

瓜蒂醇提物通过调控Wnt/ β -catenin信号通路 对肝癌细胞Hep3B恶性生物学行为的影响

任刚* 李福昌 程德刚

(成都市简阳市中医医院普外科, 成都 641400)

摘要 该文探讨了瓜蒂醇提物对肝癌细胞Hep3B增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其分子机制。肝癌细胞Hep3B被分为NC组、不同浓度瓜蒂醇提物(1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)组、LiCl组、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瓜蒂醇提物+LiCl组。采用CCK-8法检测细胞活性; 克隆形成实验检测Hep3B细胞克隆形成数量; 流式细胞术检测Hep3B细胞的凋亡情况; 蛋白质印迹法检测蛋白表达情况; Transwell检测Hep3B细胞的迁移和侵袭数。不同浓度瓜蒂醇提物处理Hep3B细胞后, Hep3B细胞的活性降低, 克隆数量以及迁移侵袭数减少, Hep3B细胞的凋亡率升高, Cleaved-caspase-3表达水平升高, pro-caspase-3、MMP2、MMP9表达水平降低, Wnt3a、cyclinD1、c-myc、核 β -catenin蛋白表达水平降低, APC和质 β -catenin蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl可以逆转瓜蒂醇提物对Hep3B细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。瓜蒂醇提物通过调控Wnt/ β -catenin信号通路抑制Hep3B细胞增殖、迁移、侵袭, 并促进细胞凋亡。

关键词 瓜蒂醇提物; Wnt/ β -catenin信号通路; 肝癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

The Effect of *Cucumis melo* L. Ethanol Extract on the Malignant Biological Behavior of Hepatocarcinoma Cell Hep3B by Regulating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway

REN Gang*, LI Fuchang, CHENG Degang

(Department of General Surgery, Jianyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 641400, China)

Abstract This article was to explore the effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of hepatocarcinoma cell Hep3B and its molecular mechanism. Hep3B liver cancer cells were divided into NC group, different concentrations of *Cucumis melo* L. ethanol extract (1.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/mL}$) group, LiCl group, 20.0 $\mu\text{g/mL}$ *Cucumis melo* L. ethanol extract + LiCl group. CCK-8 method was used to detect cell viability; clone formation experiment was used to detect the number of Hep3B cell clone formation; flow cytometry was used to detect Hep3B cell apoptosis; Western blot was used to detect protein expression; Transwell was used to detect Hep3B cell migration and invasion number. After treating Hep3B cells with different concentrations of *Cucumis melo* L. ethanol extract, Hep3B cell activity was decreased, the number of clones and the number of migration and invasion were decreased, the Hep3B cell apoptosis rate was increased, the expression level of Cleaved-caspase-3 was increased, pro-caspase-3, MMP2 and MMP9 expression levels were decreased,

收稿日期: 2022-08-25

接受日期: 2022-10-25

四川省中医药信息学会关于舒适化医疗(新晨基金)专项科研课题(批准号: 20200119)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13982911659, E-mail: rekcql@163.com

Received: August 25, 2022

Accepted: October 25, 2022

This work was supported by the Sichuan Information Society of Traditional Chinese Medicine on Comfortable Medical (Xinchen Fund) Special Research Project (Grant No.20200119)

*Corresponding author. Tel: +86-13982911659, E-mail: rekcql@163.com

and the protein expression levels of Wnt3a, cyclinD1, c-myc and nuclear β -catenin decreased, while the protein expression levels of APC and plasma β -catenin increased ($P<0.05$). Wnt/ β -catenin signaling pathway activator LiCl can reverse the effects of *Cucumis melo* L. ethanol extract on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of Hep3B cells. *Cucumis melo* L. ethanol extract inhibits the proliferation, migration and invasion of Hep3B cells and promotes cell apoptosis by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords *Cucumis melo* L. ethanol extract; Wnt/ β -catenin signaling pathway; liver cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展是多因素复杂调节的结果, 多种细胞信号转导通路与其进展密切相关, 研究表明中医药可通过干预相关信号通路的转导发挥防治肝癌的作用^[1-2]。Wnt/ β -catenin是众多信号通路的一种, Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活会促进肝癌的发生发展^[3]。研究报道黄芪多糖通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路促进HepG2细胞凋亡^[4]。蟾蜍灵通过Wnt/ β -catenin信号通路调控肝癌细胞侵袭和转移^[5]。瓜蒂, 又叫苦丁香、甜瓜蒂、香瓜蒂, 为葫芦科黄瓜属植物甜瓜的干燥果梗, 广泛分布在全国各地。相关文献显示, 瓜蒂在催吐和治疗食物中毒、湿热黄疸、鼻塞等方面具有良好的效果^[6]。甜瓜蒂的提取物具有抗肿瘤作用, 葫芦素是其主要化学成分之一^[7]。研究报道瓜蒂水提物和醇提物可抑制食管癌TE-1、EC-1细胞增殖、迁移、克隆形成的能力, 促进细胞凋亡^[8]。然而瓜蒂醇提物对肝癌细胞的影响及其机制尚不清楚。因此, 本实验旨在研究瓜蒂醇提物对肝癌细胞的影响及其机制是否与Wnt/ β -catenin信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

肝癌细胞Hep3B及人正常肝细胞系LO-2购自美国ATCC; RPMI-1640培养基(货号SH30809.01)购自美国Hyclone公司; 瓜蒂醇提物(20201025)购自西安天瑞生物技术有限公司; Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl(货号BYGL-GC12077)购自南京北鱼生物科技有限公司; CCK-8试剂盒(货号FY600001-1ML)购自上海弗元生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(货号A005-1)购自北京百奥莱博科技有限公司; Cleaved-caspase-3(货号ab2302)、pro-caspase-3(货号ab32150)、MMP2(货号ab92536)、MMP9(货号ab283575)、Wnt3a(货号ab219412)、cyclinD1(货号ab16663)、c-myc(货号ab32072)、

