0.26、1.27±1.26 和 1.48±0.82) 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 而 Bcl-2 (0.71±0.04、0.42±0.06 和 0.18±0.03) 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且呈剂量依赖性。见图 2E。

**2.3 各组 HepG2 细胞周期分布以及 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平** 与对照组 (50.76%±0.87%) 比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组  $G_0/G_1$  期细胞比例 (60.32%±1.31%、63.95%±0.07% 和 74.97%±0.29%) 明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且呈剂量依赖性。Western blotting 法检测结果显示: 与对照组 (Cyclin D1: 1.00±0.03; CDK4: 1.00±0.05)

比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 处理 48 h 后 HepG2 细胞中 Cyclin D1 (0.86±0.04、0.61±0.12 和 0.52±0.07) 和 CDK4 (0.82±0.12、0.61±0.05 和 0.53±0.06) 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见图 3。

**2.4 各组 HepG2 细胞中 B1R 的蛋白表达水平** 与对照组 (1.00±0.05) 比较, 5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R 蛋白表达水平 (0.87±0.09) 降低, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R 蛋白表达水平 (0.69±0.04 和 0.46±0.08) 明显降低 ( $P<0.01$ )。见图 4A。免疫荧光法检测结果显示: 与对照组 (1.00±0.05) 比较, 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R 荧光强度 (0.73±0.02) 明显降低 ( $P<0.01$ )。见图 4B。

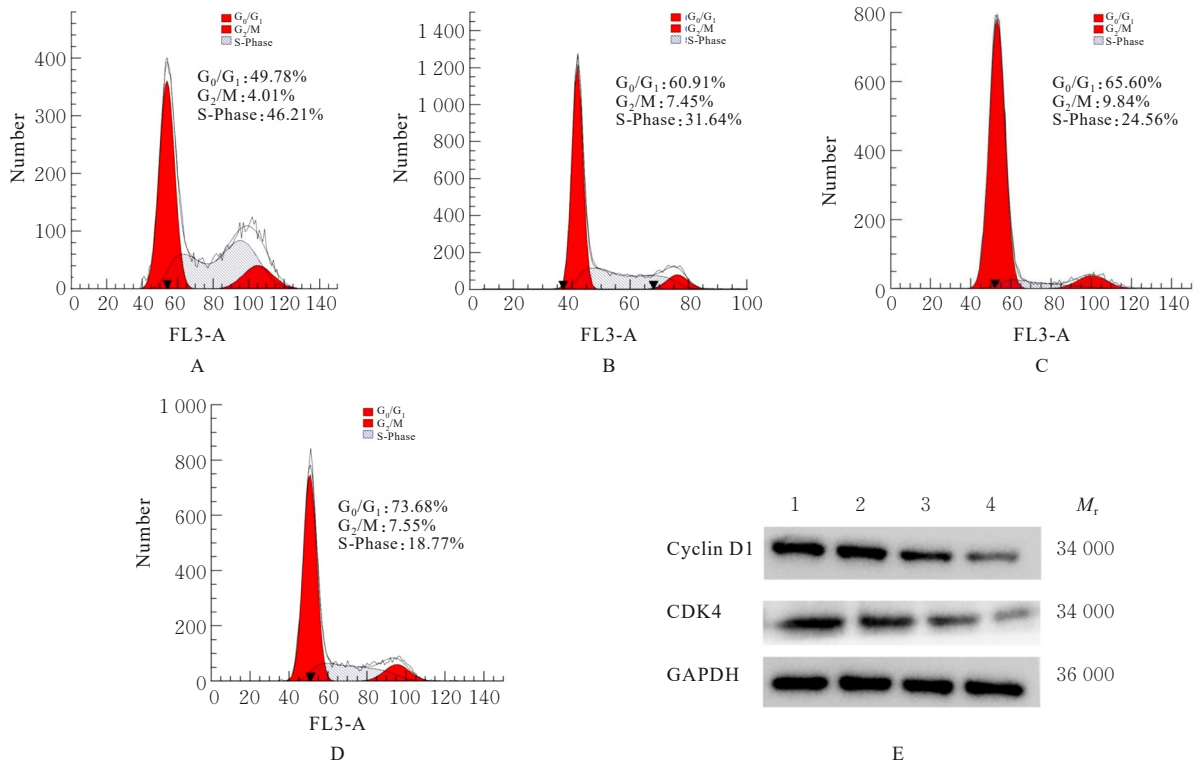
**2.5 各组 HepG2 细胞中 Akt、p-Akt、FoxO3a 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平** 与对照组比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细胞中 Akt 和 FoxO3a 蛋白表达水平无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与对照组 (p-AKT: 1.00±0.03, p-FoxO3a: 1.00±0.02) 比较, 5.0、10.0 和 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 组 HepG2 细



A: Control group; B-D: 5.0, 10.0, and 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 groups. Lane 1: Control group; Lane 2-4: 5.0, 10.0, and 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 groups.

