DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230612.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1049.R.20230612.1112.002.html

黎药海南地不容氧化克班宁对人乳腺癌MCF-7细胞微管位点和微管蛋白的调控机制研究

肖 迪[1],闫彩凤[1],于晶涵[1],许声江[2],王先正[2],王正文[2]✉
(1.哈尔滨商业大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150076;2.海南省肿瘤医院肝胆胰外科,海南 海口 570000)

[摘要] **目的**:本论文深入探究黎药海南地不容抗乳腺癌活性化合物氧化克班宁对微管网络的破坏能力,研究氧化克班宁在分子层面和细胞层面对微管网络稳态的影响。**方法**:首先采用EBI位点竞争法和分子对接来确定氧化克班宁对微管位点的占据力;其次,采用Western Blot法检测STAT3、PKA1、CAMK4和PKA检测氧化克班宁对微管蛋白的影响。**结果**:EBI位点竞争法结果显示,EBI与β-微管蛋白加合物比β-微管蛋白出现在分子量更小的区域(ctrl2)。分子对接结果显示,氧化克班宁可以占据微管蛋白的秋水仙碱位点。Western Blot结果显示,低、中、高3个浓度的氧化克班宁或阳性药Taxol作用MCF-7细胞48 h后,显著降低STAT3蛋白表达水平($P<0.01$),显著降低PKA1和CAMK4蛋白表达水平($P<0.05$,$P<0.01$),并且可降低PKA蛋白表达水平,与对照组差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论**:氧化克班宁结合在微管蛋白秋水仙碱位点扰乱微管蛋白聚合,造成MCF-7细胞有丝分裂,从而导致MCF-7细胞死亡。氧化克班宁可通过抑制MCF-7细胞中STAT3、PKA1、CAMK4和PKA蛋白的表达水平,干扰纺锤体形成,最终造成MCF-7细胞有丝分裂灾难。

[关键词] 黎药海南地不容;氧化克班宁;MCF-7细胞;微管位点;微管蛋白
[中图分类号] R29 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)15-1121-07

Study on regulating mechanisms of oxocrebanine obtained from *Stephania hainanensis* H. S. Lo et Y. Tsoong on microtubule sites and tubulin in human breast cancer MCF-7 cells

XIAO Di[1], YAN Cai-feng[1], YU Jing-han[1], XU Sheng-jiang[2], WANG Xian-Zheng[2], WANG Zheng-wen[2]✉
(1. *College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin* 150076, *China*; 2. *Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Hainan Cancer Hospital, Haikou* 570000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by Natural Science Foundation of Hainan Province*(820*RC*776).
[*Author*]:*XIAO Di, M.M., E-mail*: 1437423987@*qq.com*.
[*Correspondence to*]:*WANG Zheng-wen, Associate Chief Physician, M.D., E-mail*: *zhwwang_sc*@163.*com*.
Received: 2023-02-09 *Revised*: 2023-06-05 *JHMU*, 2023;29(15):1121-1127

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To determine the destructive ability of oxocrebanine, an anti-breast cancer active compound obtained from *Stephania hainanensis* H. S. Lo et Y. Tsoong, on microtubule network, and investigate the effect of oxocrebanine on microtubule network homeostasis at both molecular and cellular levels. **Methods**: the EBI site competition method and molecular docking method were used to determine the occupation of the microtubule site of oxocrebanine. Western Blot was used to detect the effect of oxocrebanine on microtubule-associated proteins including STAT3, PKA1, CAMK4, and PKA. **Results**: The results of EBI site competition assay showed that the binding of EBI to β-Tubulin covalent fusions produced adducts that appeared in regions of lower molecular weight than β-tubulin (ctrl 2). Molecular docking results showed that oxocrebanine could occupy the colchicine site of microtubule proteins. As revealed by Western Blot, the expression of STAT3 protein was decreased after MCF-7 cells have been treated with low, medium, and high concentration of oxocrebanine or the positive drug taxol for 48 h ($P<0.01$).

