

蟾毒灵抑制人前列腺癌 PC3 细胞迁移侵袭的机制研究

王海临¹, 周雯敏², 扶佳俐², 叶阳娇², 扈新¹, 高慧林¹, 张建业^{2*}

(1. 巴彦淖尔市医院泌尿外科, 内蒙古自治区 巴彦淖尔 015000; 2. 广州医科大学药学院, 广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, 广东 广州 511436)

摘要: 本研究主要探讨了蟾毒灵 (bufalin) 对人前列腺癌 PC3 细胞的体外增殖、迁移和侵袭的抑制能力, 初步探讨蟾毒灵抑制上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 过程的分子机制。采用 MTT 法评价 PC3 细胞活力; 划痕和 Transwell 实验用于检测细胞的迁移和侵袭能力; 采用 Western blot 实验检测 EMT 和整合素家族蛋白的表达情况。结果显示, 蟾毒灵对人前列腺癌 PC3 细胞的半数抑制浓度值为 $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 蟾毒灵处理后, PC3 细胞的迁移速度变慢 ($P < 0.05$), 穿过微孔滤膜的 PC3 细胞数量减少 ($P < 0.05$), 这表明蟾毒灵能够浓度依赖性地抑制 PC3 细胞的增殖、迁移与侵袭能力。本研究发现蟾毒灵可以影响 EMT 相关蛋白的表达, 包括 E-钙黏附素 (E-cadherin) 的上调以及 N-钙黏附素 (N-cadherin)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、癌基因 c-myc、锌指转录因子 Snail 的下调; 蟾毒灵还可以抑制整合素家族蛋白的表达, 包括整合素 $\alpha 2$ (ITGA2)、整合素 $\beta 1$ (ITGB1)、整合素 $\beta 3$ (ITGB3)、整合素 $\beta 5$ (ITGB5)、Yes 相关蛋白/转录共激活因子 PDZ 结合基序 (YAP/TAZ) 和整合素连接激酶 (ILK)。此外, 蟾毒灵还可抑制磷酸化局部黏着斑激酶 (p-FAK)/局部黏着斑激酶 (FAK)、磷酸化类固醇受体辅激活因子 (p-Src)/类固醇受体辅激活因子 (Src)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)/蛋白激酶 B (Akt) 的蛋白表达水平, 上述研究结果表明, 蟾毒灵可能通过 FAK/Src/磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt 通路抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖、转移和侵袭能力。因此, 蟾毒灵为前列腺癌治疗药物的开发提供一定的参考价值。

关键词: 蟾毒灵; 前列腺癌; 抗肿瘤; 增殖; 转移

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1361-06

Research on the mechanism of bufalin inhibiting migration and invasion of human prostate cancer PC3 cells

WANG Hai-lin¹, ZHOU Wen-min², FU Jia-li², YE Yang-jiao², HU Xin¹,
GAO Hui-lin¹, ZHANG Jian-ye^{2*}

(1. Department of Urology, Bayannur Hospital, Bayannur 015000, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Molecular Target and Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: In this study, we investigated the inhibitory effects of bufalin on proliferation, migration and invasion of PC3 cells *in vitro*, and preliminarily explored the molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transformation (EMT) inhibited by bufalin. The viability of PC3 cells was evaluated by MTT assay, and the migration and invasion abilities of PC3 cells were detected by wound healing and Transwell assay. Western blot was used to detect the expression of EMT and integrin family proteins. The results showed that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of bufalin against PC3 cells was $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. After bufalin treatment, the migration rate of PC3 cells slowed down ($P < 0.05$), the number of PC3 cells passing through the microporous

收稿日期: 2021-11-15; 修回日期: 2021-12-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1903126); 2020 年国家级大学生创新创业训练计划 (202010570032).

*通讯作者 Tel: 86-20-37103631, E-mail: jianyez@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1643

membrane decreased ($P < 0.05$), which indicated that bufalin could inhibit the proliferation, migration and invasion of PC3 cells in a concentration-dependent manner. We found that bufalin could affect the expression of EMT-related proteins, including up-regulation of E-cadherin and down-regulation of N-cadherin, β -catenin, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), c-myc and Snail. Bufalin also inhibited the expression of integrin family proteins, including integrin $\alpha 2$ (ITGA2), integrin $\beta 1$ (ITGB1), integrin $\beta 3$ (ITGB3), integrin $\beta 5$ (ITGB5), Yes-associated protein/transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif (YAP/TAZ) and integrin-linked kinase (ILK). In addition, bufalin could also inhibit the protein expression level of phospho-focal adhesion kinase (p-FAK)/FAK, phospho-steroid receptor coactivator (p-Src)/Src and phospho-protein kinase B (p-Akt)/Akt. These results suggested that bufalin might inhibit the proliferation, metastasis and invasion of prostate cancer PC3 cells through the FAK/Src/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. Therefore, bufalin provides reference value for the development of therapeutic drugs for prostate cancer.

