

## 常山酮抑制肝癌 HepG2 细胞活性及机制初步研究

陈孟阳<sup>1,2</sup>, 淮瑞平<sup>1,2</sup>, 杨丹妮<sup>1,2</sup>, 雷利杰<sup>1,2</sup>, 蒲秋霖<sup>1,2</sup>, 熊莉丽<sup>2\*</sup>

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610000; 2. 西南交通大学化学学院, 四川 成都 610000)

**摘要:** 探讨常山酮 (halofuginone) 抑制肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞活性的作用及机制。以肝癌 HepG2 细胞为主要研究对象, 使用 CCK-8 法、Transwell 法、流式细胞术检测不同浓度和时间处理下, 常山酮对 HepG2 细胞活性、细胞迁移、细胞周期和细胞凋亡的影响。通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 和 Western blot 检测常山酮处理后细胞中柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS)、酮戊二酸脱氢酶 (ketoglutarate dehydrogenase, OGDH) 和异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate deoxygenase, IDH) 的表达水平。与空白组相比, 常山酮显著抑制 HepG2 细胞活性 ( $P < 0.01$ ), 降低 HepG2 细胞迁移率 ( $P < 0.01$ ), 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ), 促使 HepG2 细胞周期停滞在 S 期 ( $P < 0.01$ )。常山酮处理后肝癌 HepG2 细胞中三羧酸循环关键酶 CS、IDH3 和 OGDH 表达量上调, 异柠檬酸脱氢酶同工酶 IDH1 和 IDH2 表达量下调。常山酮可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移, 促进细胞凋亡并存在明显的剂量依赖性效应, 这可能与促进细胞有氧代谢有关。

**关键词:** 常山酮; 三羧酸循环; HepG2 细胞; 异柠檬酸脱氢酶; 有氧代谢

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0368-06

## Preliminary study on the mechanism of halofuginone inhibiting the activity of HepG2 cells

CHEN Meng-yang<sup>1,2</sup>, HUAI Rui-ping<sup>1,2</sup>, YANG Dan-ni<sup>1,2</sup>, LEI Li-jie<sup>1,2</sup>, PU Qiu-lin<sup>1,2</sup>, XIONG Li-li<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China; 2. School of Chemistry, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate halofuginone's inhibitory effect and mechanism on the activity of hepatocellular carcinoma cells. HepG2 cells were used to detect the effects of halofuginone. After treatment, cell activity, cell migration, cell cycle, and cell apoptosis were detected by CCK-8, transwell, and flow cytometry, respectively. The expression levels of growth and metabolism-related factors such as citrate synthase (CS), ketoglutarate dehydrogenase (OGDH), and isocitrate deoxygenase (IDH) were detected by real-time quantitative PCR and Western blot. Compared with the control group, the activity of HepG2 cells was significantly inhibited by halofuginone ( $P < 0.01$ ), the migration rate of HepG2 cells was decreased ( $P < 0.01$ ), the apoptosis of HepG2 cells was induced ( $P < 0.01$ ), and the cell cycle was arrested in S phase ( $P < 0.01$ ). The expression levels of tricarboxylic acid key enzymes CS, IDH3, and OGDH were up-regulated, the expression level of isocitrate dehydrogenase isoenzymes IDH1 and IDH2 were down-regulation. In conclusion, halofuginone can inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells and promote apoptosis in a dose-dependent manner, which may be due to the promotion of the aerobic metabolism of cells.

**Key words:** halofuginone; tricarboxylic acid; HepG2 cell; isocitrate dehydrogenase; aerobic metabolism

收稿日期: 2023-02-22; 修回日期: 2023-06-13.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2682020ZT112); 四川省中医药管理局项目 (2021XYCZ008); 四川省科技厅重点研发计划项目 (2022YFS0437).

