

水苏碱调节CXCL12/CXCR4轴对子宫内膜癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

刘影^{1,2*} 蔡悦¹

¹首都医科大学附属北京世纪坛医院药学部, 北京 100038;

²临床合理用药生物特征谱学评价北京市重点实验室, 北京 100038)

摘要 该研究主要探讨水苏碱(STA)对子宫内膜癌(EC)细胞增殖、侵袭和迁移的影响以及对CXCL12/CXCR4轴的调节机制。将EC细胞分为对照组(Control组)、CXCL12/CXCR4抑制剂组(AMD 3100组)、STA-L组(STA-L)、STA-H组(STA-H)、STA-H+CXCL12组。采用CCK-8检测细胞增殖情况;克隆形成实验检测细胞克隆能力;流式细胞术检测细胞凋亡情况;Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力;Western blot检测细胞中上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、CXCL12、CXCR4蛋白的表达情况;建立小鼠EC移植瘤模型并观察各组小鼠的肿瘤生长情况。结果发现与Control组相比,AMD 3100组和STA处理组细胞增殖活性、克隆数量、迁移和侵袭数以及Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白表达水平降低,细胞凋亡率和E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$);与STA-H组相比,STA-H+CXCL12组细胞的增殖活性、克隆数量、迁移和侵袭数以及Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白表达水平升高,细胞凋亡率和E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$);且体内实验AMD 3100组和STA处理组的肿瘤重量和体积均低于Control组($P<0.05$)。因此,水苏碱可以通过抑制CXCL12/CXCR4轴来抑制EC细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词 水苏碱;子宫内膜癌;CXCL12/CXCR4轴;增殖;迁移;侵袭

Impacts of Stachydrine on Proliferation, Migration and Invasion of Endometrial Carcinoma Cells by Regulating CXCL12/CXCR4 Axis

LIU Ying^{1,2*}, CAI Yue¹

¹Department of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

²Beijing Key Laboratory of Bio-characteristic Profiling for Evaluation of Rational Drug Use, Beijing 100038, China)

Abstract This study mainly discusses the impacts of STA (stachydrine) on proliferation, invasion and migration of EC (endometrial carcinoma) cells and the regulatory mechanism of STA on CXCL12/CXCR4 axis. EC cells were separated into control group, CXCL12/CXCR4 inhibitor group (AMD 3100 group), low and high concentration STA groups, and high STA+CXCL12 group. CCK-8 was applied to detect cell proliferation; clonogenic assay was applied to detect the ability of cell cloning; the apoptosis was detected by flow cytometry; Transwell assay was applied to detect the migration and invasion of cells; Western blot was applied to detect the expression of E-cadherin, Vimentin, CXCL12, CXCR4 in cells; the EC transplanted tumor model of mice was established and the tumor growth of mice in each group was observed. Results found, compared with the control group, the cell proliferation activity, clone number, migration and invasion numbers, and the expression of Vimentin, CXCL12, CXCR4

收稿日期: 2023-02-03 接受日期: 2023-03-20

*通讯作者。Tel: 13031099832, E-mail: liuying7574@bjsjth.cn

Received: February 3, 2023 Accepted: March 20, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-13031099832, E-mail: liuying7574@bjsjth.cn

proteins in AMD 3100 group and STA treatment group decreased, the apoptosis rate and the expression of E-cadherin protein increased ($P<0.05$); compared with the STA high concentration group, the cell proliferation activity, clone number, migration and invasion numbers, and the expression of Vimentin, CXCL12, CXCR4 proteins in high STA+CXCL12 group increased, the apoptosis rate and the expression of E-cadherin protein decreased ($P<0.05$); *In vivo* experiments, the tumor weight and volume of AMD 3100 group and STA treatment group were lower than those of Control group ($P<0.05$). Therefore, STA inhibits the proliferation, migration and invasion of EC cells by inhibiting CXCL12/CXCR4 axis.

Keywords stachydrine; endometrial carcinoma; CXCL12/CXCR4 axis; proliferation; migration; invasion

