

Hedgehog信号通路介导白藜芦醇对人胆囊癌 GBC-SD细胞株凋亡和侵袭的影响

秦洪莉¹, 莫立军¹, 张 瞳², 高 明¹

1. 北大荒集团红兴隆医院静脉用药集中调配中心 (黑龙江双鸭山 155811)

2. 北大荒集团红兴隆医院消化内科 (黑龙江双鸭山 155811)

【摘要】目的 探讨白藜芦醇 (RSV) 对人胆囊癌 GBC-SD 细胞的凋亡、侵袭能力和上皮间充质转化 (EMT) 的影响及其发生机制。**方法** 体外培养 GBC-SD 细胞, 随机分成空白组和 RSV 低、中、高剂量组 (0, 20, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSV)。通过 Annexin V FITC/PI 双染流式分析细胞凋亡情况, RT-PCR 检测 B 淋巴细胞瘤 -2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、胱天蛋白酶 3 (Caspase 3) mRNA 表达水平, Transwell 侵袭实验检测 GBC-SD 细胞侵袭能力, Western blotting 检测 EMT 标志物钙黏蛋白 E (E-cadherin)、钙黏蛋白 N (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的表达水平和 Hedgehog 信号通路成员神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (Gli1)、Gli2、音猬因子 (Shh) 的表达。再将 GBC-SD 细胞随机分为空质粒组、Gli1 过表达质粒组、Gli1 过表达质粒 +RSV 组, 通过 Western blotting 检测 Gli1 蛋白过表达情况, Annexin V-FITC/PI 双染流式和 Transwell 侵袭实验分别检测上述各组的凋亡水平和侵袭能力。**结果** 与空白组相比, RSV 各剂量组细胞凋亡率、Bax 和 Caspase 3 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞侵袭能力显著降低 ($P < 0.01$); RSV 中、高剂量组 Bcl-2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与空白组相比, RSV 高剂量组 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高, N-cadherin、Vimentin、Gli1、Gli2 和 Shh 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与转染空质粒 +RSV 组相比, Gli1 过表达质粒 +RSV 组细胞的凋亡率降低, 侵袭能力增加 ($P < 0.001$)。**结论** RSV 促进 GBC-SD 细胞凋亡、抑制 GBC-SD 细胞侵袭及 EMT, 其作用机制可能与抑制 Hedgehog 信号相关。

【关键词】 白藜芦醇; 胆囊癌; GBC-SD 细胞株; Hedgehog 信号通路; 上皮间充质转化; 凋亡; 侵袭

Effects of the resveratrol mediated by Hedgehog signaling pathway on the apoptosis and invasion of gallbladder cancer GBC-SD cell line

Hong-Li QIN¹, Li-Jun MO¹, Tong ZHANG², Ming GAO¹

1. Intravenous Drug Dispensing Center, Hongxinglong Hospital, Beidahuang Group, Shuangyashan 155811, Heilongjiang Province, China

2. Department of Gastroenterology, Hongxinglong Hospital, Beidahuang Group, Shuangyashan 155811, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Li-Jun MO, Email: molj9009@126.com

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202311008

通信作者: 莫立军, 主管药师, Email: molj9009@126.com

【Abstract】Objective To explore the effects of resveratrol (RSV) on regulating the apoptosis, invasion ability and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of GBC-SD cells and the underlying mechanisms. **Methods** GBC-SD cells were cultured *in vitro*, and randomly divided into blank group, RSV low, medium and high dose groups (0, 20, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSV). Annexin V-FITC/PI double stain flow cytometry was used to analyze the cellular apoptosis, RT-PCR assay was used to test the mRNA expression level of Bcl-2, Bax and Caspase 3, Transwell invasion assay was used to test the invasion ability of GBC-SD cells, and Western blotting assay was used to detect the protein expression of EMT markers (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin) and Hedgehog signaling members (Gli1, Gli2 and Shh). GBC-SD cells were then randomly divided into blank plasmid group, Gli1 overexpression plasmid group, and Gli1 overexpression plasmid+RSV group. The overexpression of Gli1 protein was detected by Western blotting, and the apoptosis rate and invasion ability were detected in the above group by Annexin V-FITC/PI double stain flow cytometry and transwell invasion assay respectively. **Results** Compared with the blank group, the apoptosis rate, Bax and Caspase 3 mRNA expression in each RSV dose group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the cell invasion ability was significantly reduced ($P<0.01$); the expression of Bcl-2 mRNA in the middle and high dose groups of RSV significantly decreased ($P<0.01$). Compared to the blank group, the protein expression level of E-cadherin was significantly increased, while the protein expression level of N-cadherin, Vimentin, Gli1, Gli2 and Shh were significantly decreased in the high-dose group of RSV ($P<0.01$). Compared with the transfected empty plasmid+RSV group, the apoptosis rate of cells in the Gli1 overexpression plasmid+RSV group was reduced and the invasion ability was increased ($P<0.001$). **Conclusion** RSV promotes GBC-SD cell apoptosis, inhibits GBC-SD cell invasion and EMT, and its mechanism of action may be related to the inhibition of Hedgehog signaling.

