

· 经典名方 ·

## 基于Hedgehog信号通路探析白头翁汤抗结直肠癌 HCT116细胞机制

刘茂伦<sup>1,2</sup>, 任珊<sup>1,2</sup>, 杨寒<sup>1,2</sup>, 赵晖<sup>1,2</sup>, 陶秋<sup>1,2</sup>, 唐顺<sup>1,2</sup>, 明天琪<sup>1,2</sup>, 徐海波<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;

2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:探讨白头翁汤水煎液通过调控经典Hedgehog(Hh)信号通路诱导人结直肠癌细胞HCT116凋亡的作用及其机制。方法:用白头翁汤(25、50、100、200、500、750、1 000 mg·L<sup>-1</sup>)处理HCT116细胞24 h,然后用噻唑蓝(MTT)比色法检测白头翁汤对细胞增殖的影响;分别设置空白组、白头翁汤组(125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>)和氟尿嘧啶(5-FU)组(40 mmol·L<sup>-1</sup>),显微镜观察细胞给药前后形态变化;划痕实验检测白头翁汤对细胞迁移的影响;Hoechst 33324/碘化丙锭(PI)染色法评价白头翁汤对细胞凋亡的影响;流式细胞术检测白头翁汤对HCT116细胞凋亡的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞凋亡相关B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平及Hh信号通路关键因子音猬因子(SHh)、GLI家族锌指蛋白1(Gli1)、G蛋白偶联受体蛋白Smoothed(Smo)、苏氨酸蛋白激酶Fused抑制因子(SuFu)、c-核蛋白类基因(c-Myc)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测凋亡相关基因Bax、Bcl-2和Hh通路相关基因SHh、Gli1、Smo、SuFu、c-Myc mRNA表达水平。结果:与空白组比较,白头翁汤组(125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>)HCT116细胞形态发生明显改变,细胞变圆,其增殖被抑制,且呈浓度依赖性,迁移能力下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),细胞核出现致密浓染,凋亡数量增加。与空白组比较,白头翁汤(500 mg·L<sup>-1</sup>)处理HCT116细胞24 h, Bax蛋白和mRNA表达水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bcl-2蛋白和mRNA表达水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与空白组比较,白头翁汤组(500 mg·L<sup>-1</sup>)处理24 h后, Hh信号通路关键因子SHh、Gli1、Smo、c-Myc的mRNA和蛋白水平表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Hh信号通路负调控因子SuFu表达水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:白头翁汤通过降低Hh信号通路活性来抑制结直肠癌细胞HCT116增殖和迁移,诱导癌细胞凋亡。

**[关键词]** 白头翁汤; Hedgehog信号通路; 结直肠癌; HCT116细胞; 凋亡

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)08-0125-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.202202022

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220816.1144.010.html>

**[网络出版日期]** 2022-08-16 14:43:43

### Baitouweng Tang Suppresses Colorectal Cancer HCT116 Cells by Regulating Hedgehog Signaling Pathway

LIU Maolun<sup>1,2</sup>, REN Shan<sup>1,2</sup>, YANG Han<sup>1,2</sup>, ZHAO Hui<sup>1,2</sup>, TAO Qiu<sup>1,2</sup>, TANG Shun<sup>1,2</sup>,

MING Tianqi<sup>1,2</sup>, XU Haibo<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China;

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Baitouweng Tang (BTWT) on the apoptosis of human colorectal cancer HCT116 cells and decipher the underlying mechanism based on the Hedgehog (Hh) signaling

**[收稿日期]** 2022-06-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573813);四川省中医药管理局课题(2021XYCZ007, 2021MS447);四川省卫生健康委员会科技项目(21PJ107);成都中医药大学“杏林学者”人才计划(GJJ2021003)

**[第一作者]** 刘茂伦,在读硕士,从事中药抗肿瘤药理研究, E-mail: 1275440748@qq.com

**[通信作者]** \*徐海波,博士,教授,博士生导师,从事中药抗肿瘤药理研究, E-mail: xuhb@hotmail.com

pathway. **Method:** HCT116 cells were treated with BTWT (25, 50, 100, 200, 500, 750, and 1 000 mg·L<sup>-1</sup>) for 24 h, and then the cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. Five groups were designed for the treatment of HCT116 cells, including a blank control group, BTWT groups (125, 250, and 500 mg·L<sup>-1</sup>), and a positive control (5-fluorouracil, 5-FU, 40 mmol·L<sup>-1</sup>) group. The cell morphology was observed under an inverted microscope. The migration of the cells was detected by scratch test, and the apoptosis by Hoechst 33324/propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. Western blot was employed to determine the protein levels of sonic hedgehog (SHh), GLI family zinc finger protein 1 (Gli1), smoothened (Smo), suppressor of fused (SuFu), cellular-myelocytomatosis viral oncogene (c-Myc), and the apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax). The quantitative real-time reverse transcription PCR (Real-time PCR) was employed to determine the mRNA levels of Bax, Bcl-2, SHh, Gli1, Smo, SuFu, and c-Myc. **Result:** Compared with the blank control group, BTWT changed the cell morphology (making the cell become round with dense nucleus), inhibited the proliferation of HCT116 cells in a dose-dependent manner, decreased the ability of migration ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and increased apoptotic cells. Compared with the blank control group, BTWT (500 mg·L<sup>-1</sup>) treatment for 24 h up-regulated the protein and mRNA levels of Bax ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and down-regulated the protein and mRNA levels of Bcl-2 in HCT116 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Moreover, the treatment down-regulated the mRNA and protein levels of SHh, Gli1, Smo, and c-Myc ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and up-regulated the mRNA and protein levels of SuFu ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** BTWT inhibited the proliferation and migration and induced the apoptosis of colorectal cancer HCT116 cells by down-regulating the Hh signaling pathway.

