

芒柄花黄素抑制TLR4/NF- κ B通路对胆囊癌细胞增殖、侵袭、上皮-间质转化的影响

任毅 武飏*

(太原市中心医院肝胆胰外科, 太原 030009)

摘要 该研究旨在探究芒柄花黄素(formononetin, FMNT)抑制Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路对胆囊癌细胞增殖、侵袭、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。将胆囊癌细胞GBC-SD分为对照组、低浓度FMNT组、中浓度FMNT组、高浓度FMNT组、FMNT+脂多糖组。分别利用CCK-8测定细胞增殖情况; 伤口愈合实验检测细胞迁移情况; Transwell小室评估细胞侵袭情况; Annexin V-FITC染色检测细胞凋亡情况; Western blot检测细胞中上皮型钙黏附素(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)和TLR4、NF- κ B蛋白表达情况。结果显示, 与对照组比较, 低浓度FMNT组、中浓度FMNT组、高浓度FMNT组GBC-SD细胞D值、集落形成率、伤口愈合率、侵袭细胞数以及Vimentin、TLR4和NF- κ B蛋白表达水平降低, 细胞凋亡率、E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$), 且FMNT浓度越高, 变化越明显($P<0.05$); 与高浓度FMNT组相比, FMNT+脂多糖组GBC-SD细胞D值、集落形成率、伤口愈合率、侵袭细胞数以及Vimentin、TLR4和NF- κ B蛋白表达水平升高, 细胞凋亡率、E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。总结得出, FMNT通过抑制TLR4/NF- κ B通路抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭和EMT。

关键词 芒柄花黄素; TLR4/NF- κ B通路; 胆囊癌细胞; 增殖; 侵袭; 上皮-间质转化

Impacts of Formononetin on the Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition of Gallbladder Cancer Cells by Inhibiting the TLR4/NF- κ B Pathway

REN Yi, WU Biao*

(Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030009, China)

Abstract The purpose of this study was to explore the impacts of FMNT (formononetin) on the proliferation, invasion, and EMT (epithelial-mesenchymal transition) of gallbladder cancer cells by inhibiting the TLR4 (Toll-like receptor 4)/NF- κ B (nuclear factor kappa B) signaling pathway. GBC-SD gallbladder cancer cells were assigned into control group, low concentration FMNT group, medium concentration FMNT group, high concentration FMNT group, and FMNT+lipopolysaccharide group. CCK-8 was used to measure cell proliferation. The wound healing experiment was used to detect cell migration. Transwell chamber was used to evaluate cell invasion. Annexin V-FITC staining was used to detect cell apoptosis. In addition, Western blot was used to detect the expression of E-cadherin, Vimentin, TLR4, and NF- κ B proteins in cells. The results showed that compared with the control group, the *D* value, colony formation rate, wound healing rate, number of invasive cells, Vimentin, TLR4, and NF- κ B protein expression levels of GBC-SD cells in the low concentration FMNT group, medium concentration FMNT group

收稿日期: 2024-12-30

接受日期: 2025-04-17

*通信作者。Tel: 13803413136, E-mail: 1805332765@qq.com

Received: December 30, 2024

Accepted: April 17, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13803413136, E-mail: 1805332765@qq.com

and high concentration FMNT group decreased, while the apoptosis rate and E-cadherin protein expression level increased ($P<0.05$). The higher the FMNT concentration, the more significant the changes ($P<0.05$). Compared with the high concentration FMNT group, the *D* value, colony formation rate, wound healing rate, number of invasive cells, Vimentin, TLR4, and NF- κ B protein expression levels of GBC-SD cells in FMNT+lipopolysaccharide group increased, while the apoptosis rate and E-cadherin protein expression level decreased ($P<0.05$). It is concluded that FMNT inhibits proliferation, invasion, and EMT of gallbladder cancer cells by inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway.

Keywords formononetin; TLR4/NF- κ B pathway; gallbladder cancer cells; proliferation; invasion; epithelial mesenchymal transition

胆囊癌是一种相对罕见的恶性肿瘤,许多风险因素与胆囊癌的发展有关,导致其预后较差。胆囊癌可能表现为胆囊肿块病变、胆囊壁局部或弥漫性增厚以及胆囊腔内肿块^[1]。胆囊癌通常起源于胆管系统中的上皮细胞,约占胆道系统肿瘤的2/3,且发病率呈上升趋势,其细胞异质性高^[2]。由于早期无症状、发病隐匿、进展迅速,只有不到10%的患者在诊断后适合手术治疗。虽然化疗、靶向治疗和免疫方法提供了其他治疗选择,但只有少数患者预后良好^[3]。因此,需要对胆囊癌的发展机制进行深入探索以助于开发更有效的治疗方案。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)通路被激活后,通过髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖性和非依赖性途径激活干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)、核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK),进而诱导II型干扰素和促炎细胞因子的表达^[4]。在胆囊癌组织中,miRNA-146b-5p表达水平降低,TLR4表达水平增加,间接激活NF- κ B信号通路,从而调控胆囊癌的发展^[5]。芒柄花黄素(formononetin, FMNT)是具有化疗活性且毒性较小的生物活性物质,能够上调磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、p38、p21和p53等关键因子以及下调NF- κ B,并抑制Janus激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)、AKT以及MAPK通路,在抑制癌细胞的细胞增殖、侵袭和转移能力方面发挥重要作用,还诱导细胞凋亡和细胞周期停滞^[6]。最新研究发现,FMNT通过抑制干扰素刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)-NF- κ B通路和干扰程序性死亡配体1的激活来抑制乳腺肿瘤的发生^[7]。另有研究表明,