【Keywords】 Resveratrol; Gallbladder cancer; GBC-SD cell line; Hedgehog signaling pathway; Epithelial-mesenchymal transition; Apoptosis; Invasion

胆囊癌是胆道系统中最常见的恶性肿瘤之一，占胆道系统恶性肿瘤的 80%~85%。目前对这种肿瘤的分子发病机制、调节信号通路和靶向治疗药物等方面研究不足，阻碍了研究者们设计有效策略来应对这种疾病^[1]。Hedgehog 信号通路在多种肿瘤发生中表达异常，研究^[2]发现，胆囊癌组织中多个 Hedgehog 信号成员表达上调，通过抑制 Hedgehog 信号通路可以抑制胆囊癌细胞株的侵袭能力，并促进其凋亡，因此 Hedgehog 信号通路可能是治疗胆囊癌的一个潜在靶点。

白藜芦醇 (resveratrol, RSV)，又名 3,4',5'-三羟基二苯乙烯，为天然植物中提取，具有抗微生物、抗氧化、抗炎症等活性，被认为是一种有效、可靠的癌症化学预防和治疗策略^[3]。研究^[4-5]发现，RSV 可以抑制胆囊癌细胞的生长并促进其凋亡，但相关机制尚未得到阐释。RSV 的抗肿瘤

作用，与其调控多种信号通路密切相关。其中，RSV 通过对 Hedgehog 信号通路的拮抗作用，可以抑制多种肿瘤的发生过程，如胰腺癌、胃癌、卵巢癌等^[6-8]。考虑到胆囊癌中 Hedgehog 信号通路上调及 RSV 对 Hedgehog 信号通路的抑制作用，本课题组推测 RSV 在胆囊癌中的抗肿瘤作用可能是通过 Hedgehog 信号通路介导。另外，RSV 可以逆转多种肿瘤的上皮间充质转化 (EMT) 过程，即上皮细胞标志物的丢失，如 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 等，伴间充质细胞标志物的获取，如 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 等，但在胆囊癌中是否有这一作用尚不清楚^[9]。GBC-SD 细胞株是一种常用的胆囊癌细胞株，具有高度侵袭性和一定的干性，常被用于探究药物在胆囊癌中的作用机制^[10-11]，故本研究通过体外 GBC-SD

胆囊癌细胞株模型, 探究了 RSV 对 GBC-SD 细胞株凋亡、侵袭及 EMT 的调控作用, 并进一步探究 Hedgehog 信号通路在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

QuantStudio 6 Flex System 实时荧光定量 PCR 仪 (Life Technologies 公司); SMR16.1 酶标仪 (Uscnk 公司); ND-100 分光光度计 (杭州米欧仪器有限公司); FACSCantoII 流式细胞仪 (BD 公司); IX51 倒置显微镜 (Olympus 公司)。

RSV (Sigma 公司, 批号: 658741, 纯度 99.99%); 新生胎牛血清 (批号: 10100147C)、RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司, 批号: 11875093); 神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (Gli1) 过表达质粒 (批号: NM005269-6)、空质粒 (批号: V790-20) 购自生物风公司; Lipofectamine 3000 转染试剂 (Thermo Fisher Scientific, 批号: L3000001); Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天公司, 批号: C1062M); Transwell 小室 (批号: CLS3399)、Matrigel 基质胶 (批号: 356237) 购自康宁公司; E-cadherin 抗体 (批号: 14472)、N-cadherin 抗体 (批号: 13116)、Gli1 抗体 (批号: 3538)、Gli2 抗体 (批号: 2585) 购自 CST 公司; Vimentin 抗体 (武汉三鹰公司, 批号: 10366-1-AP); Shh 抗体 (批号: DF7747)、 β -actin 抗体 (批号: AF7018) 和相应二抗 (批号: S0001、S002) 购自 Affinity Biosciences 公司; BCA 试剂盒 (批号: 71285-M)、PVDF 膜 (批号: IPVH00005) 购自 Millipore 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号: 9767)、RNA 逆转录试剂盒 (批号: RR037A)、TB Green Fast qPCR Mix (批号: RR430A) 购自 Takara 公司; RT-PCR 引物序列均由生工生物工程上海股份有限公司合成。

