

研究论文

葛根素靶向抑制Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路抑制胃癌进展

李文哲¹, 刘芳芳^{2*}¹西安医学高等专科学校附属医院消化内科, 西安 710300; ²陕西中医药大学附属医院消化一科, 咸阳 712000

摘要: 本文探讨了葛根素对胃癌(gastric cancer, GC)进展的影响及相关分子机制。使用不同浓度葛根素处理GC细胞系AGS、N87, 并将细胞分为空白组(0 mg/mL)、低浓度葛根素组(10 mg/mL)、中浓度葛根素组(50 mg/mL)和高浓度葛根素组(100 mg/mL)。通过克隆形成实验检测各组细胞增殖活性, 划痕实验检测各组细胞迁移能力, Transwell实验检测各组细胞侵袭能力, Western blot检测各组细胞Notch1受体、Notch1受体活化片段(Notch1 intracellular domain, Notch1 ICD)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、p-AKT、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTORC1(Ser2448)、p-mTORC2(Ser2481)、凋亡相关蛋白(Bax、Bad)表达水平。构建裸鼠GC荷瘤模型, 使用不同剂量葛根素饲喂, 依据葛根素剂量将裸鼠分为对照组(0 mg/kg)、低剂量组(5 mg/kg)、中剂量组(10 mg/kg)和高剂量组(20 mg/kg), 观察各组裸鼠GC体内生长差异。向各葛根素处理组细胞培养体系中加入Notch1受体激动剂Jagged-1多肽(10 µg/mL), 再次检测上述指标。结果发现, 与空白组细胞相比, 葛根素以浓度依赖性方式抑制GC细胞增殖、迁移和侵袭活性。与空白组细胞相比, 葛根素处理组细胞Notch1受体水平更高, 而Notch1 ICD水平较低; p-PI3K、p-AKT、p-mTORC1水平更低, 而PI3K、AKT、mTOR、p-mTORC2水平无显著差异; Bax和Bad表达水平显著升高。与对照组裸鼠相比, 葛根素饲喂组裸鼠形成的GC肿瘤生长均显著减缓。加入Jagged-1后, 各葛根素处理组细胞增殖、迁移和侵袭活性均显著升高, p-PI3K、p-AKT、p-mTORC1(Ser2448)表达水平均显著升高。由此得出结论, 葛根素通过靶向抑制Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路的激活进而抑制胃癌细胞的恶性生物学行为, 并促进细胞凋亡。

关键词: 葛根素; Notch1; PI3K; AKT; mTORC1; 胃癌

Puerarin suppresses gastric cancer progression by targeted inhibition of Notch1/PI3K/AKT/mTORC1 pathway

LI Wenzhe¹, LIU Fangfang^{2*}¹Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xi'an Medical Vocational School, Xi'an 710300, China;²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

Abstract: To explore the effect of puerarin on the progression of gastric cancer (GC) cancer and related molecular mechanisms, GC cell lines AGS and N87 were treated with different concentrations of puerarin, the

收稿日期: 2024-09-22

基金项目: 陕西中医药大学附属医院科研课题(2020XZ001); 陕西省中医药管理局10个重大病种中医药创新计划项目(陕中医药函[2014]302号); 2023年重大科技创新专项项目(L2023-ZDKJ-CYJQ-SF-013)

第一作者: E-mail: liwenzhedadi2024@163.com

*通信作者: E-mail: 987750807@qq.com

cells were divided into blank group (0 mg/mL), low concentration puerarin group (10 mg/mL), medium concentration puerarin group (50 mg/mL) and high concentration puerarin group (100 mg/mL). The proliferative activity of cells in each group was detected by clone formation assay, the migratory ability of cells in each group was detected by scratch assay, the invasive ability of cells in each group was detected by Transwell assay, and the expression levels of Notch1 receptor, Notch1 receptor fragment (Notch1 intracellular domain, Notch1 ICD), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (AKT), p-AKT, mammalian target of rapamycin (mTOR), p-mTORC1 (Ser2448), p-mTORC2 (Ser2481), and apoptosis-related proteins (Bax, Bad) of each group were detected by Western blot. The nude mice were divided into control group (0 mg/kg), low dose group (5 mg/kg), medium dose group (10 mg/kg) and high dose group (20 mg/kg) according to the dose of puerarin, the growth of GC in nude mice was observed. The Notch1 receptor agonist Jagged-1 polypeptide (10 µg/mL) was added into the cell culture system of each puerarin-treated group. Puerarin inhibited the proliferation, migration and invasion of GC cells in a concentration-dependent manner. Compared with the blank control group, puerarin-treated cells had higher levels of Notch1 receptor and lower levels of Notch1 ICD, and lower levels of p-PI3K, p-AKT, p-mTORC1, but no significant differences in the levels of PI3K, AKT, mTOR, p-mTORC2. The expression levels of Bax and Bad were significantly increased. Compared with the control group, the growth of GC tumor in puerarin-fed group was significantly slowed. After adding Jagged-1, the cell proliferation, migration and invasion activities were significantly increased, and the expression levels of p-PI3K, p-AKT, p-mTORC1 (Ser2448) were significantly increased in all puerarin treated groups. Puerarin can inhibit the malignant biological behavior of gastric cancer cells and promote apoptosis by targeting the activation of Notch1/PI3K/AKT/mTORC1 pathway.

