

基于 Hedgehog 信号通路的熊果酸诱导结直肠癌 SW480 细胞凋亡的机制研究

张 梦, 何 曼, 孙 强, 陈 莉, 曾 沙, 赵 晖, 杨 寒, 刘茂伦, 任 珊, 徐海波*

成都中医药大学药学院 药理学系, 四川 成都 611137

摘 要: **目的** 研究熊果酸通过经典 Hedgehog 信号通路影响人结直肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的作用及其机制。**方法** 通过显微镜观察熊果酸对 SW480 细胞形态的影响; 采用 MTT 比色法检测熊果酸对细胞活力的影响; 细胞划痕实验检测熊果酸对细胞迁移的影响; Hoechst/PI 染色法观察熊果酸对细胞凋亡的影响; 荧光探针法检测熊果酸对细胞线粒体膜电位的影响; Caspase 活性检测试剂盒检测熊果酸对细胞凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-9 的影响; 蛋白免疫印迹法检测 Hedgehog 信号通路相关蛋白 SHh、Gli1、Ptch1、Smo、c-Myc、SuFu 及细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达水平。**结果** SW480 细胞经熊果酸给药后形态发生改变; 细胞迁移能力显著下降; 线粒体膜电位降低; 细胞核出现致密浓染; Caspase-3、Caspase-9 活性升高; SW480 细胞发生凋亡; Hedgehog 信号通路相关蛋白 SuFu 的表达水平升高, SHh、Gli1、Ptch1、Smo、c-Myc 的表达水平下降; 细胞凋亡相关蛋白 Bax 的表达水平升高, Bcl-2 的表达水平下降。**结论** 熊果酸对 SW480 细胞的生长、增殖具有抑制作用, 通过抑制 Hedgehog 信号通路的激活促进 SW480 细胞凋亡。

关键词: 熊果酸; Hedgehog 信号通路; 人结直肠癌 SW480 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)08-2365-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.020

Mechanism study on ursolic acid induced apoptosis of colorectal cancer SW480 cells based on Hedgehog signaling pathway

ZHANG Meng, HE Man, SUN Qiang, CHEN Li, ZENG Sha, ZHAO Hui, YANG Han, LIU Mao-lun, REN Shan, XU Hai-bo

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanisms of ursolic acid on proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cell SW480 through canonical Hedgehog signaling pathway. **Methods** The effect of ursolic acid on cell morphology was observed by microscope. MTT colorimetric method, cell scratch experiment and Hoechst/PI staining were used to detect the effect of ursolic acid on cell viability, cell migration and cell apoptosis. Fluorescent probe method was used to detect the effect of ursolic acid on mitochondrial membrane potential. The effects of ursolic acid on Caspase-3 and Caspase-9 were detected by Caspase activity detection kit. The expressions of Hedgehog signaling pathway-related proteins SHh, Gli1, Ptch1, Smo, c-Myc, SuFu and apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 were detected by Western blotting. **Results** Ursolic acid significantly affected the morphology of human colorectal cancer cell SW480; The migration ability of SW480 cells was decreased markedly; Mitochondrial membrane potential was decreased; The nuclei were densely stained; The activity of Caspase-3 and Caspase-9 was increased; SW480 cell apoptosis was found; The expression levels of Hedgehog signaling pathway related protein SuFu and apoptosis-related protein Bax were increased; The expression levels of apoptosis-related protein Bcl-2 and Hedgehog signaling pathway-related proteins SHh, Gli1, Ptch1, Smo c-Myc were decreased. **Conclusion** Ursolic acid enable to inhibit the growth and proliferation and promote apoptosis of SW480 cells by inactivating Hedgehog signaling pathway.

Key words: ursolic acid; Hedgehog signaling pathway; human colorectal cancer cells SW480; cell proliferation; cell apoptosis

收稿日期: 2020-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573813); 国家自然科学基金项目 (81173598); 四川省教育厅省属高校科研创新团队建设计划项目 (18TD0017); 成都中医药大学“杏林学者”基金项目 (YXRC2019002, ZRY1917); 成都中医药大学西南特色中药资源重点实验室开放研究基金资助项目 (2020XSGG006)

作者简介: 张 梦, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。

***通信作者:** 徐海波, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xuhb@hotmail.com

随着现代生活水平的提高,结直肠癌的发病率逐年上升,其中在发达国家上升趋势尤为显著。结直肠癌常见于老年群体,但近年来逐渐趋向年轻化,在年轻人中的死亡率逐年上升^[1-2]。临床治疗结直肠癌的方法包括手术、放疗、化疗等,现代治疗多根据结直肠癌靶点、异质性和耐药性等特点采取广谱疗法。目前结直肠癌临床治疗的常用药物如贝伐单抗、卡培他滨、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂等都有较为深入的开发和应用^[3-5],尽管国内外均对结直肠癌的预防和治疗有大量的研究报道,为临床众多结直肠癌患者带来福音,但对其分子机制和治疗靶点的研究有待深入。