APC(货号ab40778)、 β -catenin(货号ab32572)、Lamin B1(货号ab16048)和 β -actin(货号ab8226)抗体购自中国Abcam公司; 山羊抗兔IgG-HRP(货号2040-05)购自艾美捷科技有限公司。371型CO₂培养箱购自美国ThermoForma公司; Fax-2100酶标仪购自美国Awareness公司; SG0-2003型显微镜购自南京新睿之鸿光学仪器有限公司; FACSCalibur分析型流式细胞仪购自美国BD公司; 1658033型电泳仪购自美国Bio-Rad公司; WD-9413C型凝胶成像分析系统购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 细胞处理与分组

根据参考文献[8]和前期预实验结果, 分别用1.0、5.0、10.0、20.0 μ g/mL瓜蒂醇提物处理Hep3B细胞, 作为不同浓度瓜蒂醇提物组; 正常培养的细胞作为NC组; 用5 μ mol/L Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl和20.0 μ g/mL瓜蒂醇提物处理Hep3B细胞, 作为20.0 μ g/mL瓜蒂醇提物+LiCl组。

1.3 CCK-8检测细胞活性

将Hep3B细胞接种至96孔板中(2.5×10^4 个/孔), 按照上述1.2进行分组处理, 并将人正常肝细胞系LO-2分别用1.0、5.0、10.0、20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物处理, 48 h后, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h。将96孔板置于酶标仪卡槽中, 检测450 nm波长处的吸光度(D)值。 D 值越大, 说明细胞增殖活性越强。

1.4 克隆形成实验检测细胞克隆形成数量

将Hep3B细胞接种至6孔板中(5.0×10^4 个/孔), 按照上述1.2进行分组处理, 每2天更换一次培养液。各组细胞处理2周后, 弃培养基, 将细胞经甲醇常温固定、吉姆萨染色后, 于光学显微镜(10 $\times$)下计数大于50个细胞的集落。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将Hep3B细胞接种至6孔板中(1.0×10^5 个/孔), 按照上述1.2进行分组处理。各组细胞处理48 h后, 弃

培养液,收集各组细胞。用PBS漂洗各组细胞后,加500 μL 结合缓冲液,重悬细胞。加10 μL Annexin V-FITC,室温避光孵育10 min。再加5 μL PI,冰浴避光孵育5 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达

将Hep3B细胞接种至6孔板中(1.0×10^5 个/孔),按照上述1.2进行分组处理。各组细胞处理48 h后,弃培养液,收集各组细胞。利用RIPA试剂提取细胞总蛋白,并使用核蛋白和质蛋白提取试剂盒分离各组Hep3B细胞核蛋白和质蛋白,对蛋白浓度进行检测(BCA法)后,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min,使蛋白变性。利用SDS-PAGE实验分离总蛋白,并转至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。分别用稀释后的Cleaved-caspase-3(1:1 000)、pro-caspase-3(1:1 000)、MMP2(1:500)、MMP9(1:500)、Wnt3a(1:1 000)、cyclinD1(1:1 000)、c-myc(1:1 000)、APC(1:1 000)、 β -catenin(1:1 000)、Lamin B1(核内参,1:1 000)和 β -actin(内参,1:1 000)一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜后洗膜,再用上羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育2 h。加显影液显影,曝光拍照,ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

1.7 Transwell检测细胞迁移和侵袭

迁移实验步骤如下。于Transwell上室接种Hep3B细胞,下室加500 μL 完全培养基。将上室细胞按照上述1.2进行分组处理。各组细胞处理48 h后,弃培养液,取出小室。将下室细胞在室温下用甲醇固定、结晶紫染色后,置于显微镜下(200 $\times$)观察,统计迁移细胞数。侵袭实验步骤:预先用基质胶包被Transwell上室,自然干燥后,接种细胞,后续操作同迁移实验。

1.8 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较行 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞增殖的影响

与NC组比较,不同浓度(1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)瓜蒂醇提取物组LO-2细胞活性略有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$,表1),说明瓜蒂醇提取物对人正常肝细胞生长有一定的保护作用;Hep3B细胞活性降低,细胞克隆数量减少($P < 0.05$),且不同浓度瓜蒂醇提

物组间细胞活性和克隆数比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图1和表1)。

2.2 瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞凋亡的影响

与NC组比较,不同浓度(1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)瓜蒂醇提取物组Hep3B细胞凋亡率升高,Cleaved-caspase-3蛋白表达水平升高,pro-caspase-3蛋白表达水平下降($P < 0.05$),且不同浓度瓜蒂醇提取物组间细胞凋亡率和Cleaved-caspase-3、pro-caspase-3蛋白表达比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图2、图3和表2)。

2.3 瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞迁移和侵袭的影响

与NC组比较,不同浓度(1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)瓜蒂醇提取物组Hep3B细胞迁移和侵袭数量减少,MMP2、MMP9蛋白表达水平降低($P < 0.05$),且不同浓度瓜蒂醇提取物组间细胞迁移和侵袭数量、MMP2、MMP9蛋白表达比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图4、图5和表3)。

2.4 瓜蒂醇提取物对Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达的影响

与NC组比较,不同浓度(1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)瓜蒂醇提取物组Hep3B细胞中Wnt3a、cyclinD1、c-myc、核 β -catenin蛋白表达水平降低,APC和质 β -catenin蛋白表达水平升高($P < 0.05$),且不同浓度瓜蒂醇提取物组间各蛋白比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图6和表4)。