FMNT通过TLR4/NF- κ B信号通路抑制葡萄糖和缺氧再灌注诱导的BV2小胶质细胞神经炎症^[8]。脂多糖可被TLR4识别并激活先天免疫系统,随后促进NF- κ B的活化和促炎性细胞因子的产生,基于以上背景,本研究旨在评估FMNT对胆囊癌细胞增殖、侵袭、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响,并通过脂多糖处理探究TLR4/NF- κ B通路是否介导此作用,为胆囊癌的治疗靶点和药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胆囊癌细胞GBC-SD(货号:CL-0085)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂

FMNT(货号:B20836)购自上海源叶生物科技有限公司;脂多糖(TLR4激活剂,货号:HY-D1056)购自美国MCE公司;Matrigel基质(货号:354234)购自美国Corning公司;ANNEXIN V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(货号:CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司;RIPA裂解液(货号:P0013B)、Cell Counting Kit-8(货号:C0038)购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号:JLC-SJ2508)购自上海晶抗生物工程有限公司;增强型ECL化学发光检测试剂盒(货号:E411-04)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;上皮型钙黏附素(E-cadherin)单抗(货号:ab314063)、波形蛋白(Vimentin)单抗(货号:ab137321)、TLR4单抗(货号:ab217274)、NF- κ B单抗(货号:ab32360)、GAPDH单抗(货号:ab9485)和羊抗兔IgG二抗(货号:ab205718)购自英国Abcam公司。

1.3 细胞分离培养及分组

GBC-SD细胞培养在RPMI-1640+10% FBS+1%

P/S的培养基中,培养条件为:37℃、5% CO₂。待生长至对数期时,将GBC-SD细胞分为对照组、低浓度FMNT组、中浓度FMNT组、高浓度FMNT组、FMNT+脂多糖组,低、中、高浓度FMNT组细胞分别用30、50和80 μmol/L FMNT处理^[9], FMNT+脂多糖组细胞用80 μmol/L FMNT和1 μg/mL脂多糖同时处理^[10]。GBC-SD细胞培养48 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.4 CCK-8和集落形成实验检测细胞增殖情况

将细胞以 1×10^4 /孔的密度接种到96孔板中分组培养。分别于24 h、48 h、72 h后使用CCK-8试剂盒评估细胞活力。将10 μL CCK-8试剂添加到每个孔中,并在37℃下孵育细胞2 h。使用微孔板读数仪在450 nm波长处检测吸光度(*D*)值。在6孔板中接种1 000个细胞(细胞悬液浓度为1 000个/mL)并培养7天,清洗后70%甲醇4℃固定20 min,0.5%结晶紫室温染色30 min,计算集落形成率。

1.5 伤口愈合实验检测迁移情况

将GBC-SD细胞以 5×10^5 /孔的密度接种到6孔板中,当细胞达到80%汇合度时,使用200 μL移液器尖头划出划痕,使用无血清培养基,并按1.3分组处理。37℃孵育0和48 h后,显微镜观察并记录GBC-SD细胞伤口之间的距离,愈合率(%)= $[(W_{0h}-W_{48h})/W_{0h}] \times 100\%$ 。

1.6 Transwell评估侵袭情况

将Matrigel于4℃溶解过夜,用无血清培养基稀释后加入上室,在37℃、5% CO₂条件下孵育30 min,形成凝胶。将GBC-SD细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于上室,将添加20% FBS的DMEM培养基加入下室。37℃孵育24 h后,用70%乙醇处理侵袭细胞,0.5%结晶紫室温染色20 min,在光学显微镜下选取5个视野计数。

1.7 Annexin V-FITC染色检测凋亡情况

用预冷PBS将经不同处理后的培养细胞清洗3

次,再将细胞悬浮于结合缓冲液中,室温避光条件下用Annexin V-FITC和碘化丙啶染色15 min,并加400 μL PBS,立即使用流式细胞仪检测凋亡细胞比例。

1.8 Western blot检测E-cadherin、Vimentin、TLR4和NF-κB蛋白表达情况

使用RIPA裂解液提取GBC-SD中的蛋白,并使用BCA试剂盒进行定量分析。随后,通过12% SDS-PAGE分离25 μg蛋白质/泳道,将其转移到PVDF膜上,在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h。将膜与针对E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、GAPDH(1:2 500)、TLR4(1:1 000)和NF-κB(1:1 000)的一抗在4℃下孵育过夜。初次孵育后,用TBST洗涤膜3次,并用HRP偶联的二抗(1:50 000)在室温下探测1 h。使用增强化学发光试剂盒对蛋白质带进行可视化,并使用ImageJ软件进行量化。

1.9 统计分析

所有实验数据表示为平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)。SPSS软件进行统计分析,通过单因素方差分析比较多组间差异,进一步两组间比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表明差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 各组GBC-SD细胞形态变化

对照组GBC-SD细胞为梭形,排列松散;低浓度FMNT组、中浓度FMNT组、高浓度FMNT组GBC-SD细胞向多边形转变,细胞间出现粘连;FMNT+脂多糖组GBC-SD细胞为梭形;见图1。

2.2 各组GBC-SD细胞增殖比较

与对照组比较,低浓度FMNT组GBC-SD细胞的 D_{450} 值和集落形成率均降低($P < 0.05$);与低浓度FMNT组比较,中浓度FMNT组GBC-SD细胞的 D_{450} 值和集落形成率均降低($P < 0.05$);与中浓度FMNT组比较,高浓度FMNT组GBC-SD细胞的 D_{450} 值和集

