

引用:袁悦萌,陈姝霖,王晓娟,王雯,吴仪彬,何迎春,周芳亮.山楂酸对鼻咽癌细胞迁移与侵袭的干预作用研究[J].中医药导报,2025,31(4):27-33.

山楂酸对鼻咽癌细胞迁移与侵袭的干预作用研究*

袁悦萌¹,陈姝霖²,王晓娟¹,王 雯¹,吴仪彬¹,何迎春^{1,3,4},周芳亮^{1,3,4}

(1.湖南中医药大学医学院,湖南 长沙 410208;

2.湖南中医药大学第一中医临床学院,湖南 长沙 410208;

3.湖南中医药大学中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208;

4.湖南省中医药防治眼耳鼻咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨山楂酸(MA)对鼻咽癌细胞迁移、侵袭的作用与机制。方法:将鼻咽癌细胞S18、S26分别分为药物组(10、20、30、40、50、60、70、80 μmol/L)、对照组和顺铂(CIS)组,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测山楂酸对鼻咽癌细胞增殖能力的影响。将鼻咽癌细胞S18、S26分别分为药物组(10、15、20 μmol/L)、对照组和CIS组,采用划痕实验、Transwell侵袭小室法检测鼻咽癌细胞迁移和侵袭情况。将鼻咽癌细胞S18、S26分别分为药物组(20、40 μmol/L)、对照组和CIS组,采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测细胞迁移蛋白Vimentin、N-cadherin表达水平。构建鼻咽癌细胞裸鼠足垫-腹股沟淋巴结转移模型后,将造模成功的裸鼠随机分为对照组、MA组、CIS组,每组6只。各组予相应药物干预20 d后观察裸鼠腹股沟淋巴结的大小和质量,称量肝、肾、脾质量,并评估淋巴结转移情况。结果:MTT结果显示,干预36、48 h后,药物组S18、S26细胞相对增殖率均低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。划痕实验显示,干预12、24、36、48 h后,药物组S18、S26细胞相对迁移率低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Transwell实验显示,药物组(15、20 μmol/L)S18细胞相对侵袭率低于对照组($P<0.01$);药物组S26细胞相对侵袭率低于对照组($P<0.05$)。Western blotting结果显示,药物组S18、S26细胞Vimentin、N-cadherin蛋白相对表达量低于对照组($P<0.05$)。动物实验显示,MA组、CIS组裸鼠淋巴结转移率均低于对照组($P<0.05$),淋巴结、肝、脾质量均低于对照组($P<0.05$);HE染色示MA组转移灶明显少于对照组。结论:山楂酸可抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达。

[关键词] 鼻咽癌;山楂酸;细胞迁移;细胞侵袭;上皮间质转化

[中图分类号] R285.5;R739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)04-0027-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.005

Study on the Intervention Effect of Maslinic Acid on the Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

YUAN Yuemeng¹, CHEN Shulin², WANG Xiaojuan¹, WANG Wen¹, WU Yibin¹,

HE Yingchun^{1,3,4}, ZHOU Fangliang^{1,3,4}

(1.Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan, 410208, China; 3.Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 4.Hunan Provincial Engineering and Technological Research Center for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine and Protecting Visual Function, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects and mechanisms of maslinic acid (MA) on the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. Methods: NPC cell lines S18 and S26 were divided into drug groups (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μmol/L MA), control group, and cisplatin (CIS) group. The MTT

*基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目(2023-2335);湖南省科技创新计划项目(2024RC3202)

通信作者:周芳亮,女,副教授,研究方向为中医药防治鼻咽癌的机制

assay was used to evaluate the inhibitory effect of MA on NPC cell proliferation. For migration and invasion assays, S18 and S26 cells were divided into drug groups (10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$ MA), control group and CIS group. Scratch wound healing and Transwell invasion chamber assays were performed to assess cell migration and invasion. For protein analysis, S18 and S26 cells were divided into drug groups (20, 40 $\mu\text{mol/L}$ MA), control group and CIS group. Western blotting was used to detect the expression levels of migration-related proteins (Vimentin, N-cadherin). A nude mouse footpad-inguinal lymph node metastasis model was established using NPC cells. Successfully modeled mice were randomly divided into control group, MA group and CIS group, 6 mice in each group. After 20 days of drug intervention, inguinal lymph node size and weight, liver/kidney/spleen weights, and lymph node metastasis were evaluated. Results: MTT assays showed that the relative proliferation rates of S18 and S26 cells in drug groups were significantly lower than those in the control group at 36 and 48 h post-treatment ($P<0.05$ or $P<0.01$). Scratch wound healing assays demonstrated that drug groups showed lower relative migration of S18 and S26 cells than control group at 12, 24, 36, and 48 h post-treatment ($P<0.05$ or $P<0.01$). Transwell assays demonstrated that drug groups (15, 20 $\mu\text{mol/L}$) showed lower relative invasion rates of S18 cells than control group ($P<0.01$), and that drug groups showed lower relative invasion rates of S26 cells than control group ($P<0.05$). Western blotting demonstrated that drug groups (S18, S26) showed lower Vimentin and N-cadherin protein expression ($P<0.05$). Animal experiments showed that MA group and CIS group showed lower lymph node metastasis rates than control group ($P<0.05$), with lower lymph node/liver/spleen weights than control group ($P<0.05$). MA group showed fewer metastatic foci (HE staining) than control group. Conclusion: Maslinic acid can inhibit NPC cell proliferation, migration and invasion related protein expression.

