

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.007

西贝素通过调控 Cyclin D1 介导的 CDK4/6-Rb-E2F1 信号轴抑制人胃腺癌 AGS 细胞增殖

刘雪¹, 李治汉¹, 杨霞², 张兆鹏², 陈慧丹², 李一权², 韩继成², 朱羿龙², 朱光泽^{2,3} (1. 长春中医药大学 临床医学院, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学 中西医结合学院 吉林省传染性疾病预防与诊治重点实验室, 吉林 长春 130117; 3. 长春中医药大学附属医院 检验科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探究西贝素通过调控 Cyclin D1 介导的 CDK4/6-Rb-E2F1 信号轴对人胃腺癌细胞(AGS)的增殖抑制效果及其分子机制。**方法:** 利用不同浓度的西贝素处理 AGS 和人正常胃黏膜上皮细胞(GES-1), 通过 CCK-8 检测和结晶紫染色实验确定西贝素的最适抑制剂量和作用时间; 采用划痕实验和 Transwell 迁移实验与侵袭实验检测西贝素对 AGS 细胞迁移与侵袭能力的影响; 利用流式细胞术和 WB 检测西贝素对 AGS 细胞周期及细胞周期相关蛋白表达的影响; 利用质粒过表达 Cyclin D1, 并通过 WB 检测、结晶紫染色实验、划痕实验和 Transwell 迁移实验与侵袭实验进一步明确西贝素的抑制机制; 构建 AGS 移植瘤裸鼠模型, 采用免疫荧光染色法和免疫组化检测 Cyclin D1、CDK4、CDK6、Rb、p-Rb、E2F1 的表达水平。**结果:** 与对照组相比, 西贝素药物浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 GES-1 细胞的增殖无影响($P > 0.05$), 但能够显著性抑制 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.01$), 并诱导 AGS 细胞周期 G0/G1 期阻滞, 显著抑制周期相关蛋白 Cyclin D1、CDK4、CDK6、p-Rb、E2F1 的表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Cyclin D1 过表达能够显著降低西贝素对 AGS 细胞的抑制效果($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 荷瘤裸鼠实验结果显示, 西贝素能够抑制 AGS 移植瘤的增殖, 影响肿瘤组织中 Cyclin D1、CDK4、CDK6、p-Rb、E2F1 的表达($P < 0.01$)。**结论:** 西贝素可能通过下调 Cyclin D1 介导的 CDK4/6-Rb-E2F1 信号轴活化抑制 AGS 增殖。

[关键词] 人胃腺癌细胞; 西贝素; 周期蛋白 D1; CDK4/6-Rb-E2F1 信号轴

[中图分类号] R735.3; R730.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 05-0528-09

Sipeimine inhibits the proliferation of human gastric adenocarcinoma AGS cells by modulating the cyclin D1-mediated CDK4/6-Rb-E2F1 signaling axis

LIU Xue¹, LI Zhihan¹, YANG Xia², ZHANG Zhaopeng², CHEN Huidan², LI Yiquan², HAN Jicheng², ZHU Yilong², ZHU Guangze^{2,3} (1. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Key Laboratory of Jilin Province for Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Infectious Diseases, College of Integrative Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-proliferative effect and molecular mechanism of sipeimine on human gastric adenocarcinoma cells (AGS) by modulating the Cyclin D1-mediated CDK4/6-Rb-E2F1 signaling axis. **Methods:** AGS and GES-1 cells were treated with different concentrations of sipeimine. The optimal inhibitory dose and duration were determined using CCK-8 and crystal violet assays. The effects of sipeimine on AGS cell migration and invasion were assessed *via* scratch and Transwell assays. Flow cytometry and Western blot analyses evaluated the impact of sipeimine on AGS cell cycle progression and expression of cell cycle-related proteins. Cyclin D1 was overexpressed by plasmid transfection to further elucidate the inhibitory mechanism of sipeimine *via* WB, crystal violet, scratch, and Transwell assays. An AGS xenograft nude mouse model was established to investigate the *in vivo* effects and mechanisms of sipeimine, and the expression of Cyclin D1, CDK4, CDK6, Rb, p-Rb, and E2F1 was assessed by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Results:** Compared with the control group, sipeimine at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not affect the proliferation of GES-1 cells ($P > 0.05$), but significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion capabilities of AGS cells ($P < 0.01$). It also induced G0/G1 phase arrest in the AGS cell cycle and significantly suppressed the

[基金项目] 吉林省自然科学基金(YDZJ202401687ZYTS)

[作者简介] 刘雪, 女, 硕士生

[通信作者] 朱光泽; 朱羿龙(扫码获取作者通信方式)



expression levels of the cycle-related proteins Cyclin D1, CDK4, CDK6, p-Rb, and E2F1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Overexpression of Cyclin D1 significantly reduced the inhibitory effect of sipeimine on AGS cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In tumor-bearing mouse models, sipeimine inhibited AGS xenograft proliferation and affected the expression of Cyclin D1, CDK4, CDK6, p-Rb, and E2F1 in tumor tissues ($P < 0.01$). **Conclusion:** Sipeimine may inhibit AGS proliferation by downregulating the Cyclin D1-mediated CDK4/6-Rb-E2F1 signaling pathway activation.

[Key words] human gastric adenocarcinoma cells; sipeimine; Cyclin D1; CDK4/6-Rb-E2F1 signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(5): 528-536. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.007]

胃癌(gastric cancer, GC)是起源于胃的原发性恶性上皮性肿瘤。有数据^[1-2]显示,2022年在全球范围内有超过968 000例新发GC病例,导致约660 000人死亡,使得GC成为世界上第五大最常见的癌症和第五大癌症相关的死亡病因。在中国,GC是继肺癌、肝癌之后的第三大最常见恶性肿瘤,其发病率约占所有恶性肿瘤的7.4%,2022年GC的死亡率达到10.1%^[3]。目前,GC的治疗方法主要是手术治疗、辅助化疗、放疗或新辅助治疗^[4]。然而,由于化疗或靶向药物存在耐药性及多种不良反应,常使患者的治疗效果受到限制。近年来,大量研究^[5-6]显示,中药及其有效成分在提升化疗效果、降低不良反应的同时,还可调节免疫微环境,为肿瘤综合治疗提供了独特的应用优势。已知贝母素甲、贝母素乙、贝母辛和西贝素是4种具有明确药理作用的贝母类生物碱,具有明显的抗肿瘤活性^[7-10]。课题组在前期预实验研究中发现,西贝素对GC细胞的抑制效果最显著。本研究通过体内外实验,基于Cyclin D1介导的CDK4/6-Rb-E2F1信号轴探讨西贝素抑制人胃腺癌AGS细胞增殖的效果及其潜在作用机制,以期为GC治疗策略的优化及中药有效成分抗肿瘤机制的深入研究提供新的思路与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

