

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.01.007

· 基础研究 ·

银杏内酯B经PERK/ATF4/CHOP通路调控肝癌细胞增殖、迁移、凋亡和EMT

刘燕华¹, 王红娟¹, 鲍柏军¹, 朱隽雅¹, 易楠¹, 纪易斐¹, 黄伟¹, 张莉¹, 刘国良²(1. 南通大学附属医院 消化内科, 江苏 南通 226000; 2. 盐城市第三人民医院暨南通大学第六附属医院 消化内科, 江苏 盐城 224000)

[摘要] **目的:** 探究银杏内酯B(GKB)调控蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/转录激活子4(ATF4)/C/EBP同源蛋白(CHOP)信号通路对肝癌细胞增殖、迁移、凋亡和上皮间质转化(EMT)的影响。**方法:** 将人肝癌细胞MHCC-97H随机分为对照组、GKB组、GSK2656157(PERK抑制剂)组和GKB + GSK2656157组,以GKB和GSK2656157分别干预后,采用MTT法和EdU染色检测各组细胞的增殖活性及增殖率,划痕愈合实验、流式细胞术分别检测各组细胞的迁移及凋亡水平,WB法检测各组细胞中EMT和PERK/ATF4/CHOP信号通路相关蛋白的表达水平。构建MHCC-97H细胞裸鼠移植瘤模型,以同法分组及药物干预后测定各组移植瘤体积,采用免疫组化、TUNEL染色分别检测各组肿瘤细胞增殖、凋亡水平,WB法检测各组移植瘤组织中EMT和PERK/ATF4/CHOP信号通路相关蛋白的表达水平。**结果:** 与对照组比较,GKB组细胞活性、增殖率、迁移率、移植瘤体积、Ki-67阳性细胞率、MMP2、N-cadherin与MMP9蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率、TUNEL阳性细胞率、p-PERK/PERK与E-cadherin、ATF4、CHOP蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$);GSK2656157组各指标变化与GKB组相反(均 $P < 0.05$)。与GKB组比较,GKB + GSK2656157组细胞活性、增殖率、迁移率、移植瘤体积、Ki-67阳性细胞率、MMP2、N-cadherin与MMP9蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率、TUNEL阳性细胞率、p-PERK/PERK与E-cadherin、ATF4、CHOP蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。**结论:** GKB可通过激活PERK/ATF4/CHOP信号通路抑制肝癌MHCC-97H细胞增殖、迁移和EMT并促进其凋亡。

[关键词] 银杏内酯B;蛋白激酶R样内质网激酶/转录激活子4/C/EBP同源蛋白通路;肝癌;增殖;迁移;凋亡;上皮间质转化

[中图分类号] R735.7;R730.52;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026)01-0051-08

Ginkgolide B regulates the proliferation, migration, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of liver cancer cells through the PERK/ATF4/CHOP pathway

LIU Yanhua¹, WANG Hongjuan¹, BAO Bojun¹, ZHU Junya¹, YI Nan¹, JI Yifei¹, HUANG Wei¹, ZHANG Li¹, LIU Guoliang² (1. Department of Gastroenterology, Nantong University Affiliated Hospital, Nantong 226000, Jiangsu, China; 2. Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital of Yancheng City & the Sixth Affiliated Hospital of Nantong University, Yancheng 224000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of ginkgolide B (GKB) on the proliferation, migration, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of liver cancer cells by regulating the protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/activating transcription factor 4 (ATF4)/C/EBP homologous protein (CHOP) signaling pathway. **Methods:** Human liver cancer cells MHCC-97H were randomly assigned into the control group, the GKB group, the GSK2656157 (PERK inhibitors) group, and the GKB + GSK2656157 group. After intervention with GKB and PERK inhibitors GSK2656157 on different groups, MTT assay and EdU staining were used to detect the proliferation activity and proliferation rate of cells in each group. Scratch assay and flow cytometry were used to detect the migration and apoptosis of cells in each group, respectively. Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of EMT and PERK/ATF4/CHOP signaling pathway related proteins in each group. The MHCC-97H nude mouse transplant tumor model was constructed, and the tumor volumes of each group were measured after grouping and drug intervention. Immunohistochemistry and TUNEL staining were used to detect the proliferation and apoptosis of tumor cells in each group. In addition, WB was used to detect the expression levels of EMT and PERK/ATF4/CHOP signaling pathway related proteins in transplant

[基金项目] 南通市自然科学基金和社会民生计划项目(MSZ2023077)

[作者简介] 刘燕华, 硕士, 主治医师

[通信作者] 刘国良(扫码获取作者通信方式)



tumor tissues of each group. **Results:** Compared with those in the control group, the cell activity, proliferation rate, migration rate, tumor volume, Ki-67 positive cell ratio, and relative expressions of MMP2, N-cadherin, and MMP9 proteins decreased significantly in the GKB group (all $P < 0.05$), while the apoptosis rate, TUNEL positive cell ratio, and the expressions of p-PERK/PERK, E-cadherin, ATF4, and CHOP proteins increased significantly (all $P < 0.05$). The changes in various indicators in the GSK2656157 group were the opposite of those in the GKB group (all $P < 0.05$). Compared with those in the GKB group, the cell activity, proliferation rate, migration rate, tumor volume, Ki-67 positive cell ratio, and expressions of MMP2, N-cadherin, and MMP9 proteins increased significantly in the GKB + GSK2656157 group (all $P < 0.05$), while the apoptosis rate, TUNEL positive cell ratio, and the expressions of p-PERK/PERK, E-cadherin, ATF4, and CHOP proteins reduced significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion:** GKB can inhibit the proliferation, migration, and EMT of liver cancer MHCC-97H cells and promote their apoptosis by activating the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway.

