



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007
China Journal of General Surgery, 2023, 32(2):221-230.

· 基础研究 ·

扁蒴藤素对肝细胞癌细胞生物学行为及吉西他滨化疗敏感性的影响

于彬¹, 于勇², 时磊¹, 袁俊建³

(河北省沧州市中心医院 1. 肝胆胰外二科 3. 肝胆胰外一科, 河北 沧州 061000; 2. 河北省东光县中医医院 急诊科, 河北 东光 061600)

摘要

背景与目的: 研究显示, 扁蒴藤素 (PT) 可通过多种机制调控癌细胞增殖、凋亡、迁移及血管生成, 然而其对肝细胞癌 (HCC) 的作用研究较少。因此, 本研究探讨 PT 对体外培养的 HCC 细胞生物学行为及其对 HCC 细胞吉西他滨 (GEM) 化疗敏感性的影响, 并分析机制。

方法: CCK-8 法检测 PT、GEM 对 HCC 细胞株 Huh7、SMMC-7721 及 HepG2 细胞增殖抑制作用; 根据 CCK-8 实验结果, 选择合适的 HCC 细胞株与药物浓度用于后续实验; 分别用 GEM (GEM 组)、PT (PT 组)、GEM 联合 PT (GEM+PT 组)、Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 FH535 (FH535 组) 处理 HCC 细胞, 以单纯培养的细胞为对照组, 然后分别用流式细胞术、平板克隆形成实验、细胞划痕、Transwell 实验及 qRT-PCR 技术检测各组细胞凋亡、集落形成、迁移、侵袭及细胞 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 表达情况; 同时用 Western blot 法检测 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、波形蛋白 (Vim)、E-钙黏蛋白 (E-cad) 及 cleaved caspase 3 (C-caspase-3) 蛋白的表达。

结果: PT 与 GEM 均能明显抑制 Huh7、SMMC-7721 及 HepG2 细胞的增殖, 且呈浓度依赖性 (均 $P < 0.05$)。选择 Huh7 细胞为研究对象, PT、GEM、FH535 的作用浓度分别为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组比较, GEM 组、PT 组、GEM+PT 组及 FH535 组细胞凋亡率、E-cad 及 C-caspase-3 蛋白相对表达量升高, 集落形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数、c-myc、cyclin D1 和 survivin mRNA 及 β -catenin、p-GSK-3 β 和 Vim 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 且 GEM 组、PT 组、GEM+PT 组、FH535 组对 Huh7 细胞的上述变化依次逐渐增强 (均 $P < 0.05$)。

结论: PT 对 HCC 细胞的恶性生物学行为有明显的抑制作用, 且可增强 HCC 细胞的 GEM 化疗敏感性, 其作用机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活有关。

关键词

癌, 肝细胞; 扁蒴藤素; 吉西他滨; Wnt 信号通路

中图分类号: R735.7

Effects of pristimerin on biological behavior and the sensitivity to gemcitabine chemotherapy in hepatocellular carcinoma cells

YU Bin¹, YU Yong², SHI Lei¹, YUAN Junjian³

(1. The Second Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery 3. the First Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China; 2. Emergency Department, Dongguang County Hospital of Traditional

基金项目: 河北省医学科学研究课题基金资助项目 (20211343)。

收稿日期: 2022-08-18; **修订日期:** 2023-01-20。

作者简介: 于彬, 河北省沧州市中心医院主治医师, 主要从事肝胆胰疾病相关研究。

通信作者: 于彬, Email: yubin03093@163.com

Chinese Medicine, Dongguang, Hebei 061600, China)

Abstract

Background and Aims: Studies have demonstrated that pristimerin (PT) can regulate the proliferation, apoptosis, migration and angiogenesis of cancer cells through multiple mechanisms. However, its role in hepatocellular carcinoma (HCC) has been less studied. Therefore, this study was conducted to investigate the effect of PT on the biological behavior of HCC cultured in vitro and its impact on the sensitivity of HCC cells to gemcitabine (GEM) chemotherapy, as well as the mechanism.

Methods: The inhibitory effects of PT and GEM on the proliferation of HCC cell lines (Huh7, SMMC-7721 and HepG2) were detected by CCK-8 assay. The suitable HCC cell line and drug concentrations were selected for subsequent experiments according to the results of CCK-8 assay. HCC cells were exposed to GEM (GEM group), PT (PT group), GEM plus PT (GEM+PT group) or Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor FH535 (FH535 group), respectively, using the purely cultured cells as the control group. Then, the apoptosis, colony formation, migration, invasion and the mRNA expressions of c-myc, cyclin D1 and survivin were detected by flow cytometry, plate cloning test, cell scratch assay, Transwell test and qRT-PCR, respectively. At the same time, Western blot technology was used to detect the protein expressions of β -catenin, GSK-3 β , p-GSK-3 β , vimentin (Vim), E-cadherin (E-cad) and cleaved caspase 3 (C-caspase-3).

Results: The proliferation rates of Huh7, SMMC-7721 and HepG2 cells were significantly decreased after exposure to both PT and GEM, with a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). The Huh7 cells were chosen as the study object, and the treatment concentrations of PT, GEM and FH535 used were 2.0 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with control group, the apoptosis rate, the relative protein expressions of E-cad and C-caspase-3 were increased, the number of colony formation, scratch healing rate, the number of invasive cells, the relative mRNA expressions of c-myc, cyclin D1, survivin and protein expressions of β -catenin, p-GSK-3 β and Vim were decreased in GEM group, PT group, GEM+PT group (all $P < 0.05$). The above changes in Huh7 cells were increased successively in order of GEM group, PT group, GEM+PT group and FH535 groups (all $P < 0.05$).