人胃腺癌细胞系AGS和人正常胃黏膜上皮细胞GES-1购买于北京北纳创联生物技术研究院。动物选用7周龄雌性BALB/c裸鼠(SPF级),购自北京斯贝福生物公司[SCXK(京)2024-0001, No.110324241102562471]。本研究的动物试验方案已获得长春中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(伦理批准号2024017)。

1.2 主要实验试剂

胎牛血清购自上海双迦生物科技有限公司, RPMI 1640、双抗和胰酶购自山东思科捷生物技术有限公司,西贝素购自美国MCE公司,CCK-8试剂盒、结晶紫染色液、RIPA裂解液、BCA试剂盒及细胞周期检测试剂盒均购自上海碧云天生物公司,通用型抗体稀释液与PAGE凝胶快速制备试剂盒均购自上

海雅酶生物公司,转染试剂盒购自美国ZETA公司,pCMV-HA-Cyclin D1和pCMV-HA质粒购自PPL,E-cadherin、Vimentin、MMP3、Cyclin D1、CDK4、CDK6、GAPDH和Tubulin抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,Rb、p-Rb和E2F1抗体购自美国abcam公司。

1.3 细胞培养

将AGS细胞与GES-1细胞复苏后接种到100 mm × 20 mm细胞培养皿中,加入10 mL含有10%胎牛血清和1%双抗的RPMI 1640培养基,轻柔混匀后放置37 °C的5% CO₂恒温培养箱中培养,在细胞贴壁后更换新鲜培养基,根据细胞生长密度进行传代,取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.4 CCK-8法检测AGS细胞的增殖能力

分别收集对数生长期的AGS细胞和GES-1细胞,胰酶消化后以166 × g离心5 min进行计数,每孔5 × 10³个细胞接种密度加入96孔板内,之后将96孔板放入37 °C、含5% CO₂的培养箱中进行过夜培养。

使用DMSO溶剂和1640培养基稀释西贝素在培养液中的最终质量浓度分别为30、50、70、90、100、110、130、150 μg/mL。待细胞贴壁生长后,弃去孔内培养基并加入不同浓度的待测药物,每组设置5个复孔,同时设立DMSO溶剂阴性对照组,分别置于培养箱作用24、48、72 h。培养结束后弃去培养液,每孔加入100 μL(1640稀释)的10%浓度的CCK-8溶液,置于37 °C、5% CO₂培养箱中反应2 h,随后用酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度,依据检测结果进行分析,最终筛选出西贝素最适用药浓度与作用时间是100 μg/mL与48 h。

1.5 结晶紫染色法检测AGS细胞的增殖能力

将AGS细胞和GES-1细胞分别接种至12孔板内,接种密度为1 × 10⁵个/孔,随后将12孔板置于37 °C、含5% CO₂的培养箱中过夜培养。待细胞完全贴壁后,用100 μg/mL西贝素处理AGS细胞和GES-1细胞48 h,同时设置阴性对照组。培养结束后弃去培养基,用4%多聚甲醛固定细胞15 min后加入0.1%结晶紫染色液500 μL/孔,于室温下染色15 min,用纯净水清洗2遍。待自然晾干后在显微镜下拍照,所得图像采用Image J软件进行处理。

1.6 细胞划痕实验检测 AGS 细胞的划痕修复能力

将 AGS 细胞接种于 6 孔板内, 细胞接种密度为 2.5×10^5 个/孔。待细胞生长至融合率约 80%~90% 时, 采用 200 μL 无菌枪头尖端, 在细胞表层以垂直方向一端向另一端划出一道印记, 脱落的细胞用 PBS 清洗干净确保划痕清晰, 试验孔更换为含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素的培养基, 同时设置阴性对照组。分别在处理后 0 h、24 h 和 48 h 时间点, 将 6 孔板置于显微镜下观察划痕变化并拍照, 最后用 Image J 软件分析与计算细胞迁移率。

1.7 Transwell 迁移实验与侵袭实验检测 AGS 细胞的迁移与侵袭能力

将用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素处理后的 AGS 细胞以及阴性对照组的 AGS 细胞以 2.5×10^5 个/孔加入到无或有预包被基质胶的 Transwell 小室上室中, 随后向下室加入含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 500 μL , 每组设置 3 个复孔。将小室置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 48 h。培养结束后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 取出小室, PBS 洗 2 遍, 用湿棉签轻轻擦去上室表面未迁移或未侵袭细胞, 待小室自然晾干后置于显微镜下观察并拍照记录实验结果。

1.8 流式细胞术检测 AGS 细胞的细胞周期

将 AGS 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养至细胞贴壁后, 实验孔更换为含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素的培养基, 同时设置阴性对照组。将细胞置于培养箱 48 h 后用胰酶消化, 经 PBS 清洗 2 遍后制备成单细胞悬液。向悬液中加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇, 混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中固定过夜。次日用 PBS 洗涤细胞, 166 $\times g$ 离心 5 min 收集沉淀的细胞, 向细胞中加入 500 μL PI/RNase A 染色工作液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光染色 30 min 后用流式细胞仪检测并分析细胞周期分布情况。

