

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.03.0218

论著

肉桂醛通过靶向 EphA2 蛋白抑制膀胱癌细胞增殖和血管生成

李文胜, 李会兵

(河南科技大学第一附属医院泌尿外科, 洛阳 471003)

摘要 目的: 揭示肉桂醛对膀胱癌细胞增殖、迁移和血管生成的影响, 并探讨其机制。方法: T24 细胞在含有不同浓度(0、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)肉桂醛的培养基中处理 24 h。通过 MTT 实验和划痕实验检测肉桂醛对膀胱癌细胞生长和迁移的影响。使用流式细胞术(FCM)和管状形成实验评估肉桂醛对膀胱癌细胞凋亡和血管生成的影响。进一步通过免疫印迹实验检测 Ephrin A 受体 2 (EphA2) 的表达。结果: 与对照组相比, 不同浓度肉桂醛处理可抑制膀胱癌细胞的增殖($F=408.3, P<0.001$), 并促进膀胱癌细胞的凋亡($F=69.57, P=0.0004$)。同时抑制膀胱癌细胞的迁移($F=25.60, P=0.0039$)和人类脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)血管生成($F=48.12, P=0.0005$)。机制研究表明, 肉桂醛能够靶向 EphA2 蛋白($F=84.91, P=0.0004$), 抑制膀胱癌细胞增殖。结论: 肉桂醛通过靶向 EphA2 蛋白, 抑制膀胱癌细胞增殖和血管生成。

关键词 肉桂醛; 膀胱癌; 细胞凋亡; 血管生成; EphA2

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)03-0218-04

Cinnamaldehyde inhibits cell proliferation and angiogenesis in bladder cancer by targeting EphA2 protein

LI Wensheng, LI Huibing

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract Objective: To uncover the effects of cinnamaldehyde on the proliferation, migration, and angiogenesis of bladder cancer (BC) cells and investigate the underlying mechanism. **Methods:** T24 cells were treated with cinnamaldehyde at different concentrations (0, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The effects of cinnamaldehyde on bladder cancer cell growth and migration were assessed by MTT and wound healing assays. Flow cytometry (FCM) and tube formation assays were used to evaluate the effects of cinnamaldehyde on apoptosis and angiogenesis in bladder cancer cells. Furthermore, Western blotting was used to detect the effect on Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) expression. **Results:** Compared with the control group, different concentrations of cinnamaldehyde treatment inhibited bladder cancer cell proliferation ($F=408.3, P<0.001$) and promoted apoptosis ($F=69.57, P=0.0004$). It was also found that cinnamaldehyde inhibited the migration of bladder cancer cells ($F=25.60, P=0.0039$) and angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells ($F=48.12, P=0.0005$). Mechanistic studies indicated that cinnamaldehyde targeted EphA2 protein ($F=84.91, P=0.0004$), thereby inhibiting the proliferation of bladder cancer. **Conclusion:** Cinnamaldehyde inhibits cell proliferation and angiogenesis in bladder cancer by targeting EphA2 protein.

Key words cinnamaldehyde; bladder cancer; apoptosis; angiogenesis; EphA2

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤^[1], 晚期患者的 5 年生存率仅为 20%~30%^[2]。虽然遵循治疗指南的膀胱癌患者 5 年生存率较高^[3], 但开发新的膀胱癌早期检测方法及个体化治疗方案仍是提高临床疗效和安全性的关键。

肉桂醛是肉桂中的主要成分, 具有抗氧化、抗炎等多种生物活性^[4]。其可通过诱导细胞周期停滞, 尤其是在 G0/G1 期, 抑制肿瘤细胞的增殖^[5]。它还通过增强活性氧簇(ROS)的生成, 导致肿瘤细胞内的

