

虫草素通过调控 Gli1 介导抗肝癌细胞增殖及促凋亡的机制

童汪霞, 罗宁*, 李桂凤, 刘旭东, 刘璇, 王凯萌
(广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

[摘要] 目的:探讨虫草素抑制人肝癌细胞增殖并促其凋亡的分子机制。方法:采用干扰小RNA(siRNA)技术沉默胶质瘤相关癌基因同源物1(Gli1)基因并转染SMMC-7721细胞,细胞增殖与活性检测(CCK-8)及细胞克隆实验检测细胞增殖能力;使用不同剂量的虫草素对肝癌细胞进行干预,检测肝癌细胞的增殖、凋亡情况。使用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Gli1及其下游相关基因的表达情况。结果:与正常肝细胞比较,Gli1在SMMC-7721肝癌细胞中的mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。CCK-8及克隆形成实验结果显示,与空白组比较,干扰沉默Gli1组SMMC-7721细胞72,96h的增殖率降低($P<0.05$, $P<0.01$);细胞集落形成能力显著降低($P<0.01$)。虫草素干预后,与空白组比较,虫草素80,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组72,96h肝癌细胞的增殖明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。凋亡实验结果显示,与空白组比较,虫草素80,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组SMMC-7721肝癌细胞凋亡显著增加($P<0.01$)。Real-time PCR及Western blot实验显示,虫草素80,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组Gli1在SMMC7721细胞中的mRNA及蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);虫草素120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和原癌基因(c-Myc)mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)mRNA和蛋白表达增加($P<0.05$)。结论:Gli1在肝癌中高表达。虫草素可通过对Gli1及其下游与凋亡相关因子的调控从而抑制肝癌增殖并促肝癌细胞凋亡。

[关键词] 原发性肝癌; 虫草素; 胶质瘤相关肿瘤基因同源物1(Gli1); 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0104-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220295

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211116.1904.003.html>

[网络出版日期] 2021-11-17 11:27

Mechanism of Cordycepin Inhibiting Proliferation and Promoting Apoptosis of Hepatoma Cells by Regulating Gli1

TONG Wang-xia, LUO Ning*, LI Gui-feng, LIU Xu-dong, LIU Xuan, WANG Kai-meng
(Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of cordycepin inhibiting proliferation and promoting apoptosis of human hepatoma cells (HCCs). **Method:** Glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli1) gene was silenced by small interfering RNA (siRNA) and transfected into SMMC-7721 cells, and then cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and cell cloning assay. SMMC-7721 cells were treated with different concentration of cordycepin, and the cell proliferation and apoptosis were examined. The expression of Gli1 and the downstream related genes was determined by Real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot. **Result:** The mRNA and protein expression of Gli1 in SMMC-7721 cells was higher than that in normal liver cells ($P<0.01$). The proliferation rate of SMMC-7721 with silenced Gli1 decreased at 72 and 96 h ($P<0.05$, $P<0.01$), and the colony-forming capacity lowered ($P<0.01$) compared with those in the blank group. Compared with the control, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cordycepin significantly inhibited the

[收稿日期] 20210104(018)

[基金项目] 广西青年科学基金项目(2018GXNSFBA281189)

[第一作者] 童汪霞, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合肝病临床与基础研究, E-mail:twx_01@126.com

[通信作者] * 罗宁, 博士, 从事中西医结合脑病肿瘤临床与基础研究, E-mail:ln760320@163.com

proliferation of SMMC-7721 cells at 72 and 96 h ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and promoted the apoptosis of them ($P < 0.01$). Moreover, 80 and 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cordycepin restrained the mRNA and protein expression of Gli1 in SMMC7721 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, cordycepin led to the decrease in the mRNA and protein levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and c-Myc ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the increase in the mRNA and protein expression of cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3) ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gli1 is highly expressed in HCCs, and cordycepin can suppress the proliferation and enhance the apoptosis of HCCs by regulating Gli1 and the downstream apoptosis-related factors.

[Keywords] primary hepatic carcinoma; cordycepin; glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli1); cell proliferation; apoptosis

原发性肝癌是一种临床上常见的恶性肿瘤,肝细胞癌(HCC)为其主要的细胞类型。原发性肝癌具有恶性程度高、进展快及治疗后易复发的特点。每年因肝癌死亡的患者在全球因癌症死亡的患者比例中位居第二^[1-2]。肝癌发生、发展的分子机制目前尚未完全清楚,因此缺乏有效的治疗方法。

Hedgehog(Hh)信号通路是调控胚胎发育和组织形态的主要信号通路,Hh通路信号转导异常会导致先天性发育畸形(如前脑无裂畸形、多指/趾症等)及肿瘤发生(如皮肤基底细胞癌、髓母细胞瘤、横纹肌肉瘤等)^[3]。Hh通路在许多常见肿瘤中异常活跃,包括肝癌^[4]。胶质瘤相关肿瘤基因同源物1(Gli1)是Hh通路激活的标志蛋白,该因子通过调控靶基因的转录发挥转录激活的作用。对Gli1的干预可抑制肝癌的增殖及侵袭^[5-6]。

