和厚朴酚对宫颈癌细胞血管生成拟态及上皮间质转化的影响

江晓聪，潘秀花，蔡文娟，张 弛，蓝玉宏
（惠州市中心人民医院肿瘤放疗科，广东惠州 516001）

摘要：目的 探讨和厚朴酚调节表皮生长因子受体（epithelial growth factor receptor，EGFR）信号通路对宫颈癌细胞血管生成拟态（vasculogenic mimicry，VM）和上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）的影响。**方法** 将宫颈癌 HeLa 细胞分为对照组、和厚朴酚低、中、高剂量组、和厚朴酚＋ NSC228155 组以及西妥昔单抗组；采用 Transwell 小室检测细胞侵袭；划痕试验检测细胞迁移；三维培养 HeLa 细胞并进行高碘酸希夫染色，观察 VM 形成情况；采用蛋白质印迹法和实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞中的蛋白和基因表达。**结果** 与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞侵袭数目、划痕愈合率、环状结构数、磷酸化 EGFR（phosphorylation EGFR，p-EGFR）/EGFR、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）2、MMP9、促红细胞生成素肝细胞受体（erythropoietin-producing hepatocyte receptor，Eph）A2、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、神经钙黏蛋白（neural cadherin，CDH2）以及波形蛋白表达均降低，而上皮钙黏蛋白（epithelial cadherin，CDH1）表达升高（$P < 0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋ NSC228155 组 HeLa 细胞侵袭数目、划痕愈合率、环状结构数、p-EGFR/EGFR、MMP2、MMP9、EphA2、VEGF、CDH2 以及波形蛋白表达均升高，而 CDH1 表达降低（$P < 0.01$）。**结论** 和厚朴酚可能通过抑制 EGFR 信号通路抑制宫颈癌细胞 VM 形成和 EMT。

关键词：和厚朴酚；宫颈癌；血管生成拟态；上皮间质转化；表皮生长因子受体
中图分类号：R737.3 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）09-0922-11
DOI：10.13683/j.wph.2023.09.006

Effects of honokiol on vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells

JIANG Xiaocong, PAN Xiuhua, CAI Wenjuan, ZHANG Chi, LAN Yuhong
(*Department of Tumor Radiotherapy, Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, Guangdong Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of honokiol on vasculogenic mimicry (VM) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cervical cancer cells by regulating epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway. ***Methods*** HeLa cervical cancer cells were divided into control group, honokiol low-dose, medium-dose and high-dose groups, honokiol＋NSC228155 group, and cetuximab group. Transwell chambers were used to detect cell invasion. Scratch assay was applied to detect cell migration. Periodic acid-Schiff was used to observe the formation of VM in HeLa cells. Western blot and quantitative real time fluorescent polymerase chain reaction were applied to detect the protein and gene expression in cells. ***Results*** Compared with the control group, the number of HeLa cell invasion, scratch healing rate, number of ring structures, the ratio of phosphorylated EGFR (p-EGFR)/EGFR, the expression of matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP9, erythropoietin-producing hepatocyte receptor (Eph)A2, vascular endothelial growth factor (VEGF), neural cadherin (CDH2) and vimentin in the low, medium and high dose honokiol groups were decreased, and the expression of epithelial cadherin (CDH1) was increased ($P<0.01$). Compared with the high-dose honokiol group, the number of invasion, scratch healing rate, number of ring structures, the ratio of p-EGFR/EGFR, the expression of MMP2, MMP9, EphA2, VEGF, CDH2 and Vimentin in the honokiol＋NSC228155 group were increased, and the expression of CDH1 was

收稿日期：2022-08-24；修回日期：2023-03-02
作者简介：江晓聪，副主任医师，研究方向：妇科肿瘤。
基金项目：惠州市科技计划项目（20200411）

decreased（$P<0.01$）. ***Conclusion*** Honokiol may inhibit VM formation and EMT of cervical cancer cells by inhibiting the EGFR signaling pathway.

Key words: honokiol; cervical cancer; vasculogenic mimicry; epithelial-mesenchymal transition; epithelial growth factor receptor

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一，2020 年全球约有 60.4 万例新发病例，34.2 万例患者死亡[1]。目前，宫颈癌的治疗方法有手术、放化疗以及靶向免疫治疗等，但由于其易转移，疗效并不理想[2]。血管生成拟态（vasculogenic mimicry，VM）是一种新型恶性肿瘤供血模型，可为肿瘤细胞的快速生长提供足够的血供，并且 VM 的结构特点可使肿瘤细胞与血液循环直接接触，促进肿瘤的侵袭和转移[3—4]。同时，上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）相关转录因子在 VM 形成肿瘤细胞中高度上调[5—6]。以往的抗血管生成治疗只针对血管内皮细胞，并未显著影响 VM。因此，寻找新的药物靶点意义重大。