熊果酸是一类具有显著生物活性的五环三萜类化合物,广泛存在于多种水果、蔬菜中,同时也是中药材白花蛇舌草、冬凌草、木瓜、夏枯草等的主要活性成分^[6-9],具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗诱变等药理活性^[10-11]。目前已有大量关于熊果酸抗癌机制报道,包括结直肠癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌、皮肤癌^[12-16]等。Hedgehog 信号通路近年来被发现参与多种肿瘤的发生、发展、转移和耐药性阶段^[17],然而未见有关于熊果酸通过 Hedgehog 信号通路抑制结直肠癌的研究,因此本研究以人结直肠肿瘤 SW480 细胞为模型,检测熊果酸对细胞生长、增殖、迁移及细胞凋亡方面的影响,初步探索熊果酸通过 Hedgehog 信号通路对结直肠癌的作用效果,为临床结直肠癌的治疗提供更多的用药选择和实验数据基础。

1 材料

1.1 细胞与药物

人结直肠癌 SW480 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所;熊果酸(质量分数>98%,批号 MUST-18072310),购自成都曼斯特生物科技有限公司;Hedgehog 信号通路抑制剂 GANT-61 ($C_{27}H_{35}N_5$,质量分数>98%,批号#21798),购自美国 Med Chem Express (MCE) 公司。

1.2 试剂

DMEM 低糖细胞培养基(批号 SLBT7314),美国 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液(PBS,批号 121D039)、胰蛋白酶(批号 HJ202410)、青霉素链霉素双抗(批号 HJ202605),索莱宝科技有限公司;胎牛血清(批号 20180524),赛澳美细胞技术有限公司;抗荧光淬灭封片液(含 Hoechst33324 和碘化丙啶(propidium iodide, PI,批号 121818191028)、

线粒体膜电位检测试剂盒(批号 100918190307)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P1002)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0006)、MTT 试剂盒(批号 C0009-2)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 活性检测试剂盒(批号 071018190123)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-9) 活性检测试剂盒(批号 060618200415),碧云天科技有限公司;Hedgehog 信号通路相关抗体、音猬因子(sonic hedgehog, SHh)、GLI 家族锌指蛋白 1 (GLI family zinc finger protein 1, Gli1)、G 蛋白偶联受体蛋白(smoothened, Smo)、原癌基因蛋白(cellular-mycelocytomatosis viral oncogene, c-Myc)、苏氨酸蛋白激酶 Fused 抑制因子(suppressor of Fused, SuFu),武汉三鹰生物技术有限公司;表面受体(Patched, Ptch1),美国 Immunoway 公司。细胞凋亡相关抗体:B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2),美国 Immunoway 公司;Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax),武汉三鹰生物技术有限公司。内参抗体:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、山羊抗兔 IgG 二抗,杭州联科生物技术股份有限公司。

1.3 仪器

3001 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DMI3000B 倒置显微镜、SP8 SR 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);QUOTQTION 电泳仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Forma3111CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);AllegraX[®]-12series 离心机(美国 BECK MAN Coulter);CYT5MFV 微孔板成像系统(美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SW480 细胞用含有 10%胎牛血清和 1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基培养,放置于 37 °C、5% CO₂ 的环境中。根据细胞生长情况,2~3 d 更换新鲜培养基,待细胞生长面积达 80%~90%时,按 1:2 比例进行传代,传至第 5 代后部分用于保存,部分用于后续实验。

2.2 光学显微镜下观察细胞生长、细胞形态

取出处于对数生长期的 SW480 细胞,经胰蛋白酶消化并收集细胞后,以 1.0×10^5 个/mL 的细胞密

度, 500 μL /孔的体积接种于 24 孔细胞培养板中, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (100 μL /孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 于微孔板成像系统中观察记录细胞生长情况和细胞形态。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖

采用“2.2”项方法处理细胞, 以 1.0×10^4 个/mL 的细胞密度, 100 μL /孔的体积接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸的培养基 (100 μL /孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 更换含 5 mg/mL MTT 的培养基 (100 μL /孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 更换含 5 mg/mL MTT 的培养基 (100 μL /孔) 处理细胞, 继续培养 4 h 后, 更换 DMSO (150 μL /孔) 处理细胞结晶, 振荡 10~15 min, 待结晶物充分溶解后, 在酶标仪中测定波长 570 nm 下的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 划痕实验检测细胞迁移能力