Key words: bufalin; prostate cancer; anti-tumor; proliferation; metastasis

前列腺癌 (prostate cancer, PC) 是目前全球男性最常见的恶性肿瘤。根据2020年全球癌症统计数据显示, 新发病例估计141.4万例, 其发病率(约占7.3%)位居全球癌症第4位; 约37.5万例患者死于前列腺癌, 其死亡率(约占3.8%)位居第8位^[1]。近年来, 随着人口老龄化、饮食和生活方式的改变, 前列腺癌的发病率已呈显著上升趋势。早期的前列腺癌患者可以通过根治性手术或放疗, 达到良好的治疗效果, 然而大多数前列腺癌患者在确诊时已处于晚期^[2]。目前常见的前列腺癌的治疗方法包括内分泌治疗(醋酸阿比特龙、恩杂鲁胺、阿帕鲁胺)、化学疗法(多西他赛、卡巴他赛)、靶向治疗和免疫疗法等, 仍有部分患者出现复发和转移的情况, 甚至转化为激素抵抗性前列腺癌, 因此亟须新的疗法来改善前列腺癌患者的生存率^[3,4]。

传统的中药是开发有效抗肿瘤药物的天然宝库, 中药单体的分离和药理作用研究对开发新型的抗肿瘤药物具有重要意义^[5]。蟾酥是从动物蟾蜍的皮肤和耳后腺提取和分离的药物, 蟾毒灵(bufalin)是从传统中药蟾酥中分离得到的一种蟾蜍二烯内酯。蟾毒灵作为一种甾体类化合物, 不仅具有强心、抗炎、镇痛和调节免疫等生理活性, 越来越多的研究证实蟾毒灵在肺癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌和黑色素瘤等癌症患者中的抗肿瘤作用^[6-8]。然而, 蟾毒灵抑制前列腺癌体外生长和迁移侵袭能力的作用机制尚未完全阐明。本研究旨在研究蟾毒灵对前列腺癌PC3细胞增殖、迁移和侵袭, 并对其相关机制进行探讨。

材料与方法

细胞培养 人前列腺癌细胞株PC3购于ATCC公司, 于含有10%胎牛血清的DMEM培养基(Gibco公司)中置于37℃、5% CO₂培养箱中培养, 定期观察细胞。

MTT实验 取对数生长期的PC3细胞, 胰酶消化后按照4 000个/孔的细胞密度接种于96孔板中, 培养至一定时间后分别加入不同浓度的蟾毒灵, 每组设6个复孔, 并设立空白对照组。处理68 h后, 加入浓度为5 mg·mL⁻¹ MTT溶液(MP Biomedicals公司)20 μ L, 继续孵育4 h后吸弃上清液, 每孔加入DMSO溶液100 μ L, 室温震荡10 min, 在490和655 nm波长下测定吸光度(A)。细胞增殖活力(%) = $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100$, 计算蟾毒灵对PC3细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)^[9]。

划痕实验 首先在6孔板背后用marker笔均匀地画5条横线, 取对数生长期的PC3细胞, 胰酶消化后按照4×10⁵个/孔的细胞密度接种于6孔板中, 当细胞融合率接近90%时, 用枪头垂直于背后的横线划3道痕。PBS润洗2次后加入含有不同浓度药物的低血清培养基, 于0、12和24 h在倒置显微镜下拍照^[10]。

Transwell实验 取对数生长期的PC3细胞, 胰酶消化后用无血清培养基重悬细胞, 按照6×10⁴个/孔的细胞密度接种于上室(未铺胶), 加入无血清培养基稀释的不同浓度的蟾毒灵溶液, 下室加入600 μ L完全培养基, 于培养箱中孵育24 h后取出小室(Corning公司), 移到含甲醇的孔板中室温固定30 min, 接着移到含0.5%结晶紫的孔板中染色1 h, 轻轻用PBS冲洗浸泡数次, 用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞, 底面朝上晾干, 于倒置显微镜下拍照。评估细胞的侵袭能力需要将基质胶(Corning公司)和无血清培养基按照1:8的比例稀释, 取45 μ L铺在上室于培养箱放置2 h使其凝固后再重复上述步骤^[11]。

