

# 一种新型查耳酮衍生物 C13 通过 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路抑制人胃癌细胞的生长

谭 鹏, 张云封, 王龙燕, 黄惠铭, 王 飞, 魏雪娇, 王柱国, 李 军\*, 胡仲冬\*

(北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 100029)

**摘要:** 3'-羟基-4'-甲氧基-2-羟基-5-溴查耳酮 (以下简称 C13) 是本课题组对龙血竭抗肿瘤活性化合物 DHMMF 进行结构修饰过程中获得的一个新型查耳酮衍生物。本研究探讨了 C13 对人胃癌 HGC-27、AGS 细胞增殖、凋亡的影响及其潜在的作用机制。首先采用噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、集落形成实验、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色法发现 C13 能显著抑制人胃癌 HGC-27、AGS 细胞的增殖能力。采用流式细胞术和免疫印迹法检测发现 C13 能诱导人胃癌 HGC-27、AGS 细胞发生凋亡, 并上调剪切的聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (cleaved-poly ADP-ribose polymerase, cleaved-PARP) 的蛋白水平。转录组测序分析结果显示 C13 可能通过调控人表皮生长因子受体 4/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4/phosphoinositide 3-kinase/AKT, ErbB4/PI3K/AKT) 信号通路发挥抗胃癌作用。最后免疫印迹实验结果表明, C13 处理后能下调人胃癌细胞中 ErbB4 总蛋白及磷酸化水平, 并能够抑制其下游 PI3K 及 AKT 蛋白磷酸化水平, 进一步验证了转录组测序结果。综上所述, 新型查耳酮衍生物 C13 能够显著抑制人胃癌 HGC-27、AGS 细胞增殖并诱导其发生凋亡, 其机制可能与下调 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路有关。本研究能够为胃癌治疗提供一个候选研究药物。

**关键词:** 查耳酮衍生物 C13; 人胃癌细胞; 增殖; 凋亡; ErbB4/PI3K/AKT 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0957-08

## A novel chalcone derivative C13 inhibits the growth of human gastric cancer cells through suppressing ErbB4/PI3K/AKT signaling pathway

TAN Peng, ZHANG Yun-feng, WANG Long-yan, HUANG Hui-ming, WANG Fei,  
WEI Xue-jiao, WANG Zhu-guo, LI Jun\*, HU Zhong-dong\*

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine,  
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract:** 3'-Hydroxy-4'-methoxy-2-hydroxy-5-bromochalcone (hereinafter referred to as C13) is a novel chalcone derivative obtained in the process of structural modification of DHMMF, the antitumor active compound of *Resina Draconis*, in our laboratory. In this study, we investigated the effects of C13 on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer HGC-27 and AGS cells and its potential mechanism of action. Firstly, through methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), colony formation assay, and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining, we found that C13 inhibited the proliferation ability of human gastric cancer HGC-27 and AGS cells. Using flow cytometry and Western blot, it was found that C13 induced apoptosis in human gastric cancer HGC-27 and AGS

收稿日期: 2023-11-08; 修回日期: 2024-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074072); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2023-JYB-JBQN-051); 北京中医药大学国家级人才精准培育计划 (JZPY202206); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目.

\*通讯作者 Tel: 86-10-64286180, E-mail: huzhongdong@126.com; drlj666@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1262

cells, and up-regulated the protein level of cleaved poly ADP-ribose polymerase (cleaved-PARP). The results of RNA sequencing analysis showed that the Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4/phosphoinositide 3-kinases/AKT (ErbB4/PI3K/AKT) signaling pathway may be involved in anti-gastric cancer activity of C13. Finally, the results of immunoblotting assay showed that C13 treatment down-regulated the protein levels of ErbB4 and phospho-ErbB4, as well as down-regulated the phosphorylation levels of PI3K and AKT in human gastric cancer HGC-27 and AGS cells, which verified the results from RNA-seq analysis. In conclusion, C13 inhibited the proliferation and induced apoptosis of human gastric cancer cells, which may be related to the down-regulation of ErbB4/PI3K/AKT signaling pathway. This study may provide a candidate drug for the treatment of gastric cancer.