[基金项目]海南省自然科学基金项目(820RC776)
[作者简介]肖迪,医学硕士,E-mail:1437423987@qq.com。
[通讯作者]王正文,副教授,医学博士,E-mail:zhwwang_sc@163.com。
[收稿日期]2023-02-09 [修回日期]2023-06-05 网络出版时间:2023-06-12 15:52:17

The expression levels of PKA1 and CAMK4 proteins aslo showed significant reductions ($P<0.05$, or $P<0.01$). Oxocrebanine also decreased the PKA protein in MCF-7 cells compared to the control group ($P<0.01$). **Conclusion**: Oxocrebanine, a ligand that binds at the colchicine site of tubulin, perturbs tubulin polymerization and causes mitosis in MCF-7 cells, thus leading to MCF-7 cell death. Oxocrebanine may promote microtubule dynamics through stathmin by inhibiting the expression levels of STAT3, PKA1, CAMK4, and PKA proteins in MCF-7 cells. Oxocrebanine interfers with spindle formation, and ultimately causes mitotic catastrophe in MCF-7 cells.

[**KEYWORDS**] *Stephania hainanensis* H. S. Lo et Y. Tsoong; Oxocrebanine; MCF-7 cell line; Microtubule site; Microtubule protein

海南地不容(*Stephania hainanensis* H. S. Lo et Y. Tsoong)系防己科千金藤属植物,又名金不换、山乌龟,草质藤本,属海南特有植物。生于海南岛大山石缝、峭壁、乱石堆的半阴处或溪边丛林中[1]。海南地不容作为海南黎族的传统医药,块根入药。味苦,性寒,有小毒。具有清热解毒、抗菌抗炎、截疟、理气、止痛等功效。海南地不容中主要含有异喹啉型生物碱、阿扑啡型生物碱、原小檗碱型生物碱和吗啡型生物碱。这些生物碱具有抗肿瘤、抗氧化、抗惊厥、抗血小板凝集等多种生物活性,用于治疗癌症、损伤和炎症[2,3]。课题组前期实验从海南地不容分离得到的阿朴菲类生物碱——单体化合物氧化克班宁(结构式见图1),具有抗乳腺癌活性,其敏感细胞株为MCF-7细胞,IC_{50}为16.66 μmol/L[4]。

微管是由α、β-微管蛋白异二聚体组成的圆柱形结构。通过抑制微管蛋白聚合或阻断微管的解聚,干扰微管的动态平衡,最终阻碍微管的正常功能导致细胞死亡。秋水仙碱是第一个确定的微管蛋白破坏剂[5]。目前进入临床试验的肿瘤血管阻断剂多为微管抑制剂,其中又多为作用于秋水仙碱位点的化合物[6]。Stathmin是一种微管不稳定蛋白,它与α,β-微管蛋白异二聚体结合,调节微管动力。STAT3与Stathmin结合的位置是羧基末端区域,Stathmin是STAT3维持微管形态的直接靶点,STAT3的过量表达,拮抗Sathmin的微管解聚活性[7]。

前期研究发现,海南地不容氧化克班宁作为拓扑异构酶和微管蛋白的双重抑制剂,可同时干扰MCF-7细胞的微管结构和动态平衡[8]。本论文进一步观察氧化克班宁对MCF-7细胞微管网络的影响,通过对作用位点、信号通路等途径探讨氧化克班宁对微管网络的作用机制;在微观层面,通过检测氧化克班宁对微管调控蛋白的影响,进一步确定氧化克班宁促进微管解聚的机制。

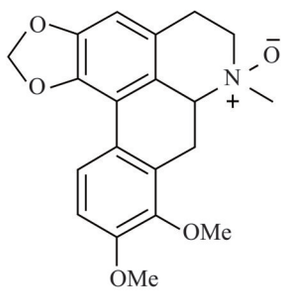


图1 氧海南地不容氧化克班宁结构式

Fig 1 The structural formula of oxocrebanine in *Stephania hainanensis* H. S. Lo et Y. Tsoong

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌MCF-7细胞由哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心提供;氧化克班宁(Oxocrebanine,98%)由海南医学院提供,紫杉醇购自上海源叶生物科技有限公司(货号B21695),秋水仙素购自碧云天生物科技有限公司(货号:ST1173),N,N,′-亚甲基双丙烯酰胺(EBI,2-iodo-iV-[2-[2-[2-[2-iodoacetyl] ethyl] acetamide)购自博奥森生物集团有限公司(货号:BA09167173),DMSO购自天津市富宇精细化工有限公司(货号:20200605),RPMI-1640培养基购自大连美伦生物科技有限公司(货号:MA0215-Nov-17H),胰蛋白酶购自美国Sigma药物公司(货号:20200603),胎牛血清购自广州翔博生物科技有限公司(货号:20201013);电泳仪(型号:DYY-7C)、垂直电泳转印槽(型号:DYCZ-40D)购自北京六一生物技术有限公司,凝胶成像系统购自GE美国通用电气公司(型号:ImageQuant LAS500)。