Key Words: puerarin; Notch1; PI3K; AKT; mTORC1; gastric cancer

胃癌(gastric cancer, GC)是消化系统主要的恶性肿瘤之一,是全球第五大常见癌症,也是第三大癌症相关死亡原因^[1]。GC的致病风险因素包括幽门螺杆菌感染、年龄、高盐摄入量以及饮食中水果和蔬菜摄入量低^[2]。目前,临床针对早中期GC主要采取手术切除的方式,而晚期GC患者以放疗结合化疗为主,但是往往收效不佳,并且带来的不良反应较多。因此,需要找到更有针对性、不良反应更小的治疗药物。葛根是一种传统中药,葛根素(puerarin)是在葛根和葛属植物中发现的一种具有生物活性的黄酮类物质,被证实可有效治疗心血管疾病、肝病、胃病、呼吸系统疾病、糖尿病、阿尔茨海默病和癌症等慢性病^[3-5]。近年来,葛根素的抗癌作用得到了广泛的研究。在乳腺癌中,葛根素能够通过增加癌细胞内双特异性磷酸酶1的表达来抑制肿瘤进展^[6]。此外,葛根素还可以通过靶向碳酸酐酶XII来抑制由低剂量化疗药物奥沙利铂诱导的乳腺癌细胞上皮-间质转化,因此葛根素被认为是治疗乳腺癌患者的潜在临床药物^[7]。另外,葛

根素还可以诱导膀胱癌细胞凋亡,从而抑制肿瘤进展^[8]。当然,葛根素对膀胱癌的抑制作用还可能涉及其对环状RNA和微小RNA的靶向调控^[9]。然而,葛根素对GC的药效和作用机制还有待深入阐明。据报道,葛根素可以通过激活PI3K/AKT信号通路来抑制肝癌HepG2细胞糖异生过程^[10]。此外,葛根素靶向磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路对神经系统疾病产生一定的保护作用^[11]。而细胞内的另一条经典信号通路Notch通路,与GC细胞的存活和周期也有着紧密关联^[12]。因此,本研究通过不同浓度葛根素处理GC细胞,探究了葛根素对GC细胞恶性生物学行为的影响及其与GC细胞Notch、PI3K/AKT信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞系与葛根素

人GC细胞系AGS购自武汉普诺赛生命科技有限公司。N87细胞购自合肥万物生物科技有限公司。

司。葛根素购自上海源叶生物科技有限公司(生产批号: B20446)。细胞均培养于含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基中。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清、青霉素/链霉素混合液、RPMI-1640培养基购自Gibco公司。蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。磷酸盐缓冲液、蛋白裂解液购自北京索莱宝科技有限公司。超敏化学发光液购自Thermo Fisher公司。Jagged-1多肽购自MCE公司。抗GAPDH、Bax、Bad、Notch1和Notch1 ICD抗体购自Abcam公司。抗PI3K、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、AKT、p-AKT、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTORC1(Ser2448)和p-mTORC2(Ser2481)抗体购自Proteintech公司。羊抗鼠、羊抗兔二抗购自Cell Signaling公司。酶标仪购自Thermo Fisher公司。聚丙烯酰胺凝胶电泳槽购自Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 葛根素处理和细胞分组

将AGS和N87细胞均分为空白组(0 mg/mL)、低浓度葛根素组(10 mg/mL)、中浓度葛根素组(50 mg/mL)和高浓度葛根素组(100 mg/mL), 按照对应浓度分别加入经培养基稀释好的葛根素, 空白组加入等量培养基。在部分实验中, 需要向上述各葛根素处理组加入10 μ g/mL的Jagged-1多肽。葛根素处理时间以不同实验所需时间为准。