采用“2.2”项方法处理细胞, 以 1.0×10^6 个/mL 的细胞密度, 500 μL /孔的体积接种于 24 孔细胞培养板中, 培养 12 h 待细胞高密度贴壁后, 手持移液器, 使枪尖垂直于培养板底部, 水平划线。然后对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换含 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (100 μL /孔) 处理细胞, 在加药后 0、12、24 h 时间点于显微镜下观察并记录细胞划痕的愈合情况。各组细胞不同时间点的划痕面积采用 Image J 软件统计, 以对照组 (0 h) 的划痕面积为基准, 计算相对划痕面积。

2.5 Hoechst/PI 染色法观察细胞凋亡

在细胞发生凋亡的初期阶段, 细胞膜还未破损, 但细胞核染色质开始固缩, 因此通过 Hoechst/PI 染色观察初期细胞凋亡。采用“2.2”项方法处理细胞, 以 1.0×10^5 个/mL 的细胞密度, 1 mL/孔的体积接种于激光共聚焦培养皿中, 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换含 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (1 mL/孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 吸弃培养基, PBS 清洗后

每孔加入 50 μL 含 Hoechst 33324 和 PI 的抗荧光淬灭封片液, 然后于激光共聚焦显微镜下观察记录细胞凋亡情况。

2.6 JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位

在细胞发生凋亡的早期阶段, 线粒体膜电位会发生改变, 因此通过检测线粒体膜电位的变化来考察细胞早期凋亡。采用“2.2”项方法处理细胞, 以 1.0×10^5 个/mL 的细胞密度, 500 μL /孔的体积接种 24 孔培养板于中, 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换含 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (500 μL /孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 收集细胞, 按照线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 法) 说明书染色, 在微孔板成像系统下观察线粒体膜电位的变化。

2.7 Caspase-3、Caspase-9 活性的检测

采用“2.2”项方法处理细胞, 以 1.0×10^6 个/mL 的细胞密度, 1 mL/孔的体积接种 6 孔培养板于中, 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换含 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (1 mL/孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 收集细胞, 每个样品加入 200 μL 裂解液, 收集裂解液后部分采用 Bradford 法测定蛋白浓度, 当蛋白质量浓度在 1~3 mg/mL 时, 剩余样品按照 Caspase-3、Caspase-9 活性检测试剂盒设定反应体系, 待体系颜色变化明显时在酶标仪中测定波长 405 nm 下的 A 值, 并计算酶活力单位。

2.8 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达水平

采用“2.2”项方法处理细胞, 以 5.0×10^5 个/mL 的细胞密度, 1 mL/孔的体积接种于 6 孔培养板中, 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 对照组更换含 0.1% DMSO、给药组更换含不同浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 熊果酸、阳性药组更换含 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基 (1 mL/孔) 处理细胞, 继续培养 24 h 后, 收集细胞, 每个样品加入 200 μL 预冷的增强型 RIPA 裂解液, 收集裂解液后部分采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度, 剩余部分按 4:1 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀后加热制样以备用。制备 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶, 分离蛋白样品, 湿法转膜, 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin,

BSA) 室温封闭 90 min, 按比例加入相应一抗后于 4 ℃ 孵育过夜, 次日更换二抗孵育 90 min, 使用化学发光成像系统成像, 采用 Image Lab 软件进行蛋白条带分析。

2.9 统计学处理

除特别说明外, 所有实验均进行 ≥ 3 次的生物学重复研究, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。采用 GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software, Inc) 软件进行统计学分析, 组间差异分析采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 对 SW480 细胞形态的影响

微孔板成像系统明场模式下记录的 SW480 细

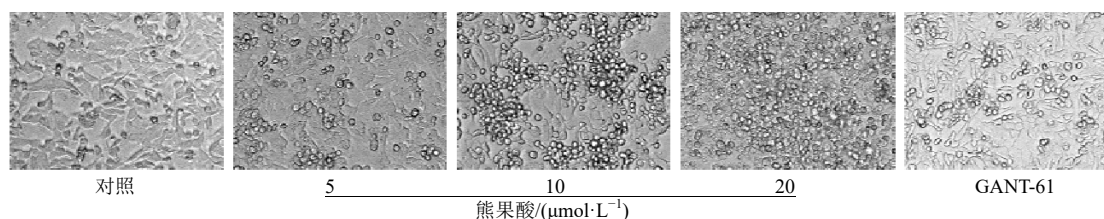


图 1 熊果酸对 SW480 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of ursolic acid on morphology of SW480 cells

