

黄芩素调节 Rho-ROCK-MLC 通路抑制乳腺癌细胞的生长与转移

蔡菲菲, 王秀峰, 周钱梅, 陆奕宇, 苏式兵*

上海中医药大学交叉科学研究院中医复杂系统研究中心, 上海 201203

摘要: 本文探讨黄芩素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 异种移植瘤裸鼠的肿瘤生长和肺转移的抑制作用及机制。将 20 只雌性 BALB/c 裸鼠随机分为正常组、模型组、紫杉醇组及黄芩素组, 每组 5 只, 建立人乳腺癌异种移植瘤裸鼠模型, 黄芩素组以 50 mg/kg 黄芩素腹腔注射 (qod), 紫杉醇组注射 10 mg/kg 紫杉醇 (biw), 正常组和模型组以生理盐水腹腔注射 (qd) 8 周。实验结果显示, 紫杉醇组及黄芩素组瘤重、肺转移结节数和转移灶小于模型组。黄芩素和 ROCK 抑制剂 Y-27632 单用及联用均能抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移力和细胞骨架蛋白表达, 同时抑制 ROCK1、Rac1、RhoA 和 p-MLC 蛋白水平。

关键词: 黄芩素; 乳腺癌; 细胞迁移

中图分类号: R273

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)4-0570-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.4.005

Baicalein regulates Rho-ROCK-MLC pathway to inhibit the growth and metastasis of breast cancer

CAI Fei-fei, WANG Xiu-feng, ZHOU Qian-mei, LU Yi-yu, SU Shi-bing*

Research Center for Traditional Chinese Medicine Complexity System, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: In this study, the inhibitory effect and mechanism of baicalein on tumor growth and lung metastasis of human breast cancer cell line MDA-MB-231 in nude mice was investigated. Twenty female BALB/C nude mice were randomly divided into normal group, model group, paclitaxel group and baicalein group. There were 5 nude mice in each group. The nude mice model of human breast cancer xenograft was established. Baicalein group was injected with 50 mg/kg baicalein abdominal cavity, paclitaxel group was injected with 10 mg/kg paclitaxel, normal group and model group were injected with normal saline for 8 weeks. Experimental results indicated that the tumor weight and the number of lung metastasis nodule and metastasis focus in paclitaxel group and baicalein group were less than those in the model group. Baicalein alone or in combination with ROCK inhibitor Y-27632 could inhibit the migration and cytoskeleton protein expression of MDA-MB-231 cells, reduce the formation of protein bundles, and inhibit the protein levels of ROCK1, Rac1, RhoA and p-MLC.

Key words: baicalein; breast cancer; cell migration

乳腺癌 (breast cancer) 在中医学范畴被称为“乳岩”、“乳石痈”等, 是女性中最常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率不断上升, 发病年龄越来越小, 严重威胁着女性的健康^[1]。虽然乳腺癌在早期筛查、手术和放化疗技术等方面有了显著的进展, 但对于晚期乳腺癌的全身性转移, 临床缺少安全有效的治疗药物, 是目前临床治疗的难点, 也是乳腺癌患者死

亡的主要原因之一。中药及其活性成分被报道具有抑制乳腺癌转移的作用^[2], 成为乳腺癌转移治疗药物的研究热点之一。黄芩素 (baicalein) 是中药黄芩的主要生物活性成分之一, 在体内外研究中均已被证明具有抗肿瘤、抗炎、抗心血管疾病和抗菌活性^[3]。近年来, 黄芩素因能抑制肿瘤细胞的增殖, 或诱导低毒性癌细胞的凋亡和自噬性细胞死亡^[4], 尤其因其能抑制乳腺癌的转移而受到越来越多的关注^[5,6]。乳腺癌组织中异常激活的 RhoA 和 ROCK, 引起下游 MLC 磷酸化增强, 导致细胞的迁移和侵袭^[7]。本研究旨在通过建立人乳腺癌异种移植瘤

收稿日期: 2020-04-01 接受日期: 2021-01-22

基金项目: 国家自然科学基金委重点项目 (81330084)

* 通信作者 Tel: 86-21-51323013; E-mail: shibingsu07@163.com

裸鼠模型,观察黄芩素抑制乳腺癌生长和转移的体内作用,并探讨黄芩素参与 ROCK 介导的细胞骨架重组抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移的作用机制。

