

千层纸素 A 通过调控 P4HB 蛋白介导的 hedgehog 信号抑制肝癌血管生成

周婷婷¹ 张燕¹ 刘兆国² 李万红¹ (1.海安市中医院药学部 江苏海安 226600; 2.南通大学药学院)

摘要 **目的:** 探讨脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基(P4HB)蛋白在千层纸素 A 抗肝癌血管生成中的作用及其可能的机制。**方法:** Western blot 检测 6 株人肝癌细胞系 HCCLM3、Huh7、HepG2、MHCC97-L、Bel-7402 及 SMMC-7721 中 P4HB 的蛋白表达。MTS 试剂盒检测受试化合物对 SMMC-7721 细胞体外增殖的影响;LDH 检测受试化合物对 SMMC-7721 细胞毒性影响;Western blot 法检测受试化合物对 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白表达的影响;构建 P4HB 干扰质粒并转染 SMMC-7721 细胞,Western blot 检测干扰转染效率;采用小管形成实验研究干扰 P4HB 对 SMMC-7721 细胞血管生成的影响;采用 Western blot 检测干扰 P4HB 对 SMMC-7721 细胞中 hedgehog (Hh)信号相关蛋白 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白表达影响;采用 ELISA 试剂盒检测激动 Hh 信号对 P4HB 蛋白调控 SMMC-7721 细胞血管内皮生长因子(VEGF)及血小板衍生生长因子(PDGF)分泌影响。**结果:** 6 株细胞中,SMMC-7721 细胞表达 P4HB 蛋白最高。与对照组相比,千层纸素 A 体外可显著抑制抑制 SMMC-7721 细胞的增殖($P<0.05$),并在 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时对细胞显示毒性作用($P<0.05$)。与对照组相比,千层纸素 A 可显著抑制 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白表达($P<0.05$);与对照干扰组相比,P4HB 干扰质粒可显著抑制 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白表达($P<0.05$),表明质粒构建成功;与对照干扰组相比,干扰 P4HB 可抑制 SMMC-7721 细胞的血管生成($P<0.05$),降低 SMMC-7721 细胞 Patched 及 Smo 的蛋白表达($P<0.05$),并升高 Hhip 蛋白表达($P<0.05$)。此外,与对照组相比,千层纸素 A 亦能够抑制 SMMC-7721 细胞 Patched 及 Smo 的蛋白表达($P<0.05$),并增加 Hhip 蛋白表达($P<0.05$)。与 P4HB 干扰组相比,激动 Hh 信号可减弱 P4HB 干扰所致的细胞 VEGF 及 PDGF 分泌下降的作用($P<0.05$)。**结论:** 千层纸素 A 能够通过抑制 P4HB 介导的 hedgehog 信号抑制肝癌细胞的血管生成。千层纸素 A 是抗肝癌血管生成疗法的潜在化合物。

关键词 千层纸素 A;肝癌;血管生成;脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基;Hedgehog 信号

中图分类号:R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2022)12-2061-07

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.001

Oroxylin A Inhibiting the Tumor Angiogenesis of Liver Cancer by Regulating P4HB-Mediated Hedgehog Signal

Zhou Tingting¹, Zhang Yan¹, Liu Zhaoguo², Li Wanhong¹ (1.Department of Pharmacy, Haian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Haian 226600, China; 2.School of Pharmacy, Nantong University)

ABSTRACT **Objective:** To study the role and mechanisms of prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide (P4HB) in oroxylin A against tumor angiogenesis of liver cancer.**Methods:** The expression of P4HB was examined by Western blot in six human liver cancer cells HCCLM3, Huh7, HepG2, MHCC97-L, Bel-7402 and SMMC-7721. MTS detection kit was used to test the effect of oroxylin A on the proliferation of SMMC-7721 cells. The toxicity of oroxylin A on SMMC-7721 cells was measured by LDH detection kit. Western blot was used to examine the effect of oroxylinA on the expression of P4HB in SMMC-7721 cells. P4HB shRNA plasmid was constructed and then transfected into SMMC-7721 cells. The transfection efficacy of P4HB shRNA plasmid was examined by Western blot. Tube formation was used to study the effect of P4HB knockdown on the tumor angiogenesis of SMMC-7721 cells. Western blot was used to study the effect of P4HB knockdown on the protein expression of Patched, Smo and Hhip in SMMC-7721 cells. ELISA was used to detect the effect of activation of Hh signal on the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) induced by P4HB knockdown in SMMC-7721 cells. **Results:** Western blot showed that SMMC-7721 cells had the highest expression of P4HB in six liver cancer cells. Compared to the control group, oroxylin A significantly inhibited the proliferation of SMMC-7721cells *in vitro* and showed toxic effect on SMMC-7721 cells at $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Oroxylin A notably inhibited the expression of P4HB in SMMC-7721 cells. Compared to the control shRNA, Western blot showed that P4HB shRNA significantly inhibited the expression of P4HB in SMMC-7721 cells ($P<0.05$), suggesting that the plasmid was successfully constructed. Compared to the control shRNA group, knockdown of P4HB evidently inhibited the tube formation of SMMC-7721 cells ($P<0.05$). Compared to the control shRNA group, knockdown of P4HB inhibited the expression of Patched and Smo ($P<0.05$), and increased the expression of Hhip in SMMC-7721 cells ($P<0.05$). In addition, compared to the control group, oroxylin A could inhibit the expression of Patched and Smo ($P<$