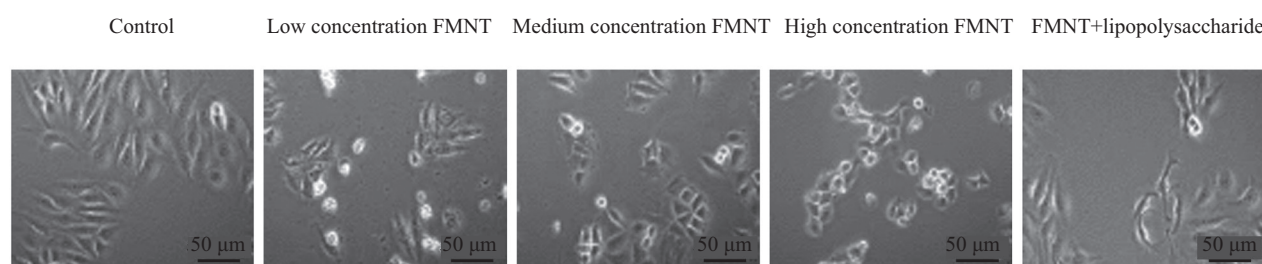


图1 各组GBC-SD细胞形态变化

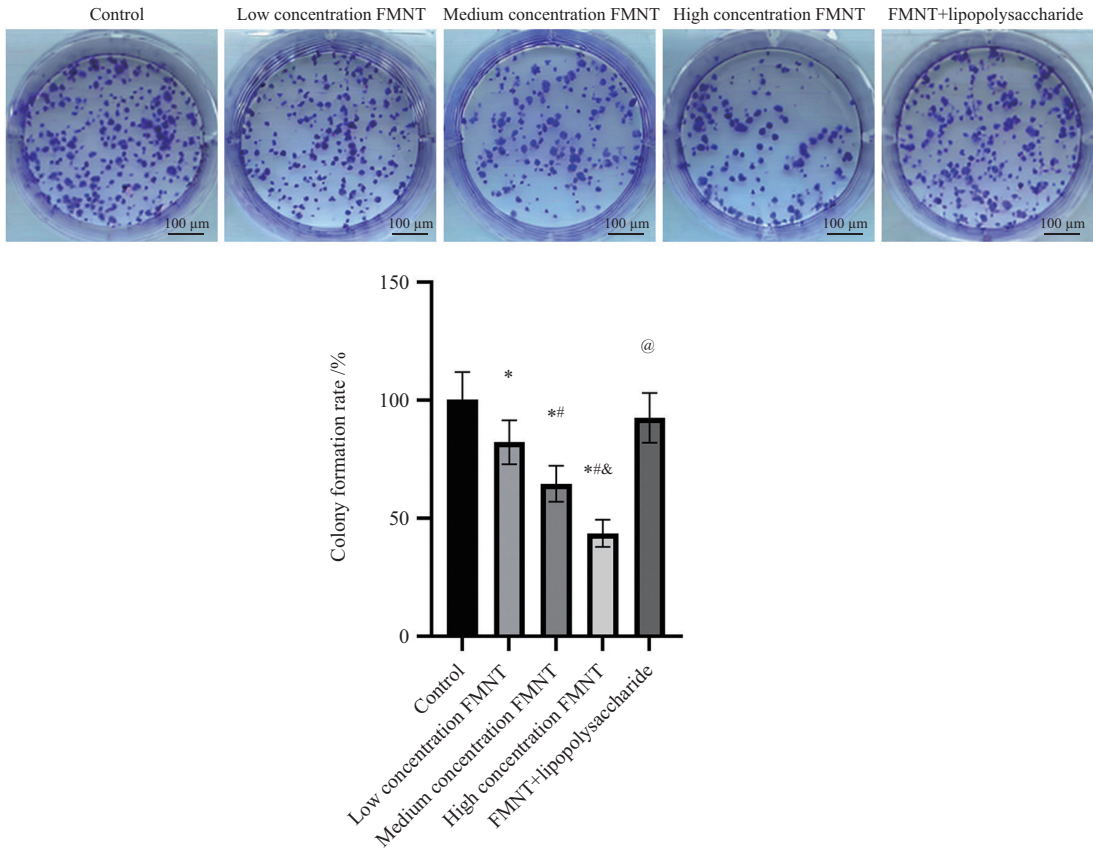
Fig.1 Morphological changes of GBC-SD cells in each group

落形成率均降低 ($P<0.05$); 与高浓度 FMNT 组比较, FMNT+脂多糖组 GBC-SD 细胞的 D_{450} 值和集落形成率均升高 ($P<0.05$); 见图 2 与表 1。

2.3 各组 GBC-SD 细胞迁移比较

与对照组比较, 低浓度 FMNT 组 GBC-SD 细

胞伤口愈合率降低 ($P<0.05$); 与低浓度 FMNT 组比较, 中浓度 FMNT 组 GBC-SD 细胞伤口愈合率降低 ($P<0.05$); 与中浓度 FMNT 组比较, 高浓度 FMNT 组 GBC-SD 细胞伤口愈合率降低 ($P<0.05$); 与高浓度 FMNT 组比较, FMNT+脂多糖组 GBC-SD 细胞伤口



* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与低浓度 FMNT 组比较; & $P<0.05$, 与中浓度 FMNT 组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度 FMNT 组比较。 $n=6$ 。
* $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P<0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P<0.05$ compared with the high concentration FMNT group. $n=6$.

