

鸦胆子苦醇调节SHH/GLI信号通路对胃癌MGC-803 细胞增殖、迁移和血管生成的影响

熊玉龙¹ 陈波^{2*}

(¹黄冈市中心医院中医内科, 黄冈 438000; ²宜昌市第二人民医院消化内科, 宜昌 443000)

摘要 该文探讨鸦胆子苦醇(BRU)调节音猬因子(SHH)/胶质细胞瘤转录因子1(GLI)信号通路对胃癌MGC-803细胞增殖、迁移和血管生成的影响。体外培养MGC-803细胞, 分别用不同浓度BRU处理细胞, 筛选药物作用浓度。将细胞分为五组: 对照组(Ctrl组), BRU低、中、高浓度组(L-BRU、M-BRU、H-BRU组, 200、400、800 nmol/L), H-BRU+SHH激活剂组(H-BRU+PM组), 采用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)法检测细胞增殖; 流式细胞仪检测细胞凋亡; 划痕愈合实验观察细胞迁移; Transwell小室实验检测细胞侵袭; 血管拟态形成实验观察细胞成管; Western blot检测SHH、GLI、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、PTCH1(patched 1)、SMO(smoothened)蛋白表达情况。结果显示, 选定200、400、800 nmol/L为BRU作用浓度进行后续实验; 与Ctrl组比较, L-BRU、M-BRU和H-BRU组MGC-803细胞EdU阳性细胞百分比、细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量、管腔数量及SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2蛋白表达水平下降, 细胞凋亡率增加($P<0.05$); PM削弱了H-BRU对MGC-803细胞中上述指标的作用($P<0.05$)。结果表明, BRU可能通过抑制SHH/GLI信号通路蛋白表达, 抑制胃癌MGC-803细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成, 促进细胞凋亡。

关键词 鸦胆子苦醇; 胃癌; SHH/GLI信号通路; 增殖; 迁移; 血管生成

Effects of Brusatol on the Proliferation, Migration, and Angiogenesis of Gastric Cancer MGC-803 Cells by Regulating the SHH/GLI Signaling Pathway

XIONG Yulong¹, CHEN Bo^{2*}

(¹Department of Traditional Chinese Medicine, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China;

²Department of Gastroenterology, Second People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China)

Abstract This article investigates the effects of BRU (Brusatol) on the proliferation, migration, and angiogenesis of gastric cancer MGC-803 cells by regulating the SHH/GLI signaling pathway. MGC-803 cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of BRU to screen for drug action concentrations. The cells were separated into five groups: control group (Ctrl group), BRU low, medium, and high concentration groups (L-BRU, M-BRU, H-BRU group, 200, 400, 800 nmol/L), and H-BRU+SHH activator group (H-BRU+PM group). EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) method was applied to detect cell proliferation. Flow cytometry was applied to detect apoptosis. Scratch healing assay was used to observe cell migration. Transwell chamber experiment was applied to detect the invasion. The vascular mimicry formation experiment was applied to observe the angiogenesis. The expression of SHH, GLI, VEGF (vascular endothelial growth factor), VEGFR2 (vascular endothelial growth

收稿日期: 2025-03-28

接受日期: 2025-08-12

*通信作者。Tel: 18707253633, E-mail: o17bxy@163.com

Received: March 28, 2025

Accepted: August 12, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-18707253633, E-mail: o17bxy@163.com

factor receptor 2), PTCH1 (patched 1) and SMO (smoothened) were detected by Western blot. The results showed that 200, 400, 800 nmol/L were selected as the concentration of BRU for subsequent experiments. Compared with the Ctrl group, the percentage of EdU positive cells, scratch healing rate, and number of cell invasions, the number of lumens, and the protein expressions of SHH, GLI1, VEGF, and VEGFR2 in MGC-803 cells decreased in the L-BRU, M-BRU, and H-BRU groups, while the apoptosis rate increased ($P < 0.05$). PM weakened the effect of H-BRU on the above indicators in MGC-803 cells ($P < 0.05$). The results indicated that brusatol may inhibit the proliferation, migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer MGC-803 cells and promote cell apoptosis by suppressing the protein expression of SHH/GLI signaling pathway.

Keywords Brusatol; gastric carcinoma; SHH/GLI signaling pathway; proliferation; migration; angiogenesis

胃癌是一种比较常见的消化系统恶性肿瘤,是全球癌症死亡的第四大原因,其晚期的中位生存期不到12个月^[1-2]。早期胃癌临床特征不明显,不易引起患者重视,导致很多患者发现时已进入胃癌晚期^[3]。胃癌的疗法很多,其系统疗法包括化疗、靶向治疗和免疫治疗,在过去几年中有了显著的发展^[4]。然而,确定最佳治疗策略尚未得到解决。因此,寻找新的有效治疗药物和方法至关重要。

鸦胆子苦醇(Brusatol, BRU)是从传统中草药鸦胆子中提取的一种重要苦木素类化合物,具有生物和医学活性,包括抗肿瘤(神经内分泌肿瘤、胶质瘤、血肿和鼻咽癌)、抗炎、抗疟疾和杀虫作用^[5-7]。有研究表明BRU可通过磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)通路逆转脂多糖诱导的人胃癌SGC-7901细胞上皮-间充质转化,诱导细胞凋亡^[8]。目前关于BRU对胃癌作用的研究较少,其抗癌机制尚未明确。