**[Keywords]** Baitouweng Tang; Hedgehog signaling pathway; colorectal cancer; HCT116 cells; apoptosis

结直肠癌是一种严重威胁人类身体健康和生活质量的常见癌症,2020年全球有1 930万新发癌症和近1 000万癌症死亡数,其中结直肠癌的发病率位居全球第3位,占比10%<sup>[1]</sup>。值得注意的是,结直肠癌的发病越来越年轻化,现代生活方式(如摄入过多动物源性食物和久坐)与结直肠癌的发生发展有重要联系,所以需要制定有效的预防和治疗策略<sup>[2]</sup>。临床上许多治疗结直肠癌的药物如五氟尿嘧啶(5-FU)也因耐药性的发展而影响其疗效,在系统治疗后,患者五年存活率依然很低<sup>[3]</sup>。白头翁汤来源于中医经典《伤寒杂病论》,临床已使用超过1 800年,由白头翁、黄柏、黄连、秦皮4味中药组成,具有很好的抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用<sup>[4-8]</sup>,炎症反应和免疫应答的过度表达,约占到显著性结直肠癌基因富集的62.5%<sup>[9]</sup>,表明白头翁汤具有治疗结直肠癌的潜力。Hedgehog(Hh)信号通路在多种肿瘤的发生发展中都发挥着重要作用<sup>[10]</sup>,其异常激活可以导致结直肠肿瘤细胞逃避凋亡和自噬,从而造成癌变<sup>[11-12]</sup>。白头翁汤临床治疗结直肠癌的报道逐年增多,但其对Hh信号通路的调控机制研究依然缺乏,限制了对白头翁汤更优治疗效果的挖掘。本研究以人结直肠肿瘤细胞HCT116为模型,检测对

细胞增殖、迁移及凋亡的影响,探索仲景名方白头翁汤通过调控Hh信号通路抗结直肠癌的深层机制,为临床用药提供实验数据支持。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结直肠癌HCT116细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,编号187401,本研究采用10代以内细胞进行实验。

**1.2 药物与试剂** 白头翁汤由白头翁、黄连、黄柏、秦皮组成,上述药物均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,批号分别为D2011103、D2011103、D2006124、2006063,经成都中医药大学药学院吕光华教授鉴定均为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》标准;四味药按5:2:4:4的比例配好后,用10倍量的纯水在常温下浸泡30 min,加热煮沸,然后保持微沸40 min,收集滤液,再重复这个过程1次,最后加8倍量水煎煮0.5 h后过滤,合并3次滤液,浓缩至1 g·mL<sup>-1</sup>。在16 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径14.5 cm),取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤后放入-80 °C冰箱备用。给药时将浓缩液解冻,用完全培养基稀释至所需浓度,调整pH为7.0~7.4。

5-FU (C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 美国Sigma公司,批号

WXBC6532V), McCoy's 5A 培养基(以色列 Biological Industries 公司,批号 2129203),磷酸盐缓冲液(PBS)、2×SYBR Green qPCR Master Mix(Low ROX)、RIPA 强裂解液、山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 GP21090020100、LT202201、CR2202045、CR2107181),胰蛋白酶与青-链霉素(索莱宝科技有限公司,批号分别为 HJ202410、HJ202605),胎牛血清(南美乌拉圭 Adamas Life 公司,批号 C8010),噻唑蓝(MTT)试剂盒、Hoechst 33324/碘化丙锭(PI)试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒(碧云天生物科技有限公司,批号分别为 C0009-2、121818191028、P1002、P0006、012621210601),总 RNA 提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司,批号 191009),PVDF 膜(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 42131900),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(MultiSciences 公司,批号 A11015),Hh 信号通路相关抗体音猬因子(SHh)、G 蛋白偶联受体蛋白(Smo)、c-核蛋白类基因(c-Myc)、苏氨酸蛋白激酶 Fused 抑制因子(SuFu),GLI 家族锌指蛋白 1(Gli1)抗体(美国 Affinity 公司,批号分别为 00041772、81m 2941、49x7965、00047289、10017658),细胞凋亡相关抗体 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白(Bcl-2,美国 Immunoway 公司,批号 10016705),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax,武汉三鹰生物技术有限公司,批号 00102164),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、山羊抗兔 IgG 二抗(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 A00131、YR202912)。