和厚朴酚是一种双酚化合物，具有抑制肿瘤细胞增殖分化、血管生成以及转移等作用[7]。研究表明，和厚朴酚可通过上调血小板反应蛋白 2 抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭[8]。表皮生长因子受体（epithelial growth factor receptor，EGFR）是宫颈癌的一个关键治疗靶点[9]，其对 VM 具有促进作用，激活 EGFR 信号通路可诱导 VM 促进鼻咽癌转移[10]。据报道，和厚朴酚可抑制 EGFR 信号发挥抗恶性肿瘤活性、增强 EGFR 抑制剂的抗肿瘤作用[11]。现探讨和厚朴酚调节 EGFR 信号通路对宫颈癌细胞 VM 和 EMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞株购自美国典型培养物保藏中心细胞库。和厚朴酚（纯度：98%，PB547）购自北京普非生物科技有限公司；EGFR 抑制剂西妥昔单抗（HY-P9905）以及 EGFR 激活剂 NSC228155（纯度≥ 98.0%，HY-101084）均购自美国 MedChem Express 公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（C0256）、青 - 链霉素混合液（C0222）购自上海碧云天生物科技有限公司；DMEM 培养基（C11995500BT）购自美国 Gibco 公司；基质胶（354234）、糖原高碘酸希夫（periodic acid-Schiff，PAS）染色液（G1360）、磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS，P1020）、放射免疫沉淀试验（radio immunoprecipitation assay，RIPA）裂解液（R0010）以及聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（0.22 μm，ISEQ00010）均购自北京索莱宝生物科技有限公司；兔源一抗磷酸化 EGFR（phosphorylation EGFR，p-EGFR，ab40815）、EGFR（ab52894）、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）2（ab92536）、MMP9（ab76003）、促红细胞生成素肝细胞受体（erythropoietin-producing hepatocyte receptor，Eph）A2（ab185156）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF，ab32152）、上皮钙黏蛋白（epithelial cadherin，CDH1）（ab231303）、神经钙黏蛋白（neural cadherin，CDH2）（ab76057）、波形蛋白（ab45939）、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH，ab181602）以及辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔二抗（ab288151）均购自英国 Abcam 公司；TRIzol 试剂（9109）、PrimeScript RT 试剂盒（RR037Q）、SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（DRR081）均购自日本 Takara 公司；BX51 光学显微镜购自日本 Olympus 公司；移液器枪头（200 μl，上海净信实业发展有限公司）；ABI Prism 7500 型实时荧光定量聚合酶链反应（real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）仪（美国 ABI 公司）。

1.2 细胞培养

将 HeLa 细胞置于含 10% FBS、100 U/ml 青链

霉素的DMEM培养基中，在37 ℃、5%二氧化碳的稳定环境下常规培养，定期观察，每1～2 d更换一次培养基，当细胞融合度达到85%以上时，消化传代，收集对数期的细胞进行试验。

1.3 细胞分组与干预

将宫颈癌细胞HeLa分为对照组（正常培养）、和厚朴酚低剂量组（5 μg/ml）、和厚朴酚中剂量组（10 μg/ml）、和厚朴酚高剂量组（20 μg/ml）[8]、西妥昔单抗组（100 μg/ml）[12]、和厚朴酚＋NSC228155组（20 μg/ml和厚朴酚＋10 μg/ml NSC228155）[13]，干预24 h后，收集细胞，进行后续试验。

1.4 方法

1.4.1 Transwell小室试验检测细胞侵袭

将基质胶包被在上室，并向上室加入无血清的HeLa细胞重悬液100 μl，下室加入含10% FBS的DMEM培养基。在37 ℃、5%二氧化碳下孵育24 h后，取出Transwell小室，弃去孔中的培养基，用棉签轻轻擦去上部未侵袭的细胞，并用PBS洗涤。然后将细胞用甲醇固定30 min，0.1%结晶紫染色20 min。在光学显微镜下计数。

1.4.2 划痕试验检测细胞迁移

取各组细胞，置于37 ℃、5%二氧化碳培养箱中培养24 h后，采用移液器枪头进行划痕，显微镜下记0 h细胞的划痕宽度为W_0，记24 h时细胞的划痕宽度为W_{24}。划痕愈合率＝（W_0－W_{24}）/W_0×100%。

1.4.3 HeLa细胞三维培养及PAS染色

在96孔板中加入预先于4 ℃解冻的基质胶，每孔60 μl，置于37 ℃培养箱中凝固2 h。消化处于对数期的HeLa细胞，分组处理后调整细胞密度为1×10^4个/孔，将细胞悬液沿孔壁缓慢加入，37 ℃继续培养，10 h后在BX51光学显微镜下观察并拍照。

将上述细胞进行糖原PAS染色。弃去孔板中的培养液，固定液固定15 min，蒸馏水冲洗；加入过碘酸溶液室温氧化15 min，蒸馏水冲洗；加入希夫试剂，于室温阴暗处浸染15 min，后用进行2次亚硫酸钠滴洗，每次2 min，蒸馏水冲洗，苏木精复染2 min，蒸馏水冲洗，显微镜下观察计数。

1.4.4 蛋白质印迹法（western blot，WB）检测相关蛋白表达

利用RIPA裂解液提取HeLa细胞总蛋白。采用电泳分离蛋白，100 V恒压转移蛋白至PVDF膜上，用5%的脱脂牛奶封闭2 h，将膜与一抗p-EGFR、EGFR、MMP2、MMP9、EphA2、VEGF、CDH1、CDH2、波形蛋白以及GAPDH，在4 ℃孵育过夜，再将膜与HRP偶联的羊抗兔二抗在室温环境下孵育2 h，弃去液体，洗涤3次，加入增强型化学发光试剂观察WB结果，Image J软件评估蛋白的灰度值。

1.4.5 RT-qPCR检测

使用TRIzol试剂从细胞中分离总RNA，使用PrimeScript RT试剂盒将总RNA逆转录成互补DNA（complementary DNA，cDNA）。以cDNA为模板使用特异性引物，通过SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒在PCR系统进行RT-qPCR检测。反应系统总体积20 μl：SYBR Premix Ex TaqTM（2×）10 μl、0.8 μl PCR正反向引物各10 μm、2 μl cDNA（200 ng/μl）和6.4 μl超纯水。热循环条件如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，55 ℃退火10 s，72 ℃延伸15 s，共计40个循环。GAPDH为内参对照。使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法计算信使RNA（messenger RNA，mRNA）的相对表达量。见表1。