\*通讯作者 Tel: 86-28-66367236, E-mail: lxiong@swjtu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0216

据 Cancer statistics 数据显示, 截至 2020 年已有超过 90 万患者患有肝癌, 超过 83 万患者死于肝癌<sup>[1]</sup>。世界卫生组织预测 2030 年将会有超过 100 万患者死于肝癌<sup>[2]</sup>。肝癌的 5 年生存率为 18%, 为除胰腺癌外的第二大致命癌症<sup>[3]</sup>, 因此急需开发有效的肝癌治疗药物以增加肝癌患者的生存率。天然小分子化合物常山酮近年来被发现可抑制胰腺纤维化和肝硬化, 降低细胞外基质的形成, 抑制前列腺癌和肾母细胞瘤生长<sup>[4-6]</sup>, 减少胰腺癌的发生<sup>[7,8]</sup>。已有研究表明, 常山酮可以抑制乳腺癌细胞迁移<sup>[9]</sup>, 抑制小鼠肝癌细胞生长<sup>[10]</sup>。当常山酮联合其他抗癌药物作用时, 可增加癌细胞凋亡, 比单独治疗更有效<sup>[7,9]</sup>, 因此可以作为肿瘤联合治疗的候选药物。常山酮对肝癌细胞是否具有有效的抑制作用及作用机制目前鲜有研究。本研究通过常山酮对肝癌 HepG2 细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡及细胞周期的影响, 初步探究其对肝癌的潜在治疗效果及其机制。

## 材料与方 法

**细胞系及主要试剂** 人肝癌细胞系 HepG2、HepG2-C3A、Huh-7 均购自中国科学院上海细胞库。常山酮氢溴酸盐 (halofuginone hydrobromide, HH) 纯度 99.7%, 由重庆威鹏 (VPON) 药业提供。DMEM 培养基、100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素、0.25% EDTA 胰酶和胎牛血清购自美国 ThermoFisher 公司; CCK-8 试剂盒购自美国 APEX-BIO 公司; TRIzol@reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; qPCR 试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 与逆转录试剂盒 HiScript III 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 均购买于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate deoxygenase, IDH) 1、IDH2、GAPDH 一抗购自美国 Abcam 公司, 羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗购自北京博奥森生物技术有限公司, Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物科技股份有限公司。

**细胞培养** 将不同细胞株复苏后在添加 10% 胎牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM 培养基中培养。所有细胞放置在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。视细胞生长情况, 每 2~4 天进行 1:2~1:3 传代。

**CCK-8 法检测常山酮对肝癌细胞增殖的抑制作用** 收集对数期肝癌细胞按 2×10<sup>3</sup> 个/孔的数量接种于 96 孔板中, 培养过夜。参照 Wang 等<sup>[11]</sup> 的实验方法, 选取常山酮氢溴酸盐 0.5、2.5、6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 μmol·L<sup>-1</sup> 分别处理 6、24 和 48 h, 每个浓度梯度

设置 3 个复孔, 并设置空白对照组为 0.1% DMSO 且不含细胞。培养基与 CCK-8 试剂按 9:1 的比例混匀后加入每个孔中, 37 °C 继续孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的光密度值, 以反映各组细胞的增殖活力, 常山酮氢溴酸盐的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 使用 GraphPad Prism 9 软件计算。

**Transwell 法检测细胞迁移率** 将含有大约 2×10<sup>5</sup> 个细胞, 浓度为 2.5 和 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> 常山酮氢溴酸盐和含 0.1% DMSO 的无血清 DMEM 接种到 Transwell 孔板的内室中。将含血清的 DMEM 添加至外室。继续孵育 24 h 后染色, 在 Nikon Eclipse TE200 倒置光学显微镜下对迁移的细胞进行计数。通过使用 Image J 软件分析并计算细胞迁移率的变化。

## 流式细胞术检测 HepG2 细胞的细胞周期分布及凋亡率

**细胞周期分布检测** 收集常山酮氢溴酸盐 (0、0.5、2.5、12.5 μmol·L<sup>-1</sup>) 处理 48 h 的 HepG2 细胞, 并在冰冷的 70% 乙醇中固定过夜, 然后将细胞在室温下以 350 ×g 离心 5 min。弃乙醇, 用 500 μL PBS 洗涤两次, 250 ×g 离心 5 min, 弃上清。500 μL PI/RNase A 染色工作液重悬细胞, 室温避光 30 min 后, 通过流式细胞仪 (cytoflex, Beckman, Brea, CA, USA) 检查细胞周期的相位分布, 并通过 ModFit LT5.1 程序进行分析。