1.3.2 克隆形成实验

将AGS细胞和N87细胞分别按500个/孔接种于6孔板内, 按前述分组使用含不同浓度葛根素的培养基进行培养, 每天更换1次培养基以维持培养体系内的葛根素浓度。连续培养10 d, 肉眼可见明显的细胞集落形成, 撤去培养体系, 用磷酸盐缓冲液轻轻洗涤3次。然后用4%多聚甲醛固定细胞15 min, 经磷酸盐缓冲液轻轻洗涤3次后, 再用0.1%结晶紫溶液染色细胞20 min。将6孔板倒置风干10 min。然后, 观察并统计各孔内形成的细胞集落数量。在部分实验中, 需要向上述各葛根素处理组加入10 μ g/mL的Jagged-1多肽。

1.3.3 划痕实验

将AGS细胞和N87细胞分别接种于6孔板内,

以不含葛根素的完全培养基进行培养。待其汇合度达70%, 撤去旧培养基, 用磷酸盐缓冲液洗涤3次。将细胞按前文所述进行分组, 并用无菌10 μ L移液枪头在孔底进行十字划痕。之后, 使用无血清培养基配制前述浓度的葛根素, 并用以培养细胞。分别在划痕第0 h、24 h于显微镜下观察划痕面积变化情况, 拍照后通过Image J软件分析划痕愈合面积比例。在部分实验中, 需要向上述各葛根素处理组加入10 μ g/mL的Jagged-1多肽。

1.3.4 Transwell实验

首先, 在冰上操作, 将Matrigel胶铺于24孔Transwell板的小室底部。然后, 将处于对数生长期的AGS细胞和N87细胞消化并离心, 使用含不同浓度(如前文分组所述浓度)葛根素的无血清培养基进行重悬。然后, 吸取200 μ L(1 000个细胞)细胞悬液加入小室内, 下室内加入700 μ L含10%胎牛血清的完全培养基。培养48 h后取出Transwell板, 用棉签轻轻拭去小室底部未发生侵袭的细胞, 然后用4%多聚甲醛固定细胞, 再用0.1%结晶紫溶液对细胞染色, 待小室风干后于显微镜下观察并统计发生侵袭行为的细胞数量。在部分实验中, 需要向上述各葛根素处理组小室内加入10 μ g/mL的Jagged-1多肽。

1.3.5 Western blot

收集经不同浓度葛根素处理24 h后的GC细胞, 首先经过磷酸盐缓冲液溶液冲洗3次, 然后使用蛋白裂解液进行裂解, 获得细胞总蛋白。蛋白样品在4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min条件下离心10 min, 留取离心后的上清蛋白样品。然后, 蛋白样品经过蛋白定量检测试剂盒测定浓度后, 在聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 并转移到聚偏二氟乙烯膜上。然后, 使用5%脱脂牛奶对膜进行封闭2 h。之后, 将膜与稀释好的一抗在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 然后继续与稀释好的二抗在常温下孵育2 h。最后, 使用超敏化学发光液对蛋白条带进行显影。所有一抗稀释比例为1:2 000, 二抗稀释比例为1:10 000。

1.3.6 裸鼠荷瘤模型

20只4周龄雄性BALB/C裸鼠购自北京斯贝福生物公司, 饲养于洁净动物房内, 并适应性饲喂一周。收集处于对数生长期的AGS细胞, 消化、离心后, 用磷酸盐缓冲液重悬并计数。将AGS细胞按 2×10^6 个/只接种于裸鼠背部皮下, 5 d后可见明

显的突起物形成,表明建模成功。之后,依据葛根素饲喂剂量将裸鼠随机分为对照组(0 mg/kg)、低剂量组(5 mg/kg)、中剂量组(10 mg/kg)和高剂量组(20 mg/kg),每组各5只。对照组饲喂不含葛根素的正常饲料;其余各组按分组剂量饲喂葛根素(生理盐水稀释)和正常饲料,每天给药一次,连续饲喂20 d。饲喂结束后,处死动物,取下肿瘤组织,拍照后称重(mg),并测量体积,体积公式: $V=(长 \times 宽^2)/2$ 。本研究动物实验获得西安医学高等专科学校附属医院动物保护伦理委员会审批通过,所有操作均符合伦理要求。

1.3.7 统计分析

所有实验独立重复3次。数据使用Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析并绘制统计图。对于多组数据,通过单因素方差分析进行比较。 $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素以浓度依赖性抑制GC细胞增殖、迁移和侵袭活性