[Keywords] nasopharyngeal carcinoma; maslinic acid; cell migration; cell invasion; epithelial-mesenchymal transition

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种鳞状上皮细胞癌,高发于我国南方各省以及东南亚地区、北非地区^[1]。放疗联合顺铂化疗是目前治疗鼻咽癌的主要方法,然而鼻咽癌起病部位隐匿,原发癌病灶小,易被忽略或误诊,局部/区域复发与转移是威胁鼻咽癌患者生存期的最大威胁^[2]。超过90%的鼻咽癌复发或转移发生于根治性治疗结束后的5年内,并且晚期(T_{3-4} 或 N_{2-3})患者具有更高的复发率或转移率^[3]。因此,探究防治鼻咽癌转移和复发的治疗方法和药物是迫切需要解决的问题^[4]。

中医药在抗肿瘤方面具有显著优势,目前从天然产物中提取治疗癌症有效成分是医学科研工作者关注的热点。山楂酸(maslinic acid, MA)是一种天然五环三萜酸,广泛存在于橄榄、山楂等植物中,具有抗癌、抑制肿瘤细胞增殖^[5]与凋亡^[2-3,6]、抗菌、抗炎、抗2型糖尿病^[7]等作用。前期研究发现MA可通过诱导自噬抑制鼻咽癌细胞增殖,但其对迁移和侵袭的影响尚未明确。本研究从体外细胞实验和体内动物模型两方面,探究MA对鼻咽癌转移的干预作用及分子机制,旨在为MA的临床应用提供依据。

1 材 料

1.1 细胞株及动物 人鼻咽癌细胞S18、S26、5-8F购自北京北纳创联生物技术研究院(批号:TP20181224)。SPF级BALB/c-nu裸鼠20只,3~4周龄,雄性,体质量13.37~15.23 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SYXK(湘)2021-0002。实验动物质量合格证号:ZS-202410150006,随机选取18只进行实验。本实验所有大鼠均置于温度(25±1)℃,湿度(55±5)%的明暗交替时间为12/12的环境中饲养。许可证号:SYXK(湘)2024-0014。本研究动物实验方案经湖南中医药

大学动物实验伦理委员会批准,伦理号:HNUCM21-2410-17。

1.2 药物与试剂 胎牛血清(美国Gibco公司,批号:10099-141);RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司,批号:SH3080901B);胰蛋白酶消化液(北京索莱宝公司,批号:20211125);山楂酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:M138840,纯度97%);顺铂(cisplatin, CIS)(齐鲁制药有限公司,批号:H20023460);二甲基亚砜(北京索莱宝公司,批号:710N0317);蛋白Marker(美国Thermo公司,批号:26616);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(批号:5174S)、波形蛋白(Vimentin)抗体(批号:25)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)抗体(批号:13116)均购自美国CST公司;山羊抗小鼠荧光二抗(批号:D00115-03)、山羊抗兔荧光二抗(批号:C70420-01)均购自美国LICOR公司;结晶紫(北京索莱宝公司,批号:44240516002);通用型抗体稀释液(美国NCM公司,批号:20210722)。

1.3 主要仪器 CO_2 培养箱(美国赛默飞世尔公司,型号:HERAcell150i);精密恒温水槽(上海一恒科学有限公司,型号:BWS-12);电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司,型号:202-1AB);细胞成像多功能检测系统(美国BioTek公司,型号:CytationTM5);双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司,型号:SW-CJ-2FD);台式高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司,型号:Microfuge 20R);全自动酶标分析仪(美国BioTek公司,型号:ELX800);蓝箭快转仪(广州道一科学技术有限公司,型号:FTB95);台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:TG16-WS);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY600HE)。

2 方 法

2.1 细胞传代 将鼻咽癌S18、S26细胞接种于含10%胎牛血

清的RPMI-1640培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中传代培养,取对数生长期细胞用于实验。当细胞生长至融合度为80%~90%时,即可进行传代。先加适量磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)清洗细胞1~2次,然后吸取500 μL胰蛋白酶置于培养瓶内或1 mL胰蛋白酶于培养皿内,然后轻轻晃动使胰酶充分浸没培养瓶和培养皿底部,置于37℃细胞培养箱孵育2~4 min(根据细胞状态不同而变化),细胞变圆胞质回缩时加入2 mL培养基,用1 mL枪头反复轻轻吹打,当细胞形成单细胞悬液时根据细胞状态及生长速度将细胞分配至原培养瓶/培养皿及新培养瓶/培养皿。最后将细胞放入细胞培养箱继续培养。

