

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.007

· 基础研究 ·

## 扁蒴藤素调节 Shh/Gli1 信号通路对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡和血管生成拟态的影响

罗健玮<sup>1a</sup>, 黄泓轲<sup>1b</sup>, 胡艳丽<sup>2</sup> (1. 乐山职业技术学院 a. 中医康养学院; b. 生物医药学院, 四川 乐山 614000; 2. 重庆大学附属黔江医院 妇科, 重庆 400030)

**[摘要]** **目的:** 探讨扁蒴藤素(Pris)调节 Shh/Gli1 信号通路对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡和血管生成拟态 (VM) 的影响及其机制。**方法:** 采用 MTT 法检测不同浓度 Pris 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用, 以选取合适的干预浓度。将 HeLa 细胞分为对照组、环巴胺组、Pris 组、Pris+pc-NC 组和 Pris+pc-Shh 组。采用 MTT 法、EdU 法检测各组细胞的增殖能力, Transwell 小室法、流式细胞术检测各组细胞的迁移及侵袭能力和细胞凋亡率, 体外血管生成实验观察 VM 形成情况, qPCR 法检测各组细胞中 Shh 和 Gli1 mRNA 表达水平, WB 法检测细胞中血管内皮生长因子 A (VEGF-A)、血管内皮钙黏素 (VE-cadherin)、Ki-67、caspase-3 及与 Shh/Gli1 信号通路相关蛋白表达水平。**结果:** 0.25~2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Pris 对 HeLa 细胞增殖均有显著抑制作用, 选择 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Pris 进行后续实验。对照组细胞形成良好的管腔结构, 与对照组相比, 环巴胺组、Pris 组和 Pris+pc-NC 组 HeLa 细胞管腔结构被明显破坏, 细胞增殖活力和增殖率、迁移及侵袭细胞数目、Shh 和 Gli1 mRNA、VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 caspase-3 表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ ); 环巴胺组与 Pris 组 HeLa 细胞各项检测指标比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ); 与 Pris+pc-NC 组相比, Pris+pc-Shh 组细胞管腔结构形成明显改善, 细胞增殖活力和增殖率、迁移及侵袭细胞数、Shh 和 Gli1 mRNA、VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 caspase-3 表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ )。**结论:** Pris 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、迁移与侵袭和 VM 的形成并促进细胞凋亡, 可能与阻断 Shh/Gli1 信号通路有关。

**[关键词]** 扁蒴藤素; 宫颈癌; HeLa 细胞; Shh/Gli1 信号通路; 血管生成拟态

**[中图分类号]** R737.33; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)07-0687-07

## Effects of pristimerin on the proliferation, apoptosis and vasculogenic mimicry of cervical cancer HeLa cells by regulating the Shh/Gli1 signaling pathway

LUO Jianwei<sup>1a</sup>, HUANG Hongke<sup>1b</sup>, HU Yanli<sup>2</sup> (1. a. College of Traditional Chinese Medicine Health and Wellness; b. School of Biomedical Sciences, Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000, Sichuan, China; 2. Department of Gynecology, Affiliated Qianjiang Hospital of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of pristimerin (Pris) on the proliferation, apoptosis and vasculogenic mimicry (VM) of cervical cancer HeLa cells by regulating the Shh/Gli1 signaling pathway. **Methods:** MTT method was used to detect the inhibitory effects of Pris in different concentrations on the proliferation of cervical-cancer HeLa cells to select appropriate intervention concentration. Cervical cancer HeLa cells were grouped into the control group, the cyclopamine group, the Pris group, the Pris+pc-NC group and the Pris+pc-Shh group. MTT and EdU were applied to detect the proliferation abilities of cells in each group. Transwell chamber method and flow cytometry were used to detect cell migration and invasion abilities and cell apoptosis rate. *In vitro* angiogenesis experiments were used to observe the formation of VM. qPCR was used to detect Shh and Gli1 mRNA expression levels in each group. Western blotting was used to detect the expression levels of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), Ki-67, caspase-3, and proteins related to the Shh/Gli1 signaling pathway. **Results:** 0.25-2.5 mol/L Pris significantly inhibited the proliferation of HeLa cells, and 1.5 mol/L was selected for subsequent experiments. The cells in the control group formed a good lumen structure. Compared with the control group, the lumen structures of HeLa cells in the cyclopamine group, the Pris group and the Pris+pc-NC group were significantly damaged. Cell proliferation activity, proliferation rate, numbers of