在哺乳动物胚胎发育过程中,初级纤毛转导和调节多种信号通路,在这些通路中,音猬因子(sonic hedgehog, SHH)是最重要的通路之一,SHH信号在成年哺乳动物组织中保持静止^[9]。SHH的激活可促进下游胶质细胞瘤转录因子1(glioma associated oncogene homolog 1, GLI1)表达,GLI1的表达水平与SHH信号通路的活性密切相关,其异常激活与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[10-11]。据研究报道,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促进血管生成的主要因素之一,且胃癌淋巴结转移与VEGF的高表达密切相关^[12]。本研究就VEGF参与肿瘤血管生成,探讨BRU调节SHH/GLI信号通路对胃癌细胞增殖、迁移和血管生成的影响,为胃癌的治疗提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人胃癌细胞(MGC-803)、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(货号: P0010)、SHH激活剂(PM, 货号: SF6822-5mg, 将PM粉末溶于DMSO中制成1 mol/L的母液,使用时稀释成实验所用浓度1 mmol/L)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)-488细胞增殖检测试剂盒(货号: C0071S)购自上海碧云天生物技术有限公司; BRU(货号: SML1868-5mg)购自美国Sigma-Aldrich公司; 细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8, HY-K0301)、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propyl iodide, Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(货号: HY-K1073)均购自美国MedChemExpress公司; 兔源一抗SHH、GLI1、VEGF、血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体均购自赛信通(上海)生物试剂有限公司, PTCH1(patchd 1)、SMO(smoothened)抗体及羊抗兔二抗购自英国Abcam公司; Varioskan LUX多功能酶标仪、QuantStudio™ 5实时荧光定量PCR系统、CO₂细胞培养箱、Nanodrop2000分光光度计、放射免疫沉淀测定(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解和提取缓冲液(货号: 89900)、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(货号: T2234)、电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒(货号: WP20005)、Attune™ NxT流式细胞仪均购自美国ThermoFisher Scientific公司; 光学显微镜购自基恩士(中国)有限公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)-凝胶电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物浓度筛选 将复苏后的MGC-803细胞, 常规培养, 待细胞贴壁后用不同浓度BRU(0、100、200、400、800、1 600 nmol/L)进行处理, 将处理好的MGC-803细胞进行细胞活性观测, 观测时间取24、48、72 h。向各孔中加入10 mL CCK-8试剂, 继续培养4 h, 采用酶标仪(450 nm波长)检测各孔MGC-803细胞, 记录细胞吸光度(D)值, 计算MGC-803细胞存活率。细胞存活率 $=[(\text{实验组 } D - \text{空白组 } D) / (\text{对照组 } D - \text{空白组 } D)] \times 100\%$ 。筛选出合适的浓度以进行后续实验。每个浓度均设置6个复孔。实验重复三次。

1.2.2 EdU法检测MGC-803细胞增殖情况 将对数期的MGC-803细胞接种(4×10^4 /孔)在24孔板中, 分为未进行BRU处理的对照组(Ctrl组)、BRU低浓度组(L-BRU组)、BRU中浓度组(M-BRU组)、BRU高浓度组(H-BRU组)、H-BRU+SHH激活剂组(H-BRU+PM组), 进行后续实验。其中L-BRU组、M-BRU组、H-BRU组分别加入200、400、800 nmol/L BRU, H-BRU+PM组加入800 nmol/L BRU和1 mmol/L PM^[11], 继续培养24 h, 按照操作说明进行EdU标记, 4%多聚甲醛室温固定30 min, Apollo染色, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核, 最后通过显微镜观察来进行图像获取。计算EdU阳性细胞比并对结果进行统计学分析。实验重复三次。

1.2.3 流式细胞仪检测MGC-803细胞凋亡情况 收集1.2.2分组处理24 h后的MGC-803细胞, 用0.25%胰蛋白酶37 °C消化1 min, 培养于6孔板中(1×10^6 /孔), 取100 mL各组细胞悬液按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明进行处理, 使用流式细胞仪进行检测, 分析细胞凋亡率(早期凋亡和晚期凋亡的和)。

1.2.4 划痕愈合实验检测MGC-803细胞迁移能力情况 将1.2.2分组后的MGC-803细胞加入胰蛋白酶(0.25%)进行消化1 min, 以每孔 1×10^6 个转接于6孔细胞培养板中常规培养, 用无菌100 mL移液枪枪头垂直画出一道划痕, 形成损伤, 用不含钙、镁离子的PBS缓冲液洗涤, 然后继续培养48 h, 用显微镜(10 $\times$)观察0 h和48 h时划痕宽度(W), 分别记为 W_0 和 W_{48} , 计算细胞划痕愈合率, 划痕愈合率 $=[(W_0 - W_{48}) / W_0] \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell小室实验检测MGC-803细胞侵袭情

况 Transwell小室用基质胶包被, 将重悬MGC-803细胞用无胎牛血清培养基调整细胞浓度, 将细胞接种(1×10^5 /小室)至Transwell上室, 培养24 h, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 用0.1%结晶紫室温染色30 min。显微镜观察, 并拍照记录。统计侵袭细胞数目。

