

# 华蟾素调控 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路逆转结肠癌 HCT15/5-FU 细胞耐药的体外研究

赵秦英<sup>1,2</sup>, 吴悦<sup>1,2</sup>, 桂仲璇<sup>1,2</sup>, 张泉<sup>1,2</sup>, 叶映泉<sup>1,2</sup>, 王高翔<sup>1,2</sup>, 张梅<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨华蟾素(CINO)联合5-氟尿嘧啶(5-FU)对人源结肠癌(CRC)耐药细胞株HCT15/5-FU的逆转作用,明确缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子(VEGF)通路在逆转结肠癌化疗耐药中的调控作用。方法 MTT法检测细胞耐药性及耐药指数的变化,流式细胞术评价细胞凋亡的情况,划痕实验和Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力的变化。Western blot检测上皮间充质转化(EMT)相关蛋白及HIF-1 $\alpha$ /VEGF通路相关蛋白的表达。结果 与HCT15细胞相比,HCT15/5-FU的耐药指数约为8.720。CINO联合5-FU作用后,能够明显提升HCT15/5-FU细胞的药物敏感性,降低耐药指数,剂量依赖性地上调细胞凋亡水平,抑制细胞迁移和侵袭能力;Western blot结果显示CINO联合5-FU作用后能够抑制EMT及HIF-1 $\alpha$ /VEGF通路的活性。结论

体外研究显示,华蟾素具有逆转结肠癌5-FU耐药的作用,其机制可能与调节HIF-1 $\alpha$ /VEGF通路抑制EMT、血管生成有关。

**关键词** 华蟾素; HIF-1 $\alpha$ /VEGF; 结肠癌; 5-FU 耐药

**中图分类号** R 735.3+5

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2023)06-0902-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.004

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界常见恶性肿瘤之一,病死率仅次于肺癌<sup>[1-2]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是结直肠癌的基石药物,但是超过50%的结直肠癌患者对5-FU产生耐药,阻断化疗进程从而导致不良预后<sup>[3]</sup>。近期研究<sup>[4]</sup>表明,上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和血管生成诱导细胞产生耐药表型,而缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/血

管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路是EMT和血管生成进程中的主要诱导因素,目前关于HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路逆转结肠癌5-FU耐药的相关研究较少。华蟾素(cinobufagin, CINO)是中华大蟾蜍皮中提取的干燥分泌物,其抗炎、抗病毒、调节免疫应答、抗肿瘤等功效已得到有效证实<sup>[5]</sup>,研究<sup>[6]</sup>结果显示,CINO能够通过阻断EMT过程抑制结肠癌移植瘤小鼠的侵袭转移过程,并且通过HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路有效抑制肿瘤血管生成<sup>[7]</sup>。该研究旨在探讨CINO对结肠癌5-FU耐药细胞的体内抑制作用及其机制,以期为中西医结合治疗结肠癌提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人结肠癌细胞株HCT15(货号: icell-h072)、人结肠癌细胞株HCT15/5-FU耐药细胞株(货号: icell-h073)及HCT15/5-FU人结肠癌细胞专用培养基(货号: icell-h073-001b)购自上海赛百慷生物有限公司; 5-FU(货号: HY-90006)购自美国MCE公司; 华蟾素注射液购自安徽华润金蟾药业股份有限公司; MTT检测试剂盒(货号: CT0002)购自山东思科捷生物技术有限公司; ABW基质胶(货号: 0827045)购自上海诺娃医药科技有限公司; Annexin V-FITC / PI双染细胞凋亡检测试剂盒(货号: BB-4101)购自美国BD公司; E-cadherin(货号: 20874-1-AP)、N-cadherin(货号: 22018-1-AP)购自美国Proteintech公司; HIF-1 $\alpha$ (货号: AF1009)、Snail(货号: AF6032)购自美国Affinity公司; Vimentin(货号: R22775)、VEGF(货号: R26073)购自成都正能生物技术责任有限公司; LAUDR AQUALine AL 12型水浴锅购自德国LAUDR公司; PowerPac™ Basic Power Supply 1645050型电泳仪购自美国BIO-RAD公司; SpectraMax iD3型酶标仪购自美国MOLECULAR公司; Cytomics™ FC 500型流式细胞仪购自美国BECKMAN OULTER公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将HCT15、HCT15/5-FU细胞分