1.2 细胞

人胆囊癌细胞 GBC-SD 细胞株 (批号: TCHu 16) 购自中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、分组处理及质粒过表达

用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI-1640 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞孵箱中培养

GBC-SD 细胞, 细胞密度达 90%~100% 后用 0.25% 胰酶进行消化传代。将 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 当细胞融合度达 70%~80% 后, 用 0, 20, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RSV 处理 48 h, 依次设为空白组 (加入等体积 DMSO)、RSV 低、中、高剂量组。质粒转染方法参照 Lipo3000 试剂说明书, 当细胞融合度达 70%~80% 左右, 分别转染空质粒或 Gli1 过表达质粒, 同时加入高剂量 RSV 或等体积 DMSO 孵育 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3.2 Annexin V FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

收集各组细胞, 用冷 PBS 清洗 2 次, 1X Binding Buffer 重悬后, 分别加入 Annexin V 和 PI 处理细胞 (按照试剂盒操作说明书进行) 并设置空白组 (不加染料)、Annexin 单染组和 PI 单染组, 最后用流式细胞仪和 FlowJo 软件分析细胞凋亡情况, 即比较右下象限早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 的百分比。

1.3.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

冰上将 Matrigel 胶与冰 PBS 按 1:7 进行稀释, 取 70 μL 稀释的 Matrigel 胶均匀地铺于 48 孔 Transwell 小室上, 细胞孵箱放置 2 h 待胶凝固后, 各组取 5×10^4 个 GBC-SD 细胞重悬于 200 μL 无血清培养基中, 接种于 Matrigel 胶上, 下室加入含 10% 胎牛血清的完全培养液 800 μL , 于孵箱培养 48 h, 再经甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色后, 用棉签刮除上室面未侵袭的细胞, 在显微镜下随机选取 5 个视野观察并拍照, 采用 Image J 软件计数穿膜细胞的数量。

1.3.4 Western blotting 检测蛋白表达水平

用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 裂解各组细胞并提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 用 5% SDS 在 100 °C 下将蛋白变性, 在 PAGE 胶上点样后电泳, 转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂牛奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h, 分别用 E-cadherin (稀释比例 1:1 000)、N-cadherin (稀释比例 1:2 000)、Vimentin (稀释比例 1:5 000)、Gli1 (稀释比例 1:1 000)、Gli2 (稀释比例 1:500)、Shh (稀释比例 1:1 000)、 β -actin (稀释比例 1:10 000) 一抗稀释液 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 随后室温摇床上孵育稀释的二抗 (稀释比例 1:10 000) 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 显影, 凝胶成像系统中曝光并拍照记录, 用

Image J 软件测量平均灰度值，以目的条带与内参 β -actin 条带灰度值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.3.5 RT-PCR检测细胞mRNA表达情况

使用 Trizol 提取各组细胞的总 RNA，利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA 后，以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测。引物序列如下：Bax 正向：5'-GCCAATTGGAGATGAAGTGG-3'，反向：5'-GTGAGCGAGGCGGTGAGGAC-3'；Bcl-2 正向：5'-GCAGAGATGTCCAGTCAGC-3'，反向：5'-CCCACCGA ACTCAAAGAAGG-3'；Caspase 3 正向：5'-GCAGCAGCCTCAAATTGTTGACTA-3'，反向：5'-TGCTCCGGCTCAAACCATC-3'；GAPDH 正向：5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'，反向：5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。

PCR 的反应条件为 95℃ 预变性 30 s，95℃ 变性 10 s，60℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 30 s，40 个循环，72℃ 延伸 60 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 软件进行统计分析，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*t* 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV对GBC-SD细胞凋亡的影响

Annexin V FITC/PI 双染法检测结果显示，RSV 以剂量依赖方式促进 GBC-SD 细胞的凋亡，其中 RSV 各剂量组的细胞早期凋亡率显著高于空白组 ($P < 0.01$)；RSV 各剂量间的细胞凋亡率差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