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81703884);2020 年度南通市市级科技计划(指导性)项目(编号:JCZ20164);2020 年度南通市药学会-常州四药医院药学基金科研项目(编号:ntyx2010)

通信作者:李万红 Tel:18934506558 E-mail: 18934506558@163.com

0.05), and increased the expression of Hhip in SMMC-7721 cells ($P<0.05$). Compared to the P4HB shRNA group, activation of Hh signal attenuated the inhibitory effects of P4HB depletion on the secretion of VEGF and PDGF ($P<0.05$). **Conclusion:** Oroxylin A can inhibit the tumor angiogenesis of liver cancer by suppressing the P4HB-mediated Hh signal. Oroxylin A is a potential candidate compound in the treatment of tumor angiogenesis in liver cancer.

KEY WORDS Oroxylin A; Liver cancer; Tumor angiogenesis; Prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide; Hedgehog signal

肝癌血管生成对于肝癌的演进及转移至关重要。研究发现,肝癌的生长依赖于新生的血管,这些新生血管不仅能够为肝癌的生长持续的提供营养物质和能量,还能够将肝癌细胞代谢产生废物排出^[1]。抑制肝癌血管生成已被证实可有效抑制肝癌的生长,进而控制肝癌的进展^[2]。因此,而目前临床抗肝癌血管生成的药物主要是一些单抗类的药物,如贝伐珠单抗等^[3],此类药物虽然具有一定的疗效,但临床使用中经常会出现耐药^[4],导致药效降低甚至无效。此外,单抗类药物使用成本较高,给社会和家庭带来巨大负担。因此,深入挖掘调控肝癌血管生成的调控机制,找寻并开发无毒、有效且容易获取的抗肝癌血管生成药物迫在眉睫。

黄芩是临床常用的一味中药,具有清热燥湿、泻火解毒、止血及安胎等功效,在我国具有悠久的药用历史和显著的药用价值^[5]。研究显示黄芩的主要活性成分包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及千层纸素 A (oroxylin A) 等^[6]。其中千层纸素 A 是一种黄酮类化合物,具有广泛的药理活性,如抗炎、抗肝脏脂肪变性、抗病毒、改善记忆障碍及抗肝纤维化等^[7]。此外,千层纸素 A 还具有广泛的抗肿瘤活性,能够对结肠癌、食管鳞状细胞癌、乳腺癌、非小细胞肺癌及肝癌的生长发挥抑制作用^[8]。文献调研发现,目前千层纸素 A 抗肝癌效应的机制研究主要集中在诱导凋亡和分化、逆转多药耐药及代谢调控等^[9],显示出较好的抗肝癌效应。纵观国内、外研究,尚未见千层纸素 A 调控肝癌血管生成的相关报道。

脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基 (prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide, P4HB) 是蛋白质二硫键异构酶基因家族的核心成员,它可作为内质网分子伴侣蛋白参与抑制错误折叠蛋白的聚集^[10]。已有研究发现,P4HB 蛋白在多个肿瘤组织中异常高表达,如肺癌、胶质瘤、非小细胞肺癌、肾透明细胞癌及肝癌等^[11]。此外,另有研究发现,过表达 P4HB 可通过上调上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进而促进肝癌的进展^[12],但 P4HB 蛋白是否介导千层纸素 A 对肝癌血管生成的调控及其调节机制尚未可知。因此,本研究拟选用人肝癌细胞为研究对象,首先明确千层纸素 A 对肝癌细胞增殖及 P4HB

蛋白表达影响,重点研究 P4HB 蛋白在调控肝癌细胞血管生成中的作用及其潜在机制,对于明确 P4HB 在肝癌血管生成中的作用及推动千层纸 A 作为潜在的抗肝癌血管生成候选化合物的开发具有重要价值。

1 材料与方法

1.1 细胞株

本实验中所使用的细胞包括 HepG2、MHCC97-L、Bel-7402、HCCLM3、Huh7 及 SMMC-7721 及人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 共 7 株细胞,均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (CBTCCAS, 中国上海)。

1.2 仪器与材料

Synergy H1 酶标仪 (美国基因有限公司); TS100 倒置光学显微镜 (日本尼康公司); ChemiDoc XRS+蛋白凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Microfuge 20R 冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Mini Protean Tetra 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Thermo-Mixer F1.5 恒温混匀仪 (德国 Eppendorf 公司)。