2.2 药物制备 山楂酸用二甲基亚砜(DMSO,≤1%)溶解成80 mmol/L的母液,分装后80℃避光保存,临用时用RPMI-1640完全培养液稀释,配成所需要的工作浓度。

2.3 噻唑兰(MTT)比色法检测鼻咽癌细胞增殖能力 取对数生长期的细胞按照 4×10^3 /孔接种于96孔板中培养。将细胞分为药物组、对照组和CIS组。待细胞贴壁后弃上清,药物组分别加入不同浓度MA(10、20、30、40、50、60、70、80 μmol/L),对照组加入完全培养基,CIS组加入CIS(4 μmol/L,用完全培养基稀释),每组设置6个复孔,置于37.5℃、5%CO₂培养箱中培养。分别培养24、36、48 h后,弃培养液,每孔加入100 μL现配的MTT溶液,于培养箱中继续培养3 h,3 h后将MTT溶液吸出,每孔加入100 μL DMSO,避光摇匀,用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值。实验重复3次。以细胞指数作为细胞增殖情况来判断。细胞增殖率=(A_{实验组}-A_{空白})/(A_{溶剂对照}-A_{空白})。

2.4 划痕实验检测细胞迁移能力 在24孔板背面用记号笔画上细的横线,每隔1 cm画一条横线,每孔3条横线,用于后续拍照时定位。制备细胞悬液加入孔中,每孔 1×10^6 ~ 5×10^6 个细胞,细胞几乎完全融合成单层时,准备划痕。取一个200 μL无菌枪头,垂直于上述3条横线划痕,同一次实验尽量使用同一个无菌枪头并保证划痕的宽度一致。弃掉孔中的旧培养基,同时将划痕时产生的细胞碎片吸走。用无菌PBS冲洗2~3次,尽量将悬浮细胞清洗干净。将细胞分为药物组、对照组和CIS组。药物组分别加入不同浓度MA(10、15、20 μmol/L),对照组加入完全培养基,CIS组加入CIS(4 μmol/L,用完全培养基稀释),沿壁轻打入孔板中,每隔12 h拍照记录划痕宽度,拍照时间分别为0 h、12 h、24 h、36 h、48 h,用ImageJ软件测量划痕面积(B),计算迁移率,每组设置5个复孔。实验重复3次。迁移率=(B_{实验组}-B_{空白})/(B_{溶剂对照}-B_{空白})。

2.5 Transwell侵袭小室法(Matrigel侵袭实验)检测细胞侵袭能力 取500 μL无血清细胞悬液(5×10^4 个细胞)置于Matrigel包被的内室(上室),然后加750 μL完全培养基(10%胎牛血清)于下室,细胞沉降4 h后吸出Matrigel胶。将细胞分为药物组、对照组和CIS组。药物组分别加入不同浓度MA(10、15、20 μmol/L),对照组加入完全培养基,CIS组加入CIS(4 μmol/L,用完全培养基稀释),垂直轻打入上室中。培养24 h后取出小室,用棉签轻轻擦掉未穿过膜的细胞,甲醇固定,结晶紫染色,用蒸馏水轻轻地冲洗数次,空气中风干。显微镜下随机选取5个高倍视野计穿过膜的细胞数,以平均数作为穿膜细胞数,每组设置5个复孔,实验重复3次。

2.6 Vimentin、N-cadherin蛋白表达水平 取对数生长期细胞,消化重悬成单个细胞,用60 mm²培养皿(3×10^5 个细胞/皿)待细胞贴壁,长至皿的60%~70%后,将细胞分为药物组、对照组和CIS组。药物组分别加入不同浓度MA(20、40 μmol/L),对照组加入同等体积的完全培养基,CIS组加入CIS(4 μmol/L,用完全培养基稀释),24 h后提取蛋白样品,采用蛋白定量法检测蛋白浓度。取80~100 μg蛋白为上样质量,依据其浓度计算上样体积,即上样量。充分混匀后将样品置于恒温金属浴内,加热变性(100℃,10 min)。制分离胶为10% SDS-PAGE的胶并点样,再通过电转移法将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用含5%脱脂牛奶的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐吐温,洗涤缓冲液(TBST)封闭1 h后,加入相应一抗稀释液(Vimentin、N-cadherin、GAPDH稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜后将羊抗兔或羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗稀释液(1:1 000)在室温下孵育2 h(羊抗兔二抗稀释液用于Vimentin蛋白,羊抗鼠二抗稀释液用于N-cadherin、GAPDH蛋白),最后在Odyssey CLX荧光扫描系统上测定蛋白表达水平。