Western blot实验 取对数生长期的PC3细胞, 胰酶消化后按照4×10⁵个/孔的细胞密度接种于6孔板中, 不同浓度的蟾毒灵溶液处理细胞48 h后, 加入80 μ L配制好的裂解液(RIPA:PMSF:PI = 100:1:2),

冰上裂解 30 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后取上清液用 BCA 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司) 进行蛋白浓度定量。按照每孔 25 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 将凝胶中的蛋白湿转到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 使用 ECL 发光液显色, 凝胶成像系统成像。以 β-肌动蛋白 (β-actin, Affinity 公司, AF7018) 表达作为内参对照^[12]。本研究所采用的一抗 E-钙黏附素 (E-cadherin, 3195S)、N-钙黏附素 (N-cadherin, 13116S)、β-连环蛋白 (β-catenin, 8480S)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9, 13667S)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2, 40994S)、癌基因 c-myc (9402S)、锌指转录因子 Snail (3879S)、整合素 α2 (integrin α2, ITGA2, 88228S)、整合素 β1 (integrin β1, ITGB1, 9699S)、整合素 β3 (integrin β3, ITGB3, 13166S)、整合素 β5 (integrin β5, ITGB5, 3629S)、Yes 相关蛋白/转录共激活因子 PDZ 结合基序 (Yes-associated protein/transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif, YAP/TAZ, 8418S)、磷酸化类固醇受体辅激活因子 (phospho-steroid receptor coactivator, p-Src, 2105S)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt, 4685S)、磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-Akt, 13038S) 购自 Cell Signaling Technology 公司; 整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK, DF6141)、局部黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK, AF6397)、磷酸化局部黏着斑激酶 (phospho-focal adhesion kinase, p-FAK, AF3398)、类固醇受体辅激活因子 (steroid receptor coactivator, Src, AF6161) 购自 Affinity 公司。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验数据进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组均数比较, 如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性, 组间比较采用 *t* 检

验; 多组均数比较, 各组定量资料都呈正态分布并且方差齐性, 采用单因素方差分析。 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结果

1 蟾毒灵抑制人前列腺癌 PC3 细胞活力

为了确定蟾毒灵 (图 1A) 对前列腺癌 PC3 细胞活力的影响, 利用 MTT 实验考察了蟾毒灵处理细胞后细胞生存率的变化。结果表明, 随着蟾毒灵浓度的增高, PC3 细胞活力逐渐递减 (图 1B)。蟾毒灵对 PC3 细胞的 IC₅₀ 为 0.26 ± 0.03 μmol·L⁻¹, 本研究将 0.10、0.20 和 0.40 μmol·L⁻¹ 作为后续实验的浓度。

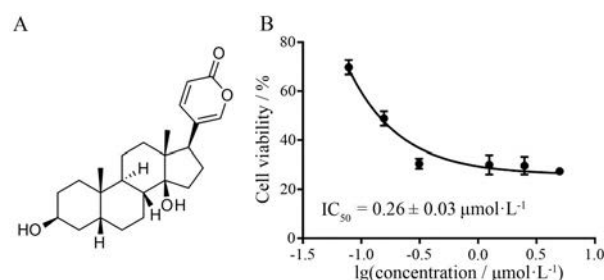


Figure 1 Chemical structure of bufalin and its inhibitory effect on the growth of prostate cancer PC3 cells. A: Chemical structure of bufalin; B: Bufalin could inhibit the cell viability of PC3 cells in a concentration-dependent manner with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 0.26 ± 0.03 μmol·L⁻¹

2 蟾毒灵抑制人前列腺癌 PC3 细胞的平面迁移能力

划痕实验结果表明, 随着蟾毒灵处理浓度增加, PC3 细胞的迁移速度逐渐变慢, 说明蟾毒灵能够浓度依赖性地抑制 PC3 细胞的平面迁移能力 (图 2)。蟾毒灵作用 12 h 后, 对照组、0.10、0.20 和 0.40 μmol·L⁻¹ 处理组的相对迁移率分别为 41.11% ± 2.40%、24.74% ± 1.01%、21.67% ± 0.85%、17.86% ± 1.30%; 蟾毒灵作用 24 h 后, 对照组、0.10、0.20 和 0.40 μmol·L⁻¹ 处理组的相对迁移率分别为 71.77% ± 1.91%、33.11% ± 0.78%、22.33% ± 1.16%、19.20% ± 0.31%。