2023-03-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81774051); 白求恩公益基金会项目(编号: BCF-XD-ZL-20220118-018); 安徽省第十三批“115”产业创新团队

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学中西医结合学系, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 赵秦英, 女, 硕士研究生;

张梅, 女, 博士, 主任医师, 副教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zml3856990019@163.com

别培养于完全培养基内, HCT15/5-FU 细胞先是通过在完全培养基中逐渐提高 5-FU 的浓度(10~20 mg/L) 筛选出具有抗药性的细胞, 然后在含有 5-FU (20 mg/L) 的培养液中稳定培养以维持细胞耐药性。

**1.2.2 细胞活力分析** 取对数生长期的 HCT15 或 HCT15/5-FU 接种到 96 孔板中( $1 \times 10^4$  个/孔)。细胞生长 24 h 后, 加入 5-FU (0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 或 5-FU (12 mg/L) + CINO (0.0、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 mg/ml) 后继续培养 48 h, 吸去上清液, 每孔加入 90  $\mu$ l 新鲜培养液、10  $\mu$ l MTT 溶液, 继续培养 4 h, 吸除上清液, 每孔加入 110  $\mu$ l Formazan 溶解液, 避光慢摇 10~15 min 后, 于酶标仪 490 nm 处读取吸光度(optical density, OD) 值, 实验重复 3 次, 绘制细胞生长折线图并计算半数抑制浓度(median inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 值和耐药指数(resistance index, RI), 抑制率 =  $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ ,  $RI = HCT15/5-FU$  细胞的  $IC_{50} / HCT15$  细胞的  $IC_{50}$ , 逆转倍数 = 使用 CINO 前的  $IC_{50} /$  使用 CINO 后的  $IC_{50}$ 。

**1.2.3 流式细胞术实验** 将对数生长期 HCT15/5-FU 耐药细胞株( $1 \times 10^5$  个/孔) 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 吸弃培养液, 将 5-FU (12 mg/L) + CINO (0、1、2、4 mg/ml) 细胞培养液作用于细胞 48 h 后收集各组细胞, 冷 PBS 洗 2 遍后用 Annexin V 结合液重悬细胞至适宜浓度, 再加入 Annexin V-FITC 染色液避光孵育 15 min 后, 加 PI 染料避光孵育 5 min 后在流式细胞仪中检测并分析细胞凋亡率。每组设 3 个复孔, 重复 3 次。

**1.2.4 划痕实验** 将对数生长期的 HCT15/5-FU 耐药细胞株( $1 \times 10^5$  个/孔) 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后用 p200 枪头沿直尺竖直划线, 去除原培养液, 将 5-FU (12 mg/L) + CINO (0、1、2、4 mg/ml) 细胞培养液作用于细胞 48 h 后收集各组细胞, 在 0、48 h 的时间点分别拍照。每组设 3 个复孔, 重复 3 次。

**1.2.5 Transwell 小室迁移与侵袭实验** 将 200  $\mu$ l 的 HCT15/5-FU 细胞悬液( $1 \times 10^5$  个/ml) 接种于小室的上室(侵袭实验的小室提前用 60  $\mu$ l 稀释的基质胶包被)。下室加入 600  $\mu$ l 含 5-FU (12 mg/L) + CINO (0、1、2、4 mg/ml) 的细胞培养液, 作用细胞 48 h 后, 取出上室, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色 10 min, 每个小室随机选取 5 个区域拍照、计数并