[Key words] ginkgolide B (GKB); protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/activating transcription factor 4 (ATF4)/C/EBP homologous protein (CHOP) pathway; liver cancer; proliferation; migration; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(1): 51-58. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.01.007]

肝癌是最常见的肝脏恶性肿瘤之一,因早期常无症状,导致难以及时确诊治疗,患者病死率高,预后较差,对人民生命安全构成极大威胁^[1-2]。银杏内酯B(ginkgolide B, GKB)是一种天然二萜类化合物,具有明显的抗肿瘤活性:其可显著抑制人膀胱癌和食管癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[3-4],还能通过抑制血小板活化,降低血小板黏附能力及其对肿瘤细胞迁移的促进作用^[5]。蛋白激酶R样内质网激酶/转录激活子4/C/EBP同源蛋白(PERK/ATF4/CHOP)是重要的内质网应激调控信号,刺激其激活可诱导非小细胞肺癌细胞凋亡并降低其细胞活性^[6],能在体内抑制乳腺癌细胞增殖活力^[7],诱导抗辐射肝癌细胞凋亡和内质网应激并抑制上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[8],由此可知,PERK/ATF4/CHOP是肝癌的潜在治疗靶标。本研究通过体外培养人肝癌MHCC-97H细胞并构建其裸鼠移植瘤模型,基于PERK/ATF4/CHOP信号通路探究GKB对肝癌细胞增殖、迁移、凋亡和EMT的影响,旨在为肝癌临床治疗提供新的理论依据与潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物及主要试剂

人肝癌细胞MHCC-97H(货号IM-H045)、Hep3B(货号IM-H367)、HepG2(货号IM-H038)均购自厦门逸漠生物科技有限公司,正常人肝细胞L02(货号TW34729)购自上海通蔚实业有限公司。

SPF级、6周龄、体质量(20±1)g的BALB/c-nu雄性裸鼠购自南通大学[生产许可证号:SCXK(苏)2023-0021],饲养于南通大学实验动物中心[使用许可证号:SYXK(苏)2022-0046],室温(23±2)°C,相对湿度(60±5)%,光照周期12h光/12h暗循环。本研究符合南通大学实验动物伦理委员会的审批要求(伦理批号:S20240412-001)。

GKB(对照品,批号E-0008,HPLC纯度≥98%)购自上海同田生物技术有限公司,PERK抑制剂GSK2656157(批号V0060,纯度≥98%)购自美国InvivoChem公司,MTT检测试剂盒(货号ab211091)、Hoechst 33342试剂(货号ab228551)、EdU检测试剂盒(货号ab219801)、TUNEL检测试剂盒-辣根过氧化物酶(HRP)-DAB(货号ab206386)、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(货号ab14085)、兔抗人MMP2(货号ab92536)、N-cadherin(货号ab76011)、MMP9(货号ab137867)、β-actin(货号ab8227)、PERK(货号ab229912)、E-cadherin(货号ab227639)、ATF4(货号ab270980)与CHOP(货号ab11419)一抗HRP-驴抗兔二抗(货号ab6721)、Alexa Fluor®-488山羊抗兔二抗(货号ab150077)均购自英国Abcam公司,兔抗人p-PERK(货号AP328)一抗购自上海碧云天生物技术有限公司,兔SP免疫组化试剂盒(货号SP0021)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 细胞培养

肝癌MHCC-97H、Hep3B、HepG2细胞及L02细胞于39°C温水浴内快速解冻后在DMEM培养基(89%DMEM+10%胎牛血清+1%青链霉素)中培养。培养条件:气相95%空气+5%CO₂、温度37°C、湿度95%,传代比例:1:2~1:3,每2d换液1次。

1.3 MTT法筛选GKB的最佳作用浓度

将传代2次的MHCC-97H、Hep3B、HepG2与L02细胞接种在96孔板,均用0、25、50、100、200、300 mg/L GKB处理细胞24 h及48 h^[9],以0 mg/L GKB处理组为对照组,同时设置不接种细胞(只加入等量培养基)的空白对照组,以10 μL/孔的量添加MTT工作液,处理2 h后用DMSO溶解结晶体,置于酶标仪内振荡混匀后,在波长490 nm处测定细胞的光密度(D)值,分析获取各组细胞的活性。细胞活性=(GKB处理组D值-空白对照组D值)/(对照组D值-空白对照组D值)×100%。

1.4 细胞分组与药物干预

将传代2次的MHCC-97H细胞接种在24孔板中,分为4组(6孔/组):对照组(未处理细胞)、GKB组(100 mg/L GKB处理)、GSK2656157组(1 μmol/L GSK2656157处理)、GKB+GSK2656157组(100 mg/L GKB+1 μmol/L GSK2656157处理)。各组细胞均干预48 h后进行后续功能实验。

1.5 MTT法和EdU染色检测MHCC-97H细胞的增殖能力

MTT法:将传代2次的MHCC-97H细胞接种在96孔板中,接种密度约为 1×10^3 个/孔,按“1.4”中方法分组干预后以10 μL/孔的量添加MTT工作液,以“1.3”中MTT法检测各组细胞活性。