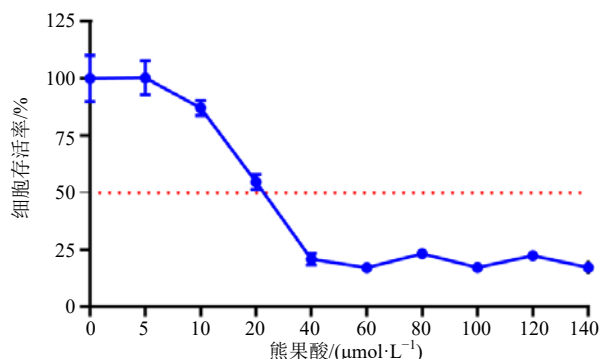


图 2 熊果酸对 SW480 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of ursolic acid on proliferation of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

定熊果酸对 SW480 细胞的干预浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.3 对 SW480 细胞迁移的影响

细胞划痕法检测熊果酸对 SW480 细胞迁移的影响, 结果见图 3, 与对照组及 0 h 相比, 熊果酸处理后 12 h 和 24 h 时间点的细胞划痕的愈合面积显著减小 ($P < 0.01, 0.001$), 说明熊果酸能够抑制 SW480 细胞的迁移能力, 且这种抑制作用随着熊果酸干预浓度的增加而增强。

3.4 对 SW480 细胞凋亡的影响

Hoechst/PI 染色法观察熊果酸诱导 SW480 细胞

胞形态见图 1, 与对照组相比, SW480 细胞经熊果酸和 Hedgehog 信号通路抑制剂 GANT-61 给药处理后, 细胞贴壁能力降低, 形态发生明显改变, 逐渐皱缩变圆, 且随着熊果酸浓度的增加, 细胞皱缩和碎片化的比例增加。

3.2 对 SW480 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测熊果酸对 SW480 细胞增殖的影响, 结果见图 2, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着熊果酸浓度增加, 细胞存活率急剧降低, 当熊果酸浓度大于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 SW480 细胞的存活率影响达到平稳阈值。通过分析得出熊果酸干预 24 h 对 SW480 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 18.16 $\mu\text{mol/L}$, 基于 IC_{50} , 后续实验设

凋亡的情况, 结果见图 4, 与对照组相比, 熊果酸干预后细胞呈现凋亡早期染色质固缩所致的致密浓染, 颜色过于饱和, 甚至有些发白, 表明熊果酸能够诱导 SW480 细胞凋亡, 这种诱导作用随着熊果酸干预浓度的增加而增强, 值得注意的是, 熊果酸高浓度 (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理诱导的细胞凋亡数量显著高于 Hedgehog 信号通路抑制剂 GANT-61 (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理组。

3.5 对 SW480 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 染色法观察熊果酸对 SW480 细胞线粒体膜电位的影响, 结果见图 5, 与对照组相比, 熊果酸干预后细胞的红色荧光减弱, 绿色荧光增强, 表明熊果酸能使 SW480 细胞的线粒体膜电位降低, 且膜电位降低程度随着熊果酸干预浓度的增加而增大。

3.6 对 SW480 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

试剂盒检测熊果酸对 SW480 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响, 结果见图 6, 与对照组相比, 熊果酸各剂量干预后细胞的 Caspase-3 活性显著升高 ($P < 0.05$), 熊果酸高剂量干预后细胞的 Caspase-9 活性显著升高 ($P < 0.05$), 表明熊果酸能够增强 SW480 细胞的 Caspase-3、Caspase-9 活性。