1.9 WB 法检测 AGS 细胞相关蛋白的表达水平

将 AGS 细胞按 5×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板, 细胞完全贴壁后用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素处理 48 h 后弃去孔内培养基, PBS 清洗 2 遍后, 于冰上每孔加入 120 μL RIPA 裂解液, 裂解细胞 20 min 后收集总蛋白裂解液, 通过 BCA 法对总蛋白进行定量分析, 并向剩余蛋白样品中加入 $5 \times$ Loading Buffer, 混匀后煮沸 10 min。取 30 μg 待检样品进行上样, 上层胶恒压 90 V 电泳 20 min, 下层胶恒压 130 V 至溴酚蓝跑到凝胶底部终止电泳。随后将蛋白条带转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 使用快速封闭液封闭处理 40 min。封闭结束后, 加入按 1:1 000 比例稀释的一抗 (E-cadherin、Vimentin、MMP3、Cyclin D1、CDK4、

CDK6、Rb、p-Rb、E2F1、Tubulin 及 GAPDH 抗体), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育过夜。次日, 用 TBST 缓冲液清洗 NC 膜 3 次, 10 min/次, 再加入按 1:3 000 比例稀释的、与一抗种属相应的辣根过氧化物酶标记的 IgG(H+L) 二抗, 室温下于摇床上孵育 40 min, TBST 缓冲液清洗 3 次, 10 min/次, 随后进行显影液显色, 用化学发光仪拍照记录。使用 Image J 软件测定各蛋白条带灰度值。

1.10 AGS 细胞的转染与分组

取处于对数生长期的 AGS 细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中。待细胞生长至融合率约 60%~70% 时进行转染, 按照转染试剂盒说明, 将 pCMV-HA-Cyclin D1 和 pCMV-HA 分别与转染试剂按照 1:1 的比例混合 (2 μg 质粒:2 μL 转染试剂), 用移液器轻柔吹打混匀, 室温静置 15 min, 再将质粒-转染试剂混合液加入细胞培养基中, 转染 6 h 后更换培养基, 继续培养 48 h 进行后续实验。

将 pCMV-HA-Cyclin D1 质粒转染组定义为过表达组, 将 pCMV-HA 质粒转染组定义为空载组。按空载组、空载-西贝素组 (西贝素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 过表达组、过表达-西贝素组 (西贝素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 转染培养完成后, 通过 WB 法检测周期相关蛋白以验证过表达效率, 同时通过结晶紫染色、划痕实验及 Transwell 实验检测上述各组细胞增殖、迁移、侵袭能力的变化。

1.11 构建 AGS 细胞荷瘤裸鼠模型和西贝素对裸鼠移植肿瘤体积的影响

将 AGS 细胞以 2×10^6 个细胞皮下注射于裸鼠的右后肢近背部区域构建胃癌荷瘤裸鼠模型。14 d 后待裸鼠右后肢近背部区域出现黄豆粒大小的肿瘤即视为造模成功, 本研究造模成功率为 100%。随后对裸鼠进行随机分组, 每组 8 只, 分别为西贝素组与对照组。给药方式: 西贝素组裸鼠每 5 d 进行 1 次西贝素 (12 mg/kg) 瘤内注射, 连续给药 5 次; 对照组裸鼠则瘤内注射等量的生理盐水, 两组裸鼠给药频率与周期保持一致。每隔 7 d 测量 1 次裸鼠移植瘤直径, 连续测量 42 d 并计算移植瘤大小, 同时监测裸鼠生存状态。AGS 细胞荷瘤裸鼠实验结束后, 取出其皮下肿瘤组织并拍照。

1.12 免疫荧光染色法检测裸鼠移植瘤组织中 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白的表达

从西贝素组和对照组中随机挑选 3 个移植瘤组织, 采用 4% 多聚甲醛进行组织固定 24 h 并制备石蜡切片, 将切片放入环保型脱蜡液处理后依次通过梯度乙醇复水至蒸馏水, 再将切片置于 EDTA 抗原修复缓冲液中, 使用微波炉加热进行抗原修复, 再于过氧

化氢溶液中浸泡 10 min, 随后画圈, 血清封闭 30 min 后加入 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 一抗(1:1 000 比例稀释), 4 °C 孵育过夜, 次日加入与一抗种属相应的 Cyanine 3 标记二抗(1:3 000 比例稀释), 室温孵育 45 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 再以 DAPI 室温避光染核 8 min, 最后用自发荧光淬灭剂封片, 于 4 °C 避光保存并进行免疫荧光检测并拍照。利用 Image J 软件对免疫荧光结果进行分析, 测定各组肿瘤组织中 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 的阳性信号的相对强度。

1.13 免疫组化检测裸鼠移植瘤组织中 Rb、p-Rb、E2F1 的表达水平

将 1.12 制作好的组织蜡块切片, 将切片置于 65 °C 烤箱中脱蜡 1 h 后进行脱蜡至水, 加入柠檬酸后在微波炉中进行抗原修复, 再用免疫组化笔在组织上画圈并在圈内血清封闭 30 min, 甩掉封闭液后滴加 Rb、p-Rb、E2F1 一抗(1:1 000 比例稀释), 于 4 °C 避光孵育过夜, 次日加入与一抗相应种属的辣根过氧化酶标记的二抗(1:3 000 稀释)于室温避光孵育 1 h, 随后进行 DAB 显色、苏木素染核、中性树胶封片, 最后镜检。利用 Image J 软件对免疫组化结果进行分析, 测定各组肿瘤组织中 Rb、p-Rb、E2F1 的阳性表达率。

1.14 统计学处理

上述所有实验均独立重复 3 次。所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。两组间的数据

比较采用 *t* 检验(*t*-test), 多组间的数据比较则采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