Conclusion: PT has significant inhibitory effect on the malignant biological behavior of HCC cells, and can enhance the sensitivity of HCC cells to GEM. The mechanism may be related to its inhibition of the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Pristimerin; Gemcitabine; Wnt Signaling Pathway

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌亚型, 发生率和病死率较高, 无限增殖和转移是其主要特征, 也是全球癌症相关死亡的主要原因之一^[1-2]。由于缺乏早期体征, HCC 往往确诊时已为晚期且无法切除, 且由于其高度转移性、复发性及普遍的化疗耐药性, HCC 治疗策略有限, 病死率持续接近发病率水平, 5年生存率低至14%~18%^[3], 提高HCC细胞化疗敏感性对改善预后, 提高患者生存率将具有重要意义。吉西他滨 (gemcitabine, GEM) 目前被用作肝癌和胰腺

癌的一线治疗药物, 但癌细胞的化疗耐药性严重限制了其疗效^[4]。扁蒴藤素 (pristimerin, PT) 是一种具有抗炎和抗癌活性的天然醌类三萜, 据报道^[5], 其可介导多种机制调控癌细胞周期进程、增殖、迁移、凋亡及血管生成。Wnt/ β -catenin 信号通路已成为抗肿瘤治疗的有效靶标, 与癌症多种恶性生物学行为相关, 研究^[6]发现, 通过抑制该通路可有效提高癌细胞的化疗敏感性。因此, 本实验通过利用PT及GEM干预体外培养的HCC细胞, 探讨PT对体外培养的HCC细胞生物学行为的影响和

PT是否可提高HCC细胞对GEM化疗敏感性及其与Wnt/ β -catenin信号通路的关系, 以期为HCC化疗治疗及预后改善的策略制定提供一定的参考资料。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人HCC细胞株Huh7、SMMC-7721及HepG2细胞购自上海ATCC细胞库。

1.2 试剂和仪器

GEM(纯度 $\geq 99\%$)购自广州糖姆氏生命科学有限公司; PT(纯度 $\geq 98\%$)购自成都普菲德生物技术有限公司; FH535(Wnt/ β -catenin信号传导抑制剂)购自MCE公司; Matrigel基质胶购自美国Corning公司; AnnexinV-FITC/PI流式细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; 兔抗 β -catenin单克隆抗体、兔抗裂解caspase-3(cleaved caspase 3, C-caspase-3)多克隆抗体、兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)单克隆抗体购自美国Abcam公司; 兔抗波形蛋白(vimentin, Vim)多克隆抗体购自北京博奥森生物科技有限公司; 兔抗糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase3 β , GSK-3 β)单克隆抗体购自北京百奥莱博科技有限公司; 兔抗p-GSK-3 β 多克隆抗体购自PL Laboratories公司; ABI 7300型实时荧光定量PCR系统购自美国ABI公司; 550型全自动酶标仪购自美国Bio-Rad公司; Gel Doc XR+凝胶成像分析系统购自美国BIO-RAD公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养液接种Huh、SMMC-7721及HepG2细胞, 并于37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。于对数生长期利用胰蛋白酶消化处理后传代, 传代培养2~3次。

1.3.2 CCK-8法检测不同浓度PT及GEM对HCC细胞的增殖抑制作用 收集对数期细胞沉淀, 利用含不同浓度PT(0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$)及GEM(0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)的RPMI 1640完全培养液重悬, 以每孔1000个细胞密度接种于96孔板中, 每个浓度各5个复孔。培养48 h后, 各孔均加入10 μL CCK-8溶液, 37℃下孵育2 h, 450 nm处测定吸光度(OD)值, 细胞存活率(%) = 实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$,

均以0 $\mu\text{mol/L}$ 药物培养为对照组。

1.3.3 细胞分组 CCK-8实验后, 选择合适的HCC细胞系为研究对象, 将细胞分为对照组(仅RPMI 1640完全培养液)、GEM组(RPMI 1640完全培养液+GEM 20 $\mu\text{mol/L}$)、PT组(RPMI 1640完全培养液+PT 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、GEM+PT组(RPMI 1640完全培养液+GEM 20 $\mu\text{mol/L}$ +PT 1.0 $\mu\text{mol/L}$)及FH535组(20 $\mu\text{mol/L}$)并利用对应培养液培养以用于后续实验检测。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集各组培养48 h后的HCC细胞, PBS洗涤2次, 3000 r/min离心5 min, 将细胞沉淀重悬于500 μL 1 \times 结合缓冲液重悬并调整细胞密度为1 $\times 10^6$ /mL, 混入5 μL Annexin V-FITC溶液、5 μL PI溶液室温避光染色15 min, 1 h内通过流式细胞仪检测细胞凋亡率, 重复3次。

1.3.5 平板克隆形成实验检测细胞集落形成能力 HCC细胞以每孔1 $\times 10^3$ 个细胞密度接种至6孔板内, 24 h后各组对应培养液培养, 每3天换液1次, 培养2周。PBS洗涤2次, 4%多聚甲醛溶液室温固定15 min, 0.1%结晶紫溶液染色10 min, PBS洗涤2次, 晾干, 镜下观察集落形成情况, 计数含有超过50个细胞的集落。

1.3.6 细胞划痕试验检测细胞迁移能力 利用RPMI 1640完全培养液接种HCC细胞至24孔板, 培养直至汇合, 无菌10 μL 移液枪头划痕形成无细胞区, PBS洗涤, 更换不含胎牛血清的对应培养液继续培养48 h, 在划痕后0 h和48 h拍照, Image J软件测量划痕宽度, 划痕愈合率(%) = (0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$, 用于评估细胞迁移能力, 重复3次。

1.3.7 Transwell实验检测细胞侵袭能力 对照组培养液(不含胎牛血清)以每孔5 $\times 10^4$ 个细胞接种HCC细胞至Transwell 24孔板上室(涂布Matrigel基质胶), 下室加入500 μL 含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养液, 48 h后, 4%多聚甲醛固定Transwell下侧侵入细胞20 min, 0.1%结晶紫染色5 min, 镜下观察并拍照、计数, 重复3次。