多种中药成分被发现能通过对Gli1进行干预而达到抗肿瘤的效果,如白杨素^[7]、蝎毒多肽^[8]。虫草素是中药蛹虫草的天然产物,在体外能够阻滞肿瘤细胞周期,诱导肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[9-10]。但虫草素是否能通过干预Gli1通路达到抑制肝癌细胞增殖的作用,尚未有相关报道。本文的研究目的在于探讨虫草素通过调控Gli1从而抑制肝癌增殖及促肝癌细胞凋亡的分子机制。

1 材料

1.1 细胞株 正常肝细胞株LO2购自中山大学生命科学院细胞库,批号CL-0560,由广西中医药大学药学院重点实验室常规培养及传代。Huh7, HepG2及SMMC7721细胞系购于美国菌种宝藏中心(ATCC),批号分别为PH-A120, PH-A053, PH-A021,由广西中医药大学药学院重点实验室常规培养及传代。

1.2 药物与试剂 虫草素购自美国Sigma公司,批号C3394,纯度 $\geq 98\%$ 。胎牛血清(FBS),DMEM培养基,二甲基亚砷,Annexin V-异硫氰酸荧光素

(FITC),碘化丙啶(PI),RPMI1640培养液,0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为10099-142, C11995500BT, RNBJ8284, B1094, 39642, T679267, 2120167CP);结晶紫染色液,四甲基乙二胺(TEMED),10%过硫酸铵(美国Sigma公司,批号分别为20210419, T7024, A3678);5%牛血清白蛋白(BSA),青霉素-链霉素溶液(中国Biosharp公司,批号分别为A9647, BL505A);磷酸盐缓冲液(PBS,无锡普禾有限公司,批号20200978);TBST缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号20201123);TRIzol试剂,10 \times Oligo Annealing Buffer, Lipofectamine[®] RNAi MAX Reagent(美国Invitrogen公司,批号分别是5243, T20190102, PI2058);Hoechst 33258染液(北京百灵威科技有限公司,批号LF20R04);BCA蛋白定量试剂盒(凯基生物技术有限公司,批号KGPBCA);RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司,批号P0013B);30%丙烯酰胺,1.0 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH=6.8/8.8电泳缓冲液,10%十二烷基硫酸钠(SDS),丽春红S(上海国药公司,批号分别为80001326, 73509461, 30166428, 3761-53-3);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒,质粒抽提试剂盒及凝胶回收试剂盒(日本Takara公司,批号分别为T0864, AT201903, TB202007);蛋白预染Marker, SYBR Green聚合酶链式反应(PCR)试剂盒,逆转录试剂盒(美国Thermo公司,批号分别为26616, F-415XL, K1622);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号HATF00010);Tween-20(美国Amresco公司,批号BYL40713);ECL发光液(北京鼎国生物科技有限公司,批号ECL-0011);羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(美国CST公司,批号ab9004);半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),原癌基因(c-Myc),Gli1, β -肌动蛋白(β -actin)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分

别为 ab3097, ab0532R, ab1408S, ab9876T, ab3301, ab9154); si-RNA (北京欧林格生物公司, 批号 RA9765); EcoRI 内切酶, BsmI 内切酶, T4DNA ligase 及 GeneRuler DNA Ladder(立陶宛 Fermentas 公司, 批号分别为 BW201912, 20190819, T202003, GW202001)。

1.3 仪器 Galaxy170S 型 CO₂ 培养箱 (英国 NewBrunswick 公司); ABI7500 型实时荧光定量检测仪 (美国 ABI 公司); VarioskanLUX 型酶标仪 (芬兰 Thermo Fisher 公司); Nanodrop 2000 型超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); XDY-2 型荧光倒置生物显微镜 (广州粤显光学仪器有限公司); Epoch2 型全波长酶标仪, Elx808 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); BSC1300- II B2 型智能生物安全柜 (山东新华医疗器械有限公司); Mini-PROTEAN Tetra Cell 型垂直电泳仪, Mini Trans-Blot Cell 型蛋白转印模块, Bio-Rad PowerPac Mniversal™ 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5424 型冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); Avanti J-26XP 型低温高速离心机, FC500 型流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司); ZWYR-2102C 型台式恒温培养振荡器摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); Tanon 5200 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); ECLIPSE Ni-U 型正置荧光生物显微镜 (日本 Nikon 公司); SW-CJ-2D 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); QuantStudio™6Flex 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 系统 (美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 细胞系与细胞培养 LO2, Huh7, HepG2 及 SMMC7721 细胞株均在添加 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养, 置 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中。待细胞融合度达 90%~95% 时, 用胰酶 0.3 mL 消化 1 min, 加入新鲜 DMEM 高糖培养基重悬, 计数仪下计数。分板进行实验处理。