图2 各组 HepG2 细胞凋亡情况(A~D)及各组 HepG2 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达电泳图(E)

Fig. 2 Apoptosis of HepG2 cells in various groups (A-D) and electrophoregram (E) of expressions of Bax and Bcl-2 proteins in HepG2 cells in various groups

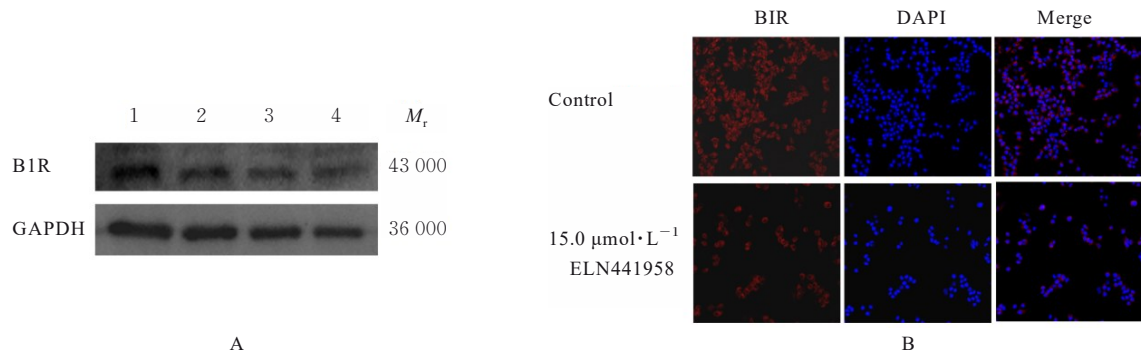


A: Control group; B-D: 5.0, 10.0, and 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 groups. Lane 1: Control group; Lane 2-4: 5.0, 10.0, and 15.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 groups.

图3 各组 HepG2 细胞周期变化(A~D)及各组 HepG2 细胞中 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达电泳图(E)

Fig. 3 Changes in cell cycles in HepG2 cells in various groups (A-D) and electrophoregram (E) of expressions of Cyclin D1 and CDK4 proteins in HepG2 cells in various groups

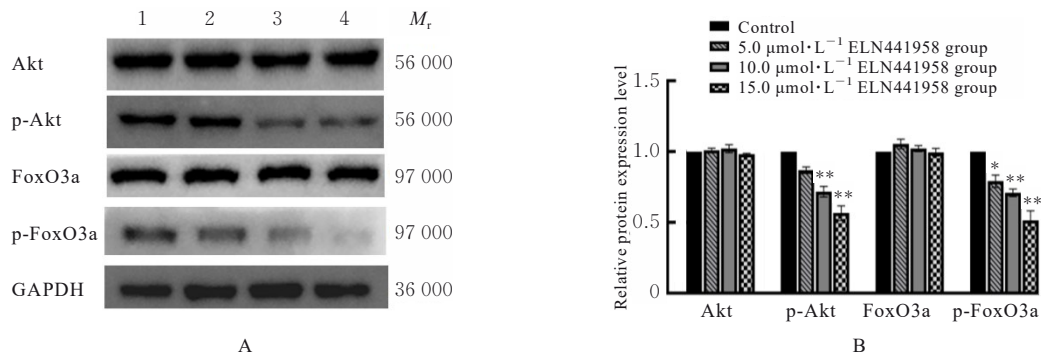
胞中 p-Akt ( $0.86 \pm 0.06$ 、 $0.72 \pm 0.08$  和  $0.58 \pm 0.06$ ) 和 p-FoxO3a ( $0.76 \pm 0.08$ 、 $0.68 \pm 0.04$  和  $0.46 \pm 0.09$ ) 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 5。



Lane 1: Control group; Lane 2:  $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group; Lane 3:  $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group; Lane 4:  $15.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 group.