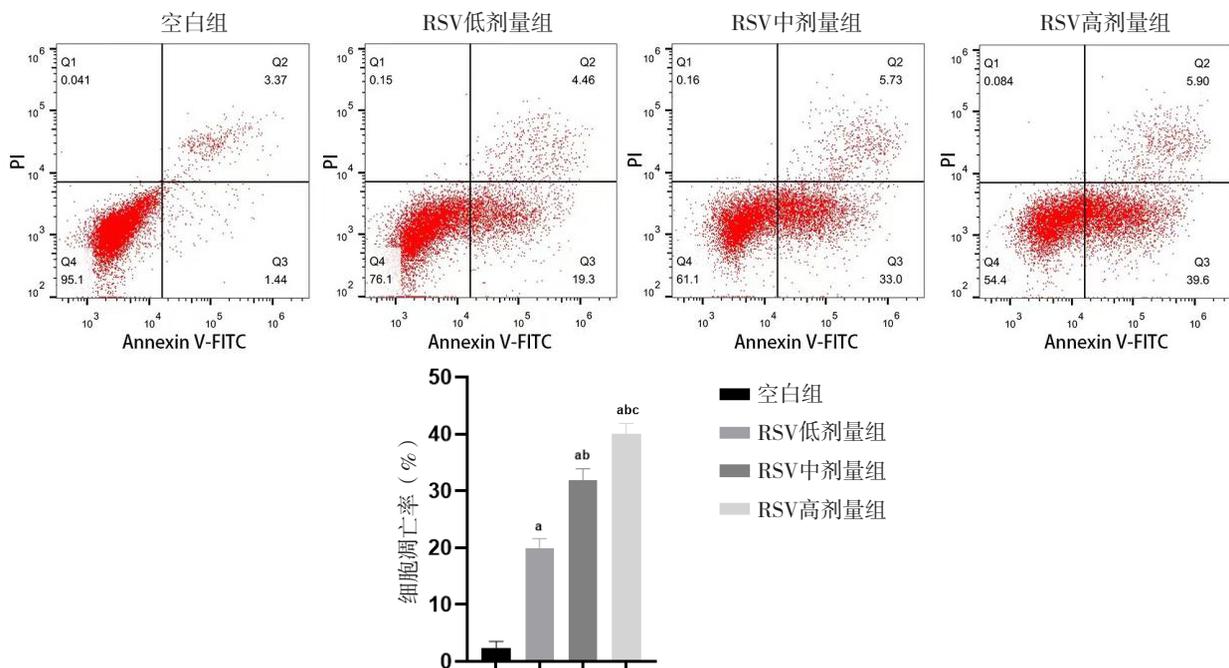


图1 不同浓度RSV对GBC-SD细胞株凋亡的影响 (n=3)

Figure 1. The effect of different concentrations of RSV on the apoptosis of GBC-SD cells (n=3)

注：与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与RSV低剂量组比较，^b $P < 0.05$ ；与RSV中剂量组比较，^c $P < 0.05$

RT-PCR 结果显示，不同浓度 RSV 处理 GBC-SD 细胞 48 h 后，Bax 和 Caspase 3 mRNA 表达水平与 RSV 浓度呈正相关，与空白组比较，RSV 各剂量组的 Bax 和 Caspase 3 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；而 Bcl-2 mRNA 水平与 RSV 浓度呈负相关，与空白组比较，RSV 中、高剂量组 Bcl-2 mRNA 水平显著下降 ($P < 0.01$)，但低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见

图 2。

2.2 RSV抑制GBC-SD细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果显示，不同浓度梯度 RSV 处理 GBC-SD 细胞 48 h 后，与空白组比较，RSV 各剂量组对 GBC-SD 细胞侵袭能力有明显的抑制作用，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，且不同剂量组之间的差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 3。

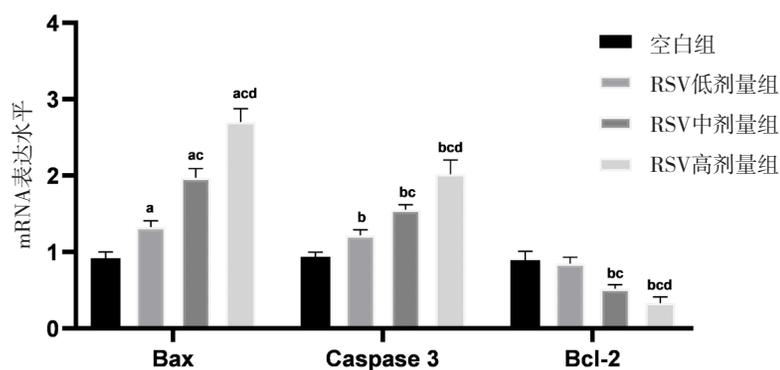


图2 不同浓度RSV对GBC-SD细胞株Bax、Caspase3和Bcl-2 mRNA表达的影响 (n=3)