**Key words:** chalcone derivative C13; human gastric cancer cell; proliferation; apoptosis; ErbB4/PI3K/AKT signaling pathway

胃癌 (gastric cancer, GC) 作为全球最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率与死亡率均稳居癌症前五<sup>[1]</sup>。作为一种多因素疾病, 胃癌的发生发展与多种危险因素有关, 主要包括幽门螺杆菌感染、高盐摄入、低果蔬摄入等<sup>[2]</sup>。虽然胃癌早期根治术后5年生存率超过90%<sup>[3]</sup>, 但因为其早期症状不明显, 导致许多患者临床诊断出胃癌时已经是中后期, 手术的治疗现状不佳。目前靶向药物及免疫治疗在胃癌中已经取得了一定进展<sup>[4]</sup>, 但临床药物治疗仍然以普通化疗药物为主, 其不良反应及易耐药性往往导致治疗失败<sup>[5]</sup>。因此, 开发低毒高效的新型抗胃癌药物仍具有重要意义。

人表皮生长因子受体4 (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4, ErbB4) 是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族的成员之一, 是一种大的跨膜糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性<sup>[6]</sup>。当ErbB4与其配体结合后, 会激活磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B (phosphoinositide 3-kinase/AKT, PI3K/AKT) 等一系列信号通路并促进细胞的分裂与增殖<sup>[7]</sup>。现有研究表明, 与正常胃细胞相比, ErbB4在多种胃癌细胞系中高表达, 并与胃癌患者预后不良密切相关<sup>[8]</sup>。

中药龙血竭 *Resina Draconis* 为百合科植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour) S. C. Chen 的含脂木材经乙醇提取得到的树脂, 具有活血化瘀、收敛止血、补血等功效<sup>[9]</sup>。现代药理学研究表明龙血竭具有抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗菌<sup>[11]</sup>、抗炎镇痛<sup>[12]</sup>、降糖降脂<sup>[13]</sup>等作用。本课题组前期工作发现龙血竭乙酸乙酯提取部位<sup>[13,14]</sup>以及黄烷类成分 DHMMF<sup>[15]</sup>能通过调节 Smad 同源物3 (recombinant SMAD family member 3, Smad3)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、细胞周期依赖性激酶抑制因子1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A) 等癌症相关蛋白及信号通路诱导肿瘤细胞周期阻滞、凋亡及自噬。本课题组在对龙血竭活性化合物 DHMMF 进行结构修饰的过程中获得了多个查耳酮衍生物, 其中3'-羟

基-4'-甲氧基-2-羟基-5-溴查耳酮 (C13) 具有良好的体外抗胃癌活性, 并且转录组数据提示其机制可能与调控 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路有关。本研究主要以人胃癌 HGC-27、AGS 细胞为研究对象, 探讨 C13 对人胃癌细胞增殖、凋亡的影响及其对 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路的调控作用。

## 材料与方法

**药品与试剂** C13 (纯度大于98%) 由本实验室合成, 通过理化性质和 NMR、MS 等谱学数据确定结构, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解 C13 为 5 mmol·L<sup>-1</sup> 母液, -20 °C 储存待用; 胎牛血清 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, F102-01); 抗生素-抗真菌 (100×)、0.25% 胰酶、Meilunbio<sup>®</sup> 飞克特超敏 ECL 发光液 (大连美仑生物技术有限公司, MA0345、MA0234、MA0186); 噻唑蓝 (MTT) 粉末 (北京百瑞极生物科技有限公司, BN30793); 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Becton Dickinson 公司, 556547); BeyoClick<sup>™</sup> EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, C0071S); RNA-Solv Reagent (美国 Omega Bio-tek 公司, L01UM); 剪切的聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (cleaved-PARP)、PI3K、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、AKT、磷酸化 AKT (p-AKT) (美国 Cell Signaling Technology 公司, 9532T、4249T、17366S、4685S、4060S); ErbB4、磷酸化 ErbB4 (p-ErbB4) (武汉爱博泰克生物科技股份有限公司, A19047、AP0034)。

**细胞培养** 人胃癌 HGC-27 细胞购买于美国模式培养物集存库 (ATCC) (编号 FH0271, 传至 8~10 代); 人胃癌 AGS 细胞由中国医学科学院医学实验动物研究所龚佳男老师赠予 (传至 8~10 代)。两株细胞均培养于含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 1640 完全培养基, 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下。

**MTT 法细胞增殖实验** 取对数生长期的胃癌 HGC-27、AGS 细胞消化成单细胞悬液。计数后, 稀释

细胞使每毫升含细胞为 $3 \times 10^4$ 个, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度 C13 药物工作液 (0、1、2、3、4、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药处理 24、48、72 h 后, 吸弃药物工作液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  MTT 工作液 (0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。孵育结束后, 吸弃 MTT 工作液并加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 置于摇床避光摇晃 10 min 后在 490 nm 波长下测定吸光度并计算细胞存活率。

**EdU 法细胞增殖实验** 取对数生长期的人胃癌 HGC-27、AGS 细胞消化成单细胞悬液, 计数后按每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 12 孔板中, 每组设置 3 个复孔。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度的 C13 药物工作液 (0、1.5、3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药处理 24 h 后, 按 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒说明书步骤操作, 最后于倒置荧光显微镜下观察并记录。