EdU染色:取各组对数生长期MHCC-97H细胞,加入10 μmol/L EdU试剂作用2.5 h,弃培养基后用4%多聚甲醛固定2 h,按EdU检测试剂盒操作说明行EdU染色,在Hoechst 33342溶液中染细胞核10 min,洗涤细胞后,于荧光显微镜下观察、拍照、计数细胞,按照公式“细胞增殖率=细胞EdU阳性数/细胞总数 $\times 100\%$ ”计算各组细胞增殖率。

1.6 划痕愈合实验检测MHCC-97H细胞的迁移能力

选取各组对数生长期MHCC-97H细胞,消化后制为单细胞悬液,以 5×10^5 个/mL的密度接种在24孔板中,待细胞贴壁后划痕,镜下观察、拍照、定量划痕面积(记为 S_{0h}),将各组细胞培养24 h后再次镜下观察、拍照、定量划痕面积(记为 S_{24h}),按照公式“细胞迁移率= $(S_{0h} - S_{24h})/S_{0h} \times 100\%$ ”计算各组细胞迁移率。

1.7 流式细胞术检测MHCC-97H细胞的凋亡水平

选取各组对数生长期MHCC-97H细胞,消化后制为单细胞悬液,以 5×10^5 个/mL的密度分别滴加5 μL Annexin V-FITC和2.5 μL PI,避光处理15 min后清洗细胞,上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡水平,采用Flow Jo软件分析各组细胞凋亡率。

1.8 WB法检测MHCC-97H细胞EMT和PERK/ATF4/CHOP通路相关蛋白的表达水平

选取各组对数生长期MHCC-97H细胞,用RIPA裂解液裂解细胞并提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度后进行煮沸变性。每组取等量蛋白,以20 μg/孔上样、电泳(120 V、2 h)与全湿电转(100 V、1.5 h),分离转印后的蛋白进行封闭后,依次在MMP2(1:2 000)、N-cadherin(1:1 000)、MMP9(1:1 000)、β-actin(1:2 000)、p-PERK(1:2 000)、PERK(1:1 000)、E-cadherin(1:2 000)、ATF4(1:1 000)、CHOP(1:2 000)、β-actin(1:2000)一抗中4℃处理过夜。清洗后,在山羊抗兔二抗(1:1 000)中37℃下处理3 h。采用化学发光法对各组蛋白进行显色,然后拍摄其

图像,运用ImageJ软件定量蛋白灰度值,按照公式“蛋白相对表达=检测蛋白灰度值/β-actin蛋白灰度值”计算各组蛋白相对表达水平。

1.9 MHCC-97H细胞裸鼠移植瘤模型的制备、分组与药物干预

取传代2次的MHCC-97H细胞用PBS制为单细胞悬液,以 3×10^6 个(悬浮在0.2 mL PBS内)的量接种至裸鼠右前肢皮下,以构建移植瘤模型^[9]。待皮下瘤体长至50~100 mm³时,表示MHCC-97H裸鼠移植瘤模型造模成功。将24只造模成功的裸鼠随机分为对照组、GKB组、GSK2656157组、GKB+GSK2656157组,每组6只。

裸鼠造模成功后进行药物干预,GKB组裸鼠给予40 mg/kg GKB灌胃干预^[9],GSK2656157组裸鼠给予100 mg/kg GSK2656157灌胃干预^[10],GKB+GSK2656157组裸鼠给予40 mg/kg GKB和100 mg/kg GSK2656157联合灌胃干预,药物均溶于生理盐水且干预体积均为10 mL/kg,GKB每天干预1次,GSK2656157每周干预2次,对照组裸鼠给予10 mL/kg生理盐水灌胃干预,持续干预2周。

1.10 移植瘤体积的测定、标本采集及处理

药物干预14 d后,将各组裸鼠安乐死,剥离皮下移植瘤并拍照,测量最长径(长度)和最短径(宽度),按照公式“长度 \times 宽度 $\div 2$ ”计算移植瘤体积。

冰上剪取约270 mg新鲜移植瘤组织,置于RIPA裂解液内0℃下匀浆提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,将蛋白样品液存在-80℃。剩余移植瘤组织以OCT包埋剂完全浸没,液氮速冻成块后。修整后进行冰冻切片,切成5 μm厚片备用。

1.11 免疫组化与TUNEL染色检测MHCC-97H细胞的增殖与凋亡水平

免疫组化染色:以3% H_2O_2 清除组织切片中内源性过氧化物酶,在5%山羊血清中室温封闭120 min,滴加Ki-67一抗(1:100)4℃下处理12 h。按兔SP试剂盒说明书步骤进行免疫组化染色。洗涤切片后,显微镜下观察、拍照、计数Ki-67阳性细胞与总肿瘤细胞,依据公式“Ki-67阳性细胞率=Ki-67阳性细胞数/总肿瘤细胞数 $\times 100\%$ ”计算各组Ki-67阳性细胞率。

TUNEL染色:固定后的移植瘤组织切片后,按TUNEL检测试剂盒操作说明行TUNEL染色,洗涤后用苏木精染细胞核后,再次洗涤后在显微镜下观察、拍照、计数凋亡细胞,按照公式“TUNEL阳性细胞率=TUNEL阳性细胞数/总肿瘤细胞数 $\times 100\%$ ”计算各组TUNEL阳性细胞率。

