

灯盏花素通过PI3K/AKT轴抑制胃腺癌细胞增殖与侵袭

董鑫然, 曾琴, 张丽荣, 段鸿飞, 白兰
(赣南医科大学创新与转化医学研究院, 江西 赣州 341000)

摘要:目的: 评估源自中药灯盏细辛的主要活性成分灯盏花素(Breviscapine)对AGS胃腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用, 并阐明其潜在分子机制。方法: 以不同浓度(0~50 $\mu\text{mol/L}$)的灯盏花素处理AGS细胞, 通过CCK-8、平板克隆形成实验及EdU染色评价细胞增殖, 利用划痕实验和Transwell实验分析细胞迁移与侵袭能力。流式细胞术用于检测细胞周期分布和凋亡水平, Western blot用于检测增殖相关蛋白(PCNA、Cyclin D1、MYC)、上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物(E-CAD、N-CAD、MMP2)及PI3K/AKT通路关键分子的表达变化。结果: CCK-8实验显示, 20~50 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理AGS细胞24 h、48 h后, 细胞活力降低($P<0.01$), 且各浓度灯盏花素对正常胃黏膜GES-1细胞活性无明显影响; 平板克隆形成实验与EdU染色结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理后, AGS细胞集落形成数减少、DNA合成期增殖细胞占比降低($P<0.05$); 划痕实验与Transwell实验结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素可降低AGS细胞的划痕愈合率、迁移及侵袭细胞数($P<0.01$), 且抑制作用随浓度升高而增强。流式细胞术检测发现, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理后, AGS细胞G1期比例升高、S期比例降低($P<0.01$), 30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理组细胞凋亡率达14.3%, 高于对照组的1.93%($P<0.01$)。Western blot检测结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素可下调AGS细胞中PCNA、Cyclin D1、MYC等增殖相关蛋白表达($P<0.05$), 上调上皮表型标志物E-CAD表达, 同时下调间质表型标志物N-CAD及侵袭相关蛋白MMP2表达($P<0.01$); 并能上调促凋亡蛋白BAX、C-Caspase-3表达, 下调抗凋亡蛋白Bcl-2表达($P<0.01$), 同时降低PI3K与AKT的磷酸化水平($P<0.01$)。联用PI3K/AKT通路激活剂后, AGS细胞中p-PI3K、p-AKT表达水平较单独灯盏花素处理组回升($P<0.01$), 灯盏花素对AGS细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用也被明显削弱($P<0.01$)。结论: 灯盏花素通过抑制PI3K/AKT信号通路以及调控增殖与EMT相关分子, 从而有效抑制AGS胃腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭。本研究为灯盏花素作为潜在抗胃腺癌候选药物提供了重要实验依据。

关键词: 胃腺癌; 灯盏花素; PI3K/AKT信号通路; 上皮间质转化; 增殖与侵袭

中图分类号: R73-33 文献标志码: A 文章编号: 2097-7174(2026)03-0208-09

DOI: 10.3969/j.issn.2097-7174.2026.03.003

Eupatilin inhibits the proliferation and invasion of gastric adenocarcinoma cells through the PI3K/AKT axis

DONG Xinran, ZENG Qin, ZHANG Lirong, DUAN Hongfei, BAI Lan

(Gannan Innovation and Translational Medicine Research Institute, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: **Objective:** To evaluate the inhibitory effects of breviscapine—the major active component derived from the traditional Chinese medicinal herb *Erigeron breviscapus*—on the proliferation, migration, and invasion of AGS gastric adenocarcinoma cells, and to elucidate its underlying molecular mechanisms. **Methods:** AGS cells were treated with different concentrations of breviscapine (0-50 $\mu\text{mol/L}$). Cell proliferation was assessed using CCK-8 assays, colony formation assays, and EdU staining. Cell migration and invasion were evaluated through wound-healing and Transwell assays. Flow cytometry was performed to analyze cell cycle distribution and apoptosis. Western blot was used to examine the expression of proliferation-related proteins (PCNA, Cyclin D1, MYC), epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-CAD, N-CAD, MMP2), and key molecules in the PI3K/AKT signaling pathway. **Results:** CCK-8 assays showed that the viability of AGS cells was significantly reduced in a concentration-dependent manner after treatment with

通信作者: 白兰, 女, 博士, 教授, 研究方向: 代谢性疾病和消化道肿瘤分子机制和药理药效研究。E-mail: bailan@gmu.edu.cn

20 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine for 24 h and 48 h ($P < 0.01$), while breviscapine at all tested concentrations had no significant effect on the viability of normal gastric mucosal GES-1 cells. Colony formation assays and EdU staining revealed that the number of colony formation and the proportion of proliferating cells in the S phase were significantly decreased in AGS cells treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine ($P < 0.05$). Wound-healing and Transwell assays demonstrated that 20 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine significantly decreased the wound healing rate, the number of migrated and invaded AGS cells ($P < 0.01$), with the inhibitory effect enhanced as the concentration increased. Flow cytometry analysis indicated that the proportion of AGS cells in the G1 phase was significantly increased and that in the S phase was significantly decreased after treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine ($P < 0.01$); the apoptosis rate of AGS cells in the 30 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine group reached 14.3%, which was significantly higher than 1.93% in the control group ($P < 0.01$). Western blot results showed that 20 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ breviscapine significantly downregulated the expression of proliferation-related proteins including PCNA, Cyclin D1 and MYC in AGS cells ($P < 0.05$), upregulated the expression of the epithelial marker E-CAD, and downregulated the expression of the mesenchymal marker N-CAD and invasion-related protein MMP2 ($P < 0.01$). Moreover, breviscapine significantly upregulated the expression of pro-apoptotic proteins BAX and C-Caspase-3, downregulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.01$), and markedly decreased the phosphorylation levels of PI3K and AKT ($P < 0.01$). After combined treatment with a PI3K/AKT pathway activator, the expression levels of p-PI3K and p-AKT in AGS cells were significantly increased compared with the breviscapine alone group ($P < 0.01$), and the inhibitory effects of breviscapine on the proliferation, migration and invasion of AGS cells were significantly attenuated ($P < 0.01$). **Conclusion:** Breviscapine effectively suppresses the proliferation, migration, and invasion of AGS gastric adenocarcinoma cells by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway and modulating proliferation- and EMT-related molecules. These findings provide important experimental evidences supporting breviscapine as a potential therapeutic candidate for gastric adenocarcinoma.