分析数据。

**1.2.6 Western blot 实验** 用 5-FU (12 mg/L) + CINO (0、1、2、4 mg/ml) 培养 48 h 后收集细胞, 提取蛋白后, 经电泳、转膜, 10% 脱脂牛奶摇床敷育 2 h 后, 4  $^{\circ}$ C 敷育一抗过夜。次日, TBST 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 1 h 后, TBST 3 次, 使用 ECL 发光液显影。采用 Image J 软件对蛋白条带进行分析, 测得条带的灰度值, 以各组目的蛋白与内参(GAPDH) 蛋白灰度值的比值来反映目的蛋白的相对表达水平, 比较各组间的差异。每组实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 检验方法采用多因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HCT15/5-FU 细胞耐药性的鉴定及 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞耐药性的影响** 如图 1A 所示, 5-FU (0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 作用于细胞 48 h, HCT15 的  $IC_{50}$  为 ( $1.476 \pm 0.2657$ ) mg/L, HCT15/5-FU 的  $IC_{50}$  为 ( $12.87 \pm 0.6364$ ) mg/L, 耐药指数 RI 约为 8.720 倍。在 5-FU 各浓度作用下, HCT15/5-FU 细胞的抑制率明显低于 HCT15 细胞 ( $F = 9.692$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 HCT15/5-FU 细胞对 5-FU 产生耐药性。

如图 1B 显示, CINO (0.0、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 mg/ml) 作用 HCT15/5-FU 细胞 12、24、48、72 h, 对应的  $IC_{50}$  分别为 ( $27.08 \pm 2.609$ )、( $9.943 \pm 0.2952$ )、( $3.989 \pm 0.6406$ )、( $6.903 \pm 0.7587$ ) mg/L, 计算逆转倍数分别为 0.475、1.294、3.226、1.857, 提示 CINO 在 48 h 时, 对 HCT15/5-FU 细胞的耐药逆转效果最好, 因此在后续实验中以 48 h 作用时间为标准。

**2.2 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞凋亡能力的影响**

如图 2 结果所示, 与对照组(5-FU 12 mg/L 单独作用) ( $3.33 \pm 0.577$ )% 相比, 5-FU (12 mg/L) + CINO (1、2、4 mg/ml) 作用 48 h, HCT15/5-FU 细胞凋亡率分别为 ( $8.33 \pm 0.577$ )%、( $13.33 \pm 1.528$ )%、( $19.00 \pm 1.000$ )%, 提示 CINO 具有诱导 HCT15/5-FU 细胞凋亡的能力, 差异有统计学意义 ( $F = 135.3$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.3 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞迁移和侵袭能力的影响** 划痕实验显示(图 3A、C), 与对照组(5-FU 12 mg/L 单独作用) 相比, 5-FU (12 mg/L) + CINO (1、2、4 mg/ml) 作用 48 h 后, CINO 显著降低细胞

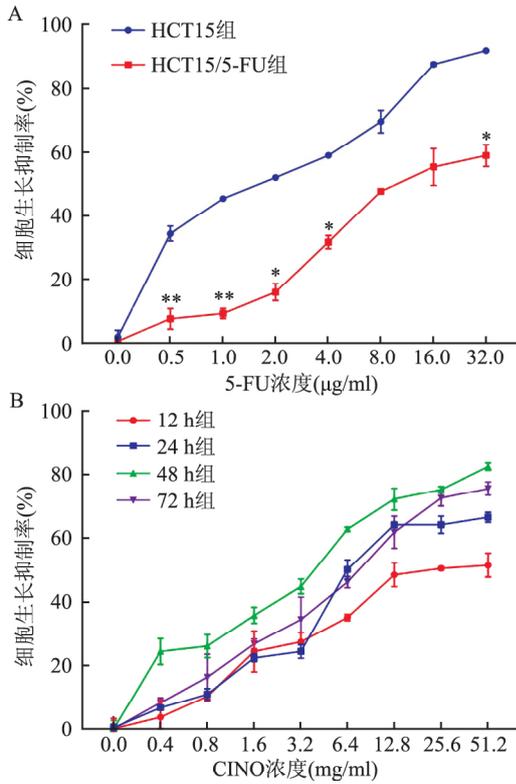


图1 5-FU 或 CINO 对 HCT15 和 HCT15/5-FU 细胞生长抑制作用  
A: 5-FU 对 HCT15 和 HCT15/5-FU 细胞生长抑制率曲线; B: CINO 对 HCT15/5-FU 不同时间点细胞生长抑制率曲线; 与 HCT15 细胞组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