2.5 LiCl可以逆转瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞增殖、迁移侵袭和凋亡的影响

与NC组相比,20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瓜蒂醇提取物组细胞活性降低,细胞克隆数量、迁移和侵袭数量减少,MMP2、MMP9表达水平下降,Cleaved-caspase-3表达水平和细胞凋亡率升高,pro-caspase-3表达水平降低,Wnt3a、cyclinD1、c-myc、核 β -catenin蛋白表达水平降低,APC和质 β -catenin蛋白表达水平升高($P < 0.05$);LiCl组细胞活性升高,细胞克隆数量、迁移和侵袭数量增多,MMP2、MMP9表达水平增高,Cleaved-caspase-3表达水平和细胞凋亡率下降,pro-caspase-3表达水平升高,Wnt3a、cyclinD1、c-myc、核 β -catenin蛋白表达水平升高,APC和质 β -catenin蛋白表达水平下降($P < 0.05$)。与20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瓜蒂醇提取物组相比,20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瓜蒂醇提取物+LiCl组细胞活性升高,细胞克隆数量、迁移和侵袭数量增加,MMP2、MMP9表达水平升高,Cleaved-caspase-3表达水平和细胞凋亡率降低,Wnt3a、cyclinD1、c-myc、

表1 不同浓度瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞增殖的影响

分组 Group	D值 D value		细胞克隆数量 Number of cell clones
	LO-S	Hep3B	
NC group	1.54±0.23	1.21±0.10	125.00±10.03
1.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	1.55±0.21	1.04±0.07*	101.00±8.12*
5.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	1.63±0.22	0.84±0.04* [#]	76.00±5.01* [#]
10.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	1.74±0.24	0.52±0.05* ^{#&}	57.00±3.46* ^{#&}
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	1.89±0.26 [#]	0.42±0.04* ^{#&\$}	41.00±2.19* ^{#&\$}
F	3.584	245.709	244.646
P	0.014	<0.001	<0.001

* P <0.05, 与NC组比较; [#] P <0.05, 与1.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较; [&] P <0.05, 与5.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较; ^{\$} P <0.05, 与10.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较。
* P <0.05 compared with NC group; [#] P <0.05 compared with 1.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; [&] P <0.05 compared with 5.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; ^{\$} P <0.05 compared with 10.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

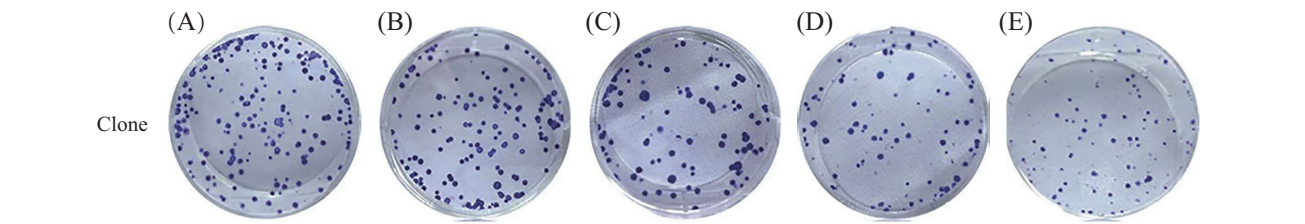


图1 细胞克隆形成检测
A: NC组; B: 1.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; C: 5.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; D: 10.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; E: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组。
A: NC group; B: 1.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: 5.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; D: 10.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; E: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

图1 细胞克隆形成检测
Fig.1 Detection of cell clone formation

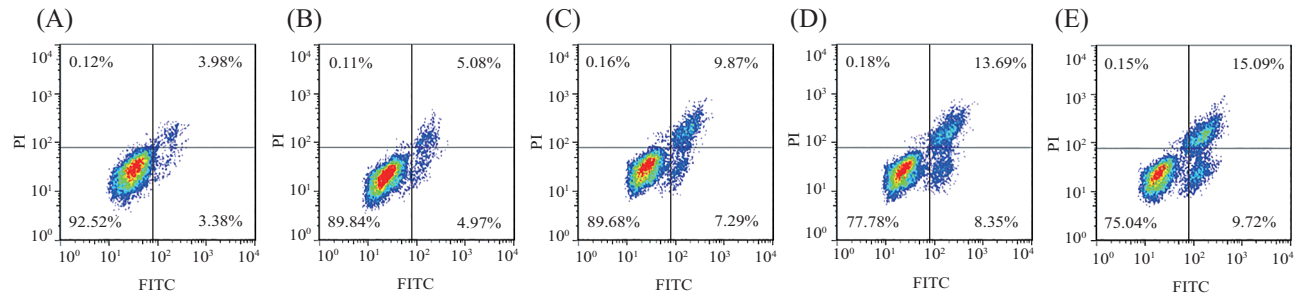


图2 瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞凋亡的影响
A: NC组; B: 1.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; C: 5.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; D: 10.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; E: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组。
A: NC group; B: 1.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: 5.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; D: 10.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; E: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

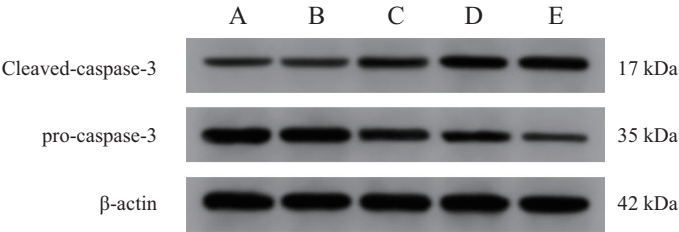
图2 瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞凋亡的影响
Fig.2 The effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on Hep3B cell apoptosis

核 β -catenin蛋白表达水平升高, APC和质 β -catenin蛋白表达水平下降(P <0.05)(图7、图8、表5和表6)。

3 讨论

肝癌是世界上发病率和死亡率最高的癌症之

一, 其患病率呈逐年增长趋势, 已成为严重威胁我国居民身体健康和安全的重要疾病, 而中药提取物在抗肝癌中具有一定的优势, 可抑制肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并影响肝癌细胞信号转导通路等^[9-10]。因此, 开发新的可用于抗肝癌的中药, 并探讨其可能的