千层纸素 A (货号:480-11-5,批号:20210916-A) 购自成都普思有限公司;基质胶 (货号:1567ML005,批号:20210603) 购自南通启翔生物科技有限公司;细胞增殖 (MTS) 检测试剂盒 (货号:KGA327,批号:KG20210306-2) 购自凯基生物;乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (货号:C0016,批号:20200218) 购自碧云天;细胞转染用试剂 Lipofectamine 3000,货号:L3000008,从 Invitrogen 公司获取;平滑激动剂 (SAG) (货号:SF6836,批号:20210934) 够自碧云天;相关的 P4HB 干扰质粒及对照质粒,委托吉玛基因公司构建并通过商业化获取;P4HB 抗体 (批号:ab137110) 购自 Abcam 公司;Smo 抗体 (批号:sc-166685) 和 Hhip 抗体 (批号:sc-293265) 购自 Santa Cruz 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号:ab181602) 购自 Abcam 公司;血管内皮生长因子 (VEGF) (货号:H044-1,批号:JC20210318) 及血小板衍生生长因子 (PDGF) (货号:H030,批号:JC20210706); ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;VEGF 检测试剂盒 (货号:H044-1,批号:JC20210625)、PDGF 检测试剂盒 (货号:H030,批号:JC20220322) 均购自南京建成生物公司。

1.3 方法

1.3.1 Western blot 检测 6 株人肝癌细胞 P4HB 蛋白表达 分别培养 HepG2、MHCC97-L、Bel-7402、HCCLM3、Huh7 及 SMMC-77216 人肝癌细胞,根据实验要求处理好培养皿中的细胞,清洗完毕后,向培养皿中加入 RIPA 裂解液 200 μl ,使用蓝色枪头用力刮细胞 2 min,获得细胞总蛋白。采用 Bradford 法对提取的细胞进行蛋白定量,获得各组细胞蛋白的上样量。紧接着,进行 SDS-PAGE 电泳及转膜操作。转膜结束后封闭 PVDF,清洗干净后加入一抗 P4HB 置 4℃ 冰箱过夜。然后回收一抗,再次洗膜,清洗干净后在凝胶成像系统上曝光。实验重复 3 次。

1.3.2 MTS 法检测受试化合物对细胞增殖的影响

将对数生长期的 SMMC-7721 消化离心后,用 DMEM 完全培养基稀释细胞并吹打均匀获得细胞悬液,浓度为 2×10^5 个细胞/ml。将细胞悬液以每孔 200 μl 接种至 96 孔板中置培养箱培养。待孔内细胞涨至 75% 时加入不同浓度的千层纸素 A 处理,组别设为 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,每组设置 5 个复孔,对照组给与等体积的溶剂(DMSO),置培养箱培养继续作用 24 h。孵育结束后,向每孔加入 20 μl 的 MTS 试剂,继续孵育 3 h。处理完毕后,使用紫外分光光度计在 490 nm 波长下检测各孔的光密度($OD_{490\text{nm}}$)值。实验重复 3 次。

1.3.3 LDH 试剂盒检测千层纸素 A 对 SMMC-7721 细胞毒性影响 使用乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒检测千层纸素 A 对 SMMC-7721 细胞的毒性,具体操作按照说明书进行。实验重复 3 次。

1.3.4 P4HB 过表达质粒转染 ①培养细胞:将细胞种在 6 孔板中,培养密度达到 80% 时换成新鲜的完全培养基,待转染;②DNA/RNA 脂质体复合物的制备:先取适量的 DNA/RNA 加入含 125 μl opti-MEM 的 EP 管当中,同时取适量 Lipofectamine3000 试剂(DNA/RNA : lipo3000 = 1 : 1.5)加入含 150 μl opti-MEM 的另一 EP 管中,将两个 EP 管中液体轻轻混合放置 20 min,制备成 DNA/RNA 脂质体复合物;③细胞-DNA/RNA 脂质体复合物共培养:将 DNA/RNA 脂质体复合物加入相应的 6 孔板中,轻轻混匀,过表达质粒培养 48 h,干扰质粒培养 72 h;④筛选稳定表达的细胞株:实验采用的质粒抗性基因为嘌呤霉素,加入相应的抗菌药物筛选细胞,进行培养;⑤转染效果的验证:由于本实验所用的质粒不带荧光,因此采用的是 Western Blot 检测相关蛋白表达的方法,分为对照组、对照干扰组以及 P4HB 干扰组。

1.3.5 ELISA 检测 SMMC-7721 细胞上清液中 VEGF

及 PDGF 水平^[13] 在 96 孔板的每孔中加入已配制好的包被抗体的溶液 100 μl ,用膜封闭后放在 4℃ 冰箱过夜。然后去除孔内的液体并用洗涤缓冲液清洗孔板,清洗结束后放在吸水纸用力拍打,重复上述操作 3 次。最后加入封闭液于孔中,室温孵育 1 h 后重复上述清洗操作。完成上述操作后按照说明书的操作流程进行检测,酶标仪设定在 450 nm 处和 570 nm 处,检测每孔的光密度(OD)值。

1.3.6 小管形成实验检测干扰 P4HB 对 SMMC-7721 细胞血管生成影响^[14] 向已预冷的 96 孔板每孔加入 100 μl 基质胶,置培养箱培养 0.5 h。将 HU-VEC 细胞悬液(浓度已调整至 1×10^5 个细胞/ml)按每孔 100 μl 体积加入孔内。除空白对照组外,实验组每孔加入等体积已转染 P4HB 干扰质粒或对照质粒的 SMMC-7721 细胞上清液 150 μl 。处理完毕后,将 96 孔板置显微镜下观察管腔的形成并拍照,并采用 Image J 软件作定量分析。