1.3.8 qRT-PCR技术检测相关因子mRNA相对表达水平 TRIzol试剂提取各组培养48 h后的HCC细胞总RNA, 纯度测试后, 将RNA反转录为cDNA, 制备反应体系并于ABI7300系统上进行qRT-PCR分析。反应条件为95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s,

73 °C 10 s 下进行 40 个循环。以 GAPDH 为内参， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列如下：c-myc 正向：5'-TTC TCT CCG TCC TCG GAT TC-3'，反向：5'-GTA GTT GTG CTG ATG TGT GG-3'；细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 正向：5'-CCC TCG GTG TCC TAC TTC AA-3'，反向：5'-GGG GAT GGT CTC CTT CAT CT-3'；凋亡抑制基因 (survivin) 正向：5'-AAA TGC ACT CCA GCC TCT GT-3'，反向：5'-TTG TCG AGG AAG CTT TCA GGT-3'；GAPDH 正向：5'-CTC CTC CTG TTC GAC AGT CAG C-3'，反向：5'-CCC AAT ACG ACC AAA TCC GTT-3'。

1.3.9 Western blot 技术检测细胞中相关蛋白相对表达量 收集各组培养 48 h 后的 HCC 细胞，RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白，BCA 蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度，SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品，并将蛋白转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶封闭，一抗内 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜，洗膜，辣根过氧化物酶偶联的二抗内 (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h，洗膜，ECL 发光溶液显色，凝胶成像系

统成像并使用 Image J 软件进行量化，以目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值比值表示蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理

SPSS 26.0 软件进行数据统计学处理，多计量资料比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 LSD-*t* 检验，计量结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 PT、GEM 对 Huh7、SMMC-7721 及 HepG2 细胞存活率的影响

Huh7、SMMC-7721 及 HepG2 细胞存活率均随 PT、GEM 作用浓度增大而降低 (均 $P < 0.05$)。PT、GEM 作用浓度分别为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 Huh7 细胞的增殖抑制率接近 50%，结合 2.0 $\mu\text{mol/L}$ PT、20 $\mu\text{mol/L}$ GEM 对 SMMC-7721 及 HepG2 细胞抑制作用较强，故后续实验以 Huh7 细胞作为研究对象 (表 1-2)。

表 1 不同浓度 PT 培养下各细胞存活率 (%， $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Cell survival rates under different concentrations of PT (%， $\bar{x} \pm s$)

PT 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	Huh7	SMMC-7721	HepG2
0	100	100	100
0.25	91.75 \pm 3.24 ¹⁾	90.63 \pm 2.13 ¹⁾	91.44 \pm 3.46 ¹⁾
0.5	82.11 \pm 2.82 ^{1),2)}	67.15 \pm 1.95 ^{1),2)}	72.51 \pm 2.36 ^{1),2)}
1.0	62.10 \pm 2.61 ^{1),2),3)}	50.02 \pm 1.75 ^{1),2),3)}	55.36 \pm 1.95 ^{1),2),3)}
2.0	49.18 \pm 2.40 ^{1),2),3),4)}	38.44 \pm 2.11 ^{1),2),3),4)}	39.16 \pm 2.11 ^{1),2),3),4)}
4.0	35.20 \pm 1.62 ^{1),2),3),4),5)}	26.71 \pm 1.85 ^{1),2),3),4),5)}	25.45 \pm 2.63 ^{1),2),3),4),5)}

注：1) 与 0 $\mu\text{mol/L}$ PT 比较， $P < 0.05$ ；2) 与 0.25 $\mu\text{mol/L}$ PT 比较， $P < 0.05$ ；3) 与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ PT 比较， $P < 0.05$ ；4) 与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ PT 比较， $P < 0.05$ ；5) 与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ PT 比较， $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ PT; 2) $P < 0.05$ vs. 0.25 $\mu\text{mol/L}$ PT; 3) $P < 0.05$ vs. 0.5 $\mu\text{mol/L}$ PT; 4) $P < 0.05$ vs. 1.0 $\mu\text{mol/L}$ PT; 5) $P < 0.05$ vs. 2.0 $\mu\text{mol/L}$ PT

表 2 不同浓度 GEM 培养下各细胞存活率比较 (%， $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Cell survival rates under different concentrations of GEM (%， $\bar{x} \pm s$)

GEM 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	Huh7	SMMC-7721	HepG2
0	100	100	100
2.5	92.47 \pm 1.96 ¹⁾	93.16 \pm 3.46 ¹⁾	94.15 \pm 3.44 ¹⁾
5	83.78 \pm 2.31 ^{1),2)}	80.11 \pm 3.11 ^{1),2)}	82.27 \pm 3.96 ^{1),2)}
10	70.49 \pm 3.85 ^{1),2),3)}	60.36 \pm 4.02 ^{1),2),3)}	54.13 \pm 2.75 ^{1),2),3)}
20	50.20 \pm 2.92 ^{1),2),3),4)}	47.16 \pm 2.65 ^{1),2),3),4)}	43.17 \pm 3.16 ^{1),2),3),4)}
40	38.63 \pm 2.07 ^{1),2),3),4),5)}	32.11 \pm 2.13 ^{1),2),3),4),5)}	29.86 \pm 3.45 ^{1),2),3),4),5)}

注：1) 与 0 $\mu\text{mol/L}$ GEM 比较， $P < 0.05$ ；2) 与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ GEM 比较， $P < 0.05$ ；3) 与 5 $\mu\text{mol/L}$ GEM 比较， $P < 0.05$ ；4) 与 10 $\mu\text{mol/L}$ GEM 比较， $P < 0.05$ ；5) 与 20 $\mu\text{mol/L}$ GEM 比较， $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ GEM; 2) $P < 0.05$ vs. 2.5 $\mu\text{mol/L}$ GEM; 3) $P < 0.05$ vs. 5 $\mu\text{mol/L}$ GEM; 4) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{mol/L}$ GEM; 5) $P < 0.05$ vs. 20 $\mu\text{mol/L}$ GEM