1.2 方法

1.2.1 EBI竞争法测定氧化克班宁竞争微管位点 氧化克班宁给药浓度为8.33、16.66、33.32 μmol/L,秋水仙碱的终浓度为6.8 μmol/L,作用MCF-7细胞48 h后,用EBI(100 μmol/L)孵育2 h,空白对照组每孔加同体积RPMI 1640培养基,收集细胞,加入RIPA裂解液裂解30 min,4 ℃、12 000 r/min离心

15 min,提取蛋白。蛋白样品上样,低中高剂量组分别加入EBI,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,于5%脱脂牛奶中封闭60 min后抗体孵育。

1.2.2 分子对接 利用分子模拟软件AutoDock进行分子对接研究。微管蛋白晶体结构从PDB数据库(PDB: 1SA0)下载。采用AutoDock对晶体结构进行处理,包括提取配体、去除水分子、加氢、添加部分电荷和最小化能量。同时用ChemDraw软件画出氧化克班宁结构图,然后利用PyMOL软件构建待测化合物的三维结构,最小化能量后生成构象库。选择默认的对接参数将化合物对接到定义的对接点。

1.2.3 Western Blot法测定STAT3、PKA1、CAMK4、PKA蛋白表达的变化 氧化克班宁给药浓度为8.33、16.66、33.32 μmol/L,秋水仙碱浓度为6.8 μmol/L,作用MCF-7细胞48 h后,提取蛋白。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,于5%脱脂牛奶中封闭60 min,分别加入兔抗人STAT3、PKA1、CAMK4、PKA抗体,4 ℃孵育过夜;TBST洗涤3次,加入二抗,室温孵育60 min;TBST洗涤3次,加入ECL发光试剂显影。

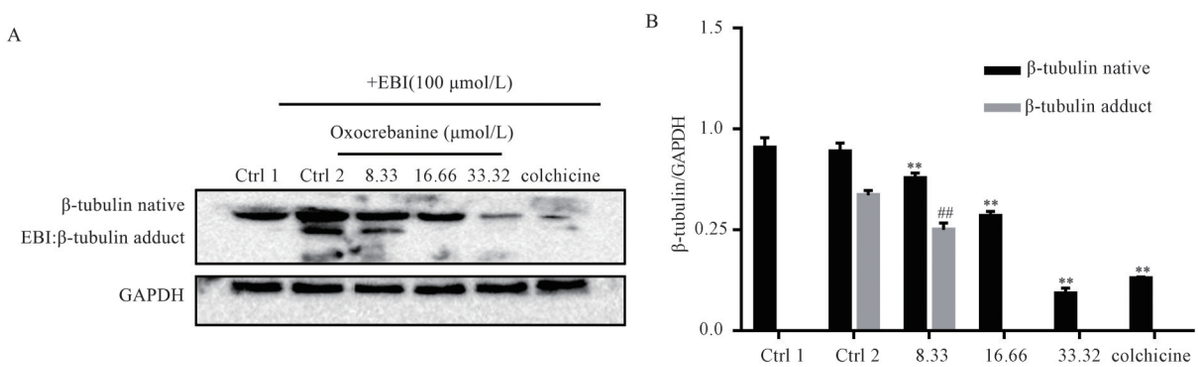
1.3 统计学处理

采用SPSS for Windows 21.0软件对数据进行分析处理。多样本组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和LSD多重比较分析法进行。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化克班宁对微管位点的作用

以EBI竞争实验确定氧化克班宁是否作用于微管蛋白的秋水仙碱位点,如图2所示,EBI与β-微管蛋白共价融合产生的加合物出现在分子量更小的区域(ctrl2),且随着氧化克班宁的浓度逐渐增高,加合物条带也随之消失,高浓度组出现的情况与秋水仙碱对照组相同。



A:β-tubulin蛋白表达条带;B:β-tubulin蛋白表达柱状图;Ctrl2为空白组+EBI试剂

图2 EBI实验验证氧化克班宁靶向秋水仙碱位点

Fig 2 EBI assay verified that oxocrebanine targeted colchicine sites

表1 氧化克班宁对乳腺癌MCF-7细胞β-tubulin表达水平的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of oxocrebanine on the expression level of β-tubulin in MCF-7 cells (n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	质量浓度(μmol/L)	β-tubulin native	β-tubulin adduct
空白组1	0	0.91±0.04	0
空白组2	0	0.89±0.05	0.67±0.03
	8.33	0.76±0.04**	0.50±0.05##
氧化克班宁	16.66	0.57±0.06**	0
	33.32	0.18±0.04**	0
Colchicine	6.80	0.26±0.03**	0
F		274.00	136.69
P		0.00	0.00

