安罗替尼通过调控NF-κB信号通路对脑胶质瘤细胞恶性表型的影响Δ

柳　新[1*]，李青山[1]，谢云鹏[2#]，张圣林[1]，董　怡[1]（1.承德医学院附属医院肿瘤科，河北 承德　067000；2.承德医学院附属医院神经外科，河北 承德　067000）

中图分类号　R965；R739.41　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）02-0192-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.02.12

摘　要　目的　探究安罗替尼通过调控核因子κB（NF-κB）信号通路对脑胶质瘤细胞恶性表型的影响。**方法**　体外培养人脑胶质瘤T98G细胞，以5-氟尿嘧啶为阳性对照药物，考察不同浓度（5、10、20 μmol/L）安罗替尼对该细胞增殖、黏附、迁移、侵袭能力和上皮间质转化（EMT）相关蛋白[上皮钙黏着蛋白（E-cadherin）、神经钙黏着蛋白（N-cadherin）、波形蛋白（vimentin）、纤维连接蛋白（FN）]表达的影响，并通过加入NF-κB信号通路抑制剂（BAY 11-7082）和激活剂（prostratin）来验证安罗替尼上述作用的可能机制。**结果**　5、10、20 μmol/L的安罗替尼均可显著降低细胞的增殖活力（5 μmol/L安罗替尼组除外）和迁移率，显著减少黏附细胞数和侵袭细胞数，显著上调E-cadherin蛋白的表达并下调N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达（$P<0.05$），且20 μmol/L安罗替尼的作用与阳性对照药物相当（$P>0.05$）；与10 μmol/L安罗替尼比较，通路抑制剂可使细胞增殖、黏附、迁移、侵袭能力以及N-cadherin、vimentin、FN、磷酸化NF-κB p65蛋白的表达显著降低，E-cadherin蛋白的表达显著上调（$P<0.05$），而通路激活剂则可使上述指标显著逆转（$P<0.05$）。**结论**　安罗替尼可抑制人脑胶质瘤T98G细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭，上述作用可能与通过抑制NF-κB信号通路进而抑制细胞EMT样进程有关。

关键词　脑胶质瘤；安罗替尼；核因子κB信号通路；上皮间质转化

Effects of anlotinib on the malignant phenotype of glioma cells by mediating NF-κB signaling pathway

LIU Xin[1], LI Qingshan[1], XIE Yunpeng[2], ZHANG Shenglin[1], DONG Yi[1] (1. Dept. of Oncology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China; 2. Dept. of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of anlotinib on the malignant phenotype of glioma cells by regulating the nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway. **METHODS** Human glioma T98G cells were cultured *in vitro*, and 5-fluorouracil was used as positive control to investigate the effects of different concentrations of anlotinib (5, 10, 20 μmol/L) on the ability of proliferation, adhesion, migration and invasion, the expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins [E-cadherin, N-cadherin, vimentin and fibronectin (FN)]. NF-κB signaling pathway inhibitor (BAY 11-7082) and activator (prostratin) were additionally used to verify the possible mechanism of the above effects of anlotinib. **RESULTS** Anlotinib with 5, 10, 20 μmol/L could significantly decrease the activity of cell proliferation (except for 5 μmol/L anlotinib group), migration rate, and the number of adherent cells and invasive cells, could significantly up-regulate the expression of E-cadherin protein while down-regulate the expressions of N-cadherin, vimentin and FN protein ($P<0.05$); the effect of 20 μmol/L anlotinib was similar to that of positive control ($P>0.05$). Compared with 10 μmol/L anlotinib, pathway inhibitor could significantly decrease the ability of proliferation, adhesion, migration and invasion, and the expressions of N-cadherin, vimentin, FN and phosphorylated NF-κB p65 protein, while could significantly up-regulate the expression of E-cadherin protein ($P<0.05$); above indexes were reversed significantly by pathway activator ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Anlotinib may inhibit the proliferation, adhesion, migration and invasion of human glioma T98G cells, which may be associated with the inhibition of the NF-κB signaling pathway, thus inhibiting cell EMT-like processes.

KEYWORDS　glioma; anlotinib; nuclear factor-κB signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition

脑胶质瘤恶性程度高、发展速度快，为临床常见颅内恶性肿瘤，具有高复发率和高病死率的特点。由于脑胶质瘤的位置特殊，早期症状不明显，故大多数患者在确诊时已处于中晚期，错过了最佳手术治疗时机，加之手术后复发率和转移率较高，放化疗毒副作用极大，严重影响了患者的生存质量[1]。可见，探究有效且安全的药物对于脑胶质瘤患者的临床治疗十分必要。

安罗替尼作为一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂，对多种生长因子受体激酶具有抑制作用，且能通过抑制相关转移信号通路来发挥抗肿瘤作用[2]。研究指出，肿瘤细胞的迁移、侵袭与上皮间质转化（epithelial-mesenchymal