A: NC组; B: 1.0 μg/mL 瓜蒂醇提取物组; C: 5.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组; D: 10.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组; E: 20.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组。
A: NC group; B: 1.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: 5.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; D: 10.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; E: 20.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

图3 瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞Cleaved-caspase-3、pro-caspase-3蛋白表达的影响

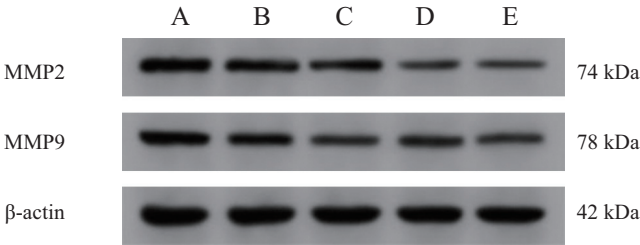
Fig.3 The effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on protein expression of Cleaved caspase-3 and pro-caspase-3 in Hep3B cells

表2 不同浓度瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞凋亡的影响

Table 2 The effect of different concentrations of *Cucumis melo* L. ethanol extract on Hep3B cell apoptosis

分类 Group	Cleaved-caspase-3	pro-caspase-3	凋亡率/% Apoptotic rate /%
NC group	0.32±0.02	0.96±0.09	7.36±0.64
1.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.45±0.04*	0.84±0.06	10.05±0.81*
5.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.57±0.06* [#]	0.73±0.08	17.16±1.34* [#]
10.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.71±0.07* ^{#&}	0.61±0.05	22.04±1.81* ^{#&}
20.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.83±0.08* ^{#&S}	0.48±0.03	24.81±2.14* ^{#&S}
F	109.118	74.156	236.287
P	<0.001	<0.001	<0.001

*P<0.05, 与NC组比较; [#]P<0.05, 与1.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组比较; [&]P<0.05, 与5.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组比较; ^SP<0.05, 与10.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组比较。
*P<0.05 compared with NC group; [#]P<0.05 compared with 1.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; [&]P<0.05 compared with 5.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; ^SP<0.05 compared with 10.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.



A: NC组; B: 1.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组; C: 5.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组; D: 10.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组; E: 20.0 μg/mL瓜蒂醇提取物组。
A: NC group; B: 1.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: 5.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; D: 10.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; E: 20.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

图4 Western blot检测MMP2、MMP9蛋白的表达

Fig.4 Western blot detects the expression of MMP2 and MMP9 protein

作用机制, 对寻找针对性的治疗肝癌的药物具有十分重要的意义。葫芦素作为瓜蒂提取物的主要化学成分, 具有显著的抗肿瘤作用, 研究报道葫芦素I可通过调控STAT3通路抑制肝癌细胞的生长^[11]。葫芦素B和阿霉素联合抗肝癌H22细胞增殖^[12]。此外, 葫芦素E通过抑制 TFAP4/Wnt/β-catenin信号转导而使

结肠癌细胞对化学疗法敏感^[13]。葫芦素B抑制JAK2/STAT3信号拮抗非小细胞肺癌H1975细胞增殖^[14]。而瓜蒂醇提取物的抗肝癌作用尚未清楚。本实验用不同浓度瓜蒂醇提取物处理肝癌细胞Hep3B和人正常肝细胞LO-2, 结果显示, 瓜蒂醇提取物对LO-2细胞有一定的保护作用, 但是瓜蒂醇提取物可降低Hep3B细

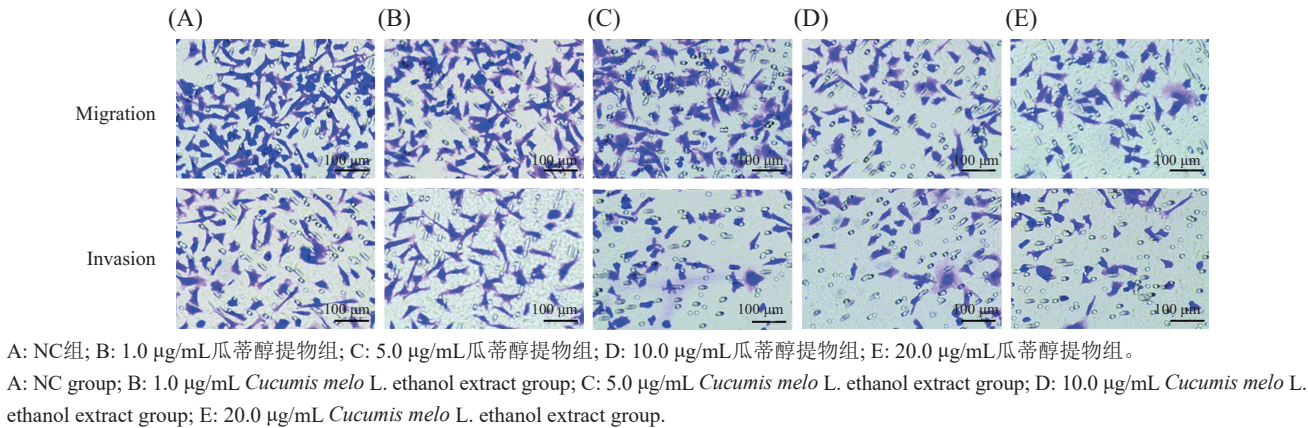


图5 瓜蒌醇提取物对Hep3B细胞迁移和侵袭的影响

Fig.5 The effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on Hep3B cell migration and invasion

表3 瓜蒌醇提取物对Hep3B细胞迁移和侵袭的影响

Table 3 The effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on Hep3B cell migration and invasion