注:与空白对照组1比较,**$P<0.01$,与空白对照组2比较,##$P<0.01$。

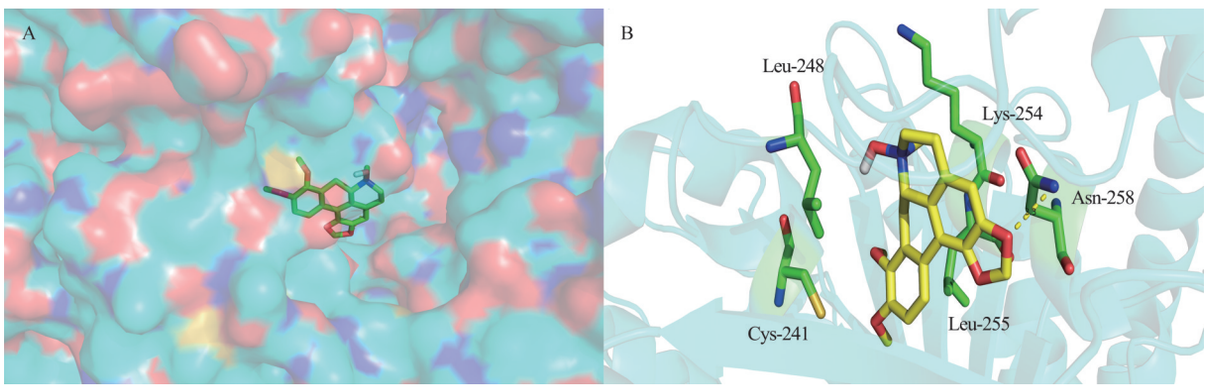
2.2 分子对接实验结果

推测氧化克班宁通过结合微管蛋白而靶向微管,使用AutoDock软件研究氧化克班宁和微管蛋白(PDB: 1SA0)融合及连接,评估氧化克班宁和微管蛋白的融合方式。结果显示,氧化克班宁可以占据微管蛋白的秋水仙碱位点,如图3所示,氧化克班宁能够与Lys-254,Leu-255,Cys-241和Leu-248的残基形成疏水作用;氧化克班宁中的亚甲二氧基与Asn-258形成氢键。证明氧化克班宁可能是一种与微管蛋白结合的抑制剂。

2.3 氧化克班宁对人乳腺癌MCF-7细胞微管关键蛋白的影响

2.3.1 氧化克班宁对MCF-7细胞微管调控蛋白

STAT3的影响　实验结果如图4和表2所示，STAT3的蛋白灰度值出现剂量依赖性降低的趋势（$P<0.01$），表明给药氧化克班宁48 h后，MCF-7细胞内的STAT3蛋白表达量降低。6.80 μmol/L的Taxol作用后，MCF-7细胞内的STAT3表达量显著减少（$P<0.01$）。



A：氧化克班宁在β-tubulin中位置图；B：氧化克班宁与β-tubulin分子对接图

图3　氧化克班宁结构图及氧化克班宁与β-tubulin对接位点展示

Fig 3　Structure diagram of oxocrebanine and the binding sites of oxocrebanine and β-tubulin

表2　氧化克班宁对乳腺癌MCF-7细胞STAT3表达水平的影响（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effect of oxocrebanine on the expression level of STAT3 in MCF-7 cells（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	质量浓度(μmol/L)	STAT3
空白组	0	1.13±0.04
Taxol组	6.80	0.69±0.02**
	8.33	0.93±0.03**
氧化克班宁	16.66	0.71±0.04**
	33.32	0.56±0.05**
F		102.84
P		0.00