**集落形成实验** 取对数生长期的人胃癌 HGC-27、AGS 细胞消化成单细胞悬液, 计数后按每皿 2 000 个细胞接种于 6 cm 皿中, 每组设置 3 个重复。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度的 C13 药物工作液 (0、1.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。每隔 4 天换液 1 次。连续给药处理 12 天后, 吸弃旧培养基并用 PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min 后加入 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  结晶紫染液染色 30 min。染色结束后, 用 PBS 轻轻清洗 2 遍并用相机拍照记录。

**流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期的人胃癌 HGC-27、AGS 细胞消化成单细胞悬液, 计数后按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度的 C13 药物工作液 (0、1.5、3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药处理 48 h 后, 按细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作, 最后使用流式细胞仪检测并计算细胞凋亡率。

**转录组测序** 取对数生长期的人胃癌 HGC-27 细胞消化成单细胞悬液, 适量接种于 6 cm 皿中。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度的 C13 药物工作液 (0、3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药处理 48 h 后, 吸弃旧培养基并用 PSB 清洗 3 次, 每皿加入 1 mL RNA-Solv reagent 裂解细胞, 在冰上裂解 5 min 后, 将样品转移至 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中, 将收集的样品送至上海伯豪生物技术有限公司进行转录组测序分析。

**免疫印迹实验** 取对数生长期的人胃癌 HGC-27、AGS 细胞消化成单细胞悬液, 适量接种于 6 cm 皿中。贴壁 24 h 后, 吸弃旧培养基并加入含不同浓度的 C13 药物工作液 (0、1.5、3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药处理 48 h 后, 吸弃旧培养基并用 PSB 清洗 3 次, 每孔加入适量的细胞裂解液, 冰上裂解 10 min 并收集于 1.5 mL EP 管中。

将收集的样品置于 99  $^{\circ}\text{C}$  干式恒温器中加热 10 min,  $-40^{\circ}\text{C}$  保存待用。以适量体积上样, 采用适当的条件进行电泳、电转, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 分别用相应的一抗 (1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 溶液洗 3 次后, 加入对应二抗 (1:10 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。二抗孵育结束后, TBST 溶液洗 3 次, 而后加入超敏发光液并进行曝光, 借助 Image J 软件进行定量统计。

**数据处理与分析** 以上所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析并采用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。分析方法为单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA),  $P < 0.05$  认为具有统计学差异。

## 结果

### 1 C13 的结构及相关谱学数据

C13 (结构见图 1): 黄色粉末, 熔点: 176~177  $^{\circ}\text{C}$ 。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.95 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.79 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J = 8.4, 2.4$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J = 8.4, 2.4$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 3.95 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  191.31, 157.86, 153.83, 147.89, 139.64, 135.06, 132.63, 132.48, 125.50, 123.78, 123.33, 118.93, 116.02, 112.52, 111.83, 56.48。HRESIMS:  $m/z$  346.990 9, 计算值  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrO}_4$  346.992 4 [ $\text{M} - \text{H}$ ]<sup>-</sup>。