1 材料

1.1 动物

4~6 周龄的 BALB/c 裸小鼠,雌性,体质量 20 ± 2 g,动物合格证编号:SCXK(沪)2012-0002,于上海中医药大学动物实验中心 SPF 实验室饲养。

1.2 药物

黄芩素(含量 98%)产品编号:05-2001,上海中药标准化研究中心提供,用二甲基亚砜(DMSO)稀释为 100 mmol/L,0.22 μ m 微孔滤膜过滤后分装。紫杉醇注射液,批号 090603,30 mg/5 mL,购自海口市制药厂有限公司。

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司);胎牛血清 FBS(美国 PAA 公司);胰蛋白酶(美国 Amersco 公司);DMSO(美国 Sigma 公司);SDS、Aprotinin、Tris-base(国药集团化学试剂有限公司);PMSF、APS、TEMED、蛋白定量试剂盒(上海威奥生物科技有限公司);抗体 GAPDH 等(美国 Cell Signaling Technology 公司);Transwell 小室(美国 Corning-Costar 公司);Y-27632(美国 MedChemExpress 公司)。

1.4 仪器

生物安全柜(HFsafe-500,香港力康发展有限公司);CO₂ 细胞恒温培养箱(3111,美国 Thermo Forma 公司);倒置显微镜(100-120,日本 Olympus 公司);酶联免疫检测仪(Synergy2,美国 BioTek 公司);离心机(ST16R,美国 Thermo Forma 公司);Bio-Rad 电泳仪及转印系统(1658033,美国 Bio-Rad 公司);化学发光成像仪(Tanon 2500,上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 黄芩素安全性评价

将 30 只 4~6 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性裸小鼠随机分为正常对照组、生理盐水组、黄芩素组,每组 10 只。生理盐水组、黄芩素组分别予 0.2 mL 生理盐水和黄芩素组 100 mg/kg 腹腔注射给药,每天一次,共给药 8 周。每日称量并记录体重,8 周后,摘眼球取血,颈脱位法处死,将血液离心分离血清和血细胞冻存于 -80 °C。检测血清肝功指标 ALT、AST 和肾功能指标 BUN、Cr 以评价黄芩素的毒副作用。本研究根据上海中医药大学动物护理和使用委员会

出版的《实验动物护理和使用指南》中规定的动物护理标准进行,方案经上海中医药大学动物保护与利用委员会批准。

2.2 黄芩素对人乳腺癌异种移植瘤裸鼠的作用研究

20 只 SPF 级 BALB/c 雌性裸小鼠,随机分为正常组、模型组、紫杉醇组及黄芩素组,每组 5 只。除正常组外,将细胞总数为 5×10^6 的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 注射到裸鼠右上肢腋下乳房脂肪垫中,观察并记录裸鼠体重变化和肿瘤生长情况。在造模后的第二天开始给药。黄芩素组以 50 mg/kg^[5],隔天一次给药 0.2 mL;紫杉醇组以 10 mg/kg^[8],每三天一次给药 0.2 mL;正常组、模型组以等量的生理盐水 0.2 mL 腹腔注射给药,每天一次,共给药 8 周。给药 8 周的裸鼠称体重后,摘眼球取血,颈脱位法处死。血液离心分离血清和血细胞冻存于 -80 °C。完整剥离肿瘤组织,称取肿瘤组织重量,一部分放入福尔马林组织固定液中,另一部分 -80 °C 冻存。用 1 mL 注射器从裸鼠主支气管注入适量福尔马林固定液后摘下整个肺脏,放入福尔马林中固定,常规石蜡包埋,4 μ m 切片做 H&E 染色。

2.3 黄芩素抑制乳腺癌侵袭转移作用机制研究

2.3.1 细胞分组及处理

用含 10% FBS 的 1640 培养基常规培养 MDA-MB-231 细胞至对数生长期,分为正常对照组,黄芩素组,抑制剂 Y-27632 组和黄芩素组与抑制剂联用组。黄芩素组分别用 100、50、25 μ M 的黄芩素进行干预,抑制剂组用 10 μ M Y-27632 干预,联用组以 100 μ M 黄芩素 + 10 μ M Y-27632 干预细胞。