划痕愈合率 ( $F = 68.63, P < 0.01$ ) 呈现浓度依赖性; Transwell 迁移实验显示(图 3B、D), 与对照组 (5-FU 12 mg/L 单独作用) 相比 5-FU (12 mg/L) + CINO (1、2、4 mg/ml) 作用 48 h 后, 迁移细胞数目呈现浓度依赖性的减少 ( $F = 276.1, P < 0.01$ ); Transwell 侵袭实验表明(图 3B、D), 与对照组 (5-FU 12 mg/L 单独作用) 相比 5-FU (12 mg/L) + CINO (1、2、4 mg/ml) 作用 48 h 后, 侵袭细胞数目呈现浓度依赖性地减少 ( $F = 182.9, P < 0.01$ )。

EMT 与结肠癌 5-FU 耐药机制具有密切关系, 为了检测 HCT15/5-FU 细胞中 EMT 相关蛋白的表达, 该实验通过 Western blot 实验对 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Snail 进行检测。结果显示(图 3E、F), CINO 明显地上调 E-cadherin 蛋白表达 ( $F = 94.31, P < 0.01$ ), 并具有浓度依赖性。对 N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达具有不同程度的抑制作用, 与对照组 (5-FU 12 mg/L 单独作用) 相比, N-cadherin、Snail 在 CINO 各浓度组均显著降低 ( $F_{N-cadherin} = 68.57, P < 0.01$ ;  $F_{Snail} = 131.9, P < 0.01$ ); 在 CINO  $\geq 2$  mg/ml 时, Vimentin 蛋白表达明显下降 ( $F = 92.45, P < 0.01$ )。