2.7 动物实验检测MA对裸鼠足垫鼻咽癌移植瘤的影响

2.7.1 构建裸鼠足垫转移瘤模型 用鼻咽癌细胞5-8F构建裸鼠足垫鼻咽癌移植瘤动物模型^[8]。裸鼠适应性喂养3 d,取对数生长期鼻咽癌细胞5-8F,用PBS重悬,调整细胞密度为每毫升 5×10^6 个细胞,用碘伏消毒裸鼠左脚足垫,使用微量注射器以0.5 mL/min的速度将鼻咽癌细胞5-8F悬液注射到裸鼠左脚足垫,每只小鼠注射20 μL细胞悬液,注射1次,制造裸鼠移植瘤模型,注射完毕后缓慢取出注射针,用棉球按压小鼠出血部位30 s。构建动物模型约3周后,肉眼观察裸鼠左后足状态,用手触及左侧腘窝处有肿大淋巴结,且瘤体生长至直径为5 mm表明动物模型构建成功^[8~9]。将造模成功的裸鼠随机分为MA组、对照组、CIS组,每组6只。造模成瘤6 d后给药,MA组MA剂量为30 mg/(kg·d)^[10];对照组给予等体积生理盐水,1次/d,0.1 mL/(kg·d),CIS组CIS剂量为2 mg/(kg·d)^[11]。各组均腹腔注射,连续干预20 d。定期观察小鼠一般状态、肿瘤生长以及腘窝淋巴结肿大情况。停药后采取颈椎脱臼法处死裸鼠,观察肿瘤区域淋巴结转移情况,并计算淋巴结转移率。取受累的淋巴结计数并称量淋巴结质量,拍照后进行HE染色;取裸鼠的肝、肾、脾,称量脏器质量。

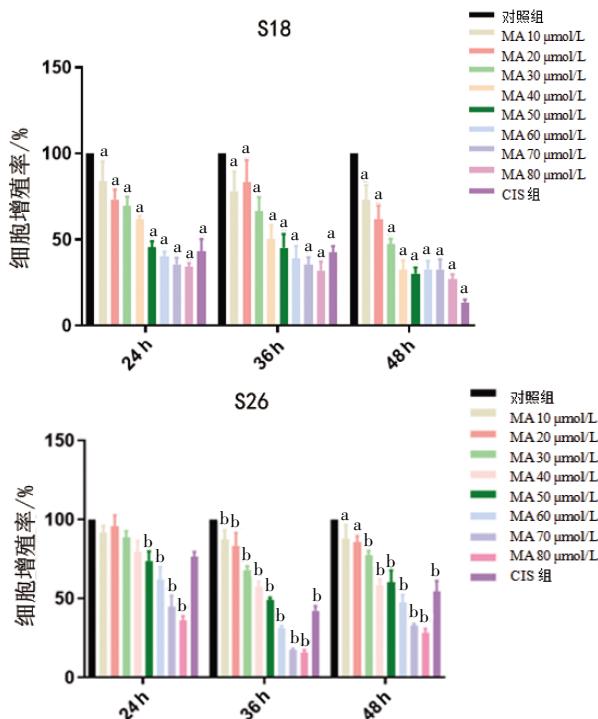
2.7.2 淋巴组织HE染色 使用4%多聚甲醛浸泡淋巴组织,室温过夜,固定淋巴组织;使用75%乙醇浸泡淋巴组织1 h,85%乙醇浸泡淋巴组织1 h,95%乙醇浸泡淋巴组织2 h;使用二甲苯浸泡淋巴组织约10 min至组织变得透明,在液体石蜡溶液中过夜浸泡以脱水处理;使用石蜡组织包埋机将淋巴组织包埋在石蜡中,将淋巴组织切成厚度为5 μm的石蜡切片,并转移至黏附性载玻片上,将黏附性载玻片放置在烤片机(60℃,2 h)至石蜡脱落;组织载玻片放入二甲苯中,3 min/次,3次;放入100%乙醇中,3 min/次,3次;放入95%乙醇溶液中,3 min/次,3次。使用苏木精滴在组织上至完全覆盖组织,染色30 s至3 min,视组织情况决定染色时间,载玻片放入流动的自来水中,放置10~15 min;使用伊红溶液浸泡30 s至3 min,视组织决定染色时间,95%乙醇浸泡3次,3 min/次;使用100%乙醇浸泡3次,3 min/次;二甲苯中浸泡3次,3 min/次,在通风

橱中晾干载玻片。将中性树脂滴在载玻片上,使用盖玻片覆盖,待中性树脂晾干后,放入扫描机扫描拍照。

2.8 统计学方法 采用SPSS 29.0统计软件分析数据,计量资料符合正态分布且方差齐,用“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用LSD检验进行多重比较。计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用GraphPad Prism 9.5.0软件绘制分析图。

3 结 果

3.1 MA对鼻咽癌细胞增殖的影响 干预24、36、48 h后,药物组S18细胞增殖率均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);干预24 h后,药物组(50、60、70、80 $\mu\text{mol/L}$)S26细胞增殖率均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);干预36、48 h后,药物组S26细胞增殖率均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。MA可抑制鼻咽癌细胞增殖,作用呈时间和浓度依赖性。(见图1)



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图1 各组鼻咽癌细胞S18、S26增殖率比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.2 MA对鼻咽癌细胞迁移、侵袭的影响 干预12、24、36、48 h后,药物组鼻咽癌细胞S18、S26迁移率均低于对照组,差异有

统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图2~3)