**1.3 仪器** 3001 型多功能酶标仪、Forma3111CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DMI3000B 倒置显微镜(德国 Leica 公司);QUOTQTION 型电泳仪、化学发光凝胶成像系统、PCR 扩增仪、蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);CYT5MFV 型微孔板成像系统(美国 BioTek 公司);ScanDrop2 型多功能超微量核酸蛋白测定仪(德国耶拿公司);Quant Studio™7 Flex 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将 HCT116 细胞放入含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 McCoy's 5A 培养基完全培养基中,然后放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,

每天观察细胞状态,待细胞融合度达培养瓶 90% 时,按 1:3 比例传代,第 5 代后冻存部分细胞,剩下部分细胞用于后续实验。

**2.2 MTT 比色法检测细胞增殖** 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL,100 μL 每孔接种于 96 孔板中,培养箱内培养 12 h,待细胞贴壁后,吸出培养基,更换为新培养基、经前期初筛白头翁汤浓度范围后,确定白头翁汤组给药质量浓度为 25、50、100、200、500、750、1 000 mg·L<sup>-1</sup> 和 5-FU 组 5-FU (40 mmol·L<sup>-1</sup>)<sup>[13]</sup>。培养 24 h,所有组更换含 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 培养基 100 μL,继续培养 4 h,然后加入 DMSO (150 μL/孔),震荡 15 min 后在酶标仪测定 570 nm 吸光度 *A*。细胞存活率= $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

**2.3 细胞形态观察** 取对数生长期的 HC T116 细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL,每孔 500 μL 接种于 24 孔板中,待培养 12 h 细胞贴壁后,空白组更换新培养基,白头翁汤组(125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>)、5-FU 组(40 mmol·L<sup>-1</sup>),继续培养 24 h,于光学显微镜下观察记录细胞生长情况和形态。

**2.4 划痕实验评价细胞迁移能力** 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL,每孔 500 μL 接种于 24 孔细胞培养板,培养 12 h 待细胞贴壁,用 10 μL 移液枪垂直于培养板底部平行和竖直划线,以 2.3 项方法处理细胞,分别在 0、12、24 h 于显微镜下观察记录各组划痕愈合情况。用 Image J 软件分析统计,计算细胞迁移率。细胞迁移率=[划痕面积(0 h)-划痕面积(12 h/24 h)]/划痕面积(0 h)×100%。

**2.5 Hoechst 33324/PI 染色法检测细胞凋亡** 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL,每孔 1 mL 接种于 6 孔板中,培养 12 h,待贴壁后,以 2.3 项方法给药处理细胞 24 h,弃培养基,用 PBS 清洗后每孔加入含 Hoechst 33324 和 PI 50 μL 抗荧光淬灭封片液,然后在微孔成像仪上观察记录细胞凋亡情况。

**2.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 以 2.3 项给药处理细胞 24 h,收集细胞,从样本管中分出小部分细胞;用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次,离心后弃上清,加入预冷 1× Binding Buffer 工作液 500 μL 重悬细胞;每管样本管中加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 染色液 10 μL,单染管中分别加入 Annexin V-FITC 5 μL 或 PI 10 μL,轻轻涡旋后混匀,室温避光孵育 5 min;打开流式细胞仪,用空白管调节 FSC、SSC 通道的电压,使细胞位于中央,然后调节 FITC 和 PI 通道的电

压,使细胞在左下角区域即可。在此电压条件下,用单染管调节 FITC 与 PI 之间的补偿,然后上机样本。

**2.7 Real-time PCR 检测细胞凋亡和 Hh 通路相关 mRNA 表达** 取对数生长期的 HCT116 细胞,以  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞密度,1 mL 每孔的体积接种于 6 孔培养板中,培养 12 h,待细胞贴壁后,采用 2.3 项方法处理细胞 24 h,提取总 RNA,然后先将总 RNA 先在 25 °C 孵育 10 min,随后在 42 °C 孵育 40 min,最后在 80 °C 孵育 10 min,逆转录成 cDNA,PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表 1。选用  $\beta$ -actin 作为内参,PCR 反应条件:预变性 95 °C,30 s,变性 95 °C,15 s;退火 60 °C,30 s,延伸 72 °C,30 s。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算方法,计算所测基因的相对表达量。

**2.8 Western blot 检测凋亡和 Hh 信号通路相关蛋白的表达** 将对数生长期细胞调整为  $1 \times 10^6$  个/mL,每孔 1 mL 接种于 6 孔板中培养 12 h,待贴壁后以 2.3 项方法处理细胞,在给药 24 h 后弃培养基,用 PBS 清洗,每组样品加入预冷的增强型 RIPA 裂解液 200  $\mu$ L,离心并收集上清液,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,混匀后加热制样以备用。制备 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,分离蛋白样品,湿法转膜,5% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 90 min,加入一抗(1:1 500)后于 4 °C 孵育过夜,次日更换二抗(按 1:5 000)孵育 90 min,使用化学发光成像系统成像,采用 Image Lab 软件进行蛋白条带分析。