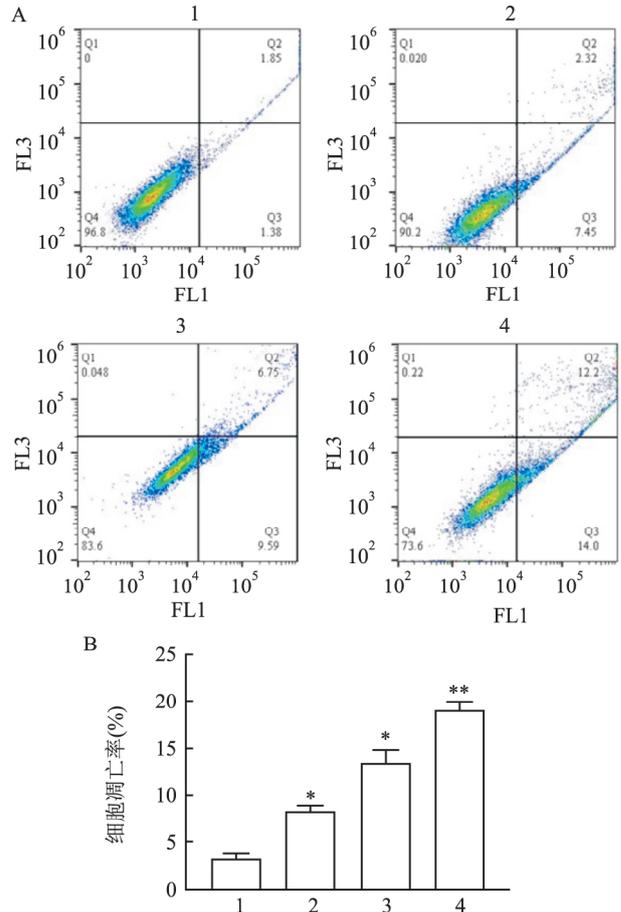


图2 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞凋亡率的影响

A: 流式细胞术检测不同浓度 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞凋亡能力的影响; B: 不同组中 HCT15/5-FU 细胞凋亡率的分析; 1: 对照组 (5-FU 12 mg/L 单独作用); 2: 5-FU 12 mg/L + CINO 1 mg/ml 组; 3: 5-FU 12 mg/L + CINO 2 mg/ml 组; 4: 5-FU 12 mg/L + CINO 4 mg/ml 组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.4 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的影响** HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路在结肠癌 5-FU 耐药机制中发挥重要作用, 并与 EMT、血管生成密切相关。因此, 该研究对 HCT15/5-FU 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白的表达水平进行检测, 如图 4 结果所示, 在 CINO  $\geq 2$  mg/ml 时, 对结直肠癌 5-FU 耐药的潜在生物标志物 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达具有抑制作用, 差异有统计学意义 ( $F = 84.33, P < 0.01$ ); VEGF 在 CINO 各浓度组均显著降低, 并且差异有统计学意义 ( $F = 176, P < 0.01$ )。说明 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路在 CINO 逆转结肠癌 5-FU 耐药中发挥功效, 并呈现被抑制状态。

