研究论文

苍术素通过调节RhoA/ROCK1信号通路对膀胱癌 细胞增殖、凋亡和血管生成拟态的影响

赖海燕^{1*} 李茜¹ 陆一菱¹ 刘英¹ 秦小莉¹ 魏仁波² (¹成都市第三人民医院药学部,成都 610014; ²成都市第三人民医院泌尿外科,成都 610014)

该文探讨苍术素(ATR)调节Ras同源基因家族成员A(RhoA)/Rho激酶1(ROCK1)信号 摘要 通路对膀胱癌(BC)细胞增殖、凋亡和血管生成拟态(VM)的影响。利用CCK-8法检测不同浓度(0、 10、20、40、80、160 mg/L)的 ATR对 T24细胞增殖率的影响, 筛选 ATR干预浓度。在此基础上 将T24细胞分为NC组(正常培养)、L-ATR组(20 mg/L ATR)、M-ATR组(40 mg/L ATR)、H-ATR 组(80 mg/L ATR)、H-ATR+血管紧张素 II(Ang II)组(80 mg/L ATR+100 nmol/L的 RhoA/ROCK1 通路激活剂 Ang II)。MTT检测、Edu实验检测 T24细胞增殖情况;流式细胞术、TUNEL法测定 T24细胞凋亡情况; Matrigel基质胶法测定 T24细胞血管生成情况; 鬼笔环肽染色观察 T24细胞骨 架; Western blot测定 RhoA/ROCK1通路蛋白表达情况。随着 ATR浓度的增加, T24细胞增殖率呈 ATR剂量依赖性降低(P<0.05), 选择ATR浓度为20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L进行后续研究。与NC 组对比, L-ATR组、M-ATR组、H-ATR组T24细胞D450值、Edu阳性细胞率及管腔数量均显著降低, 凋亡率及F-肌动蛋白荧光强度显著升高,且呈ATR剂量依赖性变化(P<0.05);与H-ATR组对比,H-ATR+Ang II组T24细胞D450值、Edu阳性细胞率及管腔数量均显著升高, 凋亡率及F-肌动蛋白荧光 强度显著降低(P<0.05)。与NC组对比, L-ATR组、M-ATR组、H-ATR组T24细胞RhoA、ROCK1蛋 白表达水平均显著降低, 且呈ATR剂量依赖性变化(P<0.05); 与H-ATR组对比, H-ATR+Ang II组T24 细胞RhoA、ROCK1蛋白表达水平均显著升高(P<0.05)。ATR可能通过抑制RhoA/ROCK1信号通 路激活进而抑制T24细胞增殖,影响VM的形成,诱导细胞凋亡。

关键词 苍术素; 膀胱癌; Ras同源基因家族成员A/Rho激酶1; 增殖; 凋亡; 血管生成拟态

Impacts of Atractylonin on Proliferation, Apoptosis and Vasculogenic Mimicry of Bladder Cancer Cells by Regulating RhoA/ROCK1 Signal Pathway

LAI Haiyan^{1*}, LI Qian¹, LU Yiling¹, LIU Ying¹, QIN Xiaoli¹, WEI Renbo²

(¹Department of Pharmaceutical, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014, China; ²Department of Urology, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the impacts of ATR (atractylonin) on the proliferation, apoptosis and VM (vasculogenic mimicry) of BC (bladder cancer) cells by regulating the RhoA (Ras homologous