注：与空白对照组比较，**$P<0.01$。

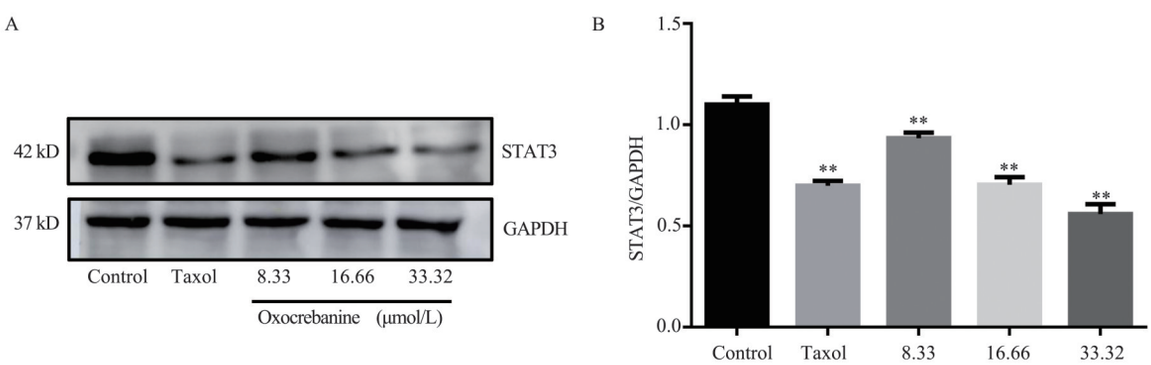
表3　氧化克班宁对乳腺癌MCF-7细胞PKA1和CAMK4表达水平的影响（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Effect of oxocrebanine on the expression level of PKA1 and CAMK4 in MCF-7 cells（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	质量浓度(μmol/L)	PKA1	CAMK4
空白组	0	1.46±0.05	1.01±0.04
Taxol组	6.80	0.92±0.05**	0.73±0.03**
	8.33	1.31±0.03*	0.85±0.03**
氧化克班宁	16.66	1.15±0.06**	0.66±0.04**
	33.32	0.49±0.04**	0.43±0.02**
F		123.31	136.69
P		0.00	0.00

注：与空白对照组比较，**$P<0.01$。

2.3.2　氧化克班宁对MCF-7细胞Stathmin调控蛋白PKA1和CAMK4的影响　实验结果如图5、6和表3，氧化克班宁8.33、16.66、33.32 μmol/L作用细