2.2 虫草素干预 取适量的虫草素溶于 DMEM 培养基, 配成 300 g·L⁻¹ 溶液, 置于 -20 °C 保存, 临用时再用 DMEM 稀释至所需浓度。本实验所用虫草素终浓度分别为 40, 80, 120 μmol·L⁻¹。

2.3 细胞转染 SMMC-7721 细胞首先接种于 6 孔培养板中 24 h (1×10⁵ 个/孔)。实验分为 SMMC-7721 细胞+干扰小 RNA (siRNA) 空白 (打乱序列的 siRNA) 组及 SMMC-7721 细胞+Gli1 siRNA 1, 2, 3 组。用不含血清的空 DMEM 高糖培养基 150 μL 与 Lipofectamine® RNAi MAX Reagent 9 μL 混匀,

配制 A 液; 用不含血清的空 DMEM 高糖培养基 150 μL 与 si-RNA 30 pmol 混匀, 配置 B 液。将 A, B 两液混匀后加入到 6 孔板中, 置于 37 °C 中培养 48 h 后收样做 Real-time PCR。siRNA 干扰序列见表 1。

表 1 Gli1 siRNA 序列

Table 1 siRNA sequence of Gli1

名称	序列(5'-3')	长度 /bp
Gli1-siRNA-1	上游 GCGGCACCAUGGCCGUA AATT	120
	下游 UUUAGCGCCAUGCUGCGGCAT	
Gli1-siRNA-2	上游 CGUUGUCAUUUACAUCUCUTT	117
	下游 ACACAUGUTAAUGAGAACCTT	
Gli1-siRNA-3	上游 GTGUGACCCATCAGGACAATT	115
	下游 UUGUCCUGUUGGCUCACUCAT	

2.4 Real-time PCR 检测 Gli1, Caspase-3, Bcl-2, c-Myc 的 mRNA 表达 取对数生长期 SMMC7721 细胞, PBS 冲洗 2 次, 使用 0.25% 胰酶消化, 计数后以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中。设空白组及不同剂量虫草素干预组, 每组 3 个复孔。按照分组, 空白组加入新的培养基, 虫草素干预组分别加入 40, 80 及 120 μmol·L⁻¹ 的虫草素, 置 6 孔板于 37 °C, 含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中并分别培养 48 h 后收集细胞。使用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 在测定浓度后进行逆转录和 PCR 反应。按以下方案扩增样品, 95 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共循环 40 次。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算相对表达量。引物序列由生工生物 (上海) 股份有限公司合成。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
Gli1	上游 GCTGCGCTGCCGTGG	115
	下游 GGTGTGGGGACACTCTGTCT	
Caspase-3	上游 TGGAACCAAAGATCATACATGGAA	182
	下游 TTCCTGAGGTTTGCTGCAT	
Bcl-2	上游 TCATGTGTGTGGAGCGTC	117
	下游 AGCCTCCGTTATCCTGGATC	
c-Myc	上游 TGTAGTAATCCAGCGAGAG	247
	下游 CGCAGATTGTAAGTTCCAG	
GAPDH	上游 AGAAGGCTGGGGCTCATTG	258
	下游 AGGGGCCATCCACAGTCTTC	

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Gli1, Caspase-3, Bcl-2, c-Myc 蛋白表达 取对数生长期

的 SMMC7721 细胞,细胞培养、分组及给药同 2.4 项。加药培养 48 h,吸弃上清,收集细胞,提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒进行样品蛋白定量分析。蛋白质在 95 °C 加热 5 min。在 SDS-PAGE 上加载等量的蛋白质。蛋白质在凝胶上分离后,电转移到 PVDF 膜上。然后用 5% 的脱脂牛奶封闭。在室温下封闭 60 min 后,加入特异性一抗在 4 °C 孵育过夜。Caspase-3, Bcl-2, c-Myc, Gli1, β -actin (1:1 000), GAPDH (1:4 000)。TBST 缓冲液洗膜 3 次,加入二抗 (1:300) 在室温下孵育 1 h。滴加 ECL 发光液于膜上,使用 Quantity One 凝胶分析软件检测每个膜中的信号强度,并与 GAPDH 进行对比曝光分析。

2.6 细胞增殖检测 细胞传代及培养同 2.4 项,培养 24 h,弃上清,第一部分增殖实验设置空白组和 Gli1 沉默组。第二部分增殖实验分组及给药同 2.4 项。将细胞接种于 96 孔板中,分别孵育 24, 48, 72, 96 h。加入 CCK-8 溶液 20 μ L,并在 37 °C 下培养 2 h。使用微型平板读取器在 450 nm 处测定吸光度 A。集落克隆实验的分组同上,将转染的 SMMC-7721 细胞以 200 个/孔的密度接种到 6 孔板上。孵育 14 d 后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min。然后用显微镜进行细胞计数和成像。集落形成率=克隆数/接种细胞数 \times 100%。