2.3.2 Transwell 小室实验评估细胞迁移力

将各组 MDA-MB-231 细胞预先接种在 24 孔 Transwell 小室上室中,下室加入含 10% FBS 的 1640 培养基,37 °C,5% CO₂ 培养 24 h 后,清洗并擦拭除去上室表面的非迁移细胞。将迁移的细胞用 4% 多聚甲醛固定,用 0.1% 结晶紫染色,并在显微镜下对每个腔室的至少三个视野进行计数。迁移抑制率 = $(1 - \text{实验组迁移细胞数} / \text{对照组迁移细胞数}) \times 100\%$ 。

2.3.3 免疫荧光染色观察细胞骨架蛋白 F-actin 变化

各组 MDA-MB-231 细胞经用药处理 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定,室温下在湿盒中孵育稀释好的一抗及二抗,用 PBS 清洗,干燥后封片,即刻在激光共聚焦显微镜检查下观察。

2.3.4 Western blot 法检测细胞蛋白表达

收集各组 MDA-MB-231 细胞并裂解,以 BCA 蛋白测定其蛋白浓度。用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量蛋白质,并转移到 PVDF 膜上。在 4 °C 下将膜与主要抗体一起孵育过夜,将 GAPDH 作为内参对照,在室温下用二抗孵育 1 h。最后,使用化学发光成像仪可视化目标蛋白条带

2.4 统计学方法

使用 SPSS 25.0 和 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析和作图。所有数据均表示为均数 ± 标准

差,并使用 One-way ANOVA 进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素(100 mg/kg)对裸鼠未产生明显毒副作用

为了阐明黄芩素的安全性,我们检测了 100 mg/kg 黄芩素在裸鼠体内是否产生毒副作用。每周检测各组裸鼠的体重变化,正常对照组和用药组之间裸鼠体重没有显著差异(见图 1)。此外,图 1 中的生化结果显示,裸鼠肝功指标 ALT、AST 和肾功能指标 BUN、Cr 均没有统计学差异。

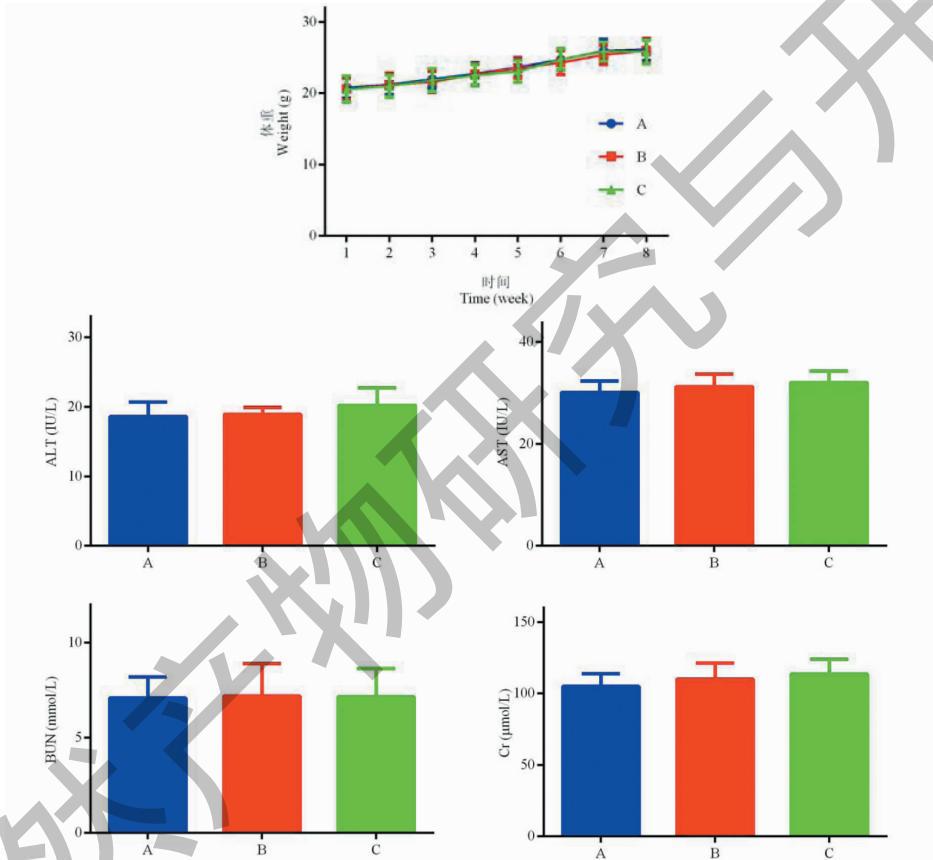


图 1 黄芩素对裸鼠体重及肝肾功能的影响

Fig. 1 Effects of baicalein on body weight, liver and kidney function in nude mice

注:A:正常对照;B:生理盐水;C:黄芩素。Note:A:Normal control;B:Normal saline;C:Baicalein.