氧化应激增加, 从而引发线粒体损伤, 激活细胞凋亡相关的信号通路, 如 caspase-3^[6]。此外, 肉桂醛能够通过调节多个信号通路, 抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[7]。并通过减少基质金属蛋白酶(MMPs)的表达, 进一步减少肿瘤细胞的侵袭能力^[8]。已有研究显示, 通过下调或抑制 Ephrin A 受体 2(EphA2)的表达, 可有效抑制肿瘤细胞的增殖与迁移, 并减少肿瘤的血管生成^[9]。然而, 肉桂醛在膀胱癌中的作用尚未得到报道, 且其作用机制不明确。本研究旨在对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 仪器 酶标仪(美国伯乐公司, 型号: ELx800);

作者简介 李文胜(1988-), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 泌尿系肿瘤的发病机制及其治疗; 通信作者: 李会兵, E-mail: rearesearcher1hb@163.com。

显微镜(美国奥林巴斯公司,型号:IX73);流式细胞仪(BD Biosciences 公司,型号:FACSCalibur);化学发光检测系统、电泳仪、冷冻离心机(美国伯乐公司);培养箱(37℃恒温,美国 Thermo 公司)。

1.2 细胞培养 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)及人膀胱癌细胞 T24 购自中国科学院。T24 细胞使用膀胱癌细胞培养基(RPMI-1640 完全培养基)培养。在进行实验前,将细胞在含有不同浓度(0、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)肉桂醛(Sigma 公司)的培养基中处理 24 h。后通过细胞检测评估肉桂醛对膀胱癌细胞的影响。

1.3 免疫印迹 用 RIPA 裂解液完全裂解膀胱癌细胞以提取细胞总蛋白,使用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行定量。随后,蛋白通过 SDS-PAGE 电泳分离并转移到 PVDF 膜上。膜上蛋白质用 TBST 缓冲液(含 5%脱脂奶粉)封闭 1 h。接着,加入一抗,包括 EphA2(ab273118;1:500,Abcam,英国)、Bax(ab32503;1:1000)、Bcl-2(ab32124;1:500)、切割型 caspase 3(ab32042;1:1000)、 β -actin(ab8226;1:3000),在室温下孵育 1 h。然后加入二抗(1:2000),继续孵育 1 h,最后使用化学发光法进行检测并拍摄图像。

1.4 CCK-8 实验 将膀胱癌细胞均匀接种至 96 孔板中,每孔接种适当数量的细胞,确保细胞处于对数生长期。将板放入 37℃的恒温箱中培养。24 h 后向每个孔中加入 CCK-8 试剂(C0038,中国碧云天公司),并继续培养 3 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度(OD 值),以评估细胞的相对活力。

1.5 集落形成实验 将膀胱癌细胞接种至 6 孔板中,每孔接种约 1000 个细胞。培养 10 d。实验结束时,使用 0.2%结晶紫溶液对细胞进行染色,染色时间为 10 min。染色后,用 PBS 缓冲液轻轻洗涤去除

多余染料,然后用 10%的甲醇固定细胞 20 min。用显微镜拍摄并记录集落的形态和数量,分析细胞的克隆形成能力。

1.6 划痕实验 当膀胱癌细胞在培养皿中汇合度达到 100%时,使用 10 μL 枪头在细胞单层中制造均匀的划痕,确保划痕宽度一致。随即用无血清培养基补充细胞培养,并将细胞继续培养 24 h。之后,用显微镜拍照并观察划痕的闭合情况,分析细胞迁移能力。