图2 各组 GBC-SD 细胞的集落形成比较
Fig.2 Colony formation of GBC-SD cells in each group

表1 各组 GBC-SD 细胞增殖比较
Table 1 Comparison of GBC-SD cell proliferation in each group

分组 Groups	D_{450}		
	24 h	48 h	72 h
Control	0.47±0.06	0.64±0.08	0.95±0.11
Low concentration FMNT	0.39±0.05*	0.53±0.06*	0.80±0.09*
Medium concentration FMNT	0.31±0.04*#	0.43±0.05*#	0.64±0.08*#
High concentration FMNT	0.23±0.04*#&	0.32±0.04*#&	0.48±0.06*#&
FMNT+lipopolysaccharide	0.43±0.05@	0.58±0.07@	0.87±0.10@
F	23.593	25.342	26.470
P	0.000	0.000	0.000

* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与低浓度 FMNT 组比较; & $P<0.05$, 与中浓度 FMNT 组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度 FMNT 组比较。 $n=6$ 。
* $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P<0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P<0.05$ compared with the high concentration FMNT group. $n=6$.

愈合率升高($P<0.05$); 见图3。

2.4 各组GBC-SD细胞侵袭比较

与对照组比较, 低浓度FMNT组 GBC-SD细胞侵袭数降低($P<0.05$); 与低浓度FMNT组比较, 中浓度FMNT组 GBC-SD细胞侵袭数降低($P<0.05$); 与中浓度FMNT组比较, 高浓度FMNT组 GBC-SD细胞侵袭数降低($P<0.05$); 与高浓度FMNT组比较, FMNT+脂多糖组 GBC-SD细胞侵袭数升高($P<0.05$); 见图4。

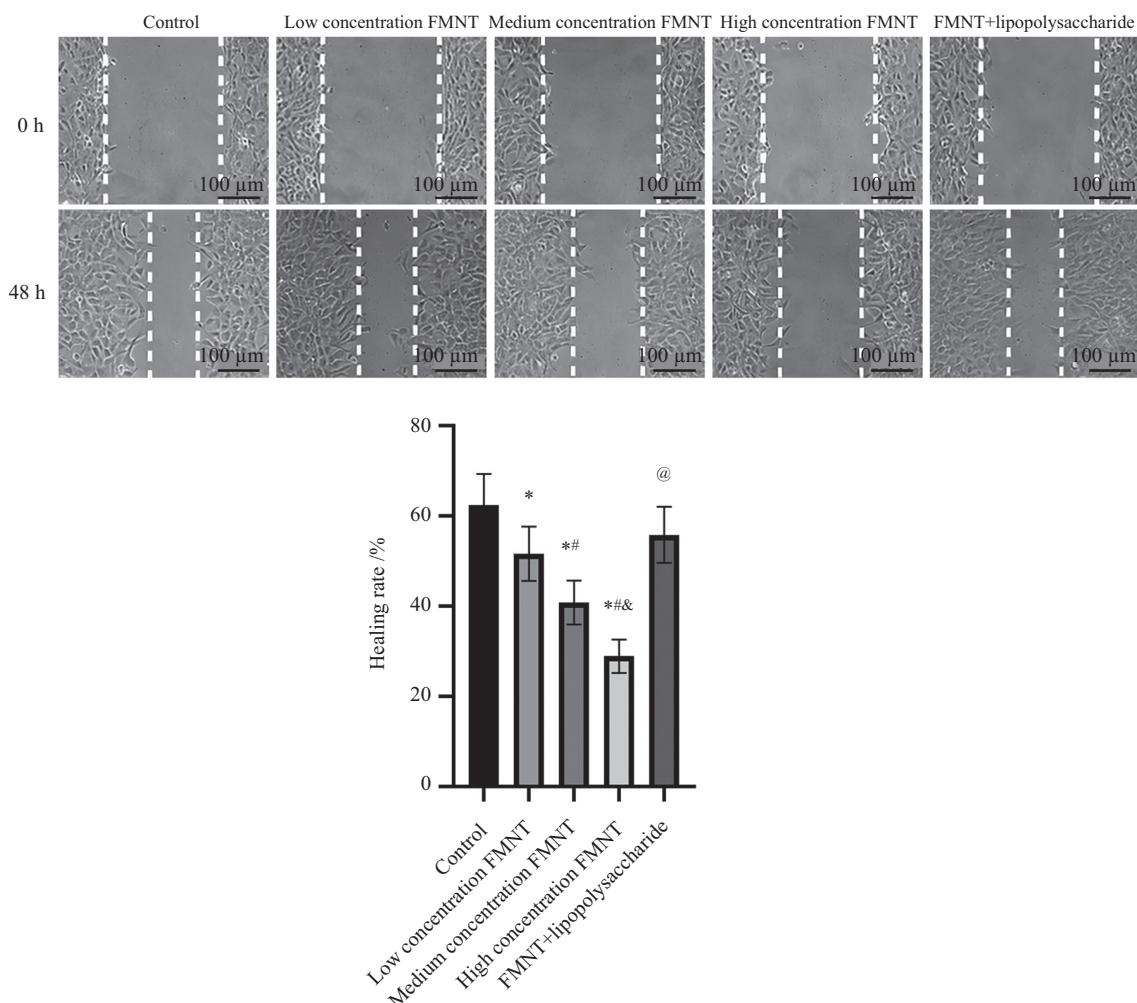
2.5 各组GBC-SD细胞凋亡比较

与对照组比较, 低浓度FMNT组 GBC-SD细胞凋亡率升高($P<0.05$); 与低浓度FMNT组比较, 中浓度FMNT组 GBC-SD细胞凋亡率升高($P<0.05$); 与中浓度FMNT组比较, 高浓度FMNT组 GBC-SD细胞凋亡