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 7.0软件分析数据。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间的比较采用单因素方差分析，进一步两组间的比较采用SNK-q检验。校正检验水准$\alpha=0.01$，以$P<0.01$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组HeLa细胞侵袭情况比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组HeLa细胞侵袭数目明显减少（$P<0.01$）；与和厚朴

酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞侵袭数目显著增多（$P < 0.01$），西妥昔单抗组 HeLa 细胞侵袭数目显著减少（$P < 0.01$），见表 2、图 1。

2.2 各组 HeLa 细胞迁移能力比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞划痕愈合率明显降低（$P < 0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞划痕愈合率显著升高（$P < 0.01$），西妥昔单抗组 HeLa 细胞划痕愈合率显著降低（$P < 0.01$），见表 3 和图 2。

2.3 各组 HeLa 细胞 VM 形成情况比较

对照组 HeLa 细胞大量黏附，可观察到其发生变形并彼此连接，形成网格样和环状结构，说明 VM 形成。相较对照组，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞环状结构数明显减少（$P < 0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞环状结构数增多（$P < 0.01$），西妥昔单抗组 HeLa 细胞环状结构数减少（$P < 0.01$），见表 4 和图 3。

2.4 各组细胞中 EGFR 通路和侵袭、迁移相关蛋白表达比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
EGFR	GGTCTTGAAGGCTGTCCAACG	CCTCAAGAGAGCTTGGTTGGG
MMP2	TACAGGATCATTGGCTACACACC	GGTCACATCGCTCCAGACT
MMP9	TGTACCGCTATGGTTACACATCG	GGCAGGGACAGTTGCTTCT
EphA2	TGGCTCACACACCCGTATG	GTCGCCAGACATCACGTTG
VEGF	GCCTTAGGACACCATACCGATG	GCTGCCCCAGGGAACAAAGTTG
CDH1	CTGTGCCCAGCCTCCATGTTTT	CTGGATAGCTGCCCATTGCAAGTTA
CDH2	AGCCAACCTTAACTGAGGAGT	GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
波形蛋白	GTTGACAATGCGTCTCTGGC	CGATTAGGACAGCTGTTCCT
GAPDH	CCGTTGAATTTGCCGTGA	TGATGACCCTTTGGCTCCC

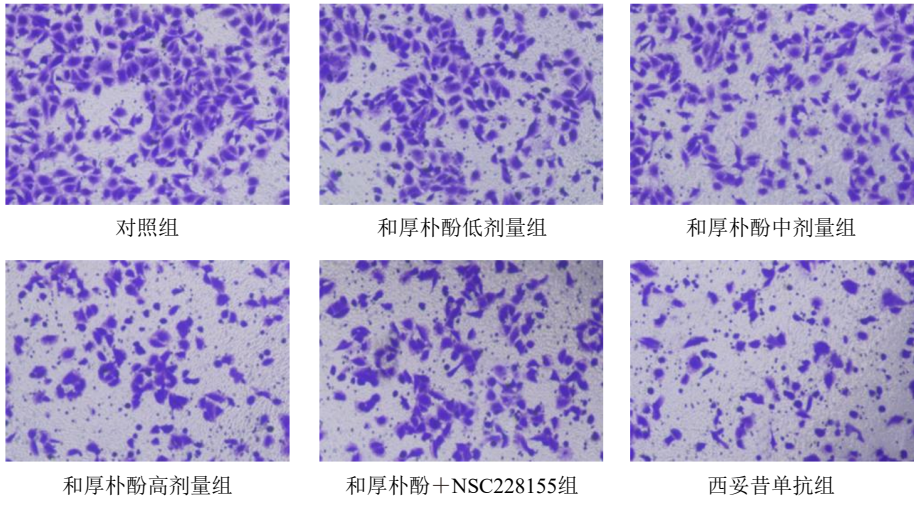


图 1 各组 HeLa 细胞侵袭情况比较（×200）

Figure 1 Comparison of HeLa cell invasion in each group（×200）

表 2 各组 HeLa 细胞侵袭数目比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Comparison of HeLa cell invasion numbers in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	细胞侵袭数目/个
对照组	215.64±6.32
和厚朴酚低剂量组	183.72±6.14*
和厚朴酚中剂量组	154.56±5.25*#
和厚朴酚高剂量组	119.83±5.13*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	137.48±5.24△
西妥昔单抗组	86.35±4.12△
*F*值	433.087
*P*值	＜0.001

注：较对照组，*$P<0.01$；较和厚朴酚低剂量组，#$P<0.01$；较和厚朴酚中剂量组，▲$P<0.01$；较和厚朴酚高剂量组，△$P<0.01$。

Note: *vs* control group, *$P<0.01$; *vs* honokiol low-dose group, #$P<0.01$; *vs* honokiol medium-dose group, ▲$P<0.01$; *vs* honokiol high-dose group, △$P<0.01$.

表 3 各组 HeLa 细胞划痕愈合率比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 3 Comparison of scratch healing rate of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	划痕愈合率/%
对照组	48.75±3.16
和厚朴酚低剂量组	39.32±2.45*
和厚朴酚中剂量组	31.65±2.23*#
和厚朴酚高剂量组	18.46±2.14*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	24.58±2.17△
西妥昔单抗组	11.24±1.35△
*F*值	213.188
*P*值	＜0.001

注：较对照组，*$P<0.01$；较和厚朴酚低剂量组，#$P<0.01$；较和厚朴酚中剂量组，▲$P<0.01$；较和厚朴酚高剂量组，△$P<0.01$。

Note: *vs* control group, *$P<0.01$; *vs* honokiol low-dose group, #$P<0.01$; *vs* honokiol medium-dose group, ▲$P<0.01$; *vs* honokiol high-dose group, △$P<0.01$.