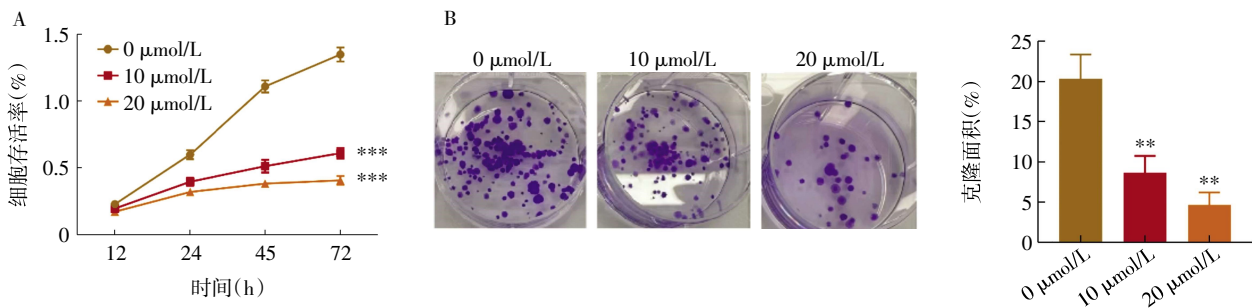
1.7 细胞凋亡检测 使用碧云天公司提供的细胞凋亡检测试剂盒。首先,膀胱癌细胞用 PBS 洗涤后,用 70%乙醇固定在 -20°C 下 2 h。接着,使用 PI 染料和 FITC-Annexin V 标记物进行染色,并在 4°C 下孵育。使用 FACSCalibur 流式细胞仪和 CellQuest Pro 5.1 软件分析细胞凋亡水平(BD Biosciences 公司)。

1.8 管状形成实验 使用 HUVECs 进行管状形成实验。首先,将 HUVECs 接种至已预涂 20% Matrigel 的 24 孔板中,并在含有肉桂醛处理的培养基中培养。4 h 后,用荧光显微镜拍摄观察 HUVECs 形成管状结构的情况。

1.9 统计学处理 所有实验数据使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异使用 ANOVA 进行比较。对于多组比较,使用 Bonferroni 修正进行进一步分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肉桂醛抑制膀胱癌细胞的增殖 CCK-8 实验结果显示,肉桂醛在不同浓度下均显著抑制了 T24 细胞的增殖,表现为 OD450 值的明显降低($F=408.3$, $P<0.001$,图 1A)。此外,克隆形成实验发现,肉桂醛处理后,T24 细胞的克隆数量显著减少($F=37.27$, $P=0.0014$,图 1B)。



注:A:CCK-8 实验;B:克隆形成实验;统计每个视野中的克隆数量;** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 1 肉桂醛抑制膀胱癌细胞增殖

Fig.1 Cinnamaldehyde suppressed the proliferation of bladder cancer cells

2.2 肉桂醛促进膀胱癌细胞的凋亡 通过流式细胞术观察到,肉桂醛处理(10、20 $\mu\text{mol/L}$)能够明显抑制 T24 细胞的凋亡,表现为凋亡细胞的比例显著降低($F=69.57$, $P=0.0004$,图 2A)。此外,免疫印迹实

验结果显示,肉桂醛处理后,Bax 和切割型 caspase-3 的表达上调,而 Bcl-2 的表达则显著下调(Bax: $F=30.5$, $P<0.001$, BCL2: $F=115.5$, $P<0.001$,切割型 caspase 3: $F=420.3$, $P<0.001$,图 2B)。