1.3.7 Western blot 检测 SMMC-7721 细胞相关蛋白表达 根据实验要求处理好培养皿中的细胞,清洗完毕后,向培养皿中加入 RIPA 裂解液 200 μl ,使用刮刀刮下细胞,获得细胞总蛋白。采用 Bradford 法对提取的细胞进行蛋白定量,获得各组细胞蛋白的上样量。紧接着,进行 SDS-PAGE 电泳及转膜操作。转膜结束后封闭 PVDF,清洗干净后加一抗如 P4HB、Patched、Smo 及 Hhip 置 4℃ 冰箱过夜。然后回收一抗,再次洗膜,清洗干净后在凝胶成像系统上曝光。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad 5.0 软件进行数据处理,结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示并行单因素方差分析,均数间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

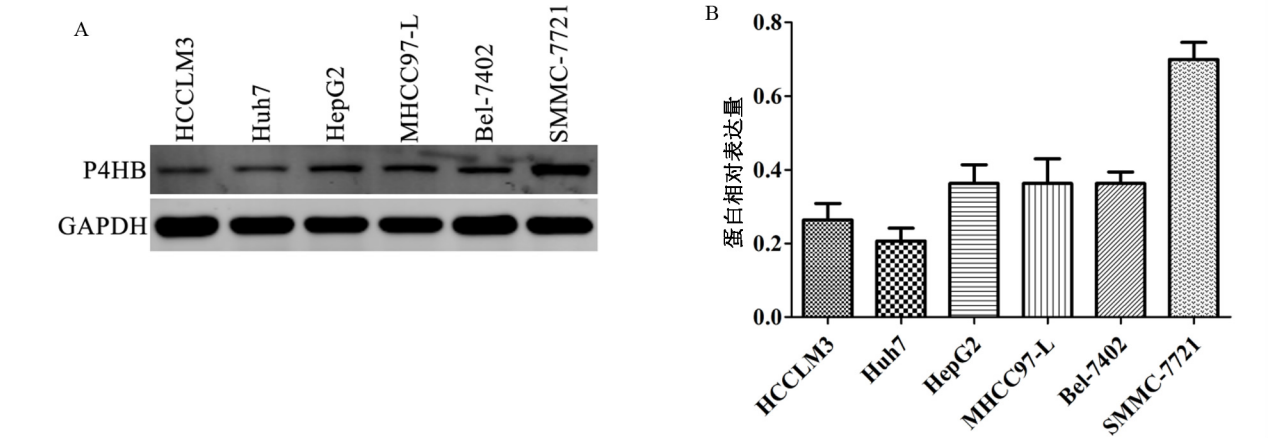
2 结果

2.1 人肝癌细胞系中 P4HB 蛋白表达检测

结果显示,在 6 株肝癌细胞中,SMMC-7721 细胞表达 P4HB 最高(见图 1)。基于该结果,后续选择 SMMC-7721 细胞做进一步深入研究。

2.2 千层纸素 A 对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响

与对照组相比,千层纸素 A 可浓度依赖性的抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即能够抑制对 SMMC-7721 细胞的增殖($P < 0.05$);与对照组相比,千层纸素 A 在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 SMMC-7721 细胞表现出毒性作用($P < 0.05$)。该实验研究结果为后续千层纸素 A 体外浓度的选择提供重要的实验依据。见表 1。



A.Western blotting 检测人肝癌细胞 P4HB 蛋白表达 B.蛋白表达定量

图 1 人肝癌细胞 P4HB 蛋白表达检测

表 1 SMMC-7721 细胞活力及毒性情况检测 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞活力		LDH 释放	
	12h	24h	12h	24h
对照组	0.98±0.04	0.98±0.03	1.00±0.08	1.00±0.10
千层纸素 A (2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.92±0.04	0.90±0.08	1.03±0.03	1.06±0.05
千层纸素 A (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.90±0.27	0.86±0.06	1.07±0.02	1.08±0.05
千层纸素 A (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.78±0.06 ^a	0.76±0.03 ^a	1.12±0.05	1.16±0.06
千层纸素 A (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.68±0.04 ^a	0.62±0.05 ^a	1.13±0.05	1.17±0.08
千层纸素 A (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.52±0.07 ^a	0.46±0.11 ^a	1.18±0.06	1.23±0.09
千层纸素 A (80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.43±0.06 ^a	0.41±0.12 ^a	1.24±0.06	1.31±0.08
千层纸素 A (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.33±0.06 ^a	0.31±0.07 ^a	1.44±0.08 ^a	1.49±0.06 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

2.3 千层纸素 A 对 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白表达的影响

与对照组相比,20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的千层纸素 A 能够抑制 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白的表达 ($P<0.05$),且在一定浓度范围内,具有浓度依赖性。见图 2、表 2。