**[基金项目]** 乐山市科技计划项目 (No. 20SZD004)

**[作者简介]** 罗健玮 (1986—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事妇科肿瘤的临床治疗研究。E-mail: jjzozij6@163.com

**[通信作者]** 罗健玮, E-mail: jjzozij6@163.com

migration and invasion, expression levels of Shh and Gli1 mRNA, and expression levels of VEGF-A, VE-cadherin, Ki-67, Shh and Gli1 proteins were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate and the expression level of caspase-3 were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in HeLa cell detection indicators between the cyclopamine group and the Pris group (all  $P > 0.05$ ). Compared with the Pris+pc-NC group, the formation of cell lumen structure in the Pris+pc-Shh group was significantly improved. The cell proliferation activity and proliferation rate, the numbers of migration and invasion cells, the expressions of Shh and Gli1 mRNA, and the expressions of VEGF-A, VE-cadherin, Ki-67, Shh and Gli1 proteins were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate and the expression level of caspase-3 were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Pris can inhibit the proliferation, migration, invasion and VM formation of cervical cancer HeLa cells, and promote cell apoptosis, which may be related to blocking the Shh/Gli1 signaling pathway.

**[Key words]** pristimerin (Pris); cervical cancer; HeLa cell; Shh/Gli1 signaling pathway; vasculogenic mimicry (VM)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(7): 687-693. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.007]

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞的过度增殖和转移需要大量氧气和营养物质<sup>[2]</sup>。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是一种不同于正常血管生成的肿瘤血管生成模式,无血管内皮细胞,但可以为肿瘤细胞提供氧气和营养物质<sup>[3]</sup>。因此,阻断VM的形成就可以抑制肿瘤的发生和发展,对提高肿瘤的治疗效果具有重要意义。扁蒴藤素(pristimerin, Pris)是一种天然醌类三萜,参与调控肿瘤细胞的增殖、迁移、凋亡及血管生成等<sup>[4]</sup>。研究表明,Pris可以抑制肝癌Huh7细胞增殖、迁移和侵袭并促进凋亡<sup>[5]</sup>;Pris可以抑制膀胱癌HT-1376细胞增殖并促进其凋亡<sup>[6]</sup>。Shh/Gli1信号通路参与肿瘤的血管生成,Shh与其细胞膜表面受体Patched结合后导致Patched与另一细胞膜表面受体SMO(Smoothened)发生解离,解离后的SMO进一步激活了Gli,完成了Shh信号通路的激活和信号转导;在肿瘤血管生成中,Shh/Gli1信号通路被激活,进而促进内皮细胞增殖、迁移和侵袭;阻断Shh信号通路可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭细胞并促进其凋亡<sup>[7-8]</sup>。本研究探究Pris调节Shh/Gli1信号通路对宫颈癌细胞增殖、凋亡和VM的影响及其机制,以期为宫颈癌的临床用药提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

宫颈癌HeLa细胞购自浙江美森细胞科技有限公司,在DMEM培养基中、37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养,待细胞到对数生长期时收集细胞并传代,进行后续实验。

Pris(纯度≥98.0%)购自北京德航五洲科技有限公司,Shh信号通路抑制剂环巴胺购自上海信裕生物科技有限公司,DMEM培养基购自南京北鱼生物科技有限公司,胎牛血清购自上海必宝生物科技有限公司,TRIzol试剂购自上海圻明生物科技有限公司,反转录试剂盒购自北京缔一生物科技有限公司,总RNA提取试剂盒购自上海博湖生物科技有限公司,胰蛋白酶购自杭州

沃森生物技术有限公司,Transwell小室购自上海代轩生物科技有限公司,MTT试剂盒购自无锡怀信生物医药科技有限公司,血管内皮生长因子A(VEGF-A)、血管内皮钙黏素(VE-cadherin)、Ki-67、caspase-3、Shh、Gli1一抗及HRP标记的山羊抗兔IgG二抗均购自英国Abcam公司。

### 1.2 MTT法检测Pris对HeLa细胞增殖的影响

取对数生长期HeLa细胞,重悬后将细胞接种于96孔板(1×10<sup>3</sup>个/孔)中,待细胞完全贴壁后,弃掉培养基,加入100 μL含不同浓度(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μmol/L)Pris的培养基<sup>[9]</sup>,另设对照组(未处理细胞)。培养48 h后,弃去培养基,每孔加入含MTT溶液(5 mg/mL)的无血清培养基,反应4 h。加入DMSO培养基,震荡溶解后,用酶标仪测定490 nm波长处各孔细胞的光密度(D)值。按照公式“细胞增殖抑制率=[(对照组D值-空白组D值)-(实验组D值-空白组D值)]/(对照组D值-空白组D值)×100%”计算细胞增殖抑制率。

### 1.3 细胞分组与转染

取对数生长期的HeLa细胞,将其分为对照组(未处理细胞)、环巴胺组(10 μmol/L)<sup>[10]</sup>、Pris组(1.5 μmol/L)、Pris(1.5 μmol/L)+pc-NC(转染pcRNA-NC)组、Pris(1.5 μmol/L)+pc-Shh(转染pcRNA-Shh)组,DMEM培养基重悬细胞,培养48 h后进行后续实验。

