

· 论 著 ·

车叶草苷调节 SHH/GLI1 信号通路对肝细胞癌细胞恶性进展和化疗耐药性*

孙伟涛¹, 陈志飞¹, 石彦科¹, 孙江江¹, 王楠¹, 张萌², 郜惠秋², 王军委^{3△}

1. 邯郸市中心医院普外科, 河北邯郸 056004; 2. 邯郸市第一医院肿瘤内科, 河北邯郸 056000;
3. 邯郸市中心医院肿瘤介入科, 河北邯郸 056004

摘要:目的 探讨车叶草苷(ASP)调节超音速刺猬因子(SHH)/胶质瘤相关癌基因同源物 1(GLI1)信号通路对肝细胞癌(HCC)细胞恶性进展和化疗耐药性的影响。方法 采用蛋白印迹法(WB)检测 HCC 耐药细胞系人类肝癌细胞系(SMMC-7721)/阿霉素(ADM)和 SMMC-7721 细胞株系 SHH、GLI1 蛋白的表达;将 HCC 耐药细胞系 SMMC-7721/ADM 分为 Control 组、ADM 组、L-ASP 组(1 mmol/L ASP)、M-ASP 组(2 mmol/L ASP)、H-ASP 组(3 mmol/L ASP)、ASP+PM 组(1 μ mol/L SHH/GLI1 信号通路激活剂 PM)。除 Control 组外,每组均加入 5 μ g/mL ADM。采用细胞计数试剂盒(CCK8)法和平板克隆实验检测 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞增殖的影响;采用 Transwell 实验检测 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞侵袭和迁移的影响;采用流式细胞仪检测 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡的影响;采用 WB 检测 SMMC-7721/ADM 细胞 SHH、GLI1、增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达量;采用动物实验验证 ASP 对 HCC 移植瘤生长和 SHH/GLI1 信号通路蛋白表达的影响。结果 SHH、GLI1 在 SMMC-7721/ADM 中的表达高于 SMMC-7721($P<0.05$)。L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 中,随着 ASP 水平的升高,SMMC-7721/ADM 细胞的增殖、迁移、侵袭能力降低,SHH、GLI1、PCNA、MMP-9 的表达,并促进细胞凋亡和 Bax 表达($P<0.05$)。SHH/GLI1 信号通路激活剂 PM 可以逆转 H-ASP 处理对 SMMC-7721/ADM 细胞恶性进展和化疗耐药性的抑制作用($P<0.05$)。ASP 可以抑制 HCC 移植瘤的生长及 SHH、GLI1 的表达($P<0.05$)。结论 ASP 可以抑制 HCC 细胞恶性进展和增强化疗敏感性,其机制可能是通过抑制 SHH/GLI1 信号通路实现。

关键词:车叶草苷; 超音速刺猬因子; 胶质瘤相关癌基因同源物 1; 肝细胞癌; 恶性进展; 化疗耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.18.008

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2025)18-2219-07

文献标志码:A

Regulation of SHH/GLI1 signaling pathway by asperuloside on the malignant progression and chemotherapy resistance of hepatocellular carcinoma cells*

SUN Weitao¹, CHEN Zhifei¹, SHI Yanke¹, SUN Jiangjiang¹, WANG Nan¹,
ZHANG Meng², GAO Huiqiu², WANG Junwei^{3△}

1. Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056004, China;
2. Department of Oncology, Handan First Hospital, Handan, Hebei 056000, China; 3. Department of
Tumor Intervention, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of asperuloside (ASP) on the malignant progression and chemotherapy resistance of hepatocellular carcinoma (HCC) cells by regulating the supersonic hedgehog (SHH)/glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) signaling pathway. **Methods** The expression of SHH and GLI1 protein in human hepatocellular carcinoma cell line (SMMC-7721)/adriamycin (ADM) and SMMC-7721 cell line were detected by Western blot (WB). The HCC drug-resistant cell line SMMC-7721/ADM were divided into Control group, ADM group, L-ASP group (1 mmol/L ASP), M-ASP group (2 mmol/L ASP), H-ASP group (3 mmol/L ASP), ASP+PM group (1 μ mol/L SHH/GLI1 signaling pathway activator PM). Except for Control group, 5 μ g/mL ADM was added to each group. The effect of ASP on the proliferation of SMMC-7721/ADM cells was detected by cell counting kit-8 (CCK8) assay and plate cloning assay. The effect

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20241159)。

作者简介:孙伟涛,男,主治医师,主要从事普外科方向的研究。△ 通信作者,E-mail:xjklmywjw@163.com。

of ASP on the invasion and migration of SMMC-7721/ADM cells were detected by Transwell assay. The effect of ASP on the apoptosis of SMMC-7721/ADM cells was detected by flow cytometry. The expression of SHH, GLI1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and B cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) in SMMC-7721/ADM cells were detected by WB. Animal experiments verified the effect of ASP on the growth of HCC xenografts and the expression of SHH/GLI1 signaling pathway proteins.