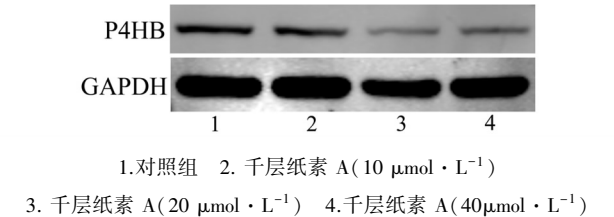


图 2 Western blot 测定各组 SMMC-7721 细胞 P4HB 蛋白表达情况

表 2 千层纸素 A 对 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白水平变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	P4HB 蛋白
对照组	—	0.42±0.046
千层纸素 A	10	0.36±0.04
千层纸素 A	20	0.14±0.06 ^a
千层纸素 A	40	0.13±0.05 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 P4HB 干扰质粒可显著降低 SMMC-7721 细胞 P4HB 蛋白表达

与对照组相比,转染对照干扰质粒对 SMMC-

7721 细胞 P4HB 蛋白表达无明显影响 ($P>0.05$); 与对照干扰组相比, P4HB 干扰质粒能够显著抑制 SMMC-7721 细胞的 P4HB 蛋白表达 ($P<0.05$),表明干扰质粒构建成功。见图 3、表 3。

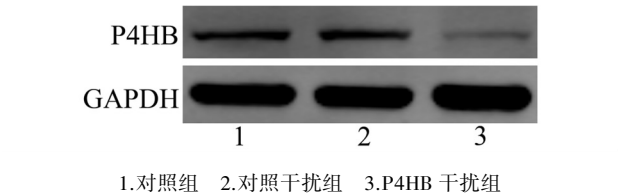


图 3 Western blot 测定各组 SMMC-7721 细胞 P4HB 蛋白表达情况

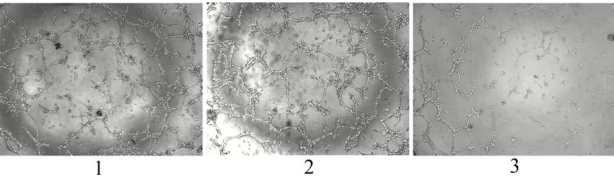
表 3 P4HB 干扰质粒对 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白水平变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	P4HB 蛋白
对照组	0.57±0.06
对照干扰组	0.56±0.06
P4HB 干扰组	0.14±0.05 ^a

注:与对照干扰组比较,^a $P<0.05$ 。

2.5 干扰 P4HB 对 SMMC-7721 细胞的血管生成的影响

与对照组相比,转染对照干扰质粒对 SMMC-7721 细胞的血管生成无明显影响 ($P>0.05$); 而与对照干扰组相比,干扰 P4HB 可显著抑制 SMMC-7721 细胞的血管生成 ($P<0.05$)。见图 4、表 4。



1.对照组 2.对照干扰组 3.P4HB 干扰组
图 4 各组 SMMC-7721 细胞血管生成情况 (50×)

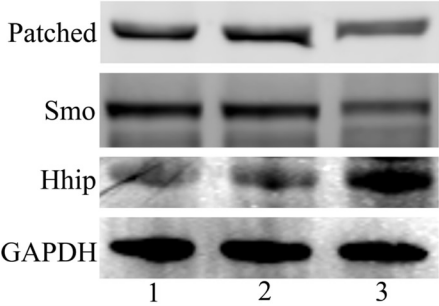
表 4 各组 SMMC-7721 细胞血管数目变化情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	小管数目(个)
对照组	128±8.12
对照干扰组	125±6.56
P4HB 干扰组	24.67±6.03 ^a

注:与对照干扰组比较, ^a $P<0.05$ 。

2.6 干扰 P4HB 对 SMMC-7721 细胞 hedgehog 信号活化的影响

与对照组比较,转染对照干扰质粒对 SMMC-7721 细胞中 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白表达无明显影响($P>0.05$);与对照干扰组相比,干扰 P4HB 可抑制 SMMC-7721 细胞中 Patched 及 Smo 蛋白的表达($P<0.05$),并增加 Hhip 蛋白表达($P<0.05$)。表明干扰 P4HB 蛋白可抑制 SMMC-7721 细胞 hedgehog 信号的活化。见图 5、表 5。



1.对照组 2.对照干扰组 3.P4HB 干扰组
图 5 Western blot 测定各组 SMMC-7721 细胞 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白表达情况

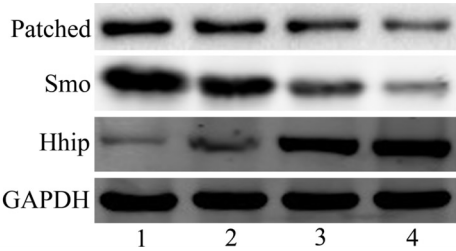
表 5 各组 SMMC-7721 细胞中 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白水平变化情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Patched 蛋白	Smo 蛋白	Hhip 蛋白
对照组	0.51±0.11	0.57±0.05	0.11±0.05
对照干扰组	0.50±0.07	0.56±0.06	0.10±0.04
P4HB 干扰组	0.22±0.05 ^a	0.17±0.11 ^a	0.76±0.06 ^a