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,也是女性第四大常见癌症,其主要发生在高龄产妇中,但也会对尚未完成生育的年轻患者产生影响^[1]。目前EC的治疗方法包括手术、放疗、化疗和激素治疗,大多数EC患者被诊断为早期疾病且预后良好,但仍有部分患者预后较差,癌转移风险较高,常规疗法效果不佳^[2-3]。因此,迫切需要新的更有效且预后较好的治疗方法来阻止EC的发展和转移。随着紫杉醇、人参皂苷-Rg3等一些抗癌药物的出现,中医的治疗理念也逐渐被大家所接受。水苏碱(stachydrine, STA)是一种从益母草中分离出来的化学生物碱,具有抗炎、抗癌、心脏保护和改善脑缺血等多种药理活性^[4]。有研究发现,STA可以通过抑制CXCR4/ERK和CXCR4/Akt信号转导来抑制人毛细胞型星形细胞瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。但STA对EC的作用还尚不清楚。已知CXCR4是一种趋化因子受体,其配体是趋化因子基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1),也被称为CXCL12。两者均在肿瘤中广泛表达,且与细胞增殖和迁移有关^[6]。目前已有大量研究报告CXCL12/CXCR4轴可以促进结直肠癌、胃癌等多种癌细胞的增殖和转移,但CXCL12/CXCR4轴在EC细胞中的研究甚少^[7-8]。因此,基于以上描述,本研究旨在探讨STA是否可以通过调节CXCL12/CXCR4轴来抑制EC细胞的增殖、侵袭和迁移。

1 材料和方法

1.1 材料

材料包括:人EC细胞系RL95-2细胞(中科院细胞典藏库);C57BL/6J雌性小鼠(7周龄,22~24 g,辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号:SCXK(辽)2020-0002);水苏碱(规格:100 mg, HPLC \geq 98%,成都瑞芬思生物科技有限公司);AMD

3100(货号:HY-10046)、CXCL12蛋白(货号:HY-P73411,美国Med Chem Express公司);CCK-8细胞增殖检测试剂盒(货号:4202-250T,上海雅吉生物科技有限公司);结晶紫(货号:C8470-25,北京索莱宝科技有限公司);Annexin V-FITC/PI荧光双染细胞凋亡检测试剂盒(货号:P-CA-201,武汉普诺赛生命科技有限公司);Transwell 12孔板(Corning,货号:3460,上海雅吉生物科技有限公司);上皮钙黏蛋白(E-cadherin)小鼠单抗(货号:ab231303)、波形蛋白(Vimentin)兔单抗(货号:ab92547)、CXCL12兔单抗(货号:ab155090)、CXCR4兔单抗(货号:ab124824,英国Abcam公司);山羊抗小鼠(货号:SSA013)、山羊抗兔IgG二抗(货号:SSA010,北京义翘神州科技股份有限公司)。本研究已通过首都医科大学附属北京世纪坛医院动物伦理委员会批准(批号:22030056)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人EC细胞系RL95-2细胞用含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂中培养,当细胞融合率达到80%后按照1:3的比例进行传代,将传至第3代的细胞用于后续实验。

1.2.2 CCK-8检测STA对细胞的毒性 将细胞接种至96孔板(5×10^4 个/孔)中,然后用不同浓度(0、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)的STA处理细胞48 h,每孔加入10 μL 的CCK-8工作液,在37 °C培养2 h。用酶标仪测定每孔在450 nm处的吸光度(D)值,并计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.3 细胞分组和处理 将RL95-2细胞分为对照组(Control)、CXCL12/CXCR4抑制剂组(AMD 3100)、STA-L组(STA-L)、STA-H组(STA-H)、STA-H+CXCL12组。Control组细胞用普通培养基培养,CXCL12/CXCR4抑制剂组用AMD 3100浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基培养^[9],STA低、高浓度组分别

用STA浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基培养^[5], STA-H+CXCL12组用含有80 $\mu\text{mol/L}$ 的STA和100 ng/mL的CXCL12^[10]的培养基联合培养。

1.2.4 CCK-8检测细胞增殖 将细胞接种至96孔板(5×10^4 个/孔)中,按照1.2.3的分组分别在培养12 h、24 h、48 h、72 h时每孔加入100 μL 的培养基培养48 h,然后按照1.2.2的实验方法检测各组细胞存活率,每组实验重复3次。

1.2.5 克隆形成实验 将细胞接种于6孔板(5×10^5 个/孔)中,按照分组培养24 h后,将细胞以每孔 1×10^3 个接种到60 mm的平板中,加入DMEM培养基并置于培养箱中培养2周。然后将细胞用4%多聚甲醛在42 $^{\circ}\text{C}$ 下固定15 min,用0.1%结晶紫室温染色30 min,用显微镜对可见菌落进行计数。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 将细胞按照分组培养48 h后收集细胞,用PBS清洗后,加入100 μL 的1 \times 结合缓冲液重悬细胞,然后再分别加入10 μL 的Annexin V-FITC和10 μL 的碘化丙锭(PI),室温孵育20 min后加入400 μL PBS缓冲液。最后用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.2.7 Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力 将细胞按照分组培养48 h后,以 5×10^4 个/孔接种至Transwell上室中,侵袭实验则需将细胞接种至底部涂有基质胶的上室中,并加入无血清培养基,下室中均加入含10% FBS的培养基。24 h后清除上室膜内细胞,将膜外的细胞用4%多聚甲醛在室温下固定10 min后,再用结晶紫染色,在显微镜下观察并计算迁移和侵袭的细胞数。