**细胞凋亡率检测** 收集常山酮氢溴酸盐 (0、0.5、2.5、12.5 μmol·L<sup>-1</sup>) 处理 24 和 48 h 的 HepG2 细胞。然后 250 ×g 离心 5 min, 吸弃上清液, 用 PBS 洗涤两次, 250 ×g 离心 5 min, 吸弃上清, 获得细胞沉淀。用 500 μL binding buffer 重悬细胞后, 加入 5 μL Annexin V 轻轻吹匀, 再加入 5 μL PI 混匀; 室温避光反应 15 min, 通过流式细胞仪检查细胞分布, 并通过 Flowjo 软件 (Tree-Star, Ashland, OR, USA) 分析数据, 凋亡率计算方法为: 凋亡率 = 早期凋亡细胞数 (LR) + 晚期凋亡细胞数 (UR) / 总细胞数。

**qPCR 法检测细胞中 mRNA 表达量变化** 使用 Trizol 试剂提取处理后肝癌细胞总 RNA。使用 HiScript III 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 纯化总 RNA 并逆转录, 以制备 cDNA 样品。目的基因及内参基因的引物序列见表 1。每个 PCR 反应体系为: ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 7.5 μL, 上下引物各 0.6 μL, cDNA 1 μL, 双蒸水 6.3 μL。PCR 反应条件: 95 °C 下预变性 10 min, 然后按 95 °C 15 s, 62 °C 下反应 1 min, 共 40 个循环, 最后 95 °C 下反应 15 s、60 °C 下反应 1 min、95 °C 下反应 15 s。

**Western blot 法检测细胞中 IDH1、IDH2 蛋白的**

**Table 1** Primers for gene amplification. CS: Citrate synthase; IDH: Isocitrate deoxygenase; OGDH: Ketoglutarate dehydrogenase

Primer name	Forward primer	Reverse primer
CS	5'-TGCTTCCTCCACGAATTTGAAA-3'	5'-CCACCATACATCATGTCCACAG-3'
IDH1	5'-TGTGGTAGAGATGCAAGGAGA-3'	5'-TTGGTGAAGTGGTCGTTGGTG-3'
IDH2	5'-CGCCACTATGCCGACAAAAG-3'	5'-ACTGCCAGATAATACGGGTCA-3'
IDH3	5'-TGCTGCCAAAGCACCTATTCA-3'	5'-GTGACCGCTGCTATTGGG-3'
OGDH	5'-GGCTTCCCAGACTGTTAAGAC-3'	5'-GCAGAATAGCACCGAATCTGTTG-3'
$\beta$ -Actin	5'-AGAGTACTGAGCTGCCTGAC-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

**表达** 使用具有  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PMSF 的冰冷 RIPA 缓冲液裂解刮下肝癌细胞并收集。然后在  $4^\circ\text{C}$  以  $15\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。收集细胞裂解物并确定蛋白质提取物的浓度。蛋白质样品 (每个泳道  $30 \mu\text{g}$ ) 通过 10% SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上。用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭膜 1 h, 在  $4^\circ\text{C}$  下分别过夜孵育一抗 IDH1 (1:5 000)、IDH2 (1:5 000) 与  $\beta$ -actin (1:8 000), TBST 中将膜洗涤 3 次, 每次 10 min。在常温下孵育相应的二抗 (1:8 000)。使用 HRP 蛋白发光液于 iBright 蛋白免疫印迹成像系统中显影成像并分析蛋白条带的灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 计算 IDH1、IDH2 蛋白的表达量。

**统计学分析** CCK-8 法、流式细胞术、Western blot、qPCR 等实验均重复 3 次。数据分析通过 GraphPad Prism 9 软件完成。两组间比较采用 student's *t* test, 多组间比较采用 two-way ANOVA 用于确定显著性;  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。数据表示为  $\bar{x} \pm s$ 。