### 1.4 MTT、EdU法检测Pris对HeLa细胞增殖的影响

MTT细胞增殖检测:于96孔板中培养上述各组HeLa细胞(1×10<sup>3</sup>个/孔),在24、48 h时分别向每孔中加入10 μL MTT溶液,反应4 h后再加入150 μL DMSO培养基,震荡溶解,用酶标仪检测490 nm处各孔细胞的D值。

EdU法检测:于24孔板中培养上述各组HeLa细胞(1×10<sup>4</sup>个/孔)36 h,后向每孔中加入EdU试剂作用2 h,按照试剂盒说明书进行EdU及DAPI染色,后用荧光显微镜采集各组细胞的图像,采用Image J软件分析定量各组EdU阳性细胞数及总细胞数,依据公

式“细胞增殖率=EdU 阳性细胞数/总细胞数×100%”计算细胞增殖率。

### 1.5 Transwell 小室法检测 Prls 对 HeLa 细胞迁移和侵袭的影响

细胞迁移实验:于 Transwell 小室的上室中加入 200  $\mu\text{L}$  HeLa 细胞悬液( $5\times 10^5$  个/mL),在下室中加入 600  $\mu\text{L}$  含血清的 DMEM 培养基,培养 24 h 后,取出小室,以 PBS 清洗,在 4% 多聚甲醛溶液中固定 10 min,0.1% 结晶紫染液中染色 10 min,光学显微镜下选取 5 个视野观察并计数迁移细胞数。

细胞侵袭实验:除在加入细胞前需用基质胶预铺 Transwell 上室外,其余实验步骤同细胞迁移实验。

### 1.6 流式细胞术检测 Prls 对 HeLa 细胞凋亡的影响

收集各组 HeLa 细胞,用 PBS 清洗、离心后收集细胞,将细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  的 1 $\times$  结合缓冲液中,根据凋亡试剂盒说明书步骤,加入 Annexin V-FITC 溶液与 PI 试剂,室温下避光反应 15 min,后上流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

### 1.7 血管生成实验检测 Prls 对 HeLa 细胞 VM 形成的影响

取高浓度无酚红基质胶,于实验前解冻。用 DMEM 培养基稀释基质胶,将稀释好的基质胶以每孔 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中,4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下反应 1 h,待基质胶凝固后,取各组培养 48 h 的细胞,用胰酶消化处理,调整细胞密度为  $5\times 10^5$  个/mL,将 50  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入 96 孔板基质胶表面,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  环境中培养 24 h 后观察细胞 VM 形成情况,在倒置显微镜下任选 5 个视野进行观察与拍照,计数各组管腔结构数量<sup>[2]</sup>。

### 1.8 qPCR 法检测 Prls 对 HeLa 细胞 Shh 和 Gli1 mRNA 表达的影响

用 TRIzol 试剂提取各组 HeLa 细胞总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA,用 qPCR 法扩增 cDNA。PCR 引物序列:Shh 上游引物为 5'-GGAGTGAAA CTGCGGGTGA-3',下游引物为 5'-GCGGTACAG GAAAGTGAGG-3';Gli1 上游引物为 5'-TTCCTA CCAGAGTCCCAAGT-3',下游引物为 5'-CCCTAT GTGAAGCCCTATTT-3';GAPDH 上游引物为 5'-GC ACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物为 5'-TG GTGAAGACGCCAGTGA-3'。PCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,55  $^{\circ}\text{C}$  10 s,72  $^{\circ}\text{C}$  15 s,共计 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析目的基因 mRNA 的相对表达水平。

### 1.9 WB 法检测 Prls 对 HeLa 细胞 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、caspase-3 和 Shh 蛋白表达的影响

用蛋白裂解液裂解各组细胞并提取细胞总蛋白

质(采用细胞核提取试剂盒提取各组 HeLa 细胞核总蛋白用于检测细胞核中 Gli1 蛋白表达),定量蛋白浓度,进行 10%SDS-PAGE 分离蛋白质并转膜,在 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h 后,加入稀释比例均为 1:1 500 的 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、caspase-3、Shh、Gli1 一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜。洗膜后,加入稀释比例为 1:5 000 的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗中反应 2 h,采用 ECL 发光液显影,用 Image-Pro Plus 图像分析软件对蛋白质条带的灰度值进行定量分析。

### 1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 26.0 软件分析实验数据。呈正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Prls 显著降低 HeLa 细胞的增殖活力