1.2.8 Western blot检测细胞中E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白的表达情况 收集分组培养48 h后的细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白。用BCA试剂盒测定蛋白浓度,然后用10% SDS-PAGE分离蛋白条带并转移至PVDF膜上。结束后将PVDF膜放入5%的脱脂牛奶封闭液中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后将膜清洗后与一抗稀释液(E-cadherin、Vimentin稀释比例为1:1 000, CXCL12稀释比例为1:10 000, CXCR4稀释比例为1:100)在室温下孵育2 h,再分别与羊抗鼠二抗或羊抗兔IgG二抗稀释液(1:500)在室温下孵育2 h,最后用ECL试剂显色。在凝胶成像仪中观察蛋白条带,并以GAPDH为内参,用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.9 建立小鼠EC移植瘤模型并观察各组小鼠的肿

瘤生长情况 将C57BL/6J雌性小鼠适应性饲养1周,将各细胞组生长至对数期的RL95-2细胞用胰酶消化后1 500 r/min离心10 min,然后用无菌的PBS重悬细胞,在小鼠的右上肢的腋下注射接种密度为 1×10^6 个/mL的RL95-2细胞悬液,每只注射200 μL 。每天观察裸鼠及肿瘤的生长状况,4周后用1%戊巴比妥钠麻醉并处死小鼠后取出肿瘤组织,称重并测量肿瘤的长(L_a)和宽(L_b),然后计算肿瘤体积(V), $V=(L_a \times L_b \times L_b)/2$ 。

1.3 统计学分析

利用软件Graphpad prism 8.0分析数据,计量资料均表示为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间比较采用One-Way ANOVA分析,两两多重比较采用Tukey's分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STA对细胞毒性的影响

与对照组相比,10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的STA干预48 h后细胞的存活率均明显降低($P < 0.05$),且STA处理RL95-2细胞后的 IC_{50} 为82.80 $\mu\text{mol/L}$ 。因此,本实验选择浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 和80 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验中STA的低、高浓度组(图1)。

2.2 STA对细胞增殖活性和克隆数量的影响

与Control组相比,AMD 3100组和STA组细胞的增殖活力和克隆数量均降低($P < 0.05$),且AMD 3100组与STA-H组无显著差异($P > 0.05$);与STA-H组相比,STA-H+CXCL12组细胞的增殖活力和克隆数量升高($P < 0.05$)(图2)。

2.3 STA对细胞凋亡的影响

与Control组相比,AMD 3100组和STA不同浓度组细胞凋亡率升高($P < 0.05$),且AMD 3100组与STA-H组无显著差异($P > 0.05$);与STA-H组相比,STA-H+CXCL12组细胞的凋亡率降低($P < 0.05$)(图3)。

2.4 STA对细胞迁移和侵袭能力的影响

与Control组相比,AMD 3100组和STA不同浓度组细胞的迁移数和侵袭数降低($P < 0.05$),且AMD 3100组与STA-H组无显著差异($P > 0.05$);与STA-H组相比,STA-H+CXCL12组细胞的迁移数和侵袭数升高($P < 0.05$)(图4)。

2.5 STA对细胞中E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白表达的影响

与Control组相比,AMD 3100组和STA不同浓度组细胞中Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白表达