Key words: Gastric cancer; Breviscapine; PI3K/AKT signaling pathway; Epithelial-mesenchymal transition; Proliferation and invasion

胃癌作为全球重大公共卫生问题,其高发病率与致死率严重威胁人类健康。根据世界卫生组织(WHO)2024年癌症报告,胃癌在全球癌症发病率及死亡率位居第五,已成为癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。目前,手术切除、放射治疗和化学治疗是胃癌的一线治疗方案,但这些传统手段存在显著局限性。例如,手术难以彻底清除微小转移灶;而放疗则因缺乏肿瘤特异性,在杀伤癌细胞的同时会引发骨髓抑制、消化道反应等严重不良反应,且易诱导肿瘤细胞产生耐药性,导致复发率居高不下^[2]。因此,探索高效低毒的新型治疗策略,对改善胃癌患者预后至关重要。

中医药因多靶点、多途径调控的优势,在治疗癌症方面展现出巨大潜力。灯盏细辛首载于《滇南本草》^[3],拥有超过五百年的药用传统。据《中国本草药志》^[4]所述,灯盏细辛(傣语称之为芽蚌法兰),味辛且苦,性温,归风、火塔,其药效涵盖散热、解表、祛风除湿及活络止痛,常用于缓解牙痛、胃痛及风湿疼痛。灯盏细辛的主要成分为灯盏花素(Breviscapine),属于黄酮类活性成分^[5]。研究表明,灯盏花素在抗肿瘤中发挥潜在作用,例如,灯盏花素可通过激活线粒体凋亡途径诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡^[6];在

非小细胞肺癌 A549 细胞中,其通过活性氧-胰岛素样生长因子结合蛋白 4 轴抑制肿瘤增殖^[7];而在前列腺癌和结直肠癌中,灯盏花素可通过调控 PI3K/AKT 通路抑制肿瘤生长^[8-9]。然而,尚无研究显示灯盏花素对胃癌的治疗作用,其潜在的分子机制尚不清楚。

因此,本研究选取胃腺癌细胞株 AGS 为模型,全面探究灯盏花素对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并深入阐明其通过调控 PI3K/AKT 通路发挥作用,为后续研究与开发灯盏花素在胃癌治疗中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 胃腺癌细胞株 AGS(BNCC,货号:BNCC338141);人胃黏膜细胞 GES-1(万物生物,货号:Delf-10164);灯盏花素(Breviscapine)(麦克林,货号:B991742);5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)(MERCCK,货号:F8423);胎牛血清(新西兰,货号:SH30406.05);RPMI Medium 1640(Gibco,货号:11875093);740Y-P(Med Chem Express,货号:HY-P0175);CCK8 试剂盒、EdU 试剂盒(碧云天,货号:C0037、C0085S)。一抗:PCNA(Biolight,CP00140

HuA10)、Cyclin D1 (Abclonal, A19038)、MYC (Abclone, AE009)、E-CAD (Biolight, RMAP0043M1)、N-CAD (Abclonal, A19083)、MMP2 (Abclonal, A11144)、ACTIN (Abclonal, AC026)、p-AKT (Abclonal, AP1208)、AKT (Abclonal, A20799)。CO₂培养箱(赛默飞, 型号: 371); 多功能酶标仪 (Molecular Devices, 型号: Multiskan FC); 荧光显微镜 (OLYMPUS, 型号: CKX53SF); 显微镜 (NIKON, 型号: TS2)。

1.2 细胞培养及处理 胃腺癌细胞株 AGS 和人胃黏膜细胞 GES-1 在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 使用 RPMI 1640 培养基作为基础培养基, 添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素。药物实验时, 在完全培养基中添加相应浓度的灯盏花素、5-FU 或 PI3K 信号通路激活剂 740Y-P。

1.3 CCK-8 法检测细胞活性 按照 3 000 个/孔将 AGS 细胞或 GES-1 细胞接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液。将 96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育, 孵育 24 h 后, 加入添加相应浓度药物的新鲜培养基, 每个浓度设置 5 个复孔。分别在 24 h 和 48 h 后加入 10 μL CCK-8 试剂进行检测, 37 °C 避光孵育 2 h, 孵育完成后, 使用多功能酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。细胞活力 (%) = (测量值 - 空白值) / (对照值 - 空白值) × 100%。

1.4 平板克隆形成实验 取对数生长期的 AGS 细胞, 按照 2 000 个/孔将细胞接种于 6 孔板, 每组 3 个复孔, 加入添加相应浓度药物的新鲜培养基, 处理 48 h 后弃药, 换含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 10 d, 每 3 天更换新鲜培养基; 弃上清液, 用 PBS 轻柔清洗后, 加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 弃去结晶紫染液, 用 PBS 清洗 3 次, 自然晾干后拍照并计算克隆形成数。

1.5 EdU 染色实验 取对数生长期的 AGS 细胞, 以 3 000 个/孔接种于 96 孔板, 加入含相应浓度药物的新鲜培养基, 处理 48 h 后弃液, 每孔加入 100 μL 含 EdU 的完全培养液, 37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h。PBS 洗涤细胞 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min。弃固定液, PBS 洗涤 3 次, 加入 0.5% Triton X-100 透化 10~15 min, PBS 洗涤 3 次。每孔加入 100 μL EdU 染色液, 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 1×Hoechst 33342 染色液, 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 50~100 μL PBS, 于倒置荧光显微镜下拍照。

