

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

王健¹ 吕雪梅² 亓立廷^{3*}

(¹济南市中西医结合医院, 胃肠肝胆外科, 济南 271100; ²济南市中西医结合医院, 肝病科, 济南 271100;

³济南市中西医结合医院, 普外科, 济南 271100)

摘要 该研究主要探讨益母草碱(Leo)调节音猬因子(Shh)/胶质细胞瘤转录因子1(Gli1)信号通路对肝癌SMC-7721细胞增殖、凋亡和血管生成的影响。体外培养SMC-7721细胞并进行分组: 对照组、低浓度Leo组(Leo-L组, 10 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、中浓度Leo组(Leo-M组, 20 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、高浓度Leo组(Leo-H组, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、重组人SHH蛋白组(SHH组, 3 $\mu\text{g/mL}$ 重组人SHH蛋白)和高浓度Leo+重组人SHH蛋白组(Leo-H+SHH组, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo+3 $\mu\text{g/mL}$ 重组人SHH蛋白)。CCK-8实验检测SMC-7721细胞增殖情况; 划痕实验检测SMC-7721细胞迁移情况; 流式细胞术检测SMC-7721细胞凋亡情况; 管腔形成实验检测SMC-7721细胞血管生成情况; Western blot检测SMC-7721中Shh/Gli1信号通路及凋亡相关蛋白表达水平。与对照组相比, Leo-L、Leo-M、Leo-H组SMC-7721细胞 D_{450} 值、划痕愈合率、血管生成数量以及Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), 细胞凋亡率和Bax蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); SHH组SMC-7721细胞 D_{450} 值、划痕愈合率、血管生成数量以及Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率和Bax蛋白表达水平显著降低($P<0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组SMC-7721细胞 D_{450} 值、划痕愈合率、血管生成数量以及Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率和Bax蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。这说明Leo可能通过抑制Shh/Gli1信号通路抑制肝癌SMC-7721细胞增殖和血管生成, 诱导细胞凋亡。

关键词 益母草碱; 音猬因子; 胶质细胞瘤转录因子1; 增殖; 凋亡; 血管生成

Impacts of Leonurine on the Proliferation, Apoptosis and Angiogenesis of Hepatoma SMC-7721 Cells by Regulating Shh/Gli1 Signaling Pathway

WANG Jian¹, LÜ Xuemei², QI Liting^{3*}

(¹Department of Gastrointestinal and Hepatobiliary Surgery, Jinan Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinan 271100, China; ²Department of Hepatology, Jinan Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinan 271100, China; ³Department of General Surgery, Jinan Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinan 271100, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the impacts of Leo (Leonurine) on the proliferation, apoptosis and angiogenesis of hepatoma SMC-7721 cells by regulating Shh (Sonic hedgehog)/Gli1 (glioma associated oncogene homolog 1) signaling pathway. SMC-7721 cells were cultured *in vitro* and divided into: control group, low concentration Leo group (Leo-L group, 10 $\mu\text{g/mL}$ Leo), medium concentration Leo group (Leo-M group, 20 $\mu\text{g/mL}$ Leo), high concentration Leo group (Leo-H group, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo), recombinant human SHH

收稿日期: 2023-08-18

接受日期: 2023-09-19

*通讯作者。Tel: 15866345112, E-mail: qiliting2007@163.com

Received: August 18, 2023

Accepted: September 19, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-15866345112, E-mail: qiliting2007@163.com

protein group (SHH group, 3 $\mu\text{g/mL}$ recombinant human SHH protein), and high concentration Leo+recombinant human SHH protein group (Leo-H+SHH group, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo+3 $\mu\text{g/mL}$ recombinant human SHH protein). CCK-8 experiment was applied to detect SMC-7721 cell proliferation. Scratch test was applied to detect SMC-7721 cell migration. Flow cytometry was applied to detect apoptosis in SMC-7721 cells. Lumen formation experiment was applied to detect angiogenesis in SMC-7721 cells. Western blot was applied to detect the Shh/Gli1 signaling pathway and apoptosis related protein expression levels in SMC-7721. Compared with the control group, the D_{450} value, scratch healing rate, angiogenesis quantity, and Bcl-2, Shh, and Gli1 protein expression of SMC-7721 cells in the Leo-L, Leo-M, and Leo-H groups were obviously reduced ($P<0.05$); the apoptosis rate and Bax protein expression were obviously increased ($P<0.05$); the D_{450} value, scratch healing rate, angiogenesis quantity, and Bcl-2, Shh, and Gli1 protein expression of SMC-7721 cells in the SHH group were obviously increased ($P<0.05$); the apoptosis rate and Bax protein expression were obviously reduced ($P<0.05$). Compared with the Leo-H group, the D_{450} value, scratch healing rate, angiogenesis quantity, and Bcl-2, Shh, and Gli1 protein expression of SMC-7721 cells in the Leo-H+SHH group were obviously increased ($P<0.05$); the apoptosis rate and Bax protein expression were obviously reduced ($P<0.05$). This suggests that Leo may inhibit the proliferation and angiogenesis of hepatoma SMC-7721 cells and induce cell apoptosis by inhibiting the Shh/Gli1 signaling pathway.