Figure 2. The effect of different concentrations of RSV on the expression of Bax, Caspase3 and Bcl-2 mRNA in GBC-SD cells (n=3)

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与RSV低剂量组比较, ^c $P < 0.05$; 与RSV中剂量组比较, ^d $P < 0.05$

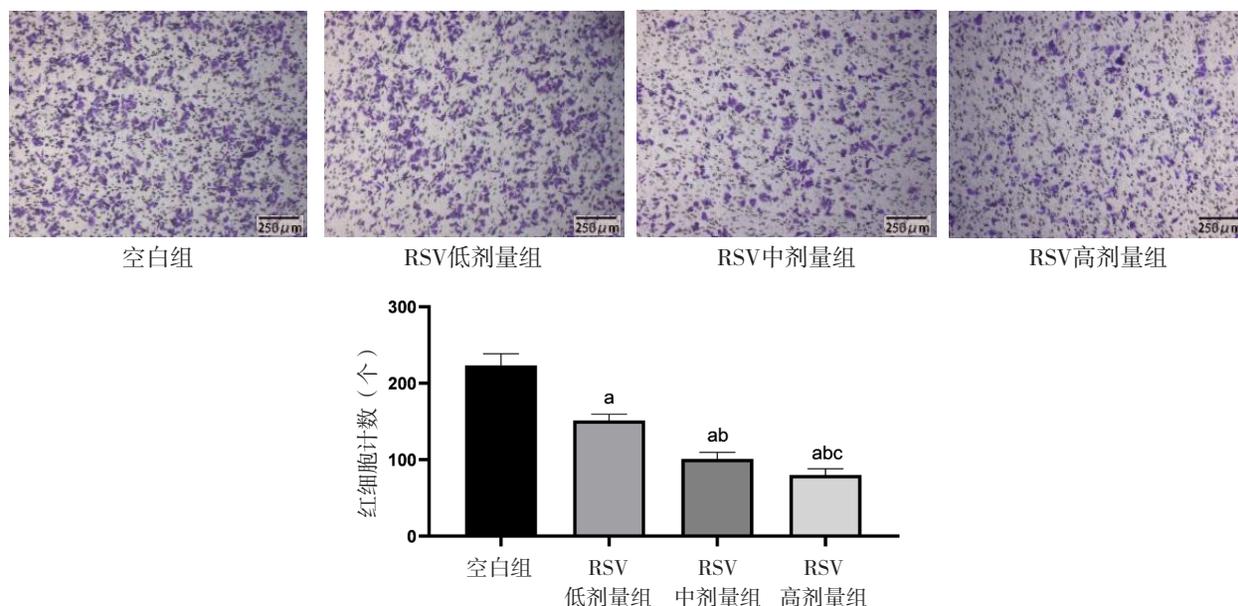


图3 不同浓度RSV对GBC-SD细胞株侵袭能力的影响 (n=3)

Figure 3. The effect of different concentrations of RSV on the invasion ability of GBC-SD cells (n=3)

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与RSV低剂量组比较, ^b $P < 0.01$; 与RSV中剂量组比较, ^c $P < 0.01$

考虑到上述不同剂量 RSV 对 GBC-SD 细胞凋亡和侵袭行为的影响结果, 拟进一步采用效果更明显的高剂量组, 并通过检测 EMT 相关蛋白的表达情况, 观察 RSV 对 GBC-SD 细胞 EMT 行为的影响。Western blotting 结果显示, RSV 高剂量组处理 GBC-SD 细胞 48 h 后, 间充质细胞相关标记物 Vimentin、N-cadherin 蛋白表达水平较空白组显著降低 ($P < 0.01$), 而上皮细胞相关标记物 E-cadherin 蛋白表达水平较空白组显著升高 ($P < 0.01$), 见图 4。

2.3 RSV抑制了GBC-SD细胞的Hedgehog信号通路

本研究进一步选择了对 GBC-SD 细胞促凋亡

效果最明显的 RSV 高剂量组来观察 RSV 处理细胞后 Hedgehog 信号通路相关蛋白表达水平变化。Western blotting 结果显示, 与空白组比较, RSV 高剂量组 Gli1、Gli2 和 Shh 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.4 上调Gli1逆转RSV对GBC-SD细胞凋亡的促进作用及对GBC-SD细胞侵袭的抑制作用

本研究进一步观察上调 Gli 蛋白后能否逆转 RSV 对 GBC-SD 细胞凋亡、侵袭的影响。Western blotting 结果显示, 转染 Gli1 过表达质粒的 GBC-SD 细胞较转染对照空质粒的 GBC-SD 细胞, Gli1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$), 见图 6。