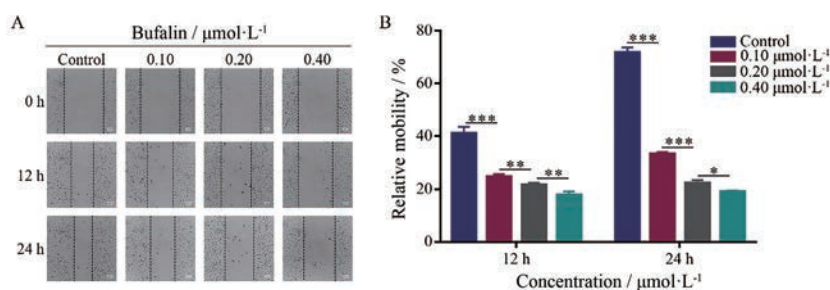


Figure 2 Bufalin inhibited the horizontal migration of PC3 cells in a concentration-dependent manner. A: Wound healing assay was applied to investigate the effect of bufalin on the horizontal migration of PC3 cells. Scale bar: 50 μm; B: The statistical results of A, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

3 蟾毒灵抑制人前列腺癌PC3细胞的空间迁移能力和侵袭能力

Transwell实验结果表明,随着蟾毒灵浓度的增加,穿过微孔滤膜的PC3细胞数量逐渐减少,且呈现剂量依赖效应,说明蟾毒灵能够明显抑制PC3细胞的空间迁移能力和侵袭能力(图3)。Transwell小室未铺基质胶时,对照组、0.10、0.20和0.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的穿膜细胞数分别为 587 ± 45.3 、 320 ± 26.2 、 228 ± 16.6 、 161 ± 25.1 个;Transwell小室铺基质胶时,对照组、0.10、0.20、0.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的穿膜细胞数分别为 457 ± 18.5 、 210 ± 10.8 、 111 ± 12.3 、 42 ± 5.0 个。

4 蟾毒灵影响上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)和整合素家族蛋白的表达

Western blot实验结果表明,与对照组比较,0.10、0.20和0.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蟾毒灵处理后,EMT相关蛋白包括E-cadherin的表达水平上调和N-cadherin、 β -catenin、MMP9、MMP2、c-myc、Snail的表达水平下调,整合素家族蛋白包括ITGA2、ITGB1、ITGB3、ITGB5、YAP/TAZ和ILK的表达水平均下调(图4)。以上结果提示,蟾毒灵对PC3细胞迁移侵袭的抑制作用与其调控EMT和整合素家族蛋白的表达相关。

5 蟾毒灵可能通过FAK/Src/PI3K/Akt通路抑制前列腺癌的发展

本研究接着通过Western blot检测蟾毒灵处理后PC3细胞内FAK/Src/PI3K/Akt信号通路的影响。与对照组比较,蟾毒灵可抑制p-FAK/FAK、p-Src/Src、p-Akt/Akt的蛋白表达水平,这表明蟾毒灵可能通过FAK/Src/PI3K/Akt通路抑制前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭(图5)。

讨论

肿瘤细胞发生EMT后具有明显的侵袭和转移能力,是肿瘤恶化的重要标志。蟾毒灵是从中国传统中药蟾酥中分离出来的一种具有生物活性的多羟基类

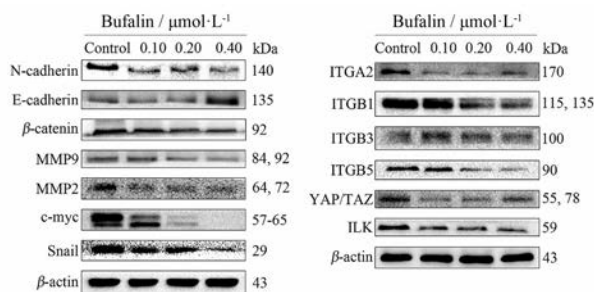


Figure 4 Expression changes of epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and integrin family protein level in PC3 cells treated with different concentration of bufalin. MMP: Matrix metalloproteinase; ITGA: Integrin α ; ITGB: Integrin β ; YAP: Yes-associated protein; TAZ: Transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif; ILK: Integrin-linked kinase