分组 Group	MMP2	MMP9	细胞迁移数量 Number of migrating cells	细胞侵袭数量 Number of invading cells
NC group	0.83±0.08	0.77±0.07	237.00±15.13	157.00±12.11
1.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.71±0.04*	0.67±0.05*	201.00±6.73*	131.00±5.17*
5.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.60±0.05* [#]	0.49±0.03* [#]	172.00±15.14* [#]	112.00±7.16* [#]
10.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.47±0.03* ^{#&}	0.41±0.03* ^{#&}	134.00±11.03* ^{#&}	86.00±6.03* ^{#&}
20.0 μg/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.35±0.02* ^{#&S}	0.31±0.02* ^{#&S}	105.00±8.17* ^{#&S}	73.00±5.49* ^{#&S}
<i>F</i>	137.364	165.938	178.461	177.080
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与NC组比较; [#] $P<0.05$, 与1.0 μg/mL瓜蒌醇提取物组比较; [&] $P<0.05$, 与5.0 μg/mL瓜蒌醇提取物组比较; ^S $P<0.05$, 与10.0 μg/mL瓜蒌醇提取物组比较。
* $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with 1.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; [&] $P<0.05$ compared with 5.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; ^S $P<0.05$ compared with 10.0 μg/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

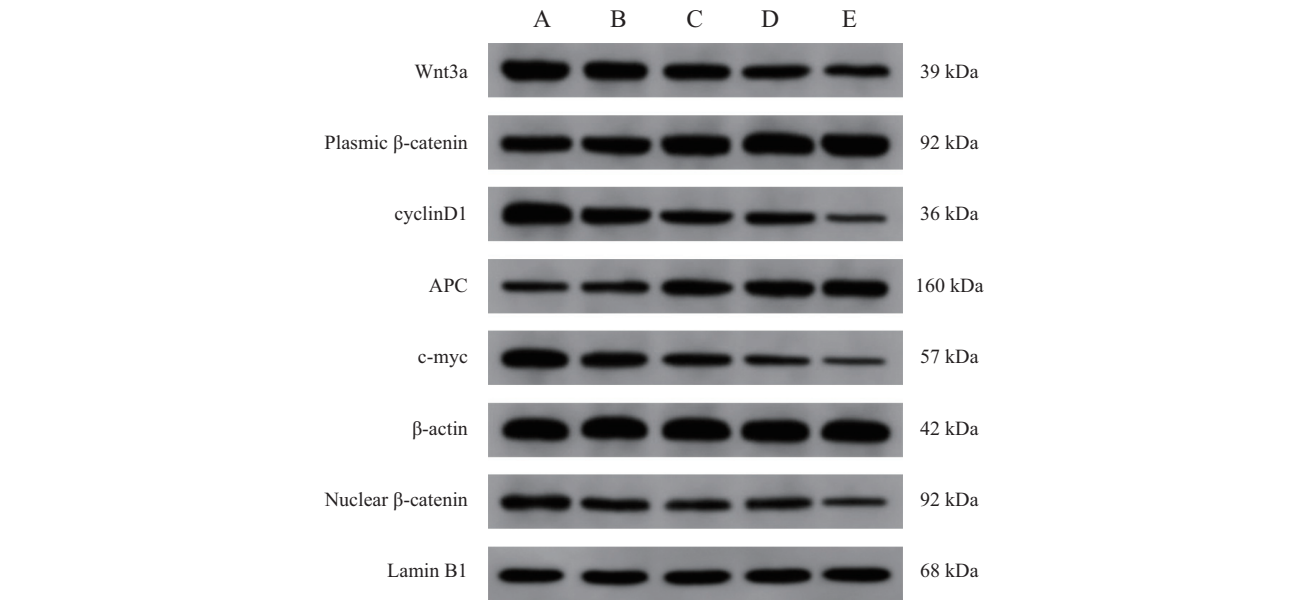


图6 Western blot检测Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达

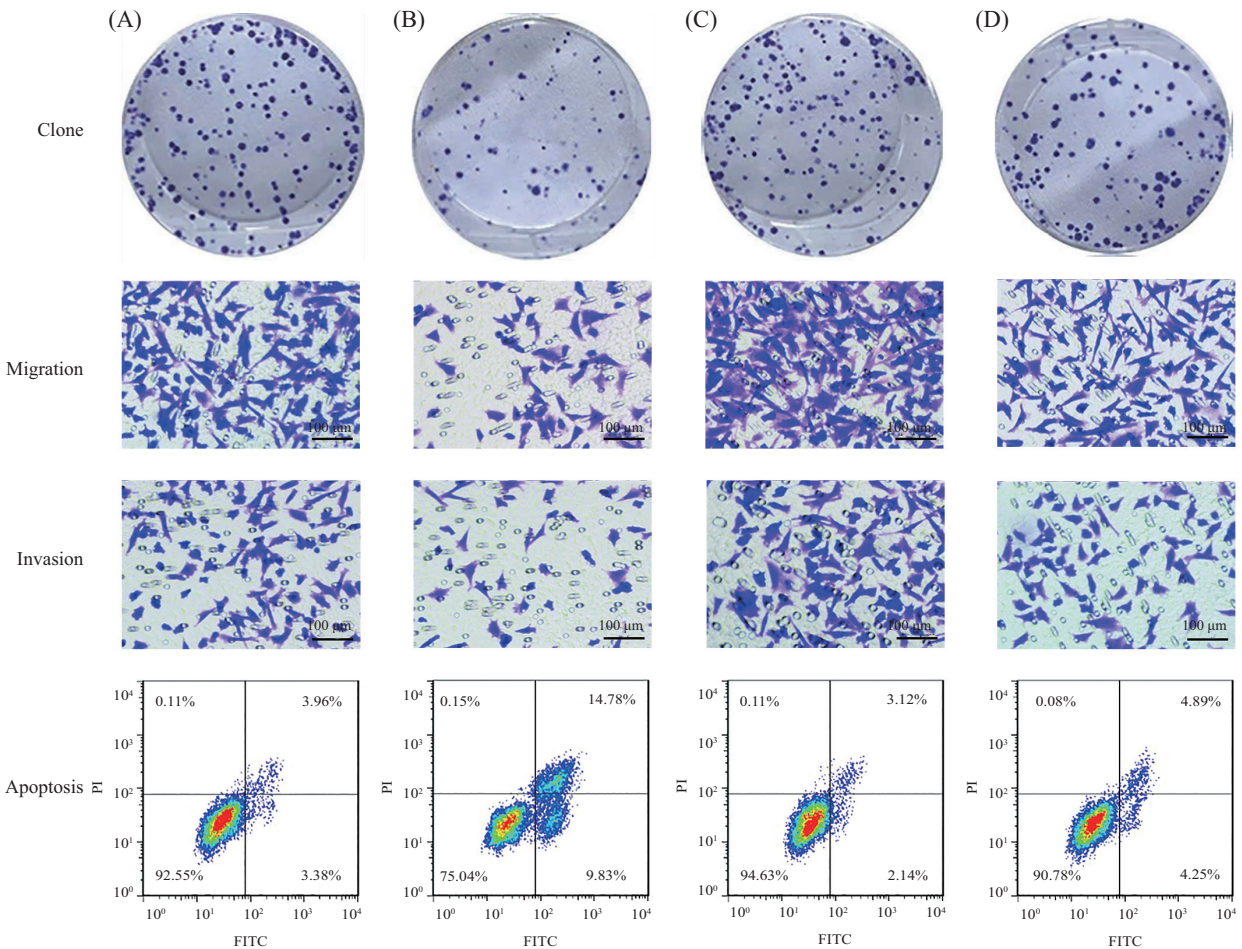
Fig.6 The expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins was detected by Western blot