图 4 各组 HepG2 细胞中 B1R 蛋白表达电泳图(A)和 HepG2 细胞中 B1R 免疫荧光图(B)

Fig. 4 Electrophoregram of expressions of B1R protein in HepG2 cells in various groups (A) and immunofluorescence images of B1R in HepG2 cells(B)



Lane 1: Control group; Lane 2-4:  $5.0$ ,  $10.0$ , and  $15.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ELN441958 groups. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图 5 各组 HepG2 细胞中 Akt、p-Akt、FoxO3a 和 p-FoxO3a 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Akt, p-Akt, FoxO3a and p-FoxO3a proteins in HepG2 cells in various groups

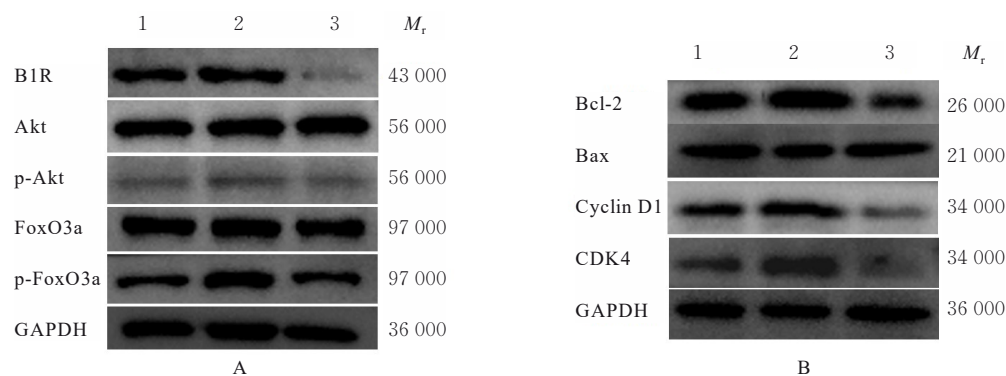
**2.6 B1R 激动剂 BK 处理后 HepG2 细胞中相关蛋白表达水平** 与 B1R 激动剂 des-Arg9-BK 组 (B1R:  $1.56 \pm 0.17$ , p-Akt:  $1.43 \pm 0.08$ , p-FoxO3a:  $1.49 \pm 0.21$ ) 比较, BK+ELN441958 组 HepG2 细胞中 B1R ( $0.63 \pm 0.08$ )、p-Akt ( $0.72 \pm 0.06$ ) 和 p-FoxO3a ( $0.65 \pm 0.07$ ) 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 B1R 激动剂 des-Arg9-BK 组 (Bcl-2:  $1.76 \pm 0.13$ , Cyclin D1:  $1.61 \pm 0.09$ , CDK4:  $1.58 \pm 0.11$ ) 比较, BK+ELN441958 组 HepG2 细胞中 Bcl-2 ( $0.68 \pm 0.06$ )、Cyclin D1 ( $0.56 \pm 0.08$ ) 和 CDK4 ( $0.57 \pm 0.06$ ) 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 B1R 激动剂 des-Arg9-BK 组 (Bax:  $0.77 \pm 0.07$ ) 比较, BK+ELN441958 组 HepG2 细胞中

Bax 蛋白表达水平 ( $1.53 \pm 0.06$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图 6。

**2.7 Akt 激动剂 SC79 处理后 HepG2 细胞相关蛋白表达水平** 与 SC79 组 (p-Akt:  $1.27 \pm 0.18$ , p-FoxO3a:  $1.31 \pm 0.03$ ) 比较, SC79+ELN441958 组 HepG2 细胞中 p-Akt ( $0.75 \pm 0.11$ ) 和 p-FoxO3a ( $0.81 \pm 0.07$ ) 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )；与 SC79 组 (Bcl-2:  $1.34 \pm 0.07$ , Cyclin D1:  $1.17 \pm 0.06$ , CDK4:  $1.23 \pm 0.09$ ) 比较, SC79+ELN441958 组 Bcl-2 ( $0.58 \pm 0.13$ )、Cyclin D1 ( $0.79 \pm 0.04$ ) 和 CDK4 ( $0.82 \pm 0.06$ ) 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )；与 SC79 组 (Bax:  $0.68 \pm 0.07$ ) 比较, SC79+ELN441958 组 HepG2 细胞中