Δ**基金项目**　河北省医学科学研究课题（No.20231363）

＊**第一作者**　主治医师，硕士。研究方向：肿瘤学相关疾病的诊疗。E-mail：liuxin662023@163.com

＃**通信作者**　副主任医师，硕士。研究方向：颅内肿瘤、脑血管病等的诊疗。E-mail：xyp830422@163.com

transition，EMT）关系密切，当EMT发生后，肿瘤细胞更具侵袭力，可进一步入侵周围组织、血管及淋巴管等，从而发生远处转移[3]。核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路是经典的信号转导通路，能参与调控肿瘤细胞迁移、侵袭、EMT、血管生成等过程[4—5]。可见，阻断NF-κB信号通路可作为改善肿瘤细胞恶性表型的重要途径。基于此，本研究拟探讨安罗替尼调控NF-κB信号通路对人脑胶质瘤细胞T98G黏附、迁移、侵袭及EMT样进程的影响，旨在为该药治疗脑胶质瘤提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括MCO18AIC型CO_2培养箱（日本SANYO公司）、Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、WMS-1033型倒置荧光显微镜（上海无陌光学仪器有限公司）、FluorChem HD2型凝胶成像系统（美国ProteinSimple公司）等。

1.2 主要药品与试剂

安罗替尼对照品（货号S8726，纯度≥98%）购自美国Selleck Chemicals公司；5-氟尿嘧啶对照品（阳性对照，货号S17073-5g，纯度≥98%）、NF-κB通路抑制剂BAY 11-7082对照品（批号J07HS173399，纯度≥98%）均购自上海源叶生物科技有限公司；NF-κB通路激活剂prostratin对照品（批号0000112801，纯度≥98%）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胎牛血清购自美国Gibco公司；DMEM-H培养基购自北京索莱宝科技有限公司；RIPA裂解液、CCK-8试剂盒均购自日本Dojindo公司；重组人纤维连接蛋白（recombinant human fibronectin，rFN）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；鼠源NF-κB p65、磷酸化NF-κB p65（phosphorylated NF-κB p65，p-NF-κB p65）、上皮钙黏着蛋白（E-cadherin）、神经钙黏着蛋白（N-cadherin）、波形蛋白（vimentin）、纤维连接蛋白（fibronectin，FN）、β-肌动蛋白（β-actin）抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG二抗（批号分别为10021394、10021309、20000374、10010628、10017978、10016772、20000374、20000425）均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 细胞

人脑胶质瘤细胞T98G（编号338721）购自商城北纳创联生物科技有限公司。

2 方法

2.1 人脑胶质瘤T98G细胞培养

取T98G细胞，复苏后接种于DMEM-H培养基（含10%胎牛血清、1%青-链霉素）中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养（培养条件下同），当细胞贴壁至80%～90%时进行传代，取第3代对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响的考察

2.2.1 细胞增殖活力

取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL接种至96孔板中，每孔100 μL。将细胞分为对照组、安罗替尼不同浓度、阳性对照组，每组设置3个复孔。对照组细胞不进行干预；安罗替尼不同浓度组细胞分别用5、10、20 μmol/L的安罗替尼[6]进行干预；阳性对照组细胞用50 mg/L的5-氟尿嘧啶[7]进行干预；同时，设置不加细胞的调零孔作为空白组。培养24 h后，每孔加入CCK-8溶液10 μL，孵育2 h后，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度（OD）值，并按下式计算细胞增殖活力：细胞增殖活力=（$OD_{实验组}-OD_{空白组}$）/（$OD_{对照组}-OD_{空白组}$）。

2.2.2 细胞黏附能力

将20 μg/mL的rFN（以不含胎牛血清的DMEM-H培养基稀释）铺于96孔板中，风干后用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤20 min×3次，备用。取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL接种至6孔板中，每孔50 μL。按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集各组细胞，用胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液（1×10^4个/mL）。取上述单细胞悬液100 μL，接种至上述铺有rFN的96孔板中，于37 ℃培养1 h；以PBS洗涤3次，以甲醇固定10 min后，用结晶紫染液染色15 min；再以PBS洗涤3次，于显微镜下观察细胞黏附情况并记录黏附细胞（呈紫色）数。

2.2.3 细胞迁移和侵袭能力

取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL接种至6孔板中，每孔300 μL。按“2.2.1”项下方法分组、处理。待细胞融合至90%时，用200 μL移液器枪头在每孔底部中央划一直线。分别于培养0、24 h时用显微镜观察并拍照，记录对应的划痕面积（$S_{0\,h}$、$S_{24\,h}$），并按下式计算细胞迁移率：细胞迁移率=（$S_{0\,h}-S_{24\,h}$）/$S_{0\,h}\times100\%$。