Results The expression of SHH and GLI1 in SMMC-7721/ADM cells were higher than those in SMMC-7721 cells ($P<0.05$). L-ASP group, M-ASP group and H-ASP group decreased the proliferation, migration and invasion of SMMC-7721/ADM cells in a dose-dependent manner, decreased the expression of SHH, GLI1, PCNA and MMP-9, and promoted cell apoptosis and Bax expression ($P<0.05$). SHH/GLI1 signaling pathway activator PM could reverse the inhibitory effect of H-ASP treatment on malignant progression and chemotherapy resistance of SMMC-7721/ADM cells ($P<0.05$). ASP could inhibit the growth of HCC transplanted tumor and the expression of SHH and GLI1 ($P<0.05$).

Conclusion ASP can inhibit the malignant progression of HCC cells and enhance the sensitivity of chemotherapy, which may be achieved by inhibiting the SHH/GLI1 signaling pathway.

Key words: asperuloside; supersonic hedgehog; glioma-associated oncogene homolog 1; hepatocellular carcinoma; malignant progression; chemotherapy resistance

手术切除是肝细胞癌(HCC)最有效的治疗方法,然而其术后较高的复发率和转移率影响了 HCC 患者的生存率^[1-2]。此外,50%以上新增 HCC 确诊患者为晚期或存在不可切除的病灶,无法通过手术切除治疗,随着医学的进步,分子靶向治疗正在解决这一难题。索拉非尼是美国食品和药物管理局批准的首个肝脏靶向药物,已被广泛应用于临床实践,对 HCC 患者的生存率具有明显改善^[3]。分子靶向药物具有较高的选择性、敏感性和有效性,已成为 HCC 治疗的一线药物。然而,靶向治疗的不良反应、耐药性等问题仍有待解决。因此,探讨 HCC 患者的化疗耐药性分子机制对开发临床治疗 HCC 的新药物具有重要意义。

车叶草苷(ASP)是从茜草科或杜仲科植物中提取的环烯醚萜类化合物,具有抗炎、镇痛、降血压、抗细胞染色体诱变、抗癌等多种药理活性,有研究发现,ASP 可以抑制 HCC 的恶性生物学行为,并抑制化疗耐药性^[4]。超音速刺猬因子(SHH)是表达最广泛的刺猬因子(HH)基因,与其受体 PTCH 结合后,诱导平滑受体(SMO)释放,介导下游转录因子胶质瘤相关癌基因同源物 1(GLI1)的激活,从而调节参与细胞生长、分化、耐药、血管生成的各种靶基因^[5]。有研究发现,缺氧可以激活 SHH 通路并促进 HCC 细胞的上皮间充质转化、侵袭、化疗耐药性^[6]。然而,目前 ASP 能否调节 SHH/GLI1 信号通路对 HCC 细胞恶性进展和化疗耐药性产生影响尚不清楚。本研究旨在为提高 HCC 治疗效果提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 BALB/C 裸鼠[许可证号:SCXK(滇)K2020-0004,昆明医科大学];人类肝癌细胞系(SMMC-7721)、SMMC-7721/阿霉素(ADM)细胞(货号:WM-23JY509、WM-23MX045,南京万木春生物科技有限公司);ADM、ASP HPLC $\geq 98\%$ (货号:

K0083、D0189,上海宝曼生物科技有限公司);2,6,9-三取代嘌呤化合物(PM,货号:XY-166-23991,上海谱析生物科技有限公司);细胞计数试剂盒(CCK8,货号:HB-CCK-8,上海汉恒生物工程有限公司);FITC-Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(货号:22839,西安百萤生物科技有限公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、SHH、GLI1、增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、辣根过氧化物酶(HRP,货号:ab245355、ab53281、ab289368、ab152112、ab38898、ab53154、ab6789,英国 Abcam 公司);酶标仪(型号:SAF-680T,上海巴玖实业有限公司);流式细胞仪(型号:SinoCyte,苏州中生医疗科技有限公司);倒置显微镜(型号:BDS500-FL,南京渝奥光学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 采用蛋白印迹法(WB)检测 HCC 耐药细胞系 SMMC-7721/ADM 和 SMMC-7721 中 SHH、GLI1 蛋白的表达。以 HCC 耐药细胞系 SMMC-7721/ADM 为实验对象,将其分为 Control 组,ADM 组, L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 组(用 DMSO 稀释配制浓度为 1、2、3 mmol/L ASP^[7]), ASP+PM 组(1 μ mol/L SHH/GLI1 信号通路激活剂 PM)。除 Control 组外,每组均加入 5 μ g/mL ADM^[8]。每组实验重复 3 次,每次 2 个平行。

1.2.2 CCK-8 和平板克隆实验检测 SMMC-7721/ADM 细胞增殖能力 CCK-8 法:将 SMMC-7721/ADM 细胞以 3×10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,孵育 24 h,加入 CCK-8 溶液,在 450 nm 处测定吸光度(A)值。平板克隆实验:将 SMMC-7721/ADM 细胞以 0.5×10^3 个细胞/孔接种到 6 孔板的孔中,培养 2 周,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,室温下甲醇固定 25 min,用结晶紫染色,于显微镜下观察并拍照。