注:与对照干扰组比较, ^a $P<0.05$ 。

2.7 千层纸素 A 对 SMMC-7721 细胞 Hh 信号活化的影响

与对照组相比,千层纸素 A 亦能够抑制 SMMC-7721 细胞中 Patched 及 Smo 蛋白的表达($P<0.05$),并增加 Hhip 蛋白表达($P<0.05$)。表明千层纸素 A 能够抑制 SMMC-7721 细胞 Hh 信号的活化。见图 6、表 6。



1.对照组 2. 千层纸素 A (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
3. 千层纸素 A (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4. 千层纸素 A (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 6 Western blot 测定各组 SMMC-7721 细胞 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白表达情况

表 6 各组 SMMC-7721 细胞中 Patched、Smo 及 Hhip 蛋白水平变化情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Patched 蛋白	Smo 蛋白	Hhip 蛋白
对照组	0.52±0.08	1.14±0.11	0.16±0.04
千层纸素 A (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.47±0.06	0.82±0.07 ^a	0.28±0.07 ^a
千层纸素 A (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.28±0.07 ^{ab}	0.33±0.08 ^{ab}	0.94±0.12 ^{ab}
千层纸素 A (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.17±0.06 ^{abc}	0.15±0.06 ^{abc}	1.18±0.10 ^{abc}

注:与对照组比较, ^a $P<0.05$;与千层纸素 A (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较, ^b $P<0.05$;与千层纸素 A (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较, ^c $P<0.05$ 。

2.8 激动 Hh 信号可减弱 P4HB 干扰诱导的血管生成抑制作用

与对照组相比,SAG 单独处理可显著促进 VEGF 和 PDGF 的分泌($P<0.05$);与对照组相比,P4HB 干扰可显著抑制 VEGF 和 PDGF 的分泌($P<0.05$);与 P4HB 干扰组相比,SAG 处理可显著减弱 P4HB 干扰所致的 VEGF 及 PDGF 分泌下降作用($P<0.05$)。上述研究结果表明,激动 Hh 信号可减弱 P4HB 干扰诱导的血管生成抑制作用。见表 7。

表 7 各组 SMMC-7721 细胞上清液 VEGF 及 PDGF 水平变化情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	上清液 VEGF 水平 (pg · ml ⁻¹)	上清液 PDGF 水平 (pg · ml ⁻¹)
对照组	127.97±6.81	19.08±2.84
SAG 组 (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	157.41±6.29 ^a	42.96±9.91 ^a
P4HB 干扰组	91.01±8.95 ^b	7.23±2.67 ^b
SAG+P4HB 干扰组	133.49±9.67 ^c	25.65±9.60 ^c

注:与对照组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$;与 P4HB 干扰组比较, ^c $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究首先在 6 株人肝癌细胞中检测 P4HB 蛋白的表达,选取了表达最高的 SMMC-7721 细胞进行后续的一系列研究。研究发现千层纸素 A 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,并能够抑制 SMMC-7721 细胞中 P4HB 蛋白的表达。此外,本文重点研究了 P4HB 蛋白在调控肝癌细胞血管生成中的作用及其

潜在机制。结果发现,干扰 P4HB 能够显著抑制 SMMC-7721 细胞的血管生成,表明在肝癌细胞中 P4HB 介导了血管生成的调控过程。此外,进一步研究发现,干扰 P4HB 能够抑制 SMMC-7721 细胞 hedgehog 信号的活化,而采用 SAG 激动 hedgehog 信号可显著减弱 P4HB 干扰所致的 VEGF 及 PDGF 分泌降低,表明激动 hedgehog 信号可减弱 P4HB 干扰诱导的血管生成抑制作用。因此,本研究结果表明:千层纸素 A 可通过抑制 P4HB 蛋白表达,阻断 hedgehog 信号活化,进而抑制血管生成相关因子 VEGF 及 PDGF 的分泌,发挥抗肝癌血管生成的作用。纵观国内外研究,尚未见从调控 P4HB 介导的 Hh 信号通路角度探究千层纸素 A 抗肝癌血管生成的作用,这是本研究的一个创新之处。

既往研究发现 P4HB 在临床肝癌组织中呈高表达,且 P4HB 的高表达伴随着肝癌患者存活率的降低。此外,深入研究发现 P4HB 能够促进肝癌的生成,过表达 P4HB 能够促进肝癌的生长、迁移、侵袭及 EMT,而沉默 P4HB 则能够抑制肝癌的生成;机制研究发现, P4HB 主要通过下调其分子伴侣 GRP78 的表达进而上调 EMT 过程,发挥促肝癌生长的作用^[15]。该研究表明 P4HB 介导了肝癌的发生与发展,是一个潜在的肝癌治疗靶点。此外,另有研究发现,P4HB 还参与了肝癌细胞对于化疗药物耐药的调节过程,并发现其主要通过调控 EMT 及 β -catenin/Snail 通路发挥其作用^[12]。最新研究证实,肝癌患者病变部位半乳糖化的 P4HB 可作为肝癌诊断的一个潜在的生物标志物^[16]。本研究发现, P4HB 还能够调控肝癌的血管生成过程,干扰 P4HB 可抑制肝癌细胞的血管生成。因此,本研究进一步丰富了对 P4HB 在肝癌中作用的认知,为未来可能的开发以 P4HB 为靶点的抗肝癌血管生成药物提供一定的理论依据。