表4 瓜蒂醇提取物对Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达的影响

Table 4 The effect of *Cucumis melo* L. ethanol extract on the expression of related proteins in the Wnt/ β -catenin signaling pathway

分组 Group	Wnt3a	核 β -catenin Nuclear β -catenin	质 β -catenin Plasmic β -catenin	cyclinD1	APC	c-myc
NC group	0.98 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.07	1.18 $\pm$ 0.12	0.36 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.09
1.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.74 $\pm$ 0.06*	0.63 $\pm$ 0.05*	0.92 $\pm$ 0.05*	0.77 $\pm$ 0.08*	0.49 $\pm$ 0.05*	0.61 $\pm$ 0.06*
5.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.62 $\pm$ 0.05* [#]	0.51 $\pm$ 0.04* [#]	1.11 $\pm$ 0.09* [#]	0.65 $\pm$ 0.06* [#]	0.61 $\pm$ 0.06* [#]	0.47 $\pm$ 0.05* [#]
10.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.49 $\pm$ 0.04* ^{#&}	0.40 $\pm$ 0.03* ^{#&}	1.24 $\pm$ 0.11* ^{#&}	0.53 $\pm$ 0.05* ^{#&}	0.73 $\pm$ 0.05* ^{#&}	0.36 $\pm$ 0.03* ^{#&}
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.35 $\pm$ 0.03* ^{#&S}	0.31 $\pm$ 0.02* ^{#&S}	1.38 $\pm$ 0.13* ^{#&S}	0.39 $\pm$ 0.04* ^{#&S}	0.84 $\pm$ 0.08* ^{#&S}	0.25 $\pm$ 0.02* ^{#&S}
F	156.638	145.398	58.631	143.179	101.972	157.703
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

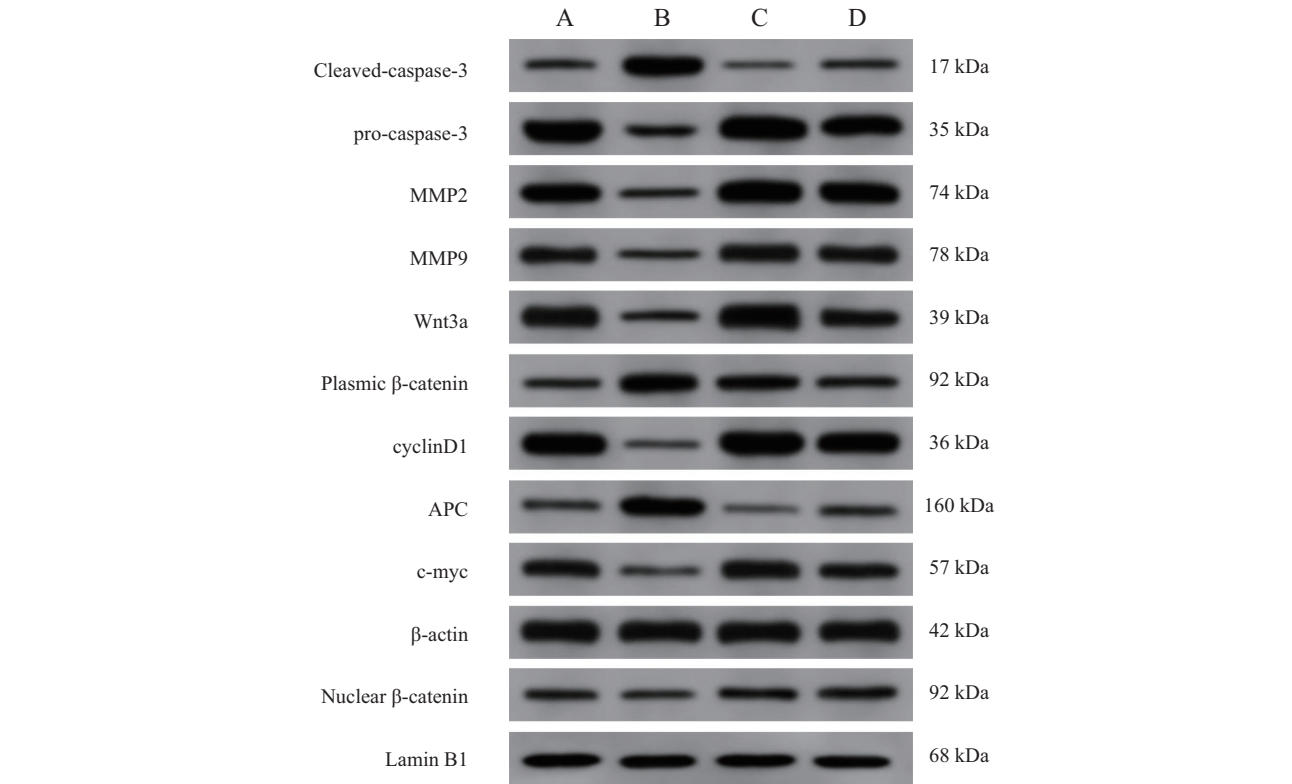
* P <0.05, 与NC组比较; [#] P <0.05, 与1.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较; [&] P <0.05, 与5.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较; ^S P <0.05, 与10.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较。
* P <0.05 compared with NC group; [#] P <0.05 compared with 1.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; [&] P <0.05 compared with 5.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; ^S P <0.05 compared with 10.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.