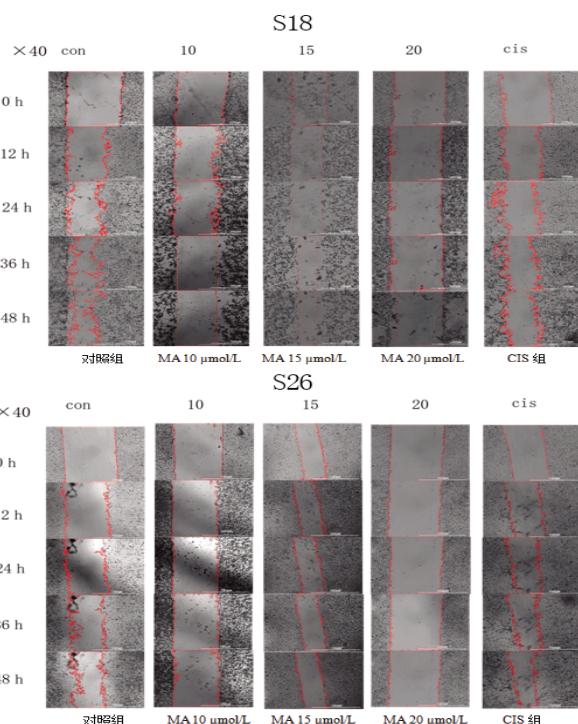
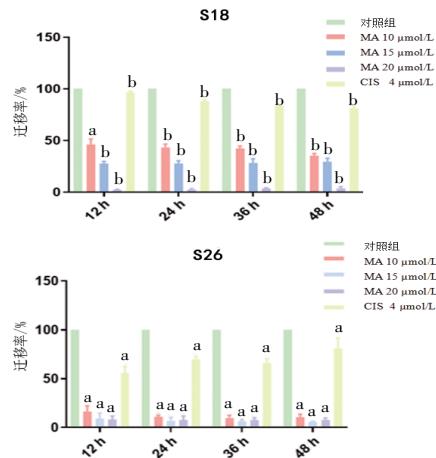


图2 各组划痕实验的镜下结果 ($\times 40$)



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图3 各组鼻咽癌细胞S18、S26迁移率的比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

药物组(15、20 $\mu\text{mol/L}$)S18细胞相对侵袭率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);药物组S26细胞相对侵袭率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图4~5)

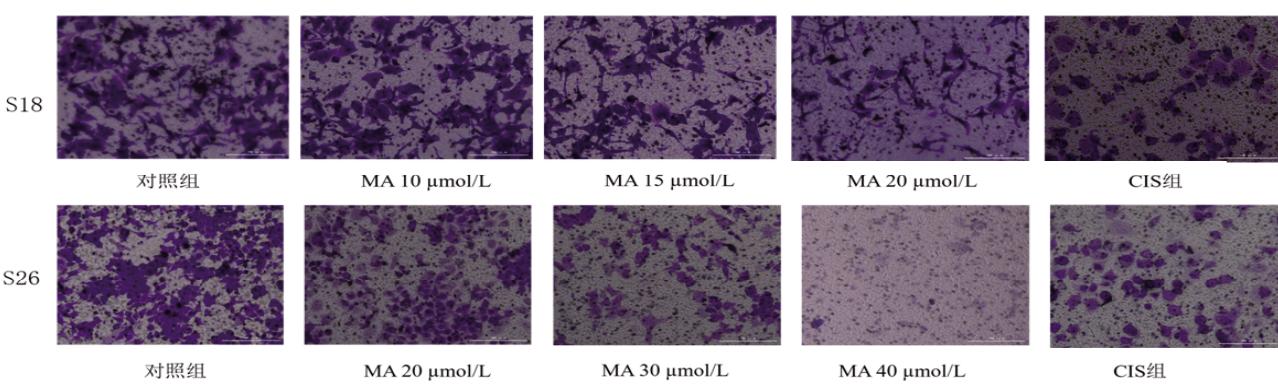
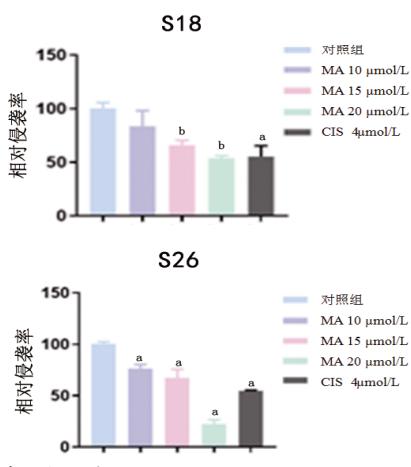


图4 各组Transwell实验的镜下结晶紫染色结果 ($\times 100$)



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图5 各组鼻咽癌细胞S18、S26侵袭率比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.3 MA对鼻咽癌细胞迁移蛋白Vimentin、N-cadherin表达的影响 药物组鼻咽癌细胞S18、S26的Vimentin、N-cadherin蛋白相对表达量低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图6~7)