gene family member A)/ROCK1 (Rho kinase 1) signaling pathway. CCK-8 method was used to detect the effect of different concentrations (0, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L) of ATR on the proliferation rate of T24 cells to screen for ATR intervention concentrations. On this basis, T24 cells were separated into NC group (normal culture), L-ATR group (20 mg/L ATR), M-ATR group (40 mg/L ATR), H-ATR group (80 mg/L ATR), and H-ATR+Ang II group (80 mg/L ATR+100 nmol/L RhoA/ROCK1 pathway activator angiotensin Ang II). MTT detection and Edu assay were applied to measure T24 cell proliferation. Flow cytometry and TUNEL assay were applied to determine T24 cell apoptosis. Matrigel matrix gel method was applied to measure angiogenesis in T24 cells. Phalloidin staining method was used to observe the cytoskeleton of T24. Western blot was applied to determine the expression of RhoA/ROCK1 pathway proteins. With the increase of ATR concentration, the proliferation rate of T24 cells decreased in a dose-dependent manner (P<0.05), and the ATR concentration was selected as 20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L for follow-up studies. Compared with the NC group, the D_{450} value, Edu positive cell rate, and lumen number of T24 cells in the L-ATR group, M-ATR group, and H-ATR group were greatly reduced, while the apoptosis rate and fluorescence intensity of F-actin were greatly increased, showing a dose-dependent change in ATR (P<0.05). Compared with the H-ATR group, the D_{450} value, Edu positive cell rate, and lumen number of T24 cells in the H-ATR+Ang II group were greatly increased, while the apoptosis rate and fluorescence intensity of F-actin were greatly reduced (P<0.05). Compared with the NC group, the expression of RhoA and ROCK1 proteins in T24 cells in the L-ATR group, M-ATR group, and H-ATR group were greatly reduced, and showed a dose-dependent change in ATR (P<0.05). Compared with the H-ATR group, the expression of RhoA and ROCK1 proteins in T24 cells in the H-ATR+Ang II group was greatly increased (P < 0.05). ATR may inhibit proliferation of T24 cells, affect VM formation, and induce cell apoptosis by inhibiting the activation of the RhoA/ROCK1 signaling pathway.

Keywords atractylodin; bladder cancer; Ras homologous gene family member A/Rho kinase 1; proliferation; apoptosis; vasculogenic mimicry

膀胱癌(bladder cancer, BC)起源于膀胱各组 织,绝大多数来自上皮组织,其中尿路上皮癌占比超 90%。数据统计显示,全球每年新增膀胱癌病例约 54.9万例,占新发癌症患者的3%,死亡病例约20万 例,占癌症死亡患者的2.1%^[1-2]。BC包括肌层浸润型 (muscle invasive bladder cancer, MIBC)和非肌层浸 润型 (non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC), 目前临床治疗BC的主要方法以手术为主,并辅以放 化疗,但其预后不佳^[3]。因此探寻新的有效的治疗 药物仍是目前研究重点。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是恶性肿瘤的一种新型血管生成模式, 可为肿瘤细胞快速生长提供充足的血液供应,目前, VM已被证实在多种恶性肿瘤中存在,且伴有VM的 肿瘤细胞易转移、恶性程度高、侵袭能力强^[4]。Ras 同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)是一种Rho家族GTP酶,因其在细胞骨架 重塑中的作用而备受关注。Rho激酶1(Rho kinase 1, ROCK1)与细胞迁移、侵袭、细胞间黏附有关, RhoA 可激活其下游效应物ROCK1促进多种恶性肿瘤的侵

袭和转移^[5-6]。既往研究显示, RhoA/ROCK1信号通路是肿瘤恶性进展的关键通路, 可调节细胞黏附, 参与细胞迁移, 促进结肠癌细胞的增殖和迁移^[7]。因此抑制 RhoA/ROCK1信号通路可抑制肿瘤进展。苍术素 (atractylodin, ATR)为苍术中主要活性成分, 其抗炎、抗癌等药理作用已被报道, 既往研究显示, ATR可有效抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 进而发挥抗肿瘤免疫功能^[8]。但ATR对BC细胞RhoA/ROCK1通路及VM的影响目前尚未可知。因此, 本研究基于RhoA/ROCK1通路, 探讨 ATR对 BC细胞增殖、调亡和VM的影响, 以期为BC临床诊治提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人BC细胞系T24购自美国ATCC公司;ATR (HPLC≥98%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;血 管紧张素II(angiotensin II, Ang II)购自北京索莱宝科技 有限公司;胎牛血清(fetal calf serum, FBS)购自以 色列Biological Industries公司;CCK8试剂购自北京 百奥莱博科技有限公司;四噻唑蓝(methyl-thiazole tetrazolium, MTT)试剂盒购自上海抚生实业有限公 司;BCA试剂盒、Edu试剂盒均购自锐博生物科技 有限公司;Matrigel基质胶购自美国Corning公司; 胰酶消化液购自上海源叶生物科技有限公司;RIPA 裂解液购自美国ABW公司;Annexin V-FITC/PI凋 亡试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; TUNEL染色液、RhoA、ROCK1抗体均购自上海 碧云天生物技术有限公司;ECL发光试剂盒购自美 国Millipore公司;β-actin购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8法筛选ATR处理细胞的最佳浓度 当 T24细胞达到70%~80%融合时,将其(1×10⁴个/孔)接 种在96孔板中,随后使用不同浓度(0、10、20、40、 80、160 mg/L)的ATR^[9]处理DMEM培养基,在培 养48 h后向各孔加10 μL CCK-8试剂,继续培养4 h。 用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度值。