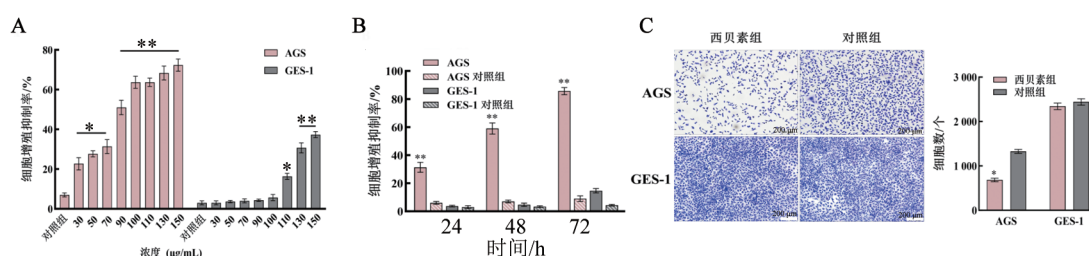
2 结果

2.1 西贝素抑制 AGS 细胞的增殖

CCK-8 法检测结果表明, 与对照组相比, 西贝素能显著抑制 AGS 细胞的增殖, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并随着药物浓度的升高而抑制效果越明显(图 1A); 与对照组相比, 药物浓度为 30、50、70、90、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的西贝素对 GES-1 细胞增殖的抑制差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 而当西贝素药物浓度增至 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其对 GES-1 细胞有明显的增殖抑制效应, 与其他药物浓度相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1A。

当西贝素的作用浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 在 24、48 和 72 h 时均能显著性抑制 AGS 细胞增殖, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 且随着时间的增加其对 AGS 细胞的抑制效果呈上升趋势; 但对于 GES-1 细胞, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的西贝素仅在 72 h 时能显著性抑制 GES-1 细胞增殖($P < 0.05$), 所以选择 48 h 为后续细胞实验作用时间(图 1B)。

结晶紫染色实验结果进一步证实, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素可显著性抑制 AGS 细胞的增殖, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 但对 GES-1 细胞无显著性影响($P > 0.05$), 见图 1C。



A: CCK-8 法检测西贝素不同药物浓度下 AGS 细胞和 GES-1 细胞的增殖能力; B: CCK-8 法检测西贝素相同药物浓度下不同时间段 AGS 细胞和 GES-1 细胞的增殖能力; C: 结晶紫染色法检测 AGS 细胞和 GES-1 细胞的增殖能力($\times 40$)。

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 西贝素对 AGS 细胞增殖能力的影响

2.2 西贝素能够抑制 AGS 细胞的划痕修复、迁移和侵袭能力

本研究通过观察划痕愈合情况来评估西贝素对 AGS 细胞划痕修复能力的影响。结果表明, 与对照组相比, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西贝素处理 24、48 h 时, 能显著抑制 AGS 细胞的划痕修复能力, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 2A。

Transwell 迁移与侵袭实验结果表明, 和对照组

相比, 西贝素组迁移和侵袭的细胞数目均明显减少, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 见图 2B 和图 2C。

WB 结果显示, 与对照组相比, 西贝素的 E-cadherin 表达量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), Vimentin、MMP-3 表达量均降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 2D。

2.3 西贝素对 AGS 细胞周期的影响

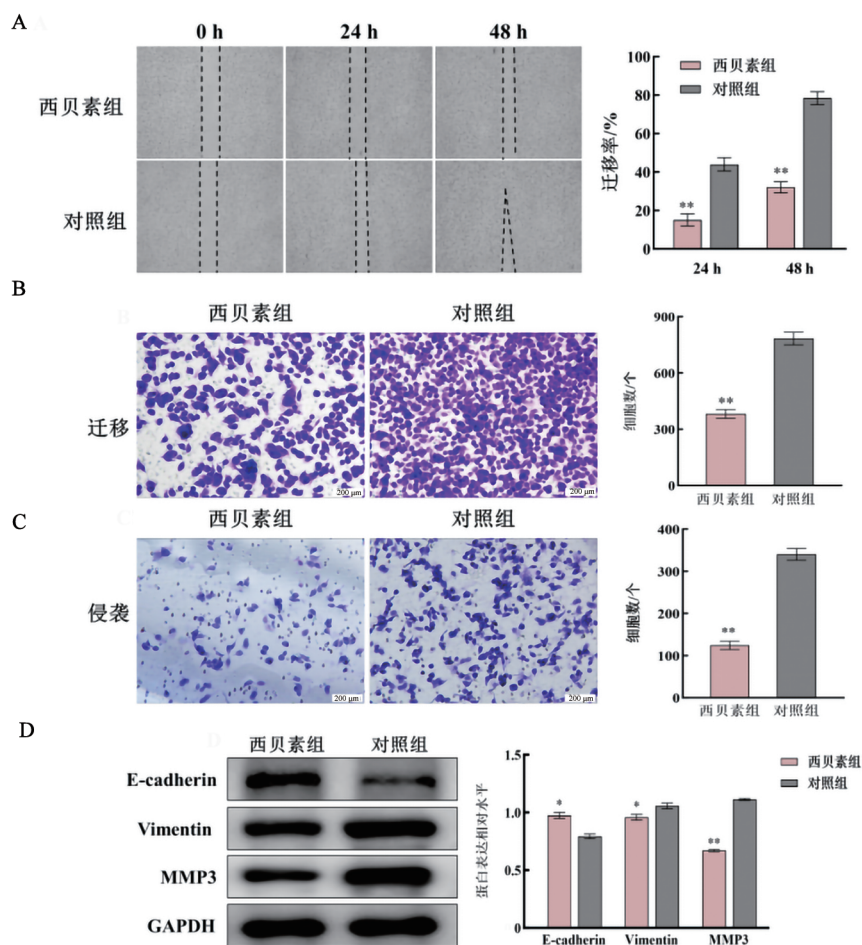
流式细胞术检测结果显示, 西贝素作用于 AGS

细胞后, G0/G1 细胞比例显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明西贝素能够显著性诱导 AGS 细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 见图 3A。

WB 结果显示, 与对照组相比, 西贝素能显著降低 AGS 细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 和 CDK6 的表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 3B。与对照组相比, 西贝素处理后的 AGS 细胞

中 p-Rb、E2F1 的蛋白表达水平均显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明西贝素均能有效抑制 Rb-E2F1 信号通路的活化, 见图 3C。

结合之前细胞周期的检测结果表明, 西贝素可能通过下调 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 的表达水平诱导 AGS 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。



A: 划痕实验检测经西贝素处理的 AGS 细胞的伤愈合能力 ($\times 10$); B: Transwell 法检测 AGS 细胞的迁移能力 ($\times 40$); C: Transwell 法检测 AGS 细胞的侵袭能力 ($\times 40$); D: WB 检测 AGS 细胞迁移、侵袭相关蛋白的表达水平。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 西贝素对 AGS 细胞迁移、侵袭能力的影响