3.2 黄芩素抑制乳腺癌异种移植瘤裸鼠肿瘤生长和肺转移

为了观察黄芩素对乳腺癌生长和转移的体内作用,采用人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株建立移植瘤裸鼠肺转移模型。如图 2 结果所示,用药组裸鼠肿瘤的瘤体体积和重量明显小于模型组,且差异统计学意义($P < 0.01$),其中黄芩素组抑瘤效果弱于紫杉醇组。图 3 中裸鼠肺转移组织病理结果显示,与正常组比较,其余各组均有癌细胞肺转移结节,而用

药后转移结节数和转移灶明显小于模型组,紫杉醇组肺转移率为 60%,黄芩素组肺转移率为 80%。该结果表明黄芩素具有明显抑制乳腺癌原位肿瘤生长和肺转移的作用。

3.3 黄芩素和 ROCK 抑制剂 Y-27632 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移

黄芩素在体内实验中表现出抑制乳腺癌生长和转移的作用,我们进一步在体外研究黄芩素抑制乳腺癌细胞转移的作用和机制。通过体外迁移实验,

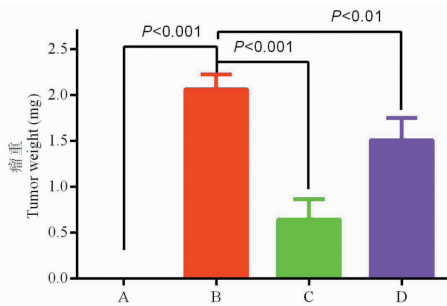


图2 黄芩素对移植瘤裸鼠体内肿瘤生长的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of baicalein on tumor growth in nude mice

注:A:正常组;B:模型组;C:紫杉醇组;D:黄芩素组。Note:A: Normal group;B:Model group;C:Paclitaxel group;D:Baicalein group.

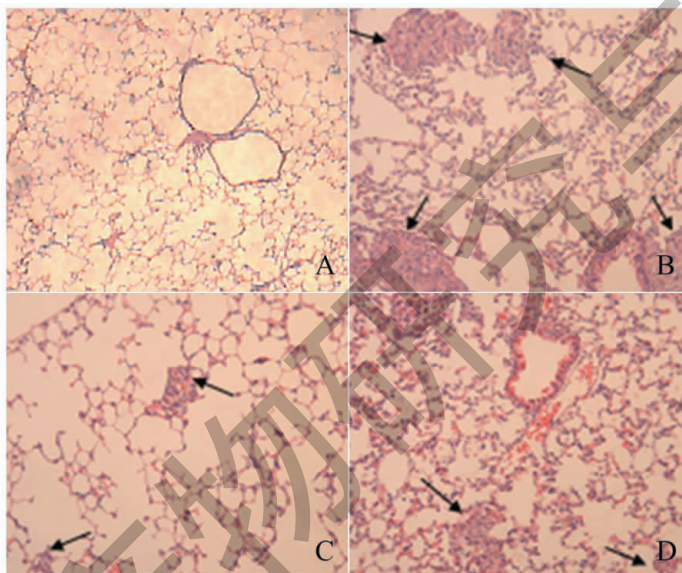


图3 黄芩素对移植瘤裸鼠体内肿瘤肺转移的抑制作用 (HE, $\times 100$)

Fig. 3 Inhibitory effect of baicalein on lung metastasis of transplanted tumor in nude mice (HE, $\times 100$)

注:A:正常组;B:模型组;C:紫杉醇组;D:黄芩素组。Note:A:Normal group;B:Model group;C:Paclitaxel group;D:Baicalein group.