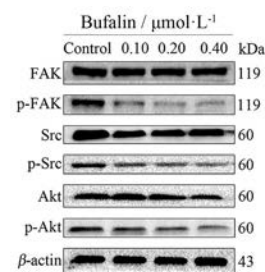


Figure 5 Expression changes of key protein level in FAK/Src/PI3K/Akt pathway in PC3 cells treated with different concentration of bufalin. FAK: Focal adhesion kinase; Src: Steroid receptor coactivator; Akt: Protein kinase B

固醇,其抗肿瘤活性引起了许多研究者的关注。据报道,蟾毒灵对多种肿瘤细胞具有显著的抑制作用。Wang等^[13]发现蟾毒灵能抑制胃癌AGS细胞的侵袭和转移,抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,可能与下调Wnt/ β -catenin信号通路,抑制无刚毛鳞甲样转录因子(Achaete scute-like2, ASCL2)表达和EMT有关。Qian等^[14]发现蟾毒灵可能通过抑制p-c-Met的表达进而抑制丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases/extracellular signal

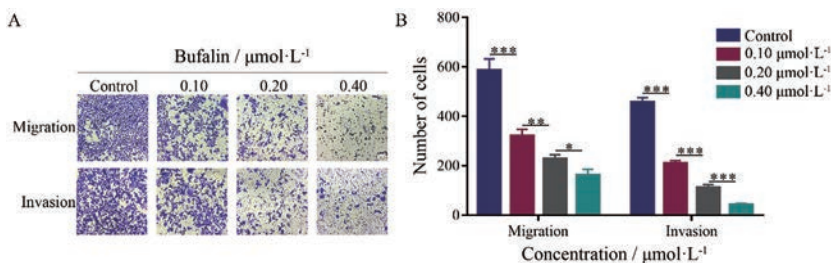


Figure 3 Bufalin inhibited the spatial migration and invasion of PC3 cells in a concentration-dependent manner. A: Transwell assay was used to investigate the effect of bufalin on the spatial migration and invasion of PC3 cells. Scale bar: 50 μm ; B: The statistical results of A, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

regulated protein kinases, MEK/ERK) 和 PI3K/Akt 信号通路的激活, 对胆囊癌 GBC-SD 细胞的生长、侵袭、迁移和成球能力有一定的抑制作用。此外, c-myc 的表达下调可通过抑制缺氧诱导因子-1 α /基质细胞衍生因子-1/CXC 趋化因子受体 4 通路, 进而增强蟾毒灵在胰腺癌 PANC-1 和 SW1990 细胞中的抗肿瘤活性^[15]。然而, 有关蟾毒灵对前列腺癌侵袭和转移的抑制作用研究还比较少, 本研究发现蟾毒灵能够抑制前列腺癌 PC3 细胞增殖, 其 IC₅₀ 值为 $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。划痕实验和 Transwell 实验结果显示, 相比于对照组, 蟾毒灵以浓度依赖性的方式减慢 PC3 细胞的迁移速度和减少 PC3 细胞的穿膜数量, 这表明蟾毒灵能够显著抑制 PC3 细胞的迁移能力和侵袭能力。

EMT 过程的表型分子表达改变包括上皮表型 E-cadherin 表达下调, 同时间充质表型 N-cadherin 表达上调, 主要表现为 E-cadherin 表达向 N-cadherin 表达转移, 诱导 β -catenin 进入胞核, 参与基因的转录与调控^[16]。在缺失 Wnt 信号的情况下, 大部分 β -catenin 与 E-cadherin 蛋白结合参与细胞的黏附作用, 磷酸化的 β -catenin 随后被泛素连接酶-蛋白酶体系统识别和降解。一旦 Wnt 蛋白与受体结合, β -catenin 在细胞核中积累, 与 T 细胞因子/淋巴因子增强子形成复合物开启 Wnt 响应基因的转录^[17]。本研究结果发现, 蟾毒灵 PC3 细胞内 E-cadherin 蛋白表达上调, N-cadherin 和 β -catenin 蛋白表达下调, 说明 EMT 过程可能被蟾毒灵所抑制。MMPs 家族蛋白可通过降解细胞外基质成分, 或调节细胞信号通路等途径增强肿瘤细胞的侵袭转移能力, 其中 MMP9 和 MMP2 是常见的肿瘤治疗靶点^[18]。本研究结果表明, 蟾毒灵作用后, 调控肿瘤细胞迁移侵袭的 MMP9 和 MMP2 蛋白表达下降。c-myc 具有调节细胞增殖分化和促进细胞凋亡的作用, 在前列腺癌组织中呈现过度表达的状态^[19]。Snail 在多种恶性肿瘤中表达上调, 可以诱导间充质和侵袭相关基因表型的表达, 亦是重要的 E-cadherin 转录调节抑制基因^[20]。c-myc 和 Snail 的蛋白表达下调也提示了蟾毒灵可能具有抑制 PC3 细胞体外生长和迁移的作用。