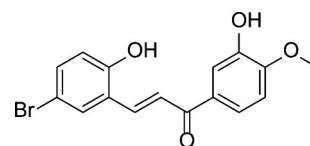


Figure 1 The chemical structure of C13

### 2 C13 对人胃癌 HGC-27、AGS 细胞增殖活性的影响

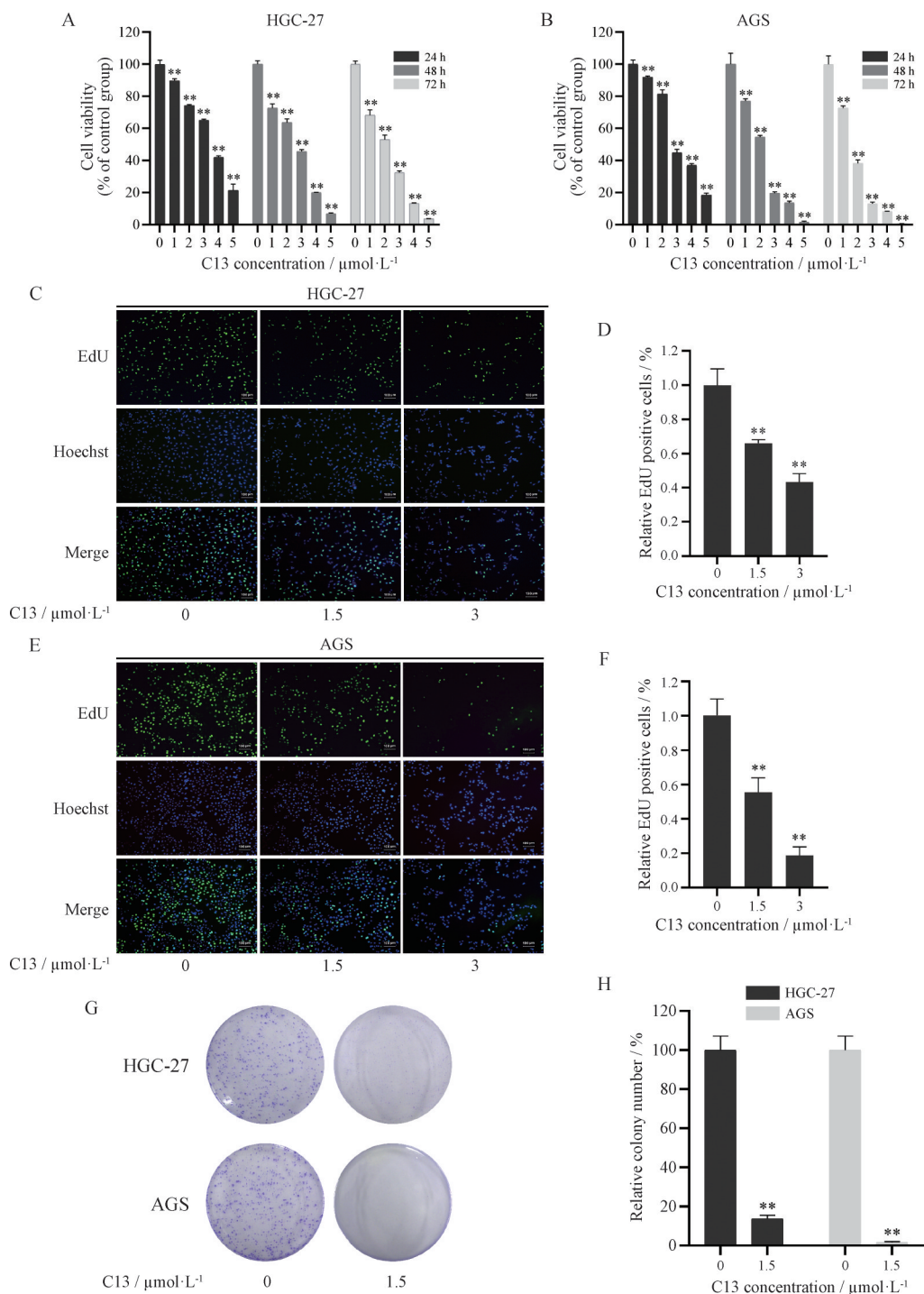
为研究 C13 对人胃癌 HGC-27、AGS 细胞活力的影响, 采用 MTT 法测定不同浓度 C13 给药处理 24、48、72 h 后两种人胃癌细胞的活力变化。与空白组相比, 各给药组显著降低两株胃癌细胞的存活率 ( $P < 0.01$ ), 并具有浓度与时间依赖性 (图 2A、B)。C13 给药处理 48 h 后人胃癌 HGC-27、AGS 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 2.284、1.898  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。正在增殖中的细胞能被 EdU 试剂染色并在荧光显微镜下发出非常明亮的绿色荧光。与空白组相比, 给药 (1.5、3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 24 h 后在荧光显微镜下绿色荧光显著减少, 证明给药组细胞增殖受到抑制 (图 2C~F)。克隆形成实验也进一步证明了 C13 能抑制人胃癌细胞的集落形成能力 (图 2G、H)。以上结果证明, C13 能抑制人胃癌 HGC-27、AGS 细胞的增

殖能力。

### 3 C13对人胃癌HGC-27、AGS细胞凋亡的影响

为研究C13对人胃癌HGC-27、AGS细胞凋亡的影响,采用Annexin V/PI流式细胞术对给药处理48 h后的两种人胃癌细胞的凋亡水平进行了检测,发现

C13能诱导两种人胃癌细胞发生凋亡。3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  C13给药处理48 h后,人胃癌HGC-27、AGS细胞凋亡率分别是 $16.70\% \pm 1.42\%$ 和 $22.69\% \pm 1.84\%$ (图3A~D)。免疫印迹实验结果表明,C13能上调凋亡标志蛋白cleaved-PARP的蛋白水平(图3E、F)。以上结果均证



**Figure 2** Effects of C13 on the proliferation of HGC-27 and AGS cells. A, B: Effects of C13 on the viability of HGC-27 and AGS cells after treatment with different concentrations and time; C – F: Representative images of EdU staining of HGC-27 and AGS cells and EdU-positive cell proportion after C13 (1.5 and 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) treatment for 24 h. Scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ ; G, H: Representative images of the cell colony formation assay of HGC-27 and AGS cells and the quantification of colony number after C13 (1.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) treatment for 12 days;  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group (0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