## 结果

### 1 常山酮抑制 HepG2 细胞活性

使用 HH 处理肝癌 HepG2 细胞, 并通过 CCK-8 法检测 HepG2 细胞的活性变化。结果表明, 不同浓度的

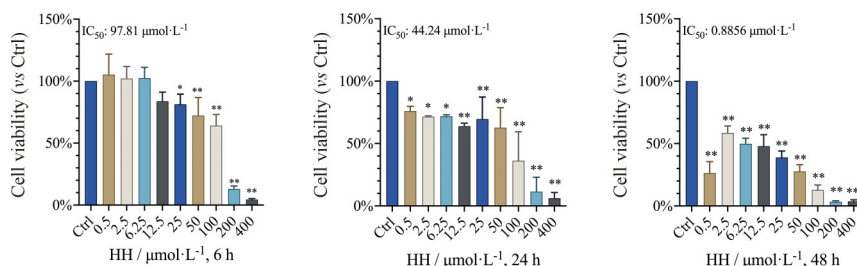
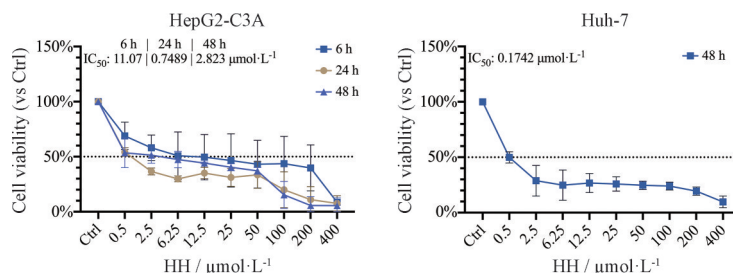
常山酮处理不同时间后, 能有效抑制肝癌 HepG2 细胞活性。与空白组相比,  $6.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HH 处理肝癌 HepG2 细胞 48 h 后, HepG2 细胞活性降低 50.1% (图 1)。HH 处理肝癌其他细胞系, 实验结果表明, 常山酮明显抑制了肝癌 HepG2-C3A 细胞和 Huh-7 细胞的活性, 且其作用强于常山酮在 HepG2 细胞中的抑制作用 (图 2)。

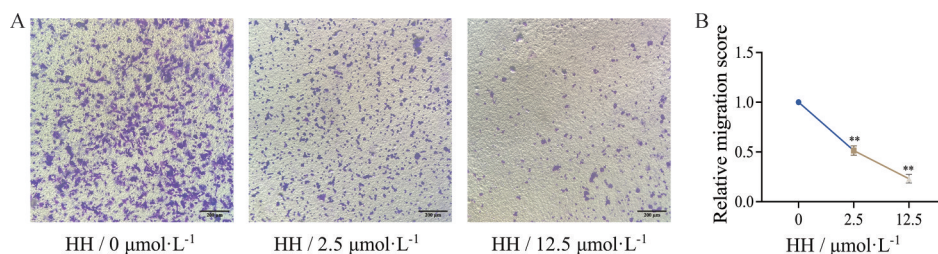
### 2 常山酮抑制肝癌 HepG2 细胞迁移

Transwell 法检测结果显示, HH 处理肝癌 HepG2 细胞后, 其迁移率显著下降, 且高浓度 HH 处理对迁移影响更明显 ( $P < 0.01$ , 图 3)。与空白组相比,  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HH 处理 HepG2 细胞 48 h 后, 细胞迁移率降低 48.5%。

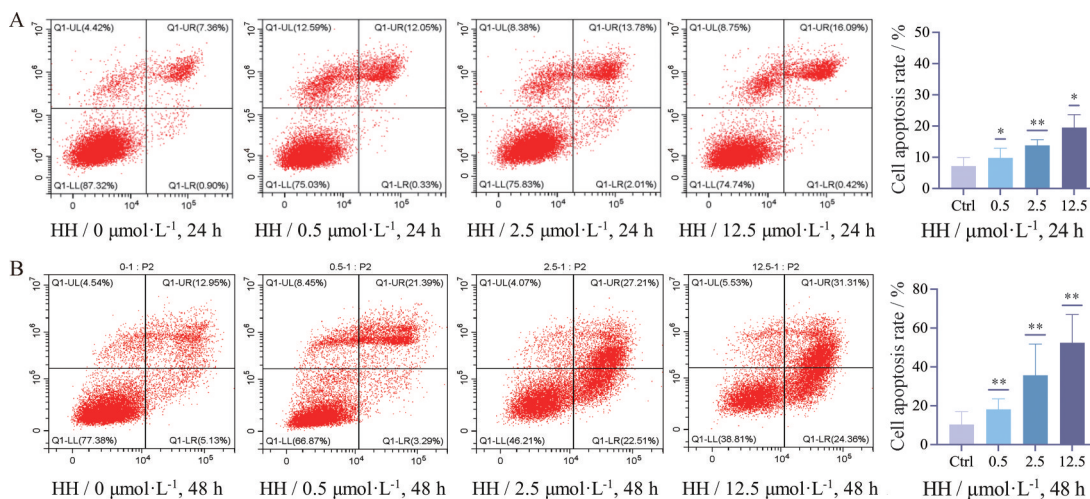
### 3 常山酮诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡

通过流式细胞术检测常山酮处理 24 h 后的肝癌 HepG2 细胞, 结果与空白组相比, HH 处理组中 HepG2 细胞凋亡率明显增大, 晚期凋亡百分率增加 2.38%~13.74%; 同时常山酮处理 48 h 后的肝癌 HepG2 细胞, 结果与空白组相比, HH 处理组中 HepG2 细胞凋亡率明显增大, 晚期凋亡百分率增加 5.18%~30.61% ( $P < 0.05$ )。两组结果表明, 常山酮能诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈现浓度依赖性增加 (图 4)。

**Figure 1** The growth inhibition of halofuginone hydrobromide (HH) on HepG2 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control (Ctrl)**Figure 2** The growth inhibition of HH on HepG2-C3A and Huh-7 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 3** Inhibitory effect of HH on migration of HepG2 cells. A: The microscopic images detected via transwell ( $\times 100$ ); B: Relative migration analysis.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl



**Figure 4** The effect of HH on apoptosis of HepG2 cells. A: HH treats HepG2 cells for 24 h; B: HH treats HepG2 cells for 48 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl

#### 4 常山酮阻滞肝癌 HepG2 细胞周期

细胞周期检测结果显示,与空白组相比,HH 处理肝癌 HepG2 细胞 48 h 后, G0/G1 期比例显著下降, G2 期比例无明显变化, S 期比例显著上调,表明 HH 处理均使 HepG2 细胞周期阻滞在 S 期(图 5)。

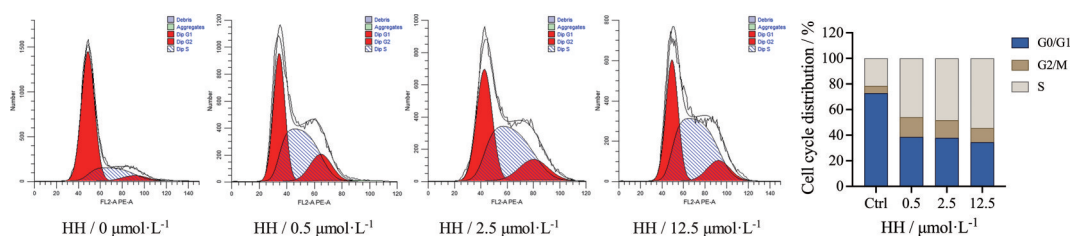
#### 5 常山酮对三羧酸循环关键酶表达的影响

qPCR 检测结果(图 6)显示,与空白组相比,HH 处理肝癌 HepG2 细胞 48 h 后,柠檬酸合酶(CS)、IDH3 和酮戊二酸脱氢酶(OGDH) mRNA 的表达水平明显上调( $P < 0.01$ ),而异柠檬酸脱氢酶同工酶 IDH1 与 IDH2 mRNA 表达量有下调趋势( $P > 0.05$ )。Western blot 蛋白检测结果与 mRNA 表达量变化一致, IDH1 和 IDH2 蛋白表达量下降( $P < 0.05$ ,图 7)。

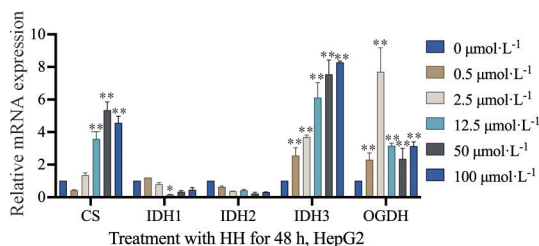
#### 讨论

常山酮是从传统中药常山中提取出的喹啉酮类天然生物碱,常用于家畜类动物抗球虫病<sup>[12]</sup>。研究表明,常山酮有望用于治疗疟疾、纤维化、炎症和调节自身免疫,并具有抑制癌细胞生长、转移和引发细胞死亡的能力<sup>[13-15]</sup>。目前的实验研究表明,常山酮可抑制乳腺癌<sup>[16]</sup>、膀胱癌<sup>[17]</sup>、黑色素瘤转移和多发性骨髓瘤<sup>[18]</sup>、前列腺移植瘤<sup>[19]</sup>、胰腺肿瘤<sup>[7]</sup>的生长。