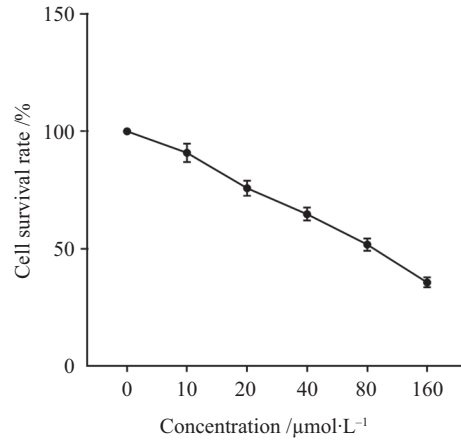
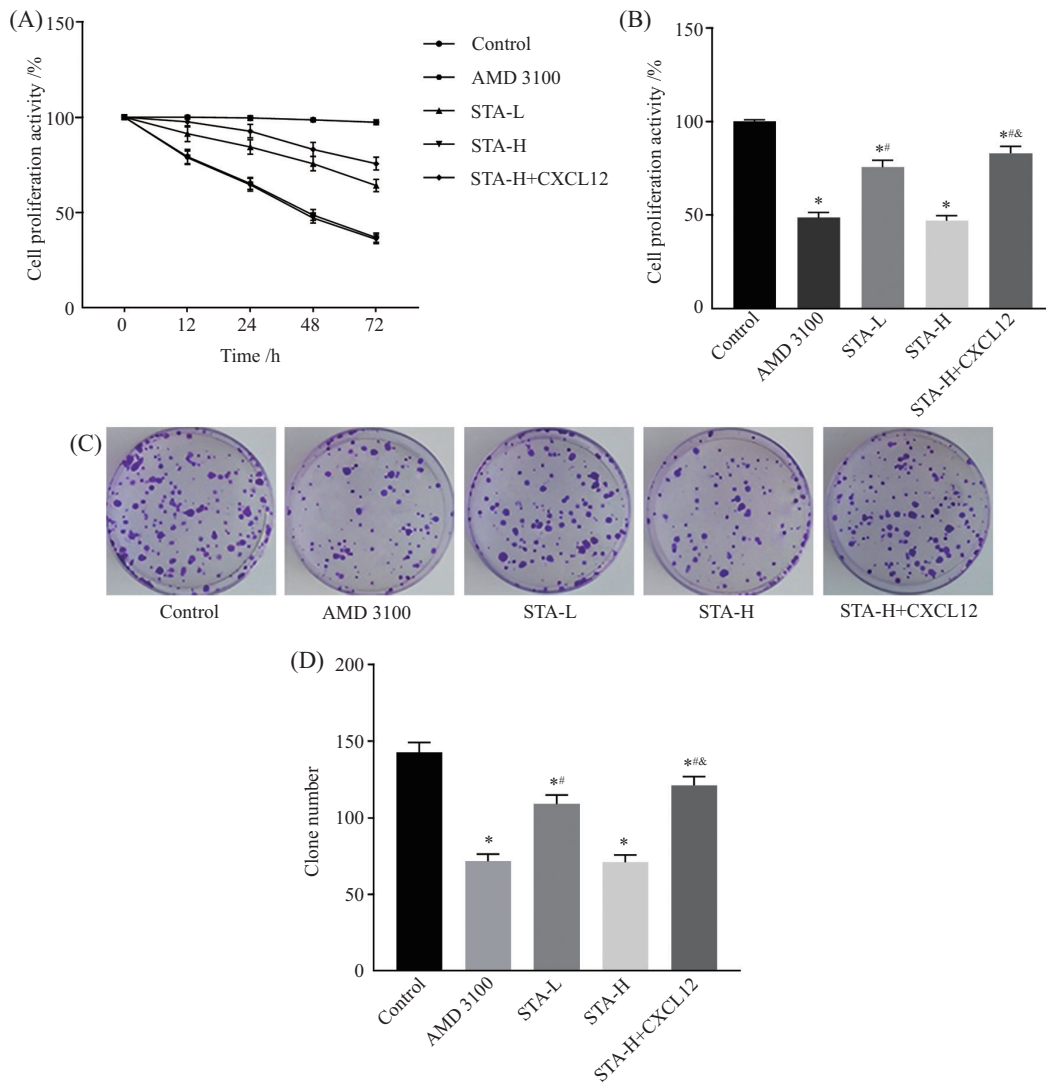


图1 不同浓度STA对RL95-2细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of STA on the survival rate of RL95-2 cells