1.6 蛋白印迹实验 RIPA 裂解液提取细胞总蛋

白, 使用 BCA Protein Assay Kit 进行定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质提取物, 转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 用 5% 脱脂牛奶将二抗稀释, 在室温下孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。采用 ECL 发光液在化学发光成像仪下扫描显影并测定灰度值, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.7 细胞划痕实验 取对数生长期的 AGS 细胞, 按照 2.2 × 10⁶ 个/孔将细胞接种于 6 孔板。用 200 μL 无菌移液器枪头尖端划伤, 形成无细胞的直线, 用 PBS 将划落的细胞冲洗干净, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养相应时间。在显微镜下记录细胞划痕愈合情况。

1.8 Transwell 迁移实验 将含有 4 × 10⁵ 个细胞的 100 μL AGS 细胞接种到 Transwell 小室的上室中。上室中添加相应浓度药物的无血清培养基, 下室加入 600 μL 含 10% FBS 的完全培养基。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。用 PBS 洗涤 3 次后, 用 4% 多聚甲醛在室温下固定细胞 15 min, 然后用 0.1% 结晶紫在室温下孵育 20 min。PBS 洗涤后, 轻轻擦去上室中的细胞, 晾干, 用显微镜拍照。

1.9 Transwell 侵袭实验 首先将 Transwell 小室的上室预先铺上一层 Matrigel 基质胶, 将 Matrigel 基质胶在 37 °C 培养箱中孵育 2 h, 使其凝固形成凝胶层。然后将含有 4 × 10⁵ 个细胞的 100 μL AGS 细胞悬液接种到铺有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上室中, 上室中添加相应浓度药物的无血清培养基, 下室中加入 600 μL 含有 10% FBS 的完全培养基。将 Transwell 小室置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。用 PBS 洗涤 3 次后, 用 4% 多聚甲醛在室温下固定细胞 15 min, 然后用 0.1% 结晶紫在室温下孵育 20 min。PBS 洗涤后, 轻轻擦去上室中的细胞, 晾干, 用显微镜拍照。

1.10 流式细胞术 取对数生长期的 AGS 细胞, 按照 2.5 × 10⁵ 个/孔将细胞接种于 6 孔板, 每组 3 个复孔, 药物处理 24 h。收集各孔细胞进行细胞周期及凋亡检测, 使用 FlowJo 10.8.1 和 ModFit 5.0 分析结果。

1.11 统计学处理 数据采用 SPSS Statistics 21.0 软件进行统计学处理。对所有数据进行正态分布检验, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 灯盏花素抑制 AGS 细胞活力且对正常胃黏膜细胞无毒性

20 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素显著抑制 AGS 细胞活力。延长灯盏花素的处理时间,即处理 48 h 后,灯盏花素对癌细胞活力的抑制作用更为明显。5-FU 能够极大地抑制胃癌细胞的细胞活力。不同浓度的灯盏花素在处理 24 h 和 48 h 后均对 GES-1 细胞的活性无影响(图 1),表明其对正常细胞无毒性,结合药物有效性与安全性,后续实验选取 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素进行研究。

2.2 灯盏花素抑制 AGS 细胞增殖能力

平板克隆形成实验:20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理的 AGS 细胞集落形成数量较未经灯盏花素处理的 AGS 细胞减少($P < 0.01$,图 2A)。EdU 染色:灯盏花素处理的 AGS 细胞中处于 DNA 合成期的增殖细胞占比较于未经灯盏花素处理的细胞降低($P < 0.05$,图 2B)。Western blot 检测显示:20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理的 AGS 细胞增殖相关蛋白 PCNA、MYC 和 CyclinD1 的表达水平均下调($P < 0.05$,图 2C)。提示灯盏花素可有效抑制 AGS 细胞的增殖能力。

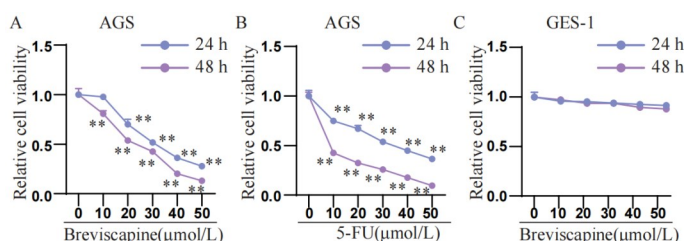


图 1 灯盏花素对 AGS 细胞存活率的影响;B:5-FU 对 AGS 细胞存活率的影响;C:灯盏花素对 GES-1 细胞存活率的影响。 $**P < 0.01$ 。Breviscapine:灯盏花素。