2.7 细胞凋亡检测 细胞培养、分组及给药同 2.4 项,各组设 3 个复孔,加药 48 h 后,吸弃上清,PBS 清洗细胞 2 次,收集细胞。加入 Binding Buffer 500 μ L 重悬细胞;分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 5 μ L 室温避光染色 10 min,加入 Annexin V Binding Buffer 300 μ L,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.8 统计学方法 使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism V7.0 软件对数据进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,两组以上数据采用方差分析 (ANOVA) 率的比较使用卡方检

验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

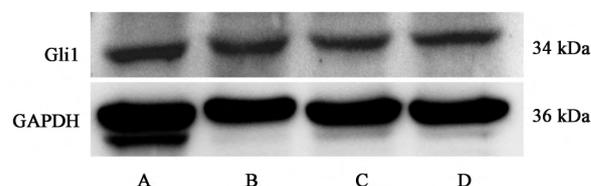
3.1 Gli1 在正常肝细胞和肝癌细胞中的 mRNA 及蛋白表达水平比较 与 LO2 细胞比较, Gli1 在 SMMC-7721, Huh7, HepG2 肝癌细胞中的 mRNA 及蛋白表达水平均高于空白组细胞 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 3, 图 1。由于 Gli1 在 SMMC-7721 肝癌细胞系中表达最高,因此选择了 SMMC-7721 细胞株进行后续实验。

表 3 Gli1 在 LO2 及 SMMC-7721, HepG2, Huh7 肝癌细胞系中的 mRNA 及蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Gli1 mRNA and protein expression level in LO2 and SMMC-7721, HepG2, Huh7 hepatoma cell lines ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	Gli1 mRNA	Gli1/GAPDH
LO2	1.003 \pm 0.091	1.000 \pm 0.055
SMMC-7721	1.803 \pm 0.069 ²⁾	1.605 \pm 0.062 ²⁾
HepG2	1.254 \pm 0.018 ¹⁾	1.265 \pm 0.123 ¹⁾
Huh7	1.418 \pm 0.032 ¹⁾	1.285 \pm 0.039 ¹⁾

注:与 LO2 细胞比较 ¹⁾ $P<0.05, ^{2)}$ $P<0.01$ 。



A. LO2 组; B. SMMC-7721 组; C. HepG2 组; D. Huh7 组

图 1 SMMC-7721, HepG2, Huh7 肝癌细胞系中 Gli1 的蛋白电泳
Fig. 1 Electrophoresis of Gli1 in SMMC-7721, HepG2, Huh7 hepatoma cell lines

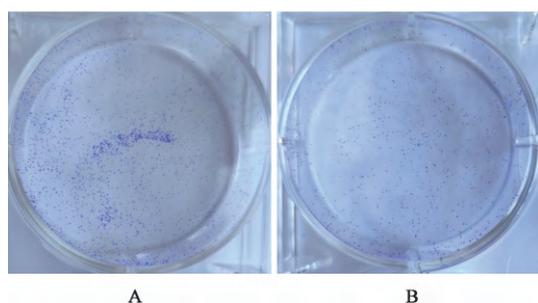
3.2 沉默 Gli1 对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响 经 Real-time PCR 筛选,最佳敲降靶序列为 Gli1-siRNA-3,用于后续的干扰沉默实验。研究结果显示,与空白组比较,沉默 Gli1 组 SMMC-7721 细胞在 72, 96 h 的增殖率明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。克隆形成实验显示,与空白组比较,沉默 Gli1 组细胞集落形成能力显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 4, 图 2。

表 4 干扰沉默 Gli1 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

Table 4 Effect of interference silencing Gli1 on proliferation of SMMC-7721 cells

组别	细胞增殖 A				细胞克隆/个
	24 h	48 h	72 h	96 h	14 d
空白	0.247 \pm 0.017	0.431 \pm 0.020	0.836 \pm 0.023	1.257 \pm 0.044	352.667 \pm 26.447
沉默 Gli1	0.194 \pm 0.013	0.385 \pm 0.010	0.726 \pm 0.023 ¹⁾	0.754 \pm 0.036 ²⁾	265.338 \pm 15.672 ²⁾

注:与空白组比较 ¹⁾ $P<0.05, ^{2)}$ $P<0.01$ 。



A. 空白组; B. 沉默 Gli1 组

图2 干扰沉默 Gli1 基因后对 SMMC-7721 细胞克隆集落的影响

Fig. 2 Effect of interfering Gli1 gene silencing on smMC-7721 cell clonal colony

3.3 虫草素对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响

与空白组比较,剂量为虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 72, 96 h SMMC-7721 肝癌细胞的增殖率明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。克隆形成实验显示,与空白组比较,虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组会明显抑制肝癌细胞的集落形成,差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。这些结果提示虫草素可呈剂量依赖性抑制肝癌细胞的增殖。见表 5, 图 3。