1.2.2 T24细胞分组及处理 将对数期T24细胞 分为NC组、L-ATR组(20 mg/L ATR)、M-ATR组 (40 mg/L ATR)、H-ATR组(80 mg/L ATR)、H-ATR+Ang II组(80 mg/L ATR+100 nmol/L RhoA/ROCK1信号通 路激活剂 Ang II^[10]),加药处理完成后分析各指标变 化。

1.2.3 MTT检测 将1.2.2中各组T24细胞按 100 μL/孔(5×10³个/孔)接种至96孔板,并于37°C、 5% CO₂培养箱培养,加入10 μL 5 mg/mL的MTT溶液 于37°C孵育4 h,室温下3 000 r/min离心5 min,弃去 培养液,加150 μL DMSO充分混匀,酶标仪记录波长 为450 nm处的吸光度值。

1.2.4 Edu实验 将1.2.2中各组T24细胞接种至 24孔板(3×10⁴个/孔), 24 h后加入Edu工作液继续于 37 °C孵育12 h,随后根据Edu试剂盒说明书进行多聚 甲醛固定(室温、30 min)、通透液室温通透(清洗3次, 每次10 min)、PBS洗涤5 min及Hoechst33342染色液 染色30 min,显微镜下观察细胞增殖情况。

1.2.5 流式细胞凋亡检测 收集1.2.2中各组对数生长期T24细胞,以预冷PBS洗涤(清洗2次,每次30 min),之后将其重悬于结合缓冲液,然后依次进行Annexin V-FITC和PI双染,室温避光培养1 h,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.6 TUNEL法 收集1.2.2中各组T24细胞,加入 多聚甲醛于室温固定 30 min,之后添加 TUNEL染色

液37 °C避光孵育1 h, PBS清洗5 min后添加DAPI染 色液室温下避光孵育15 min, 荧光显微镜下观察凋 亡细胞情况。

 1.2.7 Matrigel胶小管形成实验 胰酶消化(37°C 消化3 min) 1.2.2中各组对数期T24细胞,随后制备单 细胞悬液(1×10⁶个/mL)。Matrigel胶预涂于96孔板 各孔,常温静置成胶,以100 μL/孔接种于96孔板中, 37°C恒温培养箱中培养6 h,倒置荧光显微镜观察 VM的形成情况。

1.2.8 鬼笔环肽染色法观察细胞骨架 收集1.2.2
中各组T24细胞,加入多聚甲醛室温下固定10 min,
0.1% TritonX-100透化10 min,随后使用鬼笔环肽对
T24细胞染色,再用PI进行细胞核染色,荧光显微镜观察染色情况。

1.2.9 Western blot实验 RIPA裂解液裂解提取 总蛋白并定量蛋白浓度,取30 mg总蛋白电泳分离 并转 PVDF 膜,5% 脱脂乳粉室温封闭2 h,加入 RhoA(1:1 000)、ROCK1(1:1 000)一抗于4 °C下过 夜。TBST洗涤后加入对应二抗(1:5 000)室温孵育2 h, β-actin为内参,化学发光法曝光,拍照。

1.3 统计分析

实验结果使用 SPSS 26.0软件进行统计分析, 计量资料采用单因素方差分析,组间两两对比进行 SNK-q检验,以均数±标准差(x±s)表示, P<0.05表示 具有显著性差异。