Hh 信号通路是进化上高度保守的一个通路,其在胚胎发育、器官形成及维持正常的生理稳态方面发挥重要作用^[17]。Hh 信号异常活化参与了多种肝脏疾病的病理发生过程,如非酒精性脂肪肝、肝纤维化、肝硬化及肝癌等^[18]。既往研究发现,Hh 信号介导调控多种肿瘤的血管生成过程,而抑制 Hh 信号能够有效抑制肿瘤的血管生成^[19]。值得注意的是,已有研究显示,Hh 信号还参与调控 VEGF 等血管生成相关因子的分泌。研究发现,在肝纤维化病理状态下,给予 Hh 信号抑制剂环靶明可显著减少肝星状细胞 VEGF 的分泌^[20]。此外,在胰腺癌病理状态下,激活 Hh 信号能够促进肿瘤细胞 VEGF 等因子

的分泌,而阻断 Hh 信号则抑制 VEGF 的分泌,表明 Hh 信号参与调控了肿瘤细胞血管生成相关因子的分泌过程^[21]。本研究发现 Hh 激动剂 SAG 能够促进 SMMC-7721 细胞血管生成过程,而 SAG 处理还能够减弱 P4HB 干扰所诱导的 VEGF 及 PDGF 分泌减少,进一步表明 Hh 在肝癌中能够调控血管生成的效应,这与以往的研究结果保持一致。此外,本研究发现 P4HB 干扰能够抑制 Hh 信号,这是首次报道,也是本课题的创新性之一。

本研究的不足之处主要体现在以下几个方面,一是缺乏整体水平研究,千层纸素 A 在动物水平是否能够抑制 P4HB 的表达需要进一步的研究;二是血管生成的模型只有小管形成一种模型,后期准备通过大鼠动脉环或斑马鱼血管生成模型,进一步研究 P4HB 调控血管生成的效应。

综上,本研究发现千层纸素 A 能够通过抑制 P4HB 介导的 hedgehog 信号抑制肝癌细胞的血管生成,表明 P4HB 是治疗肝癌血管生成的潜在靶点之一,为推动千层纸素 A 作为潜在的抗肝癌血管生成候选化合物的开发具有重要价值。

参 考 文 献

- 1 Li D, Wang T, Sun FF, et al. MicroRNA-375 represses tumor angiogenesis and reverses resistance to sorafenib in hepatocarcinoma [J]. Cancer Gene Ther, 2021, 28(1-2):126-140
- 2 Wang F, Li Y, Jiang H, et al. Dual-ligand-modified liposomes Co-loaded with anti-angiogenic and chemotherapeutic drugs for inhibiting tumor angiogenesis and metastasis [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 4001-4016
- 3 Yang W, Li Z, Qin R, et al. YY1 promotes endothelial cell-dependent tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating VEGFA [J]. Front Oncol, 2019, 9: 1187
- 4 Pinter M, Jain RK, Duda DG. The current landscape of immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: areview [J]. JAMA Oncol, 2021, 7(1):113-123
- 5 Cui L, Wang W, Luo Y, et al. Polysaccharide from Scutellariabacalensis Georgi ameliorates colitis via suppressing NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation[J]. Int J BioMacromol, 2019, 132:393-405
- 6 Zhao F, Chang Y, Gao L, et al. Protective effects of Scutellariabacalensis Georgi extract on D-galactose induced aging rats[J]. Metab Brain Dis, 2018, 33(5):1401-1412
- 7 Kai J, Yang X, Wang Z, et al. Oroxylin A promotes PGC-1 α /Mfn2 signaling to attenuate hepatocyte pyroptosis via blocking mitochondrial ROS in alcoholic liver disease[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 153:89-102
- 8 Sun X, Chang X, Wang Y, et al. Oroxylin A suppresses the cell proliferation, migration, and EMT via NF- κ B signaling pathway in human breast cancer cells[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 9241769
- 9 Wei L, Dai Y, Zhou Y, et al. Oroxylin A activates PKM1/HNF4 alpha to induce hepatoma differentiation and block cancer progression [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2944
- 10 Zhang J, Guo S, Wu Y, et al. P4HB, a novel hypoxia target gene related to gastric cancer invasion and metastasis[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:9749751

PD-L1 反义寡核苷酸纳米颗粒对胃癌细胞侵袭和免疫因子分泌作用

赵鸿鹰 江荣科 李艳芳 朱梅 王雪 (徐州市肿瘤医院 徐州市第三人民医院 江苏大学附属徐州医院 江苏徐州 221000)