3.4 虫草素对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的影响

与空白组比较,虫草素 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均可促进 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡 ($P<0.05, P<0.01$), 尤其虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可显著促进 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡 ($P<0.01$)。见表 6。

表 5 虫草素对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of cordycepin on proliferation of SMMC-7721 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖 A				细胞克隆/个
		24 h	48 h	72 h	96 h	14 d
空白		0.212 \pm 0.011	0.364 \pm 0.052	0.652 \pm 0.074	0.804 \pm 0.050	385.356 \pm 26.447
虫草素	40	0.226 \pm 0.018	0.341 \pm 0.053	0.551 \pm 0.030	0.684 \pm 0.063	342.231 \pm 22.154
	80	0.184 \pm 0.014	0.311 \pm 0.054	0.321 \pm 0.044 ¹⁾	0.421 \pm 0.062 ¹⁾	282.168 \pm 19.273 ¹⁾
	120	0.230 \pm 0.021	0.322 \pm 0.053	0.350 \pm 0.031 ¹⁾	0.484 \pm 0.063 ²⁾	247.225 \pm 15.671 ²⁾

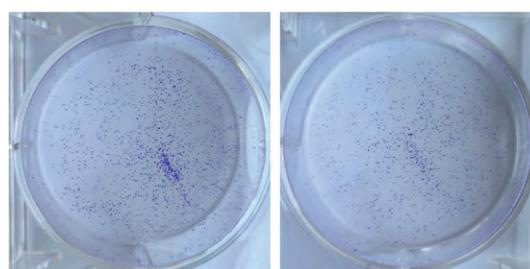
注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^{2)}$ $P<0.01$ (表 6-8 同)。

表 6 虫草素对肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的影响 ($n=3$)

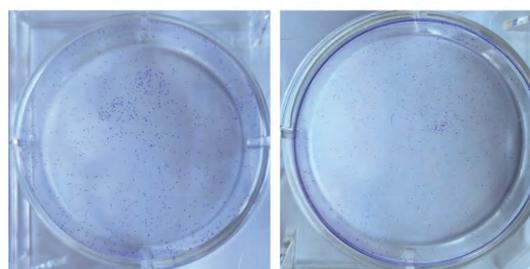
Table 6 Effect cordycepin on apoptosis of hepatoma cell SMMC-7721 ($n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白		4.1
虫草素	40	18.2 ¹⁾
	80	21.2 ²⁾
	120	23.9 ²⁾

3.6 虫草素对 Gli1 及其下游靶基因蛋白表达的影响 与空白组比较,虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组



A. 空白组; B. 虫草素 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 4 同)



C. 虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 4 同); D. 虫草素 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 4 同)

图 3 虫草素对 SMMC-7721 肝癌细胞克隆形成影响

Fig. 3 Effect cordycepin on smMC-7721 cell clonal formation

3.5 虫草素对 Gli1 及其下游靶基因 mRNA 表达的影响

与空白组比较,虫草素 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Gli1 在 SMMC7721 细胞中的 mRNA 表达水平明显下降 ($P<0.05, P<0.01$)。虫草素 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bcl-2, c-Myc mRNA 表达明显下降 ($P<0.05, P<0.01$), Caspase-3 mRNA 表达明显增加 ($P<0.05$)。见表 7。

Gli1 在 SMMC7721 细胞中的蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。虫草素 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bcl-2, c-Myc 蛋白表达明显下降 ($P<0.05, P<0.01$), Caspase-3 蛋白表达明显增加 ($P<0.05$)。见表 8, 图 4。

4 讨论

本研究对 Gli1 在肝癌中的表达及虫草素通过调控 Gli1 的抗肝癌机制进行了探讨,发现 Gli1 在肝癌组织中高表达。虫草素对肝癌细胞的增殖具有明显的抑制作用,能通过调控 Gli1 及 Gli1 下游与

表 7 虫草素对 SMMC-7721 细胞中 Gli1, Caspase-3, Bcl-2, c-Myc mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect cordycepin on mRNA expressions of Gli1, Caspase-3, Bcl-2 and c-Myc in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Gli1	Caspase-3	Bcl-2	c-Myc
空白		0.804±0.051	0.221±0.018	0.420±0.051	0.484±0.031
虫草素	40	0.651±0.036	0.342±0.021	0.322±0.022	0.351±0.035
	80	0.363±0.024 ¹⁾	0.551±0.042	0.313±0.018	0.322±0.023
	120	0.210±0.022 ²⁾	0.684±0.064 ¹⁾	0.180±0.015 ¹⁾	0.204±0.012 ²⁾