察用药后 MDA-MB-231 细胞骨架蛋白 F-actin 的变化。实验发现未用药处理的细胞内有明显的蛋白质纤维束形成,而经黄芩素和 Y-27632 处理 24 h 后的细胞骨架蛋白表达被抑制,两种药物联合应用效果更明显(见图 5)。

3.5 黄芩素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞蛋白表达的影响

通过以上的实验我们知道黄芩素具有抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 体外迁移的作用,并且该作用与影响细胞骨架蛋白的重组有关。为进一步明确黄芩素在这一过程中影响了哪些蛋白参与调控骨架蛋白重组,我们进行了 Western blot 实验。结果如图 6 所示,100 μM 黄芩素能够显著抑制 ROCK1 ($P <$

我们分别用 100 μM 黄芩素、10 μM Y-27632 (Rho 下游激酶 ROCK 的特异性抑制剂)、100 μM 黄芩素 + 10 μM Y-27632 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h,发现对照组相比,黄芩素和 Y-27632 (10 μM) 均能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移力 ($P < 0.001$)。与单独使用抑制剂相比,将 Y-27632 与黄芩素联合应用后抑制细胞迁移的作用更明显 ($P < 0.01$) (见图 4)。

3.4 黄芩素和 ROCK 抑制剂 Y-27632 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞骨架蛋白表达

通过体外细胞迁移实验证实黄芩素能够抑制细胞迁移,我们进一步利用细胞荧光化学染色方法,观

0.05), Rac1 ($P < 0.01$) 和 RhoA ($P < 0.05$) 的表达。Rho 和 ROCK 的下游调控蛋白是肌球蛋白轻链蛋白 MLC。我们发现 100 μM 黄芩素和 10 μM 的 Y-27632 均能够明显抑制 MLC 的磷酸化 ($P < 0.05$), 两药合用效果显著 ($P < 0.01$)。这说明黄芩素抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移可能与抑制 RhoA-ROCK-MLC 信号通路相关。

4 讨论

黄芩素作为黄芩根的有效提取物,在多种癌症中均显示出了其抗癌能力^[9,10]。有研究表明,黄芩素能够抑制 PI3K/AKT 信号传导诱导乳腺癌细胞凋亡和自噬^[11],通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达影响乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力^[12]。然而,黄芩素

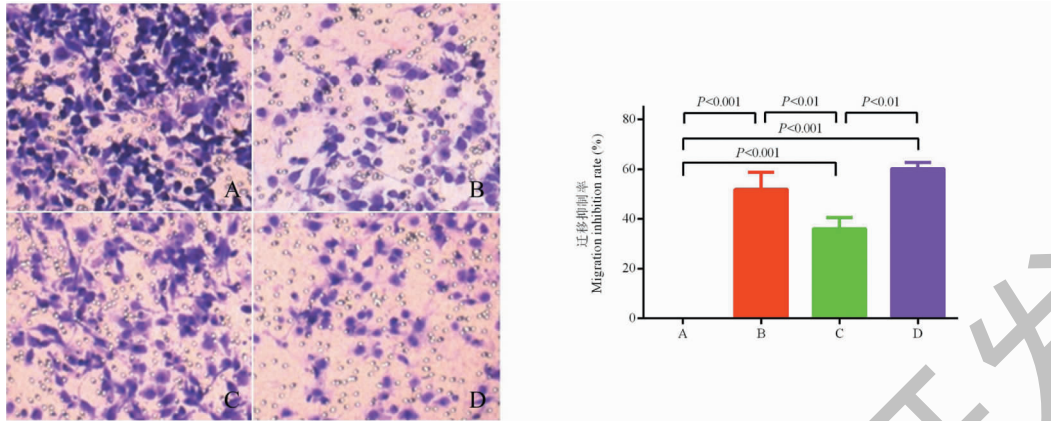


图4 黄芩素和 Y-27632 对 MDA-MB-231 细胞迁移力的影响

Fig. 4 Effects of baicalein and Y-27632 on the migration of MDA-MB-231 cell

注: A: 正常对照; B: Y-27632; C: 黄芩素; D: 黄芩素 + Y-27632, 下同。Note: A: Normal control; B: Y-27632; C: Baicalein; D: Baicalein + Y-27632, the same below.