3 讨论

5-FU 的应用提高了结直肠癌患者的生存率, 但

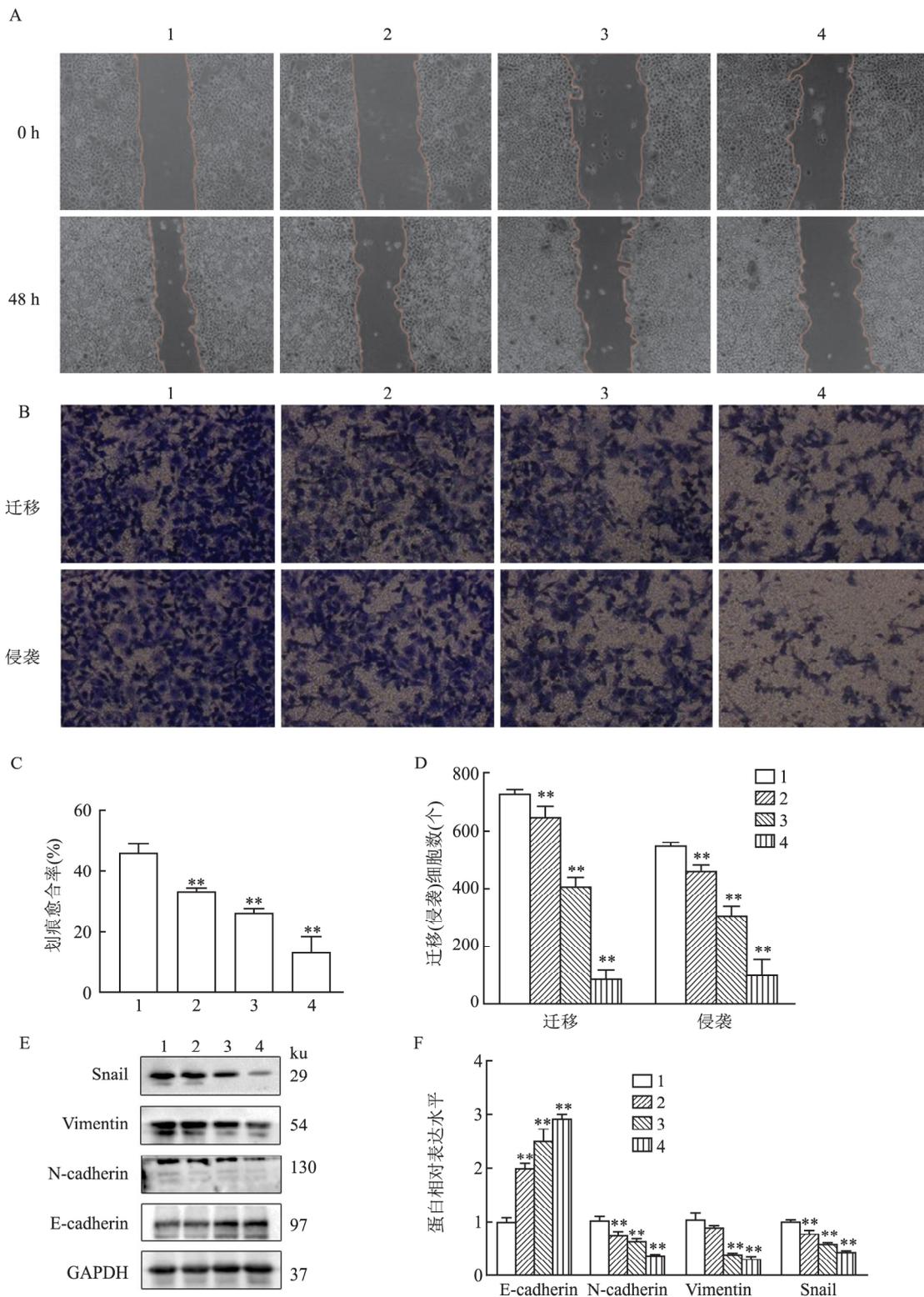


图3 CINO对HCT15/5-FU细胞侵袭、迁移能力的影响

A: 划痕实验检测不同浓度CINO对HCT15/5-FU细胞平面迁移能力的影响 ×40; B: Transwell实验检测不同浓度CINO对HCT15/5-FU细胞迁移、侵袭能力的影响 ×100; C: 不同组中HCT15/5-FU细胞划痕愈合率分析; D: 不同组中HCT15/5-FU细胞迁移(侵袭)细胞数目统计; E: Western blot检测不同浓度CINO对HCT15/5-FU细胞中EMT相关蛋白表达量的影响; F: 不同组中EMT相关蛋白的相对表达量; 1: 对照组; 2: 5-FU 12 mg/L + CINO 1 mg/ml 组; 3: 5-FU 12 mg/L + CINO 2 mg/ml 组; 4: 5-FU 12 mg/L + CINO 4 mg/ml 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

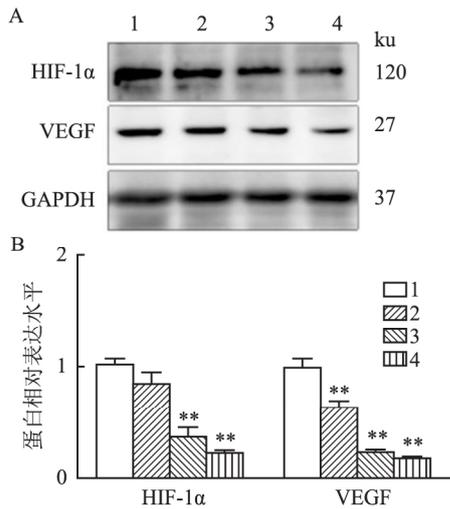


图4 Western blot 检测 CINO 对 EMT、HIF-1α/VEGF 相关蛋白的影响

A: Western blot 检测不同浓度 CINO 对 HCT15/5-FU 细胞中 HIF-1α/VEGF 蛋白表达量的影响; B: 不同组中 HIF-1α、VEGF 蛋白的相对表达量; 1: 对照组; 2: 5-FU 12 mg/L + CINO 1 mg/ml 组; 3: 5-FU 12 mg/L + CINO 2 mg/ml 组; 4: 5-FU 12 mg/L + CINO 4 mg/ml 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