整合素是一种异二聚体 I 型跨膜蛋白, 能够介导细胞与细胞外基质的黏附和激活, 在癌症的黏附、侵袭和转移过程中扮演关键的角色^[21]。目前, 已经发现整合素的 18 个 α 亚基和 8 个 β 亚基, 可结合产生至少 24 种不同的整合素^[22]。YAP/TAZ 是 Hippo 信号通路级联的下游效应因子, 其激酶级联反应通过磷酸化 YAP/TAZ 来抑制活性, 从而调控器官和肿瘤的形成。研究表明, 整合素可通过 Ras 相似物 GTP 酶 (Ras homologue GTPases, Rho GTPases) 对 YAP/TAZ 发挥调控作用^[23]。

ILK 是细胞内具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性的信号蛋白, 可通过激活整合素信号通路, 参与调控肿瘤细胞恶性表型^[24]。本研究结果表明, 与对照组相比, 蟾毒灵作用后, PC3 细胞内 ITGA2、ITGB1、ITGB3、ITGB5、YAP/TAZ 和 ILK 等蛋白表达下调, 推测整合素相关通路被抑制, 改变了细胞的运动能力, 降低了细胞的迁移侵袭能力。

FAK 与 Src 在结构和功能上相互作用, 形成 FAK/Src 复合体, 接着诱导 PI3K 的募集, PI3K 的活化导致侵袭性肿瘤细胞的转移表型。PI3K 可催化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate, PIP2) 肌醇环的 30 位点磷酸化, 使其转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PIP3)。PIP3 水平升高可通过 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 激活 Akt, 从而调节细胞的代谢、生长和转移等诸多生理过程^[24]。Wu 等^[25]的研究表明, RNA 聚合酶 I 的转录活性是由整合素信号密切控制, 在整合素激活过程中, FAK/Src/PI3K/Akt/mTOR 信号通路控制 RNA 聚合酶 I 活性, 进而参与细胞的生长和发展过程。近年来, 越来越多研究表明 FAK/Src/PI3K/Akt 信号通路是治疗肿瘤侵袭转移的重要靶点。FAK 是整合素介导的癌细胞信号转导途径的主要控制因子, 首先 FAK 与整合素结合形成局部黏附复合体时, 接着 Src 磷酸化 FAK, 进而激活 PI3K/Akt、MEK/ERK 等信号通路, 调控癌细胞的黏附、迁移和侵袭。Huang 等^[26]发现肉桂子三萜化合物 antcin K 降低 integrin $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\alpha 5$ 和 αv 蛋白表达, 抑制 FAK、Src、PI3K、Akt 等磷酸化, 还可抑制 MMP2 和 MMP9 蛋白激活, 影响 EMT 通路相关蛋白包括 E-cadherin 和 vimentin 的表达水平, 抑制人肝癌 Hep 3B 细胞的侵袭迁移。基于本研究的 Western blot 结果显示, 蟾毒灵处理后细胞内 FAK、Src、Akt 的蛋白表达与对照组相差不大, 而 p-FAK、p-Src、p-Akt 的蛋白表达呈现出被显著抑制的趋势, 因此推测蟾毒灵可能通过 FAK/Src/PI3K/Akt 信号通路调控前列腺癌 PC3 细胞的体外生长和迁移侵袭过程。

综上所述, 初步研究显示蟾毒灵能够抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移与侵袭能力, 且呈现浓度依赖效应。此外, 蟾毒灵能影响 EMT 和整合素家族蛋白的表达, 推测这在一定程度上是通过 FAK/Src/PI3K/Akt 信号通路进行调控的。以上结果提示, 蟾毒灵在抗前列腺癌转移治疗中具有良好的应用前景, 这对于开发新的抗肿瘤药物具有重要意义, 为探索新的治疗靶点提供参考价值。