1.2.6 血管拟态形成实验 将1.2.2分组后MGC-803细胞加入0.25%胰蛋白酶, 37 °C消化1 min, 制备成单细胞悬液后接种(1×10^4 /孔)到96孔板中, 其中孔底预先加入Matrigel基质胶, 培养28 h后在倒置显微镜下观察MGC-803细胞成管情况, 每孔5个视野并拍照。

1.2.7 蛋白印迹法(Western blot, WB)检测SHH/GLI信号通路蛋白表达情况 收集1.2.2分组处理24 h后MGC-803细胞, 加入RIPA裂解液, 提取总蛋白, 按照BCA试剂盒上的操作说明来测定蛋白总量。经SDS-凝胶电泳分离后, 转印至PVDF膜上, 室温封闭1 h, 分别加入稀释比例均为1:1 000的兔源一抗SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2和GAPDH抗体4 °C孵育过夜; 加入稀释比例1:3 000的相应二抗, 室温孵育2 h。通过化学发光法用ECL试剂盒进行检测, 用ImageJ软件拍摄图像, 根据蛋白条带的灰度值来分析目的蛋白表达情况。蛋白相对表达水平以目的蛋白灰度值与内参GAPDH灰度值之比表示。

1.3 数据分析

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计学分析。数据采用平均数 $\pm$ 标准差表示, 进行单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK- q 检验, 使用Bonferroni检验进行多重比较校正。 $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BRU药物浓度筛选

使用浓度为0~1 600 nmol/L的BRU处理MGC-803细胞24、48、72 h后, 浓度在100 nmol/L以上时, MGC-803细胞存活率下降($P < 0.05$), 见表1。经计算, 24、48、72 h BRU的 IC_{50} 分别为1 049.37、950.81、858.95 nmol/L。由于800和1 600 nmol/L BRU处理后的细胞存活率没有统计学差异, 在保证细胞活性的情况下, 为在保证药效的同时维持细胞活性, 后续实验最终选用了200、400及800 nmol/L(均低于 IC_{50} 且对增殖有明显抑制作用)作为BRU的工作浓度。

2.2 BRU对MGC-803细胞增殖、凋亡的影响

与Ctrl组比较, L-BRU、M-BRU和H-BRU组

表1 BRU对MGC-803细胞存活率的影响

Table 1 The effect of BRU on the survival rate of MGC-803 cells

BRU药物浓度 BRU drug concentration	<i>n</i>	24 h细胞存活率/% 24 h cell survival rate /%	48 h细胞存活率/% 48 h cell survival rate /%	72 h细胞存活率/% 72 h cell survival rate /%
0 nmol/L	6	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
100 nmol/L	6	98.99±9.70	98.48±9.71	97.36±9.72
200 nmol/L	6	83.37±8.22 [#]	82.15±8.09 [#]	80.14±8.01 [#]
400 nmol/L	6	67.24±6.87 ^{*#&}	64.32±7.05 ^{*#&}	62.54±7.04 ^{*#&}
800 nmol/L	6	49.26±5.10 ^{*#&@}	47.56±5.13 ^{*#&@}	45.34±6.02 ^{*#&@}
1 600 nmol/L	6	47.26±4.88 ^{*#&@}	45.26±4.90 ^{*#&@}	43.12±5.81 ^{*#&@}
<i>F</i>		76.830	81.878	80.895
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与0 nmol/L比较; [#]*P*<0.05, 与100 nmol/L比较; [&]*P*<0.05, 与200 nmol/L比较; [@]*P*<0.05, 与400 nmol/L比较。

**P*<0.05 compared with 0 nmol/L; [#]*P*<0.05 compared with 100 nmol/L; [&]*P*<0.05 compared with 200 nmol/L; [@]*P*<0.05 compared with 400 nmol/L.

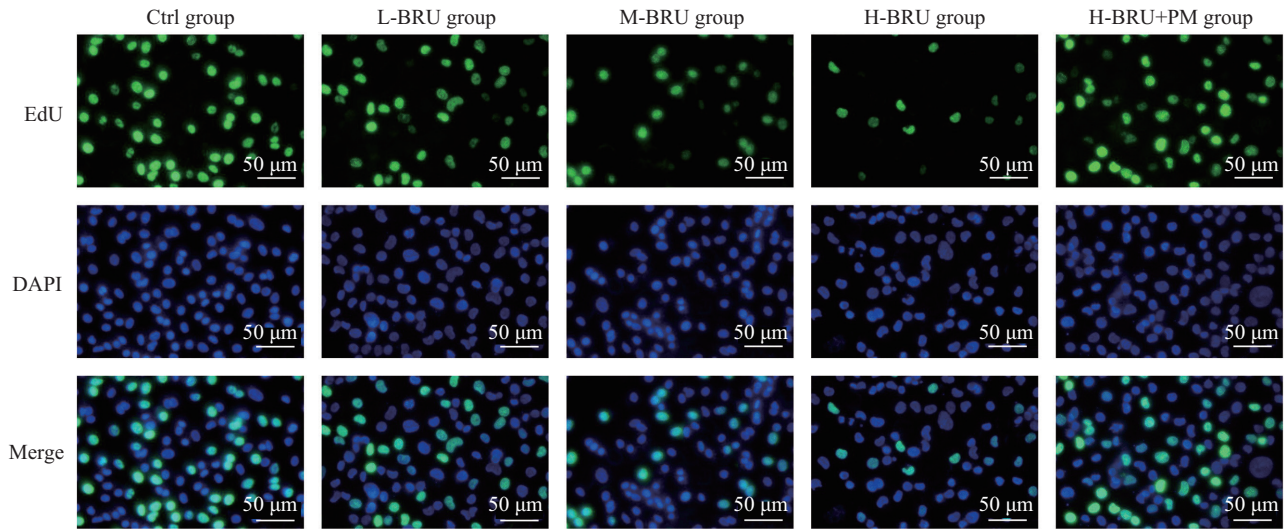


图1 BRU对MGC-803细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of BRU on the proliferation of MGC-803 cells