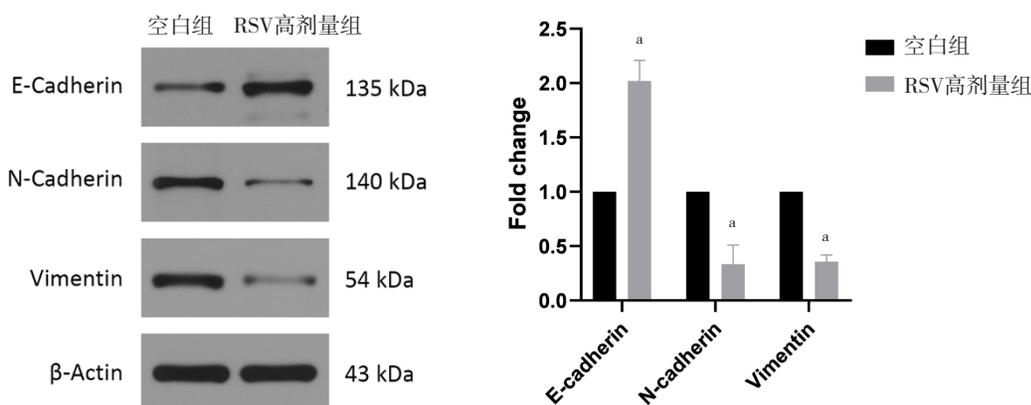


图4 高浓度RSV对GBC-SD细胞株E-cadherin、N-Cadherin和Vimentin蛋白表达的影响 (n=3)
 Figure 4. The effect of high dose of RSV on the expression of E-cadherin, N-Cadherin and Vimentin proteins in GBC-SD cells (n=3)

注: 与空白组比较, *P<0.01

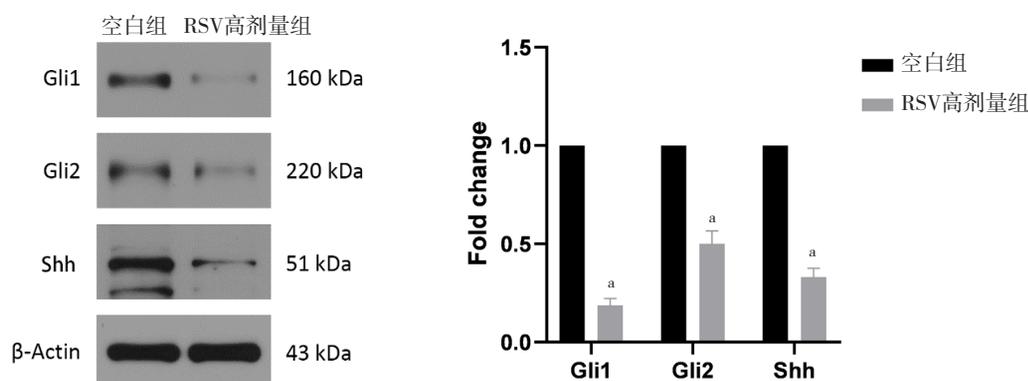


图5 高浓度RSV对GBC-SD细胞株Gli1、Gli2、Shh蛋白表达的影响 (n=3)
 Figure 5. The effect of high dose of RSV on the expression of Gli1, Gli2, Shh proteins in GBC-SD cells (n=3)

注: 与空白组比较, *P<0.01

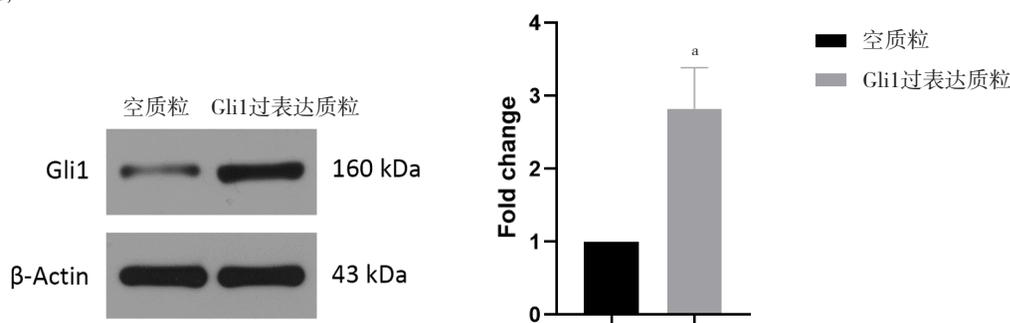


图6 转染Gli1过表达质粒对GBC-SD细胞株Gli1蛋白表达的影响 (n=3)
 Figure 6. The effect of transfecting Gli1 overexpression vector on the expression of Gli1 protein in GBC-SD cells (n=3)