表 8 虫草素对 SMMC-7721 细胞中 Gli1, Caspase-3, Bcl-2, c-Myc 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect cordycepin on protein expressions of Gli1, Caspase-3, Bcl-2 and c-Myc in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Gli1/GAPDH	Caspase-3/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	c-Myc/GAPDH
空白		1.505±0.062	1.304±0.120	1.202±0.014	0.642±0.014
虫草素	40	0.854±0.064	1.451±0.206	1.052±0.113	0.533±0.022
	80	0.673±0.041 ¹⁾	1.604±0.173	0.846±0.210	0.466±0.018
	120	0.421±0.057 ²⁾	1.809±0.220 ¹⁾	0.507±0.110 ¹⁾	0.301±0.074 ²⁾

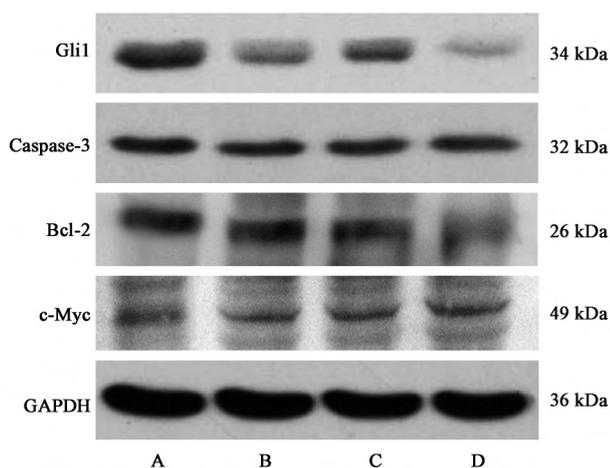


图 4 SMMC-7721 细胞中 Gli1, Caspase-3, Bcl-2, C-myc 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Gli1, Caspase-3, Bcl-2 and C-myc in SMMC-7721 cells

细胞凋亡相关因子的表达促进肝癌细胞的凋亡。

Gli1 是 Hh 信号通路的关键组成部分,属于锌指转录因子家族的成员,在 Hh 信号通路中起下游蛋白的作用。Gli1 是 Hh 信号通路的可靠激活标记^[5,11-12]。研究显示,Gli1 在所有肝细胞癌细胞系中的表达显著增加。Gli1 的过度表达可以促进 HCC 细胞的迁移、侵袭和上皮-间质转化(EMT)^[13-15]。此外,Gli1 也在其他多种类型的癌症中过表达,包括卵巢癌^[16]、胃癌^[17]、食道癌^[18]及胰腺癌^[19]等肿瘤。激活的 Gli1 以全长的形式进入细胞核内,发挥其转录激活子的功能。通过促进下游血管内皮生长因子(VEGF),Bcl-2,细胞周期蛋白(Cyclin)D/CyclinE,c-Myc 等靶标基因的异常表达,造成细胞过度增殖

并最终导致肿瘤的发生。在本研究中,生物信息分析结果及细胞实验也同样证实 Gli1 在肝癌中高表达。干扰沉默 Gli1 的表达能抑制肝癌细胞增殖并促进肝癌细胞凋亡,这与以往的研究结论一致。

尽管出现了肿瘤免疫疗法^[20]和分子靶向药物治疗法^[21-22],但这些治疗方法存在药物不良反应大且总体疗效欠佳的不足。从天然中草药中开发更有效和更安全的药物有效成分是肝癌治疗的重要策略。多种天然化合物被发现可作用于 Gli1 而达到抗肿瘤作用,如白杨素可通过抑制蛋白激酶 CK2 活性,阻断 Hh 信号通路并降低 Gli1 蛋白表达水平,从而达到抑制人肝癌细胞干性的作用^[7];肠复康胶囊可通过抑制 Hh/Gli1 信号通路并下调 VEGF 表达,从而发挥抗结肠癌的作用^[23];蝎毒多肽可呈剂量依赖性抑制慢性粒细胞白血病细胞 Gli1 基因表达,从而治疗慢性粒细胞白血病(CML)^[8]。

虫草素是一种天然真菌化合物,因其显著的抗病毒和抗癌活性而被批准用于临床试验^[24-25]。在肝癌研究中,虫草素可通过阻止磷酸化核转录因子- κ B 抑制因子 α (p-I κ B α)的活化来抑制 p65 的核易位,通过下调趋化因子受体 4(CXCR4)抑制肝癌细胞的迁移和侵袭^[26];虫草素可通过跨膜蛋白(Fas)介导的与死亡域蛋白相关的外在信号传导途径诱导人肝癌 HepG2 细胞的凋亡^[27]。这些结果均提示虫草素能通过调控多种致癌信号通路的活化而达到抑制肝癌的效果。但虫草素能否通过干预 Gli1 基因进而达到抑制肝癌的生长目前研究尚少。在最近一篇关于乳腺癌的研究中,LIU 等^[28]首次报道了虫草素对 Hh 途径的影响。他们发现虫草素可

抑制 Hh 信号通路成分的表达和 Gli1 转录活性。沉默 Gli1 基因阻断了虫草素介导的促乳腺癌细胞凋亡、抑制上皮-间充质转化及抑制 Notch 通路的激活作用。据此课题组推测虫草素在肝癌中同样能通过调控 Hh/Gli1 而影响原发性肝癌的生长和转移。