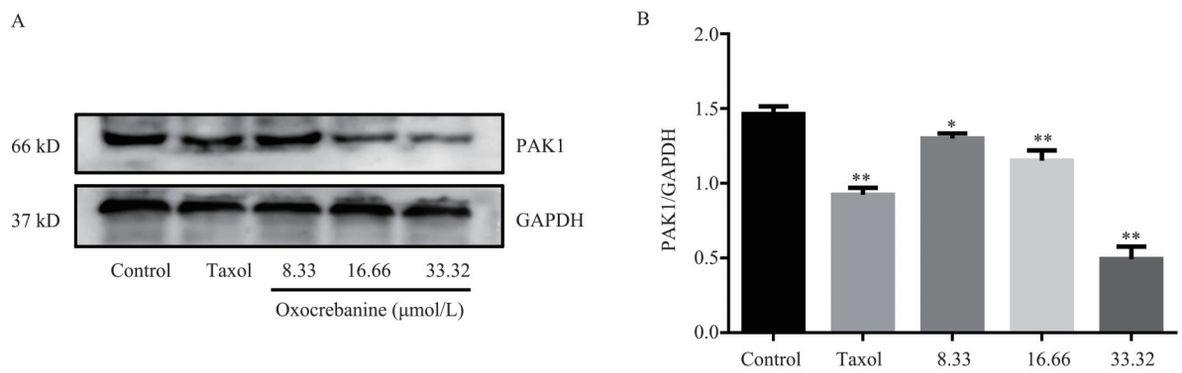


A：STAT3蛋白表达条带；B：STAT3蛋白表达柱状图；与空白对照组比较，**$P<0.01$

图4　氧化克班宁对乳腺癌MCF-7细胞STAT3表达水平的影响

Fig 4　Effect of oxocrebanine on the expression level of STAT3 in MCF-7 cells

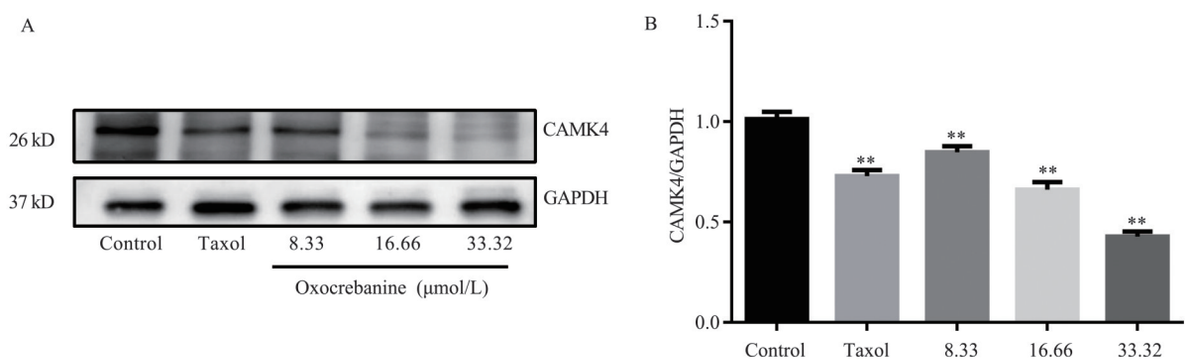
胞48 h,细胞内PKA1蛋白表达水平均出现明显降低($P<0.05$)。各剂量组CAMK4蛋白表达水平均出现了显著下降($P<0.01$)。6.80 μmol/L的Taxol作用后,MCF-7细胞内的PKA1和CAMK4蛋白表达量同样显著减少($P<0.01$)。



A:PKA1蛋白表达条带;B:PKA1蛋白表达柱状图;与空白对照组比较,$^{**}P<0.01$

图5　氧化克班宁对MCF-7细胞PKA1的影响

Fig 5　Effect of oxocrebanine on the expression level of PKA1 in MCF-7 cells

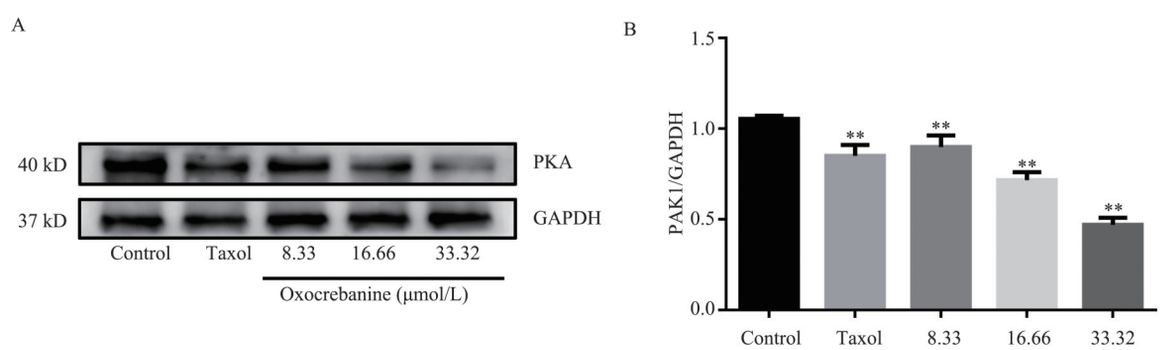


A:CAMK4蛋白表达条带;B:CAMK4蛋白表达柱状图;与空白对照组比较,$^{**}P<0.01$

图6　氧化克班宁对MCF-7细胞CAMK4的影响

Fig 6　Effect of oxocrebanine on the expression level of CAMK4 in MCF-7 cells

2.2.3　氧化克班宁对MCF-7细胞Stathmin调控蛋白PKA的影响　实验结果如图7和表4,不同剂量的氧化克班宁(8.33、16.66、33.32 μmol/L)作用于MCF-7细胞48 h,均可降低PKA蛋白表达水平($P<0.01$)。Taxol组PKA蛋白表达水平出现相同下降趋势($P<0.01$)。



A:PKA蛋白表达条带;B:PKA蛋白表达柱状图;与空白对照组比较,$^{**}P<0.01$

图7　氧化克班宁对MCF-7细胞PKA的影响

Fig 7　Effect of oxocrebanine on the expression level of PKA in MCF-7 cells

表4 氧化克班宁对乳腺癌MCF-7细胞PKA表达水平的影响（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Effect of oxocrebanine on the expression level of PKA in MCF-7 cells（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	质量浓度(μmol/L)	PKA
空白组	0	1.05±0.02
Taxol组	6.80	0.85±0.06**
氧化克班宁	8.33	0.89±0.06**
	16.66	0.71±0.04**
	33.32	0.47±0.04**
F		63.19
P		0.00