明, C13 能诱导人胃癌 HGC-27、AGS 细胞发生凋亡。

#### 4 转录组测序分析

转录组学是利用高通量测序技术对样品所有转录本进行测序, 能揭示中药干预后肿瘤组织或细胞中转录水平变化。本研究对 C13 ( $0, 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 48 h 样本进行了转录组测序, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 信号通路富集结果提示, C13 的作用机制可能与 ErbB 信号通路、p53 信号通路、铁死亡信号通路等有关 (图 4)。对转录组测序数据进一步发现, ErbB4 的表达丰度发生了下调 (对照组、给药组 count 值分别为: 1 453、810)。在肿瘤细胞中过度表达或过度激活的 ErbB4 能够通过磷酸化 PI3K, 从而激活 PI3K/AKT 信号通路, 最终促进肿瘤细胞的生长<sup>[16]</sup>。因此, 本课题组推测 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路下调可能参与了 C13 的抗胃癌作用。

#### 5 C13 对人胃癌细胞中 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路的影响

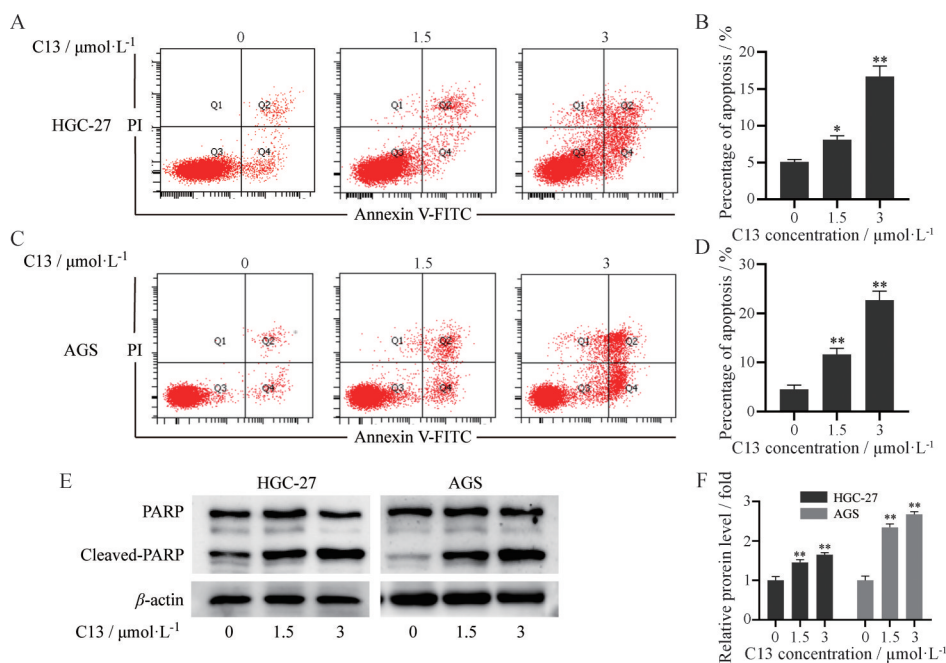
为了验证 C13 对人胃癌细胞中 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路的调控作用, 本研究采用免疫印迹实验对 C13 给药 48 h 后的人胃癌 HGC-27、AGS 细胞中 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白水平进行了检测。与空白组相比, 给药组 ( $1.5, 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 ErbB4、p-ErbB4、p-PI3K、p-AKT 蛋白水平均发生下调, 表明 C13 能够抑制人胃癌细胞中 ErbB4 总蛋白及磷酸化水平, 并能够

下调其下游 PI3K 及 AKT 蛋白磷酸化水平 (图 5)。因此, C13 能够抑制人胃癌细胞中 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路。