A: NC组; B: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; C: LiCl组; D: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物+LiCl组。
A: NC group; B: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: LiCl group; D: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract + LiCl group.

图7 LiCl可逆转瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞克隆形成和迁移、侵袭、凋亡的影响

Fig.7 LiCl can reverse the effects of the *Cucumis melo* L. ethanol extract on cell clone formation, migration, invasion and apoptosis in Hep3B cells



A: NC组; B: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组; C: LiCl组; D: 20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物+LiCl组。
A: NC group; B: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group; C: LiCl group; D: 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract + LiCl group.

图8 LiCl可逆转瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞凋亡、迁移、侵袭及Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达的影响

Fig.8 LiCl can reverse the effects of the *Cucumis melo* L. ethanol extract on apoptosis, migration, invasion and expression of Wnt/ β -catenin pathway related protein in Hep3B cells

表5 LiCl可以逆转瓜蒂醇提取物对Hep3B细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响
Table 5 LiCl can reverse the effects of the *Cucumis melo* L. ethanol extract on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of Hep3B cells

分组 Group	Cleaved-caspase-3	pro-caspase-3	MMP2	MMP9	D值 D value	细胞克隆数量 Number of cell clones	细胞迁移数量 Number of migrating cells	细胞侵袭数量 Number of invading cells	凋亡率/% Apoptotic rate /%
NC group	0.34±0.03	0.95±0.08	0.84±0.06	0.78±0.09	1.21±0.09	123.00±10.08	235.00±15.18	159.00±12.15	7.34±0.62
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.85±0.07*	0.46±0.02*	0.36±0.03*	0.33±0.02*	0.42±0.04*	45.00±3.07*	108.00±7.43*	76.00±6.27*	24.61±2.08*
LiCl group	0.23±0.02*	1.09±0.08*	0.96±0.09*	0.89±0.09*	1.42±0.14*	141.00±12.15*	348.00±19.23*	216.00±15.34*	5.26±0.53*
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract + LiCl group	0.39±0.03 [#]	0.87±0.06 [#]	0.85±0.07 [#]	0.72±0.07 [#]	1.11±0.10 [#]	108.00±8.16 [#]	217.00±18.19 [#]	136.00±11.24 [#]	9.14±0.76 [#]
F	378.718	157.054	146.931	99.460	171.786	192.846	352.418	220.203	503.448
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P <0.05, 与NC组比较; [#] P <0.05, 与20.0 μ g/mL瓜蒂醇提取物组比较。
* P <0.05 compared with NC group; [#] P <0.05 compared with 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

胞活性, 减少克隆数量以及迁移和侵袭数, 提高细胞凋亡率, 同时促进细胞中凋亡相关蛋白Cleaved-caspase-3的表达, 而抑制pro-caspase-3蛋白及促迁移和侵袭相关蛋白MMP2、MMP9的表达, 且呈剂量依赖性, 这表明瓜蒂醇提取物可通过调控相关蛋白表达抑制肝癌细胞Hep3B的增殖、迁移和侵袭, 并诱导

表6 LiCl可以逆转瓜蒂醇提物对Hep3B细胞中Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达的影响
Table 6 LiCl can reverse the effects of the *Cucumis melo* L. ethanol extract on the expression of Wnt/ β -catenin pathway related protein in Hep3B cells

分组 Group	Wnt3a	核 β -catenin Nuclear β -catenin	质 β -catenin Plasmic β -catenin	cyclinD1	APC	c-myc
NC group	0.99±0.08	0.79±0.08	0.77±0.06	1.16±0.10	0.34±0.02	0.86±0.05
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract group	0.37±0.04*	0.32±0.02*	1.36±0.15*	0.37±0.03*	0.85±0.07*	0.23±0.02*
LiCl group	1.21±0.13*	0.91±0.07*	0.62±0.06*	1.29±0.12*	0.21±0.03*	0.97±0.08*
20.0 μ g/mL <i>Cucumis melo</i> L. ethanol extract + LiCl group	0.89±0.06 [#]	0.76±0.06 [#]	0.83±0.08 [#]	1.12±0.09 [#]	0.39±0.05 [#]	0.78±0.04 [#]
F	160.126	156.941	155.593	172.886	321.759	358.239
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P <0.05, 与NC组比较; [#] P <0.05, 与20.0 μ g/mL瓜蒂醇提物组比较。

* P <0.05 compared with NC group; [#] P <0.05 compared with 20.0 μ g/mL *Cucumis melo* L. ethanol extract group.