EdU阳性细胞百分比下降, MGC-803细胞凋亡率显著增加(*P*<0.05); 与H-BRU比较, H-BRU+PM组EdU阳性细胞百分比增加, MGC-803细胞凋亡率下降(*P*<0.05), 见图1、图2和表2。

2.3 BRU对MGC-803细胞迁移和侵袭的影响

与Ctrl组比较, L-BRU、M-BRU和H-BRU组MGC-803细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量降低(*P*<0.05); 与H-BRU比较, H-BRU+PM组MGC-803细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量增加(*P*<0.05), 见图3、图4和表2。

2.4 BRU对MGC-803细胞血管形成的影响

Ctrl组MGC-803细胞管腔结构相对完整; 与Ctrl组比较, L-BRU、M-BRU和H-BRU组, 管腔结构损坏程度增加, 形态越来越不完整, 管腔数量逐

渐降低(*P*<0.05); 而与H-BRU组比较, H-BRU+PM组管腔结构有明显改善, 管腔数量增加(*P*<0.05), 见图5和表3。

2.5 BRU对MGC-803细胞SHH/GLI信号通路的影响

与Ctrl组比较, L-BRU、M-BRU和H-BRU组, SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2、PTCH1、SMO蛋白表达明显下调(*P*<0.05); 而与H-BRU组比较, H-BRU+PM组SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2、PTCH1、SMO蛋白表达显著上调(*P*<0.05), 见图6和表4。

3 讨论

胃癌是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一, 早

表2 BRU对MGC-803细胞增殖、迁移的影响

Table 2 Effects of BRU on the proliferation and migration of MGC-803 cells

组别 Group	<i>n</i>	EdU阳性细胞/% Percentage of EdU-positive cells /%	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%	细胞侵袭数量 Number of cell invasion
Ctrl group	6	55.48±6.26	3.71±0.36	90.54±9.04	175.53±17.52
L-BRU group	6	40.27±5.12*	20.54±1.98*	73.25±7.32*	142.64±14.19*
M-BRU group	6	25.35±4.03* [#]	29.48±2.94* [#]	56.36±5.62* [#]	105.16±11.51* [#]
H-BRU group	6	13.68±3.16* ^{#&}	40.35±4.03* ^{#&}	35.87±3.54* ^{#&}	75.58±7.55* ^{#&}
H-BRU+PM group	6	43.57±5.34 [@]	22.17±2.20 [@]	72.14±7.21 [@]	141.45±14.08 [@]
<i>F</i>		66.549	160.227	54.857	49.584
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与Ctrl组比较; [#]*P*<0.05, 与L-BRU组比较; [&]*P*<0.05, 与M-BRU组比较; [@]*P*<0.05, 与H-BRU组比较。
**P*<0.05 compared with Ctrl group; [#]*P*<0.05 compared with L-BRU group; [&]*P*<0.05 compared with M-BRU group; [@]*P*<0.05 compared with H-BRU group.