**2.9 统计学处理** 所有实验均进行重复 3 次,数据

表 1 引物序列

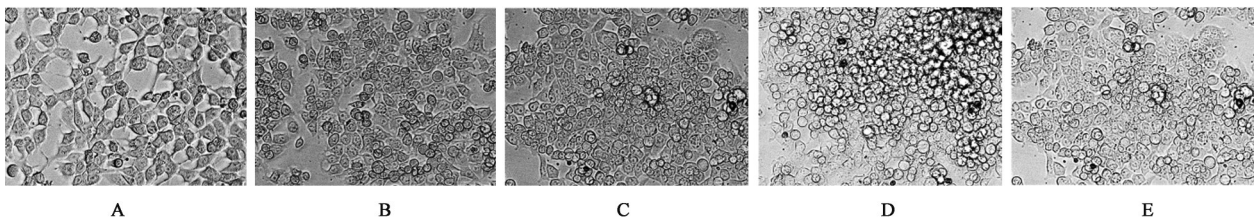
Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/ bp
$\beta$ -actin	上游 CATGAAGTGTGACGTGGACATC	155
	下游 CAGGAGGAGCAATGATCTTGATC	
Bcl-2	上游 TGGGGTCATGTGTGTGGAGA	139
	下游 TAACACAAGGGCATCCCAGC	
Bax-2	上游 ATGATTGCCGCCGTGGACACAG	142
	下游 ACAGGGCCTTGAGCACCAGTTTG	
c-Myc	上游 GCGACTCTGAGGAGGAACAAGAAG	136
	下游 CGTAGTTGTGCTGATGTGTGGAGA	
Gli1	上游 AGCTGGTGCACCCATCAACA	169
	下游 CCTCAAACGTGCACTTGTGTGG	
SHh	上游 CTCAGAGGAGTCTCTGCACTA	168
	下游 ACCGAGTTCTCTGCTTTCAC	
Smo	上游 TTCACCCTGGCCACATTC	163
	下游 TCATGGTGCCATCTGCAC	
Caspase-9	上游 AGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGG	197
	下游 CCTCCAGGAAACAAAACCTGGGAA	
Caspase-3	上游 GCGTGATGTTTCTAAAGAAGATCACAGC	166
	下游 GGGTTTCCAGTTAGACTTCTACAACGA	

均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,组间差异分析采用单因素方差分析法, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 白头翁汤对 HCT116 细胞形态的影响** 空白组 HCT116 细胞生长良好,形态正常,白头翁汤组随着白头翁汤浓度增加,细胞排列明显变得不规则,变圆的数量增多,部分细胞脱落漂浮,且细胞数量逐渐减少。见图 1。



注:A 空白组;B~D. 白头翁汤组(125、250、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );E. 5-FU 组(40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )(图 2-图 5 同)

图 1 白头翁汤对 HCT116 细胞形态学的影响(倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Baitouweng Tang on HCT116 cell morphology (inverted microscope,  $\times 200$ )

**3.2 白头翁汤对 HCT116 细胞增殖的影响** 与空白组比较,在 1 000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,白头翁汤能浓度依赖性降低细胞的增殖活性,但  $> 500 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞存活率无明显下降。统计结果显示,白头翁汤处

理 24 h,对 HCT116 细胞的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 415.4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,基于  $\text{IC}_{50}$ ,后续实验设置白头翁汤给药质量浓度为 125、250、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 2。

**3.3 白头翁汤对 HCT116 细胞迁移的影响** 与空

表2 白头翁汤对HCT116细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Baitouweng Tang on proliferation of HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞存活率 /%
空白组		100±15.5
白头翁汤组	25	83.9±6.2
	50	71.2±5.0
	100	58.4±7.1
	200	51.0±8.5
	500	48.8±5.9
	750	46.3±4.0
	1 000	43.9±3.4

白组比较,白头翁汤组(250、500 mg·L<sup>-1</sup>)和5-FU组(40 mmol·L<sup>-1</sup>)划痕面积在12、24 h明显更大,白头翁汤组(250、500 mg·L<sup>-1</sup>)和5-FU组(40 mmol·L<sup>-1</sup>)能够明显抑制HCT116细胞的迁移能力( $P<0.05, P<0.01$ ),且呈浓度依赖性。见表3和图2。

### 3.4 白头翁汤对HCT116细胞凋亡的影响 与空

表3 白头翁汤对HCT 116细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Baitouweng Tang on migration ability of HCT 116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	迁移率/%	
		12 h	24 h
空白组		31.0±2.2	55.0±1.9
白头翁汤组	125	27.0±0.8	41.0±2.0 <sup>2)</sup>
	250	22.0±2.4 <sup>1)</sup>	39.0±1.1 <sup>2)</sup>
	500	13.0±3.2 <sup>2)</sup>	29.0±3.7 <sup>2)</sup>
5-FU组	40 <sup>3)</sup>	21.0±0.6 <sup>1)</sup>	29.0±1.8 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;<sup>3)</sup>浓度单位 mmol·L<sup>-1</sup>(表4-表8同)