取对数生长期细胞，以不含胎牛血清的DMEM-H培养基制成单细胞悬液（1×10^5个/mL），取上述单细胞悬液0.25 mL，置于Transwell小室（需用基质胶处理5 h）上层；取含10%胎牛血清的DMEM-H培养基0.45 mL，置于Transwell小室下层。上室细胞按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，弃去上清液，穿膜细胞用PBS清洗3次，以4%甲醇固定30 min后晾干；用0.1%结晶紫染液染色10 min，用PBS清洗3次，晾干。使用显微镜观察、拍照（每孔随机选择5个不同区域），并使用Image J图像分析软件记录侵袭细胞（呈紫色）数。

2.2.4 细胞EMT相关蛋白的表达情况

取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL接种至6孔板中，每孔300 μL。按“2.2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集各组细胞，提取其蛋白后，进行定量、变性处理。取变性蛋白适量，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜，封闭2 h；以TBST缓冲液洗膜，加入E-cadherin、N-cadherin、vimentin、FN、β-actin一抗（稀释比例分别为1∶2 000、1∶10 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000），4 ℃下孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜，加入

相应IgG二抗（稀释比例为1∶2 000），室温下孵育2 h；以TBST缓冲液洗膜，加入显影液，使用凝胶成像系统成像并采用Image J软件进行分析，以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.3 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响机制的验证

2.3.1 细胞增殖活力

取对数生长期细胞，以2×10^{5}个/mL接种至96孔板中，每孔100 μL。将细胞分为对照组、安罗替尼组、抑制剂组和激活剂组，每组设置3个复孔。对照组细胞不进行干预；安罗替尼组细胞分别用10 μmol/L的安罗替尼（浓度参考“2.2”项下各实验结果设置）进行干预；抑制剂组细胞用10 μmol/L的安罗替尼+5 μmol/L的NF-κB通路抑制剂BAY 11-7082[8]进行干预；激活剂组细胞用10 μmol/L的安罗替尼+1 μmol/L的NF-κB通路激活剂prostratin[9]进行干预；同时，设置不加细胞的调零孔作为空白组。培养24 h后，按“2.2.1”项下方法检测各组细胞的增殖活力。

2.3.2 细胞黏附能力

取对数生长期细胞，以2×10^{5}个/mL接种至6孔板中，每孔50 μL。按“2.3.1”项下方法分组、处理，再按“2.2.2”项下方法检测各组黏附细胞数。

2.3.3 细胞迁移和侵袭能力

取对数生长期细胞，以2×10^{5}个/mL接种至6孔板中，每孔300 μL。按“2.3.1”项下方法分组、处理，再按“2.2.3”项下方法检测各组细胞迁移率和侵袭细胞数。

2.3.4 细胞EMT及NF-κB通路相关蛋白表达情况

取对数生长期细胞，以2×10^{5}个/mL接种至6孔板中，每孔300 μL。按“2.3.1”项下方法分组、处理，再按“2.2.4”项下方法检测各组细胞中E-cadherin、N-cadherin、vimentin、FN、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白（NF-κB p65、p-NF-κB p65的稀释比例分别为1∶5 000、1∶2 000）的相对表达量。

2.4 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用Tukey检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 安罗替尼对T98G细胞恶性表型的影响

3.1.1 细胞增殖活力

与对照组（1.00±0.07）比较，10、20 μmol/L安罗替尼组和阳性对照组细胞的增殖活力（0.76±0.08、0.53±0.05、0.51±0.03）均显著降低（$P<0.05$）；与阳性对照组（0.51±0.03）比较，5、10 μmol/L安罗替尼组细胞的增殖活力（0.90±0.04、0.76±0.08）均显著升高（$P<0.05$），而20 μmol/L安罗替尼组细胞的增殖活力（0.53±0.05）则与阳性对照组相当（$P>0.05$）。

3.1.2 细胞黏附能力

与对照组（239.67±10.26）比较，5、10、20 μmol/L安罗替尼组和阳性对照组的黏附细胞数（179.67±15.31、143.67±10.02、96.00±5.29、94.00±4.58）均显著减少（$P<0.05$），且有浓度依赖趋势；与阳性对照组比较，5、10 μmol/L安罗替尼组的黏附细胞数均显著增加（$P<0.05$），而20 μmol/L安罗替尼组的黏附细胞数则与阳性对照组相当（$P>0.05$）。结果见图1。

3.1.3 细胞迁移和侵袭能力

与对照组[细胞迁移率为（43.67±2.08）%、侵袭细胞数为42.67±3.79]比较，5、10、20 μmol/L安罗替尼组和阳性对照组的细胞迁移率[（35.33±2.08）%、（26.33±2.08）%、（19.00±2.00）%、（18.33±1.53）%]和侵袭细胞数（32.00±2.65、27.67±1.53、15.67±1.53、15.67±2.08）均显著降低（$P<0.05$），且有浓度依赖趋势；与阳性对照组比较，5、10 μmol/L安罗替尼组的细胞迁移率和侵袭细胞数均显著升高（$P<0.05$），而20 μmol/L安罗替尼组的上述指标则与阳性对照组相当（$P>0.05$）。结果见图2、图3。

