海洋真菌来源细胞松弛素19-hydroxycytochalasin B对膀胱癌细胞生长的抑制作用及其机制研究

唐 举[1,2#], 胡雪怡[3#], 王晨吟[2], 李 鑫[3], 孟令红[3], 张永萍[1*], 司书毅[2*]

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 国家新药 (微生物) 筛选实验室, 国家卫生健康委员会抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050; 3. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 膀胱癌在全球具有较高的发病率与死亡率, 现有治疗手段常面临耐药、复发和转移等诸多挑战, 因此驱动着对于新型治疗化合物的持续性探索。19-Hydroxycytochalasin B (19-HCB) 是一种海洋真菌来源的细胞松弛素, 已有研究证实其结构类似物具有较好的抗肿瘤活性, 但其抗肿瘤机制尚不明确。本研究旨在评估19-HCB的体外抗肿瘤活性, 并以人膀胱癌J82细胞为模型探讨其作用机制。采用MTT法、细胞划痕实验、高内涵成像与流式细胞术、克隆形成、RT-qPCR和Western blot实验等综合评估其抗肿瘤活性和机制。结果显示, 19-HCB对膀胱癌J82细胞表现出最强的增殖抑制活性 (IC_{50} = 0.59 μmol·L^{-1}), 并能显著性抑制J82细胞的迁移。进一步研究作用机制显示, 与诱导细胞凋亡密切相关, 表现为促凋亡蛋白BIM、BAX上调和抗凋亡蛋白survivin下调; 同时, 细胞周期调控蛋白p21表达上调, 而CDK1表达下调, 此外, 19-HCB还能抑制AKT信号通路传导。总之, 19-HCB通过诱导凋亡、抑制迁移并调控多条关键信号通路, 从而发挥抗膀胱癌作用, 是一种具有开发潜力的候选药物先导化合物。

关键词: 海洋真菌; 次级代谢产物; 膀胱癌; 细胞凋亡; 机制研究

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)06-2172-08

The effect and mechanism of 19-hydroxycytochalasin B from marine fungus inhibited bladder cancer cells growth

TANG Ju[1,2#], HU Xue-yi[3#], WANG Chen-yin[2], LI Xin[3], MENG Ling-hong[3], ZHANG Yong-ping[1*], SI Shu-yi[2*]

(*1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. National Screening Laboratory for New Microbial Drugs, Key Laboratory of Antibiotic Bioengineering of the National Health Commission, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*)

Abstract: Bladder cancer has a high incidence and mortality rate worldwide. Existing treatment methods often face the challenges, such as drug resistance, recurrence and metastasis. These challenges drive our effect to explore new therapeutic compounds. 19-Hydroxycytochalasin B (19-HCB) is a new cytochalasin isolated from marine fungus. Previous studies have confirmed that its structural analogues have good anti-tumor activity, but the

收稿日期: 2025-11-13; 修回日期: 2026-01-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (42206112, 42506080); 国家外国专家项目 (S20240248); 中国医药教育协会医药科技攻关课题项目 (2024KTM017).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13985171981, E-mail: zgygpg@126.com;
Tel: 86-10-63180604, E-mail: sisy@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1355

anti-tumor activity and mechanism of 19-HCB remain unclear. This study aims to evaluate the *in vitro* anti-tumor activity of 19-HCB and explore the mechanism of its action in human bladder cancer J82 cells. The anti-tumor activity was comprehensively evaluated through analyzing cell growth by MTT assay, cell scratch assay, high-content imaging and flow cytometry, colony formation and other experiments. The results showed that 19-HCB exhibited the strongest proliferative inhibitory activity (IC_{50} = 0.59 μmol·L^{-1}) against bladder cancer J82 cells and could significantly inhibit the migration of J82 cells. Its mechanism of action is closely related to inducing apoptosis, manifested as the upregulation of pro-apoptotic proteins BIM and BAX and the down-regulation of anti-apoptotic protein survivin. Meanwhile, the expression of cell cycle regulatory protein p21 is upregulated while that of CDK1 is downregulated. Additionally, 19-HCB can also inhibit the AKT signaling pathway. In summary, 19-HCB exerts anti-bladder cancer effects by inducing apoptosis, inhibiting migration and regulating multiple key signaling pathways, and is a candidate drug lead compound with development potential.

Key words: marine fungus; secondary metabolites; bladder cancer; apoptosis; mechanism research

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 全球每年约有573 278人新诊断为膀胱癌[1,2], 根据世界卫生组织的预测, 到2040年, 这一数字预计将翻一倍。该病在男性中发病率远高于女性, 在男性恶性肿瘤发病率中排名第六[3]。膀胱癌根据肿瘤浸润深度的不同, 通常被分为非肌层浸润性膀胱癌 (non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC) 和肌层浸润性膀胱癌 (muscle-invasive bladder cancer, MIBC)[3], 高度的异质性使其在临床治疗中面临巨大挑战。因此, 探寻新型高效的抗膀胱癌药物具有重要的临床意义。对于NMIBC, 核心是膀胱灌注治疗。卡介苗 (BCG) 是高危患者的免疫治疗金标准[4], 能有效预防复发和进展; 丝裂霉素C等化疗药物则常用于中危患者或术后即刻灌注[5]。对于MIBC和转移性膀胱癌, 以全身治疗为主[6]。近年来, 治疗格局被彻底改变: 免疫治疗: PD-1/L1抑制剂用于不耐受化疗或化疗后的患者[7]。靶向治疗: 针对特定基因突变 (如FGFR) 的抑制剂为精准医疗带来突破[8]。抗体药物偶联物: 针对nectin-4、TROP-2、HER2等靶点的新药疗效显著[9], 成为后线治疗的重要选择。