图 1 灯盏花素对 AGS 及 GES-1 细胞活力的影响

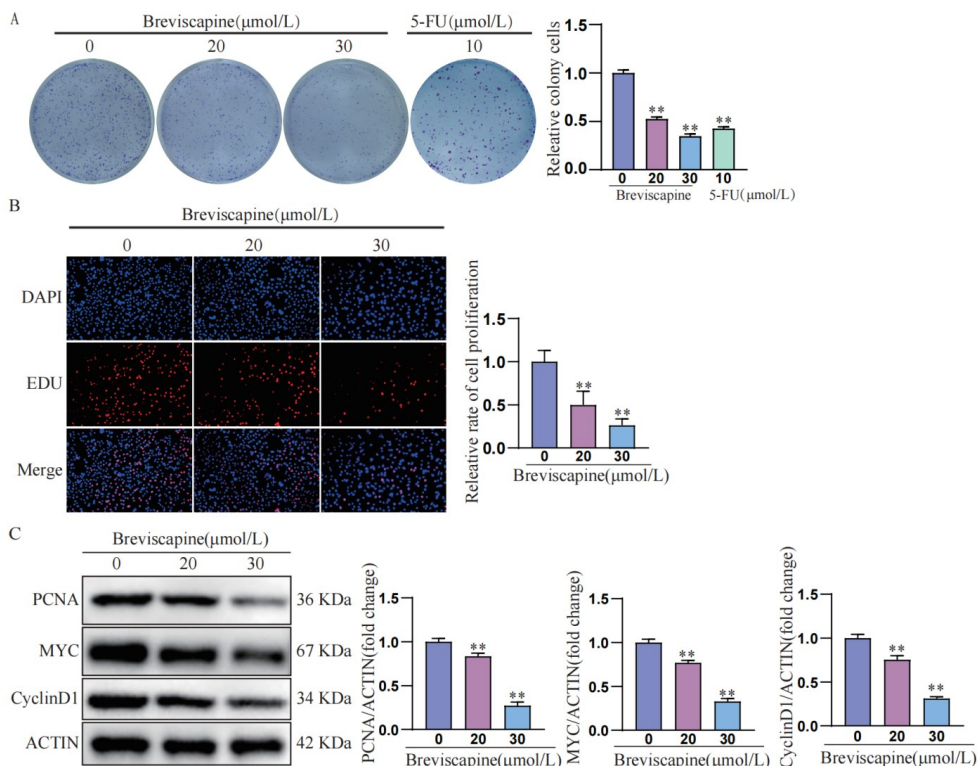


图 2 灯盏花素对 AGS 细胞增殖能力的影响

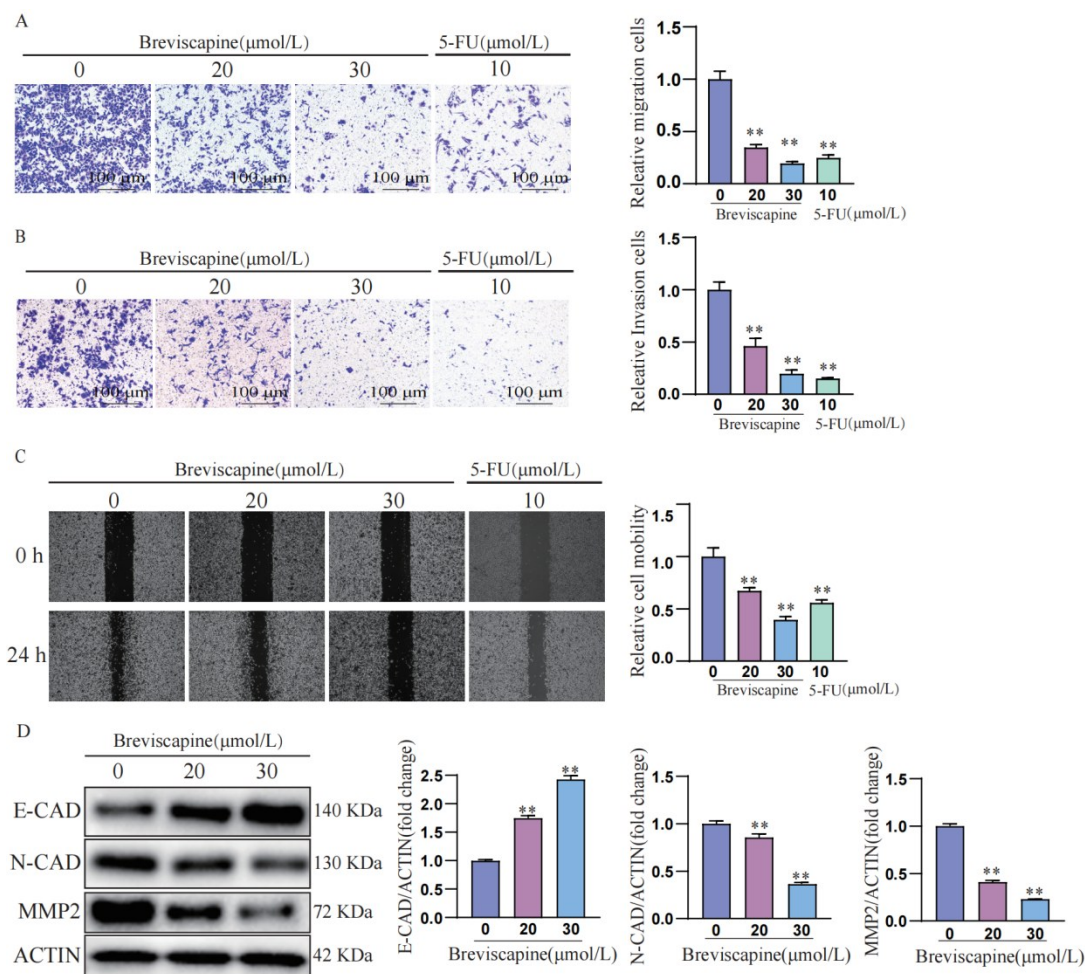
A:不同浓度灯盏花素及 5-FU 处理后 AGS 细胞的集落形成结果;B:不同浓度灯盏花素处理后 AGS 细胞的 EdU 染色结果图;C:不同浓度灯盏花素处理后 AGS 细胞中 PCNA、MYC、CyclinD1 蛋白表达。 $**P < 0.01$ 。Breviscapine:灯盏花素。

图 2 灯盏花素对 AGS 细胞增殖能力的影响

2.3 灯盏花素抑制 AGS 细胞的迁移和侵袭能力

Transwell 迁移与侵袭实验结果显示:灯盏花素可降低 AGS 细胞的迁移和侵袭能力 ($P<0.01$, 图 3A~3B);划痕实验结果同样表明,灯盏花素处理后 AGS 细胞的迁移能力降低 ($P<0.01$, 图 3C)。