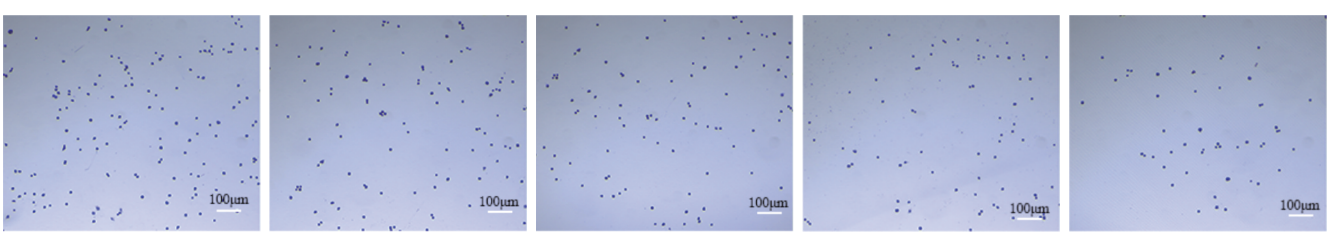
3.1.4 细胞EMT相关蛋白的表达情况

与对照组比较，各药物组细胞中E-cadherin蛋白的表达均显著上调，N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$），且有浓度依赖趋势；与阳性对照组比较，5、10 μmol/L安罗替尼组细胞中E-cadherin蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$），N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）；而20 μmol/L安罗替尼组的上述蛋白表达则与阳性对照组相当（$P>0.05$）。结果见图4、表1。

3.2 安罗替尼对T98G细胞恶性表型影响的机制

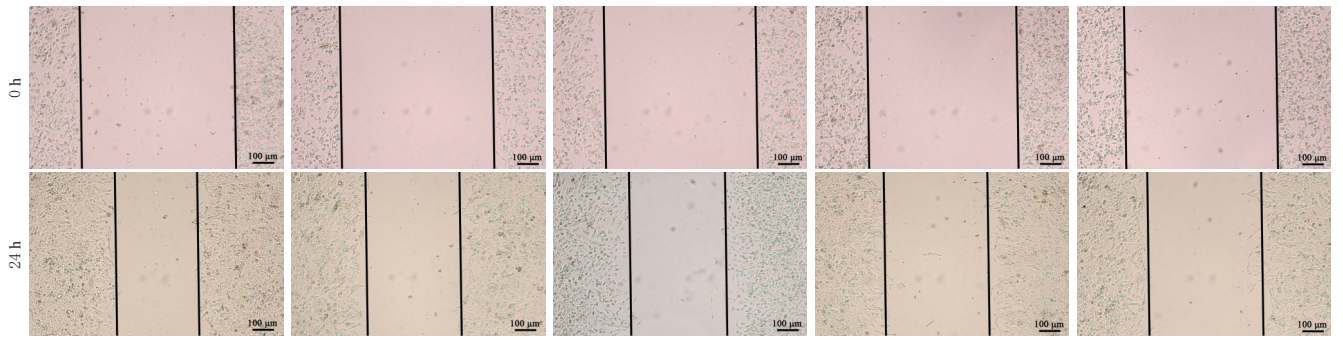
3.2.1 细胞增殖活力

与对照组（1.00±0.08）比较，安罗替尼组细胞的增殖活力（0.76±0.07）显著降低（$P<0.05$）；与安罗替尼组比较，抑制剂组细胞的增殖活力（0.48±0.02）显著降低（$P<0.05$），而激活剂组细胞的增殖活力（1.01±0.08）则显著升高（$P<0.05$）。



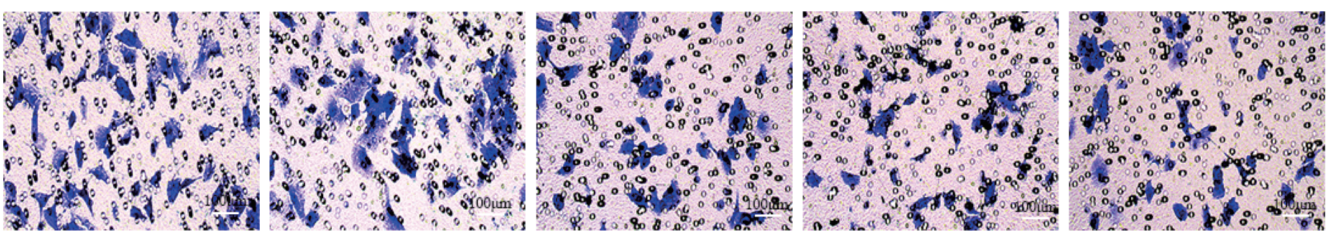
A. 对照组　B. 5 μmol/L安罗替尼组　C. 10 μmol/L安罗替尼组　D. 20 μmol/L安罗替尼组　E. 阳性对照组