1.2.3 Transwells 实验检测 SMMC-7721/ADM 细胞侵袭和迁移能力 将 SMMC-7721/ADM 细胞重悬于无血清培养基,调整浓度为 1×10^5 个细胞/200 微升,接种于 Transwell 上室(侵袭实验预涂 Matrigel 基质胶),在下室加入 500 μ L 含 12% 胎牛血清(FBS)的培养基,孵育 24 h 后,去除膜室的细胞,用甲醇固定室下室 20 min,苏木精-伊红染色,于显微镜下观察并统计。

1.2.4 流式细胞仪检测 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡能力 收集 SMMC-7721/ADM 细胞,用结合缓冲液重悬细胞,调整密度为 1×10^6 个细胞/毫升,加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI 孵育 15 min,立即用流式细胞仪分析染色细胞。

1.2.5 WB 检测 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9、Bax 蛋白表达水平 收集 RIP A 溶液裂解的集 SMMC-7721/ADM 细胞,用 7.5% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,并将其转移到 PVDF 膜上,在室温下将膜封闭于 5% BSA-TBST 溶液中,加入 GAPDH(1 : 2 000)、SHH(1 : 1 000)、GLI1(1 : 1 000)、PCNA(1 : 500)、MMP-9(1 : 1 000)、Bax(1 : 500)一抗抗体,4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,加入二抗(1 : 2 000)孵育 2 h,用 ECL 系统扫描蛋白质条带,利用 Image J 软件进行分析。

1.2.6 动物实验 采用 5 周龄 BALB/c 裸鼠皮下注射 SMMC-7721/ADM 细胞(3×10^5 个细胞/100 微升 PBS),当肿瘤达到约 100 mm³ 时,将小鼠随机分为 2 组,每组 6 只。ASP 组注射 50 mg/kg ASP^[9],对照组注射等量生理盐水,22 d 处死小鼠,记录 HCC 肿瘤重量和体积。本实验通过本院动物伦理委员会批准,编号:伦审科 2024 第(016)号。

1.2.7 免疫组织化学法检测裸鼠瘤组织 SHH、GLI1 表达 4%多聚甲醛固定 HCC 裸鼠肿瘤组织 24 h,石蜡包埋,切成 5 μ m 厚的切片,加入 SHH(1 : 2 000)、GLI1(1 : 50)一抗孵育过夜,加入二抗(1 : 500),染色,在显微镜下拍摄,统计 SHH、GLI1 阳性表达率=(阳性细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SMMC-7721、SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1 表达比较 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1 水平高于 SMMC-7721 细胞(*P* < 0.05)。见图 1、表 1。

2.2 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞增殖能力的影响 与 Control 组、ADM 组比较,L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 组 A₄₅₀、克隆细胞数下降(*P* < 0.05);

ASP+PM 组 A₄₅₀、克隆细胞数高于 H-ASP 组(*P* < 0.05)。见表 2、图 2。

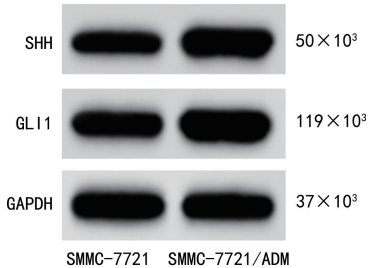


图 1 WB 检测 SMMC-7721、SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1 的表达

表 1 SHH、GLI1 在 SMMC-7721、SMMC-7721/ADM 细胞中表达比较($\bar{x}\pm s$)			
类型	<i>n</i>	SHH	GLI1
SMMC-7721	6	0.85 $\pm$ 0.22	0.93 $\pm$ 0.28
SMMC-7721/ADM	6	1.37 $\pm$ 0.25 ^a	1.41 $\pm$ 0.32 ^a

注:与 SMMC-7721 组比较,^a*P* < 0.05。

2.3 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞迁移和侵袭能力的影响 与 Control 组、ADM 组比较,L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 组迁移细胞数、侵袭细胞数减少(*P* < 0.05),ASP+PM 组迁移细胞数、侵袭细胞数高于 H-ASP 组(*P* < 0.05)。见表 3、图 3。

表 2 各组 SMMC-7721/ADM 细胞克隆细胞数比较($\bar{x}\pm s$)			
分组	<i>n</i>	A ₄₅₀	克隆细胞数(个)
Control 组	6	1.36 $\pm$ 0.17	127.74 $\pm$ 13.28
ADM 组	6	1.29 $\pm$ 0.16	125.31 $\pm$ 13.07
L-ASP 组	6	0.95 $\pm$ 0.14 ^{ab}	91.86 $\pm$ 11.71 ^{ab}
M-ASP 组	6	0.63 $\pm$ 0.13 ^{abc}	69.22 $\pm$ 10.39 ^{abc}
H-ASP 组	6	0.38 $\pm$ 0.12 ^{abcd}	41.25 $\pm$ 9.46 ^{abcd}
ASP+PM 组	6	1.17 $\pm$ 0.15 ^e	110.53 $\pm$ 12.34 ^e
<i>F</i>		43.541	50.006
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P* < 0.05;与 ADM 组比较,^b*P* < 0.05;与 L-ASP 组比较,^c*P* < 0.05;与 M-ASP 组比较,^d*P* < 0.05;与 H-ASP 组比较,^e*P* < 0.05。