Western blot 检测结果显示:灯盏花素处理后 AGS 细胞中的上皮表型相关蛋白 E-CAD 表达水平上调,而间质表型相关蛋白 N-CAD 及侵袭相关蛋白 MMP2 的表达水平下调 ($P<0.01$, 图 3D)。提示灯盏花素可有效抑制 AGS 细胞的迁移与侵袭能力。



A:不同浓度灯盏花素及5-FU处理后 AGS 细胞的迁移实验结果;B:不同浓度灯盏花素及5-FU处理后 AGS 细胞的侵袭实验结果;C:不同浓度灯盏花素及5-FU处理后 AGS 细胞的划痕愈合实验结果;D:不同浓度灯盏花素处理后 AGS 细胞中 E-CAD、N-CAD、MMP2 蛋白表达。 ** $P<0.01$ 。 Breviscapine:灯盏花素。

图3 灯盏花素对 AGS 细胞迁移和侵袭能力的影响

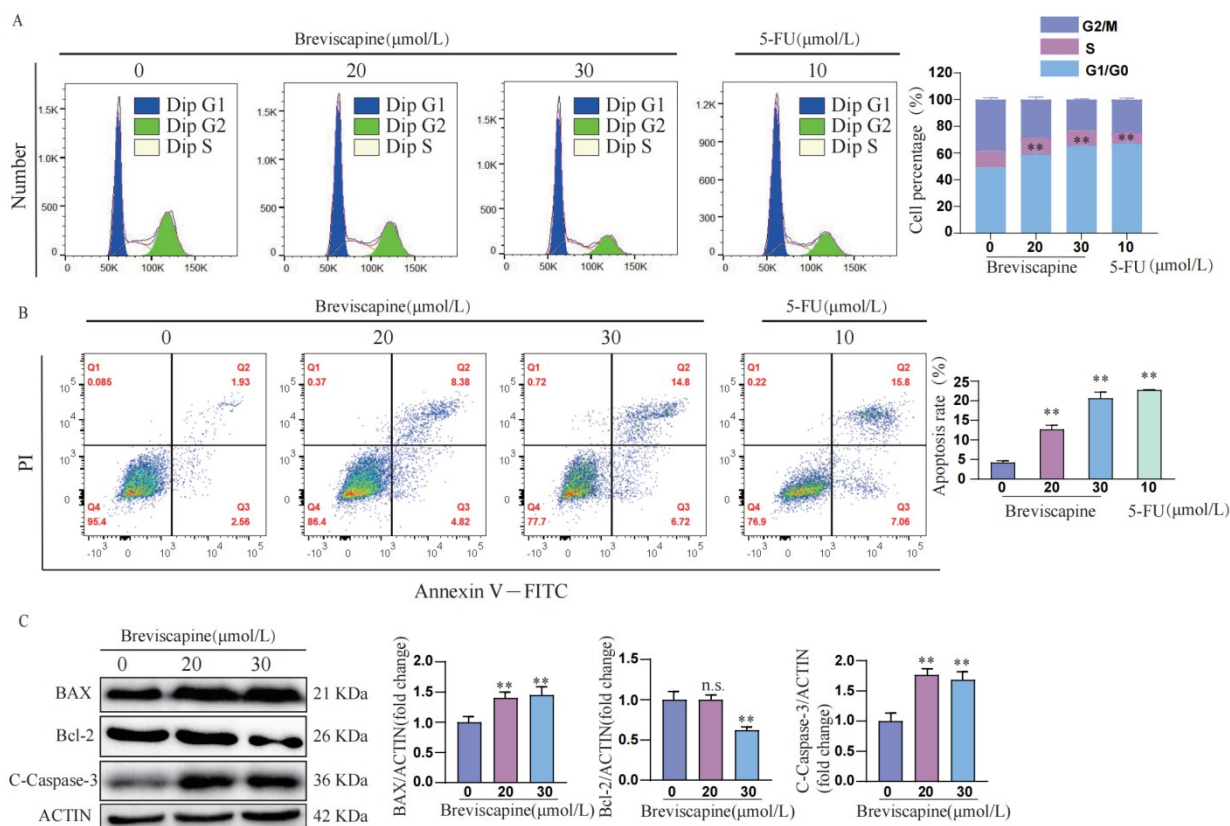
2.4 灯盏花素诱导 AGS 细胞周期阻滞并促进凋亡

细胞周期检测结果显示:与未经灯盏花素处理的 AGS 细胞相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素或 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU 处理后 AGS 细胞的 G1 期细胞比例升高,S 期比例降低 ($P<0.01$),提示灯盏花素可将细胞周期阻滞于 G1 期(图 4A)。Annexin V/PI 双染结果发现:30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理的 AGS 细胞凋亡率和 5-FU 组均高于未经灯盏花素处理的 ($P<0.01$, 图 4B)。Western blot 结果显示:灯盏花素上调促凋亡蛋白 BAX、C-Caspase-3, 下调抗凋亡蛋白

Bcl-2 ($P<0.01$)(图 4C)。提示灯盏花素可通过诱导 G1 期阻滞和凋亡抑制 AGS 细胞增殖。

2.5 灯盏花素通过负调控 PI3K/AKT 信号通路抑制 AGS 细胞的生长

在 2.2 及 2.3 部分中已证实灯盏花素可抑制 AGS 细胞的增殖、迁移及侵袭;为进一步探究其分子机制,本研究关注 PI3K/AKT 信号通路——该通路是调控肿瘤增殖、迁移等恶性行为的关键通路,且已有研究报道灯盏花素可通过抑制该通路调控其他肿瘤的进展^[8-9]。基于此,推测灯盏花素可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路影响 AGS 细



A: 不同浓度灯盏花素及5-FU处理后AGS细胞的周期流式检测结果;B: 同浓度灯盏花素及5-FU处理后AGS细胞的凋亡流式检测结果(Annexin V-FITC/PI双染);C: 不同浓度灯盏花素处理后AGS细胞中BAX、Bcl-2、C-Caspase-3蛋白表达。** $P < 0.01$ 。Breviscapine: 灯盏花素。