率升高($P<0.05$); 与高浓度FMNT组相比, FMNT+脂多糖组 GBC-SD细胞凋亡率降低($P<0.05$); 见图5。

2.6 各组GBC-SD细胞中E-cadherin和Vimentin表达水平比较

与对照组比较, 低浓度FMNT组 GBC-SD细胞中E-cadherin蛋白表达水平上升, Vimentin蛋白表达水平下降($P<0.05$); 与低浓度FMNT组比较, 中浓度FMNT组 GBC-SD细胞中E-cadherin蛋白表达水平上升, Vimentin蛋白表达水平下降($P<0.05$); 与中浓度FMNT组比较, 高浓度FMNT组 GBC-SD细胞中E-cadherin蛋白表达水平上升, Vimentin蛋白表达水平下降($P<0.05$); 与高浓度FMNT组相比, FMNT+脂多糖组 GBC-SD细胞中E-cadherin蛋白表达水平下降, Vimentin蛋白表达水平上升($P<0.05$); 见图6。

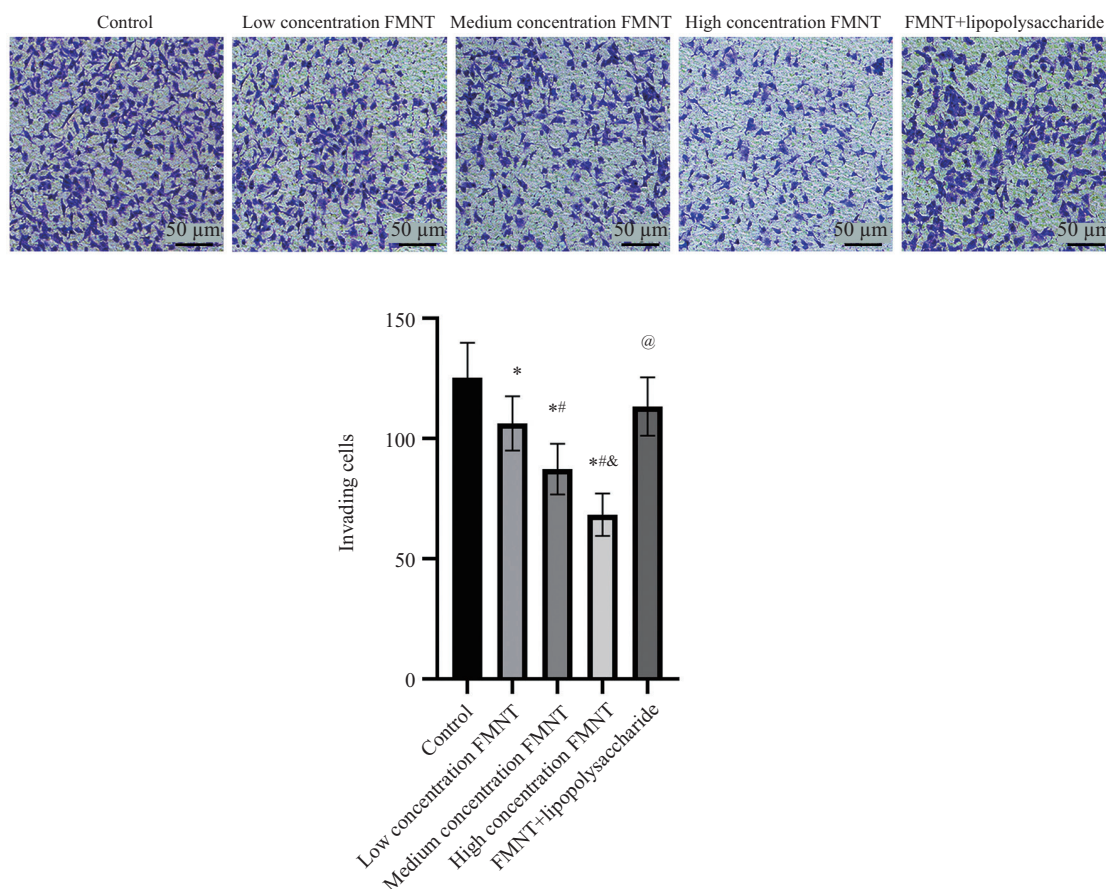


* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与低浓度FMNT组比较; & $P<0.05$, 与中浓度FMNT组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度FMNT组比较。 $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P<0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P<0.05$ compared with the high concentration FMNT group. $n=6$ 。

图3 各组GBC-SD细胞的迁移情况和愈合率比较

Fig.3 Comparison of migration and healing rates of GBC-SD cells in each group



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低浓度FMNT组比较; * $P < 0.05$, 与中浓度FMNT组比较; @ $P < 0.05$, 与高浓度FMNT组比较。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the low concentration FMNT group; * $P < 0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P < 0.05$ compared with the high concentration FMNT group. $n = 6$ 。

图4 各组GBC-SD细胞侵袭能力和细胞侵袭数比较

Fig.4 Comparison of invasion capacity and the number of invasions of GBC-SD cells in each group