使用不同浓度葛根素处理AGS细胞和N87细胞

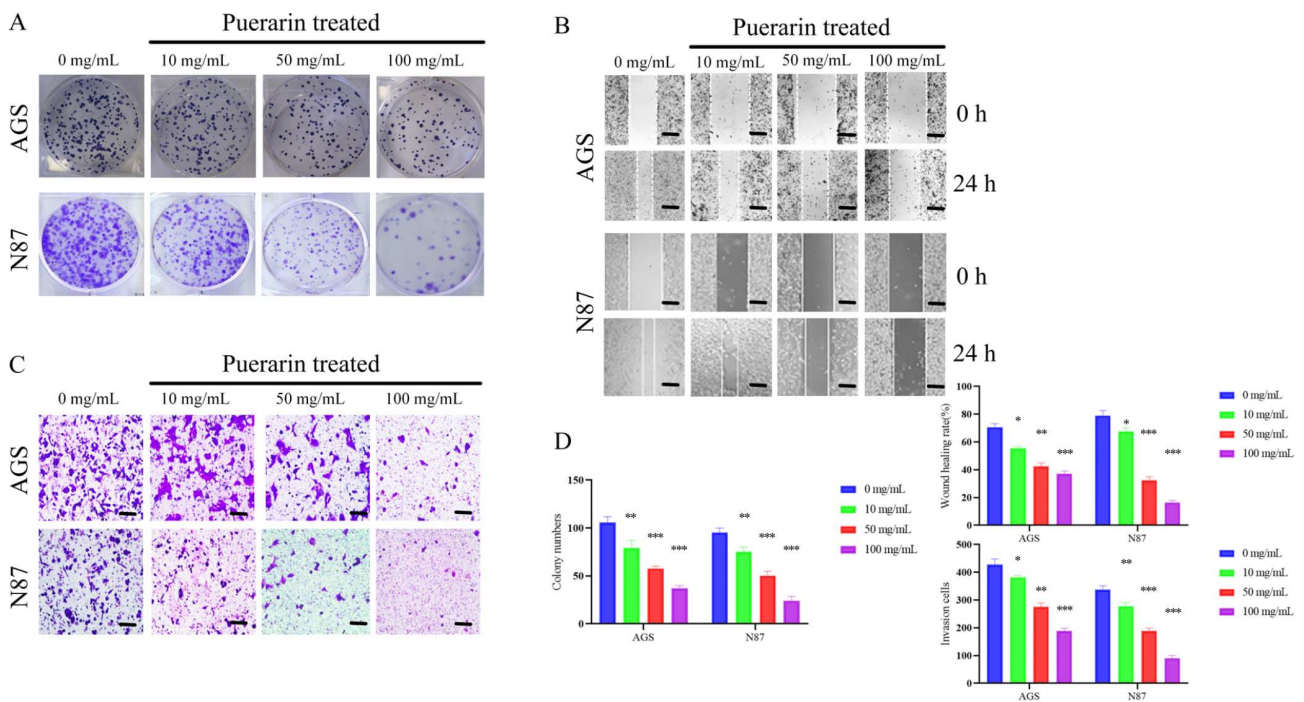
后,克隆形成实验结果表明,与空白组细胞相比,各葛根素处理组细胞的增殖活性均显著降低,形成的细胞集落数均显著少于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图1A)。划痕实验结果表明,葛根素处理导致GC细胞迁移能力受到显著抑制,各葛根素处理组细胞的划痕愈合面积均显著小于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图1B)。另外,Transwell实验结果显示,各葛根素处理组发生侵袭的细胞数量均显著少于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图1C)。

2.2 葛根素抑制GC体内生长

为了进一步验证体外实验的结论,本研究构建了裸鼠GC荷瘤模型,并以不同剂量葛根素进行饲喂。结果表明,各葛根素饲喂组裸鼠形成的GC肿瘤体积和重量均显著小于对照组裸鼠,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图2)。

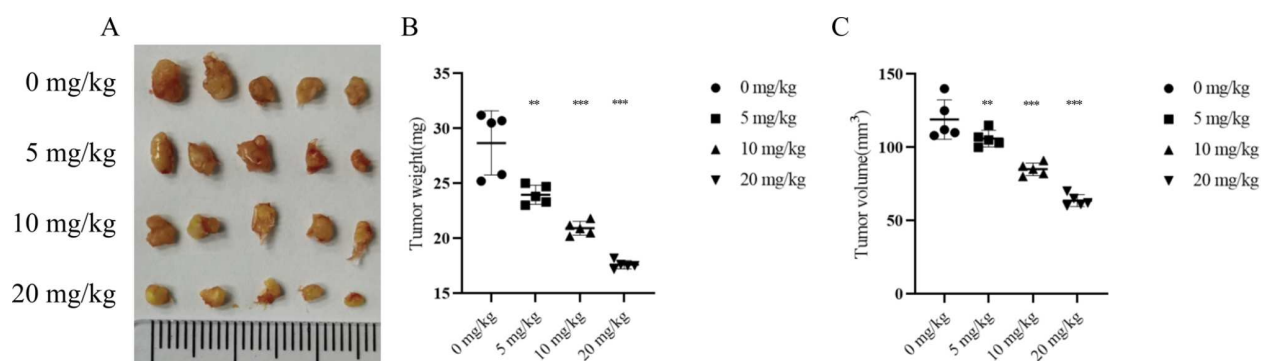
2.3 葛根素处理诱导GC细胞凋亡,并抑制Notch1受体活化和PI3K/AKT/mTORC1通路磷酸化激活