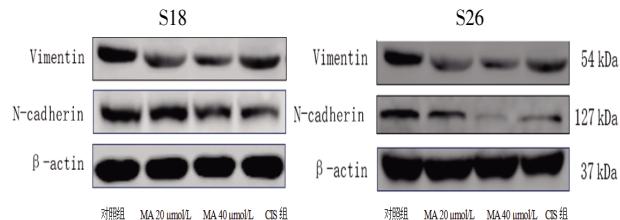
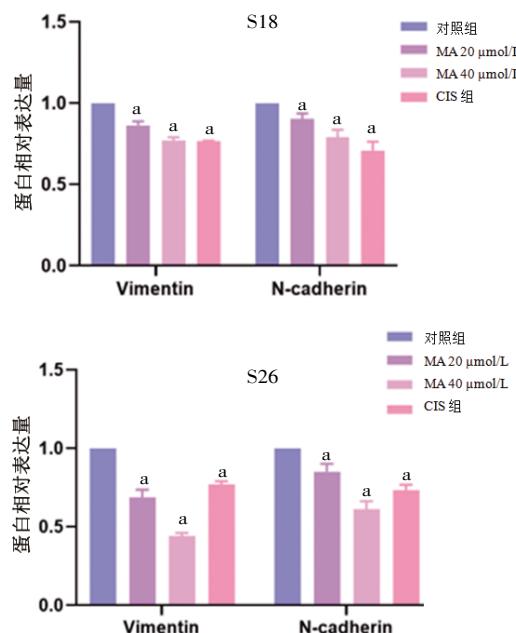


图6 各组鼻咽癌细胞S18、S26的Vimentin、N-cadherin蛋白表达Western blotting图



注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图7 各组鼻咽癌细胞S18、S26的Vimentin、N-cadherin蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.4 MA对鼻咽癌移植瘤生长的影响 MA组、CIS组裸鼠淋巴结转移率均低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表1)裸鼠足垫成瘤模型原发灶体积及淋巴结转移情况见图8A。对照组裸

鼠足垫原发灶的瘤体体积大于MA组、CIS组。(见图8B)MA组、CIS组裸鼠肿瘤质量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。(见图9)MA组裸鼠腹股沟转移淋巴结体积小于对照组。MA组、CIS组裸鼠淋巴结质量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图9)MA组、CIS组裸鼠肝、脾质量均低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);MA组裸鼠肝、脾质量高于CIS组($P<0.05$);CIS组裸鼠肝脏质量低于对照组($P<0.01$),符合顺铂作为标准化疗药物的抗转移特性。对照组裸鼠肾质量与MA组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。病理检测结果显示足掌皮下成瘤后,对照组同侧淋巴结内出现多个转移灶,淋巴结正常组织结构破坏,肿瘤细胞排列紊乱,细胞边界不清或呈不规则裸核;MA组转移灶减少,淋巴结结构渐趋向正常。(见图10)

表1 各组裸鼠淋巴结转移率比较

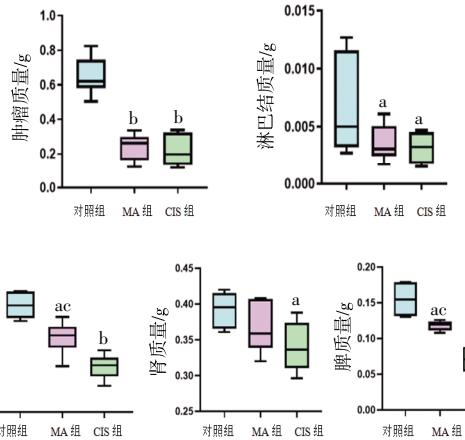
组别	n	转移/只	未转移/只	淋巴结转移率/%
对照组	6	6	0	100.00
MA组	6	5	1	83.33 ^a
CIS组	6	4	2	66.67 ^b
χ^2				8.000
P				0.005

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。



注:A.裸鼠足垫肿瘤模型;B.足垫原发灶瘤体比较的大体图像;C.分离出的转移性腹股沟淋巴结。

图8 裸鼠鼻咽癌移植瘤的生长及淋巴结转移大体图像



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与CIS组比较,^c $P<0.05$ 。

图9 各组裸鼠肿瘤、淋巴结、肝、肾、脾质量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

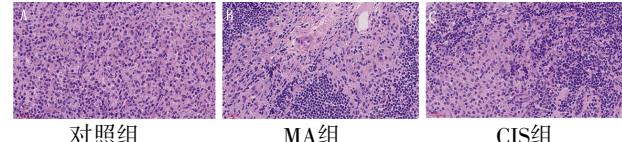


图10 各组裸鼠淋巴结转移变化比较 (HE, $\times 400$)