2.2 各组Huh7细胞凋亡情况

与对照组比较, GEM组、PT组、GEM+PT组及FH535组细胞凋亡率升高(均 $P<0.05$); 与GEM组比较, PT组、GEM+PT组及FH535组细胞凋亡率升

高(均 $P<0.05$); 与PT组比较, GEM+PT组及FH535组细胞凋亡率升高(均 $P<0.05$); 与GEM+PT组比较, FH535组细胞凋亡率升高($P<0.05$)(图1)(表3)。

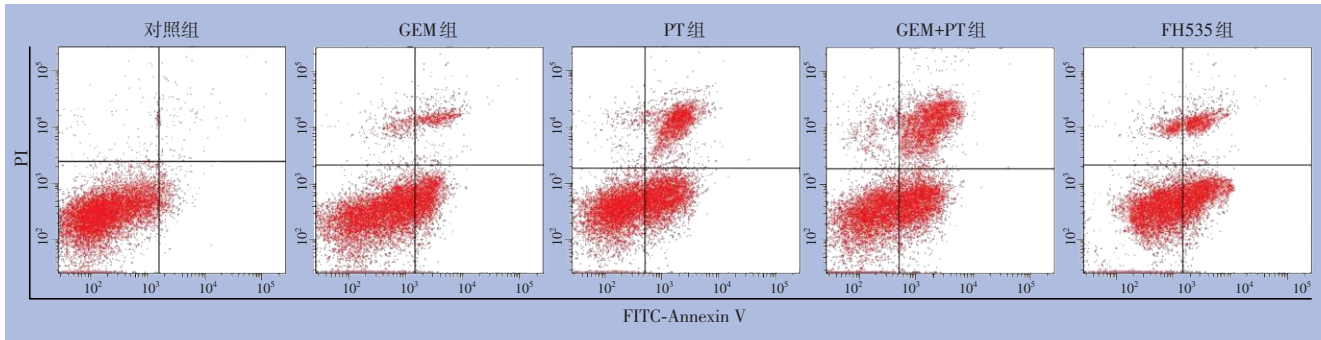


图1 流式细胞仪检测各组Huh7细胞凋亡情况

Figure 1 The apoptosis of Huh7 cells in each group detected by flow cytometry

表3 各组Huh7细胞凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of apoptosis rate of Huh7 cells in each group(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率
对照组	1.96±0.10
GEM组	23.79±2.39 ¹⁾
PT组	41.95±3.39 ^{1),2)}
GEM+PT组	62.72±3.46 ^{1),2),3)}
FH535组	56.11±2.31 ^{1),2),3)4)}

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与GEM组比较, $P<0.05$;3)与PT组比较, $P<0.05$;4)与GEM+PT组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. GEM group; 3) $P<0.05$ vs. PT group; 4) $P<0.05$ vs. GEM+PT group

2.3 各组Huh7细胞集落形成情况

与对照组比较, GEM组、PT组、GEM+PT组及FH535组细胞集落形成数减少($P<0.05$); 与GEM组比较, PT组、GEM+PT组及FH535组细胞集

落形成数减少($P<0.05$); 与PT组比较, GEM+PT组及FH535组细胞集落形成数减少($P<0.05$); 与GEM+PT组比较, FH535组细胞集落形成数减少($P<0.05$)(图2)(表4)。

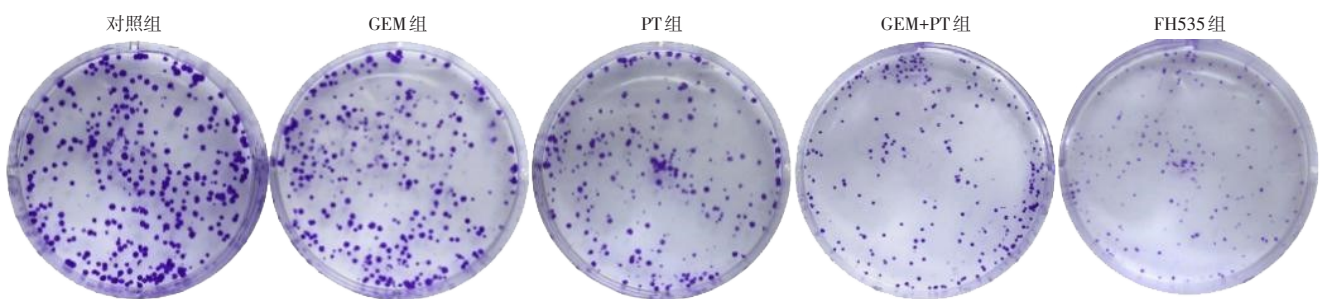


图2 各组Huh7细胞集落形成情况

Figure 2 Colony formation of Huh7 cells in each group

2.4 各组Huh7细胞迁移情况

与对照组比较, GEM组、PT组、GEM+PT组及FH535组细胞划痕愈合率降低(均 $P<0.05$); 与GEM组比较, PT组、GEM+PT组及FH535组细胞划

痕愈合率降低(均 $P<0.05$); 与PT组比较, GEM+PT组及FH535组细胞划痕愈合率降低(均 $P<0.05$); 与GEM+PT组比较, FH535组细胞划痕愈合率降低($P<0.05$)(图3)(表5)。

表4 各组 Huh7 细胞集落形成数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of colony formation number of Huh7 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	集落形成数
对照组	237.67±10.26
GEM组	145.67±9.07 ¹⁾
PT组	79.67±8.14 ^{1),2)}
GEM+PT组	38.33±7.77 ^{1),2),3)}
FH535组	20.67±5.51 ^{1),2),3),4)}