研究发现, 从海洋真菌的次级代谢产物中发现的一系列活性分子, 初步研究发现这些化合物具有细胞毒性[10]、抗菌[10]、抗寄生虫[11]和抗病毒特性[12]。抗肿瘤活性研究发现, 细胞松弛素及其衍生物对多种肿瘤细胞系表现出显著的抑制作用[13], 这表明该类化合物在抗肿瘤活性方面具有巨大潜力。19-Hydroxycytochalasin B (19-HCB, 图1) 是从海洋内生真菌*Curvularia verruculosa* CS-129分离得到的活性化合物, 通过高分辨电喷雾电离质谱 (HRESIMS) 正离子模式数据确定其化学式为$C_{29}H_{37}NO_6$。抗菌活性方面, 该化合物对水生病原菌爱德华氏菌 (*Edwardisella ictaluri*) 表现出抑制活性[14], 最小抑菌浓度 (MIC) 值为8 μg·mL^{-1}; 抗肿瘤活性方面, 19-HCB对HCT-116、肝癌细胞HepG-2和乳腺癌细胞MCF-7表现出突出的细胞毒性[14]。实验室前期将海洋内生真菌*Curvularia verruculosa* CS-129经固体大米培养基大规模发酵后, 使用乙酸乙酯对发酵物进行充分提取, 所得提取液经浓缩后得到粗提物。进一步将粗提物分离纯化后得到高纯度的19-HCB。本研究通过MTT细胞活力检测、细胞划痕、细胞凋亡检测以及Western blot等实验方法, 旨在探索19-HCB的抗膀胱癌肿瘤活性与潜在机制。

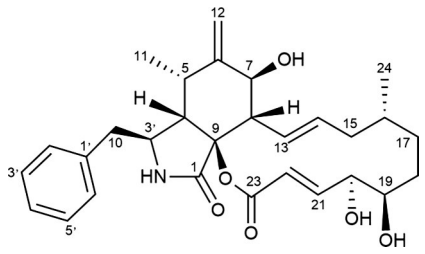


Figure 1　Chemical structure of 19-hydroxycytochalasin B (19-HCB)

材料与方法

仪器与试剂　化合物19-HCB由实验室前期自主分离纯化得到, 纯度为99.0%; 细胞恒温培养箱 (HERAcell vios 160i, 德国Thermo公司); 酶标仪 (SpectraMax ID3s, 美国Molecular Devices公司); 实时荧光定量检测PCR仪 (LightCycler 480, 瑞士Roche公司); 离心机 (10020, 德国Sigma公司); DMEM高糖培养基 (SH30243.01)、青霉素−链霉素双抗 (SV30010)、PBS缓冲液 (C7033)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液 (SH30042.01), Cytiva公司; 噻唑蓝 (M8180, Solarbio公司); BCA蛋白浓度检测试剂盒、DMSO (S24295-500 mL, 上海源叶生物科技有限公司); Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒 (C1062L)、0.1%结晶紫染色液 (S0053-1)、RIPA裂解液 (P0093-100 mL), Beyotime公司; 4%多聚甲醛固定液 (BL539A, Biosharp公司); QIAzol试剂

(79306, QINGEN 公司); 特异性引物 (Songon Biotech 公司)、蛋白酶抑制剂 (1862209, Thermo 公司)。

细胞培养 人膀胱癌细胞 J82、结直肠癌细胞 HCT-116、肝癌细胞 HepG-2、乳腺癌细胞 MCF-7 使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素−链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基, 在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中进行常规培养。当细胞生长至 70%～80% 汇合度时进行传代, 弃去旧培养基, 用 PBS 缓冲液清洗细胞一次, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 于 37 ℃ 培养箱中消化约 1～2 min。立即加入含血清的完全培养基终止消化, 吹打培养瓶壁以获得单细胞悬液。

MTT 细胞活力检测与细胞的筛选 将上述培养的细胞分别接种到 96 孔板中后, 置于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h, 使细胞充分贴壁。加入不同浓度梯度的化合物 19-HCB (10、100、316 nmol·L^{-1}、1、3.16、10、31.6、100 μmol·L^{-1}), 每个浓度设置 3 个复孔, 继续培养 72 h; 药物处理结束后, 每孔加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐溶液 (MTT, 5 mg·mL^{-1}) 25 μL, 继续培养 40 min 后加入 DMSO, 在 570 nm 波长下检测各孔的吸光度值。选取细胞活力影响最显著的细胞进行进一步的研究。