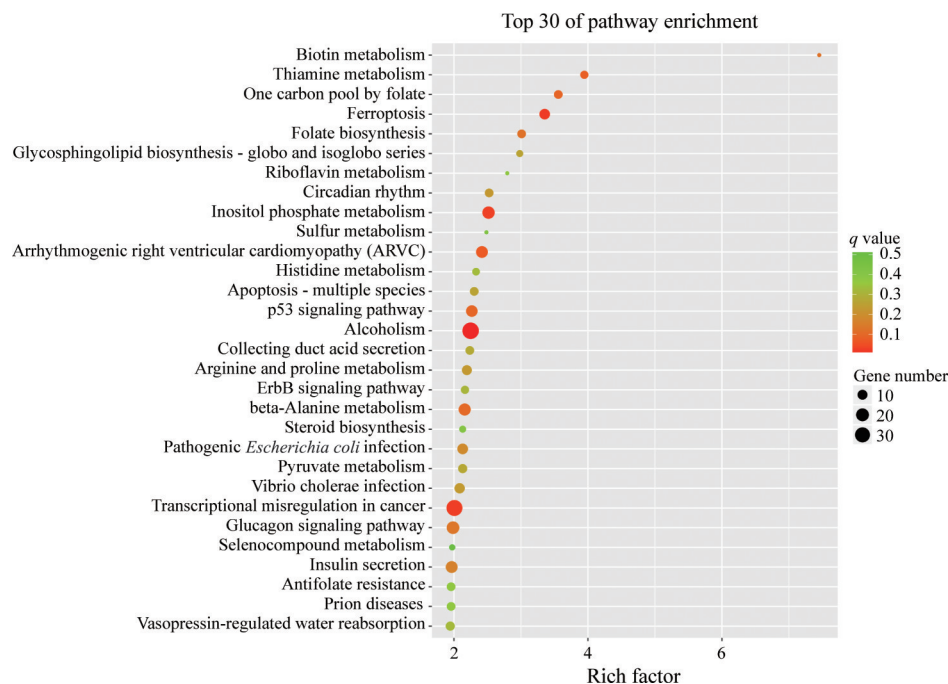
#### 讨论

随着青蒿素<sup>[17]</sup>、三氧化二砷<sup>[18,19]</sup>等中药来源成分在抗疟疾及抗肿瘤等领域取得了巨大成功, 证明从中药中挖掘新药及其先导化合物具有巨大的潜力。黄酮类化合物是中药有效成分的重要组成部分, 根据结构可以分为黄酮、黄酮醇、查耳酮、聚合黄酮和黄烷等<sup>[20]</sup>。现代药理研究表明, 中药黄酮类产物具有良好的抗肿瘤活性, 如中药黄芩中的主要成分黄芩苷可以通过诱导肿瘤细胞凋亡及周期阻滞<sup>[21]</sup>、促进铁死亡<sup>[22,23]</sup>等机制发挥抗肿瘤活性。本课题组的前期工作从中药龙血竭中分离出一个天然黄酮类成分 DHMMF, 并发现其具有良好的抗肿瘤活性<sup>[15]</sup>。在针对 DHMMF 进行类似物合成过程中, 本课题组获得了多个查耳酮类化合物, 并进行了体外抗肿瘤活性筛选, 其中 C13 对人胃癌细胞展现出较好的细胞毒活性, 其对人胃癌 HGC-27、AGS 细胞给药 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $2.284, 1.898 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过集落形成实验、EdU 增殖实验及流式细胞术实验, 进一步证明了 C13 能抑制人胃癌细胞的增殖能力并诱导其发生细胞凋亡。