作者贡献: 张建业负责课题的实验设计; 王海临负责数据分析和文章撰写; 周雯敏负责文献查阅和稿件修改; 扶佳俐和叶阳娇负责划痕和Transwell实验; 扈新和高慧林负责Western blot实验。

利益冲突: 本文所有作者均声明无利益冲突。

References

- [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: 209-249.
- [2] Xue MX, Yue G, Guo SJ, et al. The mechanism of androgen independent signaling pathway in castration-resistant prostate cancer and the research progress on related drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 21-28.
- [3] Evans AJ. Treatment effects in prostate cancer [J]. *Mod Pathol*, 2018, 31: 110-121.
- [4] Gingu C, Heidenreich A, Andresanu A, et al. Treatment of the primary in metastatic prostate cancer [J]. *Curr Opin Urol*, 2020, 30: 566-575.
- [5] Xiang YN, Guo ZM, Zhu PF, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8: 1958-1975.
- [6] Yin PH, Liu X, Qiu YY, et al. Anti-tumor activity and apoptosis-regulation mechanisms of bufalin in various cancers: new hope for cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 5339-5343.
- [7] Lan YL, Lou JC, Jiang XW, et al. A research update on the anti-cancer effects of bufalin and its derivatives [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17: 3635-3640.
- [8] Wang J, Xia Y, Zuo QS, et al. Molecular mechanisms underlying the antimetastatic activity of bufalin [J]. *Mol Clin Oncol*, 2018, 8: 631-636.
- [9] Li JJ, Guo QR, Lei XP, et al. Pristimerin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration in H1299 lung cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11: 6348-6355.
- [10] Wei MY, Li JJ, Qiu JH, et al. Costunolide induces apoptosis and inhibits migration and invasion in H1299 lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43: 1986-1994.
- [11] Huang WJ, Yan YY, Liu Y, et al. Exosomes with low miR-34c-3p expression promote invasion and migration of non-small cell lung cancer by upregulating integrin $\alpha 2\beta 1$ [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 39.
- [12] Li L, Dong Z, Shi PF, et al. Bruceine D inhibits cell proliferation through downregulating LINC01667/microRNA-138-5p/cyclin E1 axis in gastric cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584960.
- [13] Wang J, Cai H, Xia Y, et al. Bufalin inhibits gastric cancer invasion and metastasis by down-regulating Wnt/ASCL2 expression [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 23320-23333.
- [14] Qian LQ, Su HY, Wang G, et al. Anti-tumor activity of bufalin by inhibiting c-MET mediated MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways in gallbladder cancer [J]. *J Cancer*, 2020, 11: 3114-3123.
- [15] Liu X, Zhou YY, Peng JM, et al. Silencing c-Myc enhances the antitumor activity of bufalin by suppressing the HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 pathway in pancreatic cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 495.
- [16] Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges [J]. *Cells*, 2019, 8: 1118.
- [17] Patel S, Alam A, Pant R, et al. Wnt signaling and its significance within the tumor microenvironment: novel therapeutic insights [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2872.
- [18] Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 9739.
- [19] Rebello RJ, Pearson RB, Hannan RD, et al. Therapeutic approaches targeting MYC-driven prostate cancer [J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8: 71.
- [20] Smith BN, Odero-Marrah VA. The role of Snail in prostate cancer [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6: 433-441.
- [21] Zhang YX, Shao RG, He HW. Regulation of integrin gene expression [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1647-1651.
- [22] Juan-Rivera MC, Martínez-Ferrer M. Integrin inhibitors in prostate cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10: 44.
- [23] Coffey K. Targeting the Hippo pathway in prostate cancer: what's new? [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 611.
- [24] Zheng CC, Hu HF, Hong P, et al. Significance of integrin-linked kinase (ILK) in tumorigenesis and its potential implication as a biomarker and therapeutic target for human cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9: 186-197.
- [25] Wu CY, You J, Fu JJ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt mediates integrin signaling to control RNA polymerase I transcriptional activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36: 1555-1568.
- [26] Huang YL, Chu YL, Ho CT, et al. Antcin K, an active triterpenoid from the fruiting bodies of basswood-cultivated *Antrodia cinnamomea*, inhibits metastasis via suppression of integrin-mediated adhesion, migration, and invasion in human hepatoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 4561-4569.