细胞迁移检测实验 取处于对数生长期的 J82 细胞, 以 3×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 当细胞密度达到 95% 左右时, 用 200 μL 无菌移液枪头制造划痕, PBS 清洗细胞碎片后将培养基更换为含 1% FBS 的培养基, 不同组别加入对应浓度的 19-HCB, 随后将细胞置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养, 期间分别在划痕后的 0、24、48 h 对细胞的划痕愈合情况进行记录。使用 Image J 软件对图像进行分析量化。

高内涵细胞凋亡检测实验 (Annexin V) 取对数生长期的 J82 细胞接种于 96 孔板, 不同药物浓度 (0、0.1、1、10 μmol·L^{-1}) 处理 72 h, 除去孔内培养基, PBS 轻柔漂洗细胞两次。随后, 每孔加入 100 μL 配制好的染色工作液 [含 Annexin V-异硫氰酸荧光素 (FITC) 和碘化丙啶 (propidium Iodide, PI)]。将培养板置于室温下避光孵育 15 min。为便于细胞核识别和计数, 在孵育结束前 5 min, 每孔加入 Hoechst 33342 进行细胞核复染。孵育结束后, 使用高内涵成像系统进行图像采集。软件自动统计每孔中各类细胞的数目和比例。细胞凋亡率以 (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数)/总细胞数× 100%表示。所有实验独立重复 3 次, 数据以均值 ± 标准差表示。采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

细胞凋亡检测 (Annexin V-FITC/PI 流式细胞术) 取对数生长期的 J82 细胞, 以 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 将其分为对照组和 19-HCB 给药低、中、高剂量组 (5、10、20 μmol·L^{-1}) 进行给药处理 72 h。给药结束后收集细胞, 使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒进行染色, 染色完成通过流式细胞仪进行检测, 随后使用 Flow Jo 对数据进行分析。

平板克隆形成实验 将 J82 细胞接种至 6 孔板 (1×10^3 个/孔), 不同组别各自给药 72 h 后, 去除药物, 更换新鲜培养基, 连续培养 14 d 后可见对照组形成肉眼可见的细胞集落, 去除培养基用 PBS 洗两遍, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, PBS 清洗, 自然风干, 拍照后使用 Image J 计算细胞集落形成数。

Transwell 细胞侵袭实验 提前将无血清培养基稀释的 Matrigel 胶均匀铺于 Transwell 小室 (8.0 μm 孔径) 的上室面, 置于 37 ℃培养箱中聚合 1 h 形成凝胶屏障; 收集已完成给药的细胞, 用无血清培养基调整每毫升细胞数至 5×10^5 个, 在 Transwell 下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的完全培养基作为趋化诱导剂, 然后向上室加入 200 μL 细胞悬液 (即 1×10^5 个细胞), 于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h; 孵育结束后取出小室, 弃去培养液, 用 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 用湿棉签轻轻擦除上室膜内表面未侵袭细胞, 将小室风干后倒置于显微镜下随机选取 5 个不重叠视野对穿透基质胶和膜的下表面细胞进行计数。

实时定量逆转录 PCR (RT-qPCR) J82 细胞 72 h 给药处理完成后, 收集细胞, 使用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA。经逆转录合成 cDNA, 按照 qPCR 试剂盒配置反应体系, 以人源 β-actin 作为内参基因进行实时荧光定量 PCR 检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算目的基因 mRNA 的相对表达水平, 引物序列详见表 1。

Western blot 检测相关蛋白的表达 将完成给药的各组细胞收集, 分别提取总蛋白。各组加入 RIPA 裂

Table 1 Primer sequences of RT-qPCR. BIM: Bcl-2 interacting mediator of cell death; BAX: Bcl-2 associated X protein; p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; BRIC5: Baculoviral IAP repeat containing 5

Gene	Sequence (5'-3')
β-Actin	F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
	R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
BIM	F: TCCGATTTAGTTCCACTCTGC
	R: TTCCTTTTACATGCCTGGTG
BAX	F: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG
	R: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
p21	F: CGATGGAACTTCGACTTTGTCA
	R: GCACAAGGGTACAAGACAGTG
BRIC5	F: AGGACCACCGCATCTCTACAT
	R: AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG

解液和蛋白酶抑制剂 (100∶1), 冰上裂解 30 min 后, 4 ℃、12 000 ×*g* 离心 15 min, 收集上清, BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度, 蛋白样品与 4×loading buffer 混合后, 100 ℃金属浴加热 10 min 使蛋白变性。经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 初始电压为 80 V (浓缩胶), 待溴酚蓝进入分离胶后, 将电压改为 120 V, 直至溴酚蓝到达凝胶底部, 随后转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗孵育过夜, 次日回收一抗, 洗膜后使用二抗孵育 1 h, 再次充分洗膜后曝光显影。

统计学分析　本研究中的所有定量实验均至少独立重复 3 次, 实验数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。Flow Jo 用于流式数据分析, Image J 用于量化蛋白条带灰度值、克隆形成数和细胞划痕面积, GraphPad Prism 9 用于统计学分析及图表绘制; 两组间比较采用非配对 *t* 检验 (unpaired two-tailed student's *t*-test)。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结果