Keywords Leonurine; Sonic hedgehog; glioma associated oncogene homolog 1; proliferation; apoptosis; angiogenesis

肝癌是世界范围内常见的侵袭型恶性肿瘤,具有复发率高、转移快的特点^[1]。近年以来,肝癌的发病率持续增加,与肝癌相关的死亡率每年增加2%以上^[2]。传统化学和放射治疗在一定程度上可以改善患者的临床预后,但其产生的副作用不容忽视^[3]。因此,寻求安全有效的药物对肝癌的治疗以及提高预后效果具有重要意义。益母草碱(leonurine, Leo)是益母草中的生物碱,也是益母草活血利水的主要活性成分之一,具有抗氧化等多种生物作用^[4]。有研究发现,Leo对肺癌细胞有抑制增殖和诱导凋亡的作用,可发挥抗肿瘤效果^[5]。罗娜等^[6]研究发现,Leo可通过抑制LINC00461的表达进而抑制宫颈癌细胞增殖,促进细胞凋亡。但关于Leo对肝癌的抗肿瘤作用尚不明确。音猬因子(Sonic hedgehog, Shh)属于Hedgehog信号通路常见因子之一,其可激活下游胶质细胞瘤转录因子1(glioma associated oncogene homolog 1, Gli1)^[7]。RIA等^[8]研究表明,Shh/Gli1信号通路可抑制上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标记物的表达,从而抑制乳腺癌细胞侵袭。但是Shh/Gli1信号通路对肝癌细胞的具体影响机制尚不清楚。鉴于此,本研究以人肝癌细胞株SMC-7721为研究对象,探究Leo能否通过调控Shh/Gli1信号通路对肝癌细胞增殖、凋亡和血管生成产生影响,为Leo用于肝癌的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株SMC-7721和正常人肝细胞LO2购自武汉普诺赛生命科技有限公司; Leo、青霉素-链霉素溶液均购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM培养基购自合肥博美生物科技有限公司; 10%胎牛血清购自上海联硕宝为生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海吉至生化科技有限公司; 二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司; 兔源一抗Shh、Gli1均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 兔源一抗Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X Protein, Bax)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗均购自英国Abcam公司; 兔源一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购自亚科因(武汉)生物技术有限公司; 重组人SHH蛋白购于美国Cambridge公司。

1.2 细胞培养

将SMC-7721细胞和正常人肝细胞LO2用含10%胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 青-链霉素的DMEM培养基培养,并将其置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,每2~3天传代1次,用于后续实验。

1.3 Leo的细胞毒性检测

将SMC-7721细胞和正常人肝细胞LO2接种于96孔板(3×10^3 个细胞/100 μL), 在培养箱中过夜培养, 再用含不同浓度Leo(终浓度为0、5、10、20、30、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$)的培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。每孔分别加入10 μL CCK-8溶液, 继续在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育2 h, 用全自动酶标仪(450 nm波长)测定各孔的光密度(optical density, D)值, 并计算细胞存活率。细胞存活率=(药物处理组细胞 D 值/对照组细胞 D 值) $\times 100\%$ 。

1.4 细胞分组

将SMC-7721细胞分组: 对照组、低浓度Leo组(Leo-L组, 10 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、中浓度Leo组(Leo-M组, 20 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、高浓度Leo组^[6](Leo-H组, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo)、重组人SHH蛋白组^[9](SHH组, 3 $\mu\text{g/mL}$ 重组人SHH蛋白)和高浓度Leo+重组人SHH蛋白组(Leo-H+SHH组, 30 $\mu\text{g/mL}$ Leo+3 $\mu\text{g/mL}$ 重组人SHH蛋白)。分组后加入相应药物处理48 h。

1.5 CCK-8法检测SMC-7721细胞增殖

取对数生长期细胞, 胰酶消化(37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3 min)后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min离心5 min)并用培养基重悬成细胞悬液, 各组细胞以密度为 1×10^4 个/孔接种于96孔板中, 每组设5个复孔, 加入相应药物于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养48 h。每孔分别加入10 μL CCK-8溶液, 继续在培养箱中孵育2 h, 在全自动酶标仪450 nm波长处测定 D 值。