本研究的结果显示虫草素可呈剂量依赖性的抑制肝癌细胞的增殖、集落形成并促肝癌细胞凋亡。该作用是通过调控 Gli1 及 Gli1 下游与凋亡相关因子的表达而实现。该结果进一步拓宽了虫草素在肝癌中通过调控 Hh 通路关键因子 Gli1 而发挥抑癌作用的机制范围。由于本研究仅在一种肝癌细胞系中进行了细胞实验,缺乏两种细胞实验的相互佐证及动物体内实验的进一步验证。实验结果可能存在一定的不确定性。因此后续实验将进一步在 HepG2 细胞及动物体内验证。

综上所述, Gli1 在肝癌中高表达。虫草素可通过对 Gli1 及其下游与凋亡相关因子的调控从而抑制肝癌增殖并促肝癌细胞凋亡。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN S L, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):745-761.
- [2] GOLABI P, FAZEL S, OTGONSUREN M, et al. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(9):e5904.
- [3] KATOH Y, KATOH M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(6):1019-1023.
- [4] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(1):8-20.
- [5] MAGISTRI P, LEONARD S Y, TANG C M, et al. The glypican 3 hepatocellular carcinoma marker regulates human hepatic stellate cells via Hedgehog signaling [J]. *J Surg Res*, 2014, 187(2):377-385.
- [6] BRISCOE J, THEROND P P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7):416-429.
- [7] 张燕琴,潘伟男,阎敏,等. 白杨素对肝癌干样细胞球形成及 CK2 α 和 Gli1 表达的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(12):2117-2121, 2086.
- [8] 张伟锋,杨文华. 蝎毒多肽对慢性粒细胞白血病细胞 Hh 通路下游活化因子 Gli1 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(20):25-27.
- [9] JIN Y, MENG X, QIU Z, et al. Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris* [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(5):991-995.
- [10] DONG J, LI Y, XIAO H, et al. Cordycepin sensitizes breast cancer cells toward irradiation through elevating ROS production involving Nrf2 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364:12-21.
- [11] 何曼,张梦,孙强,等. 熊果酸通过 hedgehog 信号通路调控结肠癌细胞 HCT116 自噬的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5):1217-1223.
- [12] 雷楠,熊思会,谭漂,等. 野黄芩苷通过 hedgehog 信号通路抑制结肠肿瘤干细胞分化的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(7):1676-1683.
- [13] LI J, HE Y, CAO Y, et al. Upregulation of Twist is involved in Gli1 induced migration and invasion of hepatocarcinoma cells [J]. *Biol Chem*, 2018, 399(8):911-919.
- [14] CHEN B, HU Z, LI B, et al. The expressions of Hedgehog and PI3K-Akt pathway components correlate with invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(6):2381-2388.
- [15] WANG J, ZHANG N, HAN Q, et al. Pin1 inhibition reverses the acquired resistance of human hepatocellular carcinoma cells to Regorafenib via the Gli1/Snail/E-cadherin pathway [J]. *Cancer Lett*, 2019, 444:82-93.
- [16] KE Z, CAIPING S, QING Z, et al. Sonic hedgehog-Gli1 signals promote epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/Akt pathway [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):368.
- [17] CHEN J H, ZHAI E T, CHEN S L, et al. CD44, Sonic Hedgehog, and Gli1 expression are prognostic biomarkers in gastric cancer patients after radical resection [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016:1013045.
- [18] MIN S, XIAOYAN X, FANGHUI P, et al. The glioma-associated oncogene homolog 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in human esophageal squamous cell cancer by inhibiting E-cadherin via Snail [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(7):379-385.
- [19] SHENG W, DONG M, ZHOU J, et al. The clinicopathological significance and relationship of Gli1, MDM2 and p53 expression in resectable pancreatic cancer [J]. *Histopathology*, 2014, 64(4):

- 523-535.
- [20] YIN Z Y, LI X W. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 8-17.
- [21] ALQAHTANI A, KHAN Z, ALLOGHBI A, et al. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanisms and targeted therapies [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55 (9): 526.
- [22] KUDO M, ARIZUMI T. Transarterial chemoembolization in combination with a molecular targeted agent: lessons learned from negative trials (Post-TACE, BRISK-TA, SPACE, ORIENTAL, and TACE-2)[J]. *Oncology*, 2017, 93(Suppl 1): 127-134.
- [23] 杨彦. 基于Hedgehog-Gli1信号通路探讨中药复方肠复康胶囊干预结肠癌血管生成的分子机制[J]. *中医学报*, 2017, 32(11): 2035-2038.
- [24] DE CLERCQ E. Curious (old and new) antiviral nucleoside analogues with intriguing therapeutic potential [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(34): 3866-3880.
- [25] DU Y, YU J, DU L, et al. Cordycepin enhances Epstein-Barr virus lytic infection and Epstein-Barr virus-positive tumor treatment efficacy by doxorubicin [J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2): 240-248.
- [26] GUO Z, CHEN W, DAI G, et al. Cordycepin suppresses the migration and invasion of human liver cancer cells by downregulating the expression of CXCR4[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(1): 141-150.
- [27] SHAO L W, HUANG L H, YAN S, et al. Cordycepin induces apoptosis in human liver cancer HepG2 cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2): 995-1000.
- [28] LIU C, QI M, LI L, et al. Natural cordycepin induces apoptosis and suppresses metastasis in breast cancer cells by inhibiting the Hedgehog pathway [J]. *Food Funct*, 2020, 11(3): 2107-2116.