1　化合物 19-HCB 对不同细胞系生长的抑制作用

以 MTT 方法分析, 结果显示, 19-HCB 对 J82、HCT-116、HepG-2、MCF-7 细胞的 IC_{50} 值分别为 (0.59 ± 0.08)、(9.51 ± 1.86)、(6.40 ± 1.33)、(6.04 ± 2.23) μmol·L^{-1} (图 2); 由此可见, 化合物 19-HCB 对膀胱癌细胞 J82 活性具有较为显著的抑制作用。

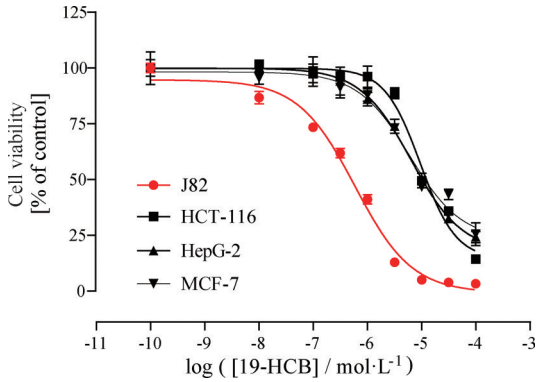


Figure 2　Compound 19-HCB exerts concentration-dependent cytotoxic effects on four human cancer cell lines. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2　化合物 19-HCB 对 J82 细胞迁移的抑制作用

细胞划痕实验结果显示 (图 3), 对照组、19-HCB 高剂量组、中剂量组、低剂量组在 24 h 时的细胞迁移率分别为 (53.78 ± 2.69)%、(34.16 ± 1.70)%、(29.89 ± 1.68)%、(14.36 ± 3.00)%; 在 48 h 时的细胞迁移率分别为 (72.35 ± 2.78)%、(42.93 ± 1.39)%、(34.29 ± 2.13)%、(22.72 ± 2.08)%; 各给药组相较于对照组细胞迁移率均显著下降, 且各组相对于对照组均具有统计学差异 ($P < 0.001$)。

3　化合物 19-HCB 促进 J82 细胞凋亡作用

以高内涵细胞分析仪检测显示, 19-HCB 促进癌细胞凋亡。结果显示 (图 4A、B), 各组 Annexin 阳性细胞的占比分别为 (3.00 ± 0.48)%、(4.29 ± 1.93)%、(10.23 ± 3.49)%、(71.32 ± 9.74)%; 10 μmol·L^{-1} 与对照组相比均存在极显著差异 ($P < 0.000\ 1$)。流式细胞术结果显示 (图 4C、D), 对照组、19-HCB 低剂量组、中剂量组、高剂量组的细胞凋亡占比分别为 (5.32 ± 1.14)%、(23.50 ± 2.93)%、(32.68 ± 1.86)%、(41.13 ± 2.12)%; 各给药组与对照组比较细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.000\ 1$)。

4　19-HCB 抑制 J82 细胞的增殖与侵袭作用

细胞克隆形成实验结果显示对照组、5、10、20 μmol·L^{-1} 组的克隆形成数分别为 (163.30 ± 12.34)、(88.00 ± 9.00)、(57.00 ± 6.25)、(46.67 ± 3.22); 给药各组与对照组比较, 细胞克隆形成数均显著减少 (图 5A、B), 差异具有显著性 ($P < 0.000\ 1$)。侵袭实验结果显示对照组、5、10、20 μmol·L^{-1} 组的侵袭细胞数分别为 (208.30 ± 7.02)、(208.00 ± 6.08)、(132.30 ± 8.51)、

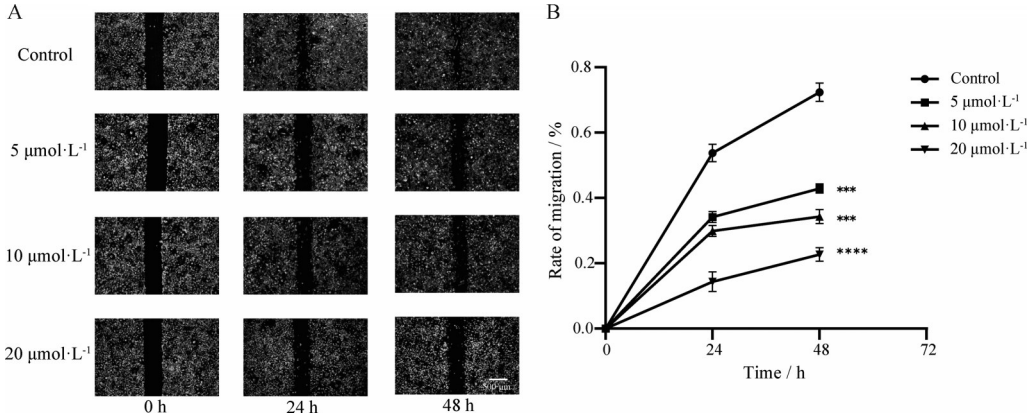


Figure 3　The effect of compound 19-HCB on J82 cell migration. A: Cell migration scratch results graph, scale bar = 500 μm; B: Cell migration rate results statistical graph. $n = 3, \bar{x} \pm s$