提取不同浓度葛根素处理的细胞总蛋白进行Western blot,结果显示,与空白组细胞相比,各葛根素处理组细胞内凋亡蛋白Bax和Bad表达水平



A: 通过克隆形成实验检测各组细胞增殖活性; B: 通过划痕实验检测各组细胞迁移能力, 标尺=200 μ m; C: 通过Transwell实验检测各组细胞侵袭能力, 标尺=100 μ m; D: 统计分析, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组(0 mol/mL)比较

图1 葛根素以浓度依赖性抑制GC细胞增殖、迁移和侵袭活性



在成功构建裸鼠GC荷瘤模型后,以不同剂量葛根素饲喂裸鼠,20 d后取肿瘤组织,观察并统计各组肿瘤大小差异。 $**P<0.01$, $***P<0.001$,与对照组(0 mol/mL)比较

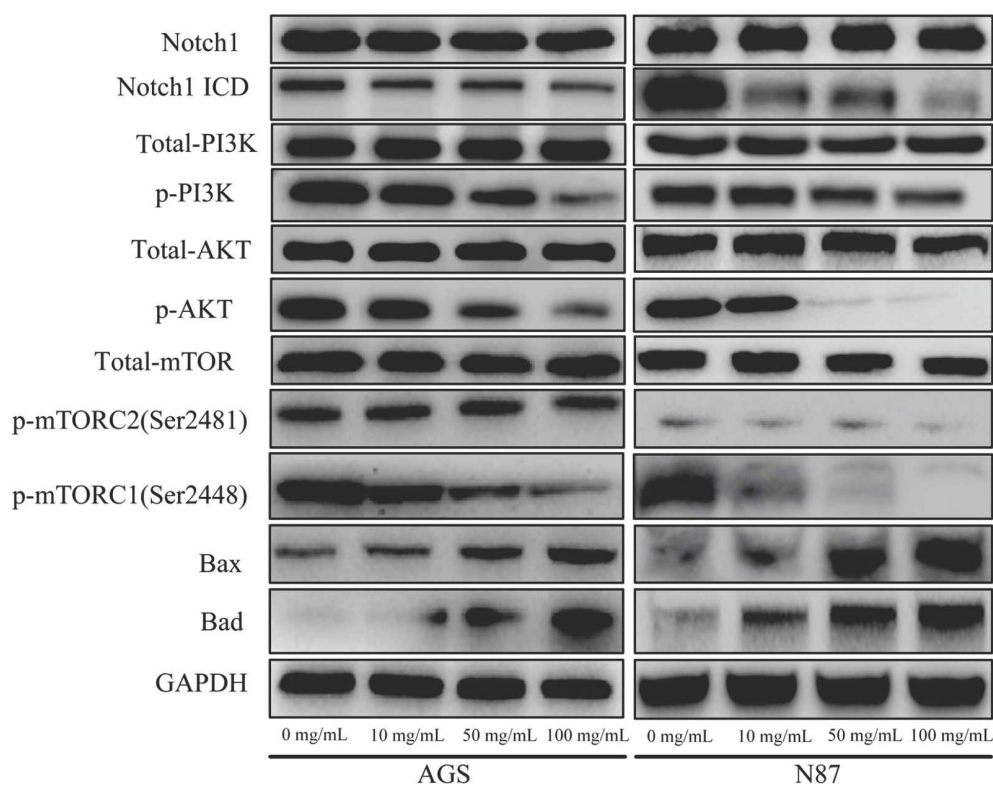
图2 葛根素抑制GC体内生长

均显著升高,Notch1 ICD水平均显著降低,p-PI3K、p-AKT、p-mTORC1(Ser2448)水平均显著降低,而Notch1、PI3K、AKT、mTOR表达水平无显著差异(图3)。

2.4 葛根素靶向抑制Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路的激活来抑制GC进展

为了验证葛根素对Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路的靶向性,分别向各葛根素处理组细胞培养