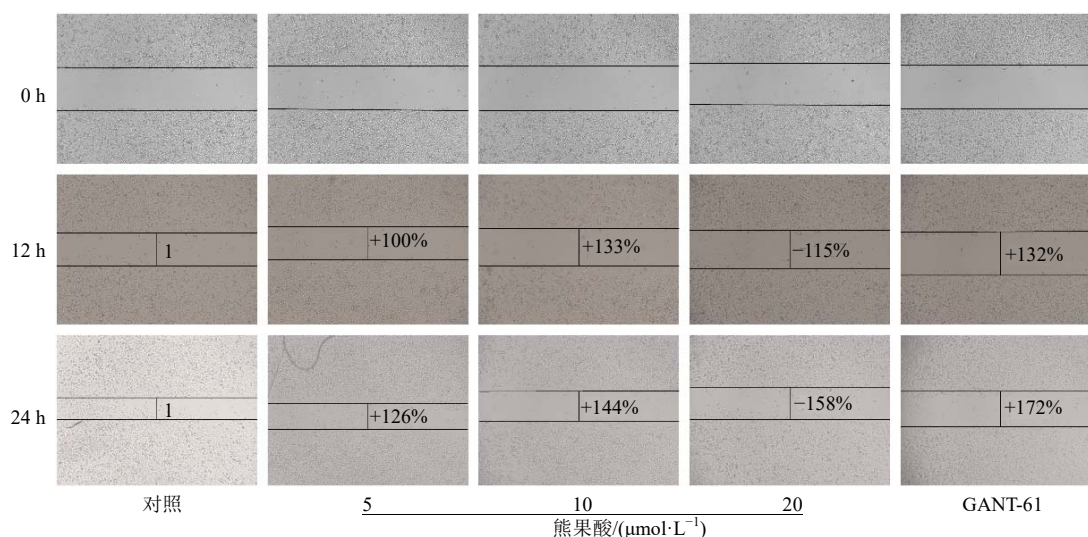


图 3 熊果酸对 SW480 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of ursolic acid on migration of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

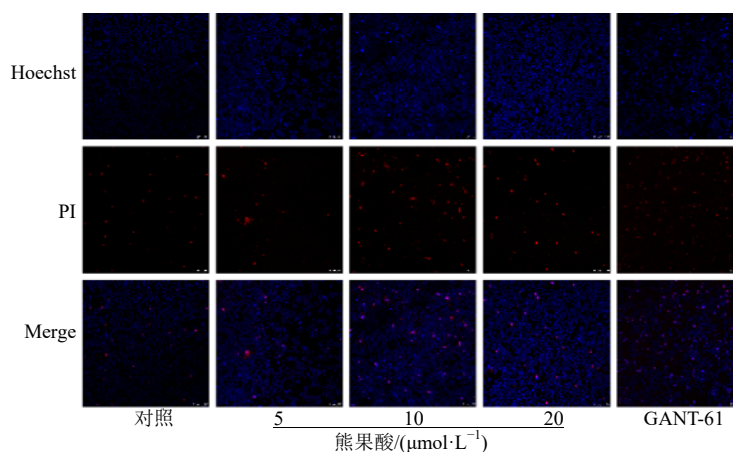


图 4 熊果酸对 SW480 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of ursolic acid on apoptosis of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

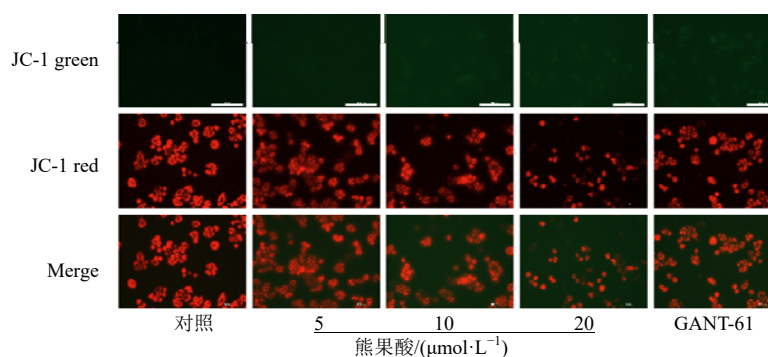
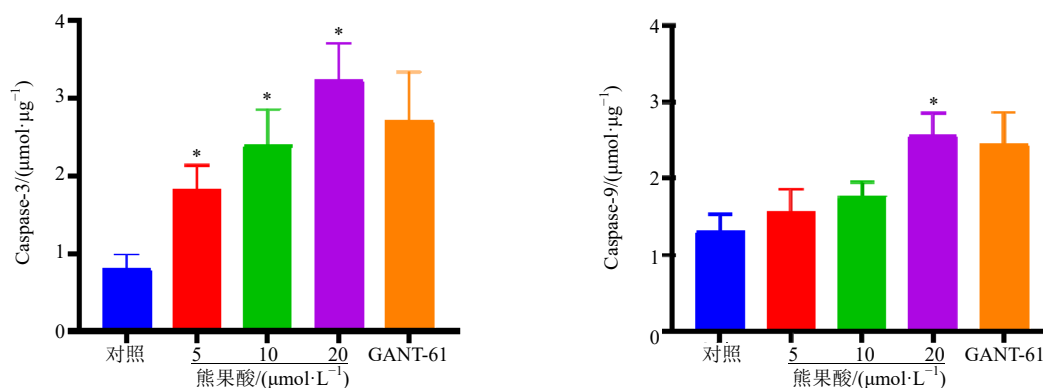


图 5 熊果酸对 SW480 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of ursolic acid on mitochondrial membrane potential of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 对 SW480 细胞凋亡相关蛋白的影响

蛋白免疫印迹法检测熊果酸对 SW480 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响, 结果见图

7, 与对照组相比, 熊果酸 (20 $\mu\text{mol/L}$) 能显著升高 SW480 细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达量 ($P < 0.05$), 熊果酸各剂量均能显著降低抗凋亡蛋白