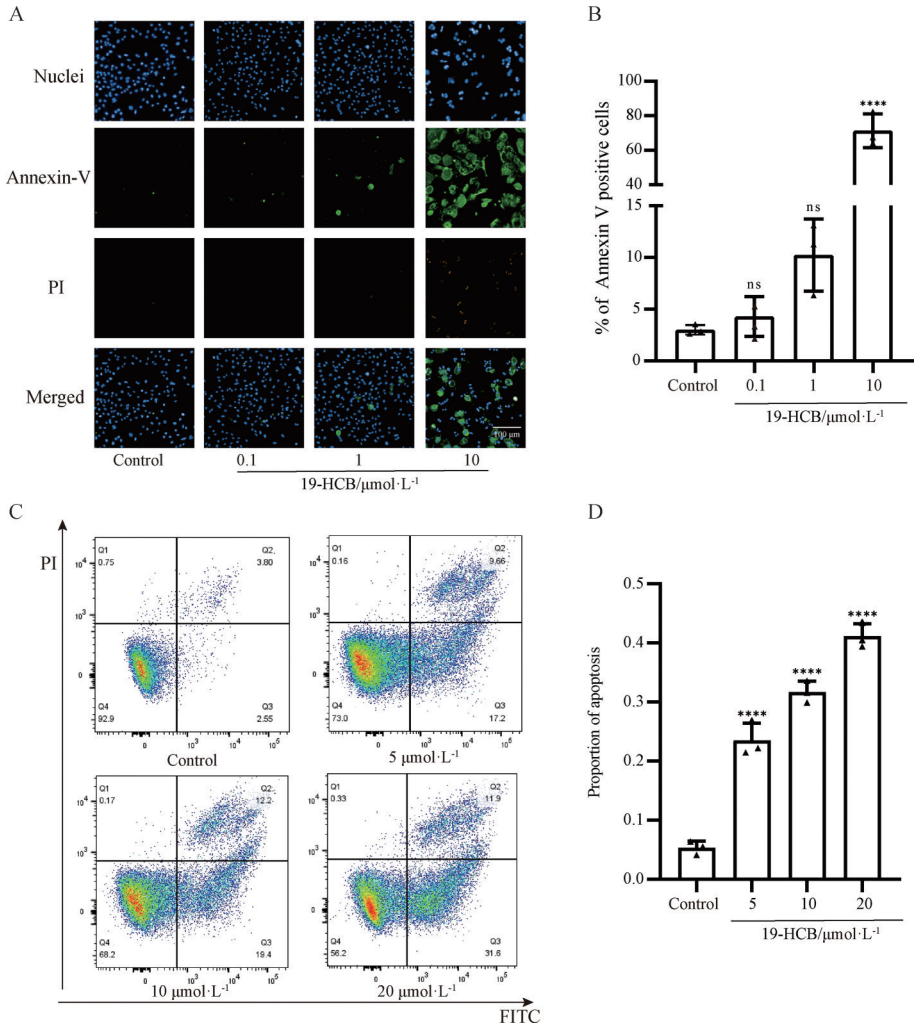


Figure 4 The effect of compound 19-HCB on the apoptosis of J82 cells. A: High-content imaging system analysis revealed the morphological characteristics of apoptosis in cells treated with different concentrations of 19-HCB, scale bar = 100 μm; B: Statistical chart of Annexin positive cell proportion; C: Flow cytometry was used to detect the effect of compound 19-HCB on the apoptosis of J82 cells; D: Statistical chart of percentage of apoptosis. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control. ns: No significance

(110.70 ± 8.01); 10和20 μmol·L^{-1}组相比于对照组细胞侵袭数明显减低 (图5C、D), 差异具有显著性 ($P < 0.000\ 1$)。

5 19-HCB对J82细胞增殖相关基因表达的影响

以RT-qPCR方法分析显示, 19-HCB对J82细胞相关基因mRNA表达水平具有明显的影响。结果如图6所示, 对照组、5、10、20 μmol·L^{-1}组survivin基因的mRNA的相对表达量分别为: (1.01 ± 0.09)、(0.38 ± 0.04)、(0.37 ± 0.07)、(0.34 ± 0.02); p21基因的mRNA相对表达量分别为: (1.02 ± 0.08)、(0.83 ± 0.06)、(2.10 ± 0.22)、(2.61 ± 0.19); BIM的mRNA相对表达量分别为: (1.01 ± 0.08)、(1.29 ± 0.02)、(1.67 ± 0.03)、(1.79 ± 0.04); BAX的mRNA相对表达量分别为 (1.02 ± 0.06)、(1.26 ± 0.07)、(1.51 ± 0.07)、(1.58 ± 0.04); 给药10 μmol·L^{-1}后, 相关基因的mRNA表达水平相对于空白组均有明显差异 ($P < 0.000\ 1$)。