体系加入50 $\mu\text{g/mL}$ 的Notch1受体激动剂Jagged-1多肽。Western blot结果显示,Jagged-1的加入部分逆转了葛根素对Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路的抑制作用(图4)。克隆形成实验结果表明,加入Jagged-1后,各葛根素处理组细胞增殖活性均显著提升,差异有统计学意义($P<0.05$)(图5A)。划痕实验和Transwell实验结果显示,在Jagged-1作用下,各葛根素处理组细胞的迁移和侵袭能力均显著增加,



使用不同浓度葛根素处理GC细胞后,通过Western blot检测相关蛋白质表达水平的变化

图3 葛根素对GC细胞凋亡、Notch1和PI3K/AKT/mTORC1通路的影响

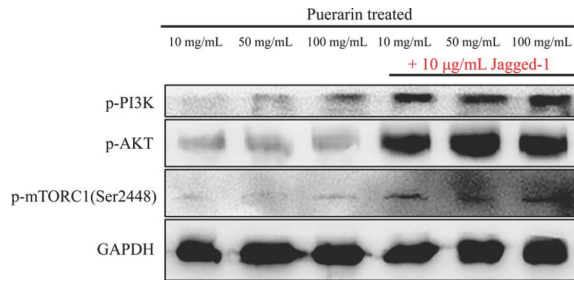


图4 加入Jagged-1后PI3K/AKT/mTORC1通路变化

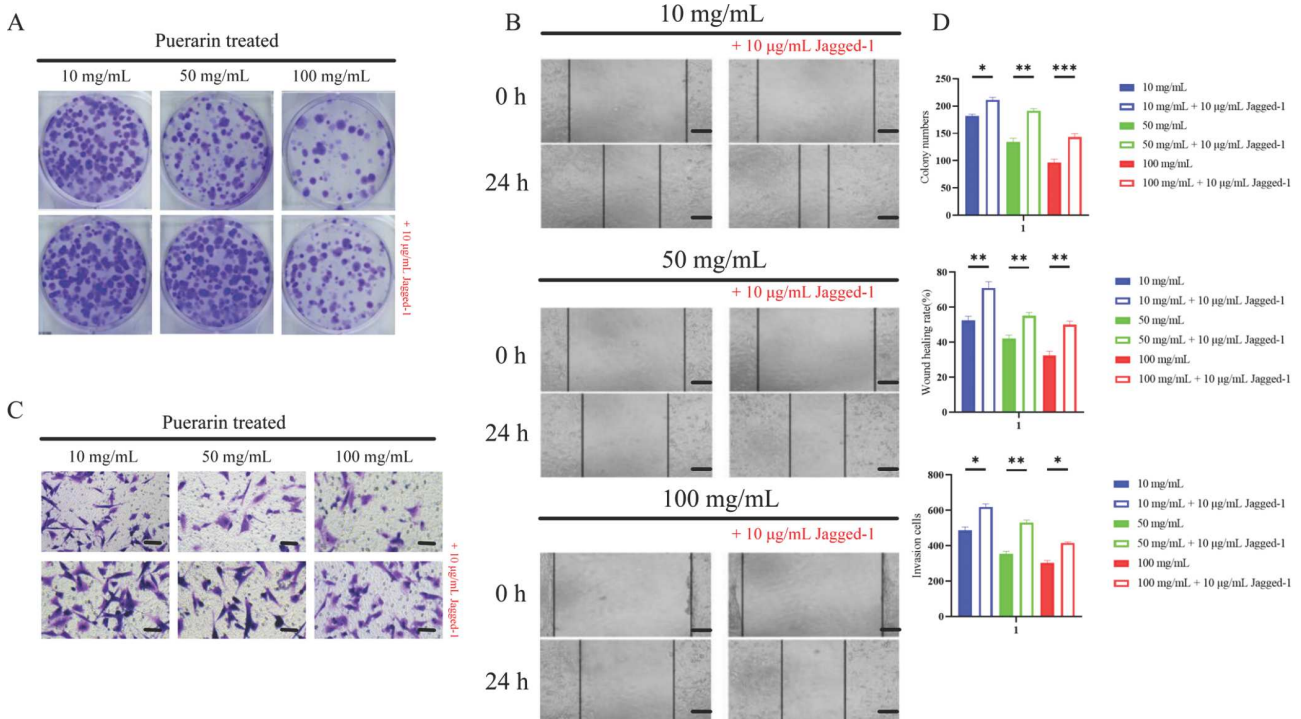
差异有统计学意义($P < 0.05$)(图5B和图5C)。

3 讨论

GC是消化道常见的恶性肿瘤之一, 全球发病率始终居高不下。传统中医药治疗GC已经得到深入探索, 其中涉及中药成分对癌细胞内信号通路的靶向调控^[13]。据报道, 中药左金丸能够增强化疗药物对GC细胞的抑制作用, 逆转癌细胞的耐药性^[14]。另外, 中药单体能够逆转GC细胞上皮-间充质转化, 从而有效抑制GC的发生和发展^[15]。这些证据说明, 中药治疗GC有着巨大的应用前景。