白组比较,细胞给药24 h,随着白头翁汤(125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>)给药浓度增加,HCT116细胞因凋亡而导致细胞核被Hochest 33324浓染而呈蓝色荧光的数量增多,荧光强度逐渐增强。而PI染色后细胞仅出现很少和较弱的红棕色荧光,表明细胞很少出现坏死。染色结果表明,白头翁汤能够诱导HCT116细胞发生早期凋亡。见图3。

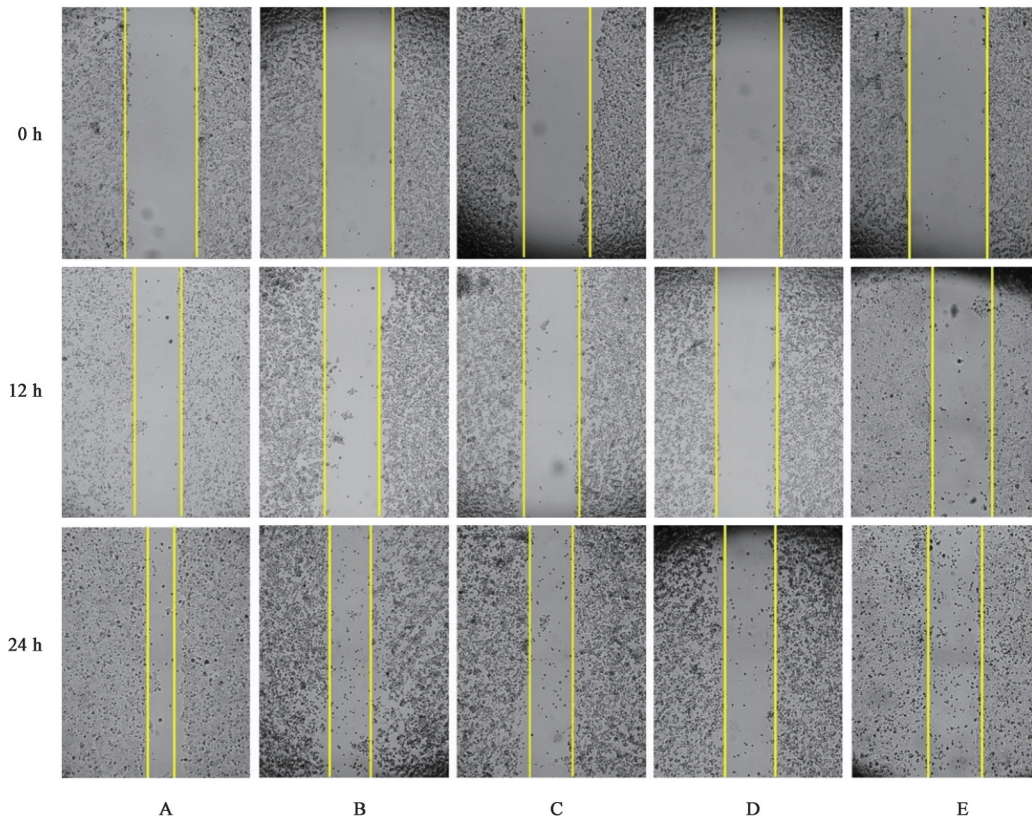


图2 白头翁汤对HCT116细胞迁移的影响(倒置显微镜,×40)

Fig. 2 Effect of Baitouweng Tang on migration of HCT116 cells (inverted microscope, ×40)

3.5 白头翁汤对HCT116细胞凋亡的影响 与空白组比较,白头翁汤组(125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>)细胞凋亡率明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),表明白头翁汤能