HeLa 细胞中 p-EGFR/EGFR、MMP2、MMP9 表达明显降低（$P<0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞 p-EGFR/EGFR、MMP2 以及 MMP9 表达明显升高（$P<0.01$），西妥昔单抗组 HeLa 细胞 p-EGFR/EGFR、MMP2 以及 MMP9 表达明显降低（$P<0.01$），见表 5 和图 4。

2.5 各组细胞中 EGFR 通路和侵袭、迁移相关基因表达比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞中 EGFR mRNA、MMP2 mRNA 以及 MMP9 mRNA 表达明显降低（$P<0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞中 EGFR mRNA、MMP2 mRNA 以及 MMP9 mRNA 表达明显升高（$P<0.01$），西妥昔单抗组 HeLa 细胞中 EGFR mRNA、MMP2 mRNA 以及 MMP9 mRNA 表达明显降低（$P<0.01$），见表 6。

表 4 各组 HeLa 细胞 VM 情况比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 4 Comparison of VM of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	环状结构数/个
对照组	86.34±4.12
和厚朴酚低剂量组	75.26±4.05*
和厚朴酚中剂量组	62.75±3.24*#
和厚朴酚高剂量组	43.85±2.43*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	54.52±3.15△
西妥昔单抗组	25.94±2.17△
*F*值	264.224
*P*值	＜0.001

注：较对照组，*$P<0.01$；较和厚朴酚低剂量组，#$P<0.01$；较和厚朴酚中剂量组，▲$P<0.01$；较和厚朴酚高剂量组，△$P<0.01$。

Note: *vs* control group, *$P<0.01$; *vs* honokiol low-dose group, #$P<0.01$; *vs* honokiol medium-dose group, ▲$P<0.01$; *vs* honokiol high-dose group, △$P<0.01$.

2.6 各组细胞中 VM 和 EMT 相关蛋白表达比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞中 EphA2、VEGF、CDH2 以及波形蛋白表达显著降低，CDH1 表达明显升高（$P<0.01$）；与和厚朴酚高剂量组比较，和厚朴酚＋NSC228155 组 HeLa 细胞中 EphA2、VEGF、CDH2、波形蛋白表达明显升高，CDH1 表达明显降低，西妥昔单抗组 HeLa 细胞中 EphA2、VEGF、CDH2 以及波形蛋白表达明显降低（$P<0.01$），CDH1 表达明显升高（$P<0.01$），见表 7 和图 5。

2.7 各组细胞中 VM 和 EMT 相关基因表达比较

与对照组比较，和厚朴酚低、中、高剂量组 HeLa 细胞中 EphA2 mRNA、VEGF mRNA、CDH2 mRNA、波形蛋白 mRNA 表达显著降低，CDH1 mRNA 表达明显升高（$P<0.01$）；与和厚朴酚高剂