据报道, 葛根素作为一种草药来源的生物活性

化合物具有广泛的药理特性^[16,17]。它还对多种人类癌症具有保护作用, 主要通过诱导癌细胞凋亡发挥作用^[18]。肿瘤发展与抑制细胞凋亡或程序性细胞死亡密切相关, 这使得癌细胞得以永生。据报道, 葛根素通过降低细胞活力、诱导细胞凋亡、激活Bax和caspase 3蛋白表达, 对结肠癌HT-29细胞产生抑制作用^[19]。许浩等^[20]的研究表明, 葛根素能够通过抑制着丝粒蛋白A的表达来抑制膀胱癌细胞的增殖行为。另有研究表明, 葛根素能够诱导雄激素非依赖性前列腺癌细胞凋亡^[21]。在卵巢癌中, 葛根素的作用有助于肿瘤抑制基因表达和肠道微生物群调节^[22]。本研究为了探讨葛根素对胃癌的抗癌作用, 也重点研究了其对细胞增殖和凋亡的作用, 结果发现, 葛根素浓度的增加对胃癌细胞的细胞活力和增殖具有显著抑制作用。相应的, 我们也发现, GC细胞中细胞凋亡被激活, 伴随Bax和Bad表达增加。与以前报道的研究结果一致, 我们的研究结果也证实了葛根素在GC细胞和裸鼠GC荷瘤模型中的抗癌作用。进一步的机制研究发现, 葛根素是通过抑制Notch1/PI3K/AKT/



A: 通过克隆形成实验检测各组细胞增殖活性的变化; B: 通过划痕实验检测各组细胞迁移能力的变化, 标尺=200 μm; C: 通过Transwell实验检测各组细胞侵袭能力的变化, 标尺=100 μm; D: 统计结果分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 mol/mL)比较

图5 葛根素靶向抑制Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路的激活来抑制GC进展

mTORC1通路磷酸化水平来抑制GC细胞增殖活性,在加入Notch1受体激动剂Jagged-1多肽后,葛根素对GC细胞增殖的抑制作用得到部分逆转。这说明Notch1通路和PI3K/AKT/mTORC1通路均是葛根素抗GC生长作用的靶标。

中药单体可以通过多种信号通路抑制癌症进展,并促进免疫治疗效果^[23]。葛根素对癌细胞的抑制作用与多种信号通路的调节相关。唐青等^[24]报道,葛根素通过抑制PI3K/AKT通路调节膀胱癌细胞周期,从而抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭。有趣的是,葛根素也可以诱导顺铂耐药性卵巢癌细胞凋亡^[25]。除此之外,葛根素被报道可以通过抑制PI3K/mTOR信号通路抑制宫颈癌细胞的生长和迁移^[26]。葛根素与PI3K/AKT/mTOR的靶向作用可能还参与了细胞代谢的调节。据报道,葛根素可以通过抑制由mTOR介导的葡萄糖代谢在胰腺导管腺癌中发挥抗肿瘤活性^[27]。为了探究葛根素通过何种途径抑制GC细胞迁移和侵袭,我们利用Western blot检测了相关蛋白质的表达水平,发现Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路激活水平受到显著抑制;而mTORC2(Ser2481)水平不受影响。在加入Notch1受体激动剂Jagged-1后,该通路活化水平得到显著提高,GC细胞迁移和侵袭活性得到提升。这进一步说明,Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路参与了GC细胞转移过程的调节。然而,关于葛根素如何作用于Notch1受体,以及如何影响其活化过程,尚需进一步研究。此外,还需要使用更为连续的浓度梯度葛根素进行深入研究。

总之,我们的结果表明,葛根素可以靶向Notch1/PI3K/AKT/mTORC1通路抑制GC细胞的增殖、迁移和侵袭行为,并促进细胞凋亡,确认最终抑制肿瘤体内、体外进展。未来的研究需要进行更为深入地探索其下游效应分子,以明确葛根素对GC治疗的临床药理作用。

作者贡献声明:

李文哲:主要负责实验操作、分析数据、绘制图表和撰写文稿;