2.4 过表达 Cyclin D1 逆转西贝素对 AGS 增殖的抑制

WB 结果表明, 过表达组的 Cyclin D1 表达水平显著高于空载组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 相较于过表达-西贝素组, 空载-西贝素组的 CDK4/6、p-Rb 及 E2F1 的蛋白表达水平均明显下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 4A。

划痕实验结果表明, 在 24 和 48 h 时, 与空载-西贝素相比, 过表达-西贝素组的划痕修复能力显著增强, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 见图 4B。

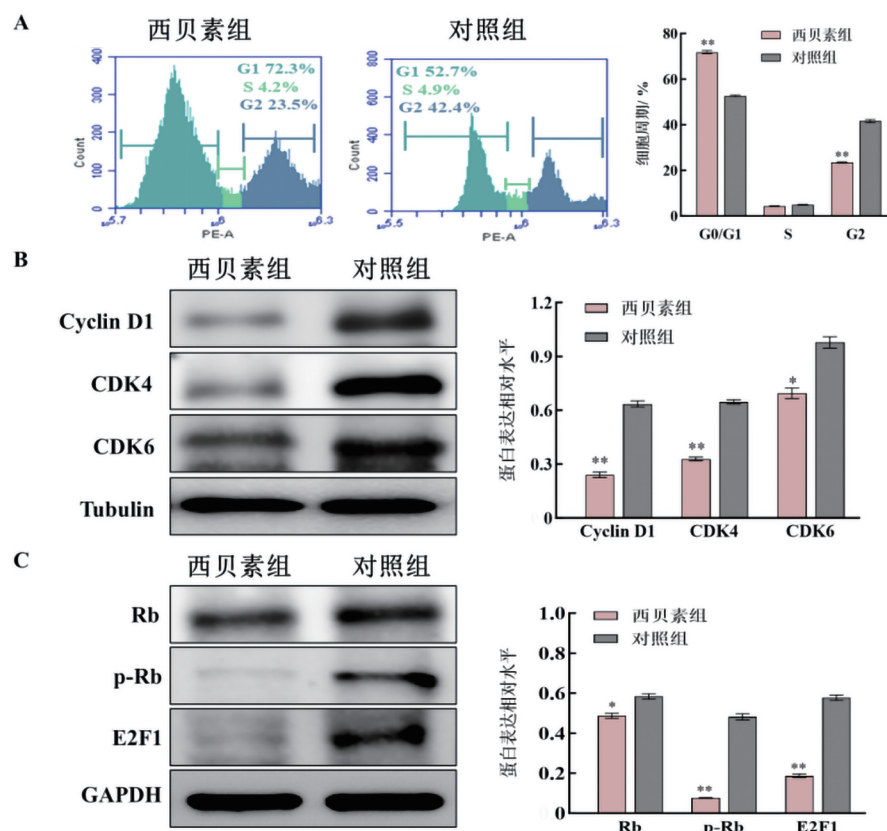
此外, 结晶紫染色法、Transwell 迁移实验与侵袭实验结果表明, 与空载-西贝素相比, 过表达-西贝素组的细胞数显著增多, 差异均有统计学意义 (均

$P < 0.01$), 见图 4C、图 4D 和图 4E。因此, 推测西贝素可能通过下调 Cyclin D1 介导 CDK4/6-Rb-E2F1 信号轴活化来抑制 AGS 细胞的增殖。

2.5 西贝素抑制荷瘤裸鼠移植瘤体增殖和细胞周期相关蛋白的表达

AGS 细胞移植瘤裸鼠实验结果显示, 与对照组相比, 西贝素处理 35 d 和 42 d 的裸鼠移植瘤的体积均显著减小 (均 $P < 0.01$), 见图 5A 和图 5B。

免疫荧光和免疫组化结果 (图 5C 和图 5D) 显示, 西贝素组裸鼠移植瘤组织中 Cyclin D1、CDK4、CDK6 的相对荧光强度与 Rb、p-Rb、E2F1 的阳性表达率均显著低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



A: 流式细胞术检测 AGS 细胞周期分布情况; B: WB 法检测 AGS 细胞中 Cyclin D1、CDK4 和 CDK6 的表达水平; C: WB 法检测 AGS 细胞中 Rb、p-Rb、E2F1 的表达水平。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 西贝素对 AGS 细胞周期的影响

3 讨论

近年来,源于植物的天然化合物凭借高效抑瘤与低不良反应的双重优势,正迅速成为抗肿瘤新药探索的重要领域^[11-12],这为抗肿瘤药物的研发奠定了重要的物质基础。在抑制肿瘤细胞增殖方面,有许多与天然化合物相关的研究,XIAO 等^[13]发现,獐牙菜苷可以通过下调 Cyclin D1、CDK4、CDC2 蛋白及 CDC25 蛋白的表达水平,造成细胞 DNA 损伤,进而导致白血病细胞阻滞于 S 期与 G2/M 周期;提取自平贝母的西贝素乙可以通过下调细胞周期相关蛋白的表达来诱导细胞阻滞于 G1 期,抑制人结肠癌 HCT116 细胞、SW480 细胞的增殖^[14-15];CHENG 等^[16]研究发现,柚皮素可以通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路并诱导细胞周期阻滞来抑制结肠癌细胞的增殖。而西贝素不仅能够通过炎症-癌症反馈环路显著抑制非小细胞肺癌肿瘤及其相关炎症反应,其毒性分析还表明,西贝素不会对主要器官造成明显损害^[10]。综上,提取自平贝母的西贝素具备着抗肿瘤潜力,这为此次探索其抗 GC 机制的研究奠定了基础。