MTT 法检测结果(图 1A)显示,与对照组相比,0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Prls 对 HeLa 细胞增殖活力均有显著的抑制作用(均  $P<0.05$ ),呈明显的浓度梯度依赖性。Prls 抑制 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为 1.58  $\mu\text{mol/L}$ ,接近 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,因此,后续实验选择 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Prls 处理细胞。

### 2.2 Prls 显著降低 HeLa 细胞的增殖能力

MTT、EdU 法检测结果(图 1B、1C)显示,与对照组相比,环巴胺组、Prls 组和 Prls+pc-NC 组 HeLa 细胞增殖活力(24、48 h)和细胞增殖率均显著降低(均  $P<0.05$ );与环巴胺组相比,Prls 组 HeLa 细胞增殖活力和细胞增殖率差异无统计学意义(均  $P>0.05$ );与 Prls+pc-NC 组相比,Prls+pc-Shh 组 HeLa 细胞增殖活力和细胞增殖率均显著升高(均  $P<0.05$ )。结果表明,Prls 显著降低 HeLa 细胞增殖能力,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Prls 对细胞增殖的抑制作用。

### 2.3 Prls 显著降低 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力

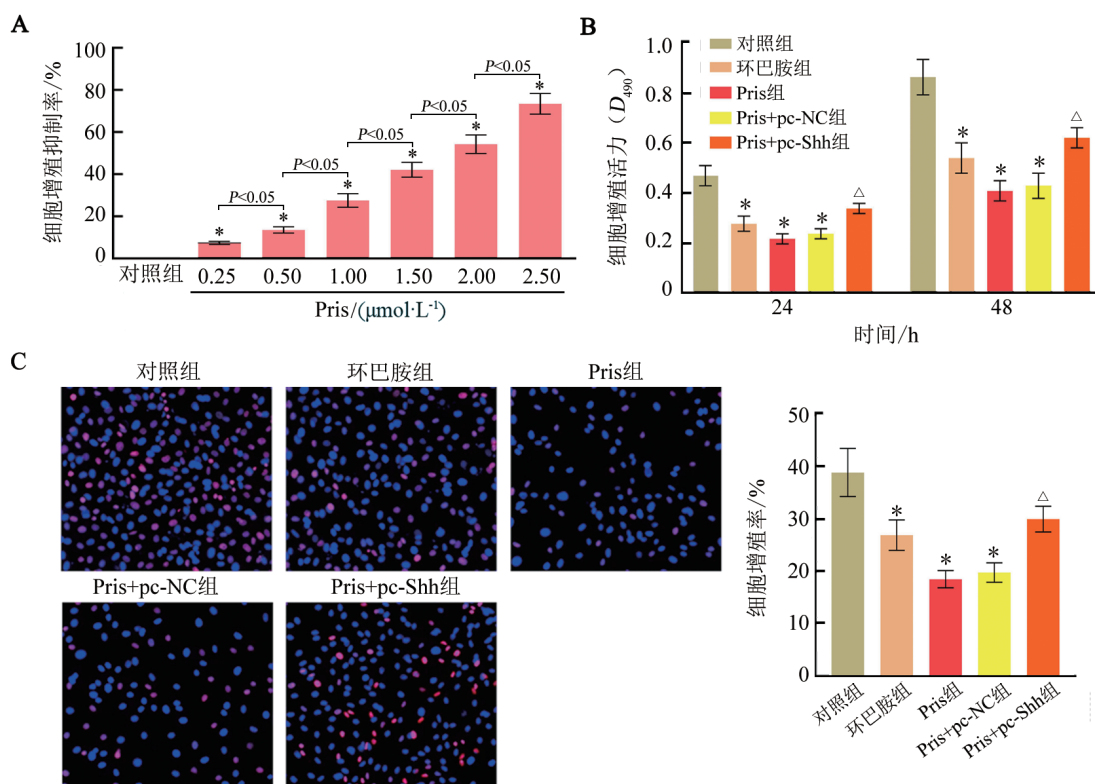
Transwell 小室实验结果(图 2A)显示,与对照组相比,环巴胺组、Prls 组和 Prls+pc-NC 组迁移与侵袭细胞数目均显著降低(均  $P<0.05$ );与环巴胺组相比,Prls 组迁移与侵袭细胞数目差异无统计学意义(均  $P>0.05$ );与 Prls+pc-NC 组相比,Prls+pc-Shh 组迁移与侵袭细胞数目均显著升高(均  $P<0.05$ )。结果表明,Prls 显著降低 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Prls 对细胞迁移和侵袭的抑制作用。

### 2.4 Prls 显著促进 HeLa 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 2B)显示,与对照组相比,环巴胺组、Prls 组和 Prls+pc-NC 组 HeLa 细胞凋亡