图4 灯盏花素对AGS细胞周期和凋亡的影响

胞恶性行为。

为验证此猜想,首先通过Western blot检测灯盏花素对PI3K/AKT通路及其上下游靶点的调控:与未经灯盏花素处理的AGS细胞相比,灯盏花素处理后AGS细胞中p-PI3K、p-AKT水平降低($P < 0.01$);同时通路上游抑制因子PTEN蛋白水平上调,而下游信号p-mTOR、p-GSK3 β 下调($P < 0.01$,图5A)。这些结果说明灯盏花素抑制了AGS细胞中的PI3K/AKT信号通路。

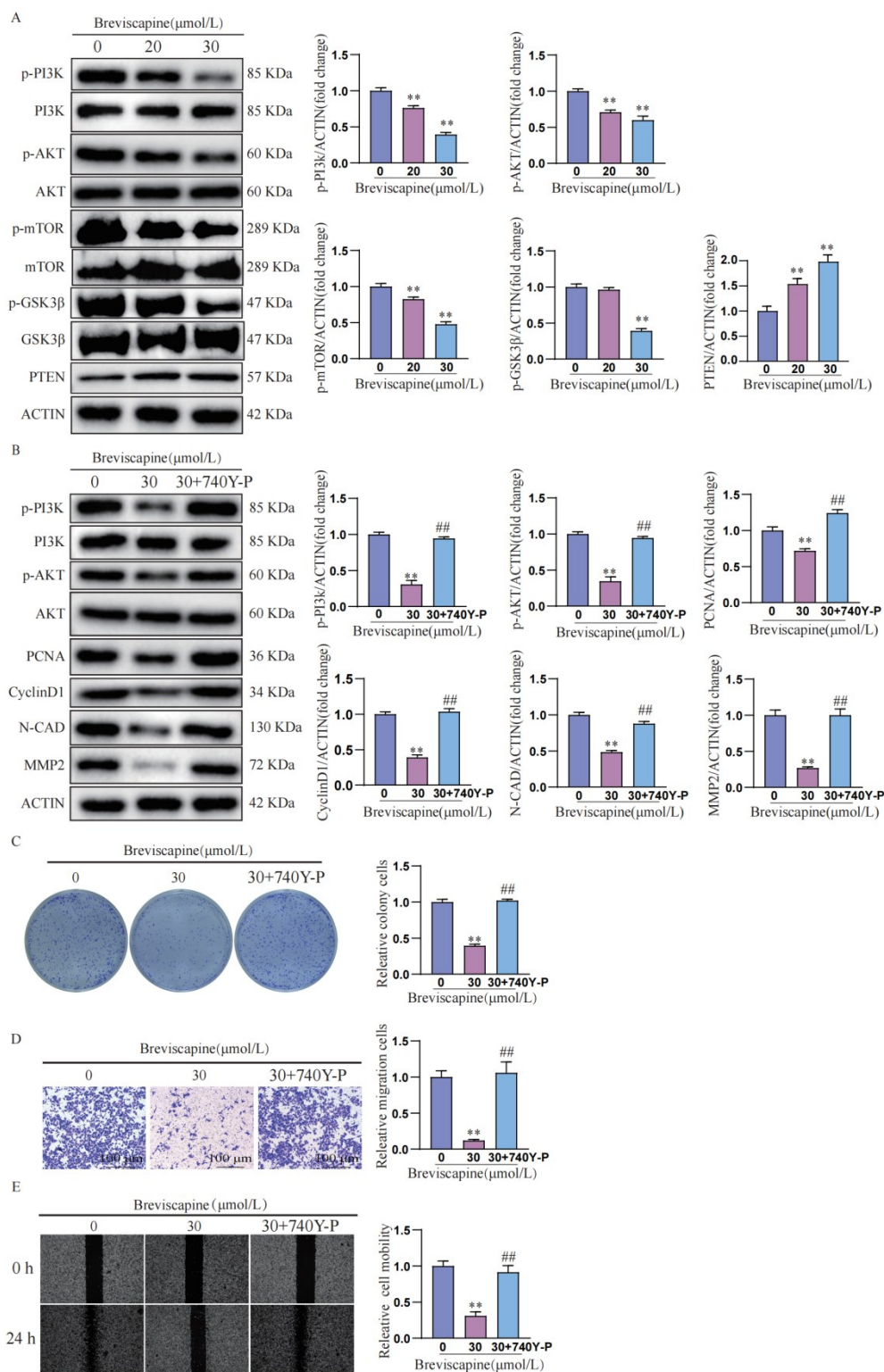
为探究灯盏花素对胃癌细胞恶性表型的抑制作用是否依赖PI3K/AKT通路,本研究利用PI3K/AKT激活剂(740Y-P)与灯盏花素(30 $\mu\text{mol/L}$)联合处理AGS细胞:Western blot结果显示,740Y-P与灯盏花素联合处理的AGS细胞中p-PI3K、p-AKT水平较单独灯盏花素处理后升高($P < 0.01$);同时增殖相关蛋白PCNA、CyclinD1及转移相关蛋白N-CAD、MMP2的表达水平也回升($P < 0.01$,图5B)。后续功能实验(克隆形成、细胞迁移、划痕愈合)进一步证实,PI3K/AKT激活剂可逆转灯盏花素对AGS细胞增