6 19-HCB对J82细胞增殖相关蛋白表达的影响

在肿瘤的发生和进展过程中, 蛋白survivin、CDK1、p21与肿瘤细胞增殖失控相关[15-17]; BIM与BAX共同调控肿瘤细胞的凋亡[18]、AKT与肿瘤信号通路相关[19]。蛋白免疫印迹结果显示 (图7), 化合物19-HCB处理72 h后, survivin、CDK1蛋白表达水平均随药物浓度升高而下调, AKT蛋白水平20 μmol·L^{-1}组明显下调 ($P < 0.000\ 1$); BIM、BAX蛋白水平给药后也呈现上调趋势 ($P < 0.001$、$P < 0.000\ 1$); p21蛋白水平20 μmol·L^{-1}组明显上调 ($P < 0.000\ 1$)。

讨论

本研究对海洋真菌来源的化合物19-HCB进行了体外抗肿瘤活性评价, 包括对多种人类癌细胞系 (包括人膀胱癌细胞J82、结直肠癌细胞HCT-116、肝癌细

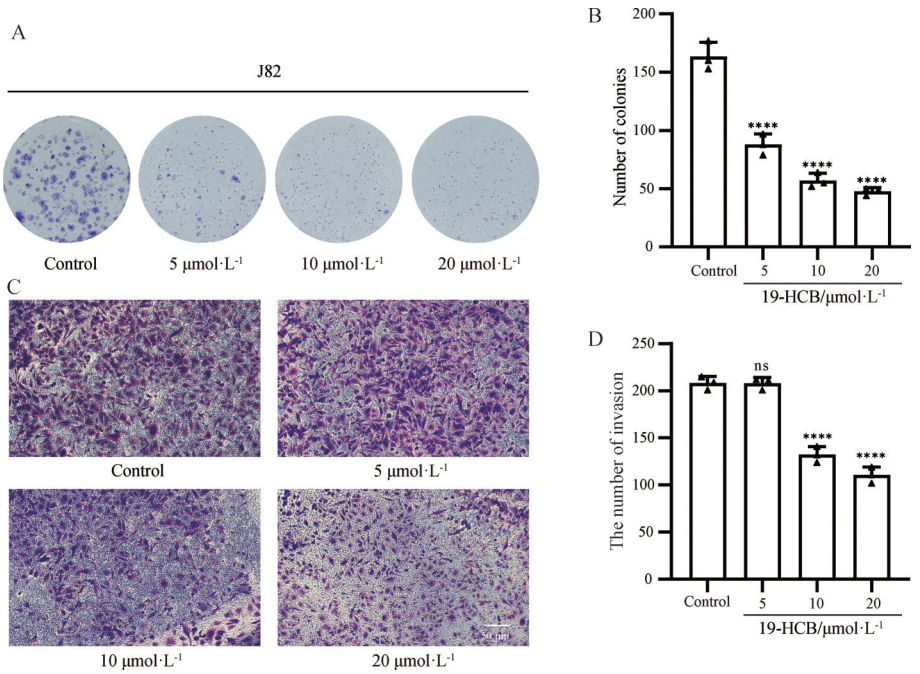


Figure 5　The effect of compound 19-HCB on cell proliferation and invasion. A: Cell plate clone proliferation; B: Cell clone number statistics; C: Staining for cell invasion assay, scale bar = 50 μm; D: Cell invasion number statistics. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control

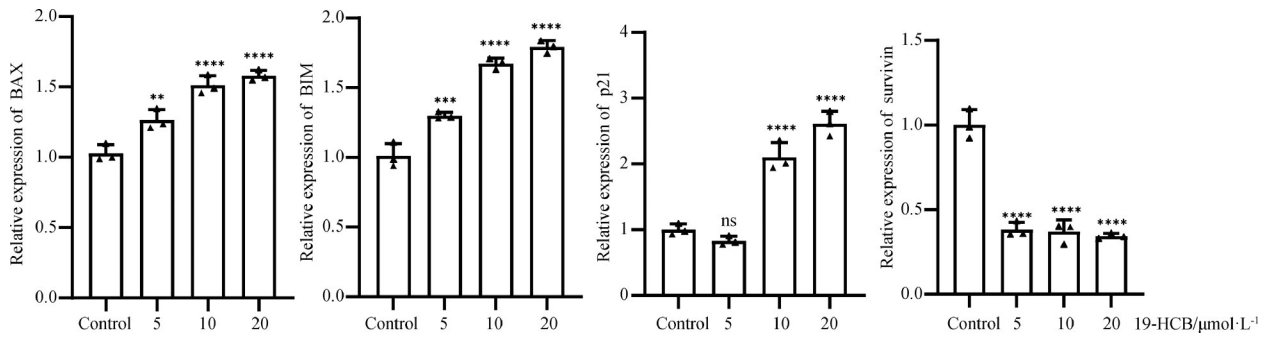


Figure 6　Statistical plot of related gene expression levels. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