够浓度依赖性诱导HCT116细胞凋亡。见表4。

3.6 白头翁汤对HCT116细胞相关mRNA表达的影响 与空白组比较,白头翁汤组(500 mg·L<sup>-1</sup>)处

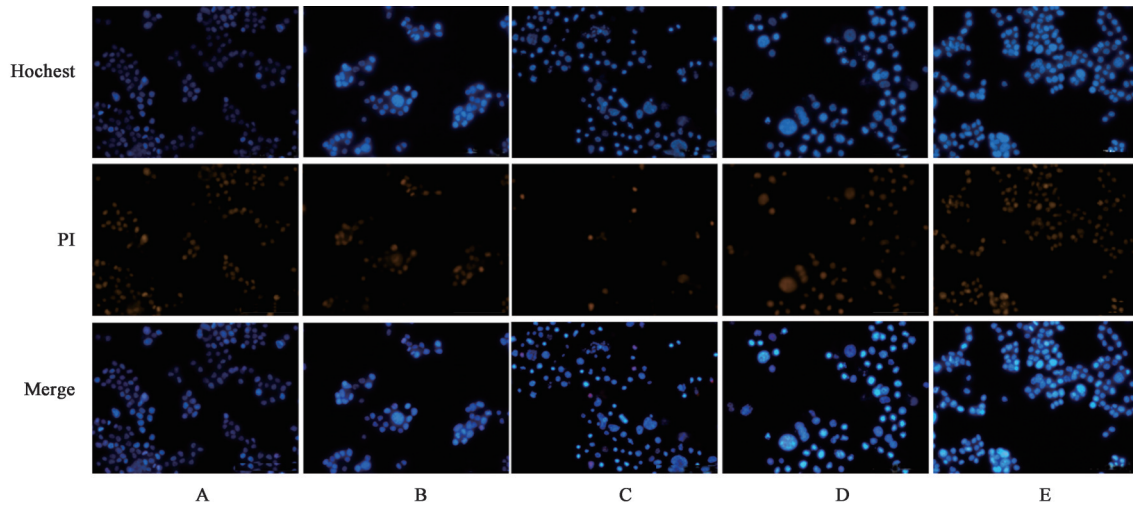


图3 白头翁汤对HCT116细胞凋亡的影响 (Hoechst 33324/PI, ×40)

Fig. 3 Effect of Baitouweng Tang on HCT116 cell apoptosis (Hoechst 33324/PI, ×40)

表4 白头翁汤对HCT116细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Baitouweng Tang on HCT116 cell apoptosis

( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	凋亡率%
空白组		6.26±0.70
白头翁汤组	125	10.46±0.90 <sup>1)</sup>
	250	10.88±1.20 <sup>1)</sup>
	500	12.44±2.40 <sup>2)</sup>
5-FU组	40	8.60±1.90

理24 h, 凋亡相关 Bax mRNA 表达水平显著增加 ( $P<0.01$ ), 白头翁汤组 (250、500 mg·L<sup>-1</sup>) Bcl-2 mRNA 表达明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 说明白头翁汤可以浓度依赖性诱导 HCT116 细胞凋亡。见表5。

3.7 白头翁汤对 Hh 信号通路相关 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 白头翁汤组 (250、500 mg·L<sup>-1</sup>)

表5 白头翁汤对HCT116细胞凋亡相关 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 5 Effect of Baitouweng Tang on mRNA expression of apoptosis in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Bax	Bcl-2
空白组		1.00±0.11	1.01±0.16
白头翁汤组	125	1.30±0.06	0.83±0.17
	250	1.37±0.14	0.57±0.08 <sup>1)</sup>
	500	3.20±0.18 <sup>2)</sup>	0.28±0.04 <sup>2)</sup>
5-FU组	40	6.14±0.92 <sup>2)</sup>	0.39±0.06 <sup>2)</sup>

Gli1、SHh、Smo 和 c-Myc mRNA 水平明显下调 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 白头翁汤组 (125、250、500 mg·L<sup>-1</sup>) SuFu mRNA 水平显著上调 ( $P<0.01$ ), 表明白头翁汤对 Hh 信号通路异常激活有较好抑制作用。见表6。

表6 白头翁汤对HCT116细胞Hh信号通路相关 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 6 Effect of Baitouweng Tang on mRNA expression of Hh signal pathway in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	SHh/ $\beta$ -actin	Gli1/ $\beta$ -actin	Smo/ $\beta$ -actin	c-Myc/ $\beta$ -actin	SuFu/ $\beta$ -actin
空白组		1.00±0.06	1.01±0.13	1.00±0.10	1.00±0.13	1.00±0.09
白头翁汤组	125	0.83±0.17	0.43±0.06 <sup>2)</sup>	0.41±0.08 <sup>2)</sup>	0.67±0.03 <sup>1)</sup>	1.35±0.09 <sup>2)</sup>
	250	0.43±0.07 <sup>2)</sup>	0.19±0.03 <sup>2)</sup>	0.29±0.08 <sup>2)</sup>	0.59±0.06 <sup>1)</sup>	1.41±0.18 <sup>2)</sup>
	500	0.12±0.05 <sup>2)</sup>	0.17±0.05 <sup>2)</sup>	0.28±0.07 <sup>2)</sup>	0.51±0.09 <sup>2)</sup>	2.18±0.12 <sup>2)</sup>
5-FU组	40	0.20±0.08 <sup>2)</sup>	0.35±0.02 <sup>2)</sup>	0.08±0.03 <sup>2)</sup>	0.45±0.06 <sup>2)</sup>	2.21±0.13 <sup>2)</sup>

3.8 白头翁汤对HCT116细胞凋亡相关蛋白水平的影响 与空白组比较, 白头翁汤组 (500 mg·L<sup>-1</sup>) 促凋亡蛋白 Bax 表达明显升高 ( $P<0.05$ ), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达被抑制 ( $P<0.05$ )。提示白头翁汤能够调控凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平, 从而诱导

HCT116 细胞凋亡。见图4、表7。

3.9 白头翁汤对HCT116细胞Hh通路相关蛋白水平的影响 与空白组比较, 白头翁汤组 (500 mg·L<sup>-1</sup>) 处理后, Hh 信号通路中 SHh、Gli1、Smo、c-Myc 蛋白明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<$