2 结果

2.1 ATR浓度筛选

与0 mg/L ATR对比, 10~160 mg/L ATR处理 T24细胞后其细胞增殖率呈ATR剂量依赖性降低 (*P*<0.05), 见图1。经计算, ATR对T24细胞IC₅₀为 79.40 mg/L, 因此选择20、40、80 mg/L的ATR进行 后续实验。

2.2 ATR对T24细胞增殖的影响

L-ATR组、M-ATR组、H-ATR组 T24细胞*D*₄₅₀ 值及Edu阳性细胞率均低于NC组(*P*<0.05),且均呈 ATR剂量依赖性降低(*P*<0.05);与H-ATR组对比,H-ATR+Ang II组T24细胞*D*₄₅₀值及Edu阳性细胞率均升 高(*P*<0.05)。见图2、表1。

2.3 ATR对T24细胞凋亡的影响

L-ATR组、M-ATR组、H-ATR组T24细胞调 亡率及凋亡指数均高于NC组(*P*<0.05),且均呈ATR



 $^{*}P$ <0.05 compared with 0 mg/L ATR group; $^{*}P$ <0.05 compared with 10 mg/L ATR group; $^{*}P$ <0.05 compared with 20 mg/L ATR group; $^{\$}P$ <0.05 compared with 40 mg/L ATR group; $^{\$}P$ <0.05 compared with 80 mg/L ATR group.





A: NC组; B: L-ATR组; C: M-ATR组; D: H-ATR组; E: H-ATR+Ang II组。

A: NC group; B: L-ATR group; C: M-ATR group; D: H-ATR group; E: H-ATR+Ang II group.

图2 Edu实验检测T24细胞增殖情况

Fig.2 T24 cell proliferation was detected by Edu assay

表1 ATR对T24细胞增殖的影响			
Table 1 Effects of ATR on T24 cell proliferation			
组别	D	Edu阳性细胞率/%	
Group	D 450	Edu positive cell rate /%	
NC group	0.87±0.12	39.48±3.31	
L-ATR group	0.70±0.10*	31.52±2.82*	
M-ATR group	$0.58{\pm}0.07^{*^{\#}}$	22.96±2.13* [#]	
H-ATR group	0.42±0.06* ^{#&}	14.58±1.59* ^{#&}	
H-ATR+Ang II group	$0.76{\pm}0.11^{@}$	35.42±3.11@	

*P<0.05,与NC组对比; *P<0.05,与L-ATR组对比; *P<0.05,与M-ATR组对比; @P<0.05,与H-ATR组对比。

*P<0.05 compared with NC group; *P<0.05 compared with L-ATR group; *P<0.05 compared with M-ATR group; @P<0.05 compared with H-ATR group.



A: NC组; B: L-ATR组; C: M-ATR组; D: H-ATR组; E: H-ATR+Ang II组。

A: NC group; B: L-ATR group; C: M-ATR group; D: H-ATR group; E: H-ATR+Ang II group.

图4 TUNEL实验测定T24细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis of T24 cells was determined by TUNEL assay

表2 ATR对T24细胞凋亡的影响 Table 2 Effects of ATR on anontosis of T24 cells

	凋亡率/%	凋亡指数/%	
Group	Apoptosis rate /%	Apoptosis index /%	
NC group	6.11±0.42	5.82±0.41	
L-ATR group	17.03±2.42*	19.22±2.16*	
M-ATR group	33.24±2.79* [#]	32.38±2.59* [#]	
H-ATR group	46.53±3.55* ^{#&}	45.19±3.37* ^{#&}	
H-ATR+Ang II group	20.59±3.23 [@]	23.96±2.54 [@]	

*P<0.05,与NC组对比; *P<0.05,与L-ATR组对比; *P<0.05,与M-ATR组对比; ®P<0.05,与H-ATR组对比。

*P<0.05 compared with NC group; *P<0.05 compared with L-ATR group; *P<0.05 compared with M-ATR group; *P<0.05 compared with H-ATR group.