率均显著升高(均  $P < 0.05$ );与环巴胺组相比,Pris 组 HeLa 细胞凋亡率差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 Pris+pc-NC 组相比,Pris+pc-Shh 组 HeLa 细胞凋亡率

显著降低( $P < 0.05$ )。结果表明,Pris 显著促进 HeLa 细胞凋亡,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Pris 对细胞凋亡的促进作用。



A、B: MTT 法检测各组 HeLa 细胞增殖抑制率(A)和细胞增殖活力(B);C: EdU 法检测各组 HeLa 细胞增殖率( $\times 200$ )。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与 Pris+pc-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图1 Pris 或环巴胺对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响

### 2.5 Pris 显著抑制 HeLa 细胞 VM 的形成能力

血管生成实验结果(图 2C)显示,对照组 HeLa 细胞形成良好的 VM 管腔结构;与对照组相比,环巴胺组、Pris 组和 Pris+pc-NC 组 HeLa 细胞 VM 管腔结构明显被破坏,管腔结构数量明显减少[(45.24 $\pm$ 4.73)个、(43.75 $\pm$ 4.62)个、(42.80 $\pm$ 4.49)个 vs (65.30 $\pm$ 5.18)个,均  $P < 0.05$ ];与 Pris+pc-NC 组相比,Pris+pc-Shh 组细胞 VM 管腔结构形成有明显改善,管腔结构数量显著增多[(57.62 $\pm$ 5.03)个 vs (42.80 $\pm$ 4.49)个,  $P < 0.05$ ]。结果表明,Pris 显著抑制 HeLa 细胞 VM 管腔结构的形成能力,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Pris 对细胞 VM 管腔结构形成的抑制作用。

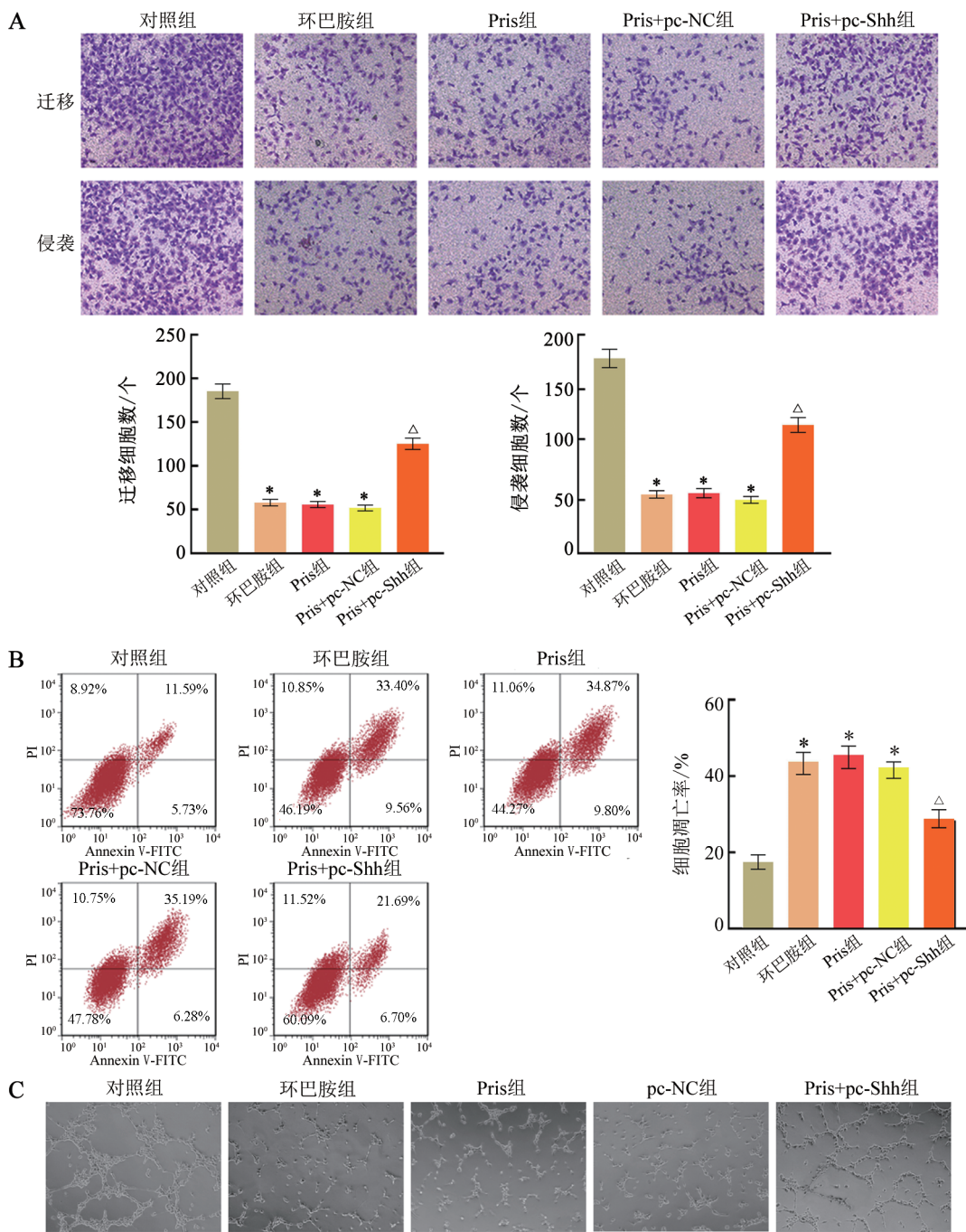
### 2.6 Pris 显著降低 HeLa 细胞中 Shh 和 Gli1 mRNA 表达水平