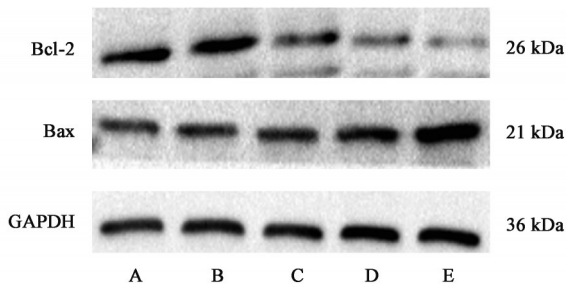


图4 HCT116细胞凋亡相关蛋白表达水平电泳  
Fig. 4 Electrophoresis of expression level of apoptosis related proteins in HCT116 cells

0.05,  $P < 0.01$ ), 白头翁汤组 ( $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Hh 信号通路负调控蛋白 SuFu 表达明显增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明白头翁汤可以抑制 Hh 信号通路的异常激活。见表8、图5。

表8 白头翁汤对HCT116细胞中Hh信号通路相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Baitouweng Tang on related proteins of Hh signal pathway in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SHh/GAPDH	Gli1/GAPDH	Smo/GAPDH	c-Myc/GAPDH	SuFu/GAPDH
空白组		0.44±0.07	0.41±0.02	0.21±0.02	0.33±0.03	0.19±0.07
白头翁汤组	125	0.26±0.07	0.33±0.05	0.17±0.04	0.21±0.02 <sup>1)</sup>	0.27±0.09
	250	0.23±0.02	0.22±0.03 <sup>2)</sup>	0.15±0.02 <sup>1)</sup>	0.18±0.02 <sup>2)</sup>	0.36±0.04
	500	0.12±0.03 <sup>1)</sup>	0.15±0.03 <sup>2)</sup>	0.11±0.02 <sup>2)</sup>	0.15±0.04 <sup>1)</sup>	0.57±0.09 <sup>1)</sup>
5-FU组	40	0.09±0.02 <sup>1)</sup>	0.11±0.03 <sup>2)</sup>	0.07±0.01 <sup>2)</sup>	0.07±0.01 <sup>2)</sup>	0.76±0.04 <sup>2)</sup>

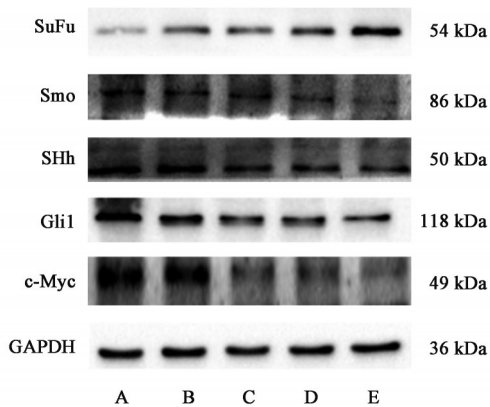


图5 HCT116细胞中Hh信号通路相关蛋白表达电泳  
Fig. 5 Electrophoresis of proteins of Hh signal pathway in HCT116 cells

#### 4 讨论

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 2020年我国因结直肠癌而死亡的人数达29万, 而结直肠癌的治疗一直存在耐药性发展<sup>[14]</sup>和药品价格昂贵的问题, 所以寻找代替和辅助药物是现今抗结直肠癌研究的热点。中医将结直肠癌归为“肠覃”“癥瘕”等范畴, 外感邪毒或饮食失调, 脾胃湿热蕴结, 下注肠道, 灼血为瘀, 热盛成毒, 日久发为肠癌。白头翁汤中以苦寒入血分的白头翁为君, 可清热解毒, 凉血止痢; 黄连、黄柏2味臣药共助君药清热解

表7 白头翁汤对凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Baitouweng Tang on apoptosis related proteins Bax and Bcl-2 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
空白组		0.47±0.05	0.93±0.17
白头翁汤组	125	0.60±0.09	0.57±0.02
	250	0.63±0.09	0.46±0.03
	500	0.75±0.08 <sup>1)</sup>	0.39±0.04 <sup>1)</sup>
5-FU组	40	1.02±0.08 <sup>2)</sup>	0.23±0.04 <sup>1)</sup>

毒, 燥湿止痢; 秦皮为佐使药, 可清热解毒, 收涩止痢, 四药合用治疗肠道热毒且湿邪停滞, 这与结直肠癌的病机相合, 且白头翁汤已在临床和前期研究都展现出对结直肠癌良好的治疗作用<sup>[15-16]</sup>。

经典Hh通路被激活后, Smo作为关键因子将信号跨膜传递至细胞质内<sup>[17-18]</sup>, 将原本被SuFu抑制的Gli蛋白释放出来, 然后进入核内, 开始转录靶基因<sup>[19-21]</sup>。Gli蛋白家族中Gli1可以调控一些原癌基因如RAS, MEK, c-Myc, Akt, 这些致癌基因调控DNA修复机制, 从而激活DNA受损细胞的抗凋亡机制, 促使肿瘤的发生<sup>[22]</sup>。Hh信号通路在结肠癌的发生发展过程中扮演着重要角色, 因此, 本研究将进一步探索白头翁汤以Hh信号通路为靶点, 诱导结肠肿瘤细胞凋亡的深层机制。