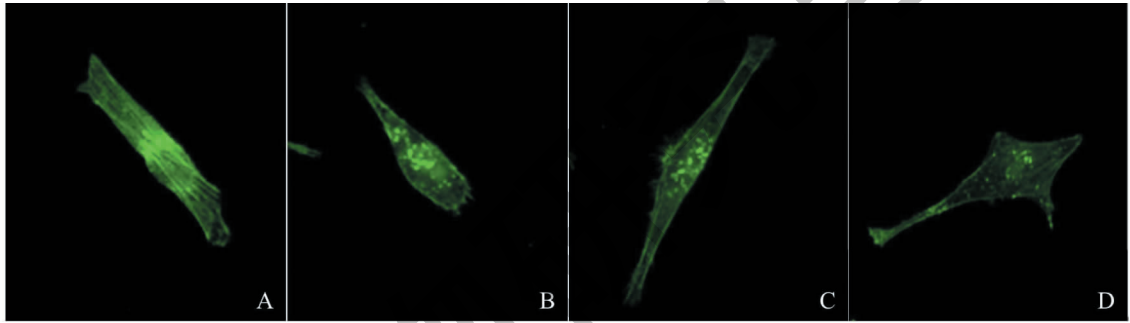


图5 黄芩素和 Y-27632 对 MDA-MB-231 细胞迁移力的影响

Fig. 5 Effects of baicalein and Y-27632 on F-actin of MDA-MB-231 cells

抗肿瘤的作用尚未在临床试验中得到证实,其抑制乳腺癌细胞迁移的具体机制也尚未解明。本研究在人乳腺癌异种移植瘤裸鼠模型上,观察到黄芩素能够抑制乳腺癌原位肿瘤生长和肺转移,抑制效果不及紫杉醇,但是对裸鼠的体重和肝肾功能均没有显著影响,表明黄芩素应用于乳腺癌防治可能是比较安全的,这与既往黄芩素抑制乳腺癌裸鼠肺转移模型的体内研究结果一致^[13]。

肿瘤细胞的迁移运动能力是肿瘤发生转移的主要原因之一,而细胞的迁移运动受到 Rho 家族基因的调控。它们通过调控细胞的骨架重组,细胞的黏附和细胞的运动等参与癌转移^[14]。单个或集体肿瘤细胞迁移是这一复杂过程中的关键步骤,涉及细胞外基质 (ECM) 重塑以及与相邻细胞和与基础结缔组织细胞粘连的动态重组,信号蛋白以及细胞骨架相关的支架成分,以协调的方式介导细胞与 ECM 的粘附^[15]。在本研究中观察到黄芩素具有抑制

MDA-MB-231 细胞迁移的作用,与本研究实验结果相似的是,有研究报道,黄芩素可能通过抑制 MMP-9 蛋白表达,抑制 MDA-MB-231 细胞增殖和迁移^[16]。

Rho 家族蛋白对细胞的迁移运动起调控作用, RhoA 是 Ras 超家族中小分子量的 G 蛋白成员之一,主要是通过影响细胞骨架参与调控肿瘤细胞的侵袭和转移^[17]。Rac1 是 Rho 家族 Rac 亚家族的成员,能够调控细胞生长和细胞骨架重组^[18],是许多细胞过程的多效性调节剂,包括细胞周期,细胞间粘附,以及通过肌动蛋白网络调节细胞运动性^[19]。Rho 相关蛋白激酶 (ROCK) 是一种属于 AGC (PKA/PKG/PKC) 丝氨酸-苏氨酸激酶家族的激酶^[20],是 RhoA 的下游靶效应分子,它主要通过作用于细胞骨架而参与调节细胞的形状和运动^[21]。已发现大鼠 ROCK 是 Rho 的第一个效应物,它们通过使下游肌球蛋白轻链 MLC 的磷酸化来诱导应激纤维的形成