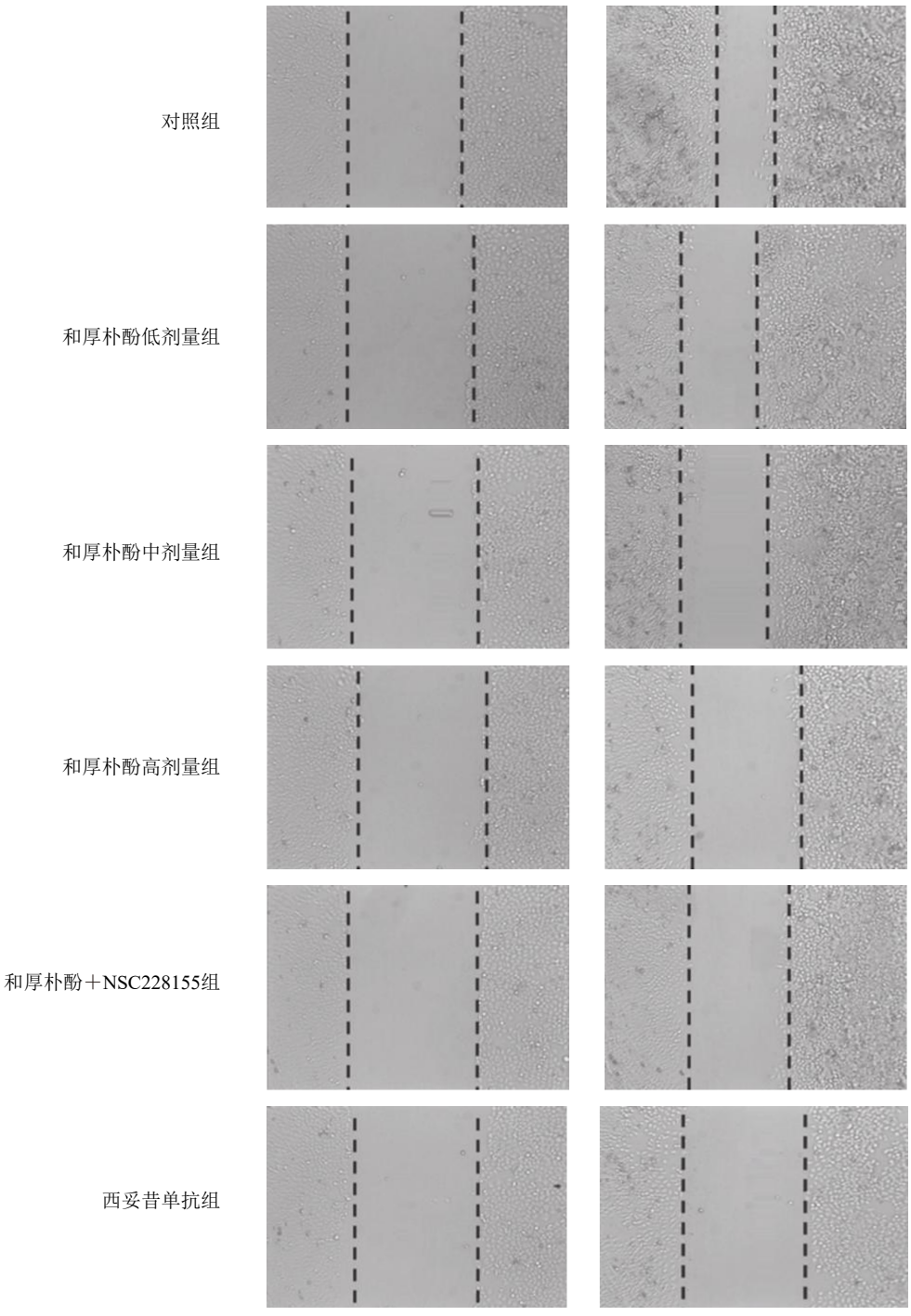


图 2　划痕试验检测 HeLa 细胞迁移

Figure 2　HeLa cell migration detected by scratch test

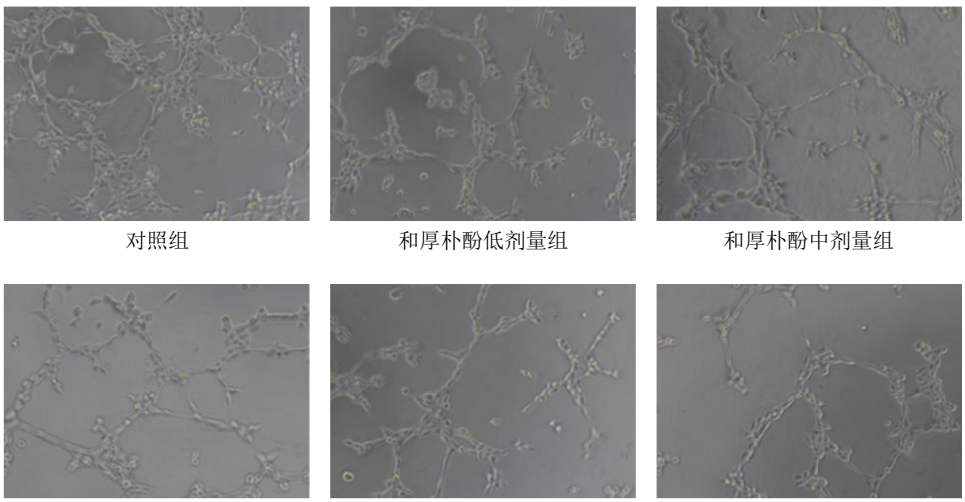


图 3　各组 HeLa 细胞 VM 形成情况

Figure 3　Formation of VM in HeLa cells in each group

表 5　各组 HeLa 细胞中 EGFR 通路相关蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 5　Comparison of EGFR pathway related protein expression of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	p-EGFR/EGFR	MMP2/GAPDH	MMP9/GAPDH
对照组	0.78±0.07	1.38±0.11	1.23±0.10
和厚朴酚低剂量组	0.59±0.05*	1.17±0.09*	1.09±0.08*
和厚朴酚中剂量组	0.48±0.06*#	0.86±0.07*#	0.83±0.05*#
和厚朴酚高剂量组	0.36±0.04*#▲	0.58±0.05*#▲	0.53±0.04*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	0.54±0.05△	0.72±0.06△	0.68±0.06△
西妥昔单抗组	0.23±0.03△	0.45±0.04△	0.37±0.03△
*F*值	81.420	124.787	155.890
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*P＜0.01；较和厚朴酚低剂量组，#P＜0.01；较和厚朴酚中剂量组，▲P＜0.01；较和厚朴酚高剂量组，△P＜0.01。

Note: *vs* control group, *P＜0.01; *vs* honokiol low-dose group, #P＜0.01; *vs* honokiol medium-dose group, ▲P＜0.01; *vs* honokiol high-dose group, △P＜0.01.

表 6　各组 HeLa 细胞中 EGFR 通路相关基因表达比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 6　Comparison of EGFR pathway related gene expression of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	*EGFR*	*MMP2*	*MMP9*
对照组	1.00±0.08	1.01±0.10	1.03±0.11
和厚朴酚低剂量组	0.74±0.06*	0.84±0.09*	0.85±0.10*
和厚朴酚中剂量组	0.61±0.07*#	0.63±0.07*#	0.66±0.08*#
和厚朴酚高剂量组	0.45±0.05*#▲	0.41±0.06*#▲	0.43±0.05*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	0.68±0.07△	0.54±0.08△	0.55±0.07△
西妥昔单抗组	0.29±0.04△	0.30±0.04△	0.31±0.05△
*F*值	90.341	73.557	67.066
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*P＜0.01；较和厚朴酚低剂量组，#P＜0.01；较和厚朴酚中剂量组，▲P＜0.01；较和厚朴酚高剂量组，△P＜0.01。

Note: *vs* control group, *P＜0.01; *vs* honokiol low-dose group, #P＜0.01; *vs* honokiol medium-dose group, ▲P＜0.01; *vs* honokiol high-dose group, △P＜0.01.