1.6 划痕实验检测SMC-7721细胞迁移

取对数生长期的细胞, 胰酶消化(37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3 min)后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min离心5 min)并用培养基重悬成细胞悬液, 细胞以密度为 1×10^6 个/孔接种于6孔板中, 每组设置5个复孔。当细胞达到80%融合后, 用200 μL 微量移液器的枪头刮细胞层, 产生一条无细胞区域, 测量此时划痕宽度。随后加入相应药物继续培养48 h后测量划痕宽度。计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率=[(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度] $\times 100\%$ 。

1.7 流式细胞术检测SMC-7721细胞凋亡

取对数生长期细胞, 胰酶消化(37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3 min)后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min离心5 min)并用培养基重悬成细胞悬液, 各组细胞以密度为 1×10^4 个/孔接种于96孔板中, 每组设置5个复孔。加入相应药物放入培养箱中培养48 h后, 轻轻吸去培养基, 并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)缓冲液洗涤1

次, 用300 μL 结合缓冲液重悬后, 加入5 μL 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-膜联蛋白V(Annexin V)和5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI), 避光室温孵育15 min后, 通过流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.8 管腔形成实验检测SMC-7721细胞血管生成

将96孔板置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预冷后, Matrigel胶用无血清培养液按1:10比例稀释, 再将Matrigel胶加入到96孔板中(50 μL /孔), 放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中干燥60 min。取对数生长期细胞, 胰酶消化(37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3 min)后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min离心5 min)并用培养基重悬成细胞悬液, 以细胞密度为 1×10^4 个/孔接种于Matrigel胶包被的96孔板, 每组设置5个复孔。加入相应药物, 放入培养箱中继续培养12 h, 然后加入钙黄绿素Calcein-AM/PBS溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS洗涤2次后, 荧光显微镜下观察并随机选5个视野拍照, 用Image Pro Plus 6.0软件计算血管生成数量。

1.9 Western blot检测Shh/Gli1通路及凋亡相关蛋白表达情况

收集细胞, 用RIPA裂解缓冲液提取各组细胞中的总蛋白, 用BCA蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量, 经电泳分离、转膜、5%脱脂牛奶室温封闭2 h后, 将聚偏二氟乙烯膜与一抗Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Shh(1:1 000)、Gli1(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜孵育, $1 \times \text{TBST}$ 洗膜3次, 每次5 min。再加入HRP标记的二抗(1:3 000)在室温下孵育4 h。加入ECL试剂观察蛋白显色情况, 通过Quantity One软件评估蛋白灰度值。

1.10 统计学分析

使用GraphPad Prism 6软件进行统计学分析, 计量资料表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。单因素方差分析用于多组间的比较, 进一步两组间的比较采用SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Leo对人肝癌SMC-7721细胞和正常人肝细胞LO2存活率的影响

与对照(0 $\mu\text{g/mL}$)组比较, 5、10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ Leo组LO2细胞存活率无明显差异, 40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ Leo组LO2细胞存活率显著降低($P < 0.05$, 图1)。与对照(0 $\mu\text{g/mL}$)组比较, 10、20、30、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ Leo组SMC-7721细胞存活率显著降低($P < 0.05$), 且Leo对

SMC-7721细胞增殖的半数抑制浓度(IC_{50})接近30 $\mu\text{g/mL}$ (图1); 且10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ Leo对正常人肝细胞LO2无明显毒性作用, 因此选择10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ Leo进行后续实验。

2.2 各组SMC-7721细胞增殖能力比较

与对照组相比, Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组SMC-7721细胞 D_{450} 值显著降低($P<0.05$), SHH组SMC-7721细胞 D_{450} 值显著升高($P<0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组SMC-7721细胞 D_{450} 值显著升高($P<0.05$)(图2)。

2.3 各组SMC-7721细胞迁移能力比较

与对照组相比, Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组

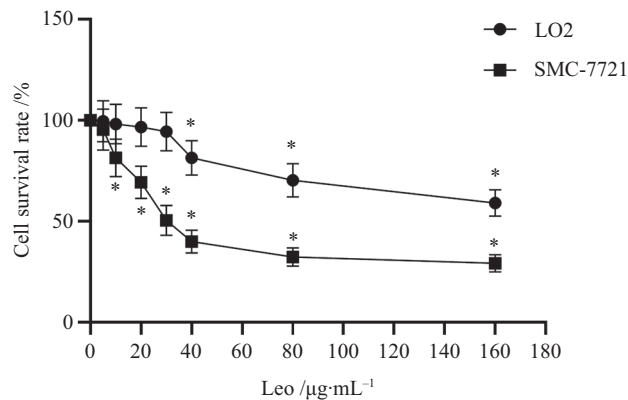
SMC-7721细胞划痕愈合率显著降低($P<0.05$), SHH组SMC-7721细胞划痕愈合率显著升高($P<0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组SMC-7721细胞划痕愈合率显著升高($P<0.05$)(图3)。