2.7 各组GBC-SD细胞中TLR4和NF- κ B蛋白表达水平比较

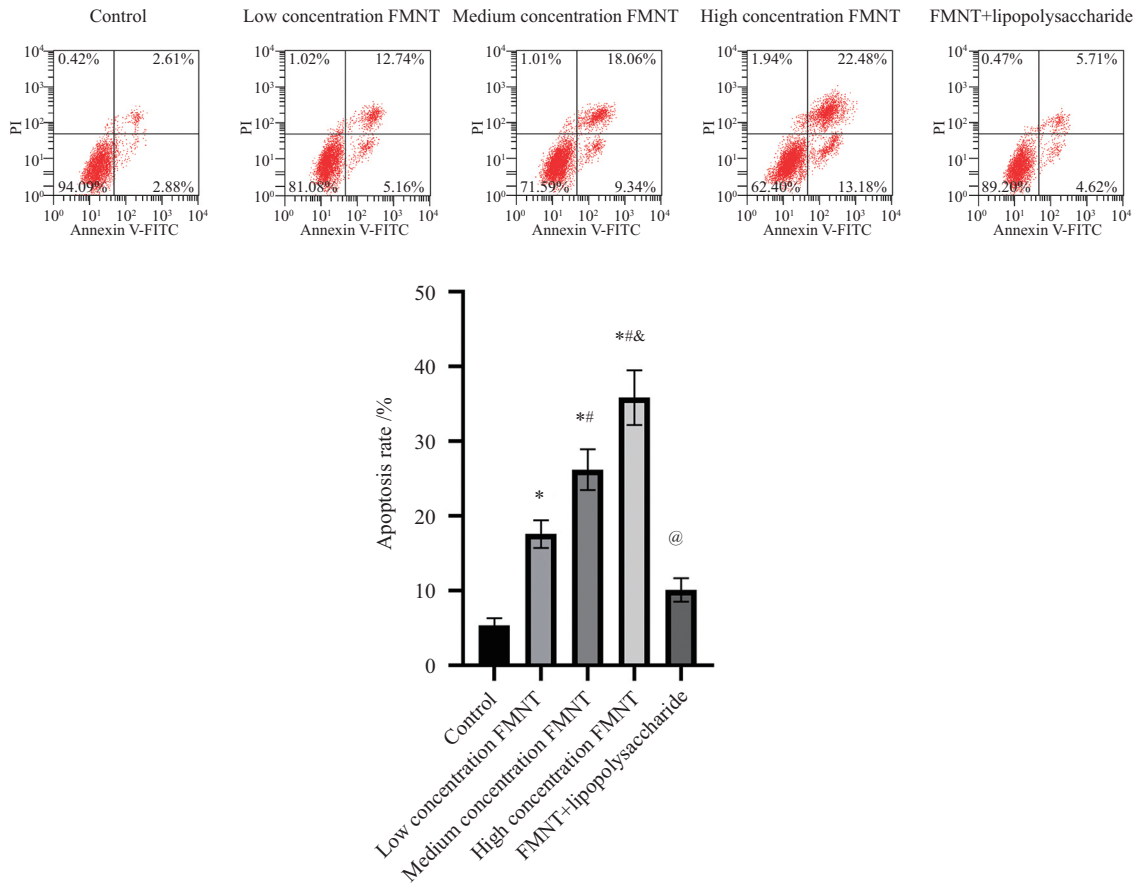
与对照组比较, 低浓度FMNT组GBC-SD细胞中TLR4和NF- κ B蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 与低浓度FMNT组比较, 中浓度FMNT组TLR4和NF- κ B蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 与中浓度FMNT组比较, 高浓度FMNT组TLR4和NF- κ B蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 与高浓度FMNT组相比, FMNT+脂多糖组TLR4和NF- κ B蛋白表达水平升高($P < 0.05$); 见图7。

3 讨论

胆囊癌是胆道系统中最常见的癌症, 由于患者通常无症状或表现出与常见良性疾病相似的非特异性症状, 因此诊断较为困难。手术切除是唯一的治愈性疗法, 且早期非局部晚期阶段是最佳治疗时间点。但胆囊癌通常表现为局部晚期, 且具有侵袭性,

无法完全治愈^[11]。胆囊癌的危险因素主要与慢性胆管炎症有关, 包括胆结石病、透明变性胆囊炎、革兰氏阴性菌慢性感染、肥胖和先天性胰胆发育异常等^[12]。在高达90%的病例中, 胆囊癌与胆结石和长期存在的大胆结石(>3 cm)密切相关。目前的化疗方案以卡培他滨和顺铂作为一线治疗, 以5-氟尿嘧啶和奥沙利铂-伊立替康作为二线治疗^[13]。

FMNT是豆科植物黄芪和禾本科植物燕麦中含量丰富的黄酮类化合物的次级代谢产物。在传统中医上, 黄芪用于治疗炎症性疾病、免疫疾病和癌症, 而FMNT是黄芪的重要生物活性代谢产物^[14]。FMNT是一种属于植物雌激素类的异黄酮, 通过依赖和不依赖雌激素的机制表现出对健康有益的广泛生理效应^[15]。FMNT通过调节炎症、血管生成、细胞周期和细胞凋亡在疾病管理中发挥着重要作用, 其已被证实通过不同的信号转导途径来发挥抗癌作



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低浓度FMNT组比较; & $P < 0.05$, 与中浓度FMNT组比较; @ $P < 0.05$, 与高浓度FMNT组比较。 $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P < 0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P < 0.05$ compared with the high concentration FMNT group. $n=6$ 。