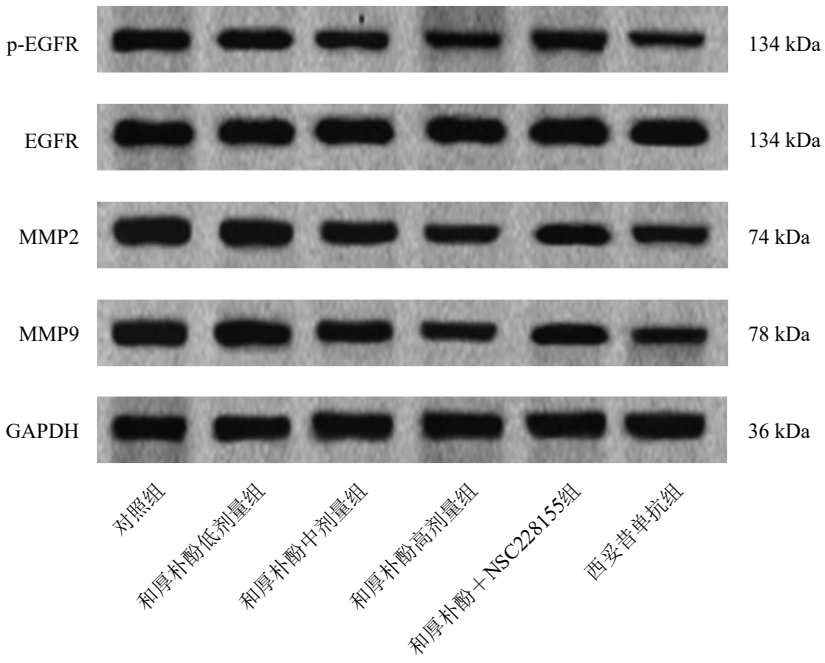


图 4　WB 检测 HeLa 细胞中 EGFR 通路相关蛋白表达

Figure 4　Expression of EGFR pathway related proteins of HeLa cells detected by WB

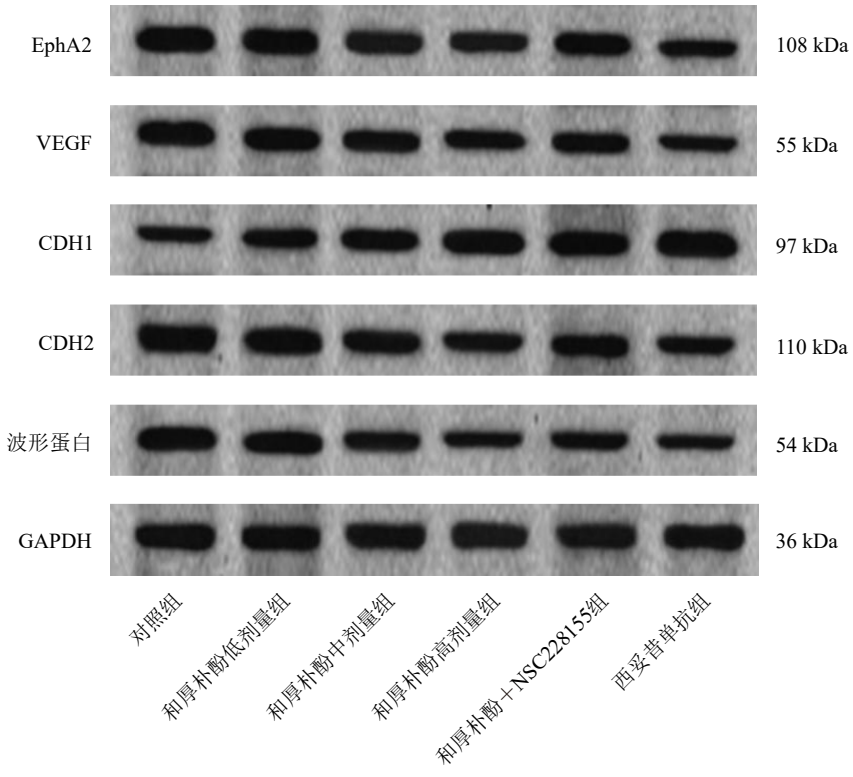


图 5　WB 检测 HeLa 细胞中 VM 和 EMT 相关蛋白表达

Figure 5　Expression of VM and EMT related proteins of HeLa cells detected by WB

量组比较，和厚朴酚＋NSC228155组HeLa细胞中EphA2 mRNA、VEGF mRNA、CDH2 mRNA以及波形蛋白mRNA表达明显升高，CDH1 mRNA表达明显降低，西妥昔单抗组HeLa细胞中EphA2 mRNA、VEGF mRNA、CDH2 mRNA以及波形蛋白mRNA表达明显降低（$P < 0.01$），CDH1 mRNA表达明显升高（$P < 0.01$），见表8。

3 讨论

在肿瘤发生发展过程中，血液提供的氧气和营养物质是必不可少的。VM与经典肿瘤血管生成模式不同，是由肿瘤细胞通过自身变形所形成的血管内衬，内有一层PAS阳性基膜样物质的不规则血管样管道，其内有时可见红细胞，与周围血管相连通，为肿瘤组织提供足够的血液供应[14]。由于其独特的结构，肿瘤细胞与血液直接接触，这大大增加了癌细胞通过血液循环发生远处转移的风险[15]。