2.4 各组SMC-7721细胞凋亡能力比较

与对照组相比, Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组SMC-7721细胞凋亡率显著升高($P<0.05$), SHH组SMC-7721细胞凋亡率显著降低($P<0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组SMC-7721细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)(图4)。

2.5 各组SMC-7721细胞血管生成比较

与对照组相比, Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组

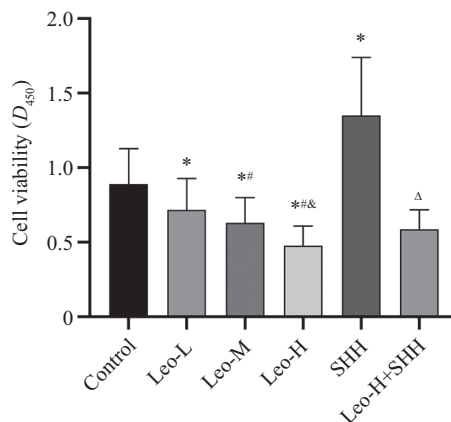


* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{g/mL}$ Leo组比较。

* $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ Leo group.

图1 Leo对人肝癌SMC-7721细胞和正常人肝细胞LO2存活率的影响

Fig.1 Effect of Leo on the survival rate of human hepatocellular carcinoma SMC-7721 cells and normal hepatocellular carcinoma LO2

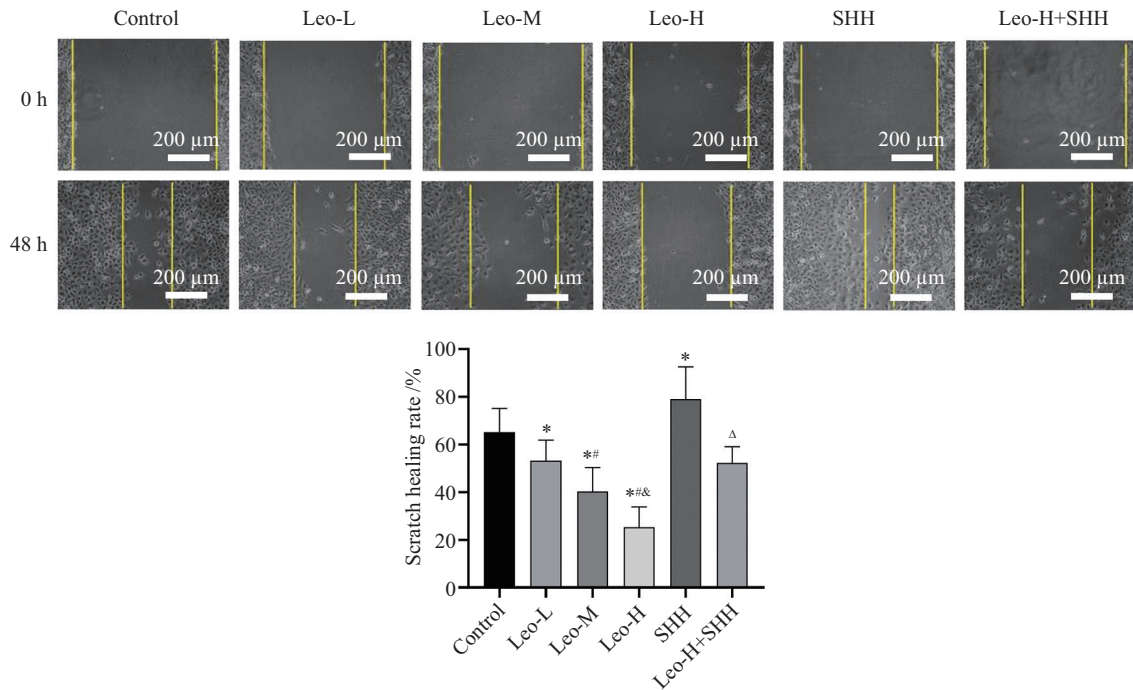


* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与Leo-L组相比; & $P<0.05$, 与Leo-M组相比; Δ $P<0.05$, 与Leo-H组相比。

* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with Leo-L group; & $P<0.05$ compared with Leo-M group; Δ $P<0.05$ compared with Leo-H group.