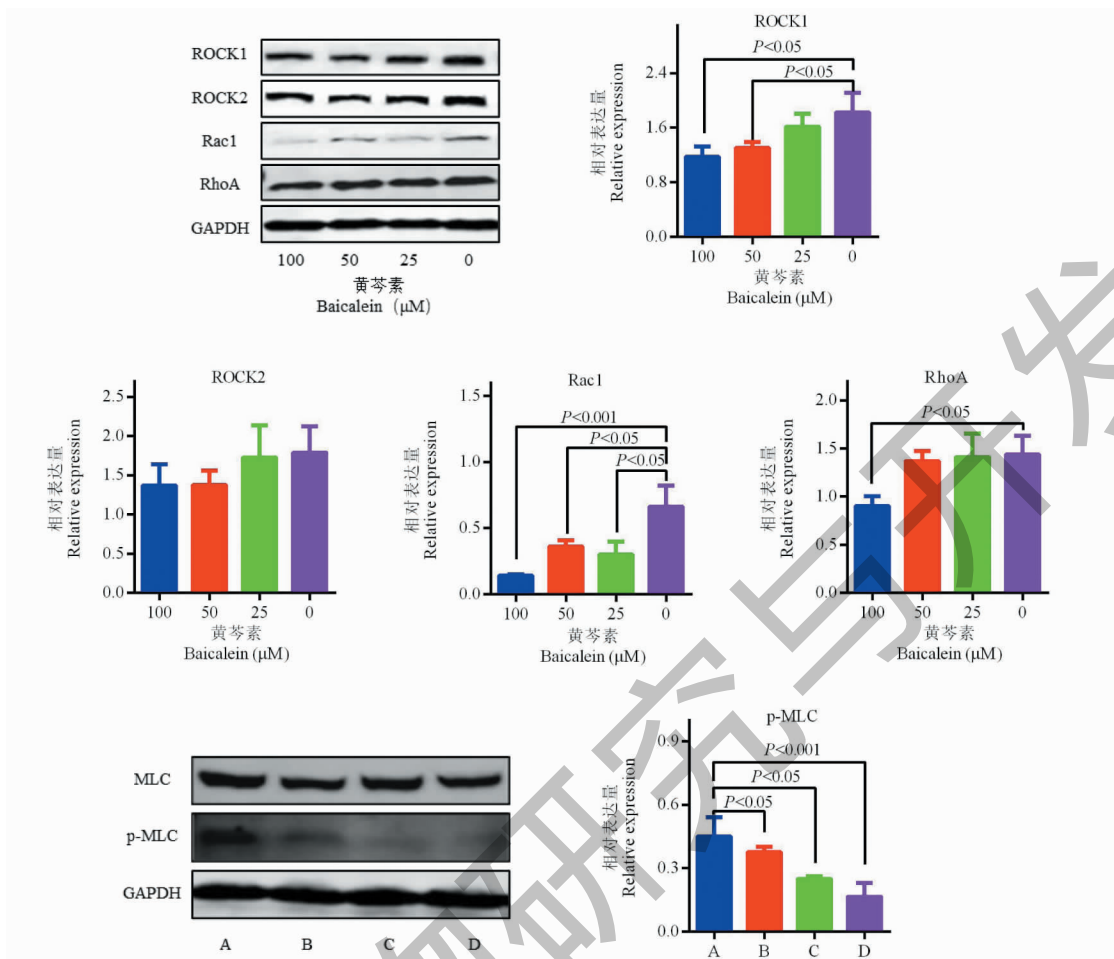


图 6 黄芩素和 Y-27632 对 MDA-MB-231 细胞蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of baicalein and Y-27632 on protein expression of MDA-MB-231 cells

和粘着斑^[22],目前已经鉴定出两个小鼠 ROCK 同工型 ROCK1 和 ROCK2。我们实验发现黄芩素同 ROCK 的特异性抑制剂 Y-27632 单用或联合应用能够改变细胞的骨架重组,抑制细胞迁移,同时抑制 ROCK1、Rac1 和 RhoA 的蛋白表达水平,并且抑制 MLC 的磷酸化。这表明黄芩素抑制癌细胞迁移可能与 Rho-ROCK-MLC 通路相关。

综上,黄芩素能够抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 异种移植瘤裸鼠的肿瘤生长和肺转移,且无明显肝肾毒性。而且,黄芩素可能是通过调节 Rho-ROCK-MLC 通路,影响细胞骨架蛋白表达,从而抑制乳腺癌细胞迁移。

参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- 2 Li L, Jiang SH. Experimental research progress of Chinese

medicine intervention on breast cancer[J]. Tradit Chin Med Res(中医研究), 2015, 28(4): 71-73.