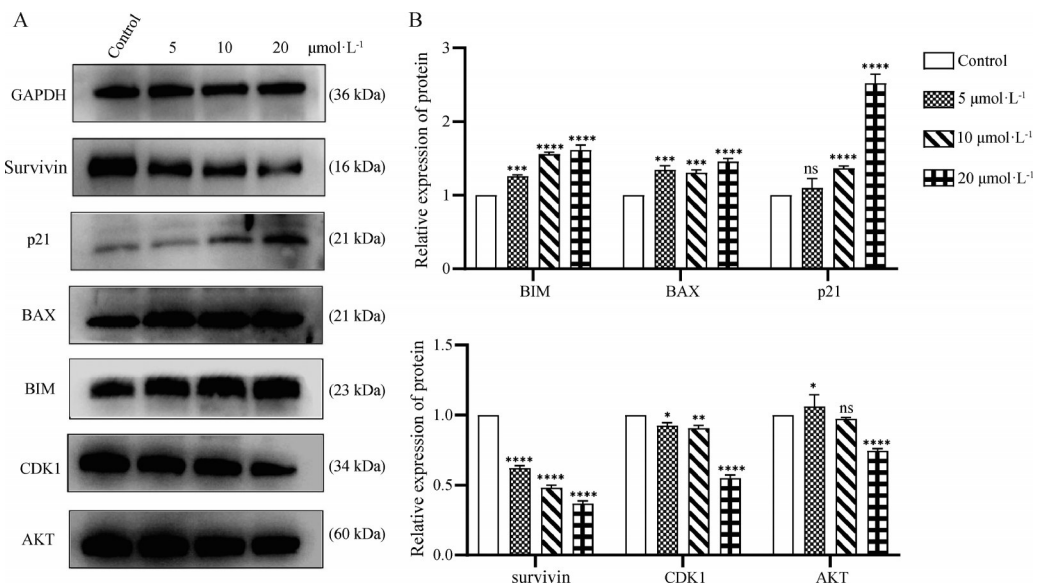


Figure 7　The effect of 19-HCB on the expression of apoptosis-related proteins in J82 cells. A: Western blot analysis of protein expression levels; B: Statistical plot of protein expression levels. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

胞 HepG-2 和乳腺癌细胞 MCF-7) 的抗肿瘤活性测试, 并重点以 J82 细胞为模型深入探讨其潜在的抗肿瘤机制。通过一系列体外实验, 包括 MTT 细胞活力检测、细胞划痕实验、高内涵细胞凋亡检测、流式细胞术、平板克隆形成实验、RT-qPCR 和 Western blot, 分析了 19-HCB 对细胞增殖、迁移、凋亡及相关基因和蛋白表达的影响。研究结果发现, 19-HCB 作为一种潜在的抗膀胱癌药物, 其选择性抑制 J82 细胞 (IC_{50}: 0.59 μmol·L^{-1})。肿瘤细胞的迁移和侵袭能力强弱与肿瘤进展和预后密切相关, 划痕实验结果表明 19-HCB 能够显著抑制肿瘤细胞迁移。此外, 通过对 19-HCB 处理后的细胞进行 Annexin V 和 PI 双染实验研究其是否能够诱导细胞凋亡。Annexin V 是一种钙离子依赖的磷脂结合蛋白, 当细胞发生凋亡时, 原本位于细胞膜脂质内侧的磷脂酰丝氨酸特异性地翻转到膜外侧, 与 Annexin V-FITC 结合产生绿色荧光。结果显示, 19-HCB 处理后 Annexin-V 的阳性细胞比例显著增加, 提示其抑制细胞增殖的作用是通过诱导凋亡而实现的。

AKT 也称为蛋白激酶 B (PKB), 属于丝氨酸/苏氨酸激酶中的 AGC (蛋白激酶 A、G、C) 超家族[20]。AKT 的异常激活驱动多种致癌过程, 包括促进细胞生存、抑制凋亡、促进生长和增殖, 促进细胞分化, 并介导肌动蛋白细胞骨架重排[21]。它还在肿瘤微环境中发挥着重要作用, 影响血管生成、炎症因子的招募以及免疫细胞的浸润。这些致癌过程共同促进肿瘤生长、转移, 以及治疗耐药性[19,21]。近年来的临床前研究表明, AKT 信号通路的异常激活可能是导致耐药的关键机制之一[22]。为深入探究凋亡通路在耐药中的作用, 研究者利用 siRNA 分别沉默了促凋亡蛋白 BAX、BAK 和 BIM, 以验证它们对 ipatasertib (AKT 抑制剂) 诱导凋亡的必要性。最终证实了敲低 BAX、BAK 或 BIM 中任一蛋白, 均能显著削弱 ipatasertib 在膀胱癌细胞中引发的凋亡效应[23]。同时, survivin 在膀胱癌中同样扮演着关键角色, 它通过抑制细胞凋亡和参与调控细胞分裂来促进肿瘤生存与发展。其抗凋亡作用主要依赖于和半胱天冬酶 (Caspase) 等凋亡效应分子的直接或间接相互作用, 从而阻断细胞死亡程序。基于此, 膀胱内局部灌注靶向 survivin 的 UsiRNA 已成为一种颇具潜力的治疗新策略[24]。此外, 细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 的高表达也被证实与膀胱癌的不良临床特征显著相关[25]。