2.4 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡的影响 与 Control 组、ADM 组比较,L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 组细胞凋亡率上升(*P* < 0.05),ASP+PM 组细胞凋亡率低于 H-ASP 组(*P* < 0.05)。见表 4、图 4。

表 3 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s$,个)			
组别	<i>n</i>	迁移细胞数	侵袭细胞数
Control 组	6	136.74 $\pm$ 13.85	119.58 $\pm$ 12.04
ADM 组	6	127.58 $\pm$ 13.59	113.72 $\pm$ 11.85
L-ASP 组	6	99.74 $\pm$ 11.47 ^{ab}	88.64 $\pm$ 10.96 ^{ab}

续表 3 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s$,个)

组别	<i>n</i>	迁移细胞数	侵袭细胞数
M-ASP 组	6	76.51±10.28 ^{abc}	65.41±9.71 ^{abc}
H-ASP 组	6	55.83±9.76 ^{abcd}	44.27±8.32 ^{abcd}
ASP+PM 组	6	114.27±12.34 ^e	98.25±11.27 ^e
<i>F</i>		40.109	43.305
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 ADM 组比较,^b*P*<0.05;与 L-ASP 组比较,^c*P*<0.05;与 M-ASP 组比较,^d*P*<0.05;与 H-ASP 组比较,^e*P*<0.05。

2.5 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9、Bax 蛋白表达的影响 与 Control 组、ADM 组比较,L-ASP 组、M-ASP 组、H-ASP 组 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9 表达水平降低,Bax 表达水平升高(*P*<0.05);ASP+PM 组 SHH、

GLI1、PCNA、MMP-9 表达水平高于 H-ASP 组,Bax 表达水平低于 H-ASP 组(*P*<0.05)。见图 5、表 5。

表 4 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	凋亡率
Control 组	6	2.03±0.62
ADM 组	6	3.14±0.71
L-ASP 组	6	10.25±2.34 ^{ab}
M-ASP 组	6	20.34±3.47 ^{abc}
H-ASP 组	6	46.58±4.58 ^{abcd}
ASP+PM 组	6	8.71±1.03 ^e
<i>F</i>		248.645
<i>P</i>		<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 ADM 组比较,^b*P*<0.05;与 L-ASP 组比较,^c*P*<0.05;与 M-ASP 组比较,^d*P*<0.05;与 H-ASP 组比较,^e*P*<0.05。