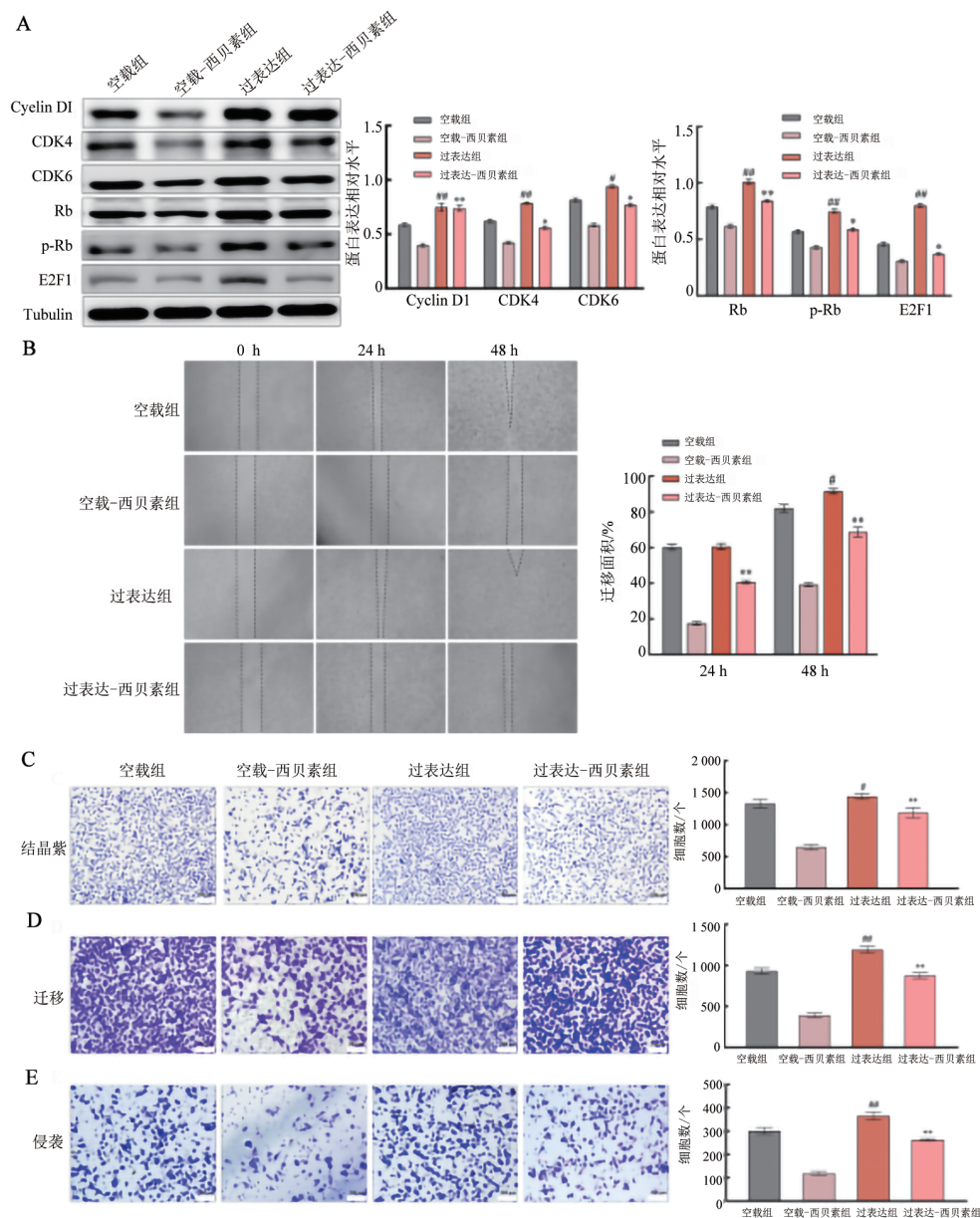
GC 是最常见的消化道恶性肿瘤之一,目前已成为全球癌症致死的重要诱因,对人类生命健康构成

了严重威胁^[17]。癌细胞通常具有无限增殖的能力,细胞周期调控失衡、进程出现异常是癌症发生的基本机制之一。而在正常细胞中,细胞周期的正常运转依赖于周期蛋白(Cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的调控,以确保细胞按照 G0/G1 期-S 期-G2 期-M 期的顺序完成分裂^[18-19]。有研究^[20]报道,在 Cyclins 中 Cyclin D1 的过度表达与人类多种癌症的发生发展最为密切,其中也包括胃癌。另外,G0/G1 期作为决定细胞周期启动的关键,Cyclin D1 在此期可通过激活并与 CDK4/6 相结合形成具有活性的 Cyclin D1-CDK4/6 复合物,进而推动细胞周期进程。在本研究中,前期通过 CCK-8 法和结晶紫染色法检测发现,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的西贝素可以显著抑制人胃腺癌 AGS 细胞增殖,但对人正常胃黏膜细胞 GES-1 无显著性影响;细胞周期、WB 检测及荷瘤裸鼠肿瘤组织免疫荧光结果表明,西贝素可能通过下调 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 的蛋白表达水平来诱导 AGS 细胞周期阻滞于 G0/G1 期,从而实现了对 AGS 细胞增殖的抑制。