Bax 蛋白表达水平 ( $1.18 \pm 0.09$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。与 SC79 组 (BIR:  $1.16 \pm 0.17$ ) 比较, SC79+ELN441958 组 HepG2 细胞中 BIR 蛋白表达

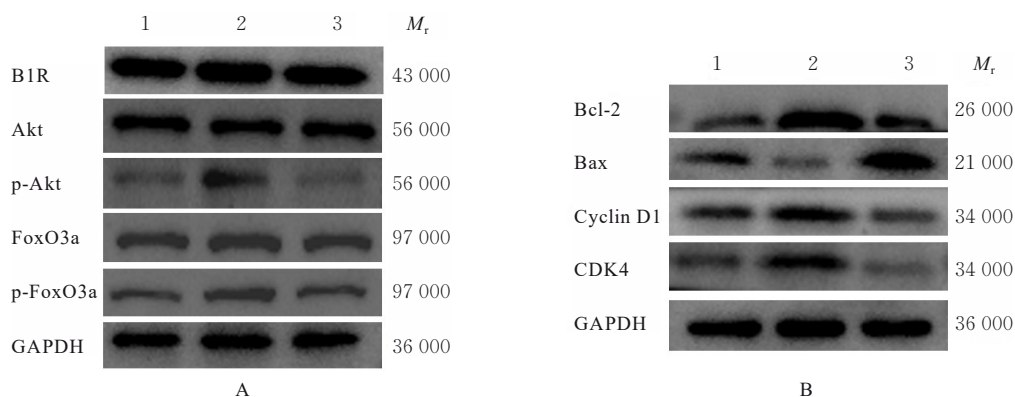
水平 ( $0.98 \pm 0.09$ ) 无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 7。



A: B1R, Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a; B: Bcl-2, Bax, Cyclin D1, and CDK4. Lane 1: Control group; Lane 2: Des-Arg9-BK group; Lane 3: BK+ELN441958 group.

图6 Western blotting法检测缓激肽B1受体激动剂BK处理后HepG2细胞中相关蛋白表达电泳图

Fig. 6 Electropherograms of related protein expressions in HepG2 cells after treated with bradykinin B1 receptor agonist BK detected by Western blotting method



A: B1R, Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a; B: Bcl-2, Bax, Cyclin D1, and CDK4. Lane 1: Control group; Lane 2: SC79 group; Lane 3: SC79+ELN441958 group.

图7 Western blotting实验检测各组HepG2细胞中Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a、Bcl2、Bax、Cyclin D1和CDK4蛋白表达电泳图

Fig. 7 Electropherograms of expressions of AKT, p-AKT, FoxO3a, p-FoxO3a, Bcl2, Bax, Cyclin D1, and CDK4 in HepG2 cells in various groups detected by Western blotting method

### 3 讨论

B1Rs作为调控激肽系统的重要受体蛋白<sup>[16-17]</sup>, 主要用于炎症和疼痛等相关疾病治疗靶点研究<sup>[18]</sup>。近年来, 多项研究<sup>[19]</sup>表明: B1R在多种肿瘤中高表达, 并可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。在炎症、细胞因子刺激或组织损伤, 尤其是癌症发生时, B1R蛋白表达水平会升高<sup>[20]</sup>。因此, B1R作为潜在的抗肿瘤靶点受到越来越多的关注。异吡啶酮类化合物ELN441958是一种新型的小分子B1Rs

拮抗剂, 在恒河猴炎性疼痛中具有较高的口服生物利用度和强大的全身疗效<sup>[9]</sup>。然而, B1R拮抗剂ELN441958在HCC中的抗肿瘤活性及其潜在机制尚未明确。

本研究结果显示: ELN441958能显著抑制HepG2细胞的增殖。细胞凋亡的激活是有效抗癌治疗的关键机制之一, 本研究进一步发现ELN441958可显著增加HepG2细胞的凋亡比例, 凋亡相关Western blotting法分析进一步支持了上述

发现, 与对照组比较, 随着药物剂量的增加, ELN441958 处理组中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 蛋白表达水平升高, 以上结果均表明 ELN441958 可能通过诱导细胞凋亡而抑制肝癌 HepG2 细胞增殖。细胞周期的异常调控是癌细胞不受控制增殖的重要原因, 本研究通过流式细胞术和 Western blotting 法检测发现: ELN441958 可能通过降低 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达, 导致 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期阻滞而抑制 HepG2 细胞的增殖。