剂量依赖性升高(P<0.05);与H-ATR组对比,H-ATR+Ang II组T24细胞凋亡率及凋亡指数均降低 (P<0.05)。见图3、图4和表2。

2.4 ATR对T24细胞VM形成的影响

与NC组对比,L-ATR组、M-ATR组、H-ATR 组T24细胞管腔形成数量均呈ATR剂量依赖性降低



A: NC组; B: L-ATR组; C: M-ATR组; D: H-ATR组; E: H-ATR+Ang II组。

A: NC group; B: L-ATR group; C: M-ATR group; D: H-ATR group; E: H-ATR+Ang II group.

图5 Matrigel基质胶法测定T24细胞管腔数量

Fig.5 The lumen number of T24 cells was measured by Matrigel matrix gel method

表3 ATR对T24细胞管腔数量的影响

Table 3Effects of ATR on the number of lumen in T24 cells			
组别	管腔数量/个		
Group	Number of lumen /pcs		
NC group	36.25±3.68		
L-ATR group	25.83±2.76*		
M-ATR group	14.35±1.52* [#]		
H-ATR group	$7.27 \pm 0.83^{*\#\&}$		
H-ATR+Ang II group	22.13±2.34@		

*P<0.05,与NC组对比;[#]P<0.05,与L-ATR组对比;[&]P<0.05,与M-ATR组对比;[@]P<0.05,与H-ATR组对比。

*P<0.05 compared with NC group; "P<0.05 compared with L-ATR group; "P<0.05 compared with M-ATR group; "P<0.05 compared with H-ATR group.



A: NC组; B: L-ATR组; C: M-ATR组; D: H-ATR组; E: H-ATR+Ang II组。

A: NC group; B: L-ATR group; C: M-ATR group; D: H-ATR group; E: H-ATR+Ang II group.

图6 鬼笔环肽染色测定T24细胞骨架损伤情况

Fig.6 The cytoskeleton damage of T24 was determined by phalloidin staining

(P<0.05); 与H-ATR组对比, H-ATR+Ang II组 T24细 胞管腔形成数量升高(P<0.05)。见图5、表3。

2.5 ATR对T24细胞骨架的影响

与NC组对比, L-ATR组、M-ATR组、H-ATR组 T24细胞中F-肌动蛋白荧光强度均增加, 且呈剂量 依赖性(P<0.05); 与H-ATR组对比, H-ATR+Ang II组 T24细胞中F-肌动蛋白荧光强度减弱(P<0.05)。见 图6、表4。

2.6 ATR对RhoA/ROCK1通路蛋白表达的影响 与NC组对比, L-ATR组、M-ATR组、H-ATR 组T24细胞RhoA、ROCK1蛋白表达水平均降低, 且均呈剂量依赖性(P<0.05);与H-ATR组对比, H-ATR+Ang II组T24细胞RhoA、ROCK1蛋白表达水 平均升高(P<0.05)。见图7、表5。

3 讨论

BC是全球第九大常见恶性肿瘤,主要分为 NMIBC和MIBC, NMIBC局限于黏膜层或黏膜下层, 约占BC的75%, MIBC的肿瘤细胞侵犯膀胱肌层,约 为BC的20%~30%^[11-12]。NMIBC患者常用的治疗方

Table 4 Effects of ATR on T24 cytoskeleton damage			
	肌动蛋白荧光强度		
Group	F-actin fluorescence intensity		
NC group	26.14±2.18		
L-ATR group	37.27±3.25*		
M-ATR group	46.39±3.73* [#]		
H-ATR group	56.29±4.89* ^{#&}		
H-ATR+Ang II group	25.39±2.05 [@]		

表4	ATR	T24细	胞骨ダ	架损伤	的影响]
 4 100		TD .	T 14			1

*P<0.05,与NC组对比;*P<0.05,与L-ATR组对比;*P<0.05,与M-ATR组对比;@P<0.05,与H-ATR组对比。

*P<0.05 compared with NC group; "P<0.05 compared with L-ATR group; "P<0.05 compared with M-ATR group; "P<0.05 compared with H-ATR group.