1.12 WB法检测移植瘤组织中EMT和PERK/ATF4/CHOP通路相关蛋白的表达水平

取存在-80℃的肿瘤组织蛋白样品液,以WB法

检测各组移植瘤组织中 EMT 和 PERK/ATF4/CHOP 信号通路相关蛋白的表达水平,其实验方法同“1.8”。

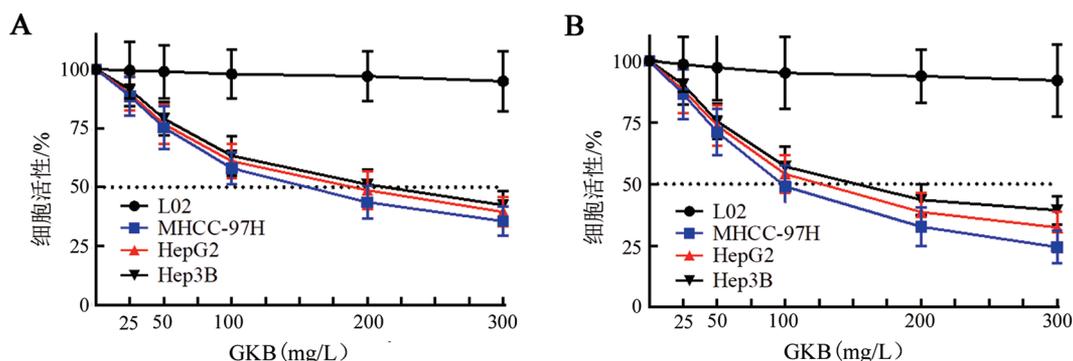
1.13 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用 SPSS26.0 软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GKB 抑制 MHCC-97H 细胞活性

MTT 法检测结果(图1)显示,与 0 mg/L GKB 比较,25、50、100、200、300 mg/L GKB 处理 MHCC-97H、Hep3B、HepG2 细胞活性均随 GKB 浓度的升高而逐渐降低(均 $P < 0.05$),而对 L02 细胞活性无明显影响(均 $P > 0.05$)。MHCC-97H 细胞对 GKB 较为敏感,且其 GKB 干预 24 h 时半数抑制浓度(IC_{50})为 151.32 mg/L,干预 48 h 时 IC_{50} 为 97.14 mg/L 且接近 100 mg/L,后续实验选择 MHCC-97H 细胞,并以 100 mg/L GKB 干预 48 h。



A: 24 h 时细胞活性; B: 48 h 时细胞活性。与 0 mg/L GKB 比较, * $P < 0.05$ 。

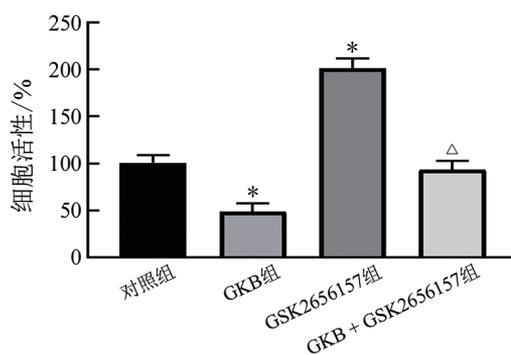
图1 MTT 法检测不同浓度 GKB 对肝癌细胞与 L02 细胞活性的影响

2.2 GKB 抑制 MHCC-97H 细胞的增殖、迁移能力并诱导其凋亡

MTT 法(图2)、EdU 染色(图3A)、划痕愈合实验(图3B)、流式细胞术(图3C)检测结果显示,与对照组比较,GKB 组细胞活性、增殖率、迁移率均显著降低(均 $P < 0.05$),凋亡率显著升高($P < 0.05$); GSK2656157 组细胞活性、增殖率、迁移率均显著升高(均 $P < 0.05$),凋亡率显著降低($P < 0.05$)。与 GKB 组相比,GKB + GSK2656157 组细胞活性、增殖率、迁移率均显著升高(均 $P < 0.05$),凋亡率显著降低($P < 0.05$)。结果表明,GKB 可显著抑制细胞活性、增殖与迁移并促进凋亡,而 GSK2656157 则呈现相反作用;两者联用后,GSK2656157 能够逆转 GKB 的抑制效应。

2.3 GKB 抑制 MHCC-97H 细胞 EMT 进程

WB 法检测结果(图4A):与对照组比较,GKB 组细胞中 MMP2、N-cadherin、MMP9 蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达显著升高($P < 0.05$); GSK2656157 组细胞中 MMP2、N-cadherin、MMP9 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。与 GKB 组比较,GKB + GSK2656157 组细胞中 MMP2、N-cadherin、MMP9 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。结果表明,GKB 抑制 MHCC-97H 细胞 EMT 相关蛋白的表达并上调 E-cadherin,而 GSK2656157 则可逆转此效应。