基因和蛋白水平数据提示, 19-HCB 的作用机制涉及多条通路: 下调 survivin 可能促进肿瘤细胞的凋亡, CDK1 可能导致细胞周期停滞, 而上调 BIM 和 BAX 则促进线粒体途径的凋亡; AKT 通路抑制进一步佐证了其干扰生存信号的能力。综上所述, 19-HCB 对膀胱癌细胞具有强效抑制作用, 其机制涉及诱导凋亡、抑制迁移和调控关键基因/蛋白表达; 本研究为膀胱癌治疗提供了新的候选分子, 并为后续开发基于 19-HCB 的药物治疗奠定了理论基础。

作者贡献: 唐举与胡雪怡为本文共同第一作者, 唐举负责实验方案实施、数据处理、文章撰写; 胡雪怡负责化合物的发现、分离纯化与鉴定; 王晨吟负责实验方案设计、指导实验、文章修改; 李鑫、孟令红负责部分实验方案实施; 张永萍、司书毅负责课题设计、实验及论文指导。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends [J]. Eur Urol, 2017, 71: 96-108.

[2] 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.

[3] Dyrskjøt L, Hansel DE, Efstathiou JA. et al. Bladder cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 58.

[4] Roupret M, Neuzillet Y, Bertaut A, et al. ALBAN: An open label, randomized, phase III trial, evaluating efficacy of atezolizumab in addition to one year BCG (Bacillus Calmette-Guerin) bladder instillation in BCG-naive patients with high-risk nonmuscle invasive bladder cancer (AFU-GETUG 37) [J]. J Clin Oncol, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_SUPPL.TPS4589.

[5] Di Stasi SM, Verri C, Capelli G, et al. Single preoperative intravesical instillation of electromotive mitomycin-C for primary non-muscle-invasive bladder cancer: A prospective randomized trial [J]. J Clin Oncol, 2010. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.15_SUPPL.4543.

[6] Funt SA, Rosenberg JE. Systemic, perioperative management of muscle-invasive bladder cancer and future horizons [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 14: 221-234.

[7] Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 54: 58-67.

[8] Noeraparast M, Krajina K, Pichler R, et al. FGFR3 alterations in bladder cancer: Sensitivity and resistance to targeted therapies [J]. Cancer Commun, 2024, 44: 1189-1208.

[9] Choi W, Lombardo K, Patel S, et al. A molecular inquiry into the role of antibody-drug conjugates in Bacillus Calmette-Guérin-exposed non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Eur Urol, 2022, 81: 138-142.

[10] Cui CM, Li XM, Li CS, et al. Cytoglobosins A−G, cytochalasans from a marine-derived endophytic fungus, *Chaetomium globosum*

QEN-14 [J]. Nat Prod, 2010, 73: 729-733.

[11] Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, et al. Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44 [J]. Nat Prod, 2006, 69: 856-858.

[12] Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, et al. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens* [J]. Parasitol Res, 2004, 93: 68-71.

[13] Van Goietsenoven G, Mathieu V, Andolfi A, et al. *In vitro* growth inhibitory effects of cytochalasins and derivatives in cancer cells [J]. Planta Med, 2011, 77: 711-717.

[14] Hu XY, Wang CY, Li XM, et al. Cytochalasin derivatives from the endozoic *Curvularia verruculosa* CS-129, a fungus isolated from the deep-sea squat lobster *Shinkaia crosnieri* living in the cold seep environment [J]. Nat Prod, 2021, 84: 3122-3130.

[15] Odle RI, Florey O, Ktistakis NT, et al. CDK1, the other master regulator of autophagy [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31: 95-107.

[16] Fukuda S, Pelus LM. Internal tandem duplication of Flt3 (ITD-Flt3) bypasses growth factor mediated survivin expression, while disruption of survivin accelerates cell death in hematopoietic cells expressing ITD-Flt3 [J]. Blood, 2004, 104: 1256.

[17] Romanov VS, Rudolph KL. P21 shapes cancer evolution [J]. Nat Cell Biol, 2016, 18: 722-724.

[18] Jabbour AM, Heraud JE, Daunt CP, et al. Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim [J]. Cell Death Differ, 2009, 16: 555-563.

[19] Sementino E, Hassan D, Bellacosa A, et al. AKT and the hallmarks of cancer [J]. Cancer Res, 2024, 84: 4126-4139.

[20] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: Navigating downstream [J] Cell, 2007, 129: 1261-1274.

[21] Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: Navigating the network [J] Cell, 2017, 169: 381-405.

[22] Touat M, Ileana E, Postel-Vinay S, et al. Targeting FGFR signaling in cancer [J] Clin Cancer Res, 2015, 21: 2684-2694.

[23] Hu C, Shang X, Zheng T, et al. Ipatasertib (GDC-0068) and erdafitinib co-treatment for inducing mitochondrial apoptosis through Bim upregulation in bladder cancer cells [J] Biochem Biophys Res Commun, 2022, 604: 165-171.

[24] Seth S, Matsui Y, Fosnaugh K, et al. RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer [J] Mol Ther, 2011, 19: 928-935.

[25] Heo J, Lee J, Nam YJ, et al. The CDK1/TFCP2L1/ID2 cascade offers a novel combination therapy strategy in a preclinical model of bladder cancer [J] Exp Mol Med, 2022, 54: 801-811.