图1 不同浓度安罗替尼对细胞黏附能力的影响



A. 对照组　B. 5 μmol/L 安罗替尼组　C. 10 μmol/L 安罗替尼组　D. 20 μmol/L 安罗替尼组　E. 阳性对照组

图2　不同浓度安罗替尼对细胞迁移能力的影响



A. 对照组　B. 5 μmol/L 安罗替尼组　C. 10 μmol/L 安罗替尼组　D. 20 μmol/L 安罗替尼组　E. 阳性对照组

图3　不同浓度安罗替尼对细胞侵袭能力的影响

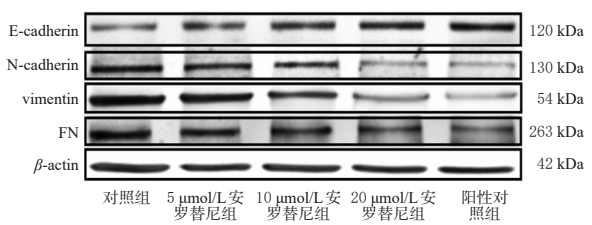


图4　不同浓度安罗替尼对细胞 EMT 相关蛋白表达影响的电泳图

表1　不同浓度安罗替尼对细胞 EMT 相关蛋白相对表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	FN
对照组	0.25±0.02	0.95±0.02	2.02±0.06	1.41±0.03
5 μmol/L安罗替尼组	0.40±0.03^{ab}	0.70±0.01^{ab}	1.90±0.03^{ab}	1.11±0.06^{ab}
10 μmol/L安罗替尼组	0.70±0.03^{ab}	0.40±0.02^{ab}	0.91±0.05^{ab}	0.84±0.04^{ab}
20 μmol/L安罗替尼组	0.95±0.03^{a}	0.16±0.02^{a}	0.20±0.01^{a}	0.30±0.02^{a}
阳性对照组	1.00±0.03^{a}	0.13±0.01^{a}	0.15±0.02^{a}	0.26±0.02^{a}

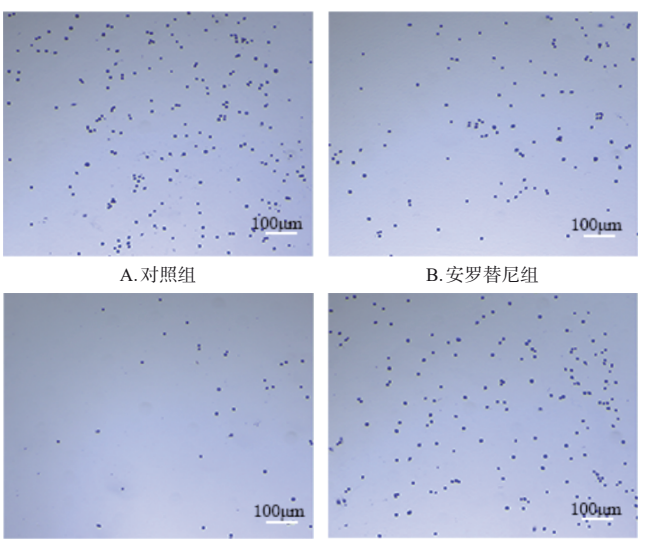
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与阳性对照组比较，$P<0.05$。

3.2.2　细胞黏附能力

与对照组（243.00±7.21）比较，安罗替尼组的黏附细胞数（143.67±11.59）显著降低（$P<0.05$）；与安罗替尼组比较，抑制剂组的黏附细胞数（73.67±10.50）显著降低（$P<0.05$），而激活剂组的黏附细胞数（228.67±13.65）则显著升高（$P<0.05$）。结果见图5。

3.2.3　细胞迁移和侵袭能力

与对照组[细胞迁移率为（43.67±2.08）%、侵袭细胞数为41.33±3.51]比较，安罗替尼组的细胞迁移率[（24.00±1.00）%]和侵袭细胞数（26.67±1.53）均显著降低（$P<0.05$）；与安罗替尼组比较，抑制剂组的细胞迁移率[（15.67±1.15）%]和侵袭细胞数（13.33±2.52）均显著降低（$P<0.05$），而激活剂组的细胞迁移率[（45.33±1.53）%]和侵袭细胞数（40.00±2.65）则显著升高（$P<0.05$）。结果见图6、图7。