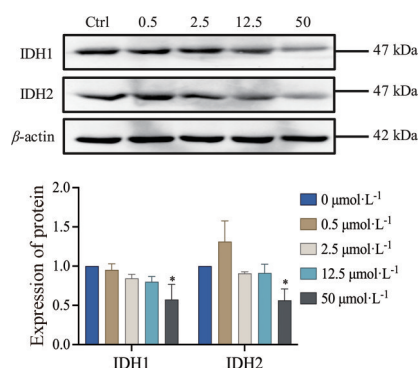
肝细胞癌(HCC)占原发性肝癌的 90%,目前尚无被纳入临床治疗的药物能够有效提高 HCC 患者生存率。近年实验室研究表明,常山酮可能对 HCC<sup>[10]</sup>具有潜在的治疗效果,因此本研究通过常山酮处理肝癌 HepG2 细胞后表型及其基因表达变化探究其对肝癌细



**Figure 5** Effects of HH on the cell cycle of HepG2 cells



**Figure 6** Effects of HH on the expression of CS, IDH1, IDH2, IDH3, and OGDH mRNA in HepG2 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s. ^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$  vs Ctrl



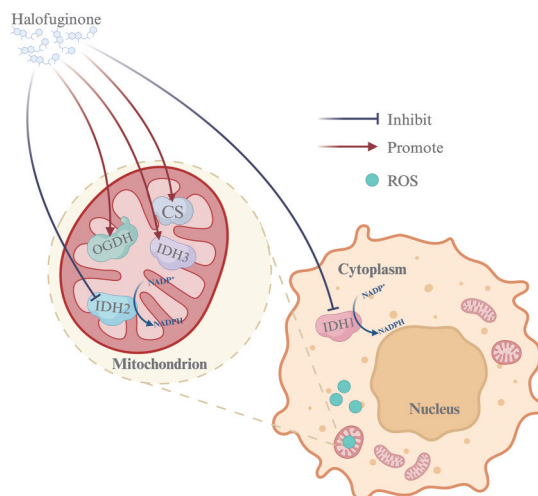
**Figure 7** Effects of HH on the expression of IDH1 and IDH2 protein in HepG2 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s. ^*P < 0.05$  vs Ctrl

胞的抑制作用及其机制。

本研究结果显示,常山酮处理可以显著抑制 HepG2 细胞的细胞活性和迁移率,且具有剂量依赖性效应,与 Gnainsky 等<sup>[20]</sup>在肝癌中的研究结果一致。流式细胞术结果显示,常山酮处理 HepG2 细胞后细胞凋亡率呈现剂量依赖性增加,同时细胞周期阻滞在 S 期。这与 Xia 等<sup>[21]</sup>观察到常山酮对细胞周期的阻滞作用一致,其可能因为常山酮抑制组蛋白脱乙酰酶 HDAC2 表达,进而影响了细胞周期蛋白表达。

CS、IDH3 和 OGDH 是三羧酸循环的 3 个关键限速酶,在癌细胞尤其是在肝癌细胞中起着调节生物合成和氧化代谢的功能<sup>[22]</sup>。本研究通过 qPCR 检测常山酮处理后 HepG2 细胞中 CS、IDH 和 OGDH 表达量变化,探究常山酮对有氧代谢的相关影响。结果显示,常山酮显著上调了 CS、IDH3 和 OGDH mRNA 的表达量,证实三羧酸循环受到常山酮的促进作用。有意思的是,与三羧酸循环关键酶 IDH3 表达量上调不同,qPCR 检测发现其同工酶 IDH1 和 IDH2 mRNA 表达量受常山酮影响呈现下调趋势。本研究又进一步通过 Western blot 实验确证 IDH1 和 IDH2 蛋白表达量也下调,与 mRNA 结果一致。常山酮处理后 IDH1 和 IDH2 表达量下降,避免了肿瘤细胞受到氧化应激损伤。在细胞三羧酸循环调控中, IDH1 和 IDH2 主要通过提高