和厚朴酚具有抗炎、抗肿瘤等作用[16]。其可通过抑制核因子-κB途径，下调VEGF的表达而抑制肺癌细胞的血管生成[17]，还可通过抑制EMT抑制膀胱癌细胞侵袭[18]。和厚朴酚可抑制HeLa细胞侵袭和迁移，且呈剂量依赖。在VM中，肿瘤细胞可模仿内皮细胞的生物学行为，表达VEGF、EphA2以及MMP等多种与内皮细胞相关的基因[19]。EMT是上皮细胞向间质细胞表型转变的过程，是VM形成和肿瘤转移的重要因素[20]。CDH1可以形成蛋白复合体并与肌动蛋白细胞骨架相连接，其表达减少

表7 各组HeLa细胞中VM和EMT相关蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

Table 7 Expression of VM and EMT related proteins of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	EphA2/GAPDH	VEGF/GAPDH	CDH1/GAPDH	CDH12/GAPDH	波形蛋白/GAPDH
对照组	1.26±0.10	1.17±0.09	0.36±0.04	1.34±0.11	1.08±0.09
和厚朴酚低剂量组	1.08±0.07*	0.95±0.08*	0.52±0.05*	1.12±0.08*	0.87±0.06*
和厚朴酚中剂量组	0.84±0.05*#	0.76±0.06*#	0.78±0.06*#	0.86±0.06*#	0.63±0.04*#
和厚朴酚高剂量组	0.57±0.04*#▲	0.51±0.05*#▲	1.04±0.07*#▲	0.58±0.05*#▲	0.42±0.03*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	0.72±0.06△	0.64±0.07△	0.91±0.05△	0.74±0.07△	0.53±0.05△
西妥昔单抗组	0.44±0.05△	0.38±0.04△	1.16±0.08△	0.45±0.04△	0.31±0.03△
*F*值	137.254	112.052	157.914	129.203	170.182
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*$P < 0.01$；较和厚朴酚低剂量组，#$P < 0.01$；较和厚朴酚中剂量组，▲$P < 0.01$；较和厚朴酚高剂量组，△$P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* honokiol low-dose group, #$P < 0.01$; *vs* honokiol medium-dose group, ▲$P < 0.01$; *vs* honokiol high-dose group, △$P < 0.01$.

表8 各组HeLa细胞中VM和EMT相关基因表达（$\bar{x}\pm s$）

Table 8 Expression of VM and EMT related genes of HeLa cells in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	*EphA2*	*VEGF*	*CDH1*	*CDH2*	波形蛋白
对照组	1.00±0.07	1.02±0.10	1.01±0.14	1.00±0.09	1.03±0.12
和厚朴酚低剂量组	0.83±0.08*	0.80±0.09*	1.42±0.18*	0.81±0.08*	0.79±0.09*
和厚朴酚中剂量组	0.67±0.07*#	0.64±0.07*#	2.18±0.23*#	0.62±0.07*#	0.57±0.06*#
和厚朴酚高剂量组	0.44±0.05*#▲	0.40±0.06*#▲	2.89±0.25*#▲	0.42±0.05*#▲	0.39±0.05*#▲
和厚朴酚＋NSC228155组	0.58±0.07△	0.55±0.06△	2.51±0.22△	0.59±0.07△	0.54±0.07△
西妥昔单抗组	0.32±0.04△	0.28±0.04△	3.32±0.27△	0.30±0.05△	0.26±0.04△
*F*值	89.314	81.860	95.984	79.552	79.002
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*$P < 0.01$；较和厚朴酚低剂量组，#$P < 0.01$；较和厚朴酚中剂量组，▲$P < 0.01$；较和厚朴酚高剂量组，△$P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* honokiol low-dose group, #$P < 0.01$; *vs* honokiol medium-dose group, ▲$P < 0.01$; *vs* honokiol high-dose group, △$P < 0.01$.

是产生 EMT 的重要标志 [21]。CDH2 在 EMT 过程中可取代上皮细胞黏附连接蛋白，波形蛋白负责维持细胞骨架的完整性，其表达升高可促进 EMT[22]。本研究结果显示，和厚朴酚可抑制 HeLa 细胞的 VM 和 EMT。

EGFR 通路是癌变过程中的常见通路，可激活一系列下游信号通路发挥相应的生物学效应。此外，EGFR 在 VM 的形成过程中起着重要的促进作用。研究显示，VM 阳性胶质瘤患者的 EGFR 阳性率显著高于 VM 阴性患者 [23]。抗 EGFR 疗法被认为是宫颈癌治疗的有效靶点，阻断该通路可抑制宫颈癌细胞的生长和转移 [24]。Shin 等 [25] 的研究显示，抗 EGFR 抗体可抑制血管生成和 VM 形成，减少三阴性乳腺癌转移。西妥昔单抗会破坏肿瘤细胞的 VM 形成能力 [26]。另有报道显示，对 EGFR 信号通路的抑制作用是和厚朴酚发挥抗肿瘤活性的重要机制 [27]。本研究结果显示，EGFR 信号通路和 VM 在接受 EGFR 抑制剂西妥昔单抗以及不同剂量和厚朴酚治疗组中受到显著抑制，提示和厚朴酚可能通过抑制 EGFR 通路而抑制 VM 形成和 EMT。

4 结论

综上所述，和厚朴酚可能通过抑制 EGFR 信号通路抑制宫颈癌细胞 VM 形成和 EMT，后续将对 EGFR 下游信号通路进行探索。

参考文献：

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al*. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 张蕾, 黄华明, 周杰, 等. 原花青素对宫颈癌HeLa细胞上皮间质转化的抑制作用[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1733-1740.