殖、迁移能力的抑制作用($P < 0.01$,图5C~5E)。

综上,灯盏花素通过抑制PI3K/AKT信号通路,发挥对AGS细胞生物学行为的调控作用。

3 讨论

胃癌是中国常见恶性肿瘤,而腺癌是胃癌常见的病理类型^[10]。本研究以AGS人胃腺癌细胞为模型,系统探究了中药灯盏细辛活性提取物灯盏花素对胃癌细胞恶性表型的调控作用及分子机制。细胞活力是反映肿瘤细胞存活能力的核心指标,也是评估抗肿瘤药物活性的基础靶点^[11]。5-FU通过触发核糖体蛋白泛素化并经自噬降解核糖体RNA、蛋白酶体降解泛素化核糖体蛋白的特异性通路诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。在本研究中,使用5-FU作为阳性对照,我们发现灯盏花素也能抑制AGS细胞活力,20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理24 h均具有显著抑制效果($P < 0.01$),且延长处理时间至48 h后,抑制效应进一步增强;更重要的是,各浓度灯盏花素



A: 不同浓度灯盏花素处理后 AGS 细胞中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达; B: 不同浓度灯盏花素及联合 740Y-P 处理后 AGS 细胞中 PI3K/AKT 通路及增殖、侵袭相关蛋白表达; C: 不同浓度灯盏花素及联合 740Y-P 处理后 AGS 细胞的集落形成结果; D: 不同浓度灯盏花素及联合 740Y-P 处理后 AGS 细胞的迁移实验结果; E: 不同浓度灯盏花素及联合 740Y-P 处理后 AGS 细胞的划痕愈合实验结果。 ** $P < 0.01$, 与 0 μmol/L 灯盏花素处理的 AGS 细胞比较; ## $P < 0.01$, 与 30 μmol/L 灯盏花素处理的 AGS 细胞比较。 Breviscapine: 灯盏花素。

图 5 灯盏花素通过抑制 PI3K/AKT 信号通路影响 AGS 细胞的生长

对正常胃黏膜 GES-1 细胞活力无影响($P>0.05$),而阳性对照药 5-FU 对正常细胞存在毒性。这一结果与余甘子醇提取物、丹参素等中药提取物对胃癌细胞的选择性抑制效应一致^[13-14],提示灯盏花素在临床转化中具有潜在安全优势,其肿瘤细胞选择性可能与其对胃癌细胞特异性信号通路的调控有关。

细胞增殖失控是胃癌发生发展的核心驱动因素^[15],而 G1/S 期转换作为细胞周期关键检查点,其异常激活在胃癌中尤为常见^[16]。本研究结果显示,灯盏花素可减少 AGS 细胞集落形成数量($P<0.01$),流式细胞术检测证实 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理后,AGS 细胞 G1 期比例升高、S 期比例降低($P<0.05$),并与阳性对照药 5-FU 的周期阻滞效应一致,明确其可将 AGS 细胞特异性阻滞于 G1 期。Cyclin D1 作为调控 G1/S 期转换的核心蛋白,其表达抑制与细胞周期阻滞现象相关^[17-18],Western blot 检测进一步验证,灯盏花素可下调增殖相关关键分子 PCNA、Cyclin D1 及 MYC 的表达水平($P<0.05$),提示灯盏花素可能通过靶向下调 Cyclin D1 表达阻断细胞周期进程。该作用模式既与丹参素将胃癌细胞阻滞于 G2/M 期的调控机制^[12]存在差异,也有区别于灯盏花素在肝癌、非小细胞肺癌中的作用特征,同时其周期阻滞效应与 5-FU 一致,体现出灯盏花素抗胃癌增殖的独特性与肿瘤类型特异性。

肿瘤细胞的迁移与侵袭能力是胃癌发生远处转移的另一重核心生物学基础,而上皮-间质转化是调控肿瘤细胞迁移侵袭的关键病理过程^[19]。本研究通过 Transwell 实验与划痕实验发现,灯盏花素可降低 AGS 细胞迁移率与侵袭率($P<0.01$);Western blot 结果显示,灯盏花素处理后,上皮表型标志物 E-CAD 表达上调,间质表型标志物 N-CAD 及侵袭相关蛋白酶 MMP2 表达下调($P<0.01$)。这一结果提示,灯盏花素可通过逆转 EMT 进程抑制 AGS 细胞迁移侵袭,与复方蜥蜴散、麦冬皂苷 D 等中药通过调控 EMT 发挥抗胃癌转移作用的机制一致^[20-21],进一步证实 EMT 是中医药干预胃癌转移的重要作用环节。

细胞凋亡是机体清除异常细胞的重要机制,凋亡通路的失活是肿瘤细胞存活并形成病灶的重要原因^[22]。本研究采用 Annexin V/PI 双染法检测发现,30 $\mu\text{mol/L}$ 灯盏花素处理组的 AGS 细胞凋亡率接近阳性对照药 5-FU 组,且远高于未经灯盏花素处理的细胞,体现了灯盏花素的促凋亡活性。在凋亡相关蛋白调控层面,灯盏花素上调促凋亡蛋白 BAX、

C-Caspase-3 表达,同时下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,这一调控模式与灯盏花素在肝癌 HepG2 细胞中通过线粒体凋亡途径发挥作用的机制部分重合^[6],提示线粒体介导的内源性凋亡通路可能是灯盏花素诱导肿瘤细胞凋亡的保守机制。其中,C-Caspase-3 作为凋亡执行阶段的关键蛋白酶,其激活标志着凋亡进程的不可逆启动,而 BAX 与 Bcl-2 的表达失衡会破坏线粒体膜的稳定性,促进凋亡相关因子释放,进一步放大凋亡信号^[20]。