注：与空白对照组比较，**P<0.01。

3 讨论

海南地不容为临床常用黎药，在当地医院用于乳腺癌（乳石痈）的治疗[1]。本课题组前期实验发掘出抗乳腺癌活性单体化合物氧化克班宁，具有双重抑制微管蛋白和拓扑异构酶作用，本实验研究了氧化克班宁引起人乳腺癌MCF-7细胞有丝分裂灾难的微管调控机制。

微管具有重要的生物学功能，如参与染色体分离，细胞内运输和维持细胞形态[9]。微管是由非共价微管蛋白异质二聚体（α-tubulin和β-tubulin）组成，在关键的细胞事件特别是在有丝分裂中发挥重要作用，所以微管被认为是抗癌药物设计的重要靶点[10]。微管靶向药物是各种类型癌症必不可少的化疗药物，微管破坏剂药物如紫杉醇、长春碱和长春新碱临床上可用于治疗多种癌症。微管破坏剂（如长春碱）通常在长春花生物碱位点与微管蛋白结合，而秋水仙碱在微管蛋白二聚体的亚基内界面发挥其生物效应[11]。秋水仙碱结合位点位于微管α和β亚基的连接处，与α亚基上的GTP结合位点相邻。有学者认为秋水仙碱结合在β微管蛋白上导致原本的直型构象弯曲，秋水仙碱和α微管蛋白间形成了空间位阻，因而影响微管聚合[12,13]。作为新型微管抑制剂的氧化克班宁，可以选择性地调节微管蛋白的活性，从而对MCF-7细胞产生显著的细胞毒性，而对正常细胞的细胞毒性较小[14-17]。分子对接结果进一步证明，氧化克班宁可以结合微管蛋白。因此，氧化克班宁结合在微管蛋白秋水仙碱位点扰乱微管蛋白聚合，干扰MCF-7细胞的有丝分裂，从而导致MCF-7细胞死亡。

EBI试剂是一种特殊的构化剂，它与（3-微管蛋白质）的Cys239和Cys354残基交联而成。在此基础上，β-tubulin加合物的转移速率明显高于β-tubulin自身，在其相对分子质量较小的部位形成β-tubulin-EBI加合物条带。在微管蛋白抑制剂占据秋水仙碱位点后，β-tubulin加合物的生成受到抑制[18]。然而MCF-7细胞经氧化克班宁或秋水仙碱处理后，再添加EBI试剂，β-tubulin-EBI加合物的形成受到抑制，表明氧化克班宁与微管蛋白的秋水仙碱位点相互作用，EBI结合物条带随着氧化克班宁的浓度升高，加合物条带不再出现，说明氧化克班宁浓度越高，与微管蛋白的秋水仙碱位点结合越紧密，越容易加强微管动力。

Stathmin通过结合微管蛋白二聚体来抑制微管蛋白，Stathmin的微管不稳定活性可被细胞表面受体激酶级联和细胞周期蛋白依赖激酶所关闭。细胞刺激可以通过酪氨酸磷酸化激活STAT家族成员，诱导其二聚体化，激活的STAT3从细胞质转位到细胞核，介导许多STAT3应答基因的转录。STAT3在癌细胞中常过表达，并作为促进生长和抗凋亡基因的转录因子，被认为是癌症进展的关键因素[19]。由于氧化克班宁可作用于微管蛋白秋水仙碱位点，又可增强微管动力，因此推测氧化克班宁发挥微管蛋白抑制作用可能是通过促微管解聚因子而完成。

据报道，STAT3可通过与Stathmin末端结合来调节微管功能，且Stathmin过表达对STAT3活性无显著影响，但若STAT3的表达增高可拮抗非磷酸化Stathmin引起的微管解聚活性[20]。氧化克班宁通过阻断STAT3的积累并抑制其活性，从而增加Stathmin的活性，加快微管解聚的进程；通过调节PKA1、PKA和CAMK4蛋白水平，促进Stathmin激活通路，进而破坏微管网络，造成有丝分裂阻滞。STMN1丝氨酸位点可被PKA1、CAMK4和PKA蛋白磷酸化。其中，Stathmin表达水平的变化影响了RhoA/ROCK通路的激活，进而调节了微管的变化。氧化克班宁可通过抑制MCF-7细胞中STAT3、PKA1、CAMK4和PKA蛋白的表达水平，来促进微管动力的关键因子Stathmin，通过调节微管相关蛋白来促进微管解聚，使纺锤体无法形成，最终造成MCF-7细胞有丝分裂灾难。

作者贡献度说明：

肖迪：完成实验；闫彩凤：负责文章撰写；于晶涵：对数据进行统计分析；许声江、王先正、王正文：对手稿进行最终审核。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 贾敏如，张艺.中国民族药辞典[M].北京：中国医药科技出版社，2016：795.