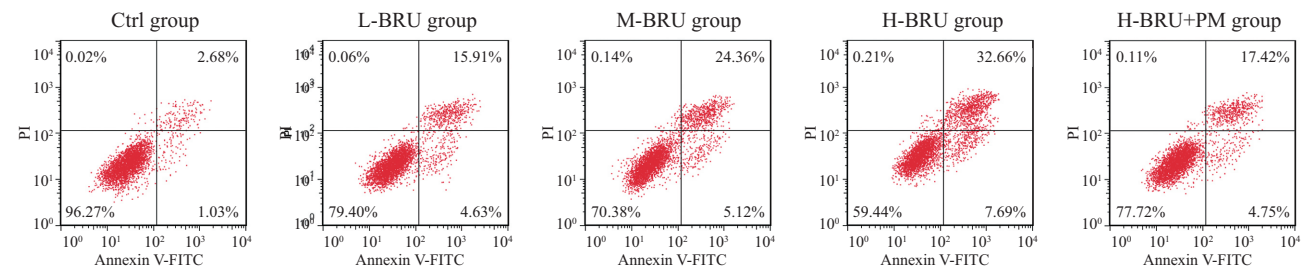


图2 BRU对MGC-803细胞凋亡的影响

Fig.2 The effect of BRU on apoptosis of MGC-803 cells

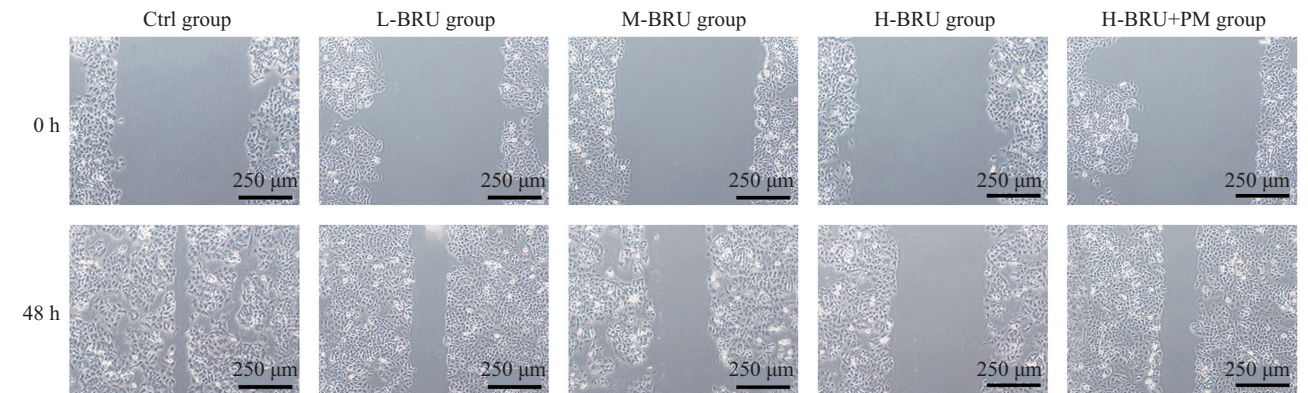


图3 BRU对MGC-803细胞迁移的影响

Fig.3 The effect of BRU on the migration of MGC-803 cells

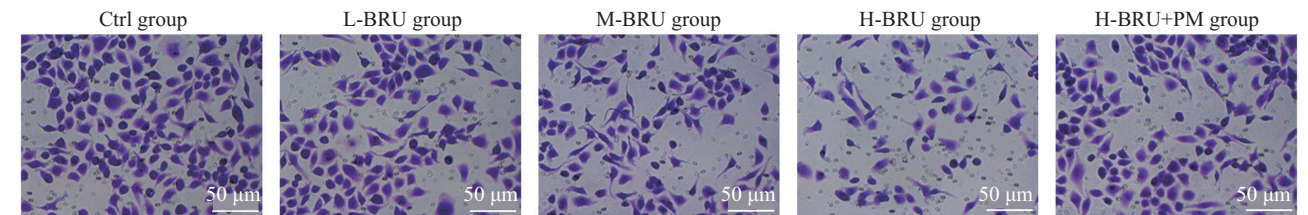


图4 BRU对MGC-803细胞侵袭的影响

Fig.4 The effect of BRU on the invasion of MGC-803 cells

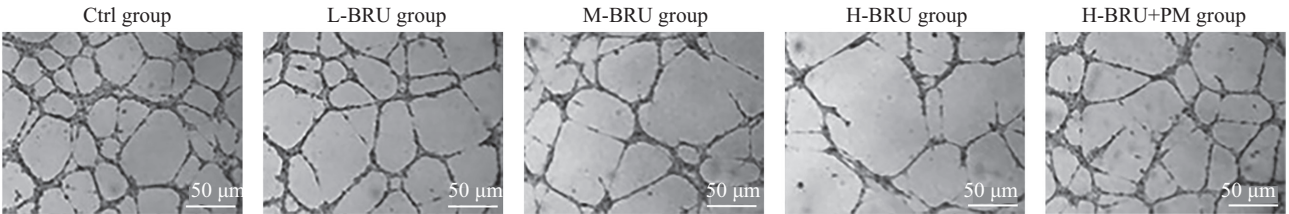


图5 BRU对MGC-803细胞血管形成的影响

Fig.5 The effect of BRU on angiogenesis of MGC-803 cells

表3 BRU对MGC-803细胞血管形成的影响

Table 3 The effect of BRU on angiogenesis in MGC-803 cells

组别 Group	<i>n</i>	管腔数量 Number of lumens
Ctrl group	6	42.83±4.28
L-BRU group	6	31.70±3.17*
M-BRU group	6	18.52±1.85*#
H-BRU group	6	9.35±0.92*#&
H-BRU+PM group	6	27.69±2.66@
<i>F</i>		123.093
<i>P</i>		<0.001

**P*<0.05, 与Ctrl组比较; #*P*<0.05, 与L-BRU组比较; &*P*<0.05, 与M-BRU组比较; @*P*<0.05, 与H-BRU组比较。

**P*<0.05 compared with Ctrl group; #*P*<0.05 compared with L-BRU group; &*P*<0.05 compared with M-BRU group; @*P*<0.05 compared with H-BRU group.