实验结果表明, 白头翁汤对结直肠肿瘤细胞HCT116有明显的增殖抑制作用, 在筛选出的浓度范围内, 肿瘤细胞形态发生改变, 且迁移能力下降, 这可能是由于白头翁汤处理后, 细胞中Hh信号通路的关键因子SHh、SMO表达显著下降, 这导致Hh信号跨膜传输受阻, 使得关键因子Gli1被抑制, 无法进入核内转录靶基因, 进而使原癌基因c-Myc被抑制。前期研究表明, Hh信号通路的关键因子SHh、Gli1与Bcl-2的表达密切相关<sup>[12]</sup>, 在Hoechst

33324/PI双染实验和流式细胞术中观察到肿瘤细胞凋亡数量增加很可能是由于白头翁汤抑制Hh信号通路的激活,导致c-Myc被抑制,使凋亡相关基因Bcl-2表达降低,Bax表达升高。Bcl-2与BH3-only蛋白结合减少,导致线粒体外膜通透化,而Bax与BH3-only蛋白结合增加,将信号传递到线粒体内部,使细胞经线粒体途径迅速死亡。

综上,白头翁汤可以抑制Hh信号通路活性,使其在结肠直肠癌细胞中的异常激活被抑制,从而改变细胞形态、增殖、迁移能力,诱导其在线粒体途径发生凋亡。本研究揭示了Hh信号通路在白头翁汤治疗结肠直肠癌的重要作用,为临床白头翁汤治疗结肠直肠癌提供科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 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): 209-249.
- [2] PATEL S G, AHNEN D J. Colorectal cancer in the young [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2018, 20(4): 15.
- [3] VEENSTRA C M, KRAUSS J C. Emerging systemic therapies for colorectal cancer [J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2018, 31(3): 179-191.
- [4] 钟宇, 郑学宝, 叶华, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及免疫机制的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12): 15-21.
- [5] 谢子葳, 李鑫, 谢碧岑, 等. 白头翁汤调控细胞因子治疗溃疡性结肠炎作用机制研究进展 [J]. *中成药*, 2021, 43(8): 2145-2148.
- [6] 金桑懿, 许玲. 白头翁汤对人肺腺癌细胞增殖及周期调控的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(05): 48-52.
- [7] 宋聚才, 巩跃生, 刘全林. 白头翁汤对结肠直肠癌小鼠肠道菌群、炎症因子及HER-2表达的影响 [J]. *中医药信息*, 2022, 39(3): 20-24.
- [8] 伍谨林, 杨柱, 龙奉玺, 等. 基于网络药理学研究白头翁汤治疗结肠直肠癌的作用机制 [J]. *中成药*, 2021, 43(11): 3206-3215.
- [9] 节阳华, 何文婷, 张洪亮. 白头翁汤治疗晚期结肠直肠癌的药效基因组学研究 [J]. *中国医药*, 2015, 10(6): 865-868.
- [10] DOHENY D, MANORE S G, WONG G L, et al. Hedgehog signaling and truncated Gli1 in cancer [J].

*Cells*, 2020, doi:10.3390/cells9092114.

- [11] 何曼, 张梦, 孙强, 等. 熊果酸通过 hedgehog 信号通路调控结肠直肠癌细胞 HCT116 自噬的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1217-1223.
- [12] 张梦, 何曼, 孙强, 等. 基于 Hedgehog 信号通路的熊果酸诱导结肠直肠癌 SW480 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2365-2373.
- [13] CHEN L, LIU M, YANG H, et al. Ursolic acid inhibits the activation of smoothened-independent non-canonical hedgehog pathway in colorectal cancer by suppressing AKT signaling cascade [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(9): 3555-3570.
- [14] LI Q, LAI Q, HE C, et al. RUNX1 regulates the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer through the Hedgehog signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2021, 12(21): 6363-6371.
- [15] 季漪, 李柳, 李文婷, 等. 吴勉华从瘀热论治直肠癌放射性肠损伤 [J]. *中医学报*, 2020, 35(12): 2592-2595.
- [16] 熊礼凤, 孙杭. 白头翁汤加味联合化疗治疗湿热蕴结型晚期结肠直肠癌临床观察 [J]. *浙江中医杂志*, 2021, 56(7): 509.
- [17] BRISCOE J, THÉRON P P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7): 416-429.
- [18] INGHAM P W, NAKANO Y, SEGER C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(6): 393-406.
- [19] HUMKE E W, DORN K V, MILENKOVIC L, et al. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(7): 670-682.
- [20] TUKACHINSKY H, LOPEZ L V, SALIC A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(2): 415-428.
- [21] WU X, ZHANG L S, TOOMBS J, et al. Extramitochondrial prosurvival BCL-2 proteins regulate gene transcription by inhibiting the SUFU tumour suppressor [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(10): 1226-1236.
- [22] QUALTROUGH D, BUDA A, GAFFIELD W, et al. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment [J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(6): 831-837.

[责任编辑 张丰丰]