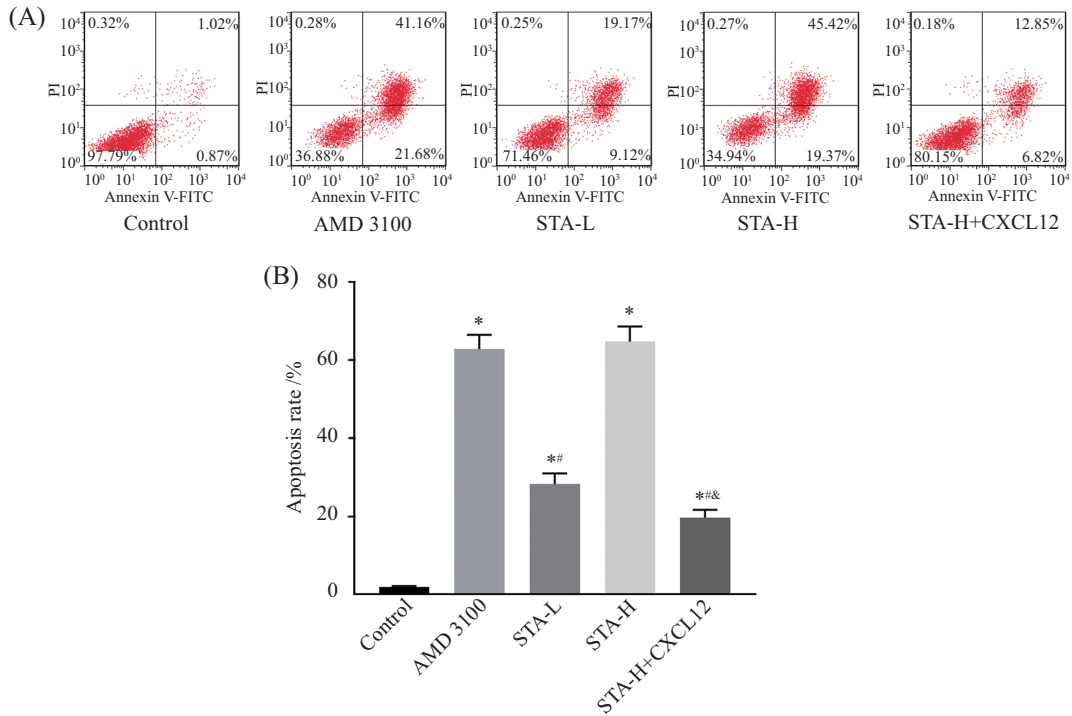


A: 不同时间点细胞的增殖活性; B: 48 h时细胞的增殖活性; C: 细胞克隆形成图; D: 克隆形成数量。* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与AMD 3100组相比; & $P < 0.05$, 与STA-H组相比。

A: proliferation activity of cells at different time points; B: proliferation activity of cells at 48 h; C: pictures of cell clone formation; D: number of clones formed. * $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with AMD 3100 group; & $P < 0.05$ compared with STA-H group.

图2 各组细胞的增殖活性和克隆形成情况

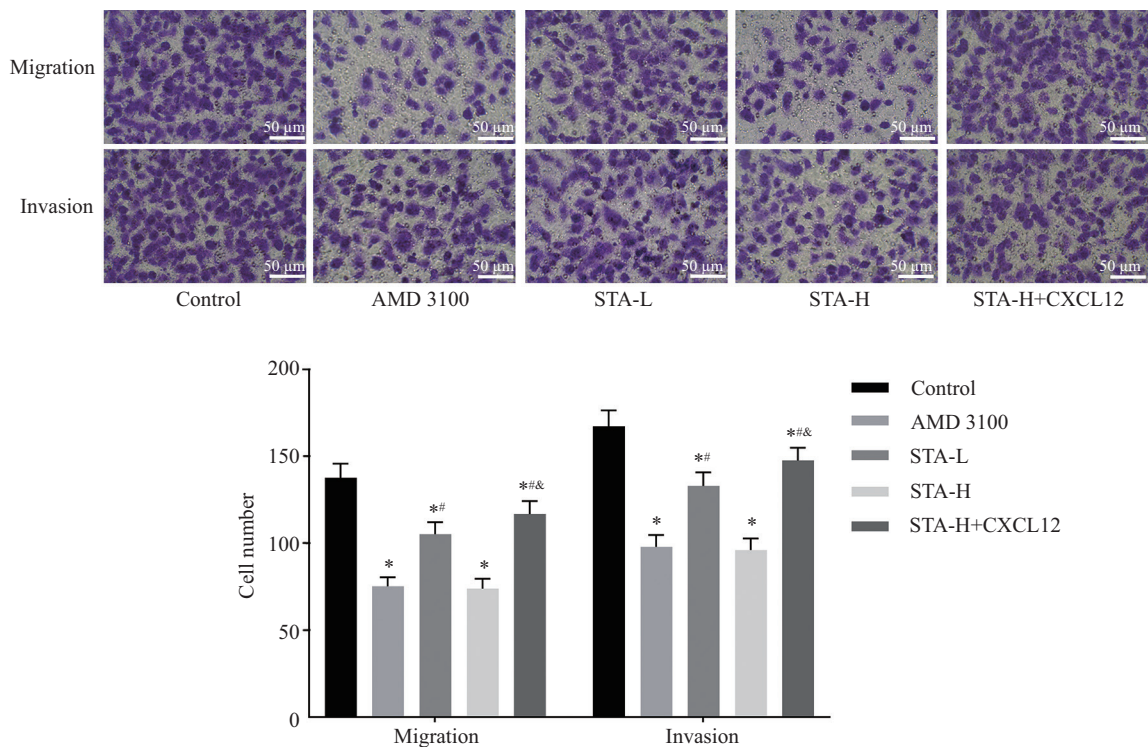
Fig.2 Proliferation activity and clone formation number of cells in each group



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与AMD 3100组相比; & $P < 0.05$, 与STA-H组相比。
 * $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with AMD 3100 group; & $P < 0.05$ compared with STA-H group.