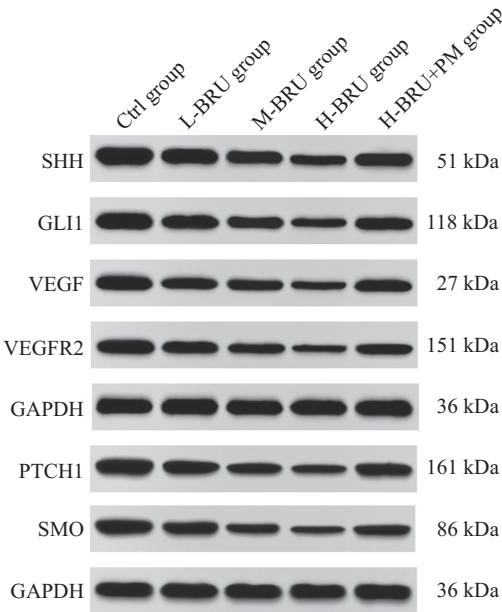


图6 BRU对MGC-803细胞SHH/GLI信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.6 The influence of BRU on the expression of proteins related to the SHH/GLI signaling pathway in MGC-803 cells

期胃癌没有特异性的临床症状, 不容易引起患者的注意, 导致大多数患者在晚期时才诊断出来^[4]。胃癌主要通过直接侵袭、血管转移、淋巴转移、腹腔内种植等途径转移^[12]。涉及胃癌转移的信号通路很多, 上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,

EMT)、胃癌细胞干性和肿瘤血管生成等都会使胃癌转移的信号通路被激活或抑制^[13]。由于胃癌具有高侵袭转移的特点, 其临床治愈率和长期生存率较低^[14]。因此, 深入研究胃癌的具体病理机制, 寻找新的有效治疗药物和方法, 对降低胃癌死亡率及延长

表4 BRU对MGC-803细胞SHH/GLI信号通路相关蛋白表达的影响

Table 4 The influence of BRU on the expression of SHH/GLI signaling pathway-related proteins in MGC-803 cells

组别 Group	<i>n</i>	SHH	GLI1	VEGF	VEGFR2	PTCH1	SMO
Ctrl group	6	1.23±0.12	1.12±0.11	0.95±0.09	0.92±0.09	1.09±0.10	1.05±0.09
L-BRU group	6	1.02±0.10*	0.93±0.09*	0.77±0.07*	0.73±0.07*	0.90±0.09*	0.83±0.08*
M-BRU group	6	0.78±0.07*#	0.73±0.07*#	0.59±0.06*#	0.56±0.05*#	0.70±0.08*#	0.62±0.06*#
H-BRU group	6	0.49±0.04*#&	0.45±0.04*#&	0.41±0.04*#&	0.39±0.03*#&	0.42±0.04*#&	0.38±0.04*#&
H-BRU+PM group	6	0.89±0.08@	0.86±0.08@	0.82±0.08@	0.78±0.07@	0.83±0.08@	0.76±0.07@
<i>F</i>		61.182	56.347	54.171	59.338	57.387	75.573
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与Ctrl组比较; #*P*<0.05, 与L-BRU组比较; &*P*<0.05, 与M-BRU组比较; @*P*<0.05, 与H-BRU组比较。

**P*<0.05 compared with Ctrl group; #*P*<0.05 compared with L-BRU group; &*P*<0.05 compared with M-BRU group; @*P*<0.05 compared with H-BRU group.

寿命至关重要。

BRU是从鸦胆子中提取的一种重要化合物,其药理作用能够诱导一系列生物学效应,包括抑制肿瘤细胞生长、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等^[15]。它对多种癌细胞具有很强的细胞毒性,因此显示出作为抗癌药物的潜力。例如:BRU可在体外抑制乳腺癌细胞生长并促进细胞凋亡^[16]。BRU可通过PI3K/Akt/NF-κB通路逆转脂多糖诱导的人胃癌SGC-7901细胞上皮-间充质转化,诱导细胞凋亡^[8]。BRU通过下调Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路进而促进铁死亡,诱导皮肤鳞癌细胞凋亡,并抑制皮肤鳞癌细胞增殖^[17]。BRU可通过抑制Nrf2/HO-1通路诱导铁死亡来抑制人胃癌细胞增殖^[18]。BRU通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活和NF-κB-p65的核转运,进而抑制非小细胞肺癌细胞的增殖,并诱导其凋亡^[19]。本研究通过系统评估不同浓度BRU对MGC-803细胞的抑制作用,发现200、400、800、1 600 nmol/L的BRU处理MGC-803细胞24、48、72 h后,细胞存活率均显著下降,而800和1 600 nmol/L BRU处理时细胞存活率没有统计学差异,提示可能存在抑制平台效应;基于量效关系,最终选择200、400、800 nmol/L 3个低于IC₅₀浓度作为后续实验BRU的药物浓度,既保证显著抑制效应,又避免过度细胞毒性干扰功能评估。功能验证实验结果显示,低、中、高浓度BRU处理后,MGC-803细胞增殖率、迁移和侵袭能力均呈现下降趋势,同时MGC-803细胞凋亡率增加,且具有浓度梯度依赖性,提示BRU能以浓度依赖方式抑制MGC-803细胞增殖、迁移与侵袭,促进细胞凋亡,为后续分子机制研究奠定了可靠的药效学基础。