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 GEM 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 PT 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 GEM+PT 组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. GEM group; 3) $P < 0.05$ vs. PT group; 4) $P < 0.05$ vs. GEM+PT group

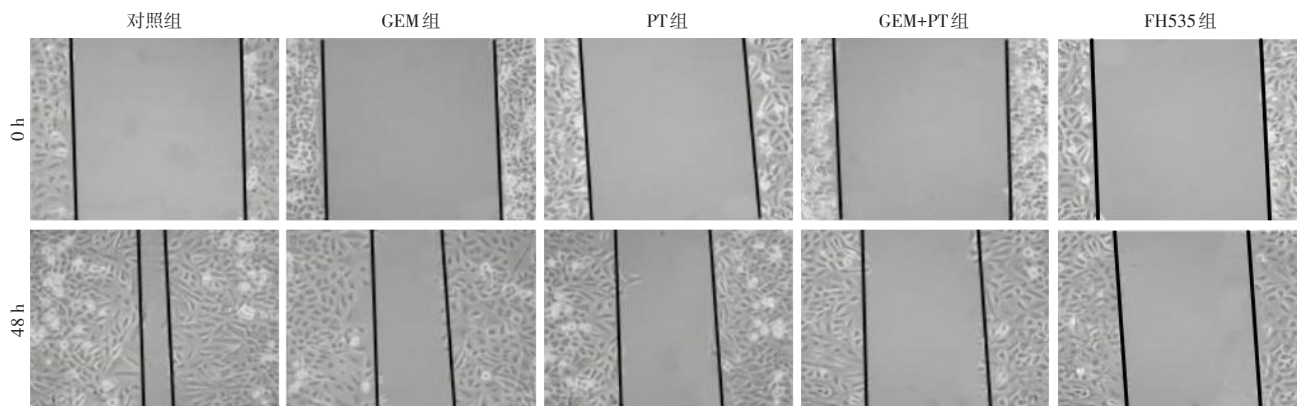


图3 各组 Huh7 细胞迁移情况

Figure 3 Migration of Huh7 cell in each group

表5 各组 Huh7 细胞划痕愈合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of scratch healing rate of Huh7 cells in each group (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	划痕愈合率
对照组	90.50±2.97
GEM组	54.07±2.91 ¹⁾
PT组	43.16±3.07 ^{1),2)}
GEM+PT组	28.53±2.48 ^{1),2),3)}
FH535组	15.67±5.51 ^{1),2),3),4)}

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 GEM 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 PT 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 GEM+PT 组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. GEM group; 3) $P < 0.05$ vs. PT group; 4) $P < 0.05$ vs. GEM+PT group

2.5 各组 Huh7 细胞侵袭情况

与对照组比较, GEM 组、PT 组、GEM+PT 组及 FH535 组细胞侵袭数减少 ($P < 0.05$); 与 GEM 组比较, PT 组、GEM+PT 组及 FH535 组细胞侵袭

数减少 ($P < 0.05$); 与 PT 组比较, GEM+PT 组及 FH535 组细胞侵袭数减少 ($P < 0.05$); 与 GEM+PT 组比较, FH535 组细胞侵袭数减少 ($P < 0.05$) (图 4) (表 6)。

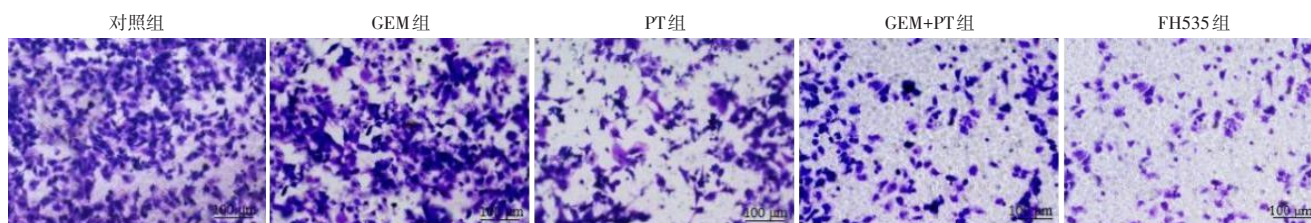


图4 各组 Huh7 细胞侵袭情况 (×200)

Figure 4 Invasion of Huh7 cells in each group (×200)

表6 各组Huh7细胞侵袭数比较(个, $\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of invasion number of Huh7 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞侵袭数
对照组	351.67±12.10
GEM组	222.67±11.02 ¹⁾
PT组	149.67±10.69 ^{1),2)}
GEM+PT组	90.33±8.02 ^{1),2),3)}
FH535组	73.67±7.51 ^{1),2),3),4)}

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与GEM组比较, $P<0.05$;3)与PT组比较, $P<0.05$;4)与GEM+PT组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. GEM group; 3) $P<0.05$ vs. PT group; 4) $P<0.05$ vs. GEM+PT group

2.6 各组Huh7细胞中相关基因相对表达量

与对照组比较, GEM组、PT组、GEM+PT组及FH535组细胞 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 相对表达量降低(均 $P<0.05$); 与GEM组比较, PT组、GEM+PT组及FH535组细胞 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 相对表达量降低(均 $P<0.05$); 与

PT组比较, GEM+PT组及FH535组细胞 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 相对表达量降低(均 $P<0.05$); 与GEM+PT组比较, FH535组细胞 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 相对表达量降低(均 $P<0.05$)(表7)。

表7 各组Huh7细胞相关基因相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)Table 7 Comparison of relative expression levels of related genes in Huh7 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	c-myc	cyclin D1	survivin
对照组	1.00±0.01	1.01±0.01	1.01±0.01
GEM组	0.72±0.03 ¹⁾	0.69±0.03 ¹⁾	0.82±0.04 ¹⁾
PT组	0.61±0.03 ^{1),2)}	0.56±0.02 ^{1),2)}	0.65±0.02 ^{1),2)}
GEM+PT组	0.36±0.02 ^{1),2),3)}	0.39±0.02 ^{1),2),3)}	0.34±0.02 ^{1),2),3)}
FH535组	0.31±0.02 ^{1),2),3),4)}	0.35±0.02 ^{1),2),3),4)}	0.29±0.02 ^{1),2),3),4)}