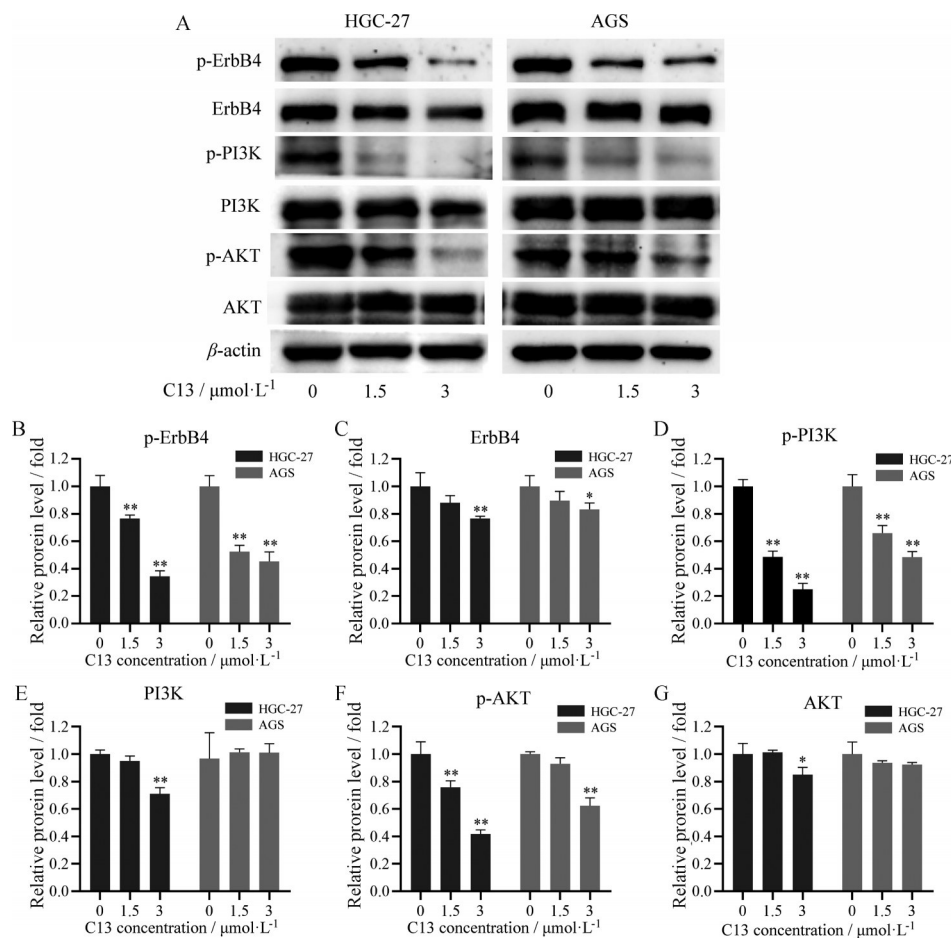
EGFR 家族, 又称 ErbB 家族, 是一组与细胞生长及



**Figure 3** Effects of C13 on apoptosis of HGC-27 and AGS cells. A–D: Representative images of apoptosis detection by Annexin V/PI flow cytometry and the quantification of apoptosis rate after C13 ( $1.5$  and  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) treatment for 48 h; E, F: Cleaved-poly ADP-ribose polymerase (cleaved-PARP) protein levels were detected by Western blot analysis and quantified using Image J after C13 ( $1.5$  and  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) treatment for 48 h.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group



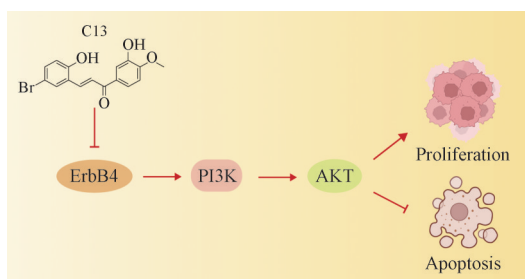
**Figure 4** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of RNA sequencing on HGC-27 cells treated with or without C13



**Figure 5** Effects of C13 on ErbB4/PI3K/AKT signaling pathway in HGC-27 and AGS cells. HGC-27 and AGS cells treated with C13 (0, 1.5, 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h were subjected to Western blot analysis (A), and the quantification using Image J (B-G).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group. ErbB4: Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4; PI3K: Phosphoinositide 3-kinases

分化密切相关的受体酪氨酸激酶,是目前研究最多的细胞信号家族之一<sup>[24]</sup>。ErbB4 是 ErbB 家族的成员之一,其对生长具有双向调节作用<sup>[6]</sup>。ErbB4 过度表达或过度激活往往会导致肿瘤的发生发展。如在胃癌、乳腺癌、黑色素瘤及肺癌中观察到 ErbB4 激酶结构域的突变,并证明了这些突变能够增加 ErbB4 的表达或磷酸化活性,进而促进肿瘤的增殖及转移<sup>[25-28]</sup>。经典 ErbB4 信号通路的激活高度依赖 ErbB4 的磷酸化。ErbB4 通过与其配体(主要为 neregulin-1)结合而被激活,激活后的 ErbB4 会开始自磷酸化,并进一步激活下游多条与增殖相关的信号通路,如 PI3K/AKT 信号通路<sup>[16]</sup>。使用慢病毒敲低 ErbB4 或使用 AST-1306 (一种 ErbB4 抑制剂)处理能够下调 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达,并显著抑制胃癌细胞增殖<sup>[8]</sup>。研究表明,ErbB4 突变频繁发生在非小细胞肺癌中,Y285C、D595V、D931Y 等位点的突变会导致 ErbB4 的蛋白水平及配体诱导的磷酸化水平的增加,并进一步上调 AKT 磷酸化水平,最终促进肿瘤细胞的增殖<sup>[27]</sup>。Clone P6-1 (一种 ErbB4 单克隆抗体)能通过抑制 ErbB4 的神经调节素(neuregulin, NRG)依赖性活化,降低其磷酸化水平进而抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[29]</sup>。为了初步探究 C13 的抗胃癌作用机制,本研究对经 C13 给药处理的人胃癌细胞样品进行了转录组测序分析,其中 KEGG 通路富集分析结果提示,ErbB 信号通路可能参与了 C13 的抗胃癌作用,且进一步挖掘转录组测序数据发现,ErbB4 的表达丰度发生了下调。因此,本课题组推测 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路下调可能参与了 C13 的抗胃癌作用。为了进一步验证上述推测,本研究开展了蛋白免疫印迹实验。结果显示,C13 能够显著抑制人胃癌细胞中 ErbB4 的磷酸化水平,并下调其总蛋白,表明 C13 能有效抑制 ErbB4 的活性。同时,C13 能够下调其下游蛋白 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平,即 C13 能够抑制人胃癌细胞中 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路。

综上所述,新型查耳酮衍生物 C13 能够显著抑制



**Figure 6** C13 inhibited the proliferation and induced the apoptosis of human gastric cancer cells through downregulating ErbB4/PI3K/AKT signaling pathway

人胃癌 HGC-27、AGS 细胞增殖并诱导其发生凋亡,其作用机制可能与下调 ErbB4/PI3K/AKT 信号通路有关(图6)。本研究揭示了 C13 的抗胃癌活性,提示其有望成为针对 ErbB4 靶点治疗胃癌的候选研究药物。