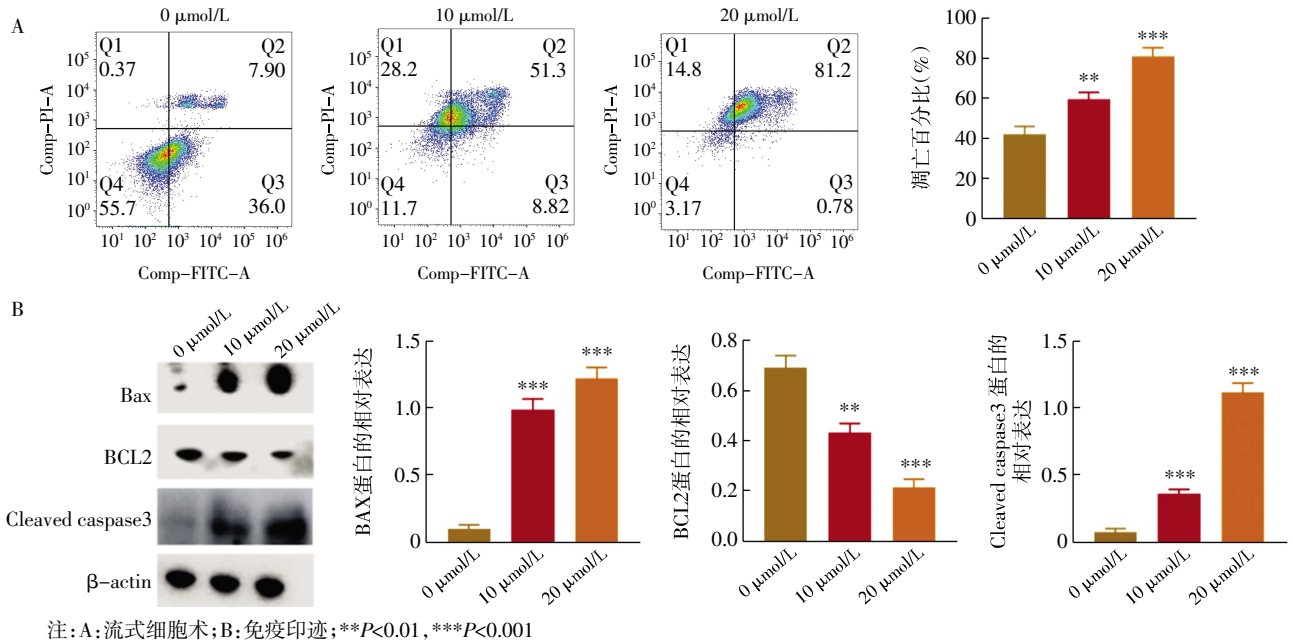


图 2 肉桂醛促进膀胱癌细胞凋亡

Fig.2 Cinnamaldehyde contributed to the apoptosis of bladder cancer cells

2.3 肉桂醛抑制膀胱癌细胞的迁移和 HUVEC 血管生成 划痕实验显示,肉桂醛处理显著抑制了 T24 细胞的迁移和侵袭,表现为迁移(上层)和侵袭(下层)细胞数量的明显减少($F=25.60, P=0.0039$,图 3A)。管状形成实验发现,肉桂醛处理后, HUVEC

的血管生成能力显著受到抑制,表现为分支点数量的减少($F=48.12, P=0.0005$,图 3B)。

2.4 肉桂醛抑制膀胱癌细胞 EphA2 的表达 免疫印迹分析发现,肉桂醛显著下调了 T24 细胞中 EphA2 的表达水平($F=84.91, P=0.0004$,图 4)。