- 3 Bie B, Sun J, Guo Y, et al. Baicalein: A review of its anti-cancer effects and mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 1285-1291.
- 4 Wu JY, Tsai KW, Li YZ, et al. Anti-bladder-tumor effect of baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application *in vivo* [J]. Evid-based Compl Alt, 2013, 2013: 579751.
- 5 Yan WJ, Zhang SQ. Inhibition mechanism of baicalein on the liver metastasis of breast cancer cell *in vivo* [J]. Pract J Cancer(实用癌症杂志), 2018, 33(12): 5-9.
- 6 Yan WJ, Ma XC, Gao XY, et al. Research progress in the correlation between baicalein and the invasion and metastasis of breast cancer[J]. J Mod Oncol(现代肿瘤医学), 2016, 24: 491-494.
- 7 Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ, et al. Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK [J]. Gastroenterology, 2014, 147: 196-208.

- 8 Qi RF, Shi RL, Lv J, et al. Curcumin combined with paclitaxel can reduce breast cancer MDA-MB-231 cell migration synergistically and reduce MMP9 expression in vitro and in vivo[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2016, 32(1): 83-85.
- 9 Rui X, Yan XI, Zhang K. Baicalein inhibits the migration and invasion of colorectal cancer cells via suppression of the AKT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 685.
- 10 Guo J, You H, Li D. Baicalein exerts anticancer effect in nasopharyngeal carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*, 2019, 27: 601-611.
- 11 Chen DH, Deng YR, Mou JJ, et al. Structural modification and antitumor activity of baicalein [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1258-1264.
- 12 Wang XF, Zhou QM, Su SB, et al. Experimental study on the inhibition of baicalein on invasion and migration of human breast cancer cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26: 745-750.
- 13 Yan WJ, Ma XC, Gao XY, et al. Inhibition mechanism of baicalein on the lung metastasis of breast cancer cell *in vivo* [J]. *J Cancer Control Treat* (肿瘤预防与治疗), 2015, 28: 310-316.
- 14 Yang R, Li Z, Li ZY, et al. Macrophage colony stimulating factor mediates macrophage migration in triple negative breast cancer through RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Chin Remed Clin* (中国药物与临床), 2019, 19: 1786-1788.
- 15 Geiger B, Zaidel-Bar R, Rao MV. The molecular architecture of cell-cell adhesions [J]. *Encycl Cell Biol*, 2016: 181-191.
- 16 Gao ML, Lin ZH, Xu YJ, et al. Effect of baicalein on proliferation and migration of breast cancer cell MDA-MB-231 *in vitro* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2013, 24: 1389-1390.
- 17 Rosenthal DT, Iyer H, Escudero S, et al. p38 γ promotes breast cancer cell motility and metastasis through regulation of RhoC GTPase, cytoskeletal architecture, and a novel leading edge behavior [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 6338-6349.
- 18 Xiang RF, Stack D, Huston SM, et al. Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) and Src family kinases (SFK) are proximal and essential for phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation in natural killer (NK) cell-mediated direct cytotoxicity against *cryptococcus neoformans* [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 6912-6922.
- 19 Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 522-529.
- 20 Hahmann C, Schroeter T. Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 171-177.
- 21 Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 446-456.
- 22 Gao J, Su XB, Lin SY, et al. Inhibitory effects of Kiss-1 gene on metastasis of HCT116 human colorectal carcinoma cells via down-regulating mitogen activated protein kinase signal transduction pathway [J]. *Chin J Exp Surg* (中华实验外科杂志), 2016, 33: 1988-1992.
-
- (上接第 553 页)
- 20 Franziska B, Patricia G. PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms [J]. *Theranostics*, 2014, 4: 336-365.
- 21 Shi J, Zhang W, He L, et al. Jinlong capsule inhibits migration and invasion in human glioblastoma cells via the modulation of mTOR/S6 signaling pathway [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2019, 13: 1023-1032.
- 22 Wang X, Pang FH, Li FY. Review on the structural modification and biological activities of dehydroabiatic acid [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1621-1625.
- 23 Deng XQ, Xiang ML, Jia R, et al. Progress in the design of selective ATP-competitive kinase inhibitor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42: 1232-1236.
- 24 Herbert TP, Tee AR, Proud CG. The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 11591-11596.
- 25 Han C, Li Y, Liu G. Drug-likeness: predication and practice [J]. *Prog Chem* (化学进展), 2008, 20: 1335-1344.