**作者贡献:** 谭鹏、张云封、王龙燕进行实验研究、数据采集及分析、论文撰写;黄惠铭、王飞进行转录组测序数据分析;魏雪娇、王柱国进行文献调研与分析;李军、胡仲冬进行实验设计、研究思路指导、论文撰写与修改、提供研究经费。

**利益冲突:** 不存在任何利益冲突。

## 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] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396: 635-648.
- [3] Gao K, Wu J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003-2015): a population-based study [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39: 24.
- [4] Li K, Zhang A, Li X, et al. Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876: 188615.
- [5] Zhang Y, Gao LX, Wang W, et al. M<sup>6</sup>A demethylase fat mass and obesity-associated protein regulates cisplatin resistance of gastric cancer by modulating autophagy activation through ULK1 [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113: 3085-3096.
- [6] Segers VFM, Dugaucquier L, Feyen E, et al. The role of ErbB4 in cancer [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43: 335-352.
- [7] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 127-137.
- [8] Xu J, Gong L, Qian Z, et al. ERBB4 promotes the proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39: 2892-2898.
- [9] Liu Y, Zhao X, Yao R, et al. Dragon's blood from *Dracaena* worldwide: species, traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49: 1315-1367.
- [10] Chen X, Zhao Y, Yang A, et al. Chinese dragon's blood EtOAc extract inhibits liver cancer growth through downregulation of Smad3 [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 669.
- [11] Wang H, Jiang HM, Li FX, et al. Flavonoids from artificially induced dragon's blood of *Dracaena cambodiana* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121: 1-5.
- [12] Wan Y, Yu Y, Pan X, et al. Inhibition on acid-sensing ion channels and analgesic activities of flavonoids isolated from dragon's blood resin [J]. *Phytother Res*, 2019, 33: 718-727.
- [13] Chen F, Xiong H, Wang J, et al. Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats [J]. *J*

- Ethnopharmacol, 2013, 149: 729-736.
- [14] Ouyang L, Li J, Chen X, et al. Chinese dragon's blood ethyl acetate extract suppresses gastric cancer progression through induction of apoptosis and autophagy mediated by activation of MAPK and downregulation of the mTOR-Beclin1 signalling cascade [J]. *Phytother Res*, 2022, 37: 689-701.
- [15] Tian Y, Wang L, Chen X, et al. DHMMF, a natural flavonoid from *Resina Draconis*, inhibits hepatocellular carcinoma progression via inducing apoptosis and G2/M phase arrest mediated by DNA damage-driven upregulation of p21 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 211: 115518.
- [16] El-Gamal MI, Mewafi NH, Abdelmotelieb NE, et al. A review of HER4 (ErbB4) kinase, its impact on cancer, and its inhibitors [J]. *Molecules*, 2021, 26: 7376.
- [17] Ma N, Zhang Z, Liao F, et al. The birth of artemisinin [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 216: 107658.
- [18] Chen L, Zhu HM, Li Y, et al. Arsenic trioxide replacing or reducing chemotherapy in consolidation therapy for acute promyelocytic leukemia (APL2012 trial) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2020382118.
- [19] Kutny MA, Alonzo TA, Abla O, et al. Assessment of arsenic trioxide and all-*trans* retinoic acid for the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia: a report from the Children's Oncology Group AAML1331 Trial [J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8: 79-87.
- [20] Lin CC, Chen DW, Dai JG. Advances of synthetic biology of flavonoids [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1322-1335.
- [21] Cai R, Zhou YP, Li YH, et al. Baicalin blocks colon cancer cell cycle and inhibits cell proliferation through miR-139-3p upregulation by targeting CDK16 [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51: 189-203.
- [22] Wen RJ, Dong X, Zhuang HW, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154881.
- [23] Kong N, Chen X, Feng J, et al. Baicalin induces ferroptosis in bladder cancer cells by downregulating FTH1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 4045-4054.
- [24] Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 79: 34-74.
- [25] Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ErbB4 [J]. *Nat Genet*, 2009, 41: 1127-1132.
- [26] Soung YH, Lee IW, Kim SY, et al. Somatic mutations of the ErbB4 kinase domain in human cancers [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118: 1426-1429.
- [27] Kurppa KJ, Denessiouk K, Johnson MS, et al. Activating ErbB4 mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 35: 1283-1291.
- [28] He XX, Ding L, Lin Y, et al. Protein expression of HER2, 3, 4 in gastric cancer: correlation with clinical features and survival [J]. *J Clin Pathol*, 2015, 68: 374-380.
- [29] Okazaki S, Nakatani F, Masuko K, et al. Development of an ErbB4 monoclonal antibody that blocks neuregulin-1-induced ErbB4 activation in cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470: 239-244.