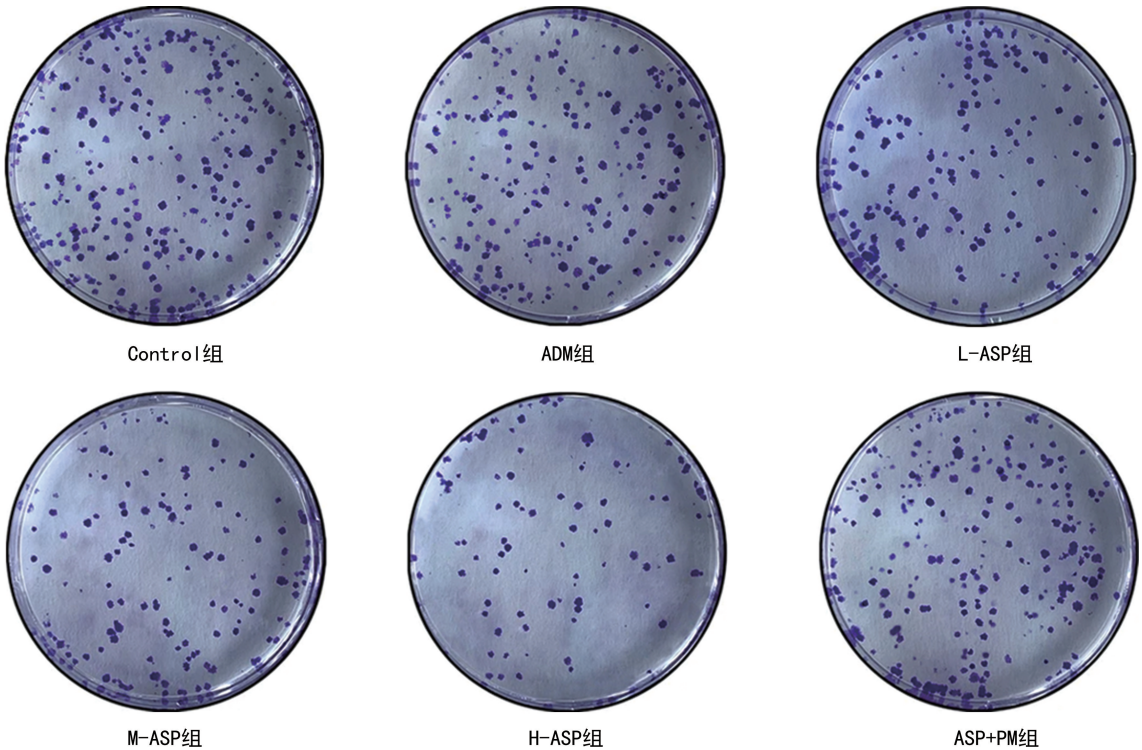


图 2 平板克隆实验检测 SMMC-7721/ADM 细胞增殖

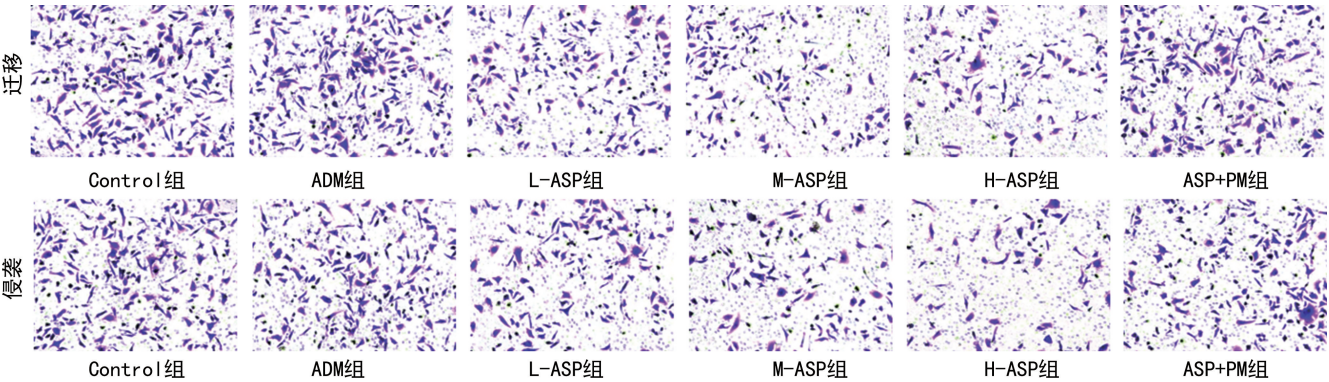


图 3 Transwell 实验检测 SMMC-7721/ADM 细胞的侵袭和迁移能力($\times 200$)

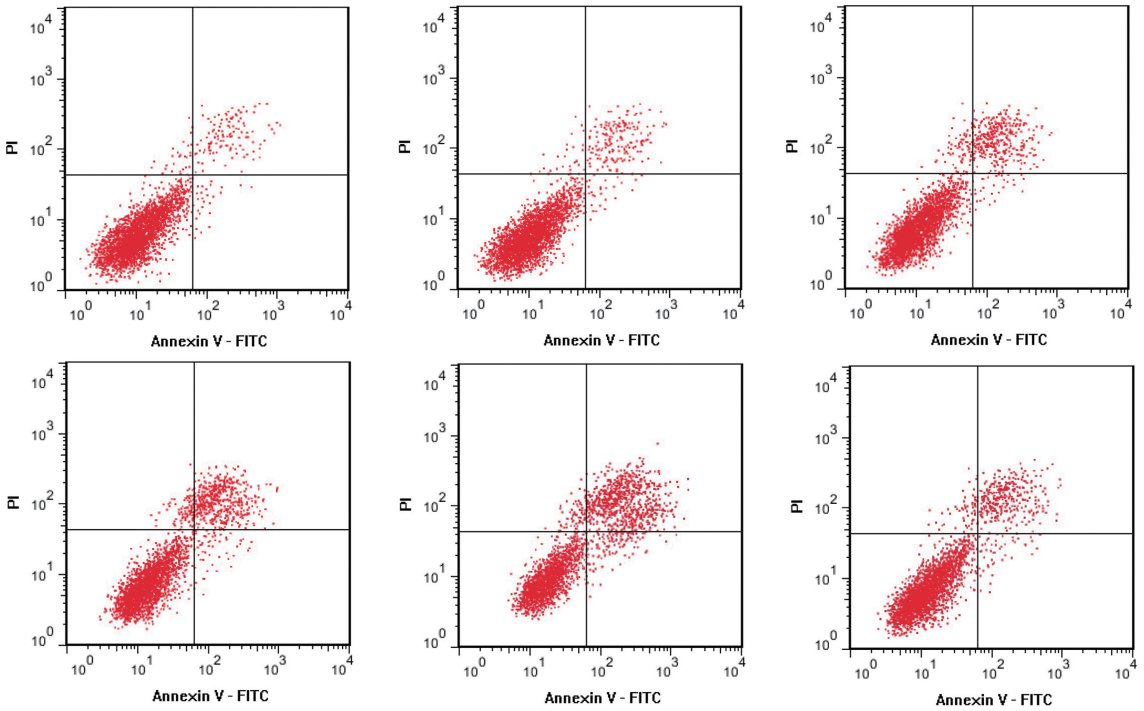


图 4 流式细胞仪检测 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡 (×200)

2.6 ASP 对裸鼠移植瘤生长和 SHH、GLI1 的影响 ASP 组移植瘤体积、重量、SHH 阳性率、GLI1 阳性率表达低于对照组($P<0.05$)。见图 6、表 6。

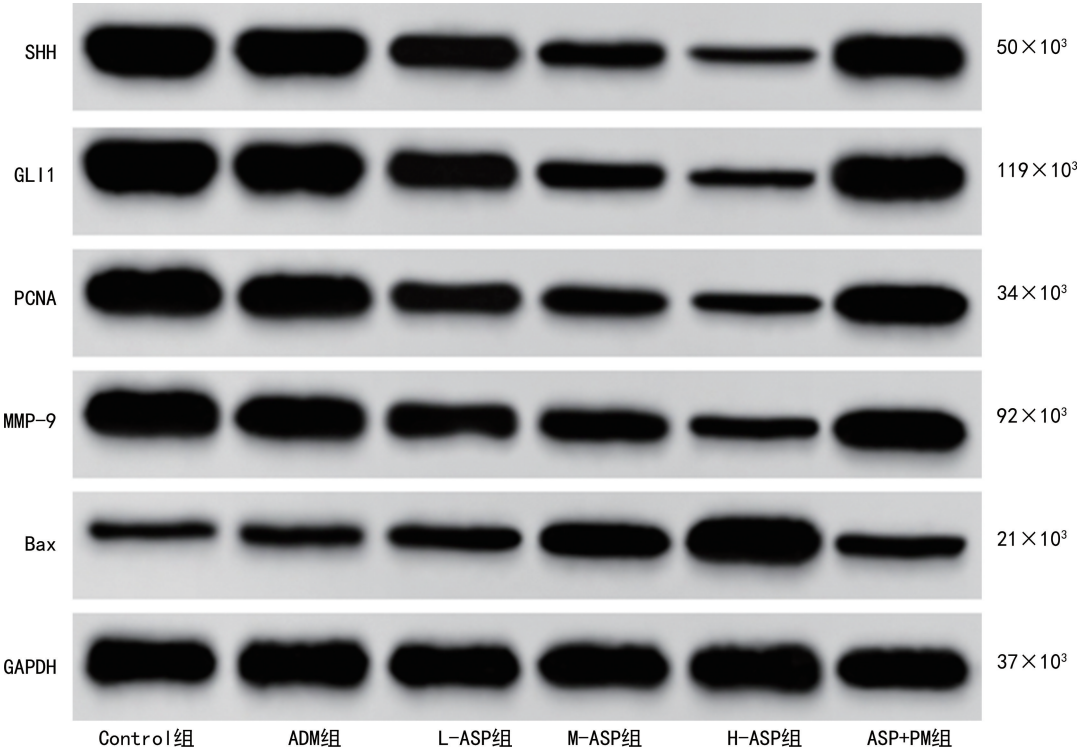


图 5 WB 检测 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9、Bax 蛋白表达

表 5 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SHH	GLI1	PCNA	MMP-9	Bax
Control 组	6	1.37±0.14	1.41±0.15	1.28±0.13	1.27±0.16	0.27±0.08
ADM 组	6	1.29±0.13	1.35±0.14	1.19±0.12	1.24±0.16	0.31±0.09
L-ASP 组	6	0.78±0.10 ^{ab}	0.92±0.12 ^{ab}	0.83±0.09 ^{ab}	0.99±0.14 ^{ab}	0.54±0.11 ^{ab}

续表 5 ASP 对 SMMC-7721/ADM 细胞中 SHH、GLI1、PCNA、MMP-9、Bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SHH	GLI1	PCNA	MMP-9	Bax
M-ASP 组	6	0.51±0.09 ^{abc}	0.69±0.11 ^{abc}	0.65±0.08 ^{abc}	0.72±0.13 ^{abc}	0.83±0.12 ^{abc}
H-ASP 组	6	0.29±0.08 ^{abcd}	0.33±0.10 ^{abcd}	0.30±0.07 ^{abcd}	0.43±0.12 ^{abcd}	1.26±0.13 ^{abcd}
ASP+PM 组	6	1.04±0.10 ^e	1.17±0.13 ^e	0.97±0.11 ^e	1.08±0.15 ^e	0.47±0.10 ^e
<i>F</i>		93.291	65.447	75.141	30.519	74.326
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 ADM 组比较,^b*P*<0.05;与 L-ASP 组比较,^c*P*<0.05;与 M-ASP 组比较,^d*P*<0.05;与 H-ASP 组比较,^e*P*<0.05。

表 6 裸鼠移植瘤生长和 SHH、GLI1 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	重量(g)	体积(mm ³)	SHH 阳性率(%)	GLI1 阳性率(%)
对照组	6	2.08±0.27	1936.71±200.34	84.51±8.69	79.76±8.03
ASP 组	6	0.79±0.24 ^a	826.36±165.72 ^a	33.28±7.09 ^a	22.83±6.32 ^a
<i>t</i>		8.747	10.461	11.189	13.646
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a*P*<0.05。