图3 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率

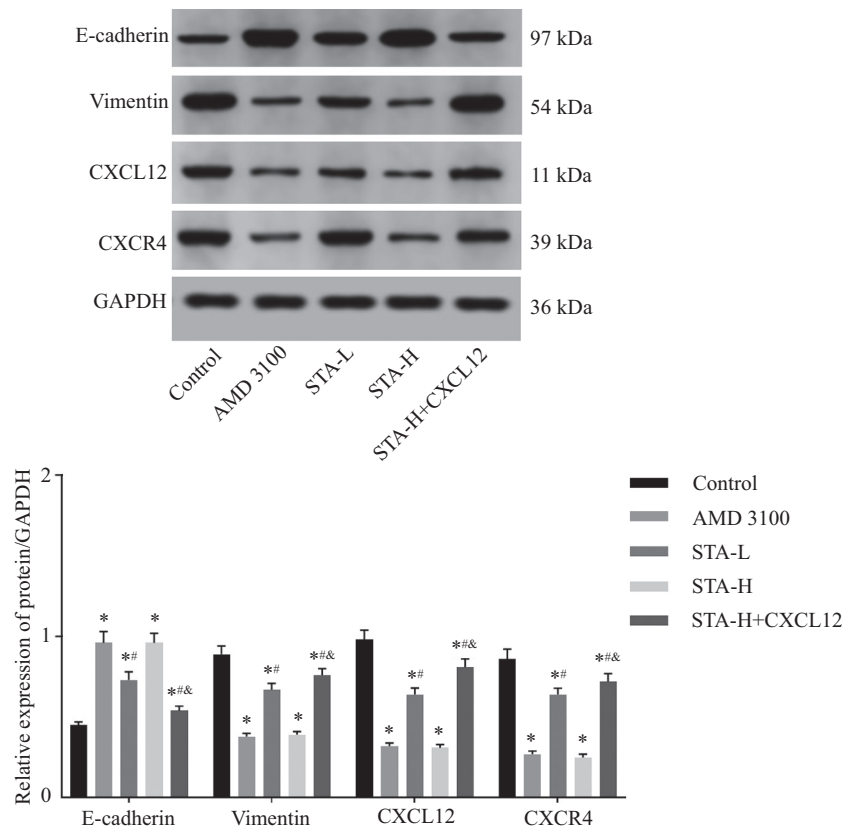
Fig.3 The apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与AMD 3100组相比; & $P < 0.05$, 与STA-H组相比。
 * $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with AMD 3100 group; & $P < 0.05$ compared with STA-H group.

图4 Transwell实验检测各组细胞的迁移和侵袭数量

Fig.4 Transwell experiment was used to detect the migration and invasion of cells in each group

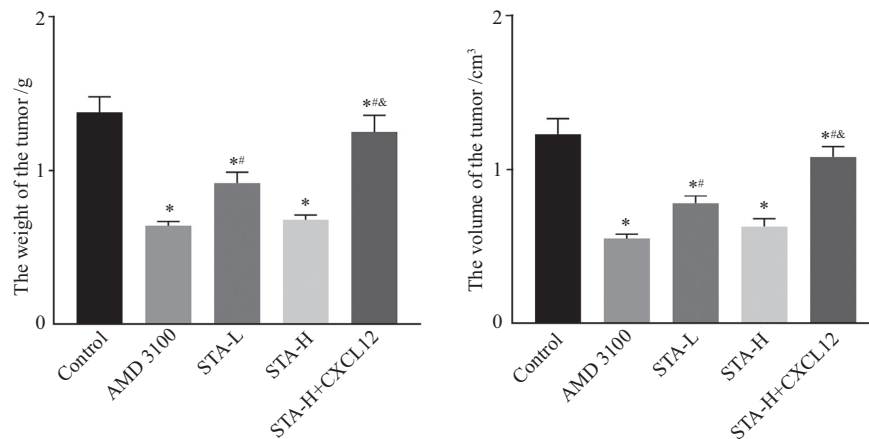


* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与AMD 3100组相比; & $P < 0.05$, 与STA-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with AMD 3100 group; & $P < 0.05$ compared with STA-H group.