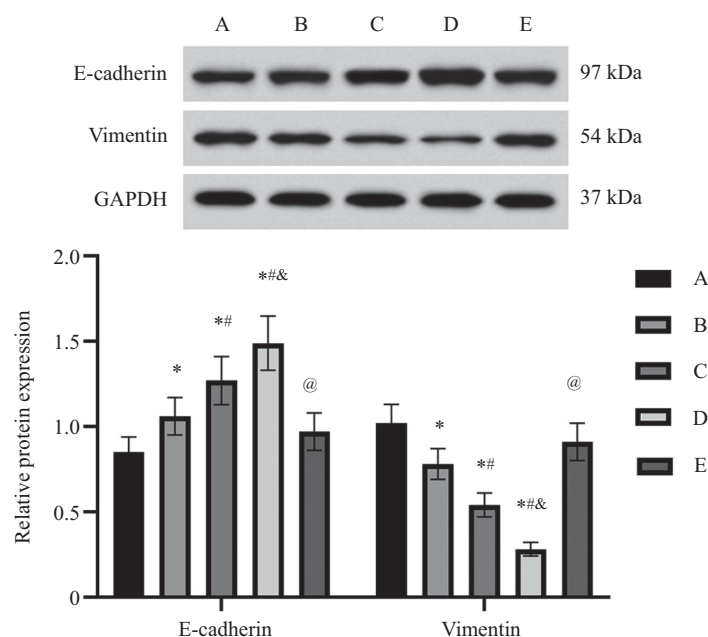
图5 流式细胞术检测GBC-SD细胞凋亡和凋亡率比较

Fig.5 Flow cytometry detection of GBC-SD cell apoptosis and comparison of apoptosis rates

用,例如STAT、磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT和MAPK信号通路,其对各种类型癌症都有抗癌潜力,例如乳腺癌、宫颈癌、头颈癌、结肠癌和卵巢癌^[16]。有研究表明,FMNT通过抑制人头颈部鳞状细胞癌细胞中的丝裂原活化蛋白激酶和NF- κ B磷酸化来诱导细胞凋亡^[17]。基于此,本研究探究FMNT对胆囊癌细胞的影响,结果发现FMNT能够抑制GBC-SD细胞增殖、迁移和侵袭,并降低Vimentin蛋白表达水平;促进GBC-SD细胞凋亡和E-cadherin蛋白表达,且浓度越高促进作用越明显,提示FMNT可能抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭和EMT。此外,由于FMNT毒性较小,其在胆囊癌的晚期治疗中作为胆囊癌治疗的辅助药物可以降低化疗引起的有害毒性作用,可能改善晚期患者的不良预后。

TLR是跨膜受体,主要由先天免疫细胞表达,可分为细胞表面TLR(TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、

TLR6)和细胞内TLR(TLR3、TLR7、TLR8、TLR9)。过去20年来,哺乳动物TLR下游的潜在信号通路已被广泛研究^[18]。例如,黄芪甲苷通过TLR4/NF- κ B/STAT3信号通路调节巨噬细胞极化,抑制肝癌进展^[19]。EMT是造成肿瘤细胞侵袭性的众所周知的机制。许多分子通路可以调节癌细胞中的EMT机制,NF- κ B就是其中之一。NF- κ B的激活可通过EMT诱导增强肿瘤细胞的转移能力,已在包括脑癌、乳腺癌、肺癌和胃癌等在内的各种癌症中得到证实。在NF- κ B驱动的EMT诱导后,E-cadherin水平显著下降,而神经型钙黏附素(N-cadherin)和Vimentin水平上升。非编码RNA也可能作为上游介质,调节癌症中的NF- κ B/EMT轴^[20]。阿司匹林可能通过显著降低肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、NF- κ B和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平来显著抑制GBC-SD细胞生长^[21]。因此本研

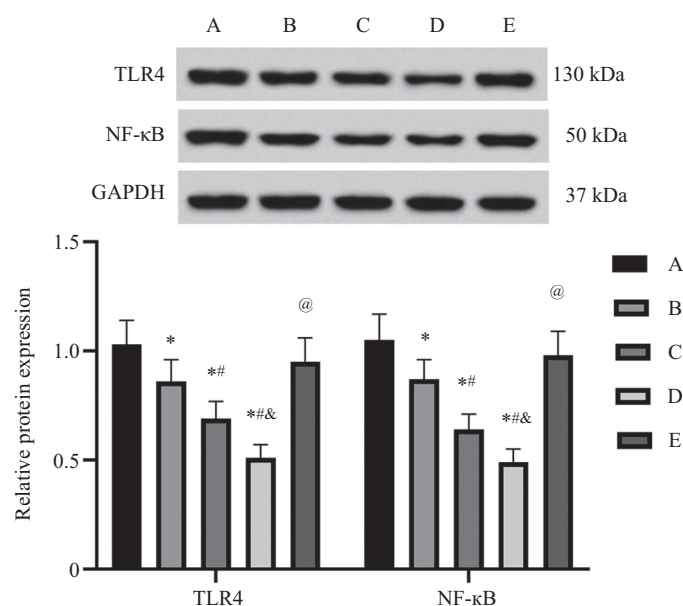


A: 对照组; B: 低浓度FMNT组; C: 中浓度FMNT组; D: 高浓度FMNT组; E: FMNT+脂多糖组。* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与低浓度FMNT组比较; & $P<0.05$, 与中浓度FMNT组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度FMNT组比较。n=6。

A: control group; B: low concentration FMNT group; C: medium concentration FMNT group; D: high concentration FMNT group; E: FMNT+lipopolysaccharide group. * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P<0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P<0.05$ compared with the high concentration FMNT group. n=6.