刘芳芳:主要负责指导实验计划和文稿修改。

利益冲突声明:本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648
- [2] López MJ, Carbajal J, Alfaro AL, et al. Characteristics of gastric cancer around the world. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2023, 181: 103841
- [3] Liga S, Paul C. Puerarin-a promising flavonoid: biosynthesis, extraction methods, analytical techniques, and biological effects. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5222
- [4] Li Z, Cao W, Zhang Y, et al. Puerarin ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting lipid metabolism through FMO5. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1423634
- [5] Xuan T, Liu Y, Liu R, et al. Advances in extraction, purification, and analysis techniques of the main components of kudzu root: a comprehensive review. *Molecules*, 2023, 28(18): 6577
- [6] Li Z, Xu W, Ren X, et al. Puerarin promotes DUSP1 expression by regulating miR-133a-3p in breast cancer. *Mol Med Report*, 2019, 19(1): 205
- [7] Chen X, Zhou Z, Zhang Z, et al. Puerarin inhibits EMT induced by oxaliplatin via targeting carbonic anhydrase XII. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 969422
- [8] Ye G, Kan S, Chen J, et al. Puerarin in inducing apoptosis of bladder cancer cells through inhibiting SIRT1/p53 pathway. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 195
- [9] Du L, Zhang L, Sun F. Puerarin inhibits the progression of bladder cancer by regulating circ_0020394/miR-328-3p/NRBP1 axis. *Cancer BioTher Radiopharms*, 2022, 37(6): 435-450
- [10] Liu Y, Qiu Y, Chen Q, et al. Puerarin suppresses the hepatic gluconeogenesis via activation of PI3K/Akt signaling pathway in diabetic rats and HepG2 cells. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111325
- [11] Wang Q, Shen ZN, Zhang SJ, et al. Protective effects and mechanism of puerarin targeting PI3K/Akt signal pathway on neurological diseases. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1022053
- [12] To HTN, Park JH, Kim JW, et al. Delta/Notch-like epidermal growth Factor-Related receptor (DNER), a potential prognostic marker of gastric cancer regulates cell survival and cell cycle progression. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10077
- [13] 赵颖异, 吕星, 谭雅兰, 等. 中药通过细胞外信号调节激酶信号通路调控胃癌的研究进展. *世界中医药*, 2024, 19(7): 1043-1048,1055
- [14] 李赞, 吴秋雪, 卫真真, 等. 中药左金丸逆转胃癌顺铂耐药的作用机制. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(3): 398-404
- [15] 蒋寒冰, 刘佳, 张淑君, 等. 中药单体逆转胃癌上皮间质转化的研究进展. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(23): 4196-4199

- [16] Zhou Y, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975
- [17] Murahari M, Singh V, Chaubey P, et al. A critical review on anticancer mechanisms of natural flavonoid puerarin. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(6): 678-686
- [18] Ahmad B, Khan S, Liu Y, et al. Molecular mechanisms of anticancer activities of puerarin. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 79-90
- [19] Yu Z, Li W. Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*, 2006, 238(1): 53-60
- [20] 许浩, 潘登, 马雨阳, 等. 葛根素调控CENPA抑制膀胱癌细胞增殖的机制研究. *东南大学学报(医学版)*, 2024, 43(4): 487-497
- [21] Li J, Xiong C, Xu P, et al. Puerarin induces apoptosis in prostate cancer cells via inactivation of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 402-413
- [22] Ye Y, Gao Y, Fang Y, et al. Anticancer effect of puerarin on ovarian cancer progression contributes to the tumor suppressor gene expression and gut microbiota modulation. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 1-15
- [23] 翟锦钰, 董智鑫, 邬海龙. 中药单体在肿瘤免疫治疗中的作用. *生命的化学*, 2024, 44(11): 1981-1989
- [24] 唐青, 吴奇, 宋秋元, 等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨葛根素对膀胱癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响. *中国老年学杂志*, 2024, 44(14): 3488-3492
- [25] Duan J, Yin M, Shao Y, et al. Puerarin induces platinum-resistant epithelial ovarian cancer cell apoptosis by targeting SIRT1. *J Int Med Res*, 2021, 49(9): 3000605211040762
- [26] Jia L, Hu Y, Yang G, et al. Puerarin suppresses cell growth and migration in HPV-positive cervical cancer cells by inhibiting the PI3K/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 543
- [27] Zhu H, Xiao Y, Guo H, et al. The isoflavone puerarin exerts anti-tumor activity in pancreatic ductal adenocarcinoma by suppressing mTOR-mediated glucose metabolism. *Aging*, 2021, 13(23): 25089-25105