qPCR 法检测结果(图 3)显示,与对照组相比,环巴胺组、Pris 组和 Pris+pc-NC 组 HeLa 细胞 Shh 和 Gli1 mRNA 表达均显著降低(均  $P < 0.05$ );与环巴胺组相比,Pris 组 HeLa 细胞 Shh 和 Gli1 mRNA 表达差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ );与 Pris+pc-NC 组相比,Pris+pc-Shh 组

HeLa 细胞 Shh 和 Gli1 mRNA 表达均显著升高(均  $P < 0.05$ )。结果表明,Pris 显著抑制 HeLa 细胞中 Shh/Gli1 信号通路的激活,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Pris 对细胞中 Shh/Gli1 信号通路活化的抑制作用。

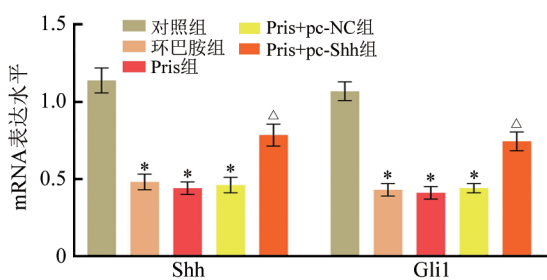
### 2.7 Pris 下调 HeLa 细胞中 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达、上调 caspase-3 表达

WB 法检测结果(图 4)显示,与对照组相比,环巴胺组、Pris 组和 Pris+pc-NC 组 HeLa 细胞中 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达水平均显著降低(均  $P < 0.05$ ),caspase-3 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与环巴胺组相比,Pris 组 HeLa 细胞中 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1、caspase-3 蛋白表达水平差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );与 Pris+pc-NC 组相比,Pris+pc-Shh 组 HeLa 细胞中 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达水平显著升高(均  $P < 0.05$ ),caspase-3 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ )。结果表明,Pris 显著下调 HeLa 细胞中 VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、Shh、Gli1 蛋白表达,而同时过表达 Shh 则可部分减弱 Pris 对细胞中前述蛋白表达的抑制作用。



A: Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力(结晶紫染色, ×200); B: 流式细胞术检测细胞的凋亡水平; C: 血管生成实验检测 HeLa 细胞 VM 形成能力(×100)。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 Pris+pc-NC 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

图2 Pris 或环巴胺对 HeLa 细胞迁移、侵袭、凋亡和 VM 形成能力的影响



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 Pris+pc-NC 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

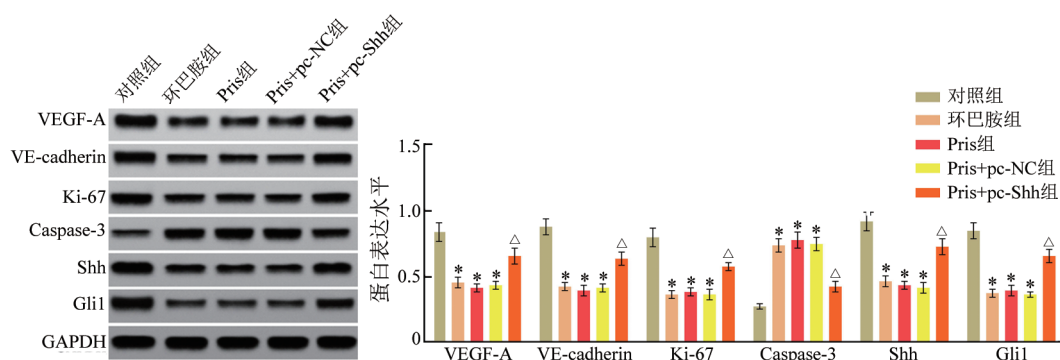
图3 各组 HeLa 细胞 Shh mRNA 和 Gli1 mRNA 水平比较

### 3 讨论

宫颈癌发病率和病死率一直居高不下,且呈逐年升高的趋势,严重威胁着广大妇女的生命健康安全<sup>[11]</sup>。宫颈癌患者死亡的主要原因是癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[12]</sup>,而肿瘤细胞的增殖需要提供氧气和营养物质,VM 是肿瘤细胞供血的方式<sup>[13]</sup>。因此,阻止 VM 的形成就可以抑制肿瘤的发生发展。Pris 是一种分布于卫矛科和翅子藤科的三萜类化合物,具有抗