图2 各组SMC-7721细胞 D_{450} 值比较

Fig.2 Comparison of D_{450} values of SMC-7721 cells in each group

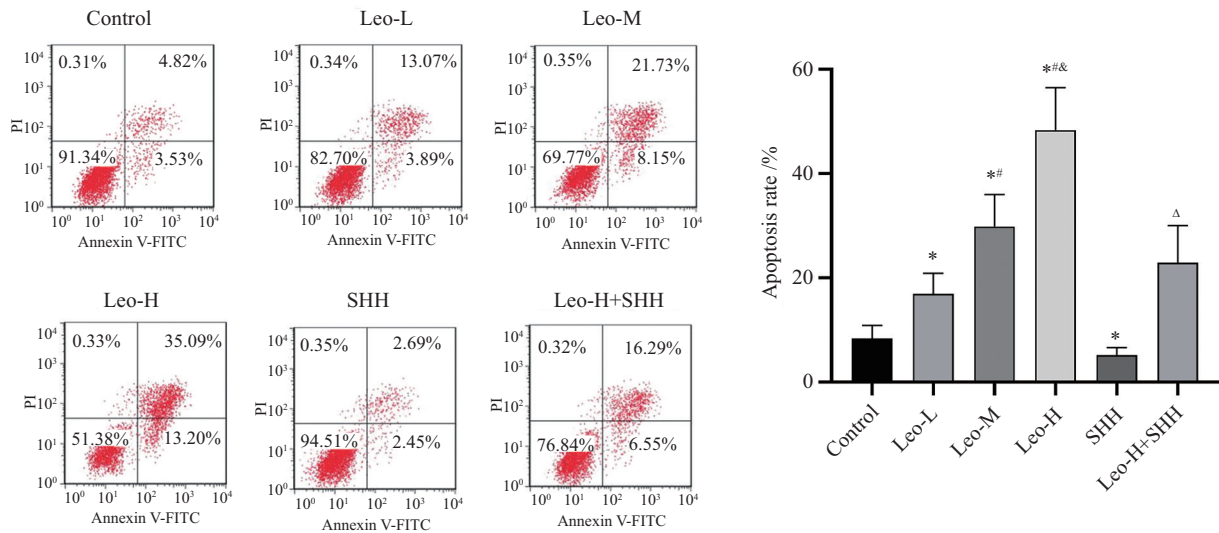


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与Leo-L组相比; & $P < 0.05$, 与Leo-M组相比; ^Δ $P < 0.05$, 与Leo-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Leo-L group; & $P < 0.05$ compared with Leo-M group; ^Δ $P < 0.05$ compared with Leo-H group.

图3 各组SMC-7721细胞迁移能力比较

Fig.3 Comparison of migration ability of SMC-7721 cells in each group



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与Leo-L组相比; & $P < 0.05$, 与Leo-M组相比; ^Δ $P < 0.05$, 与Leo-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Leo-L group; & $P < 0.05$ compared with Leo-M group; ^Δ $P < 0.05$ compared with Leo-H group.