A: NC组; B: L-ATR组; C: M-ATR组; D: H-ATR组; E: H-ATR+Ang II组。

A: NC group; B: L-ATR group; C: M-ATR group; D: H-ATR group; E: H-ATR+Ang II group.

图7 Western blot检测T24细胞RhoA、ROCK1蛋白表达情况

Fig.7 Western blot analysis of RhoA and ROCK1 protein expression in T24 cells

	表5 ATR对T24细胞RhoA/ROCK1通路蛋白表达的影响
Table 5	Effects of ATR on the expression of RhoA/ROCK1 pathway proteins in T24 cell

组别	PhoA	ROCK1
Group	XIIOA	
NC group	1.05±0.13	0.97±0.12
L-ATR group	0.82±0.11*	0.75±0.10*
M-ATR group	$0.60{\pm}0.09^{*\#}$	$0.58{\pm}0.08^{*^{\#}}$
H-ATR group	0.34±0.06* ^{#&}	$0.27 \pm 0.05^{*\#\&}$
H-ATR+Ang II group	0.71±0.09 [@]	0.68±0.09 [@]

*P<0.05,与NC组对比; *P<0.05,与L-ATR组对比; *P<0.05,与M-ATR组对比; @P<0.05,与H-ATR组对比。

*P<0.05 compared with NC group; "P<0.05 compared with L-ATR group; "P<0.05 compared with M-ATR group; "P<0.05 compared with H-ATR group.

法为手术切除和膀胱灌注化疗,5年生存率超90%, 但也存在较高的复发率,可达60%,另外约20%患者 处于进展期。通常对MIBC患者进行根治性切除和 盆腔淋巴结切除,MIBC患者的5年死亡率高达50%, 出现局部进展或复发患者预后更差^[13-14]。因此,深 入了解BC病理分子机制,积极探寻更加高效的BC 治疗方法,对改善BC患者治疗效果、减少复发、提 高整体生存率具有重要价值。

天然药物由于其高效、低毒性等优点在肿瘤治 疗中备受关注。ATR为苍术中含量最高的主要活性 物质,作为一种中药单体,具有抗炎、抗癌、抗血管 生成等多种药理活性,其中抗肿瘤活性备受关注^[15]。 VANAROJ等^[16]研究显示,ATR可通过下调Notch信 号通路抑制胆管癌细胞增殖。ZHANG等^[17]研究 显示,ATR可通过调节活性氧介导的信号通路诱导 A549肺癌细胞凋亡,并抑制细胞增殖和迁移。本研 究结果显示,使用不同浓度ATR干预T24细胞后,其增 殖能力显著降低,凋亡率显著升高,且均呈ATR剂量 依赖性变化,提示ATR可影响T24细胞增殖、凋亡过 程,然而具体作用机制仍未可知,还需进一步研究。

癌细胞增殖快速,易使肿瘤组织内部处于缺 氧状态,进而促进肿瘤细胞分泌各种促血管生成因 子,进一步促进血管生成,以得到充足的氧气、血 液及营养,促进肿瘤细胞增殖、迁移与侵袭[18]。因 此,抑制肿瘤血管生成可有效抑制肿瘤细胞增殖 与迁移,被认为是抗肿瘤治疗的关键。ROCK1为 RhoA/ROCK1信号通路中重要信号分子, ROCK1 与细胞迁移、侵袭、细胞间黏附等多个环节有关, 现已有研究证实ROCK1在癌细胞VM形成过程中起 着重要的介导作用^[19]。ROCK是RhoA蛋白的下游激 酶,两者作为RhoA/ROCK信号通路重要信号分子,在 细胞骨架运动、细胞黏附等多个环节中发挥重要作 用^[20]。ZHANG等^[21]研究显示, RhoA/ROCK信号通 路参与VM的形成, 黄芩素通过靶向RhoA/ROCK 信号通路可有效减少肿瘤血供,进而抑制非小细 胞肺癌中VM形成。安海燕等^[22]研究显示,鳖甲煎 丸可有效抑制肝癌细胞中RhoA/ROCK信号通路 RhoA、ROCK1蛋白的表达,进而抑制肝癌细胞VM 的形成。上述研究提示,抑制RhoA/ROCK信号通 路可抑制肿瘤VM的形成。本研究结果显示,不同 剂量ATR处理T24细胞后,管腔形成数量、RhoA 及ROCK1蛋白表达水平均降低,表明ATR可抑制 RhoA/ROCK1信号通路进而抑制VM的形成。本研 究在80 mg/L ATR处理基础上设置 RhoA/ROCK1激 活剂组(H-ATR+Ang II组), 研究结果显示, RhoA/ROCK1 通路激活剂Ang II可促进T24细胞增殖和管腔形成, 抑制细胞凋亡,提升RhoA、ROCK1蛋白表达水平, 进一步证实ATR抑制T24细胞的增殖和VM的形成, 并促进T24细胞的凋亡,这可能与抑制RhoA/ROCK1 通路有关。