SHH/GLI信号通路是一条在胚胎发育过程中起

重要作用的信号通路,SHH信号通路的主要效应分子是GLI家族的转录因子,包括GLI1、GLI2和GLI3等。其中,GLI1是SHH信号通路的主要转录激活因子,其表达水平与SHH信号通路的活性密切相关。研究表明,SHH/GLI1信号通路在癌症的发生、发展中也发挥着重要作用^[10-11]。有研究表明,SHH/GLI1通路在胃癌中表现出异常激活模式,可通过诱导EMT促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[20];党参炔苷可通过抑制SHH/GLI1信号通路抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,促进胃癌细胞的凋亡^[11]。研究显示,槐耳多糖可通过调节SHH/GLI1信号通路抑制肺癌细胞的增殖及血管生成,并促进其凋亡^[21]。利多卡因可通过下调SHH/GLI1信号通路来抑制胶质瘤细胞的增殖,并促进胶质瘤细胞凋亡^[22]。因此,SHH/GLI1通路被认为是胃癌的潜在治疗靶点。VEGF是促进血管生成的主要因子,肿瘤细胞释放的VEGF通过与其受体VEGFR2的胞外结构域结合促进内皮细胞增殖,诱导肿瘤血管生成^[23]。在晚期胃癌患者中VEGF呈现高表达,且有研究发现胃癌淋巴结转移与VEGF高表达密切相关^[12]。抑制VEGF表达有助于延缓血管生成进展^[24],且VEGF高表达与微血管密度相关,低表达VEGF的胃癌患者预后更好^[25]。基于VEGF参与肿瘤血管生成并在胃癌细胞中高表达的这一背景,本研究旨在探讨BRU对MGC-803细胞血管生成能力的影响。本研究显示,BRU处理细胞后管腔结构有不同程度损坏,形态不完整,管腔数量逐渐降低,SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2、PTCH1、SMO蛋白表达下调,且呈浓度依赖性,表明BRU能以浓度依赖方式抑制体外血管生成,并下调SHH/GLI1信号通路关键分子表达,提示SHH/GLI1信号通路的阻滞可

能是BRU抑制血管生成、细胞增殖、迁移侵袭及诱导细胞凋亡的分子机制。信号通路挽救实验结果显示,SHH激活剂PM与高浓度BRU共处理MGC-803细胞后,细胞增殖、迁移和侵袭能力提高,细胞凋亡能力降低,且管腔结构有改善,管腔数量有增加,SHH、GLI1、VEGF、VEGFR2、PTCH1、SMO蛋白表达回调。这表明BRU能通过抑制SHH/GLI信号通路来抑制MGC-803细胞增殖、迁移和血管生成。既往研究表明,BRU通过上调Chac1和下调Nrf2、SLC7A11表达抑制膀胱癌的生长,引发铁死亡^[26];在肾细胞癌中,BRU通过Wnt信号通路上调MEF2A表达抑制肾细胞癌进展^[27];在卵巢癌中,BRU通过抑制SPHK1/S1P/S1PR3信号通路诱导细胞凋亡,并抑制细胞生长、迁移及侵袭^[28]。本研究发现,BRU在胃癌MGC-803细胞中呈现出独特的分子作用模式:通过靶向抑制SHH/GLI信号通路,进而调控VEGF/VEGFR2介导的血管生成和侵袭迁移进程。这种机制特征与上述癌种存在明显差异,提示BRU可能具有“癌种特异性”的分子靶点选择倾向,其中SHH/GLI通路是BRU在胃癌中发挥作为的优势靶点,且药物作用机制可能受肿瘤微环境或表观遗传调控的影响。为验证这一假设,后续研究拟通过多组学分析(转录组+蛋白组)筛选BRU的癌种特异性靶点,利用类器官共培养模型评估微环境的影响,并通过CRISPR技术筛选关键调控因子。这种机制多样性的发现,不仅为BRU的精准临床应用提供了理论依据,也为开发针对不同癌种的差异化治疗方案开辟了新思路。

综上,BRU能通过抑制SHH/GLI信号通路来抑制MGC-803细胞增殖、迁移和血管生成。本研究的不足之处在于,本研究仅在细胞水平探讨了BRU对胃癌细胞的作用,且只使用了一种胃癌细胞系,缺乏其他细胞系的作用研究以及其在动物体内的抗肿瘤作用 and 安全性研究,对于BRU的其他作用机制,如BRU对SHH/GLI1信号转导过程中是否存在其他信号通路的相互作用,尚未进行深入研究。本研究未评估BRU潜在非特异性毒性,也未全面解析SHH与PI3K/Akt的交互细节,未来需通过LDH释放实验、ROS检测及其激酶活性测定和条件性基因敲除进一步验证。因此仍需要后续研究验证,为BRU的临床应用提供更加充分的理论依据。

参考文献 (References)

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statis-

tics, 2021 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.

- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] QIU H, CAO S, XU R. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020 [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(10): 1037-48.
- [4] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 57.
- [5] XI W, ZHAO C, WU Z, et al. Brusatol's anticancer activity and its molecular mechanism: a research update [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(7): 753-62.
- [6] GUO S, ZHANG J, WEI C, et al. Anticancer effects of brusatol in nasopharyngeal carcinoma through suppression of the Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85(1): 1097-108.
- [7] XIE J, LAI Z, ZHENG X, et al. Apoptotic activities of brusatol in human non-small cell lung cancer cells: involvement of ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Toxicology*, 2021, 451(1): 152680.
- [8] CHEN H, JIANG T, CHEN H, et al. Brusatol reverses lipopolysaccharide-induced epithelial-mesenchymal transformation and induces apoptosis through PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(4): 394-404.
- [9] JENG K S, CHANG C F, LIN S S. Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 758.
- [10] KOTULAK-CHRAŚCZAK A, KMIEĆ Z, WIERZBICKI P M. Sonic Hedgehog signaling pathway in gynecological and genitourinary cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(6): 1-20.
- [11] 孙海峰, 杨世玉, 王秀珍. 党参炔苷调节Shh/Gli1信号通路对胃癌细胞增殖、凋亡和上皮间质转化的影响[J]. 中国现代普通外科进展(SUN H F, YANG S Y, WANG X Z. The Effects of lobetyolin on proliferation, apoptosis, and epithelial mesenchymal transition of gastric cancer cells by regulating the Shh/Gli1 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Current Advances in General Surgery*), 2024, 27(3): 177-81.
- [12] 杨媛, 王岚. 血管内皮生长因子在胃癌诊疗中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志(YANG Y, WANG L. Research progress of vascular endothelial growth factor in the diagnosis and treatment of gastric cancer [J]. *Journal of Molecular Diagnostics and Therapy*), 2022, 14(11): 2018-22.
- [13] 杨蛟洋, 舒格格, 李东宝, 等. 信号通路在胃癌转移中作用的研究进展[J]. 基础医学与临床(YANG J Y, SHU G G, LI D B, et al. Research progress of signaling pathways in gastric cancer metastasis [J]. *Basic and Clinical Medicine*), 2023, 43(11): 1707-12.
- [14] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4012.
- [15] LU R, ZHAO G, JIANG R, et al. Brusatol inhibits proliferation

- and metastasis of colorectal cancer by targeting and reversing the RhoA/ROCK1 pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022(1): 7132159.
- [16] 刘丹, 胥旸, 邢晓静. 鸦胆子苦醇对三阴性乳腺癌细胞凋亡的影响[J]. 陕西中医(LIU D, XU Y, XING X J. Effects of BRU on apoptosis of triple negative breast cancer cells [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2021, 42(4): 419-22.
- [17] 湛程程, 何平, 黄宇婧, 等. 鸦胆子苦醇调节Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路对皮肤鳞癌细胞铁死亡的影响[J]. 重庆医科大学学报(CHEN C C, HE P, HUANG Y J, et al. Influence of brusatol on ferroptosis in cutaneous squamous cell carcinoma cells by regulating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. *Journal of Chongqing Medical University*), 2023, 48(4): 369-74.
- [18] 高薇, 曾海荣, 乐佳敏. 鸦胆子苦醇通过Nrf2/HO-1通路诱导细胞铁死亡抑制胃癌细胞HGC-27增殖[J]. 中国实验方剂学杂志(GAO W, ZENG H R, LE J M. Brusatol suppresses proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells through inducing ferroptosis via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2023, 29(2): 81-7.
- [19] 何爽, 杜玉梅, 唐加峰, 等. 鸦胆子苦醇抑制H1299非小细胞肺癌细胞增殖和促进其凋亡的机制[J]. 中国药理学通报(HE S, DU Y M, TANG J F, et al. Research of proliferation inhibition and apoptosis promotion mechanism of brusatol on H1299 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2022, 38(3): 360-6.
- [20] 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]. *J Cancer*, 2020, 11(13): 3932.
- [21] 曲锋, 张锦峰. 槐耳多糖调节Shh-Gli1信号通路对肺癌细胞增殖、凋亡和血管生成的影响[J]. 中国临床药理学杂志(QU F, ZHANG J F. Effects of Huaier polysaccharides on proliferation, apoptosis and angiogenesis of lung cancer cells by regulation of Shh-Gli1 signaling pathway [J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*), 2024, 40(7): 990-3.
- [22] 马俊, 向梅. 利多卡因通过SHH/GLI信号通路对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J]. 实用医学杂志(MA J, XIANG M. The effects of lidocaine on the malignant biological behavior of glioma cells through SHH/GLI signaling pathway [J]. *The Journal of Practical Medicine*), 2023, 39(11): 1403-8.
- [23] GHALEHBANDI S, YUZUGULEN J, PRANJOL M Z I, et al. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175586.
- [24] 谭蕊, 李论, 罗登. 飞燕草素调控RhoA/ROCK信号通路对结肠癌细胞生物学行为及血管生成拟态形成的影响[J]. 陕西医学杂志(TAN R, LI L, LUO D. Effects of delphinidin on the biological behavior and vasculogenic mimicry formation of colon cancer cells by regulating the RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Shaanxi Medical Journal*), 2024, 53(11): 1468-73.
- [25] KRUSZYNA Ł, MURAWA D, JAGODZIŃSKI P P, et al. The expression and prognostic significance of VEGF and CXCR4 in gastric cancer: correlation with angiogenesis, lymphangiogenesis and progression [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(7): 3075-88.
- [26] YU X, HE Z, WANG Z, et al. Brusatol hinders the progression of bladder cancer by Chac1/Nrf2/SLC7A11 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2024, 438(2): 114053.
- [27] WANG T, ZHOU Y, BAO H, et al. Brusatol enhances MEF2A expression to inhibit RCC progression through the Wnt signaling pathway in renal cell carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(23): 3897-910.
- [28] 钟明艳, 杨帆, 李海珍, 等. 鸦胆子苦醇调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国药房(ZHONG M Y, YANG F, LI H Z, et al. Effects of brusatol on the malignant biological behavior of ovarian cancer cells by regulating SPHK1/S1P/S1PR3 signaling pathway [J]. *China Pharmacy*), 2024, 35(16): 1991-7.