图5 各组细胞中E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白的表达

Fig.5 Expression of E-cadherin, Vimentin, CXCL12, CXCR4 protein in cells of each group



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与AMD 3100组相比; & $P < 0.05$, 与STA-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with AMD 3100 group; & $P < 0.05$ compared with STA-H group.

图6 各组大鼠肿瘤组织的生长情况

Fig.6 Tumor growth of rats in each group

水平均降低, E-cadherin蛋白表达水平升高($P < 0.05$), 且AMD 3100组与STA-H组无显著差异($P > 0.05$); 与STA-H组相比, STA-H+CXCL12组细胞中Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白表达水平均升高, E-cadherin蛋白表达水平降低($P < 0.05$)(图5)。

2.6 STA对EC大鼠移植瘤生长的影响

与Control组相比, AMD 3100组和STA不同浓度组大鼠肿瘤质量、肿瘤体积均减小($P < 0.05$); 与STA-H组相比, STA-H+CXCL12组大鼠肿瘤质量、肿瘤体积均增加($P < 0.05$)(图6)。

3 讨论

EC是发达国家最常见的妇科癌症,也是全球女性癌症相关死亡的最重要原因之一。尽管诊断为早期疾病的患者预后较好,但患有复发或转移性疾病的患者的治疗选择有限且总生存期较短^[11-12]。因此寻找新的且无副作用的抗癌药物很重要。天然存在的化合物具有多种有效的植物化学物质,通常毒性低于化学疗法,因此被广泛用于各种癌症的临床治疗^[13]。益母草在神农本草经文献中被列为无毒中药的最高等级。由于益母草具有促进血液循环的作用,因此其主要用于妇产科疾病的治疗^[14]。STA是一种从草药益母草中提取的生物活性成分,在近几年的研究中已经发现其具有抑制乳腺癌和前列腺癌发展的作用^[15],但其对EC的作用尚未研究。因此,本研究使用RL95-2细胞探讨了STA对EC的作用,发现STA处理组细胞的增殖活性和克隆数量显著低于Control组,而细胞凋亡率显著高于Control组。这揭示了STA可以通过抑制EC细胞的增殖,促进细胞凋亡,从而阻止EC的发展。

据了解,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是一种表型可塑性过程,在子宫内膜癌的发病过程中赋予上皮细胞迁移和侵袭特性,使癌细胞能够从原发肿瘤部位脱离并侵入周围组织或血管组织^[16]。E-cadherin表达的缺失和Vimentin表达的增加是EMT发生的标志,且E-cadherin和Vimentin能够介导癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[17]。本研究通过Transwell小室和Western blot实验发现,与Control组相比,STA处理组细胞的迁移和侵袭数减少,E-cadherin蛋白表达水平升高,Vimentin蛋白表达水平降低。这揭示了STA可以通过阻止上皮细胞向间充质转化来抑制EC细胞的迁移和侵袭,从而阻止EC转移,但具体的分子机制还尚未被了解。

已知趋化因子是一种独特的蛋白质,能够控制免疫细胞的趋化作用,参与细胞的增殖、迁移和凋亡。CXCL12,也被称为SDF1,是一种细胞外稳态趋化因子。CXCR4属于G蛋白偶联受体超家族,并作为CXCL12的受体发挥作用。CXCL12/CXCR4信号轴的激活可以促进EMT,加剧癌症的侵袭和转移,从而导致患者预后不良^[18-19]。研究显示,STA可以通过抑制CXCR4的活性及其下游信号通路来抑制人毛细胞型星形细胞瘤的迁移和侵袭^[5]。但研究者们对STA调控CXCL12/CXCR4信号轴的作用了

解甚少。本研究结果显示,与Control组相比,STA处理组的细胞中CXCL12、CXCR4蛋白表达水平降低,且CXCL12/CXCR4轴抑制剂AMD 3100组的细胞增殖活性、迁移和侵袭细胞数、细胞凋亡率以及CXCL12、CXCR4蛋白表达水平均与STA-H组无显著差异。这表明STA可能与AMD 3100的作用一致,可以阻断CXCL12与CXCR4结合发挥作用。而在STA-H浓度培养物中加入CXCL12后,STA对EC细胞恶性生物学特性的作用被逆转,这进一步揭示了STA可能是通过阻断CXCL12/CXCR4信号轴来促进EC细胞凋亡,抑制EC细胞增殖、迁移和侵袭的。最近有研究指出,盐酸水苏碱能够抑制肝癌小鼠移植瘤的生长^[20],因此,本研究也将EC进行体内移植瘤实验,结果发现STA处理组的小鼠肿瘤组织的质量和体积均低于Control组,表明STA在体内也可以抑制EC的发展。