A. 对照组　B. 安罗替尼组　C. 抑制剂组　D. 激活剂组

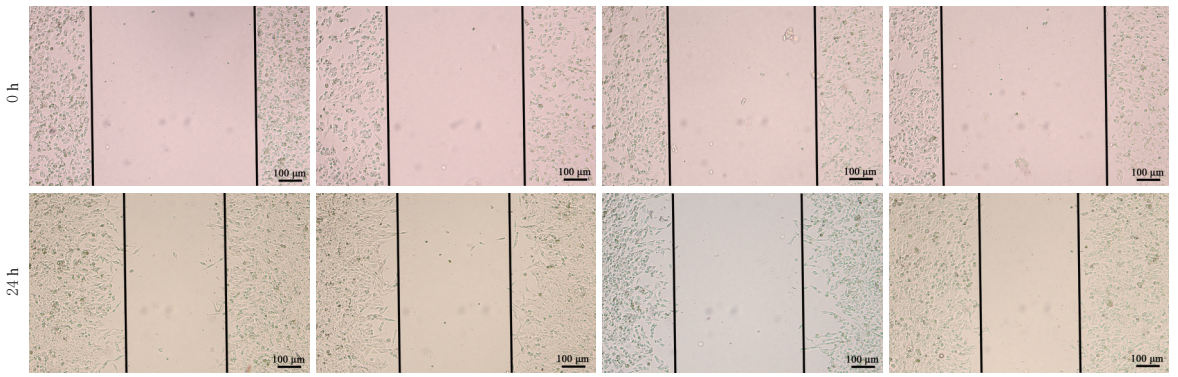
图5　机制验证中各组细胞的黏附能力比较

3.2.4　细胞 EMT 和 NF-κB 通路相关蛋白的表达情况

与对照组比较，安罗替尼组细胞中 E-cadherin 蛋白的表达显著上调，N-cadherin、vimentin、FN、p-NF-κB p65 蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$）；与安罗替尼组比较，抑制剂组细胞中 E-cadherin 蛋白的表达显著上调（$P<0.05$），N-cadherin、vimentin、FN、p-NF-κB p65 蛋白的表达均显著下调，而激活剂组细胞中上述蛋白的变化则相反（$P<0.05$）。结果见图8、表2。

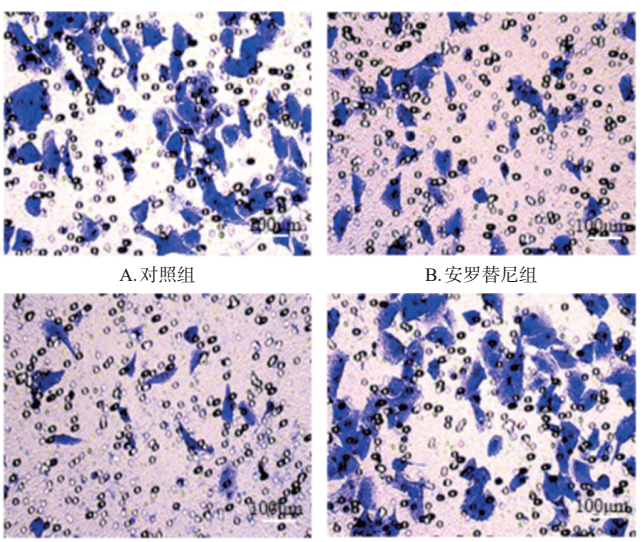
4　讨论

脑胶质瘤属于临床常见的具有高死亡率、高发病率特点的中枢神经系统肿瘤。虽然医学治疗水平在不断提高，但脑胶质瘤病灶很难通过手术彻底清除，患者极易复发，且一旦出现转移则难以进行有效治疗。脑胶质瘤细胞有丰富的新生血管，在其侵袭、转移过程中，肿瘤



A. 对照组　B. 安罗替尼组　C. 抑制剂组　D. 激活剂组

图6　机制验证中各组细胞的迁移能力比较



A. 对照组　B. 安罗替尼组

C. 抑制剂组　D. 激活剂组

图7　机制验证中各组细胞的侵袭能力比较

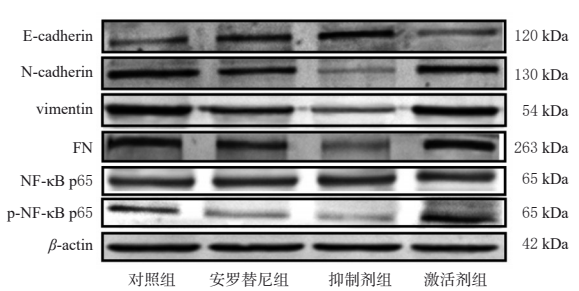


图8　机制验证中各组细胞中EMT和NF-κB通路相关蛋白表达的电泳图

表2　机制验证中各组细胞中EMT和NF-κB通路相关蛋白相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	FN	NF-κB p65	p-NF-κB p65
对照组	0.40±0.03	1.41±0.04	2.30±0.11	0.95±0.02	0.96±0.04	0.36±0.03
安罗替尼组	0.60±0.02[a]	0.95±0.02[a]	1.01±0.07[a]	0.77±0.08[a]	0.96±0.04	0.27±0.03[a]
抑制剂组	0.95±0.02[b]	0.20±0.01[b]	0.40±0.03[b]	0.25±0.03[b]	0.96±0.05	0.19±0.01[b]
激活剂组	0.40±0.03[b]	1.20±0.02[b]	2.30±0.06[b]	1.15±0.03[b]	0.95±0.04	0.43±0.02[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与10 μmol/L安罗替尼组比较，$P<0.05$。