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与GEM组比较, $P<0.05$;3)与PT组比较, $P<0.05$;4)与GEM+PT组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. GEM group; 3) $P<0.05$ vs. PT group; 4) $P<0.05$ vs. GEM+PT group

2.7 各组Huh7细胞中相关蛋白相对表达量

组间GSK-3 β 蛋白相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$); 与对照组比较, GEM组、PT组、GEM+PT组及FH535组细胞 β -catenin、p-GSK-3 β 及 Vim蛋白相对表达量降低, E-cad 及 C-caspase-3蛋白相对表达量升高(均 $P<0.05$); 与GEM组比较, PT组、GEM+PT组及FH535组细胞 β -catenin、p-GSK-3 β 及 Vim蛋白相对表达量降低, E-cad 及 C-caspase-3蛋白相对表达量升高(均 $P<0.05$); 与PT组比较, GEM+PT组及FH535组细胞 β -catenin、p-GSK-3 β 及 Vim蛋白相对表达量降低, E-cad 及 C-caspase-3蛋白相对表达量升高(均 $P<0.05$); 与GEM+PT组比较, FH535组细胞 β -catenin、p-GSK-3 β 及 Vim蛋白相对表达量降低, E-cad 及 C-caspase-3蛋白相对表达量升高(均 $P<0.05$)(图5)(表8)。

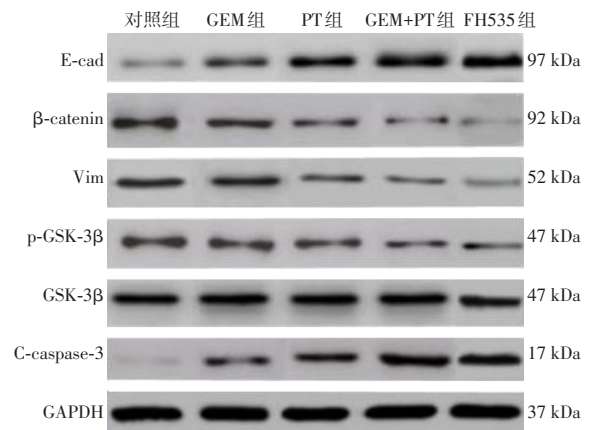


图5 Western blot检测各组Huh7细胞相关蛋白表达
Figure 5 Detection of the expressions of related proteins in Huh7 cells in each group by Western blot

表 8 各组 Huh7 细胞相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 8 Comparison of relative expression levels of related proteins in Huh7 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	β -catenin	GSK-3 β	p-GSK-3 β	Vim	E-cad	C-caspase-3
对照组	0.43 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04	0.71 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01
GEM 组	0.32 \pm 0.02 ¹⁾	0.77 \pm 0.02 ¹⁾	0.38 \pm 0.03 ¹⁾	0.49 \pm 0.02 ¹⁾	0.26 \pm 0.03 ¹⁾	0.25 \pm 0.02 ¹⁾
PT 组	0.19 \pm 0.01 ^{1),2)}	0.77 \pm 0.02 ^{1),2)}	0.27 \pm 0.02 ^{1),2)}	0.21 \pm 0.02 ^{1),2)}	0.41 \pm 0.04 ^{1),2)}	0.46 \pm 0.03 ^{1),2)}
GEM+PT 组	0.12 \pm 0.01 ^{1),2),3)}	0.78 \pm 0.03 ^{1),2),3)}	0.16 \pm 0.02 ^{1),2),3)}	0.13 \pm 0.01 ^{1),2),3)}	0.62 \pm 0.04 ^{1),2),3)}	0.78 \pm 0.03 ^{1),2),3)}
FH535 组	0.10 \pm 0.01 ^{1),2),3),4)}	0.77 \pm 0.04 ^{1),2),3),4)}	0.12 \pm 0.02 ^{1),2),3),4)}	0.10 \pm 0.01 ^{1),2),3),4)}	0.71 \pm 0.04 ^{1),2),3),4)}	0.83 \pm 0.05 ^{1),2),3),4)}

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与GEM组比较, $P<0.05$;3)与PT组比较, $P<0.05$;4)与GEM+PT组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. GEM group; 3) $P<0.05$ vs. PT group; 4) $P<0.05$ vs. GEM+PT group

3 讨论

化学治疗剂 GEM 是脱氧胞苷的核苷类似物,通过抑制 DNA 聚合酶阻止细胞周期从 G₁ 期进入 S 期进而抑制癌症发展,具有广泛的抗肿瘤活性^[7],且与其他化疗药物相比毒性相对较低,已被广泛研究为单一药物和与姑息治疗药物联合用于晚期 HCC 的治疗^[8],但由于 GEM 生物半衰期短、生物利用度低、代谢失活快和靶标特异性差,其化疗耐药发生率几乎在 80% 以上,临床益处有限^[9-10]。使用两种或多种化疗药物的联合治疗是当前肿瘤学中用于克服化疗耐药的最常用策略之一,天然产物因其优异的化学多样性、低毒性和较高患者耐受性而成为抗癌药物发现的主要来源。Wei 等^[11]发现,PT 可抑制 HCC 细胞活力,并在体内抑制原位 HCC 患者来源的异种移植物生长;Tang 等^[12]结果显示,PT 可作为化学疗法的增敏剂提高 HCC 另一种一线治疗药物索拉非尼的化疗敏感性,抑制 HCC 细胞增殖、迁移,并促进凋亡。本研究结果显示,PT、GEM 可呈浓度依赖性抑制 HCC 细胞增殖,且 PT 和 GEM 单独应用时的作用效果不及 GEM 联合 PT, GEM 联合 PT 作用 Huh7 细胞后,细胞集落形成、迁移、侵袭能力显著降低,凋亡率升高,提示 PT 可增强 HCC 细胞对 GEM 的化疗敏感性,增强 GEM 对 HCC 恶性生物学行为的抑制效果。