其耐药性是阻碍治疗进程的主要因素之一<sup>[8]</sup>。因此,研究结直肠癌 5-FU 耐药机制,对寻找克服 5-FU 耐药的治疗策略至关重要。血管生成在化疗耐药机制中占有重要地位<sup>[9]</sup>,VEGF 作为最有效的促血管生成因子,在 5-FU 耐药细胞的机制中主要受 HIF-1α 的调控,HIF-1α 在低氧状态下与 VEGF 基因中的缺氧反应元件结合,诱导 VEGF 蛋白的转录和翻译,激活多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, MDR)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)的表达,刺激肿瘤 EMT、血管生成以及化疗耐药的发生<sup>[10]</sup>。抗血管生成药物应时而生,其中的代表药物贝伐珠单抗具有结合 VEGF 所有结合位点、从源头上阻断血管生成的功能<sup>[11]</sup>,是目前结直肠癌的一线治疗药物。虽然目前抗血管生成治疗显著改善了转移性结肠癌患者的预后,但抗血管生成治疗期间出现的不良反应限制了其治疗效果。因此,寻找毒副作用小的抗血管生成药物仍然是需要努力的目标。

中医药具有低毒有效等特点,CINO 作为中华大蟾蜍皮的干燥提取物,其抗癌作用已在肝癌、胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中取得有效进展<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>表明,通过下调糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的表达,CINO 能够逆转肿瘤 MDR 的状态;胡叶等<sup>[14]</sup>显示,CINO 具有抑制血管生成的功效,其机制与阻

断 VEGF 和 VEGFR-2 的结合相关;Yang et al<sup>[15]</sup>通过网络药理学方法预测 CINO 具有抑制 HIF-1α/VEGF 信号通路的潜力。目前 CINO 通过调控 HIF-1α/VEGF 信号通路逆转结肠癌 5-FU 耐药的研究处于空白状态。课题组以 HCT15/5-FU 耐药细胞为研究对象、CINO 为干预条件,研究 CINO 对 HCT15/5-FU 耐药细胞的影响及其具体机制。MTT 实验结果表明 CINO 对 5-FU 治疗具有增敏作用。Western blot 实验表明 CINO 是通过抑制结直肠癌 5-FU 耐药的潜在生物标志物 HIF-1α 蛋白的表达而发挥 5-FU 增敏作用,提示 CINO 有望成为临床治疗中的化疗增敏剂。流式细胞凋亡实验显示 CINO 与 5-FU 的联合使用显著促进耐药细胞凋亡,表现为细胞总凋亡率的增加。划痕实验、Transwell 实验结果显示,CINO 显著抑制耐药细胞迁移、侵袭能力,这一结果在 Western blot 中被验证,表现为上调 EMT 上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白水平,抑制间质标志物 N-cadherin、细胞支架标志物 Vimentin 以及相关转录因子 Snail 蛋白的表达。Western blot 评价了 CINO 联合 5-FU 对血管生成的影响,结果显示与 5-FU 单独使用相比,CINO 与 5-FU 的联合使用显著抑制 VEGF 的表达,并且抑制效果呈显著的剂量依赖性,进一步验证了 CINO 通过下调 HIF-1α/VEGF 信号通路发挥逆转结肠癌 5-FU 耐药功效。

综上所述,体外研究显示 CINO 具有逆转结肠癌 5-FU 耐药的功效,其机制与 HIF-1α/VEGF 信号通路有关。但该研究尚且存在一定的不足之处,例如:未开展相应的动物体内实验、体外实验细胞株种类单一、对 HIF-1α/VEGF 信号通路的上游靶点未进行深入探索等,课题组将针对这些问题继续开展后续工作,进一步完善丰富 CINO 逆转结肠癌 5-FU 耐药的相关研究。

### 参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Hossain M S, Karuniawati H, Jairoun A A, et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1732.
- [3] An J, Seok H, Ha E M. GABA-producing lactobacillus plantarum inhibits metastatic properties and induces apoptosis of 5-FU-resistant colorectal cancer cells via GABAB receptor signaling [J]. *J Microbiol*, 2021, 59(2): 202-16.
- [4] Zhang L, Wu H, Zhang Y, et al. Induction of lncRNA NORAD accounts for hypoxia-induced chemoresistance and vasculogenic