肿瘤、抗炎、杀菌等多种功效<sup>[14]</sup>。大量研究表明,Pris可以抑制多种肿瘤的发生发展过程<sup>[15]</sup>;Pris可以抑制结直肠癌HCT116和HT29细胞的增殖和迁移,使细胞阻滞于G0/G1期<sup>[6]</sup>;Pris可以抑制肺癌NCL-H12991

细胞增殖、迁移与侵袭并诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本研究用不同浓度的Pris处理HeLa细胞,结果表明0.25 μmol/L及以上浓度的Pris处理均可显著抑制癌细胞的增殖能力。



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与Pris+pc-NC组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图4 各组HeLa细胞中VEGF-A、VE-cadherin、Ki-67、caspase-3、Shh、Gli1蛋白表达

Ki-67是一种细胞周期相关的蛋白,在细胞分裂过程中高表达,可促进细胞增殖。本研究结果显示,Pris可显著下调Ki-67蛋白表达而抑制细胞增殖,细胞增殖实验结果进一步证实该结论。肿瘤细胞具有高迁移和侵袭的特性,是肿瘤复发和转移的主要原因。本研究通过Transwell小室迁移和侵袭实验证实Pris可显著抑制宫颈癌HeLa细胞迁移和侵袭能力。Caspase-3是一种细胞凋亡蛋白,可激活激酶级联反应,促进细胞凋亡。本研究结果显示,Pris可上调caspase-3的表达,促进细胞凋亡,细胞凋亡实验也进一步证实了该结论。VEGF-A蛋白具有促进血管内皮细胞增殖、存活、迁移、侵袭和血管生成的作用;VE-cadherin是内皮细胞中主要的钙黏蛋白,在血管生成和屏障通透性维持中具有重要作用,VEGF-A和VE-cadherin水平可反映肿瘤细胞血管生成情况。本研究结果显示,Pris处理HeLa细胞后,VEGF-A和VE-cadherin的蛋白表达显著降低,进一步通过VM形成实验发现,HeLa细胞VM管腔结构形成明显被破坏,证实血管生成被抑制。研究结果提示,Pris可抑制HeLa细胞增殖、迁移、侵袭和VM形成并促进细胞凋亡。

研究<sup>[18]</sup>表明,Shh信号通路是具有调控作用的高度保守的信号通路,可参与调控多种癌细胞的增殖和迁移,并可调控细胞分泌多种血管新生因子发挥促血管再生的作用。ZHANG等<sup>[19]</sup>研究发现,木黄酮下调Shh信号通路抑制鼻咽癌NCSC细胞的增殖。WANG等<sup>[20]</sup>研究表明,过表达miR-129-5p可以抑制Shh信号通路,从而抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和VM形成。本研究结果显示,经Pris处理的

HeLa细胞中Shh、Gli1 mRNA和蛋白表达水平均显著降低,与Shh信号通路抑制剂环巴胺处理组达到相同水平,提示Pris可以抑制Shh信号通路。同时过表达Shh则部分减弱了Pris对HeLa细胞的抑制作用。提示Pris通过阻断Shh信号通路抑制HeLa细胞的增殖与VM形成并促进其凋亡。

综上所述,Pris可能通过阻断Shh/Gli1信号通路抑制宫颈癌HeLa细胞增殖和VM形成并促进其凋亡。本研究结果表明,Pris可作为宫颈癌的潜在治疗药物,为新型抗宫颈癌药物的开发提供了参考。未来将采用其他宫颈癌细胞,如SiHa细胞、CaSki细胞等并构建裸鼠移植瘤模型进一步验证Pris的抗宫颈癌的作用与机制。然而,本研究受条件限制,还存在一定不足,后续还需用分子对接等方法进一步探究药物和通路蛋白间的作用关系。此外,除Shh/Gli1信号通路外,Pris能否通过其他途径发挥抗肿瘤活性仍需深入探索。