ELN441958 作为一种已知的 B1R 拮抗剂, 通过降低激动剂配体亲和力, 发挥其对 B1R 的拮抗作用<sup>[9]</sup>。NICOLETTI 等<sup>[21]</sup> 研究显示: B1R 拮抗剂 SSR240612 在人胶质母细胞瘤中通过下调 B1 受体的表达, 发挥抑制增殖和促凋亡活性。参考 SSR240612 的抗肿瘤作用机制, 本研究采用 Western blotting 法检测 ELN441958 是否对肝癌 HepG2 细胞内 B1R 信号轴产生影响, 结果显示: ELN441958 处理 HepG2 细胞后, B1R 蛋白表达水平显著降低, 免疫荧光法检测结果也证实 ELN441958 能够降低 HepG2 细胞 B1R 荧光强度。PI3K/Akt 信号通路在调控肿瘤细胞增殖、凋亡和细胞周期等恶性生物学行为中发挥关键作用<sup>[22-23]</sup>, 并且作为 B1R 信号轴中一条重要的下游通路<sup>[15]</sup>。本研究结果显示: ELN441958 能够显著抑制 Akt 磷酸化表达水平, 提示 ELN441958 可能通过调控 B1R/Akt 信号轴抑制来 HepG2 细胞生长。

PI3K/Akt 途径能够介导激活 FoxO3a 磷酸化<sup>[24]</sup>, FoxO3a 是肝细胞表达的中心因子, FoxO3a 的高表达与 HCC 的预后不良相关, 是 HCC 监测的新型诊断和预后生物标志物<sup>[25]</sup>。本研究结果表明: ELN441958 对 HepG2 细胞 FoxO3a 磷酸化表达有影响, 提示 ELN441958 可能影响了 HepG2 细胞中 B1R/Akt/FoxO3a 信号通路中的关键蛋白活性。

为了进一步验证 ELN441958 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡以及 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期阻滞的机制, 本研究使用 B1R 激动剂 des-Arg9-BK 处理, 结果显示: ELN441958 能够逆转 des-Arg9-BK 引起的细胞周期、细胞凋亡和 Akt/FoxO3a 信号通路相关蛋白的表达变化, 同时, 进一步使用 Akt 激动剂 SC79 进行验证, 发现 ELN441958 逆转了 SC79 引起信号周期、细胞凋亡和 Akt/FoxO3a 信号通路相关蛋白的表达。上述结果均提示, 在 B1R 拮抗剂 ELN441958

诱导 HepG2 细胞凋亡和阻滞细胞周期的过程中, Akt/FoxO3a 细胞通路起到关键作用。

尽管本研究揭示了 ELN441958 在 HepG2 细胞中具有抗肿瘤作用, 但仍存在一定局限, 如尚未在动物模型中进行验证。未来的研究将在动物模型中评估 ELN441958 的抗肿瘤效果, 并探索其与 Sorafenib 或 PD-1 抑制剂等标准疗法的联合应用, 以优化治疗策略, 为后续临床转化提供更充分的实验依据。

综上所述, B1R 拮抗剂 ELN441958 具有抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的作用, 其机制可能是通过抑制 B1R、下调 Akt/FoxO3a 信号通路蛋白表达, 进而诱导肝癌细胞凋亡和 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞周期阻滞来实现的。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

孙杉杉参与实验设计、实验操作和论文撰写, 陆梅和高新富参与实验设计及操作, 吕光耀参与实验操作和数据整理及分析, 赵宝磊参与实验方案审核和论文审阅, 吕文文参与实验设计和论文审阅。