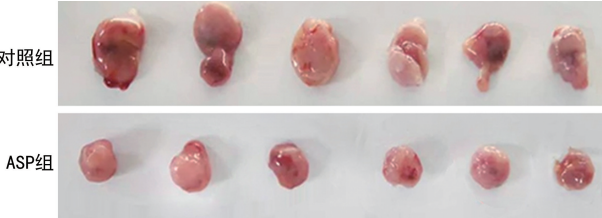


图 6 裸鼠剥离的移植瘤(*n*=6)

3 讨 论

尽管 HCC 的预防、监测、诊断、治疗和多学科合作方面均取得了较大进展,但该病仍然具有高致死率和高复发率,这主要是由于肿瘤进展、复发、转移、化疗耐药^[10]。分子靶向治疗可以通过细胞信号通路、原癌基因、抑癌基因和细胞因子等抑制癌细胞的恶性进展,然而,肝脏高度暴露于抗原和内毒素,体内平衡的机制导致肝脏对特定抗原的免疫耐受被阻止^[3]。HCC 的发生通常是由慢性炎症、纤维化和肝硬化引起,这些病理状况会导致效应免疫细胞的活化受到抑制,肿瘤细胞不能为 T 细胞所识别,导致肿瘤细胞的免疫逃逸,HCC 表现出免疫抑制肿瘤微环境,对免疫治疗有抵抗力^[11]。因此,探讨 HCC 化疗耐药性的分子机制对开发新药物和提高 HCC 患者预后至关重要。

天然化合物及其衍生物因其疗效好、不良反应少而受到广泛的关注,ASP 是从各种传统中药植物中提取得到,具有较高的抗癌潜力,在乳腺癌、白血病、口腔癌细胞等癌症治疗中发挥重要作用^[12]。ZHAO 等^[13]发现,ASP 通过调节原癌基因蛋白/丝裂原细胞外激酶/细胞外信号调节激酶(RAS/MEK/ERK)通路抑制 K562 细胞增殖,促进细胞凋亡和分化,具有良好的抗慢性粒细胞白血病的作用。LU 等^[14]发现,ASP 依赖于激活维生素 D 信号而独立于抑制核因子-

κB(NF-κB)信号而下调 Smad3 信使核糖核酸(mRNA),减少结肠癌细胞中上皮表型向运动间充质表型的转化,同时降低上皮间质转化标志物的水平,抑制转化生长因子(TGF)β1 诱导的结肠癌症细胞和结肠癌小鼠模型的恶性进展。QI 等^[15]发现,ASP 以浓度依赖的方式抑制宫颈癌细胞的增殖并促进细胞凋亡,提高细胞内活性氧(ROS)水平,降低线粒体膜电位,通过内质网应激-线粒体途径抑制宫颈癌进展。曹龄之等^[7]发现,ASP 通过调控葡萄糖调节蛋白 78/蛋白激酶 R 样内质网激酶/CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(GRP78/PERK/CHOP)信号通路,抑制胰腺癌细胞的增殖,促进细胞凋亡,进而抑制胰腺癌的进展。本研究发现,ASP 以浓度依赖的方式抑制耐药性 HCC 细胞的生物学进展,提示 ASP 可以抑制 HCC 细胞的恶性生物学进展和化疗耐药性,可能作为治疗 HCC 的潜在药物。

SHH 信号的异常激活已在 HCC 中得到证实,SHH 可以通过激活 GLI1 促进上皮间质转化过程,增加 HCC 细胞的恶性程度^[6,16]。HU 等^[17]发现,Dbx2 表达在 HCC 组织中上调,并通过激活 SHH/GLI1 信号通路促进 HCC 细胞从 G1 期向 S 期过渡,减缓细胞凋亡,在体外和体内均能促进 HCC 的增殖、迁移和侵袭,从而促进 HCC 的进程。ZHAO 等^[18]发现,血清信号肽-CUB-表皮生长因子结构域包含蛋白 1(SCUBE1)在 HCC 的癌症相关成纤维细胞中高表达,SHH/GLI1 信号通路可以被 SCUBE1 激活,增强 HCC 细胞的恶性和干性程度,促进 HCC 的进展。王健等^[19]发现,SHH/GLI1 信号通路蛋白在肝癌中高表达,益母草碱可以抑制肝癌细胞的恶性增殖和血管生成,其机制可能是通过介导 SHH/GLI1 信号通路实现。ZHUANG 等^[20]发现,GS 同源盒 2 通过调节

SHH/GLI1 信号通路进而调控胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药性。本研究发现, SHH、GLI1 蛋白在 SMMC-7721/ADM 细胞中的表达高于 SMMC-7721 细胞,使用 ASP 处理可以抑制 SHH、GLI1 蛋白的表达,而 SHH/GLI1 信号通路激活剂则可以逆转 ASP 的抑制作用,提示 ASP 可能通过抑制 SHH/GLI1 信号通路抑制 HCC 细胞恶性进展和化疗耐药性。进一步动物实验表明,ASP 可以抑制 HCC 肿瘤的生长,降低肿瘤组织中 SHH、GLI1 的表达,提示 ASP 在体内外均可以抑制 HCC 细胞恶性进展和化疗耐药性,其机制可能是通过抑制 SHH/GLI1 信号通路实现。