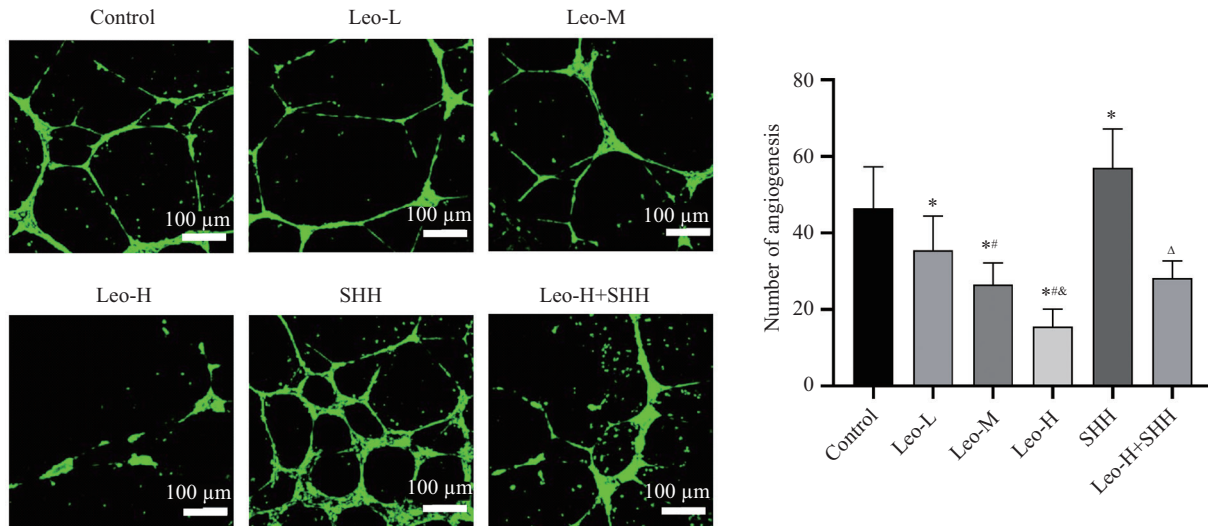
图4 各组SMC-7721细胞凋亡率比较

Fig.4 Comparison of apoptosis rate of SMC-7721 cells in each group

组 SMC-7721 细胞血管生成数量显著降低 ($P < 0.05$), SHH组 SMC-7721 细胞血管生成数量显著升高 ($P < 0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组 SMC-7721 细胞血管生成数量显著升高 ($P < 0.05$) (图5)。

2.6 各组SMC-7721细胞Shh/Gli1信号通路及凋亡相关蛋白表达水平比较

与对照组相比, Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组 SMC-7721 细胞Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与对

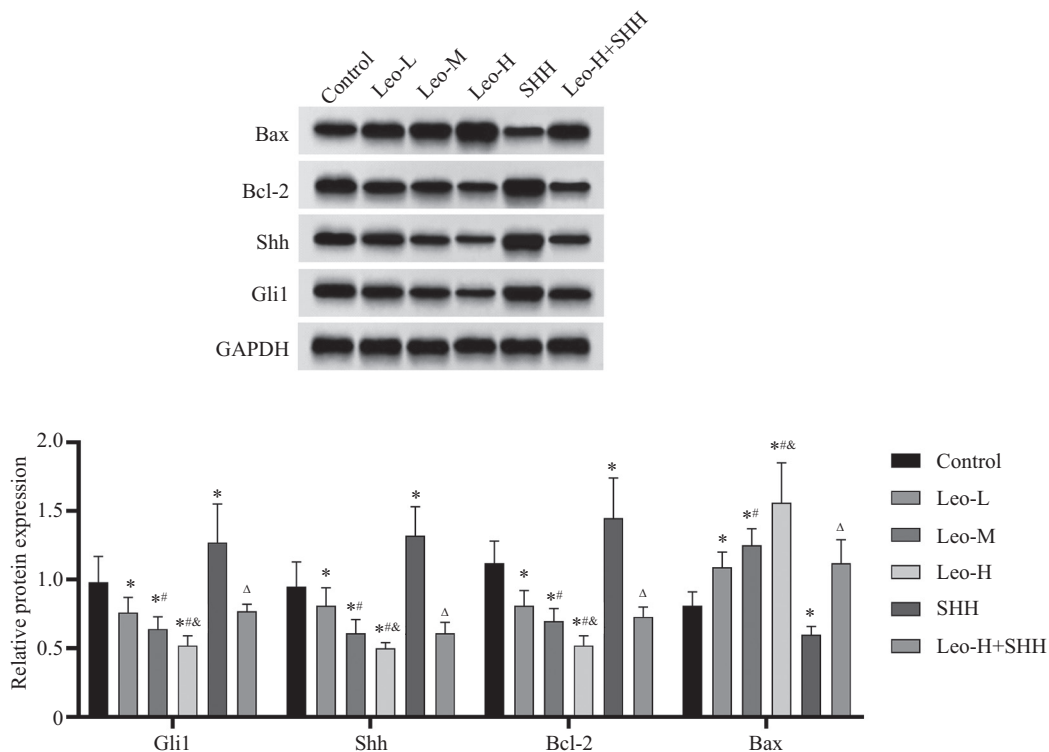


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与Leo-L组相比; & $P < 0.05$, 与Leo-M组相比; Δ $P < 0.05$, 与Leo-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Leo-L group; & $P < 0.05$ compared with Leo-M group; Δ $P < 0.05$ compared with Leo-H group.

图5 各组SMC-7721细胞血管生成比较

Fig.5 Comparison of angiogenesis of SMC-7721 cells in each group



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与Leo-L组相比; & $P < 0.05$, 与Leo-M组相比; Δ $P < 0.05$, 与Leo-H组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Leo-L group; & $P < 0.05$ compared with Leo-M group; Δ $P < 0.05$ compared with Leo-H group.