转录因子在细胞增殖、分化、发育、程序性死亡及运动等多项生物学过程中也扮演着重要角色,对肿瘤的发生发展具有显著调控作用^[21-22]。E2F 家族转

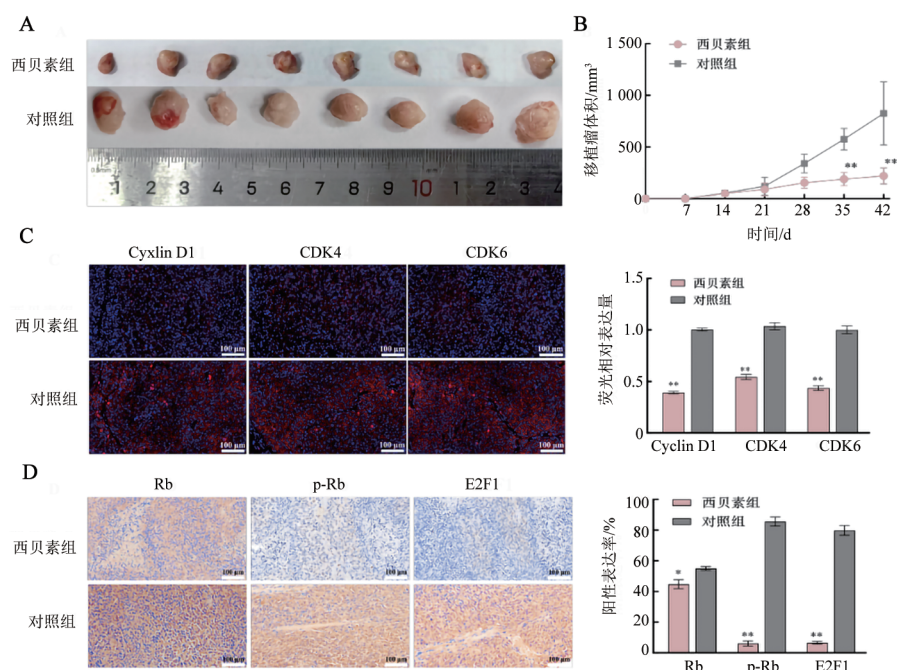
录因子(E2F)是人类基因组中65类转录因子家族的关键成员之一,其功能主要是调控细胞周期的有序进行,尤其是在推动G0/G1期向S期的转换中发挥着重要作用^[23-24]。当细胞内Cyclin D1受到刺激升高与CDK4/6相结合形成具有活性的Cyclin D1-CDK4/6复合体后,介导Rb蛋白磷酸化,从而释放E2F转录程序推动细胞周期进展^[25-27]。Rb是一种抑癌基因,通常未磷酸化的Rb可与E2F结合并抑制其转录活性,当Cyclin D1-CDK4/6复合物的活性受到抑制时,Rb蛋白磷酸化过程受阻(表现为p-Rb水平降低),E2F无法有效释放,其表达水平随之下降,最终导致细胞周

期进程被抑制。在本研究中,相较于对照组,经西贝素处理后的AGS细胞内Rb、p-Rb、E2F1蛋白表达显著降低,这与Cyclin D1、CDK4、CDK6蛋白水平显著降低相互印证。另外,在AGS过表达Cyclin D1后,西贝素对AGS细胞增殖的抑制作用较单纯西贝素给药组显著减弱,这表明过表达Cyclin D1逆转了西贝素对AGS增殖的抑制,结合WB检测结果,进一步提示西贝素可能通过抑制Cyclin D1-CDK4/6复合物的形成,进而阻断Rb蛋白的磷酸化及E2F1转录因子的释放。



A: WB法检测Cyclin D1过表达后细胞周期相关蛋白的表达水平; B: 划痕实验检测Cyclin D1过表达后细胞的划痕愈合能力($\times 10$); C: 结晶紫染色法检测Cyclin D1过表达后细胞的增殖能力($\times 40$); D: Transwell法检测Cyclin D1过表达后细胞的迁移能力($\times 40$); E: Transwell法检测Cyclin D1过表达后细胞侵袭能力($\times 40$)。与空载组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与空载-西贝素组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 过表达Cyclin D1后西贝素对AGS细胞周期相关蛋白表达水平及细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响



A: 两组裸鼠移植瘤的外形的比较; B: 两组裸鼠移植瘤体积的比较; C: 免疫荧光法检测移植瘤组织中 Cyclin D1、CDK4、CDK6 的荧光相对表达量($\times 20$); D: 免疫组化染色法检测移植瘤组织中 Rb、p-Rb、E2F1 的阳性表达率($\times 20$)。与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图5 西贝素对 AGS 细胞移植瘤裸鼠模型肿瘤增殖及周期相关蛋白表达的影响

目前,有许多与靶向 Cyclin D1 相关的药物及研究策略,如 CDKs 抑制剂、针对 CCND1 基因(编码 Cyclin D1 蛋白)的抗体、降低癌症对治疗敏感性的基因沉默剂等^[28]。CDK4/6 抑制剂是一种新型药物,可通过间接抑制 Cyclin D1 来阻断 Rb 磷酸化进而阻止癌细胞生长,常规用于乳腺癌治疗,并正在研究用于其他肿瘤中,但该类药物普遍存在耐药性、血液毒性、胃肠道反应等问题^[29],一定程度上降低了治疗效果和患者依从性。直接靶向 Cyclin D1 的抗体如 ZHAO 等^[30]开发的 AD κ 能够通过阻断 Cyclin D1-CDK4 相互作用抑制乳腺癌细胞增殖,然而其临床转化尚不清楚,脱靶引起的免疫副作用仍待解决。研究^[28,31]表明,利用基因沉默技术如 siRNA、shRNA 可下调 CCND1 表达进而抑制 DNA 损伤修复,增加化疗敏感性,但在实现基因持久性敲除、肿瘤特异性递送和降低毒性方面依然存在挑战。综上,现有 Cyclin D1 靶向干预手段均存在各自的局限性,本研究证实,天然植物活性成分西贝素可能通过靶向 Cyclin D1-CDK4/6 复合物发挥抗胃癌增殖作用,这或许为胃癌治疗提供了全新的天然药物研发方向与理论基础。后续可进一步探讨西贝素与临床常用 CDK4/6 抑制剂的协同抗肿瘤效应,以开发出更优的联合治疗方案。

利益冲突声明: 本文无利益冲突。所有作者与本研究相关的个人或机构均不存在潜在的利益冲

突。所有作者未与任何可能从本研究直接或间接获益的个人或机构存在雇佣、合作、兼职、咨询、持股、接受赞助、收取酬金或专利许可等关系。所有作者不存在任何影响本研究设计和实施、数据采集、数据分析和解释、论文撰写和发表等的潜在利益关系。

[参考文献]

- [1] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Gastric cancer, version 2.2025, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2025, 23(5): 169-191. DOI: 10.6004/jncn.2025.0022.
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- [3] 吉雨婷, 刘斯文, 张芸萌, 等. 中美两国恶性肿瘤疾病负担、流行趋势及归因风险因素比较[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(7): 646-656. DOI:10.3760/cma.j.cn112152-20240208-00068.
- [4] ARAÚJO D, RIBEIRO E, AMORIM I, et al. Repurposed drugs in gastric cancer[J]. Molecules, 2022, 28(1): 319. DOI: 10.3390/molecules28010319.
- [5] CHEN J, LI Y, SUN Q, et al. Huaier overcomes tumor-induced immunosuppression in colorectal cancer by activating MHC I and CD8⁺ T cells[J]. Phytomedicine, 2025, 147: 157157. DOI: 10.1016/j.phymed.2025.157157.
- [6] XU Y, ZHANG Y, HUANG C, et al. Xiaojianzhong decoction inhibits gastric cancer progression and enhances 5-Fu efficacy by regulating the MAPK and PI3K-AKT signaling pathway[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2025, 1263:

124671. DOI: 10.1016/j.jchromb.2025.124671.
- [7] TAN H, ZHANG G, YANG X, et al. Peimine inhibits the growth and motility of prostate cancer cells and induces apoptosis by disruption of intracellular calcium homeostasis through Ca^{2+} / CaMK II / JNK pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 81-92. DOI: 10.1002/jcb.28870.
- [8] LI J, QIN Y, WANG W, et al. Peiminine inhibits the progression of colorectal cancer through up-regulating miR-760 via declining the expression of long noncoding RNA LINC00659[J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(2): 148-156. DOI:10.1097/cad.0000000000000981.
- [9] WANG Y, HOU H, REN Q, et al. Natural drug sources for respiratory diseases from *Fritillaria*: chemical and biological analyses[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 40. DOI:10.1186/s13020-021-00450-1.
- [10] LIN Q, QU M, PATRA H K, et al. Mechanistic and therapeutic study of novel anti-tumor function of natural compound imperialine for treating non-small cell lung cancer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112283. DOI:10.1016/j.jep.2019.112283.
- [11] ASMA S T, ACAROUZ U, IMRE K, et al. Natural products/Bioactive compounds as a source of anticancer drugs[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(24):6203. DOI:10.3390/cancers14246203.
- [12] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(3): 200-216. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- [13] XIAO Q, YE Q F, WANG W, et al. Mild hypothermia pretreatment protects hepatocytes against ischemia reperfusion injury via down-regulating miR-122 and IGF-1R/AKT pathway[J]. *Cryobiology*, 2017, 75: 100-105. DOI:10.1016/j.cryobiol.2017.01.005.
- [14] 孙丽丽, 白冰, 杨霞, 等. 贝母素乙通过诱导G0/G1期阻滞抑制结肠癌细胞的增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(4): 326-332. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2024.04.002.
- [15] 杨霞, 李雅茹, 李玥, 等. 贝母素乙通过下调CDK2/CDK4/CDK6和cyclin D1表达抑制人结肠腺癌SW480细胞活力[J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(6): 1070-1077. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2024.06.013.
- [16] CHENG H, JIANG X, ZHANG Q, et al. Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(6): 3798-3804. DOI: 10.3892/etm.2020.8649.
- [17] WANG X, HE R, GENG L, et al. Ginsenoside Rg3 alleviates cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting SOX2 and the PI3K/Akt/mTOR signaling axis by up-regulating miR-429[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 823182. DOI:10.3389/fgene.2022.823182.
- [18] GALLASTEGUI E, BACHS O. Expression and purification of recombinant cyclins and cdk for activity evaluation[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1336: 9-12. DOI:10.1007/978-1-4939-2926-9_2.
- [19] LIM S, KALDIS P. Cdks, Cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation[J]. *Development*, 2013, 140(15): 3079-3093. DOI: 10.1242/dev.091744.
- [20] WANG J, SU W, ZHANG T, et al. Aberrant Cyclin D1 splicing in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 244. DOI: 10.1038/s41419-023-05763-7.
- [21] HE X, LINDSAY-MOSHER N, LI Y, et al. FOX and ETS family transcription factors regulate the pigment cell lineage in planarians[J]. *Development*, 2017, 144(24): 4540-4551. DOI:10.1242/dev.156349.
- [22] YORDY J S, MUISE-HELMERICKS R C. Signal transduction and the Ets family of transcription factors[J]. *Oncogene*, 2000, 19(55): 6503-6513. DOI:10.1038/sj.onc.1204036.
- [23] LAMBERT S A, JOLMA A, CAMPITELLI L F, et al. The human transcription factors[J]. *Cell*, 2018, 172(4): 650-665. DOI:10.1016/j.cell.2018.01.029.
- [24] 李飞飞, 王韵, 顾冀海, 等. E2F家族转录因子在肿瘤发生中的作用[J]. *遗传*, 2023, 45(7): 580-592. DOI:10.16288/j.ycz.23-029.
- [25] FRY D W, HARVEY P J, KELLER P R, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(11): 1427-1438. DOI:10.1158/1535-7163.1427.3.11.
- [26] RANDIC T, KOZAR I, MARGUE C, et al. NRAS mutant melanoma: towards better therapies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 99: 102238. DOI:10.1016/j.ctrv.2021.102238.
- [27] TRIPATHY D, BARDIA A, SELLERS W R. Ribociclib (LEE011): mechanism of action and clinical impact of this selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in various solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3251-3262. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-16-3157.
- [28] TAHERI M, ABDULLAH S R, SABER A F, et al. The dual role of cyclin D1: unraveling its tumor-promoting mechanisms and opportunities for therapeutics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 333(Pt 2): 148957. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2025.148957.
- [29] STANCIU I M, PAROSANU A I, NITIPIR C. An overview of the safety profile and clinical impact of CDK4/6 inhibitors in breast cancer-A systematic review of randomized phase II and III clinical trials[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(9): 1422. DOI: 10.3390/biom13091422.
- [30] ZHAO J, WU Y, XIAO T, et al. A specific anti-cyclin D1 intrabody represses breast cancer cell proliferation by interrupting the cyclin D1-CDK4 interaction[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2023, 198(3): 555-568. DOI: 10.1007/s10549-023-06866-7.
- [31] MARAMPON F, GRAVINA G L, JU X, et al. Cyclin D1 silencing suppresses tumorigenicity, impairs DNA double strand break repair and thus radiosensitizes androgen-independent prostate cancer cells to DNA damage[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5383-5400. DOI: 10.18632/oncotarget.6579.

[收稿日期] 2025-12-07

[修回日期] 2026-03-20

[本文编辑] 郁晓路