据报道^[13],约一半早期 HCC 患者在手术后会出现复发并发生转移性扩散,HCC 细胞高度增殖、迁移和侵袭能力是导致 HCC 恶性进展和高病死率的主要原因。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)在癌细胞侵袭和转移中起重要作用,该过程被认为与 HCC 进展及 HCC 患者的预后相关^[14]。在 EMT 期间,上皮细胞失去黏附连接和顶端-基底极性,获得间充质表

型,细胞迁移和侵袭性增加,同时间质基因如 Vim 被激活,上皮标志物 E-cad 表达减少^[15]。细胞凋亡与肿瘤生存密切相关,在 HCC 增殖抑制中起重要作用,凋亡过程激活可涉及死亡受体途径或线粒体凋亡途径,这两种途径最终都会导致下游主要效应蛋白酶 caspase-3 的裂解和激活^[16]。Wnt/ β -catenin 通路是参与包括 HCC 在内恶性肿瘤 EMT 的最重要的信号通路之一,在癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭过程中发挥重要作用^[17]。c-myc、cyclin D1 及 survivin 均为 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因^[18],其中, c-myc 是一种主转录因子,已被确定为 HCC 中常见的失调癌基因之一,在不同遗传环境中均具有致癌潜力,与肿瘤转移和不良临床后果有关^[19],研究^[20]发现,其条件性失活可显著抑制 HCC 恶性进展。cyclin D1 是细胞周期的重要调节剂, HCC 与其过表达相关^[21], Dai 等^[22]研究结果显示,通过抑制其表达可诱导 HCC 细胞增殖抑制。survivin 是一种抗凋亡蛋白,其在 HCC 组织中高度表达,可促进 EMT 过程^[23],在 HCC 的发生发展中,高水平的 survivin 表达促进癌细胞增殖,抑制凋亡,诱导肿瘤间质血管生成并降低癌细胞对放疗和化疗的敏感性^[24]。本研究结果显示,与对照组比较, GEM 联合 PT 作用后, Huh7 细胞中 c-myc、cyclin D1 及 survivin mRNA 表达水平被显著降低,且 Vim 蛋白表达下调, E-cad 及 C-caspase-3 蛋白表达上调,结合实验中细胞增殖、迁移及侵袭抑制,凋亡增加,提示 GEM 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因激活和表达,参与抑制癌细胞增殖和转移并诱导凋亡发生,进而增强 GEM 的化疗敏感性。当没有 Wnt 配体存在时,破坏复合物使细胞质中的 β -catenin 磷酸化并诱导其在蛋白酶体中降解;当 Wnts 与细胞表面受体复合物结合后,破坏复合物被灭活, GSK-3 β 磷酸化可抑制其自身激活以及随

后的 β -catenin磷酸化,导致 β -catenin在细胞质中积累并转移至细胞核,与转录因子TCF/LEF结合并激活下游c-myc、cyclin D1及survivin的转录与表达^[25-26]。Wnt/ β -catenin通路的异常激活在HCC患者中被广泛报道,约有10%~50%的HCC组织中可观察到 β -catenin的积累^[27]。研究^[28-30]发现,抑制Wnt/ β -catenin信号传导可减弱HCC细胞干性,增强HCC细胞的化疗敏感性,此时 β -catenin和p-GSK-3 β 的表达下调。本研究中,与对照组比较,GEM组、PT组及GEM联合PT组Huh7细胞中 β -catenin蛋白及p-GSK-3 β 蛋白表达水平均降低,且GEM联合PT后对上述因子的抑制作用更强,与Wnt/ β -catenin抑制剂作用效果具有一致性,提示PT可能通过抑制Wnt/ β -catenin通路激活,增强HCC细胞对GEM的化疗敏感性。

综上所述,PT可增强HCC细胞对GEM的化疗敏感性,其作用机制可能与抑制Wnt/ β -catenin通路激活,降低 β -catenin在细胞质中的积累及核移位,阻断 β -catenin下游靶基因的转录,从而抑制HCC细胞的增殖、迁移及侵袭,并诱导凋亡发生有关。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:于彬负责实验设计与实施及论文撰写;于勇、时磊、袁俊建负责数据的收集与分析 and 统计学分析。