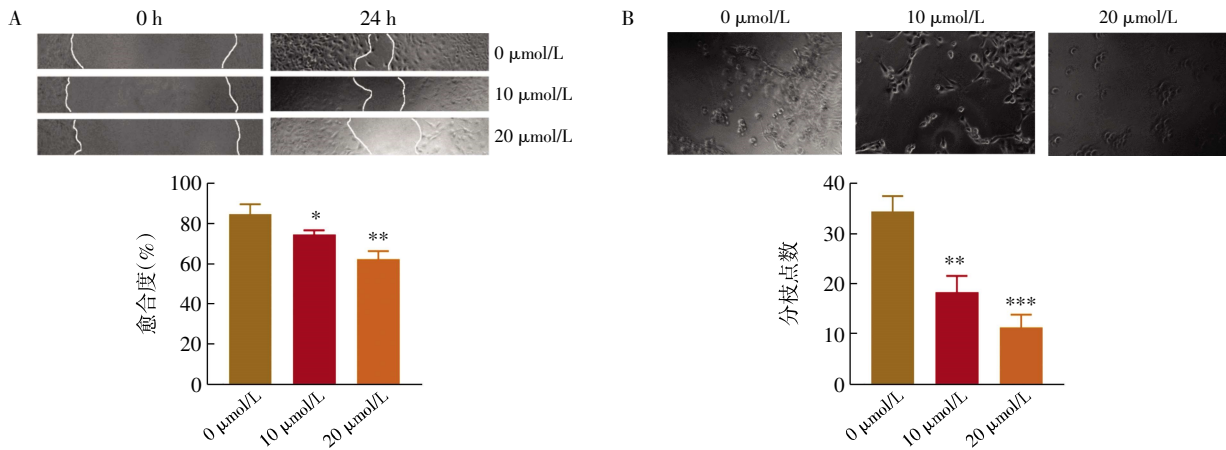


图 3 肉桂醛抑制膀胱癌细胞迁移及血管生成

Fig.3 Cinnamaldehyde suppressed the migration of bladder cancer cells and angiogenesis

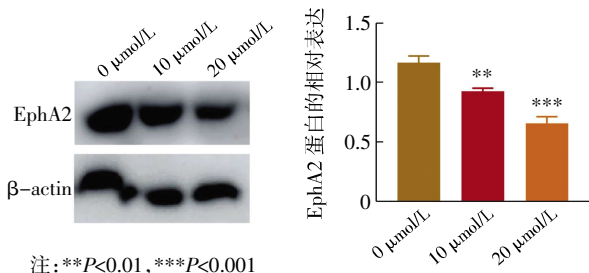


图 4 肉桂醛抑制膀胱癌细胞 EphA2 的表达

Fig.4 Cinnamaldehyde suppressed the expression of EphA2 in bladder cancer cells

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率在男性中位居所有肿瘤的第 4 位,而在女性中则较为罕见,占全身恶性肿瘤的 3%~4%^[2]。尽管膀胱癌早期可通过手术和化学治疗进行干预,但晚期膀胱癌的治疗仍然具有较高的挑战性,且疗效有限,因此亟需开发更有效的治疗药物。研究发现,肉桂醛能够抑制膀胱癌的进展,因此可能作为一种潜在的治疗药物。

肉桂醛具有广泛的生物活性,特别是在抗菌、抗氧化和抗炎方面。由于这些特性,肉桂醛在传统医学中有着悠久的历史。研究表明,肉桂醛通过调节细胞信号通路、抑制过氧化物酶的活性并清除自由基,有效减轻氧化应激,进而对心血管健康产生积极影响。它还表现出抗糖尿病作用,能够通过调节葡萄糖代谢、促进胰岛素分泌来控制血糖水平,这些效果为其在代谢性疾病中的应用奠定了基础^[10-11]。在抗肿瘤领域,肉桂醛也展现出了显著的潜力。研究发现,肉桂醛能够通过多种机制抑制肿瘤细胞的增殖和转移,进而抑制肿瘤的生长。具体而言,肉桂醛能够诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,并通过干扰细胞周期相关蛋白的表达,减缓肿瘤细胞的生长。此外,肉桂醛还能够抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,尤其在乳腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌等多种类型的肿瘤中表现出了良好的抑制效果。在膀胱癌细胞系中,肉桂醛能够显著抑制细胞的增殖,并诱导细胞凋亡。此外,肉桂醛还能通过调节与凋亡相关的蛋白(如 Bax、Bcl-2 及 caspase-3)的表达,进一步增强膀胱癌细胞的凋亡。

血管生成是肿瘤生长和转移的关键过程之一,它为肿瘤提供必需的氧气和营养,从而加速肿瘤增殖。肿瘤细胞通过分泌促血管生成因子,诱导内皮细胞的增殖、迁移和分化,形成新的血管来满足自身生长需求^[12]。因此,抑制血管生成能够有效地抑制肿瘤的生长和转移。肉桂醛通过抑制膀胱癌组织的血管生成,可能在抑制肿瘤生长和转移方面发挥了重要作用。

EphA2 是 ephrin 家族的受体酪氨酸激酶,其异常表达与多种肿瘤的进展和转移密切相关^[13]。在膀胱癌中,EphA2 的过度表达与肿瘤的血管生成、转移和侵袭性相关。过度表达的 EphA2 可通过促进微血管密度的增加,促进肿瘤的转移^[14-15]。肉桂醛能够显著下调膀胱癌细胞中 EphA2 的表达,提示其可能是肉桂醛的潜在靶标。虽然发现肉桂醛能够调节 EphA2 的表达,但其具体作用机制仍需进一步研究。