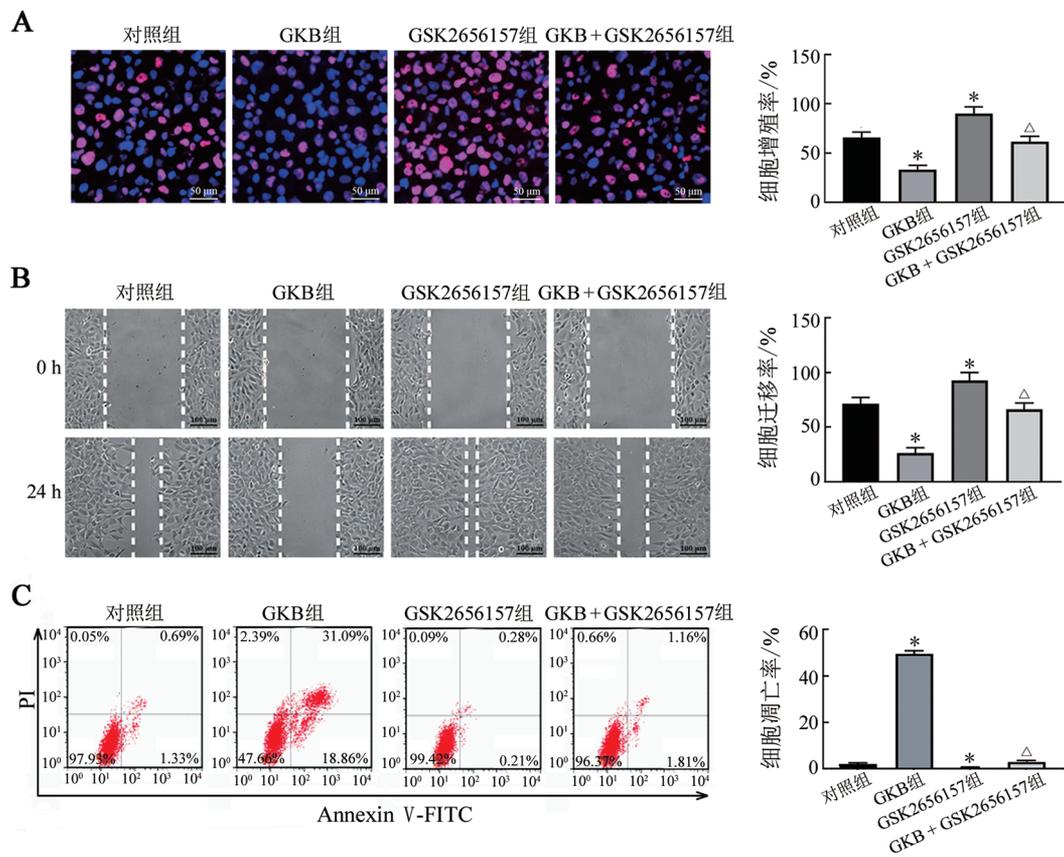


与对照组比较,* $P < 0.05$;与 GKB 组相比, ^ $P < 0.05$ 。

图2 各组 MHCC-97H 细胞活性

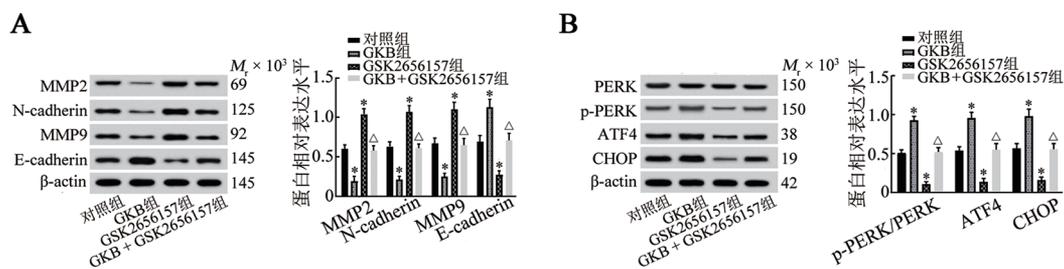
2.4 GKB 激活 MHCC-97H 细胞 PERK/ATF4/CHOP 信号通路

WB 法检测结果(图4B)显示,与对照组比较,GKB 组细胞中 p-PERK/PERK 与 ATF4、CHOP 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$); GSK2656157 组细胞中 p-PERK/PERK 与 ATF4、CHOP 蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$)。与 GKB 组比较,GKB + GSK2656157 组细胞中 p-PERK/PERK 与 ATF4、CHOP 蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,GKB 可激活 MHCC-97H 细胞 PERK/ATF4/CHOP 信号通路,而 GSK2656157 则可逆转此效应。



A: EdU染色检测细胞增殖率; B: 划痕愈合实验检测细胞迁移率($\times 200$); C: 流式细胞术检测细胞凋亡率。与对照组比较, $*P < 0.05$; 与GKB组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图3 GKB及GSK2656157对MHCC-97H细胞增殖、迁移及凋亡的影响



A: EMT相关蛋白的表达; B: PERK/ATF4/CHOP信号通路相关蛋白表达。与对照组比较, $*P < 0.05$; 与GKB组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图4 WB法检测MHCC-97H细胞EMT及PERK/ATF4/CHOP信号通路相关蛋白的表达