摘要 目的:探讨细胞程序性死亡蛋白配体 1(PD-L1)反义寡核苷酸纳米颗粒对胃癌细胞侵袭和免疫因子分泌的作用。**方法:**人胃癌细胞 AGS 分成对照(Control)组、聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒(PBCA-NP)组、PD-L1 正义寡核苷酸(SOND)组、PD-L1 反义寡核苷酸(ASOND)组、PD-L1 反义寡核苷酸纳米颗粒(ASOND-NP)组、ASOND-NP+胰岛素样生长因子 1(IGF-1)组,采用 Western Blot 法检测 PD-L1、磷酸化的磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)、PI3K、磷酸化的苏氨酸激酶(p-AKT)、AKT、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白的表达,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡率,Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭,ELISA 法检测血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素-6(IL-6)水平。**结果:**与 Control 组和 SOND 组比较,ASOND 组胃癌细胞中 PD-L1、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达减少,细胞增殖活性降低,细胞凋亡率升高,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2、PCNA 蛋白表达减少,细胞侵袭数目、迁移数目和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达均减少,细胞分泌的 VEGF、TGF-β、IL-6 均减少($P<0.05$);与 PBCA-NP 组和 ASOND 组比较,ASOND-NP 组胃癌细胞中 PD-L1、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达减少,细胞增殖活性降低,细胞凋亡率升高,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2、PCNA 蛋白表达减少,细胞侵袭数目、迁移数目和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达均减少,细胞分泌的 VEGF、TGF-β、IL-6 均减少($P<0.05$);与 ASOND-NP 组比较,ASOND-NP+IGF-1 组胃癌细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达增多,细胞增殖活性升高,细胞凋亡率降低,Bax 蛋白表达减少,Bcl-2、PCNA 蛋白表达增多,细胞侵袭数目、迁移数目和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达均增多,细胞分泌的 VEGF、TGF-β、IL-6 均增多($P<0.05$)。**结论:**PD-L1 反义寡核苷酸纳米颗粒通过抑制 PI3K/AKT 信号抑制胃癌细胞侵袭、迁移并减少免疫因子 VEGF、TGF-β、IL-6 分泌。

关键词 程序性死亡蛋白配体 1;纳米颗粒;胃癌;免疫因子;侵袭

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2022)12-2067-07

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.002

Effects of PD-L1 Antisense Oligonucleotide Nanoparticles on the Invasion and Immune Factor Secretion of Gastric Cancer Cells

Zhao Hongying, Jiang Rongke, Li Yanfang, Zhu Mei, Wang Xue (Xuzhou Cancer Hospital, Xuzhou Third People's Hospital, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Jiangsu Xuzhou 221000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of PD-L1 antisense oligonucleotide nanoparticles on the invasion and immune factor secretion of gastric cancer cells. **Methods:** Human gastric cancer cells AGS were divided into control group, polybutylene cyanoacrylate nanoparticles (PBCA-NP) group, PD-L1 sense oligonucleotide (SOND) group, PD-L1 antisense oligonucleotide (ASOND)

通信作者:赵鸿鹰 Tel:19851698777 E-mail:ed82343@163.com

=====

11 Zhu Z, He A, Lv T, et al. Overexpression of P4HB is correlated with poor prognosis in human clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2019, 26(4):431-439

12 Ma X, Wang J, Zhuang J, et al. P4HB modulates epithelial-mesenchymal transition and the β-catenin/Snail pathway influencing chemoresistance in liver cancer cells[J]. Oncol Lett, 2020, 20(1):257-265

13 王冰冰, 曹庆营, 冯社军, 等. 脑栓通胶囊联合注射阿替普酶治疗急性脑梗死疗效及对患者血清 NT-proBNP、TNF-α 水平的影响观察[J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30(9):586-590

14 杨忠英, 岳德永, 程凤娇. 复方斑蝥胶囊对肝癌细胞 Hippo/YAP 通路及血管生成拟态的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(11):1983-1992

15 Xia W, Zhuang J, Wang G, et al. P4HB promotes HCC tumorigenesis through downregulation of GRP78 and subsequent upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Oncotarget, 2017, 8(5):8512-8521

16 Kong Y, Chen H, Chen M, et al. Abnormal ECA-binding membrane glycans and galactosylated CAT and P4HB in lesion tissues as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. Front Oncol, 2022, 12:855952

17 Walton KD, Gumucio DL. Hedgehog signaling in intestinal development and homeostasis[J]. Annu Rev Physiol, 2021, 83:359-380

18 Cao L, Zhang Z, Zhang P, et al. Role of canonical hedgehog signaling pathway in liver[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(12):1636-1644

19 Zhou H, Li X, Wu RX, et al. Periodontitis-compromised dental pulp stem cells secrete extracellular vesicles carrying miRNA-378a promote local angiogenesis by targeting Sufu to activate the Hedgehog/Gli1 signalling[J]. Cell Proliferation, 2021, 54(5):e13026

20 Zhang F, Hao M, Jin H, et al. Canonical hedgehog signalling regulates hepatic stellate cell-mediated angiogenesis in liver fibrosis[J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(5):409-423

21 Bausch D, Fritz, Bolm L, et al. Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer[J]. Angiogenesis, 2020, 23(3):479-492

(2022-05-26 收稿 2022-09-15 修回)

2067