[3] 聂美楠, 王桂梅, 郭梦凡, 等. ZEB1蛋白免疫组化表达和宫颈癌上皮细胞-间质转化及血管生成拟态的关系[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(10): 1347-1350.

[4] 陈国斌, 李卫红, 梁文倩, 等. 缺氧诱导因子-1α和血管生成拟态在宫颈癌中表达的变化及其意义[J]. 海南医学, 2018, 29(7): 955-957.

[5] Zhang D, Sun B, Zhao X, *et al*. Twist1 accelerates tumour vasculogenic mimicry by inhibiting Claudin15 expression in triple-negative breast cancer[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13): 7163-7174.

[6] Shuai Q, Cao L, Qin Z, *et al*. VE-cadherin fusion protein substrate enhanced the vasculogenic mimicry capability of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Mater Chem B, 2020, 8(8): 1699-1712.

[7] 李杰, 秦涛, 武帅, 等. 和厚朴酚通过SMAD2/3通路抑制胰腺癌KPC小鼠肿瘤生长及其原代细胞的侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(13): 2326-2331.

[8] 陈佳权, 赵欢, 武晓萌, 等. 和厚朴酚抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制[J]. 中成药, 2021, 43(1): 214-218.

[9] Li HW, Liu MB, Jiang X, *et al*. GALNT14 regulates ferroptosis and apoptosis of ovarian cancer through the EGFR/mTOR pathway[J]. Future Oncol, 2022, 18(2): 149-161.

[10] Luo Y, Wang J, Wang F, *et al*. Foxq1 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by inducing vasculogenic mimicry via the EGFR signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 411.

[11] Leeman-Neill RJ, Cai Q, Joyce SC, *et al*. Honokiol inhibits epidermal growth factor receptor signaling and enhances the antitumor effects of epidermal growth factor receptor inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(9): 2571-2579.

[12] Gomes FG, Almeida VH, Martins-Cardoso K, *et al*. Epidermal growth factor receptor regulates fibrinolytic pathway elements in cervical cancer: functional and prognostic implications[J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(6): e10754.

[13] Zhao YL, Yuan BQ, Shen GS. Mechanism of *RET* gene mediated EGFR signaling pathway on epithelial-mesenchymal transition, proliferation and apoptosis of papillary thyroid carcinoma cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(15): 8036-8047.

[14] 史梦琳, 吴玮琪, 罗昊, 等. 木犀草素对人脉络膜黑色素瘤细胞株C918血管生成拟态形成的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(8): 731-735.

[15] Zhang X, Zhang J, Zhou H, *et al*. Molecular mechanisms and anticancer therapeutic strategies in vasculogenic mimicry[J]. J Cancer, 2019, 10(25): 6327-6340.

[16] Zhu J, Xu S, Gao W, *et al*. Honokiol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human lung cancer cells[J]. Life Sci, 2019, 221: 204-211.

[17] 成旭东, 陈婷, 范玲, 等. 和厚朴酚通过NF-κB信号通路抑制

IL-1诱导的人肺癌细胞H460血管生成[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 380-386.

[18] Shen L, Zhang F, Huang R, *et al*. Honokiol inhibits bladder cancer cell invasion through repressing SRC-3 expression and epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4294-4300.

[19] 许玉萍, 王金龄, 邓金勇, 等. 沉默*CTHRC1*基因表达对口腔鳞状细胞癌细胞血管生成拟态的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(23): 1785-1791.

[20] Yang TJ, Wang L, Zhang Y, *et al*. LncRNA *UCA1* regulates cervical cancer survival and EMT occurrence by targeting miR-155[J]. Eur Rev Med Paharmacol Sci, 2020, 24(19): 9869-9879.

[21] Li B, Guo X, Li N, *et al*. WNT1, a target of miR-34a, promotes cervical squamous cell carcinoma proliferation and invasion by induction of an E-P cadherin switch via the WNT/β-catenin pathway[J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43(3): 489-503.

[22] Gu F, Li ZH, Wang CQ, *et al*. Effects of forkhead box protein A1 on cell proliferation regulating and EMT of cervical carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7189-7196.

[23] 张熙, 赵启梅, 尉春艳. EGFR对血管生成拟态的诱导作用及其相关机制[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(6): 739-742.

[24] 张春利, 齐结华, 宦宇, 等. 干扰ADAM17抑制人宫颈癌细胞系HeLa细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(2): 255-259.

[25] Shin SU, Cho HM, Das R, *et al*. Inhibition of vasculogenic mimicry and angiogenesis by an anti-EGFR IgG1-human endostatin-P125A fusion protein reduces triple negative breast cancer metastases[J]. Cells, 2021, 10(11): 2904.

[26] Camorani S, Crescenzi E, Gramanzini M, *et al*. Aptamer-mediated impairment of EGFR-integrin $\alpha_v\beta_3$ complex inhibits vasculogenic mimicry and growth of triple-negative breast cancers[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46659.

[27] Zang H, Qian G, Arbiser J, *et al*. Overcoming acquired resistance of EGFR-mutant NSCLC cells to the third generation EGFR inhibitor, osimertinib, with the natural product honokiol[J]. Mol Oncol, 2020, 14(4): 882-895.

（编辑：沈佳婕）

广 告 索 引

封二 华领医药技术(上海)有限公司
封三 CSL Behring
封底 中国医药工业信息中心
前彩插1 赛诺菲(中国)投资有限公司
前彩插2 《世界临床药物》杂志征订信息
中彩插1 山东罗欣药业集团股份有限公司
中彩插2 北京泰德制药
后彩插1 山东齐鲁制药集团有限公司
后彩插2 上海君实生物医药科技股份有限公司
952页：公益广告