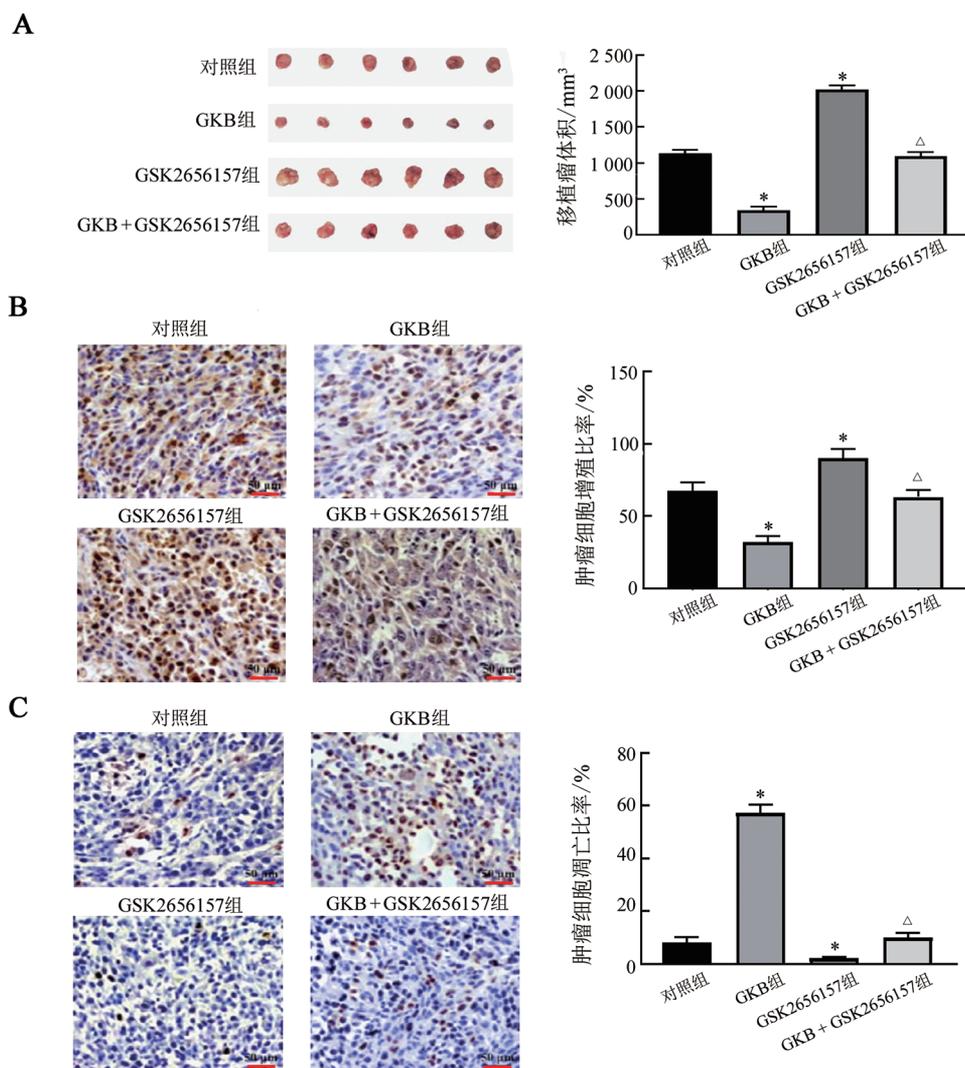
2.5 GKB抑制MHCC-97H裸鼠移植瘤生长、增殖并促进凋亡

成功建成MHCC-97H细胞裸鼠移植瘤模型(图5)。与对照组比较,GKB组移植瘤体积与Ki-67阳性细胞率均显著降低(均 $P < 0.05$),TUNEL阳性细胞率显著升高($P < 0.05$);GSK2656157组移植瘤体积与Ki-67阳性细胞率均显著升高(均 $P < 0.05$),TUNEL阳性细胞率显著降低($P < 0.05$);与GKB组比较,GKB + GSK2656157组移植瘤体积与Ki-67阳性细胞率显著升高(均 $P < 0.05$),TUNEL阳性细胞率显著降低($P < 0.05$)。结果表明,GKB可显著抑制裸鼠移植瘤生长与肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡,而GSK2656157则呈现相反作用。两者联用后,

GSK2656157能够逆转GKB的抑制效应。

2.6 GKB抑制MHCC-97H裸鼠移植瘤EMT进程

WB法检测结果(图6A)显示,与对照组比较,GKB组移植瘤组织中MMP2、N-cadherin和MMP9蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$),E-cadherin蛋白表达显著升高($P < 0.05$);GSK2656157组移植瘤组织中MMP2、N-cadherin和MMP9蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),E-cadherin蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。与GKB组比较,GKB + GSK2656157组移植瘤组织中MMP2、N-cadherin和MMP9蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),E-cadherin蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。结果表明,GKB显著抑制裸鼠移植瘤组织EMT相关蛋白的表达并上调E-cadherin,而GSK2656157则可逆转此效应。



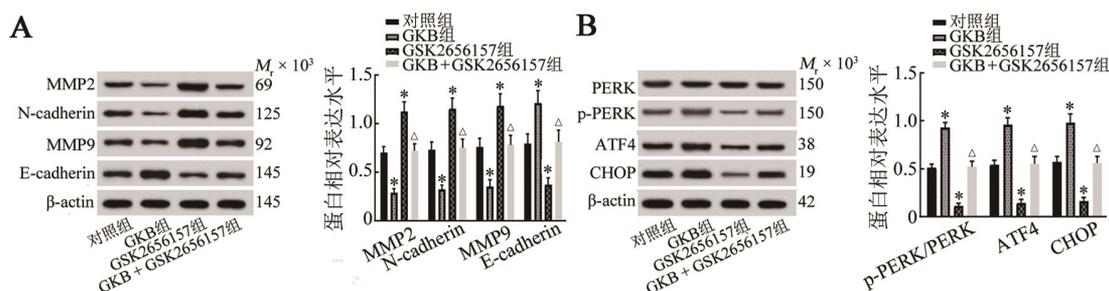
A: 移植瘤的大小及体积; B: 免疫组化染色检测移植瘤组织中肿瘤细胞增殖情况; C: TUNEL 染色检测移植瘤组织中肿瘤细胞凋亡情况。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GKB 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