综上所述,ASP 可以抑制 HCC 细胞恶性进展和增强化疗敏感性,其机制可能是通过抑制 SHH/GLI1 信号通路实现。然而,本研究局限于 SHH/GLI1 信号通路,ASP 抑制 HCC 细胞恶性进展和增强化疗敏感性的其他靶点及通路研究仍有待进一步阐明,暂未考虑 ASP 和其他药物之间的比较,后续会关注更多信号通路及其他相关药物,并重新设计实验,深入研究。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 288-303.
- [2] SUN Y, WU L, ZHONG Y, et al. Single-cell landscape of the ecosystem in early-relapse hepatocellular carcinoma [J]. Cell, 2021, 184(2): 404-421.
- [3] 程颖, 王轩, 华海清, 等. 索拉非尼治疗肝细胞癌肝移植术后复发的疗效[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(6): 550-553.
- [4] LI L, QIU H. Asperulosidic acid restrains hepatocellular carcinoma development and enhances chemosensitivity through inactivating the MEKK1/NF- κ B pathway [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2024, 196(1): 1-17.
- [5] LEI X, ZHONG Y, HUANG L, et al. Identification of a novel tumor angiogenesis inhibitor targeting Shh/Gli1 signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 232-244.
- [6] ZHANG C Y, JIANG Z M, MA X F, et al. Saikosaponin-d inhibits the hepatoma cells and enhances chemosensitivity through SENP5-dependent inhibition of Gli1 SUMOylation under hypoxia [J]. Front Pharmacol, 2019, 10(9): 1039.
- [7] 曹龄之, 付国旭, 杨凡慧, 等. 基于 GRP78/PERK/CHOP 通路探讨车叶草苷对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2022, 27(10): 1282-1287.
- [8] 李彩琳, 吕鸿, 张鸿翰, 等. 美洲大蠊多肽逆转人肝癌 HepG2/ADM 细胞多药耐药性的作用及机制研究[J]. 中

草药, 2021, 52(1): 152-159.

- [9] 初巍巍, 袁菲阳, 丁国臣, 等. 车叶草苷对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤、抗炎作用及其机制[J]. 武警医学, 2020, 31(5): 401-404.
- [10] 张子涵, 黄金刚, 邱世香, 等. 血清 HIF-1 α 、HSP27、HSP70、HSP90 α 与肝细胞癌患者经肝动脉化疗栓塞术治疗疗效的关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(4): 695-700.
- [11] HAN S, BAO X, ZOU Y, et al. D-lactate modulates M2 tumor-associated macrophages and remodels immunosuppressive tumor microenvironment for hepatocellular carcinoma [J]. Sci Adv, 2023, 9(29): 2697.
- [12] MANZIONE M G, MARTORELL M, SHAROPOV F, et al. Phytochemical and pharmacological properties of asperuloside: a systematic review [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 54(18): 173344.
- [13] ZHAO B, CHE H, LI L, et al. Asperuloside regulates the proliferation, apoptosis, and differentiation of chronic myeloid leukemia cell line K562 through the RAS/MEK/ERK pathway [J]. Heliyon, 2023, 10(1): e23580.
- [14] LU Y, GUAN T, XU S, et al. Asperuloside inhibited epithelial-mesenchymal transition in colitis associated cancer via activation of vitamin D receptor [J]. Phytomedicine, 2022, 29(6): 154070.
- [15] QI Z M, WANG X, LIU X, et al. Asperuloside promotes apoptosis of cervical cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mitochondrial pathway [J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(1): 34-41.
- [16] 路景涛, 何伟, 宋莎莎, 等. Hedgehog/Gli 信号通路在肝细胞癌侵袭转移的作用[C]. //中国药理学会抗炎免疫药理专业委员会成立 30 周年纪念大会暨 2012 年学术年会论文集, 2012: 47.
- [17] HU Y T, LI B F, ZHANG P J, et al. Dbx2 exhibits a tumor-promoting function in hepatocellular carcinoma cell lines via regulating Shh-Gli1 signaling [J]. World J ASPstroenterol, 2019, 25(8): 923-940.
- [18] ZHAO J, LI R, LI J, et al. CAFs-derived SCUBE1 promotes malignancy and stemness through the Shh/Gli1 pathway in hepatocellular carcinoma [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 520.
- [19] 王健, 吕雪梅, 亓立廷. 益母草碱调节 Shh/Gli1 信号通路对肝癌 SMC-7721 细胞增殖、凋亡和血管生成的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 5(10): 1493-1500.
- [20] ZHUANG L, YAO Y, PENG L, et al. Silencing GS homeobox 2 alleviates gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by activating SHH/GLI1 signaling pathway [J]. Dig Dis Sci, 2022, 67(8): 3773-3782.

(收稿日期: 2024-11-05 修回日期: 2025-03-15)