图6 GBC-SD细胞中E-cadherin和Vimentin蛋白表达条带和相对蛋白表达量比较

Fig.6 E-cadherin and Vimentin protein expression bands and comparison of relative protein expression levels in GBC-SD cells



A: 对照组; B: 低浓度FMNT组; C: 中浓度FMNT组; D: 高浓度FMNT组; E: FMNT+脂多糖组。* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与低浓度FMNT组比较; & $P<0.05$, 与中浓度FMNT组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度FMNT组比较。n=6。

A: control group; B: low concentration FMNT group; C: medium concentration FMNT group; D: high concentration FMNT group; E: FMNT+lipopolysaccharide group. * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low concentration FMNT group; & $P<0.05$ compared with the medium concentration FMNT group; @ $P<0.05$ compared with the high concentration FMNT group. n=6.

图7 GBC-SD细胞中TLR4和NF- κ B蛋白表达条带和相对蛋白表达量比较

Fig.7 TLR4 and NF- κ B protein expression bands and comparison of relative protein expression levels in GBC-SD cells

究探究了TLR4/NF- κ B通路在胆囊癌中的作用,结果表明,FMNT的加入抑制了GBC-SD细胞中TLR4和NF- κ B的蛋白表达,抑制程度与浓度呈正相关;脂多糖作为TLR4激活剂,能够逆转FMNT对GBC-SD细胞中TLR4和NF- κ B蛋白表达的抑制,并促进GBC-SD增殖、迁移、侵袭和EMT,抑制凋亡。这提示FMNT对GBC-SD细胞的影响可能与TLR4/NF- κ B通路相关。

综上所述,FMNT可能通过抑制TLR4/NF- κ B通路抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭和EMT。本研究表明FMNT可能是治疗胆囊癌发生和发展的有效药物,其作用机制可能包括TLR4/NF- κ B通路,由于也有研究表明FMNT对PI3K/AKT的影响,因此,后续研究可继续探究其他可能的作用机制。但本研究未进行动物实验,后续可在体内模型中验证。

参考文献 (References)

- [1] GANESHAN D, KAMBADAKONE A, NIKOLAIDIS P, et al. Current update on gallbladder carcinoma [J]. *Abdom Radiol*, 2021, 46(6): 2474-89.
- [2] MAO W, DENG F, WANG D, et al. Treatment of advanced gallbladder cancer: a SEER-based study [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(1): 141-50.
- [3] CHEN P, WANG Y, LI J, et al. Diversity and intratumoral heterogeneity in human gallbladder cancer progression revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(6): 462.
- [4] KIM H J, KIM H, LEE J H, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging [J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 67.
- [5] OUYANG B, PAN N, ZHANG H, et al. miR-146b-5p inhibits tumorigenesis and metastasis of gallbladder cancer by targeting Toll-like receptor 4 via the nuclear factor- κ B pathway [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4): 15.
- [6] ALIYA S, ALHAMMADI M, PARK U, et al. The potential role of formononetin in cancer treatment: an updated review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168(1): 115811.
- [7] LIU H, WANG Z, LIU Z. Formononetin restrains tumorigenesis of breast tumor by restraining STING-NF- κ B and interfering with the activation of PD-L1 [J]. *Discov Med*, 2024, 36(182): 613-20.
- [8] CHEN J, CAI Y, WEI D, et al. Formononetin inhibits neuroinflammation in BV2 microglia induced by glucose and oxygen deprivation reperfusion through TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Brain Res*, 2024, 1845(1): 149218.
- [9] WANG W S, ZHAO C S. Formononetin exhibits anticancer activity in gastric carcinoma cell and regulating miR-542-5p [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(3): 215-25.
- [10] 刘辉, 王雅琳, 李福龙, 等. 布托啡诺抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路对卵巢癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响 [J]. *中国优生与遗传杂志* (LIU H, WANG Y L, LI F L, et al. Effects of Butorphanol inhibition of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Chinese Journal of Eugenics and Genetics*), 2022, 30(7): 1107-11.
- [11] LOPES VENDRAMI C, MAGNETTA M J, MITTAL P K, et al. Gallbladder carcinoma and its differential diagnosis at MRI: what radiologists should know [J]. *Radiographics*, 2021, 41(1): 78-95.
- [12] GIRALDO N A, DRILL E, SATRAVADA B A, et al. Comprehensive molecular characterization of gallbladder carcinoma and potential targets for intervention [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(24): 5359-67.
- [13] PAVLIDIS E T, GALANIS I N, PAVLIDIS T E. New trends in diagnosis and management of gallbladder carcinoma [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2024, 16(1): 13-29.
- [14] DING M, BAO Y, LIANG H, et al. Potential mechanisms of formononetin against inflammation and oxidative stress: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15(1): 1368765.
- [15] SINGH L, KAUR H, CHANDRA ARYA G, et al. Neuroprotective potential of formononetin, a naturally occurring isoflavone phytoestrogen [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 103(1): e14353.
- [16] ALMATROODI S A, ALMATROUDI A, KHAN A A, et al. Potential therapeutic targets of formononetin, a type of methoxylated isoflavone, and its role in cancer therapy through the modulation of signal transduction pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9719.
- [17] OH J S, KIM T H, PARK J H, et al. Formononetin induces apoptotic cell death through the suppression of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B phosphorylation in FaDu human head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 700-10.
- [18] LUCHNER M, REINKE S, MILICIC A. TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 142.
- [19] MIN L, WANG H, QI H. Astragaloside IV inhibits the progression of liver cancer by modulating macrophage polarization through the TLR4/NF- κ B/STAT3 signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(3): 1551-66.
- [20] MIRZAEI S, SAGHARI S, BASSIRI F, et al. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: a focus on epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(7): 2770-95.
- [21] ZHU M, HUANG Y, ZHOU Z, et al. Aspirin inhibits the biological behavior of gallbladder carcinoma cells by modulating vascular endothelial growth factor [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(12): 6779-85.