[责任编辑 王鑫]

·书讯·

提高重症监护室(ICU)患者实施营养支持护理的实践分析 ——评《急危重症护理学(案例版)》

重症监护室(ICU)患者出现营养不良的风险更高,且是ICU第一常见及重要问题。导致ICU重症患者发生营养不良的主要原因为其特有的生理及病理过程,即ICU重症患者通常会因为自身所存在的系统炎症反应使得机体处在严重、持续的应激状态之下,会破坏正常生理状态之下的代谢合成及分解之间的平衡,导致患者机体维持在高分解代谢的状态之下,增加基础代谢率,导致体内的三大营养素脂肪、蛋白质及糖的代谢发生紊乱。假如不能有效的纠正这一高分解的代谢状态,就会持续的消耗机体组织机能,且机体组织缺乏充足的营养物,会损伤并影响到肠黏膜屏障的完整性、胃肠道功能及骨骼肌的力量与体积,降低机体的抗应激能力及免疫功能。情况严重的时候甚至会影响到器官的正常功能及结构,诱发多器官功能障碍综合征(MODS),增加患者的死亡风险,降低患者的预后。所以,为了确保ICU重症患者的治疗效果,降低患者发生营养不良风险,医护人员一定要给予ICU重症患者实施必要的营养支持护理。

《急危重症护理学(案例版)》,李文涛、崔巧玲主编,由科学出版社2021年1月出版。该书探讨了ICU重症患者实施营养支持护理的效果及对提高患者营养情况的影响。对ICU重症患者可以准确及时地进行有效抢救及护理评估,临床医护人员可以熟练掌握ICU危重患者护理的相关技能及知识。该书参考了最新的国内外技术,同时依据急危重症护理学的临床特点,将急救医疗服务体系作为主线,通过导入临床案例并进行分析,进而力求展示最科学及实用的急危重症护理内容。本书共十八章,列举了急危重症护理学在营养支持护理内容及方法。第一,营养制剂,肠外营养支持(PN),采用5%或10%葡萄糖注射液,复方氨基酸注射液(15AA),30%脂肪乳注射液。肠内营养(EN),采用立适康肠内营养制剂(短肽型),整蛋白型。第二,营养支持患者的护理方式,主要包括三种途径及方式,EN,完全胃肠内营养,完全胃肠外营养(TPN)支持。TPN患者合并存在EN禁忌证,在整个全部治疗过程当中使用PN支持。在营养支持的首日给予患者使用肠内短肽型配方,确定患者能够良好的耐受之后,再给予患者使用整蛋白型配方。首日用量为半浓度 $0.5 \text{ kcal} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1 \text{ kcal} \approx 4.185.85 \text{ J}$),半量500 mL,假如患者能够良好的耐受,则从次日开始将浓度及用量增加,至少在3 d之内确保能够达到目标营养量的60%。采用肠内营养输液泵控制营养剂的浓度及用量。EN+PN,开始时以EN的形式,持续3 d之后,确认患者的全身情况稳定,但是经EN干预之后为能达到目标营养的60%,此时给予患者辅助使用PN来达到目标营养量,并逐日过渡到TEN。第三,营养支持护理的时机,在患者进入到ICU之后的24~48 h之内给予患者实施。确认患者没有合并肠梗阻、肠缺血及肠道出血,且纠正紊乱的电解质、酸碱失衡,血液动力学稳定后,给予患者实施EN,否则给予患者实施PN。ICU重症患者给予有效的营养支持护理,是降低ICU重症患者发生营养不良,治疗ICU重症患者的一项基本措施。在ICU重症患者的治疗过程中应用营养支持护理,既能够使得机体组织的分解得到有效降低,缓解并预防营养不良的发生。使得ICU重症患者体内存在的异常代谢现象如低镁、低钙、低蛋白血症、高血糖等得到有效纠正,同时还能够辅助临床其他治疗方式来阻断疾病的进一步恶化,进而促使患者的临床疗效提高,改善患者的营养情况。

《急危重症护理学(案例版)》主要供全国高等医药院校的护理专业学生学习使用,同时也可以作为临床医护人员在急危重症护理工作提供知识及技术方面的参考。

(作者高乃坤,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)