细胞可从原发病灶脱离、降解，随即入侵淋巴管或血管，并经淋巴或血液循环转移至远端形成新的病灶，呈现出高度侵袭性[1]，因此探寻有效抑制脑胶质瘤细胞转移及侵袭的药物具有重要意义。

作为新型口服酪氨酸酶抑制剂，安罗替尼可通过抑制肿瘤血管形成而发挥抗肿瘤作用，现已获批用于肺癌、软组织肉瘤、甲状腺髓样癌等多种适应证，并可使晚期或转移性肝细胞癌、食管鳞癌患者在治疗中获益。研究表明，安罗替尼能抑制肺癌细胞生长和瘤体血管生成，且对人肝内胆管上皮肿瘤细胞HCCC-9810具有杀伤作用[10]；另有研究指出，安罗替尼联合替莫唑胺化疗可延缓脑胶质瘤患者的疾病进展[11]。本研究结果显示，10、20 μmol/L安罗替尼组和阳性对照组细胞的增殖活力均显著低于对照组，提示其可抑制脑胶质瘤细胞的增殖；同时，20 μmol/L安罗替尼组细胞的增殖活力与阳性对照组比较差异无统计学意义，提示此剂量的安罗替尼对脑胶质瘤细胞增殖活力的抑制作用与50 mg/L的5-氟尿嘧啶相当，与陈彦民等[12]的研究结果基本一致。

肿瘤细胞的迁移、侵袭与EMT关系密切，其可借助EMT样进程形成有迁移能力的间充质细胞，从而诱导细胞向其他组织和器官转移[13]。有研究证实，EMT在肾癌、肺癌、乳腺癌细胞原位侵袭和远端转移中发挥了重要作用[14]。作为具有高度侵袭性的恶性肿瘤，脑胶质瘤的发生与细胞间质性改变关系密切[3]。由于EMT的影响，纤维细胞快速增多，其所含的细胞外基质也不断增多，从而导致了脑胶质瘤的持续恶化发展[15]。本研究结果显示，不同浓度安罗替尼组和阳性对照组细胞黏附、迁移、侵袭能力均较对照组显著增强，且N-cadherin、vimentin、FN蛋白的表达均较对照组显著下调，E-cadherin蛋白的表达均较对照组显著上调；5、10 μmol/L安罗替尼组的上述指标改善程度均不及阳性对照组，而20 μmol/L安罗替尼组与阳性对照组比较差异均无统计学意义，表明20 μmol/L安罗替尼对脑胶质瘤细胞迁移、侵袭的抑制作用与阳性对照药相当。研究指出，发生EMT样进程后，肿瘤细胞的迁移和侵袭能力增强，主要表现为E-cadherin、N-cadherin、vimentin等细胞上皮间质分化标志蛋白表达的显著变化[16]。本研究结果提示，安罗替尼具有抑制脑胶质瘤细胞EMT样进程的能力，并可抑制其黏附、迁移和侵袭，与Nan等[17]的研究结果基本一致。

近年研究表明，多种肿瘤的发生发展和NF-κB信号

通路的异常激活有关[18]。NF-κB作为信号通路的中枢，在多种肿瘤细胞EMT样进程中发挥了重要作用，且抑制肿瘤细胞EMT样进程能够明显抑制其侵袭、转移[18]。为验证NF-κB信号通路的作用，本研究在10 μmol/L安罗替尼的基础上分别联用通路抑制剂BAY 11-7082和激活剂prostratin进行验证，结果显示，与安罗替尼组比较，抑制剂组细胞的增殖活力，黏附、迁移、侵袭能力及N-cadherin、vimentin、FN、p-NF-κB p65蛋白的相对表达量均显著降低，E-cadherin蛋白的相对表达量显著升高，而激活剂组上述指标的变化趋势则相反。以上结果提示，安罗替尼可通过抑制NF-κB信号通路来抑制细胞的EMT样进程，进而抑制脑胶质瘤细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭，说明安罗替尼的抗胶质瘤作用与抑制NF-κB信号通路有关。

综上所述，安罗替尼可抑制人脑胶质瘤T98G细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭，上述作用可能与抑制NF-κB信号通路进而抑制细胞EMT样进程有关。但本研究只针对NF-κB信号通路进行了研究，该药能否通过其他信号通路发挥抗胶质瘤作用尚需进一步探讨。

参考文献

[1] HUANG W, SHI Y, HAN B, et al. LncRNA GAS5-AS1 inhibits glioma proliferation, migration, and invasion via miR-106b-5p/TUSC2 axis[J]. Hum Cell, 2020, 33(2): 416-426.