NADPH 与 NADH 的比值,增加柠檬酸的转移<sup>[23]</sup>。而在常山酮作用下,三羧酸循环中起主要作用的 IDH3 mRNA 水平上调,可能导致肝癌 HepG2 细胞内氧化应激水平激增,ROS 水平升高,进而导致异常的细胞信号转导,这也可能是常山酮促进 HepG2 细胞凋亡的原因之一(图 8)。



**Figure 8** Molecular mechanism of inhibition of halofuginone on HepG2 cells

总之,本研究以肝癌 HepG2 细胞为研究对象,探究了常山酮对肝癌 HepG2 细胞表型的影响与分子调控机制,实验结果表明常山酮可能通过增加细胞有氧代谢促进细胞凋亡,为深入认识天然药物分子治疗肿瘤、提高疗效提供了新的实验数据和研究思路。

**作者贡献:** 熊莉丽提出研究思路及文章校对; 陈孟旻完成部分实验操作、数据分析及文章撰写; 淮瑞平完成部分实验操作及部分数据分析; 杨丹妮、雷利杰、蒲秋霖提供技术支持。

**利益冲突:** 所有作者均声明无利益冲突。

### References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73: 17-48.
- [2] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2017, 389: 56-66.
- [3] Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. Lancet, 2018, 391: 1163-1173.
- [4] Liang J, Zhang B, Shen RW, et al. Preventive effect of halofuginone on concanavalin A-induced liver fibrosis [J]. PLoS One, 2013, 8: e82232.

- [5] Sheffer Y, Leon O, Pinthus JH, et al. Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 570-577.
- [6] Zion O, Genin O, Kawada N, et al. Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention [J]. *Pancreas*, 2009, 38: 427-435.
- [7] Spector I, Honig H, Kawada N, et al. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by halofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development [J]. *Pancreas*, 2010, 39: 1008-1015.
- [8] Spector I, Zilberstein Y, Lavy A, et al. Involvement of host stroma cells and tissue fibrosis in pancreatic tumor development in transgenic mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e41833.
- [9] Jin ML, Park SY, Kim YH, et al. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration *via* downregulation of matrix metalloproteinase-9 [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44: 309-318.
- [10] Nagler A, Ohana M, Shibolet O, et al. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice by the alkaloid coccidiostat halofuginone [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40: 1397-1403.
- [11] Wang C, Zhu JB, Yan YY, et al. Halofuginone inhibits tumorigenic progression of 5-FU-resistant human colorectal cancer HCT-15/FU cells by targeting miR-132-3p *in vitro* [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20: 385.
- [12] de Jonge MJ, Dumez H, Verweij J, et al. Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 1768-1774.
- [13] Cheng H, Tian J, Zeng L, et al. Halofugine prevents cutaneous graft *versus* host disease by suppression of Th17 differentiation [J]. *Hematology*, 2012, 17: 261-267.
- [14] Elahi-Gedwillo KY, Carlson M, Zettervall J, et al. Antifibrotic therapy disrupts stromal barriers and modulates the immune landscape in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2019, 79: 372-386.
- [15] Pines M. Halofuginone for fibrosis, regeneration and cancer in the gastrointestinal tract [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 14778-14786.
- [16] Juarez P, Fournier PGJ, Mohammad KS, et al. Halofuginone inhibits TGF-beta/BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 86447-86462.
- [17] Elkin M, Reich R, Nagler A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression and bladder carcinoma metastasis by halofuginone [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 1982-1988.
- [18] Leiba M, Jakubikova J, Klippel S, et al. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth *in vitro* and *in vivo* and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents [J]. *Br J Haematol*, 2012, 157: 718-731.
- [19] Gavish Z, Pinthus JH, Barak V, et al. Growth inhibition of prostate cancer xenografts by halofuginone [J]. *Prostate*, 2002, 51: 73-83.
- [20] Gnainsky Y, Spira G, Paizi M, et al. Involvement of the tyrosine phosphatase early gene of liver regeneration (PRL-1) in cell cycle and in liver regeneration and fibrosis effect of halofuginone [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 324: 385-394.
- [21] Xia X, Wang X, Zhang S, et al. miR-31 shuttled by halofuginone-induced exosomes suppresses MFC-7 cell proliferation by modulating the HDAC2/cell cycle signaling axis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 18970-18984.
- [22] Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23: 27-47.
- [23] Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: still emerging [J]. *Cell Metab*, 2022, 34: 355-377.