#### [参考文献]

- [1] MCGLYNN K A, PETRICK J L, EL-SERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 73(Suppl 1): 4-13.
- [2] 黄 勇, 黄声稀, 刘秀峰. 肝细胞癌系统治疗进展与展望[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(8): 1491-1496.
- [3] YETISkin E, GÜNDOĞDU Ö, METE D, et al. Synthesis, cytotoxicity, and antibacterial studies of 2, 4, 5, 6-substituted hexahydro-1H-isoindole-1, 3 (2H) -dione[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 102(6): 1448-1457.
- [4] WANG Y N, CHEN H, SHENG R L, et al. Synthesis and bioactivities of marine pyran-isoindolone derivatives as potential antithrombotic agents [J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(4): 218.
- [5] GAO C L, TANG S M, ZHANG H X, et al. A novel marine pyran-isoindolone compound enhances fibrin lysis mediated by single-chain urokinase-type plasminogen activator [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(8): 495.
- [6] KRZYŻAK E, MARCINIAK A, SZKATUŁA D, et al. A series of novel 1-H-isoindole-1, 3 (2H) -dione derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: in silico, synthesis and

- in vitro studies[J]. *Molecules*, 2024, 29(15): 3528.
- [7] SPANÒ V, BARRECA M, ROCCA R, et al. Insight on [1, 3] thiazolo [4, 5-e] isoindoles as tubulin polymerization inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 212: 113122.
- [8] TAGHIZAD S, BEHBAHANINIA K, JAHROMY M H, et al. Pyrrolopyridine and isoindole as potential anticonvulsant agents: design, synthesis, and pharmacological evaluation [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2022, 18(3): 159-167.
- [9] HAWKINSON J E, SZOKE B G, GAROFALO A W, et al. Pharmacological, pharmacokinetic, and primate analgesic efficacy profile of the novel bradykinin B1 Receptor antagonist ELN441958 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(2): 619-630.
- [10] TSOU P S, LU C Y, GURREA-RUBIO M, et al. Soluble CD13 induces inflammatory arthritis by activating the bradykinin receptor B1 [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(11): e151827.
- [11] ALIFORENKO A E, MOTOV V S, BYKOV V V, et al. Analgesic and psychotropic effects of a new bradykinin antagonist [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2024, 176(5): 581-584.
- [12] DE CARVALHO FRANÇA P R, DE PAIVA J P B, DE CARVALHO R R, et al. R-954, a bradykinin B1 receptor antagonist, as a potential therapy in a preclinical endometriosis model [J]. *Peptides*, 2024, 181: 171294.
- [13] SHEN C K, HUANG BR, CHAROENSAENSUK V, et al. Bradykinin B1 receptor affects tumor-associated macrophage activity and glioblastoma progression [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(8): 1533.
- [14] WANG Y O, ZHANG B X, HUANG Y B, et al. Novel bradykinin receptor inhibitors inhibit proliferation and promote the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the ERK pathway [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3915.
- [15] NICOLETTI N F, ERIG T C, ZANIN R F, et al. Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways [J]. *J Neurooncol*, 2014, 120(2): 235-244.
- [16] LURJE I, CZIGANY Z, BEDNARSCH J, et al. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma -a multidisciplinary approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1465.
- [17] 张书力, 冯丹. 槲皮素通过下调缓激肽受体B1表达减轻糖尿病大鼠神经病理性疼痛 [J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(2): 337-342.
- [18] XIE H Y, LU F, LIU W L, et al. Remimazolam alleviates neuropathic pain via regulating bradykinin receptor B1 and autophagy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(12): 1643-1651.
- [19] WANG W, ZHOU Y, WEI R, et al. Bradykinin promotes proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells through STAT3 signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2521-2527.
- [20] DEEPAK K, ROY P K, KOLA P, et al. An overview of kinin mediated events in cancer progression and therapeutic applications [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(6): 188807.
- [21] NICOLETTI N F, SÉNÉCAL J, SILVA V D D A, et al. Primary role for kinin B(1) and B(2) receptors in glioma proliferation [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 7869-7882.
- [22] KUMAR S, AGNIHOTRI N. Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1462-1477.
- [23] MUÑOZ J P, CARRILLO-BELTRÁN D, AAEDO-AGUILERA V, et al. Tobacco exposure enhances human papillomavirus 16 oncogene expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun signaling pathway in cervical cancer cells [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3022.
- [24] ZHANG H, XIA P, LIU J, et al. ATIC inhibits autophagy in hepatocellular cancer through the Akt/FOXO3 pathway and serves as a prognostic signature for modeling patient survival [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(15): 4442-4458.
- [25] LU M, HARTMANN D, BRAREN R, et al. Oncogenic Akt-FOXO3 loop favors tumor-promoting modes and enhances oxidative damage-associated hepatocellular carcinogenesis [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 887.