与对照组比较: * $P < 0.05$, 图 7 同

* $P < 0.05$ vs control group, same as fig. 7

图 6 熊果酸对 SW480 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of ursolic acid on Caspase-3 and Caspase-9 activity of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

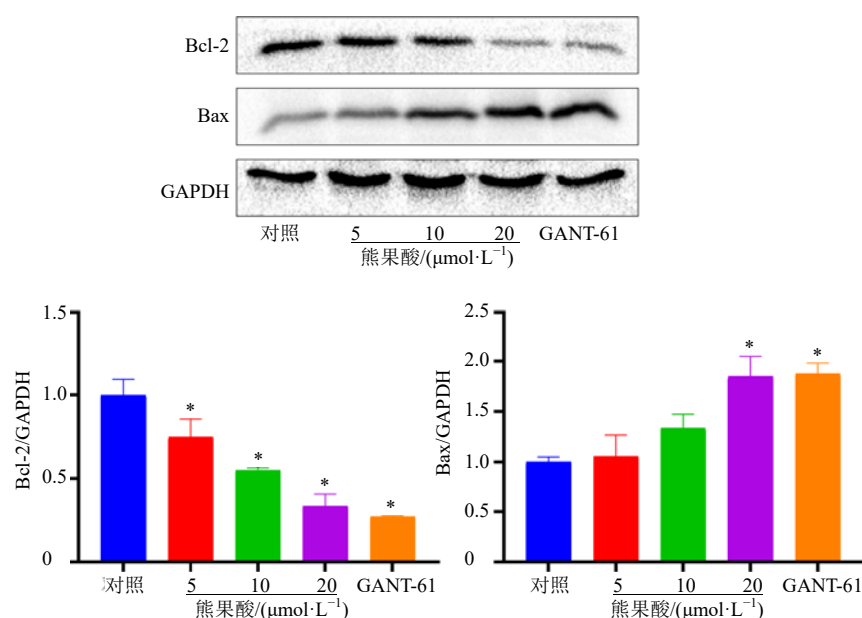


图 7 熊果酸对 SW480 细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of ursolic acid on apoptosis related proteins of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

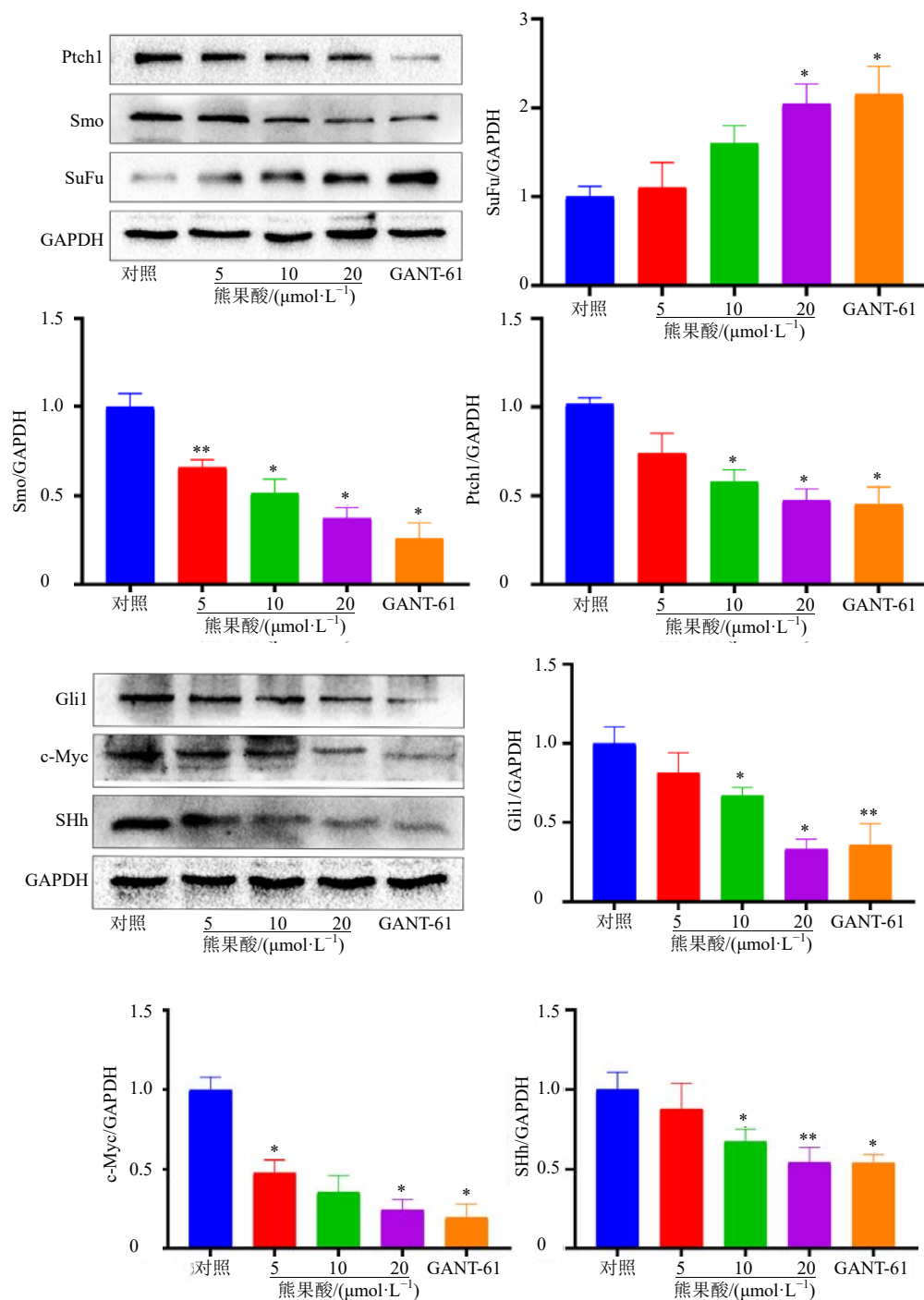
Bcl-2 表达量 ($P < 0.05$), 表明熊果酸能够综合调控凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 水平, 促进 SW480 细胞发生凋亡。