PI3K/AKT 信号通路是调控肿瘤细胞增殖、存活、迁移及 EMT 的核心信号轴,其异常激活在胃癌中发生率高达 50% 以上,是胃癌治疗的重要潜在靶点^[23]。为明确灯盏花素的作用靶点,本研究通过 Western blot 检测发现,灯盏花素处理可降低 AGS 细胞中 PI3K 与 AKT 的磷酸化水平,同时上调通路抑制因子 PTEN 的表达,下调下游效应分子 mTOR、GSK3 β 的磷酸化水平($P<0.01$),证实灯盏花素可有效抑制 PI3K/AKT 通路激活。为进一步验证该通路在灯盏花素抗胃癌效应中的必要性,本研究采用 PI3K 激活剂 740Y-P 与灯盏花素联合处理 AGS 细胞,结果显示,740Y-P 可逆转灯盏花素对 p-PI3K、p-AKT 的下调作用,同时恢复增殖相关蛋白与 EMT 相关蛋白的表达($P<0.01$);功能实验进一步证实,740Y-P 可抵消灯盏花素对 AGS 细胞增殖、迁移的抑制效应($P<0.01$)。上述结果直接证实,灯盏花素的抗胃癌作用依赖于 PI3K/AKT 通路抑制,这与灯盏花素在前列腺癌、结直肠癌中通过调控该通路发挥抗肿瘤作用的研究结论相呼应^[8-9],提示 PI3K/AKT 通路可能是灯盏花素抗肿瘤作用的保守靶点。

尽管本研究明确了灯盏花素抗 AGS 细胞的作用及机制,但仍存在一定局限性。本研究仅采用体外 AGS 细胞系开展实验,缺乏体内动物模型的验证,导致灯盏花素的体内抗肿瘤活性、药代动力学特征及长期用药安全性尚未得到明确阐释;虽已证实 PI3K/AKT 通路是灯盏花素发挥作用的关键通路,但尚未通过分子对接、免疫共沉淀等技术验证灯盏花素与 PI3K 或 AKT 蛋白是否存在直接结合作用,也未排除其通过调控通路上游分子间接抑制该通路的可能性;在临床适用性方面,由于胃癌具有高度组织异质性,而本研究未纳入不同病理类型、分化程度及临床分期的胃癌细胞系,无法明确灯盏花素对不同亚型胃癌的作用差异,进而限制了其临床应用场景的精准定位。

尽管如此,本研究的主要贡献是证实灯盏花素可通过抑制PI3K/AKT信号通路,下调增殖相关蛋白表达并逆转EMT进程,从而抑制AGS胃腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,具有良好的肿瘤细胞选择性。本研究为灯盏花素的抗胃癌作用提供了新的实验证据,也可为后续开发基于灯盏花素的胃癌治疗药物奠定理论基础。

所有作者均声明不存在利益冲突关系。

参考文献:

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3):229-263.
- [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] 于乃义,于兰馥. 滇南本草[M]. 昆明:云南科学技术出版社,2004:499-500.
- [4] 马小军,张丽霞,林艳芳. 中国傣药志-上卷[M]. 北京:人民卫生出版社,2017.
- [5] Wen L, He T, Yu A, et al. Breviscapine: a review on its phytochemistry, pharmacokinetics and therapeutic effects [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(6):1369-1397.
- [6] Wu Y, Fan Q, Lu N, et al. Breviscapine-induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in its antitumor activity [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(8):1188-1194.
- [7] Wei W, Wang L, Xu L, et al. Anticancer mechanism of breviscapine in non-small cell lung cancer A549 cells acts *via* ROS-mediated upregulation of IGFBP4 [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(4):2475-2485.
- [8] Ye J, Gao M, Guo X, et al. Breviscapine suppresses the growth and metastasis of prostate cancer through regulating PAQR4-mediated PI3K/Akt pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127:110223.
- [9] Niu P, Liu F, Lei F, et al. Breviscapine regulates the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of colorectal cancer cells *via* the PI3K/AKT pathway [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):9674.
- [10] 黄裕涵,孙国平. 基于Lauren分型的胃腺癌研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6):1060-1063.
- [11] Zhang W, Tang Y, Yang P, et al. TMX2 potentiates cell viability of hepatocellular carcinoma by promoting autophagy and mitophagy [J]. *Autophagy*, 2024, 20(10):2146-2163.
- [12] Chen J K, Merrick K A, Kong Y W, et al. An RNA damage response network mediates the lethality of 5-FU in clinically relevant tumor types [J]. *bioRxiv*, 2023. doi: 10.1101/2023.04.28.538590.
- [13] 罗兰,林久茂,魏丽慧,等. 余甘子醇提取物抑制人胃癌株AGS细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(8):989-993.
- [14] 邓帅,周桂香,郭小峰,等. 丹参素对胃癌AGS细胞凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中医药导报*, 2023, 29(4):1-4.
- [15] 沈梦迪,赵娜,邓晓晶,等. COX6B2在胃癌组织中高表达并影响患者的远期预后:基于抑制pp53信号调控胃癌细胞的增殖及细胞周期 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(2):289-297.
- [16] 侯东泽,代劲松,邓志波,等. MicroRNA-490-5p靶向CDK1通过ERK信号通路参与胃癌细胞周期调控 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(16):8.
- [17] Ma C, Wang D, Tian Z, et al. USP13 deubiquitinates and stabilizes cyclin D1 to promote gastric cancer cell cycle progression and cell proliferation [J]. *Oncogene*, 2023, 42(29):2249-2262.
- [18] 李雨,李小风,张扬. 胃癌模型大鼠胃黏膜组织Cyclin D1、c-Myc、CKIT的表达意义及其与胃癌病变程度的相关性 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2024, 23(8):789-793.
- [19] 陈晓敏,郭俊明,乐东海,等. 上皮-间质转化:肿瘤转移的重要调控机制 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(9):9.
- [20] 李铮,程翻娥,刘彩月,等. 复方蜥蜴散调控PI3K/AKT/MMP通路对胃癌耐药细胞增殖、迁移及侵袭的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(1):45-51.
- [21] 宋鸣,周昕,刘俊,等. 麦冬皂苷D调节Gas6/Axl信号轴对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(21):5221-5227.
- [22] Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4):603-619.
- [23] He Y, Sun M M, Zhang G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2021, 6:425.

(收稿:2025-06-21)(修回:2025-12-02)

(责任编辑:肖载宇)