尽管本研究揭示了肉桂醛在膀胱癌中的抗肿瘤作用,但仍存在一些局限性。首先,尚未在体内小鼠模型中验证肉桂醛的抗肿瘤效果,未来的研究应通过动物实验进一步确认肉桂醛在膀胱癌治疗中的应用前景。其次,肉桂醛可能通过多种信号通路发挥抗肿瘤作用,当前研究仅集中在 EphA2 这一靶点,其他潜在靶标和机制仍有待进一步探索。此外,

肉桂醛的药代动力学特性、代谢途径及潜在毒性等问题尚不明确,未来的研究应系统评估其临床应用的可行性和安全性。总之,肉桂醛通过靶向 EphA2,抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移,促进其凋亡,同时抑制 HUVEC 的血管生成。此结果为肉桂醛作为膀胱癌潜在治疗药物的开发提供了理论依据,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] COMPERAT E, AMIN M B, CATHOMAS R, et al. Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments[J]. *Lancet*, 2022, 400(10364): 1712-1721.
- [2] STONE L. Subtypes in small cell bladder cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2023, 20(9): 521.
- [3] LENISAT, LEC P M, CHAMINE K, et al. Bladder cancer: a review[J]. *JAMA*, 2020, 324(19): 1980-1991.
- [4] 李雪, 马艳春, 赵婧含, 等. 肉桂的化学成分及药理作用研究进展[J]. *药学研究*, 2024, 43(10): 1015-1020.
- [5] NILE A, SHIN J, SHIN J, et al. Cinnamaldehyde-rich cinnamon extract induces cell death in colon cancer cell lines HCT 116 and HT-29[J]. *Int J MolSci*, 2023, 24(9): 8191.
- [6] 洪恺祺, 陈丽, 朱镇华, 等. 肉桂醛通过 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬促进糖尿病大鼠创面愈合机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(16): 134-143.
- [7] 牟悦, 王雪振, 王世军, 等. 肉桂醛调节肿瘤的作用及机制研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(1): 294-297.
- [8] 周凌, 晏洪波. 肉桂醛对 UVA 照射后体外成纤维细胞表达 MMP-1, MMP-3 和 MAPK 信号的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2015, 29(2): 114-117.
- [9] HAORAN E, ZHANG L, YANG Z, et al. SNAI1 promotes epithelial-mesenchymal transition and maintains cancer stem cell-like properties in thymic epithelial tumors through the PIK3R2/p-EphA2 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 324.
- [10] 陈秀婷, 杨莹莹, 王佳琪, 等. 肉桂醛缓解高糖诱导的 SH-SY5Y 细胞铁死亡的作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2024, 12(1): 12-17.
- [11] 褚鹿鹿, 郭智慧, 侯婧悦, 等. 肉桂醛防治糖尿病的药理作用研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(2): 483-487.
- [12] 赵宁宁, 胡亦杨, 谢瑛莹, 等. 天然化合物通过抑制 VEGF 抗血管生成抗肿瘤的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 5: 18-21
- [13] WILSON K, SHIUAN E, BRANTLEY D M. Oncogenic functions and therapeutic targeting of EphA2 in cancer[J]. *Oncogene*, 2021, 40(14): 2483-2495.
- [14] TOMIYAMA E, FUJITA K, MATSUZAKI K, et al. EphA2 on urinary extracellular vesicles as a novel biomarker for bladder cancer diagnosis and its effect on the invasiveness of bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(7): 1312-1323.
- [15] BURASCHI S, NEILL T, XU S Q, et al. Progranulin/EphA2 axis: a novel oncogenic mechanism in bladder cancer[J]. *Matrix Biol*, 2020, 93: 10-24.

(2024-12-21 收稿)