图6 Western blot检测SMC-7721细胞Shh/Gli1信号通路及凋亡相关蛋白表达情况

Fig.6 Western blot analysis of Shh/Gli1 signaling pathway and apoptosis-related protein expression in SMC-7721 cells

照组相比, SHH组 SMC-7721细胞 Bcl-2、Shh、Gli1 的蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), Bax 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与Leo-H组相比, Leo-H+SHH组 SMC-7721细胞 Bcl-2、Shh、Gli1 的蛋白表达水平显著升高

($P < 0.05$), Bax 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)(图6)。

3 讨论

肝癌是全球癌症死亡的主要原因之一^[10]。肝

癌的常规治疗方法,如化疗、免疫疗法等具有良好的疗效,但是这些治疗方法通常无法完全治愈肝癌,甚至在治疗后会产生耐药性等不良副作用^[11]。鉴于这些因素,研究学者认为,中药治疗可能会成为肝癌治疗的有效方法。研究表明,中药治疗能够抑制癌症的进展,防止癌症复发和癌细胞转移,延长生存时间^[12]。为此,本研究选用SMC-7721细胞对研究对象,探究Leo对肝癌细胞增殖、凋亡和血管生成的影响以及其可能的机制。

益母草中包含生物碱、黄酮类等化合物^[13]。有研究表明,益母草提取物可抑制宫颈癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[14]。Leo是从益母草中提取的生物碱。肖亮等^[15]研究表明,Leo能下调表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的表达并抑制乳腺癌肿瘤细胞的增殖。LIANG等^[16]研究表明,Leo通过抑制miR-18a-5p/SLC40A1轴抑制前列腺癌细胞增殖,促进细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用。本研究结果表明:低浓度(10、20、30 $\mu\text{g/mL}$) Leo对人正常肝LO2细胞存活率无明显影响,但可显著降低肝癌SMC-7721细胞存活率(图1);此外,与对照组相比,Leo-L组、Leo-M组、Leo-H组SMC-7721细胞 D_{450} 值(图2)、划痕愈合率(图3)、血管生成数量(图5)及Shh、Gli1、Bcl-2蛋白表达水平(图6)显著降低,细胞凋亡率(图4)、Bax蛋白表达水平(图6)显著升高。这提示Leo可抑制SMC-7721细胞的增殖和血管生成,促进细胞凋亡。

Shh/Gli1信号通路涉及肿瘤细胞生长、凋亡等多方面^[17]。随着对Shh/Gli1信号通路不断深入,研究人员发现Shh/Gli1信号通路与肿瘤血管形成有关,血管生成可促进肿瘤发展^[18]。Gli1是Shh的下游基因,激活Shh/Gli1信号通路可提高Shh蛋白表达水平,进而提高Gli1蛋白的表达水平。Gli1蛋白在多数肿瘤实质细胞内表达水平提高, Gli1蛋白可通过调控细胞增殖和分化过程,在肿瘤生长及转移过程中起重要作用^[19]。夏培等^[20]研究发现,Shh信号通路激活可部分逆转沉默FOXQ1对SGC-7901细胞凋亡的促进作用。因此,本研究选择重组人SHH蛋白作为实验干扰条件,实验结果显示:与对照组相比,SHH组SMC-7721细胞的 D_{450} 值(图2)、划痕愈合率(图3)、血管生成数量(图5)及Shh、Gli1、Bcl-2的蛋白表达水平(图6)显著升高,细胞凋亡率(图4)、Bax蛋白表达水平(图6)显著降低。这提示Shh/Gli1信号通路参

与肝癌细胞的增殖和血管生成。由此我们推测Leo可能通过调控Shh/Gli1信号通路诱导肝癌细胞凋亡,并抑制细胞增殖和血管生成。为了验证该假设,本研究在添加Leo基础的上再加上重组人SHH蛋白来干预SMC-7721细胞,结果显示,与Leo-H相比,Leo-H+SHH组SMC-7721细胞的 D_{450} 值(图2)、划痕愈合率(图3)、血管生成数量(图5)及Shh、Gli1、Bcl-2的蛋白表达水平(图6)显著升高,细胞凋亡率(图4)、Bax蛋白表达水平(图6)显著降低。证实了该猜想的正确性,即Leo可能通过调控Shh/Gli1信号通路抑制SMC-7721细胞增殖和血管生成,诱导细胞凋亡。