注: 与空质粒比较, *P<0.01

Annexin V FITC/PI 双染法结果显示, 相较于单纯转染空质粒组, 转染空质粒同时加入 RSV 高剂量组的凋亡率显著增加 (P < 0.01)。相较于转染空质粒同时加入高剂量 RSV 组, 转染 Gli1 质粒同时加入高剂量 RSV 组的凋亡率显著减少 (P

< 0.01), 见图 7。Transwell 侵袭实验结果显示, 相较于转染空质粒同时加入高剂量 RSV 组, 转染 Gli1 质粒同时加入高剂量 RSV 组的穿膜细胞数量显著增加 (P < 0.01), 见图 8。

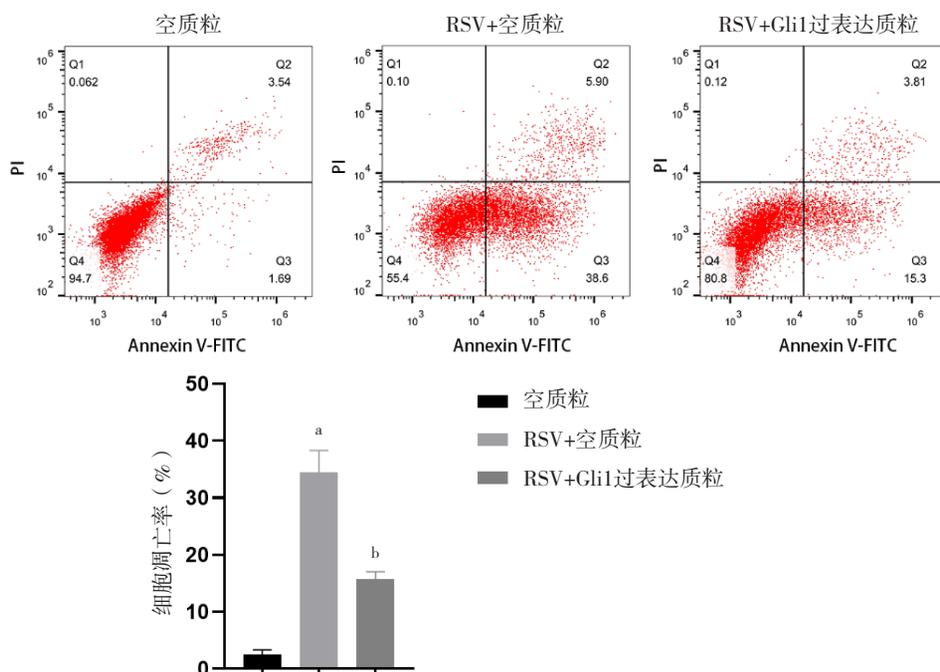


图7 转染Gli1过表达质粒对RSV处理后GBC-SD细胞株凋亡的影响 ($n=3$)

Figure 7. The effect of transfecting Gli1 overexpression vector on the apoptosis of GBC-SD cells treated with RSV ($n=3$)

注: 与空质粒比较, ^a $P < 0.01$; 与RSV+空质粒比较, ^b $P < 0.01$

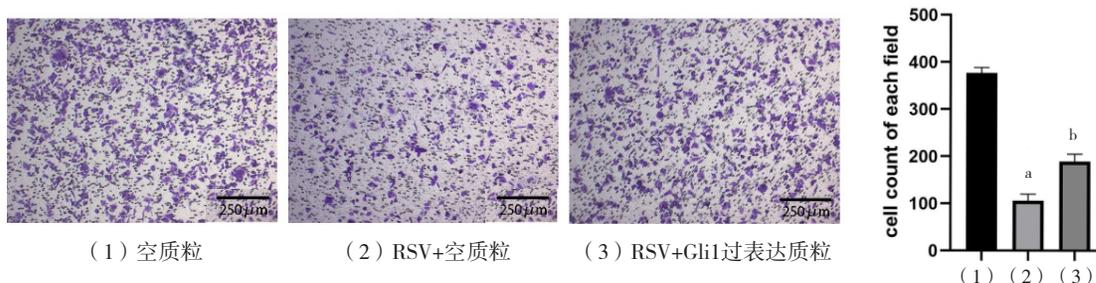


图8 转染Gli1过表达质粒对RSV处理后GBC-SD侵袭能力的影响 ($n=3$)