图5 GKB对MHCC-97H细胞移植瘤生长与肿瘤细胞增殖及凋亡的影响

2.7 GKB激活MHCC-97H裸鼠移植瘤PERK/ATF4/CHOP信号通路

WB法检测结果(图6B)显示,与对照组比较,GKB组移植瘤组织中p-PERK/PERK与ATF4、CHOP蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$);GSK2656157组移植瘤组织中p-PERK/PERK与ATF4、CHOP蛋白表达

均显著降低(均 $P < 0.05$)。与GKB组比较,GKB + GSK2656157组移植瘤组织中p-PERK/PERK与ATF4、CHOP蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,GKB可激活裸鼠移植瘤组织PERK/ATF4/CHOP信号通路,而GSK2656157则可逆转此效应。



A: EMT 相关蛋白的表达水平; B: PERK/ATF4/CHOP 信号通路相关蛋白表达水平。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GKB 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

图6 WB法检测裸鼠移植瘤组织EMT及PERK/ATF4/CHOP信号通路相关蛋白表达

3 讨论

手术干预是肝癌的常见治疗手段,辅助全身化疗、分子靶向治疗、免疫治疗等可提升患者生存率,但因药物毒副作用与耐药性、肿瘤复发与转移等问题的存在,很多患者治疗效果难以达到预期,因此亟待探寻新的治疗方案^[12-13]。近期研究表明,中草药及其单体在肝癌的治疗中得到越来越多的应用^[14],GKB是银杏叶中含有的一类重要活性成分,作为迄今发现的最强血小板活化因子拮抗剂,其可通过抑制血小板活化因子受体增强口腔鳞状细胞癌的顺铂敏感性、促进细胞凋亡^[15],并可通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭与诱导细胞凋亡而抑制人肺癌和结肠癌细胞的恶性生物学行为^[16-17],但GKB对肝癌的作用机制目前仍未阐明。本研究结果显示,GKB可降低MHCC-97H细胞活性、增殖率、迁移率并提高细胞凋亡率,表明GKB可抑制肝癌细胞体外增殖与迁移并诱导细胞凋亡;移植瘤裸鼠实验证实GKB可抑制肝癌细胞的体内增殖并促进细胞凋亡,进而抑制肝癌裸鼠移植瘤生长;体内外WB法实验结果显示GKB可在体内外抑制肝癌细胞EMT进程。此外,GKB在一定浓度范围内对正常肝细胞无毒性。与前人研究相比,本研究证实了GKB可抑制肝癌细胞增殖、迁移、EMT和体内肿瘤生长,促进其凋亡,最终对肝癌细胞起到显著抗癌功效,且较为安全。

PERK是一种位于内质网膜的I型穿膜蛋白激酶,主要与氧化应激、自噬、蛋白质折叠、氨基酸合成和细胞分化有关,在肿瘤进展过程中PERK被磷酸化激活,通过精细的调控机制特异性增强转录因子ATF4过表达,进而促进CHOP蛋白的上调,并可通过激活内质网应激促进癌细胞凋亡^[6-7]。PERK/ATF4/CHOP信号通路可通过调控内质网应激与细胞凋亡而介导恶性肿瘤发生发展过程,提高该信号通路蛋白表达可抑制肺癌移植瘤小鼠肿瘤生长^[18],并可通过阻碍肝细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭而抑制其恶性进展^[19],激活PERK/ATF4/CHOP信号转导可显著促进肝细胞癌凋亡与内质网应激,降低细胞的增殖和迁移能力^[20]。为了探究PERK/ATF4/CHOP信号通路在GKB的抗肝癌过程中的作用,本文通过WB法实验对此进行了探讨,结果显示,GKB可在体内外增强PERK磷酸化与E-cadherin、ATF4、CHOP蛋白表达,表明PERK/ATF4/CHOP信号通路参与介导GKB对肝癌细胞的抗肿瘤作用,而使用PERK抑制剂GSK2656157在体内外抑制PERK/ATF4/CHOP信号通路激活,可起到与GKB相反的促癌作用。拯救实验结果显示,以GKB和PERK抑制剂GSK2656157联

合干预MHCC-97H细胞与其移植瘤裸鼠,可减弱GKB单独干预对肝癌细胞体内外增殖、EMT与体内肿瘤生长的抑制作用,拮抗其对肝癌细胞体外迁移能力的降低作用,消除其对肝癌细胞体内外凋亡的促进作用,最终表明GSK2656157可降低GKB对肝癌细胞的抗癌功效。与前人研究相比,本研究证实了GKB是通过激活PERK信号而抑制肝癌细胞增殖、迁移和EMT并促进其凋亡的。本研究尚存在一定局限性,首先是GKB调控PERK/ATF4/CHOP信号通路的前期依据、具体机制本文尚未涉及,需要后续进行高通量筛选、生信分析或网络药理学与分子对接实验进行深入探索;另外,PERK信号通路的下游调控机制尚未阐明,还需通过基因干扰进行拯救实验来进一步验证。