参考文献

- [1] Ruan Y, Chen WP, Gao C, et al. REXO4 acts as a biomarker and promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12(6):3093-3106. doi: 10.21037/jgo-21-819.
- [2] 王可,李建波,曹晓菲. 磷酸丝氨酸磷酸化酶在肝细胞癌中的表达及其促进增殖和转移的作用机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(2):190-198. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.007. Wang K, Li JB, Cao XF. Expression of phosphoserine phosphorylase in hepatocellular carcinoma and the mechanisms for its promoting proliferation and metastasis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(2):190-198. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.007.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34. doi: 10.3322/caac.21551.
- [4] Gong JH, Zheng YB, Zhang MR, et al. Dexamethasone enhances the antitumor efficacy of Gemcitabine by glucocorticoid receptor signaling[J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(4):332-343. doi: 10.1080/15384047.2019.1702399.
- [5] Yan FX, Liao RF, Silva M, et al. Pristimerin-induced uveal melanoma cell death via inhibiting PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6208-6219. doi: 10.1111/jcmm.15249.
- [6] Gao JF, Hou DR, Hu P, et al. Curcumol increases the sensitivity of colon cancer to 5-FU by regulating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(5): 2437-2450. doi: 10.21037/tcr-21-689.
- [7] Wang S, Feng W, Wang WL, et al. Girdin knockdown increases gemcitabine chemosensitivity to pancreatic cancer by modulating autophagy[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 618764. doi: 10.3389/fonc.2021.618764.
- [8] Park JY, Chae JR, Cho YL, et al. Targeted therapy of hepatocellular carcinoma using gemcitabine-incorporated GPC3 aptamer[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10): 985. doi: 10.3390/pharmaceutics12100985.
- [9] Dyawanapelly S, Kumar A, Chourasia MK. Lessons learned from gemcitabine: impact of therapeutic carrier systems and gemcitabine's drug conjugates on cancer therapy[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2017, 34(1): 63-96. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2017017912.
- [10] Yin L, Ren TM, Zhao SY, et al. Comparative pharmacokinetic study of PEGylated gemcitabine and gemcitabine in rats by LC-MS/MS coupled with pre-column derivatization and MSALL technique[J]. *Talanta*, 2020, 206: 120184. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120184.
- [11] Wei W, Wu S, Wang XL, et al. Novel celastrol derivatives inhibit the growth of hepatocellular carcinoma patient-derived xenografts[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14):5819-5831. doi: 10.18632/oncotarget.2171.
- [12] Tang YB, Chen J, Li JQ, et al. Pristimerin synergistically sensitizes conditionally reprogrammed patient derived-primary hepatocellular carcinoma cells to sorafenib through endoplasmic reticulum stress and ROS generation by modulating Akt/FoxO1/p27kip1 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153563. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153563.
- [13] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30010-2.
- [14] Ma XL, Shen MN, Hu B, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110 β and predicts poor prognosis[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):37. doi: 10.1186/s13045-019-0724-7.

- [15] Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1):28–39. doi: [10.1002/1878-0261.12017](https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017).
- [16] Zhang XL, Yu H. Matrine inhibits diethylnitrosamine-induced HCC proliferation in rats through inducing apoptosis via p53, Bax-dependent caspase-3 activation pathway and down-regulating MLCK overexpression[J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(2):491–499.
- [17] Liao ST, Chen HY, Liu M, et al. Aquaporin 9 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(2): 1527–1544. doi: [10.18632/aging.102698](https://doi.org/10.18632/aging.102698).
- [18] Zhou Y, Liu X, Gao YH, et al. Paeoniflorin affects hepatocellular carcinoma progression by inhibiting Wnt/ β -catenin pathway through downregulation of 5-HT1D[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(9): 1246–1253. doi: [10.2174/1389201021666201009153808](https://doi.org/10.2174/1389201021666201009153808).
- [19] Moon H, Park H, Ro SW. C-myc-driven hepatocarcinogenesis[J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(10): 4937–4946. doi: [10.21873/anticancer.15307](https://doi.org/10.21873/anticancer.15307).
- [20] Wei XL, Zheng WJ, Tian PK, et al. Oncogenic hsa_circ_0091581 promotes the malignancy of HCC cell through blocking miR-526b from degrading c-MYC mRNA[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(7): 817–824. doi: [10.1080/15384101.2020.1731945](https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1731945).
- [21] Wu SY, Lan SH, Liu HS. Degradative autophagy selectively regulates CCND1 (cyclin D1) and MIR224, two oncogenic factors involved in hepatocellular carcinoma tumorigenesis[J]. *Autophagy*, 2019, 15(4):729–730. doi: [10.1080/15548627.2019.1569918](https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569918).
- [22] Dai XM, Huang RX, Hu S, et al. A novel miR-0308-3p revealed by miRNA-seq of HBV-positive hepatocellular carcinoma suppresses cell proliferation and promotes G1/S arrest by targeting double CDK6/cyclin D1 genes[J]. *Cell Biosci*, 2020, 10:24. doi: [10.1186/s13578-020-00382-7](https://doi.org/10.1186/s13578-020-00382-7).
- [23] Wang ZT, Li YP, Liu MY, et al. 3BDO inhibits the proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and stemness via suppressing survivin in human glioblastoma cells[J]. *J Cancer*, 2022, 13(4):1203–1213. doi: [10.7150/jca.66674](https://doi.org/10.7150/jca.66674).
- [24] Su CQ. survivin in survival of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 379(2):184–190. doi: [10.1016/j.canlet.2015.06.016](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.016).
- [25] Huybrechts Y, Mortier G, Boudin E, et al. WNT signaling and bone: lessons from skeletal dysplasias and disorders[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 165. doi: [10.3389/fendo.2020.00165](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00165).
- [26] Bao YQ, Cui JS, Yue YY, et al. ERBB3 binding protein 1 promotes the progression of malignant melanoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 44. doi: [10.1186/s12935-022-02473-6](https://doi.org/10.1186/s12935-022-02473-6).
- [27] Vilchez V, Turcios L, Marti F, et al. Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2):823–832. doi: [10.3748/wjg.v22.i2.823](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.823).
- [28] Hu X, Ding J, Wang G, et al. The combination of ulinastatin and 5-fluorouracil synergistically inhibits hepatocellular carcinoma growth[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(3): 300060520909776. doi: [10.1177/0300060520909776](https://doi.org/10.1177/0300060520909776).
- [29] Cao F, Yin LX. miR-122 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin via inhibiting MDR1 by targeting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 106(1): 34–43. doi: [10.1016/j.yexmp.2018.10.009](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.10.009).
- [30] Chen T, Lin J, Tang D, et al. Paris saponin H suppresses human hepatocellular carcinoma (HCC) by inactivation of Wnt/ β -catenin pathway in vitro and in vivo[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(8): 2875–2886.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 于彬, 于勇, 时磊, 等. 扁蒴藤素对肝细胞癌细胞生物学行为及吉西他滨化疗敏感性的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(2):221–230. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007)

Cite this article as: Yu B, Yu Y, Shi L, et al. Effects of pristimerin on biological behavior and the sensitivity to gemcitabine chemotherapy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(2):221–230. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.007)