3.8 对 SW480 细胞 Hedgehog 信号通路相关蛋白的影响

蛋白免疫印迹法检测熊果酸对 SW480 细胞 Hedgehog 信号通路蛋白 SHh、Gli1、Ptch1、Smo、c-Myc、SuFu 表达的影响, 结果见图 8, 与对照组相比, 熊果酸能显著降低 SHh、Gli1、Ptch1、Smo、c-Myc 蛋白的表达量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高 SuFu 蛋白的表达量 ($P < 0.05$), 表明熊果酸能够抑制 Hedgehog 信号通路的激活。

4 讨论

作为世界 3 大癌症之一的结直肠癌, 近年来随着饮食的精细化、高热量化和生活方式的久坐化、少运动化, 结直肠癌的发病率和死亡率居高不下^[18]。20 世纪 80 年代, 细胞凋亡开始作为癌症治疗的可行策略进入人们的视线, 此后的 30 多年, 人们一直致力于探索细胞凋亡在癌症治疗中的应用, 促进肿瘤细胞凋亡不仅能保护正常细胞, 死亡的肿瘤细胞还能促进临床反应, 减少肿瘤复发的几率, 未来靶向细胞凋亡作为癌症治疗的手段仍旧意义重大^[19]。Hedgehog 信号通路是癌症发生发展的重要信号通路 SHh 与 Ptch1 结合, Ptch1 对 Smo 的抑制解除, Smo



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 8 熊果酸对 SW480 细胞 Hedgehog 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of ursolic acid on Hedgehog pathway related proteins of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

被激活释放, Smo 激活是将 SHh 信号跨膜传递至细胞质的关键步骤, Smo 激活后, SuFu 与 Gli1 蛋白分离, Gli1 释放出来, 开始转录靶基因^[20], 导致引起细胞分裂和修复受损 DNA 的原癌基因 *c-Myc* 表达水平上调^[21], 此外 SHh 过表达和 Gli1 转录都能激

活 Bcl-2 启动子, 导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平上调^[22-23]。熊果酸是中药白花蛇舌草的主要活性成分, 《广西中药志》中记载白花蛇舌草: “治小儿疳积, 毒蛇咬伤, 癌肿 (肿瘤)”。此外熊果酸在抗肿瘤方面药效显著, 对肠道、肺、肝、肾都具有良好的保

护作用^[24]。基于 Hedgehog 信号通路参与了肿瘤细胞的凋亡逃逸,因此,本实验将 Hedgehog 信号通路作为靶点,探索熊果酸通过 Hedgehog 信号通路抑制结直肠癌 SW480 细胞增殖的机制。