#### [参考文献]

- CAIRD H, SIMKIN J, SMITH L, *et al.* The path to eliminating cervical cancer in Canada: past, present and future directions[J/OL]. *Curr Oncol*, 2022, 29(2): 1117-1122[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8870792/>. DOI: 10.3390/curroncol29020095.
- DU S, QIAN J X, TAN S R, *et al.* Tumor cell-derived exosomes deliver TIE2 protein to macrophages to promote angiogenesis in cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2022, 529: 168-179. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.01.005.
- WEYERS S, GARLAND S M, CRUICKSHANK M, *et al.* Cervical cancer prevention in transgender men: a review[J]. *BJOG*, 2021, 128(5): 822-826. DOI: 10.1111/1471-0528.16503.
- CHENG S H, ZHANG Z H, HU C, *et al.* Pristimerin suppressed breast

- cancer progression via miR-542-5p/DUB3 axis[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 6651-6660[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7354954/>. DOI: 10.2147/OTT.S257329.
- [5] 于彬, 于勇, 时磊, 等. 扁蒴藤素对肝细胞癌细胞生物学行为及吉西他滨化疗敏感性的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(2): 221-230. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007.
- [6] 周鑫, 杨进, 陈林, 等. 扁蒴藤素对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制[J]. *中国癌症防治杂志*, 2023, 15(1): 18-24. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2023.01.03.
- [7] JIANG J, LIU Z H, ZHOU X P, *et al.* Resveratrol induces apoptosis, suppresses migration, and invasion of cervical cancer cells by inhibiting the hedgehog signaling pathway[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 8453011[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9568329/>. DOI: 10.1155/2022/8453011.
- [8] XIE Z P, WANG F, LIN L Q, *et al.* An SGLT2 inhibitor modulates SHH expression by activating AMPK to inhibit the migration and induce the apoptosis of cervical carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2020, 495: 200-210. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.005.
- [9] 徐婷, 程名, 王叙德. 扁蒴藤素对肝细胞癌细胞 Hep3B 增殖和凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(14): 1607-1611. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.14.009.
- [10] 邵力伟, 姚春, 伍龙, 等. 环巴胺抑制 Shh 信号对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2015, 55(18): 58-60. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.18.021.
- [11] SUNDSTRÖM K, ELFSTRÖM K M. Advances in cervical cancer prevention: efficacy, effectiveness, elimination?[J/OL]. *PLoS Med*, 2020, 17(1): e1003035[2024-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31990905/>. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003035.
- [12] 邓幻苏, 刘元斌. 过表达 lncRNA MIR17HG 促进宫颈癌 HeLa 细胞的恶性生物学行为与裸鼠移植瘤生长[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(8): 741-749. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.006.
- [13] GUTIÉRREZ-HOYA A, SOTO-CRUZ I. NK cell regulation in cervical cancer and strategies for immunotherapy[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(11): 3104[2024-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34831327/>. DOI: 10.3390/cells10113104.
- [14] AL-ROMAIYAN A, MASOCHA W. Pristimerin, a triterpene that inhibits monoacylglycerol lipase activity, prevents the development of paclitaxel-induced allodynia in mice[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 944502[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9395968/>. DOI: 10.3389/fphar.2022.944502.
- [15] REHFELD A, MARCUS PEDERSEN C. Lupeol and pristimerin do not inhibit activation of the human sperm CatSper Ca(2+)-channel[J/OL]. *F1000Research*, 2022, 11: 222[2024-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36016990/>. DOI: 10.12688/f1000research.109279.2.
- [16] 吕蒙莹, 罗照勇, 王维民, 等. 扁蒴藤素对人结直肠癌细胞 HCT116 和 HT29 增殖、迁移和细胞周期的影响及作用机制研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(13): 60-67. DOI: 10.7619/jcmp.20220335.
- [17] LI J J, GUO Q R, LEI X P, *et al.* Pristimerin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration in H1299 Lung Cancer Cells[J/OL]. *J Cancer*, 2020, 11(21): 6348-6355[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7532514/>. DOI: 10.7150/jca.44431.
- [18] LÉZOT F, CORRE I, MORICE S, *et al.* SHH signaling pathway drives pediatric bone sarcoma progression[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(3): 536[2024-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32110934/>. DOI: 10.3390/cells9030536.
- [19] ZHANG Q, CAO W S, WANG X Q, *et al.* Genistein inhibits nasopharyngeal cancer stem cells through sonic hedgehog signaling[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(10): 2783-2791. DOI: 10.1002/ptr.6464.
- [20] WANG Y F, YANG H Y, SHI X Q, *et al.* Upregulation of microRNA-129-5p inhibits cell invasion, migration and tumor angiogenesis by inhibiting ZIC2 via downregulation of the Hedgehog signaling pathway in cervical cancer[J/OL]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(12): 1162-1173[2024-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6301807/>. DOI: 10.1080/15384047.2018.1491497.

[收稿日期] 2024-02-17

[修回日期] 2024-03-15

[本文编辑] 党瑞山