4 讨 论

MA是一种天然的烷类化合物,具有广泛的抗癌作用,对于治疗肺癌^[12]、宫颈癌^[13-14]、结肠癌^[15]、膀胱癌^[16]、胃癌^[17]、前列腺癌^[18]、胰腺癌^[19]等癌症具有重要作用。山楂酸可以通过诱导细胞凋亡来抑制肺癌95D细胞的增殖,其凋亡通路可能为线粒体凋亡通路^[20]。此外,山楂酸不仅可以抑制肺癌细胞诱导的破骨细胞分化,还可以通过NF-κB通路抑制肺癌细胞的增殖和迁移^[21]。山楂酸能通过线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡,提高凋亡线粒体内膜蛋白(OMA1)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)和cleaved胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达,降低抗凋亡视神经萎缩蛋白1(OPA1)、Bcl-2蛋白水平,从而抑制宫颈癌HeLa细胞的增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡^[22-23]。山楂酸不仅可以通过AMPK/mTOR信号通路抑制结肠癌细胞HCT116与SW480的增殖、迁移^[15],还能通过降低IL-6的表达水平,抑制STAT3的磷酸化,降低抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,促进结肠癌细胞CT26凋亡,抑制其增殖^[24]。研究^[5]表明,MA可抑制鼻咽癌细胞增殖,诱导鼻咽癌细胞凋亡,但机制尚不明确。鼻咽癌易发生淋巴转移,且在临床诊断的病例中,有60%~85%的患者在诊断时已出现转移。转移途径以血行转移和淋巴转移为主^[25-27]。抑制鼻咽癌细胞的迁移和侵袭是亟待解决的问题。

本研究探讨了山楂酸对鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制效应。MMT实验证实MA能抑制鼻咽癌细胞S18、S26增殖,且呈时间、浓度依赖性,提示MA可能通过干预细胞生长来发挥其抑制作用。此外,细胞迁移和侵袭是肿瘤转移的关键步骤,细胞从原发肿瘤部位迁移到其他组织是肿瘤扩散的基础。因此,阐明山楂酸在这一过程中的作用至关重要。划痕实验结果表明,MA可降低鼻咽癌细胞的迁移能力;Transwell实验进一步明确了MA对鼻咽癌细胞侵袭的抑制作用。这表明MA可能通过影响细胞的黏附性和穿透能力来阻止肿瘤细胞的侵袭。Vimentin、N-cadherin是细胞迁移和侵袭过程中的重要生物标志物,两者表达增加会增强多种上皮癌细胞的迁移和侵袭能力^[28-31],且其高表达与肿瘤恶性程度及预后呈现正相关^[32]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是肿瘤细胞从非运动上皮表型转变为迁移性间充质表型的关键过程。Vimentin在EMT期间会上调,从而促进细胞的定向迁移并增强细胞的侵袭能力^[33]。同时,在多种上皮性癌症如前列腺癌、乳腺癌、中枢神经系统肿瘤、恶性黑色素瘤、肺癌^[34]组织中N-cadherin呈过表达状态,且N-cadherin在EMT期间的表达亦上调。本实验结果表明,MA干预后,鼻咽癌细胞Vimentin、N-cadherin蛋白表达降低。

动物实验研究可以评估药物的疗效、安全性和毒性,为临床试验提供重要依据。小鼠足垫有丰富的淋巴管,呈单向淋巴引流,且拥有腘窝淋巴结、髂动脉旁淋巴结和肾门淋巴结等三级淋巴回流,是研究淋巴结转移的理想部位。该模型移植方便、易于观察,移植成功率高,并且便于手术切除局部移植瘤。因此,本实验选择小鼠足垫转移模型进行研究。体内实验结果表明,MA组、CIS组裸鼠肝、脾质量均低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);MA组裸鼠肝、脾质量高于CIS组($P<0.05$)。表

明MA安全性优于顺铂,且MA可抑制肿瘤的生长和淋巴结的转移。

综上所述,山楂酸能抑制鼻咽癌细胞的迁移与侵袭,这与其在其他癌细胞类型中表现出的抗肿瘤活性一致。本实验也存在不足之处,如未明确山楂酸是通过靶向何种信号通路发挥作用,后续研究将进一步探究其作用机制。

参 考 文 献

- [1] ZENG H M, ZHENG R S, GUO Y M, et al. Cancer survival in China, 2003–2005: A population-based study[J]. Int J Cancer, 2015, 136(8):1921–1930.
- [2] KIM Y K, YOON S K, RYU S Y. Cytotoxic triterpenes from stem bark of Physocarpus intermedium[J]. Planta Med, 2000, 66(5):485–486.
- [3] MARTÍN R, CARVALHO-TAVARES J, IBEAS E, et al. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation[J]. Cancer Res, 2007, 67(8):3741–3751.
- [4] 张莉,华毛.解毒利咽汤联合同期放化疗治疗局部晚期鼻咽癌的疗效观察[J].中医药导报,2021,27(9):121–124.
- [5] 周芳亮,胡梅,胡晶,等.山楂酸通过PI3K/Akt/mTOR通路诱导鼻咽癌CNE2细胞自噬研究[J].中草药,2020,51(9):2481–2485.
- [6] WU V W C, KWONG D L W, SHAM J S T. Target dose conformity in 3-dimensional conformal radiotherapy and intensity modulated radiotherapy[J]. Radiother Oncol, 2004, 71(2):201–206.
- [7] LIN X K, OZBEY U, SABITALIYEVICH U Y, et al. Maslinic acid as an effective anticancer agent[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(10):87–91.
- [8] 张瑞,李起,陈晨,等.胆囊癌相关性成纤维细胞促进裸鼠足垫肿瘤淋巴结转移的体内研究[J].西南医科大学学报,2023,46(1):26–30+6.
- [9] 周芳亮,蔺婷,刘洁,等.小檗碱联合人参皂苷Rg3对鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞的干预作用[J].中国药学杂志,2021,56(18):1496–1502.
- [10] JEON S J, KIM E, LEE J S, et al. Maslinic acid ameliorates NMDA receptor blockade-induced schizophrenia-like behaviors in mice[J]. Neuropharmacology, 2017, 126:168–178.
- [11] ZHOU F L, HU J, DAI N, et al. Berberine and ginsenoside Rg3 act synergistically via the MAPK/ERK pathway in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. J Funct Foods, 2020, 66:103802.
- [12] HSIA T C, LIU W H, QIU W W, et al. Maslinic acid induces mitochondrial apoptosis and suppresses HIF-1α expression in A549 lung cancer cells under normoxic and hypoxic conditions[J]. Molecules, 2014, 19(12):19892–19906.