[2] SYED Y Y. Anlotinib: first global approval[J]. Drugs, 2018, 78(10): 1057-1062.

[3] JIA Z X, ZHANG Z, LI Z, et al. Anlotinib inhibits the progress of colorectal cancer cells by antagonizing VEGFR/JAK2/STAT3 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(5): 2331-2343.

[4] TANIGUCHI K, KARIN M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(5): 309-324.

[5] 晋涛，陶胜忠，范鲁鼎，等. 白藜芦醇基于NF-κB p65通路对脑胶质瘤细胞的作用[J]. 西北药学杂志，2023，38(1)：55-60.
JIN T, TAO S Z, FAN L D, et al. Effect of resveratrol on glioma cell through NF-κB p65 pathway[J]. Northwest Pharm J, 2023, 38(1): 55-60.

[6] HU H Y, LIU Y Y, TAN S T, et al. Anlotinib exerts anticancer effects on KRAS-mutated lung cancer cell through suppressing the MEK/ERK pathway[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 3579-3587.

[7] ALKIŞ M E, TURAN N, ALAN Y, et al. Effects of electroporation on anticancer activity of 5-FU and newly synthesized zinc (Ⅱ) complex in chemotherapy-resistance human brain tumor cells[J]. Med Oncol, 2021, 38(11): 129.

[8] 张静，周永刚，舒俊斌，等. miR-130b在胶质瘤对替莫唑胺耐药中的作用[J]. 中国病理生理杂志，2019，35(4)：597-605.
ZHANG J, ZHOU Y G, SHU J B, et al. miR-130b reverses temozolomide resistance in glioma[J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(4): 597-605.

[9] 张晶，苏畅，孔凡铭，等. 基于IKKβ/NF-κB通路探究香菇多糖联合顺铂对乳腺癌的干预作用[J]. 现代药物与临床，2022，37(9)：1932-1937.
ZHANG J, SU C, KONG F M, et al. Explore the intervention effect of lentinan combined with cisplatin on breast cancer based on IKKβ/NF-κB pathway[J]. Drugs Clin, 2022, 37(9): 1932-1937.

[10] RUAN X H, SHI X L, DONG Q M, et al. Antitumor effects of anlotinib in thyroid cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2019, 26(1): 153-164.

[11] 许礼平，李玉蓉，唐心宇，等. 安罗替尼联合替莫唑胺治疗复发性高级别脑胶质瘤患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志，2023，39(4)：464-468.
XU L P, LI Y R, TANG X Y, et al. Clinical study of anlotinib in combination with temozolomide in patients with recurrent high-grade glioma[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(4): 464-468.

[12] 陈彦民，邹明雷，李丽，等. 安罗替尼通过上调miR-33b抑制PI3K/AKT信号通路来抑制HeLa增殖、迁移侵袭的作用机制[J]. 实用癌症杂志，2022，37(5)：706-711.
CHEN Y M, ZOU M L, LI L, et al. Amrotinib inhibited HeLa proliferation and migration invasion by upregulating miR-33b and inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Pract J Cancer, 2022, 37(5): 706-711.

[13] XU B, LI J, LIU X X, et al. TXNDC5 is a cervical tumor susceptibility gene that stimulates cell migration, vasculogenic mimicry and angiogenesis by down-regulating $SERPINF_1$ and $TRAF_1$ expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91009-91024.

[14] KIM B N, AHN D H, KANG N, et al. TGF-β induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10597.

[15] 曾英，肖华亮，郭乔楠. 胶质母细胞瘤上皮间叶转化机制研究进展[J]. 诊断病理学杂志，2019，26(8)：533-538.
ZENG Y, XIAO H L, GUO Q N. Advances in epithelial-mesenchymal transition of glioblastoma[J]. Chin J Diagn Pathol, 2019, 26(8): 533-538.

[16] SHASH L S, IBRAHIM R A, ELGOHARY S A. E-cadherin and N-cadherin immunohistochemical expression in proliferating urothelial lesions: potential novel cancer predictive EMT profiles[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2021, 29(9): 657-666.

[17] NAN Y, GUO L Y, LU Y L, et al. MiR-451 suppresses EMT and metastasis in glioma cells[J]. Cell Cycle, 2021, 20(13): 1270-1278.

[18] MULERO M C, WANG V Y, HUXFORD T, et al. Genome reading by the NF-κB transcription factors[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(19): 9967-9989.

（收稿日期：2023-07-11　修回日期：2023-11-01）
（编辑：张元媛）