细胞凋亡, 提示瓜蒂醇提物具有抗肝癌的潜在价值。

研究发现经典信号通路 Wnt/ β -catenin 与肝癌的形成有关, 下调 Wnt/ β -catenin 信号转导抑制肝癌细胞的增殖和侵袭^[15]。灵芝三萜能够通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[16]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键调控因子, 胞质 APC/轴蛋白破坏复合物 (destruction complex, DC) 在 β -catenin 的稳定性中起着重要作用。APC 缺失可促进 β -catenin 在细胞质中聚集并向细胞核转移, 激活与癌细胞周期、增殖、转移相关的靶基因 *c-myc*、*cyclinD1* 的生物表达^[17]。本实验结果显示, 瓜蒂醇提物呈剂量依赖性抑制 Hep3B 细胞中 Wnt3a、cyclinD1、c-myc、核 β -catenin 蛋白表达, 促进 APC 和质 β -catenin 蛋白表达, 提示瓜蒂醇提物可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。本实验进一步用 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂 LiCl 处理瓜蒂醇提物作用的 Hep3B 细胞, 结果显示, LiCl 可逆转瓜蒂醇提物对 Hep3B 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响, 这提示瓜蒂醇提物可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来抑制 Hep3B 细胞增殖、迁移和侵袭及诱导细胞凋亡。

综上所述, 瓜蒂醇提物呈剂量依赖性抑制肝癌细胞 Hep3B 增殖、迁移侵袭, 并促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关, 提示瓜蒂醇提物具有抑制肝癌发生发展的潜在作用。

参考文献 (References)

[1] 申宏, 马佳乐, 赵智圆, 等. 中医药干预相关信号通路防治肝癌

研究进展[J]. 国际中医中药杂志(SHEN H, MA J L, ZHAO Z Y, et al. Research progress on the prevention and treatment of liver cancer intervened by traditional Chinese medicine on related signaling pathway [J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine), 2021, 43(1): 93-7.

[2] 张宇, 陈华国, 赵超, 等. 中药有效成分抗肝癌作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志(ZHANG Y, CHEN H G, ZHAO C, et al. Research progress on anti-hepatocellular carcinoma mechanism of active ingredients of traditional Chinese medicine [J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2020, 45(14): 3395-406.

[3] HE S, TANG S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110851.

[4] 吕君, 朱鹏飞, 刘艳民, 等. 黄芪多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡研究[J]. 中草药(LYU J, ZHU P F, LIU Y M, et al. Astragalus polysaccharides downregulates apoptosis in HepG2 cell through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2018, 49(21): 210-5.

[5] GAI J Q, SHENG X, QIN J M, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2016, 48(1): 338-48.

[6] 石丰硕, 谢明, 王添敏. 甜瓜蒂在中药饮片标准中“主治”项的本草考证[J]. 中医学(SHI F S, XIE M, WANG T M. Materia medica textual research on “indications” in the standard of chinese medicine pieces [J]. Traditional Chinese Medicine), 2021, 10(5): 691-8.

[7] 王露. 甜瓜蒂3种提取物体外抗肿瘤活性的比较研究[J]. 天津医药(WANG L. Comparative study of in vitro anti-tumor activities of three different extracts of Pedicellus Melo [J]. Tianjin Medical Journal), 2017, 45(4): 359-63.

[8] 赵雯宇, 司富春. 瓜蒂水提物和醇提物对食管癌TE-1、EC-1细胞的增殖、迁移、克隆形成的影响及机制研究[J]. 中国药房(ZHAO W Y, SI F C. Effects and mechanism of water extract and ethanol extract of muskmelon pedicel on the proliferation, migration and cloning formation of esophageal carcinoma TE-1 and EC-1 cells [J]. China Pharmacy), 2020, 31(3): 314-20.

[9] 沈玉珍. 中药提取物抗肝癌的作用机制及优势分析[J]. 医药前沿(SHEN Y Z. Analysis of the mechanism and advantages of tra-

- ditional Chinese medicine extracts against liver cancer [J]. *Yiyao Qianyan*, 2019, 9(15): 214.
- [10] 芮冉, 董夏, 孟博博, 等. 中药活性成分干预肝癌前病变发生发展相关信号通路研究进展[J]. *辽宁中医杂志* (RUI R, DONG X, MENG B B, et al. Research progress of active components of chinese herbs in intervention of signal transduction pathway in precancerous lesions of liver cancer [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2019, 46(5): 1114-6.
- [11] 王成志, 彭元亮, 史夏青, 等. 葫芦素I对肝癌细胞生长的抑制作用及其与STAT3通路相关抗凋亡因子的关系[J]. *中国普通外科杂志* (WANG C Z, PENG Y L, SHI X Q, et al. Inhibitory effect of cucurbitacin I on hepatocellular carcinoma cells and its relation with anti-apoptotic factors related to STAT3 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of General Surgery*), 2018, 27(1): 61-7.
- [12] 杨姣, 周雪莹, 历文, 等. 葫芦素B和阿霉素联合应用在体内外对肝癌细胞H22的生长抑制作用[J]. *实用药物与临床* (YANG J, ZHOU X Y, LI W, et al. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and doxorubicin on hepatocellular carcinoma [J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*), 2012, 15(5): 257-9.
- [13] YANG P, LIU W, FU R, et al. Cucurbitacin E chemosensitizes colorectal cancer cells via mitigating TFAP4/Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(48): 14148-60.
- [14] 何臣, 王菊辉, 丘韶校, 等. 葫芦素B抑制JAK2/STAT3信号拮抗非小细胞肺癌H1975细胞增殖的研究[J]. *中国医学创新* (HE C, WANG J H, QIU S J, et al. Inhibition of JAK2/STAT3 signal activation by cucurbitacin B on proliferation of non-small cell lung cancer H1975 Cells [J]. *Medical Innovation of China*), 2020, 17(26): 31-4.
- [15] FAN W, DU F, LIU X. Phosphatidylinositol 4-phosphate adaptor protein 2 accelerates the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by enhancing Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52(5): 301-9.
- [16] 蔡蕤. 灵芝三萜通过Wnt/ β -catenin信号通路对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中成药* (CAI R. Effects of Ganoderma lucidum triterpenes on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*), 2020, 42(5): 218-22.
- [17] WANG J, CAI H, LIU Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/ β -Catenin signaling pathway and EMT [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703-18.