本实验结果证明熊果酸对结直肠癌 SW480 细胞具有良好的细胞毒作用,在一定剂量范围内对细胞形态的影响显著,明显抑制细胞的生长、迁移,诱导细胞凋亡,其机制可能是通过抑制 Hedgehog 信号通路的激活,使得 Hedgehog 信号通路中的关键因子 SHh、Gli1 和协助细胞规避凋亡的原癌基因 c-Myc 被抑制,凋亡蛋白家族 Bcl-2 表达下调,与仅含 BH3 区域蛋白(BH3-only proteins, BOPs)的结合减少,线粒体外膜开始产生孔隙,逐渐通透化,膜电位下降;Bax 表达上调,转位到线粒体内部,释放细胞色素 C,形成凋亡复合体,凋亡复合体的形成激活 Caspase 家族中的 Caspase-9、Caspase-3 等凋亡执行者,从线粒体途径诱发细胞凋亡,进而抑制 SW480 细胞的增殖。此外,本实验发现熊果酸诱导细胞凋亡的作用优于 GANT-61,说明在熊果酸诱导 SW480 细胞凋亡的过程中,除 Hedgehog 信号通路参与外,其他通路也发挥了作用。因此,熊果酸通过综合调控包括 Hedgehog 信号通路在内的多种信号通路调控结直肠癌 SW480 细胞的形态、生长、增殖、迁移,诱导其发生线粒体途径的凋亡,对临床上靶向癌细胞凋亡疗法和信号通路阻滞疗法具有重大意义。本实验结果为进一步研究 Hedgehog 信号通路靶点在结直肠癌治疗中的应用提供了有效参考,为熊果酸在癌症预防和治疗方面的应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-164.
- [2] O'Connell J B, Maggard M A, Livingston E H, et al. Colorectal cancer in the young [J]. *Am J Surg*, 2004, 187(3): 343-348.
- [3] Gu G, Barone I, Gelsomino L, et al. *Oldenlandia diffusa* extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ERα/Sp1-mediated p53 activation [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(10): 3363-3372.
- [4] Kumar R, Harilal S, Carradori S, et al. A comprehensive overview of colon cancer- A grim reaper of the 21st century [J]. *Curr Med Chem*, 2020, doi: 10.2174/0929867327666201026143757.
- [5] Block K I, Gyllenhaal C, Lowe L, et al. Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35(Suppl): S276-S304.
- [6] PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version [EB/OL]. [2020-07-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65858/>.
- [7] Yang Y C, Wang C S, Wei M C. A green approach for the extraction and characterization of oridonin and ursolic and oleanolic acids from *Rabdosia rubescens* and its kinetic behavior [J]. *Food Chem*, 2020, 319: 126582.
- [8] Miao J, Li X, Zhao C C, et al. Active compounds, antioxidant activity and α-glucosidase inhibitory activity of different varieties of *Chaenomeles* fruits [J]. *Food Chem*, 2018, 248: 330-339.
- [9] Lee M K, Ahn Y M, Lee K R, et al. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica*: Determination of triterpenic acids [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 633(2): 271-277.
- [10] Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic acid: A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 20614-20641.
- [11] Zielińska S, Matkowski A. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae) [J]. *Phytochem Rev*, 2014, 13: 391-416.
- [12] Prasad S, Yadav V R, Sung B, et al. Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: Chemosensitization with capecitabine [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 4942-4953.
- [13] Yin R, Li T, Tian J X, et al. Ursolic acid, a potential anticancer compound for breast cancer therapy [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(4): 568-574.
- [14] Lin Y J, Liang W M, Chen C J, et al. Network analysis and mechanisms of action of Chinese herb-related natural compounds in lung cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152893.
- [15] Guo J L, Han T, Bao L, et al. Ursolic acid promotes the apoptosis of cervical cancer cells by regulating endoplasmic Reticulum stress [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2019, 45(4): 877-881.
- [16] Tremmel L, Rho O, Slaga T J, et al. Inhibition of skin tumor promotion by TPA using a combination of topically

- applied ursolic acid and curcumin [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(2): 185-195.
- [17] Doheny D, Manore S G, Wong G L, et al. Hedgehog signaling and truncated GLI1 in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(9): E2114.
- [18] Mehta R S, Nishihara R, Cao Y, et al. Association of dietary patterns with risk of colorectal cancer subtypes classified by *Fusobacterium nucleatum* in tumor tissue [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(7): 921-927.
- [19] Carneiro B A, El-Deiry W S. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417.
- [20] Drenkhahn S K, Jackson G A, Slusarz A, et al. Inhibition of hedgehog/Gli signaling by botanicals: A review of compounds with potential hedgehog pathway inhibitory activities [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(5): 580-595.
- [21] Palle K, Mani C, Tripathi K, et al. Aberrant GLI1 activation in DNA damage response, carcinogenesis and chemoresistance [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(4): 2330-2351.
- [22] Chen X L, Cheng Q Y, She M R, et al. Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cyclopamine-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation *in vitro* [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(5): 315-323.
- [23] Bigelow R L, Chari N S, Uden A B, et al. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1197-1205.
- [24] Sun Q, He M, Zhang M, et al. Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model [J]. *Fitoterapia*, 2020, 147: 104735.

[责任编辑 潘明佳]