- [13] LU K W, YANG M D, PENG S F, et al. Maslinic acid induces DNA damage and impairs DNA repair in human cervical cancer HeLa cells[J]. Anticancer Res, 2020, 40(12):6869–6877.
- [14] CHEN J W, WANG L. Maslinic acid inhibits cervical intraepithelial neoplasia by suppressing interleukin-6 and enhancing apoptosis in a mouse model[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(3):579–585.
- [15] WEI Q, ZHANG B Y, LI P, et al. Maslinic acid inhibits colon tumorigenesis by the AMPK-mTOR signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(15): 4259–4272.
- [16] ZHANG S L, DING D G, ZHANG X S, et al. Maslinic acid induced apoptosis in bladder cancer cells through activating p38 MAPK signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1–2):281–287.
- [17] WANG D Y, TANG S F, ZHANG Q W. Maslinic acid suppresses the growth of human gastric cells by inducing apoptosis via inhibition of the interleukin-6 mediated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2017, 13(6): 4875–4881.
- [18] HU F, SUN Y X, ZHANG Y F, et al. Maslinic acid induces autophagy and ferroptosis via transcriptomic and metabolomic reprogramming in prostate cancer cells[J]. Front Pharmacol, 2024, 15:1453447.
- [19] YU L, XIE X F, CAO X Y, et al. The anticancer potential of maslinic acid and its derivatives: A review[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15:3863–3879.
- [20] 白雪,张月,李慧,等.山楂酸对肺癌95D细胞增殖、凋亡的影响[J].实用药物与临床,2017,20(7):737–740.
- [21] 王霆,杨兴海,韩帅,等.山楂酸对人肺癌细胞增殖与迁移及其诱导骨细胞分化的调控作用机制研究[J].中国骨与关节杂志,2015,4(9):706–712.
- [22] 胡婉婧,马霞,顾荣华.山楂酸通过促进线粒体凋亡作用抑制宫颈癌HeLa细胞发生发展的体外研究[J].中国妇幼保健,2021,36(8):1881–1885.
- [23] 张潇迪,刘珏,张群峰,等.山楂酸通过调控OMA1介导的线粒体凋亡途径诱导宫颈癌HeLa细胞凋亡[J].世界科学技术—中医药现代化,2023,25(10):3230–3237.
- [24] 李智,陈莉.基于IL-6/STAT3信号通路探讨山楂酸对小鼠结肠癌CT26细胞增殖、凋亡的影响[J].药学研究,2024,43(1):15–18,29.
- [25] 刘懿炜,王钢,周子博,等.影像学方法在鼻咽癌颈淋巴结转移诊断中的应用进展[J].分子影像学杂志,2024,47(7): 764–768.
- [26] LIN M, ZHANG X L, YOU R, et al. Evolutionary route of nasopharyngeal carcinoma metastasis and its clinical significance[J]. Nat Commun, 2023, 14(1):610.
- [27] YEUNG D C M, YEUNG Z, WONG E W Y, et al. Neck lymph node status on survival of regionally recurrent or persistent nasopharyngeal carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):5622.
- [28] LI G, SATYAMOORTHY K, HERLYN M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(9): 3819–3825.
- [29] ISLAM S, CAREY T E, WOLF G T, et al. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion[J]. J Cell Biol, 1996, 135(6 Pt 1): 1643–1654.
- [30] SHINTANI Y, HOLLINGSWORTH M A, WHEELOCK M J, et al. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression[J]. Cancer Res, 2006, 66(24):11745–11753.
- [31] KLYMENKO Y, KIM O, LOUGHREN E, et al. Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis[J]. Oncogene, 2017, 36(42):5840–5851.
- [32] 潘燕,韩婧,张晔,等.Vimentin在肿瘤转移中的作用及药物研究进展[J].生理科学进展,2010,41(6):413–416.
- [33] PHUA D C Y, HUMBERT P O, HUNZIKER W. Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(12): 2841–2855.
- [34] SATELLI A, LI S L. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(18):3033–3046.

(收稿日期:2025-02-24 编辑:蒋凯彪)