2 连敬杰，刘凡凡，范冬立，等.海南地不容的化学成分[J].沈阳药科大学学报，2019，36(3)：202-206.

3 程莎，莫国平，戴华，等.海南地不容中总生物碱的提取及含量测定[J].热带农业科学，2017，37(6)：79-83.

4 于蕾，姜春艳，宋冬雪，等.海南地不容生物碱抑制肿瘤细胞增殖及构效关系解析[J].辽宁中医杂志，2020，47(2)：145-154.

5 Chen H，Deng S，Albadari N，et al. Design，synthesis，and biological evaluation of stable colchicine-binding site tubulin inhibitors 6-Aryl-2-benzoyl-pyridines as potential anticancer agents [J]. J Med Chem，2021，64(16)：12049-12074.

6 Diab RT，Abdel-Sami ZK，Abdel-Aal EH，et al. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted-1，2,4-oxadiazoles as potential colchicine binding site inhibitors：Antiproliferative activity，molecular docking，and SAR studies [J]. New J Chem，2021，45(46)：21657-21669.

7 Yang H. Tau and stathmin proteins in breast cancer：A potential therapeutic target [J]. Clin Exp Phaparmacol P，2022，49(4)：445-452.

8 Yu L，Han S，Lang L，et al. Oxocrebanine：A novel dual topoisomerase inhibitor，suppressed the proliferation of breast cancer cells MCF-7 by inducing DNA damage and mitotic arrest [J]. Phytomedicine，2021，84：153504.

9 Peng N，Nakamura F. Microtubule-associated proteins and enzymes modifying tubulin [J]. Cytoskeleton (Hoboken)，2023,80(3-4):60-76.

10 Lafanechère L. The microtubule cytoskeleton：An old validated target for novel therapeutic drugs [J]. Front Pharmacol，2022，13：969183.

11 Liu Y，Liu J，Di D，et al. Structural and mechanistic bases of the anticancer activity of natural aporphinoid 12 oxidative medicine and cellular longevity alkaloids [J]. Curr Topics Med Chem，2013，13(17)：2116-2126.

12 Kelly EB，Tuszynski JA，Klobukowski M. QM and QM/MD simulations of the Vinca alkaloids docked to tubulin [J]. J Mol Graph Model，2011，30：54-66.

13 胡金辉，吴成军，陈文华.吲哚类微管蛋白秋水仙碱结合位点抑制剂的研究进展[J].五邑大学学报：自然科学版，2022，36(1)：13.

14 Fu DJ，Liu SM，Yang JJ，et al. Novel piperidine derivatives as colchicine binding site inhibitors induce apoptosis and inhibit epithelial-mesenchymal transition against prostate cancer PC3 cells [J]. J Enzy Inhibit Med Chem，2020，35(1)：1403-1413.

15 Pallante L，Rocca A，Klejborowska G，et al. *In silico* investigations of the mode of action of novel colchicine derivatives targeting β-tubulin isotypes：A search for a selective and specific βⅢ tubulin ligand [J]. Front Chem，2020，8：108.

16 Hu X，Li L，Zhang Q，et al. Design，synthesis and biological evaluation of a novel tubulin inhibitor SKLB0565 targeting the colchicine binding site [J]. Bioorgan Chem，2020，97(6)：103695.

17 Jianhong Y，Wei Y，Yamei Y，et al. The compound millepachine and its derivatives inhibit tubulin polymerization by irreversibly binding to the colchicine-binding site in β-tubulin [J]. J Biol Chem，2018，293(24)：9461-9472.

18 Fu DJ，Liu SM，Li FH，et al. Antiproliferative benzothiazoles incorporating a trimethoxyphenyl scaffold as novel colchicine site tubulin polymerisation inhibitors [J]. J Enzym Inhib Med Ch，2020，35(1)：1050-1059.

19 Tian Y，Liu H，Wang M，et al. Role of STAT3 and NRF2 in tumors：Potential targets for antitumor therapy [J]. Molecules，2022，27(24)：8768.

20 Yang H. Tau and stathmin proteins in breast cancer：A potential therapeutic target [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol，2022，49(4)：445-452.

［**本文编辑**］ 邹 洲 宋睿璞 朱金月