- mimicry in colorectal cancer by sponging the miR-495-3p/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 950–62.
- [5] 叶映泉, 李庆林, 朱耀东, 等. 华蟾素抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中药药理与临床* 2022, 38(3): 215–21.
- [6] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis *via* suppressing Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway and EMT [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703–18.
- [7] Li X, Chen C, Dai Y, et al. Cinobufagin suppresses colorectal cancer angiogenesis by disrupting the endothelial mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  axis [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1724–34.
- [8] 方昌义, 詹建宝, 苗祥, 等. 结直肠癌中 RAC3 表达水平及其对 FOLFOX 方案疗效的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(5): 805–9.
- [9] Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, et al. Cleaved caspase-3 transcriptionally regulates angiogenesis-promoting chemotherapy resistance [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23): 5958–70.
- [10] Chhonker S K, Rawat D, Koiri R K. Repurposing PDE5 inhibitor tadalafil and sildenafil as anticancer agent against hepatocellular carcinoma *via* targeting key events of glucose metabolism and multidrug resistance [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(8): e23100.
- [11] 李超, 姚莉, 宗玲, 等. 晚期宫颈癌治疗进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(3): 501–4.
- [12] 李淑贤, 王白燕, 李瑞琴, 等. 华蟾素抗肿瘤机制研究进展 [J]. *现代肿瘤学* 2022, 30(13): 2461–4.
- [13] 吴宏磊, 陈进宝, 徐可, 等. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志* 2021, 37(2): 192–6.
- [14] 胡叶, 周琴, 李善君, 等. 华蟾素注射液干预血管内皮细胞和肿瘤细胞增殖及 VEGF 表达的实验研究 [J]. *实用癌症杂志* 2019, 34(1): 1–4.
- [15] Yang A L, Wu Q, Hu Z D, et al. A network pharmacology approach to investigate the anticancer mechanism of cinobufagin against hepatocellular carcinoma *via* downregulation of EGFR-CDK2 signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 431: 115739.

## Cinobufagin regulates HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway to reverse drug resistance in colorectal cancer cells HCT15/5-FU *in vitro*

Zhao Qinying<sup>1,2</sup>, Wu Yue<sup>1,2</sup>, Gui Zhongxuan<sup>1,2</sup>, Zhang Quan<sup>1,2</sup>, Ye Yingquan<sup>1,2</sup>, Wang Gaoxiang<sup>1,2</sup>, Zhang Mei<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Medical University Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*Oncology Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)*

**Abstract Objective** To investigate the reversal effect of cinobufagin (CINO) combined with 5-fluorouracil (5-FU) on human colorectal cancer (CRC) drug-resistant cell line HCT15/5-FU, and to clarify the regulatory role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) / vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in reversing chemoresistance of colorectal cancer. **Methods** MTT assay was used to detect the changes of drug resistance and drug resistance index, flow cytometry was used to evaluate the apoptosis of cells, scratch test and Transwell assay were used to detect the changes of cell migration and invasion ability. Western blot was used to detect the expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins and HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway-related proteins. **Results** Compared with HCT15 cells, the resistance index of HCT15/5-FU was about 8.720. CINO combined with 5-FU could significantly enhance the drug sensitivity of HCT15/5-FU cells, reduce drug resistance index, up-regulate the level of apoptosis, and inhibit cell migration and invasion in a dose-dependent manner. Western blot results showed that CINO combined with 5-FU could inhibit the activity of EMT and HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway. **Conclusion** CINO can reverse 5-FU resistance of colorectal cancer *in vitro*, and its mechanism may be related to the regulation of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway and the inhibition of EMT and angiogenesis.

**Key words** cinobufagin; HIF-1 $\alpha$ /VEGF; colorectal cancer; 5-FU resistance