综上所述,STA通过抑制CXCL12/CXCR4轴来抑制EC细胞增殖、侵袭和迁移。本研究为EC的诊断和转移提供了新的治疗药物以及研究思路。但有研究显示,CXCL12/CXCR4轴还能够激活下游各种调节细胞生长的信号通路,如磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/Akt等^[6,21]。因此,该信号轴在EC中的具体调节机制还需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] CAVALIERE A F, PERELLI F, ZAAMI S, et al. Fertility sparing treatments in endometrial cancer patients: the potential role of the new molecular classification [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12248-62.
- [2] VAN DEN HEERIK ASVM, HOREWEG N, DE BOER S M, et al. Adjuvant therapy for endometrial cancer in the era of molecular classification: radiotherapy, chemoradiation and novel targets for therapy [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2021, 31(4): 594-604.
- [3] CHEN P, YANG Y, ZHANG Y, et al. Identification of prognostic immune-related genes in the tumor microenvironment of endometrial cancer [J]. *Aging*, 2020, 12(4): 3371-87.
- [4] YU N, HU S, HAO Z. Beneficial effect of stachydrine on the traumatic brain injury induced neurodegeneration by attenuating the expressions of Akt/mTOR/PI3K and TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Transl Neurosci*, 2018, 9(1): 175-82.
- [5] LIU Y, WEI S, ZOU Q, et al. Stachydrine suppresses viability & migration of astrocytoma cells via CXCR4/ERK & CXCR4/Akt pathway activity [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(15): 1443-59.
- [6] ZHOU W, GUO S, LIU M, et al. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(17): 3026-41.
- [7] FENG W, HUANG W, CHEN J, et al. CXCL12-mediated HOXB5 overexpression facilitates colorectal cancer metastasis

- through transactivating CXCR4 and ITGB3 [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2612-33.
- [8] QIN Y, WANG F, NI H, et al. Cancer-associated fibroblasts in gastric cancer affect malignant progression via the CXCL12-CXCR4 axis [J]. *J Cancer*, 2021, 12(10): 3011-23.
- [9] ZENG Y, LI B, LIANG Y, et al. Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment [J]. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6596-608.
- [10] LI J, LUCO A L, CAMIRAND A, et al. Vitamin D regulates CXCL12/CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in a model of breast cancer metastasis to lung [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(7): bqab049.
- [11] ZHANG M, LU Q, HOU H, et al. Garcinol inhibits the proliferation of endometrial cancer cells by inducing cell cycle arrest [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(2): 630-40.
- [12] MORITAKE T, KOJIMA J, KUBOTA K, et al. Krüppel-like factor 5 is upregulated and induces cell proliferation in endometrial cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(6): 484-90.
- [13] CHEN H Y, CHENG W P, CHIANG Y F, et al. Hinokitiol exhibits antitumor properties through induction of ROS-mediated apoptosis and p53-driven cell-cycle arrest in endometrial cancer cell lines (Ishikawa, HEC-1A, KLE) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8268-83.
- [14] LIU X, SHAN X, CHEN H, et al. Stachydrine ameliorates cardiac fibrosis through inhibition of angiotensin II/transformation growth factor β 1 fibrogenic axis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(1): 538-51.
- [15] GU R, ZHANG W, XU D. Stachydrine is effective and selective against blast phase chronic myeloid leukaemia through inhibition of multiple receptor tyrosine kinases [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 700-7.
- [16] XIONG H, WANG N, CHEN H, et al. MicroRNA 199a/b 5p inhibits endometrial cancer cell metastasis and invasion by targeting FAM83B in the epithelial to mesenchymal transition signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 304-14.
- [17] SHI R, ZHANG W, ZHANG J, et al. CircESRP1 enhances metastasis and epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer via the miR-874-3p/CPEB4 axis [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 139-55.
- [18] KHARE T, BISSONNETTE M, KHARE S. CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in colorectal cancer: therapeutic target in preclinical and clinical studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7371-87.
- [19] YANG P, HU Y, ZHOU Q. The CXCL12-CXCR4 signaling axis plays a key role in cancer metastasis and is a potential target for developing novel therapeutics against metastatic cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(33): 5543-61.
- [20] BAO X, LIU Y, HUANG J, et al. Stachydrine hydrochloride inhibits hepatocellular carcinoma progression via LIF/AMPK axis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154066.
- [21] YIN X, LIU Z, ZHU P, et al. CXCL12/CXCR4 promotes proliferation, migration, and invasion of adamantinomatous craniopharyngiomas via PI3K/AKT signal pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9724-36.