综上所述,Leo通过抑制SMC-7721细胞增殖和血管生成,诱导细胞凋亡,其作用机制可能与抑制Shh/Gli1信号通路有关。然而,本研究尚存在不足之处,仅仅在细胞水平上验证了Leo调控Shh/Gli1信号通路对SMC-7721细胞增殖、凋亡和血管生成的影响,并未在体内水平进行探讨,后续研究将会在体内水平并采用其他肝癌细胞系进行进一步探索。此外,未来我们会对Leo在体内的代谢、分布和清除情况进行分析,评估其毒性和安全性。

参考文献 (References)

- [1] LI X, RAMADORI P, PFISTER D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(9): 541-57.
- [2] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. Hepatol, 2022, 77(6): 1598-606.
- [3] DEMIR T, LEE S S, KASEB A O. Systemic therapy of liver cancer [J]. Adv Cancer Res, 2021, 149(1): 257-94.
- [4] LI Z, CHEN K, ROSE P, et al. Natural products in drug discovery and development: synthesis and medicinal perspective of leonurine [J]. Front Chem, 2022, 10(1): 1-12.
- [5] MAO F, ZHANG L, CAI M H, et al. Leonurine hydrochloride induces apoptosis of H292 lung cancer cell by a mitochondria-dependent pathway [J]. Pharm Biol, 2015, 53(11): 1684-90.
- [6] 罗娜, 杨启. 益母草碱调控LINC00461抑制宫颈癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药物应用与监测(LUO N, YANG Q. Experimental study on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of cervical cancer cells by Leonurine regulation of LINC00461 [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Application and Monitoring), 2022, 19(5): 299-302.
- [7] WU J, WANG R, KAN X, et al. A Sonic Hedgehog-Gli-Bmi1 signaling pathway plays a critical role in p27 deficiency induced bone anabolism [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(3): 956-69.
- [8] RIAZ S K, KE Y, WANG F, et al. Influence of SHH/GLI1 axis on EMT mediated migration and invasion of breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1-13.
- [9] 国伟, 杨军, 任法新, 等. SHH信号通路激活对大鼠心脏微血管

- 内皮细胞缺血再灌注损伤血管再生作用研究[J]. 疑难病杂志 (GUO W, YANG J, REN F X, et al. Effect of activation of SHH signaling pathway on vascular regeneration of rat heart microvascular endothelial cells after ischemia-reperfusion injury [J]. Journal of Intractable Diseases), 2021, 20(1): 41-6.
- [10] LI Y, ZHANG R, XU Z, et al. Advances in nanoliposomes for the diagnosis and treatment of liver cancer [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17(1): 909-25.
- [11] PÉREZ-LÓPEZ A, MARTÍN-SABROSO C, GÓMEZ-LÁZARO L, et al. Embolization therapy with microspheres for the treatment of liver cancer: state-of-the-art of clinical translation [J]. Acta Biomater, 2022, 149(1): 1-15.
- [12] ZHANG X, QIU H, LI C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2021, 15(5): 283-98.
- [13] KOSHOVYI O, RAAL A, KIREYEV I, et al. Phytochemical and psychotropic research of motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) modified dry extracts [J]. Plants, 2021, 10(2): 1-17.
- [14] LIN M, PAN C, XU W, et al. Leonurine promotes cisplatin sensitivity in human cervical cancer cells through increasing apoptosis and inhibiting drug-resistant proteins [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14(1): 1885-95.
- [15] 肖亮, 杨军平, 黎秋如, 等. 益母草碱调控成纤维细胞内EGF蛋白表达及对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 江西中医药(XIAO L, YANG J P, LI Q R, et al. Regulation of EGF protein expression in fibroblasts by Leonurus and its effect on proliferation of breast cancer cells [J]. Jiangxi Traditional Chinese Medicine), 2018, 49(12): 69-71.
- [16] LIANG B, CUI S, ZOU S. Leonurine suppresses prostate cancer growth *in vitro* and *in vivo* by regulating miR-18a-5p/SLC40A1 axis [J]. Chin J Physiol, 2022, 65(6): 319-27.
- [17] 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]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(12): 1162-73.
- [18] KE B, WANG X N, LIU N, et al. Sonic Hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates cell migration and invasion via induction of epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. Cancer, 2020, 11(13): 3932-43.
- [19] 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): 1-13.
- [20] 夏培, 熊宇, 张万里, 等. FOXQ1介导SHH信号通路诱导胃癌细胞凋亡[J]. 河北医药(XIA P, XIONG Y, ZHANG W L, et al. FOXQ1 mediates SHH signaling pathway to induce apoptosis of gastric cancer cells [J]. Hebei Medicine), 2020, 42(16): 2428-32.