综上所述, ATR可抑制BC T24细胞增殖和VM形成, 诱导细胞凋亡, 这可能是通过抑制RhoA/ROCK1 信号通路实现的, 为研究BC中 VM形成提供理论基础, 也为临床治疗BC提供参考。但考虑到信号通路的复杂性, 本次实验的研究不够深入, 有待未来深入验证。

参考文献 (References)

- YI L, WANG H, LI W, et al. The FOXM1/RNF26/p57 axis regulates the cell cycle to promote the aggressiveness of bladder cancer [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 944-55.
- [2] 刘宏伟,陈瑞琦,熊洪,等.黄芪多糖通过调控JAK2/STAT3信 号通路抑制膀胱癌UM-UC-3细胞增殖、迁移与侵袭[J].山西 医科大学学报(LIU H W, CHEN R Q, XIONG H, et al. Astragalus polysaccharide inhibits proliferation,migration and invasion of bladder cancer UM-UC-3 cells by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Journal of Shanxi Medical University), 2023, 54(11): 1442-8.
- [3] KOGUCHI D, MATSUMOTO K, SHIBA I, et al. Diagnostic potential of circulating tumor cells, urinary microRNA, and urinary cell-free DNA for bladder cancer: a review [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9148-60.
- [4] DELGADO-BELLIDO D, ZAMUDIO-MARTÍNEZ E, FERNÁN-DEZ-CORTÉS M, et al. VE-cadherin modulates β-catenin/TCF-4 to enhance vasculogenic mimicry [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(2): 135-45.
- [5] CHEN D, CHENG L, CAO H, et al. Role of microRNA-381 in bladder cancer growth and metastasis with the involvement of BMI1 and the Rho/ROCK axis [J]. BMC Urol, 2021, 21(1): 5.
- [6] 张哲哲, 齐超, 张晓玲, 等. 右美托咪定对结肠癌模型大鼠的治疗作用及对RhoA/ROCK1信号通路的影响[J]. 中国医院用药评价与分析(ZHANG Z Z, QI C, ZHANG X L, et al. Therapeutic effects of dexmedetomidine on colon cancer model rats and its effects on RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China), 2022, 22(2): 188-92.
- [7] 卢睿瑾, 杜玉梅, 黄世莹, 等. 鸦胆子苦醇通过RhoA/ROCK1信 号通路抑制人结直肠癌细胞HCT-116的侵袭和迁移[J]. 中国 药理学通报(LU R J, DU Y M, HUANG S Y, et al. Brusatol inhibits migration and invasion of colorectal cancer HCT-116 cells via suppressing RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2021, 37(10): 1360-5.
- [8] 张美楠,孙鹏冲,魏佳琪,等.苍术素调节cGAS-STING信号通路介导的免疫反应对肺癌细胞恶性生物学行为的影响[J].标记免疫分析与临床(ZHANG M N, SUN P C, WEI J Q, et al. The effect of atractylodin on the malignant biological behavior of lung cancer cells by regulating the immune response mediated by cGAS-STING signal pathway [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine), 2023, 30(3): 499-503.
- [9] 朱亚兰, 吕世文, 曾晨欣, 等. 苍术素对非小细胞肺癌细胞上 皮间质转化的影响及机制研究[J]. 浙江医学(ZHU Y L, LÜ S W, ZENG C X, et al. Effect of atractylodin on epithelial mesenchymal transformation and its mechanism in non-small-cell lung cancer cells [J]. Zhejiang Medical Journal), 2023, 45(10): 1013-8.
- [10] 王洋,田伟峰,毛文娟.基于RhoA/ROCK通路探讨桔梗提取物对类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及转移的影响 [J]. 中国新药与临床杂志(WANG Y, TIAN W F, MAO W J, et al. To investigate the effects of platycodon platycodon extract on proliferation and metastasis of fibroblastoid synovial cells in rheumatoid arthritis based on RhoA/ROCK pathway [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies), 2023, 24(3): 1-9.
- [11] GEORGANTZOGLOU N, PERGARIS A, MASAOUTIS C, et