综上所述,GKB可抑制肝癌细胞的体内增殖与EMT进程,延缓肝癌细胞裸鼠移植瘤生长,降低肝癌细胞迁移能力并诱导其凋亡,激活PERK/ATF4/CHOP信号通路可能是GKB对肝癌细胞起到以上抗肿瘤作用的药理机制之一。本研究证实了GKB对肝癌具有治疗潜力,为其在肝癌临床治疗中的研发应用提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] TAN E Y, DANPANICHKUL P, YONG J N, et al. Liver cancer in 2021: global burden of disease study[J]. *J Hepatol*, 2025, 82(5): 851-860. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.10.031.
- [2] 刘傅言, 危晏平, 付靖波, 等. 早期肝癌相关抗原CTAG1A在肝细胞癌组织与细胞中的表达及其细胞毒性T淋巴细胞抗原表位鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2025, 32(3): 270-280. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.006.
- [3] 庞华, 智静涛, 边建华, 等. 银杏内酯B对膀胱癌J82细胞增殖、凋亡的机制研究[J]. *现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2024, 16(1): 41-48. DOI: 10.3870/j.issn.1674-4624.2024.01.008.
- [4] 殷星, 侯永超, 杨利姣, 等. 银杏内酯B调控JAK2/STAT3信号通路对食管癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. *激光生物学报*, 2024, 33(2): 185-192. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2024.02.011.
- [5] 薛昌雯, 邵小宝, 陈鑫, 等. 银杏内酯B抑制血小板与肿瘤细胞相互作用的实验研究[J]. *临床输血与检验*, 2024, 26(2): 205-212. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2024.02.008.
- [6] LI D L, LIU L P, LI F, et al. Nifuroxazide induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer cells through the endoplasmic reticulum stress PERK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2023, 25(6): 248. DOI: 10.3892/ol.2023.13834.
- [7] WU Q Y, ZHOU D F, SHEN Z Z, et al. VPS34-IN1 induces apoptosis of ER+ breast cancer cells via activating PERK/ATF4/CHOP pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 214: 115634. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115634.
- [8] KIM T W. Fisetin, an anti-inflammatory agent, overcomes radioresistance by activating the PERK-ATF4-CHOP axis in liver cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 9076. DOI: 10.3390/

- ijms24109076.
- [9] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯B通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的恶性生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004.
- [10] 伍梦思, 刘华, 谭年花, 等. 鳖甲煎丸调控EGFR/MAPK/ERK通路对MHCC-97H肝癌细胞的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 394-406. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2024.03.014.
- [11] LI Z X, GE Y, DONG J, et al. BZW1 facilitates glycolysis and promotes tumor growth in pancreatic ductal adenocarcinoma through potentiating eIF2 α phosphorylation[J]. Gastroenterology, 2022, 162(4): 1256-1271. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.12.249.
- [12] XU J, LIU Y. Nanomaterials for liver cancer targeting: research progress and future prospects[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1496498-1496517. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1496498.
- [13] JAIN A, MISHRA A K, HURKAT P, et al. Navigating liver cancer: precision targeting for enhanced treatment outcomes[J]. Drug Deliv Transl Res, 2025, 15(6): 1935-1961. DOI: 10.1007/S13346-024-01780-X.
- [14] ISLAM M R, RAUF A, ALASH S, et al. A comprehensive review of phytoconstituents in liver cancer prevention and treatment: targeting insights into molecular signaling pathways[J]. Med Oncol, 2024, 41(6): 134. DOI: 10.1007/s12032-024-02333-5.
- [15] KAWASAKI K, KASAMATSU A, ANDO T, et al. Ginkgolide B regulates CDDP chemoresistance in oral cancer *via* the platelet-activating factor receptor pathway[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(24): 6299. DOI: 10.3390/cancers13246299.
- [16] 靳彩玲, 赵树鹏, 姬颖华, 等. 银杏内酯B通过MMP9/STAT3信号通路对肺癌细胞A549增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响[J]. 中医药信息, 2022, 39(1): 19-23,28. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20220104.
- [17] 孙小虎, 于洪, 王璐, 等. 银杏内酯B对人结肠癌SW480细胞恶性生物学行为及ROS/XIAP信号通路的影响[J]. 中国药业, 2022, 31(12): 60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.014.
- [18] ZHENG X, YANG L, ZHAI W, et al. Synergistic anticancer activity of cisplatin combined with tannic acid enhances apoptosis in lung cancer through the PERK-ATF4 pathway[J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 462. DOI: 10.1186/s40001-023-01420-z.
- [19] ZHEN Z L, SHEN Z M, SUN P L. Downregulation of Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) inhibits the progression of hepatocellular carcinoma cells by activating the endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 9467-9481. DOI: 10.1080/21655979.2022.2060778.
- [20] SHI Y K, MA J, CHEN K E, et al. Konjac glucomannan enhances 5-FU-induced cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells *via* TLR4/PERK/CHOP signaling to induce endoplasmic reticulum stress[J]. Oncol Res, 2023, 30(4): 201-210. DOI: 10.32604/or.2022.027584.

[收稿日期] 2025-07-07

[修回日期] 2026-01-07

[本文编辑] 党瑞山