al. Extracellular vesicles as biomarkers carriers in bladder cancer: diagnosis, surveillance, and treatment [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2744-58.

- [12] MATUSZCZAK M, KILJAŃCZYK A, SALAGIERSKI M. A liquid biopsy in bladder cancer-the current landscape in urinary biomarkers [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8597-638.
- [13] 肖峰,姜锡男,舒露,等. ECM1基因在膀胱癌中的表达及其与 临床病理特征及预后关系[J]. 实用医学杂志(XIAO F, JIANG X N, SHU L, et al. Expression of ECM1 gene in bladder cancer and its relationships with clinical pathological features and prognosis [J]. The Journal of Practical Medicine), 2023, 39(20): 2629-32,37.
- [14] GILL E, PERKS C M. Mini-review: current bladder cancer treatment-the need for improvement [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(3): 1557-69.
- [15] ACHARYA B, CHAIJAROENKUL W, NA-BANGCHANG K. Atractylodin inhibited the migration and induced autophagy in cholangiocarcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and p38MAPK signalling pathways [J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(9): 1191-200.
- [16] VANAROJ P, CHAIJAROENKUL W, NA-BANGCHANG K. Atractylodin and β-eudesmol from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. inhibit cholangiocarcinoma cell proliferation by downregulating the notch signaling pathway [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2023, 24(2): 551-8.
- [17] ZHANG T, LI S M, LI Y N, et al. Atractylodin induces apoptosis and inhibits the migration of A549 lung cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways [J]. Molecules, 2022, 27(9): 2946.

- [18] 郭小丽,杨昌明,王婵,等.布托啡诺调节缺氧诱导因子-1α/血 管内皮生长因子信号通路对宫颈癌细胞增殖、迁移和血管 生成的影响[J].中国性科学(GUO X L, YANG C M, WANG C, et al. Impacts of butorphanol on the proliferation, migration and angiogenesis of cervical cancer cells by regulating hypoxiainducible factor-1α/vascular endothelial growth factor signaling pathway [J]. Chinese Journal of Human Sexuality), 2024, 33(1): 106-10.
- [19] ZHANG J G, ZHOU H M, ZHANG X, et al. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1α, RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 32-40.
- [20] 刘丽, 王哲近, 潘邦伦, 等. GCNT3通过 PI3K/Akt/mTOR和 RhoA/ROCK/Cofilin途径促进肝癌细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(LIU L, WANG Z J, PAN B L, et al. GCNT3 promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and RhoA/ROCK/Cofilin pathways [J]. Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology), 2023, 39(4): 562-72.
- [21] ZHANG Z, NONG L, CHEN M, et al. Baicalein suppresses vasculogenic mimicry through inhibiting RhoA/ROCK expression in lung cancer A549 cell line [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2020, 52(9): 1007-15.
- [22] 安海燕,林俊豪,孙海涛,等.鳖甲煎丸通过RhoA/ROCK信号 通路抑制肝癌细胞血管形成拟态的生成[J].南方医科大学 学报(AN H Y, LIN J H, SUN H T, et al. Biejiajian pills inhibits hepatoma carcinoma cell vasculogenic mimicry by suppressing RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Journal of Southern Medical University), 2018, 38(8): 997-1001.