Figure 8. The effect of transfecting Gli1 overexpression vector on the invasion ability of GBC-SD cells treated with RSV ($n=3$)

注: 与空质粒比较, ^a $P < 0.01$; 与RSV+空质粒比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论

胆囊癌是一种罕见的肿瘤, 发病率为 2.5/10 万人, 其进展的危险因素包括胆结石、慢性炎症和异常胰胆管连接的存在。胆囊癌的病程长达 5~15 年, 其早期临床表现无特异性, 难以及时诊断, 发展到晚期后患者往往预后差^[12]。在进展性胆囊癌病例中, 标准治疗方案为吉西他滨联合顺铂化疗, 但该方案对患者总体生存率效果不明显。目前对胆囊癌的肿瘤发生知识存在很大的空白, 因此需要进一步探索胆囊癌发展的分子机制, 并挖掘出有效的生物标志物和新的治疗突破, 并最

终改善这种致命疾病的预后^[13]。

RSV 是一种天然的植物来源化合物, 通过促进凋亡和抑制 EMT 等作用达到抑制癌症的效果^[3]。研究^[5,14]表明, RSV 可以抑制胆囊癌细胞株的生长并促进其凋亡, 但具体的分子机制尚不清楚。本实验结果同样证实, RSV 可以促进 GBC-SD 细胞凋亡, 同时上调促凋亡基因 Bax、Caspase 3 mRNA 表达并下调抑凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达, 且这种促凋亡作用存在剂量依赖效应, 浓度达 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最强。EMT 是胆囊癌进展过程中显著的病理特征, 即极化的胆囊上皮细胞向间充质细胞转化的过程, EMT 也是导致细胞侵袭

能力增加的原因之一^[15]。为了进一步探究 RSV 能否抑制 GBC-SD 细胞的侵袭能力和 EMT，本研究通过侵袭实验和 Western blotting 法证明了 RSV 同样以剂量依赖的方式减弱 GBC-SD 细胞的侵袭能力并抑制 EMT，提示 RSV 可以通过多方面作用抑制胆囊癌的发展。

Hedgehog 信号因发现其与多种炎症性疾病和恶性肿瘤有关而受到广泛研究。Hedgehog 通路由膜蛋白受体 PTCH 和 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体家族成员 Smoothed 组成。Smoothed 的下游信号是胶质瘤相关致癌因子 Gli1、Gli 2 和 Gli 3，其中，Gli1 是一种转录激活因子。研究^[16]表明，Hedgehog 信号通路在慢性胆囊炎和 GBC 中异常激活，Hedgehog 信号通路的改变可能参与了胆囊炎向胆囊癌变的发展过程。Hedgehog 信号通路可以调控 EMT^[17]。沉默 GBC-SD 细胞株的 SNHG6 LncRNA 后，可以抑制 Shh 信号通路及 EMT，从而下调胆囊癌细胞的增殖、侵袭能力^[18]。另外，Gli1 蛋白被发现可以正向调控胆囊癌细胞的侵袭能力^[19]，这些结果均提示 Hedgehog 信号通路与胆囊癌的肿瘤发生密切相关。

为了探索 RSV 促进 GBC-SD 细胞凋亡和抑制 GBC-SD 细胞侵袭的分子机制是否与 Hedgehog 信号通路相关，本实验首先检测了 GBC-SD 细胞经 RSV 诱导后 Hedgehog 信号通路相关成员的蛋白水平变化。结果显示，RSV 高剂量组显著下调 GBC-SD 细胞中 Gli1、Gli2、Shh 蛋白表达水平，提示 RSV 处理 GBC-SD 细胞后，Shh 信号通路受到了抑制。为了进一步探索下调的 Hedgehog 信号通路是否介导 RSV 对 GBC-SD 细胞的抑癌作用，观察了过表达 Gli1 基因能否逆转 RSV 对 GBC-SD 细胞的凋亡诱导及侵袭抑制的作用。结果显示，过表达 Gli1 蛋白能够部分逆转 RSV 对 GBC-SD 细胞的凋亡诱导及侵袭抑制的作用，提示 Hedgehog 信号通路可能是调控 RSV 影响 GBC-SD 细胞凋亡和侵袭的潜在机制。

综上所述，本研究证明了下调的 Hedgehog 信号通路部分介导了 RSV 对 GBC-SD 细胞的凋亡诱导和侵袭抑制作用，而 RSV 对 GBC-SD 细胞凋亡和侵袭的影响存在剂量依赖效应。同时，RSV 还可以抑制 GBC-SD 细胞的 EMT。提示，RSV 可以从多方面抑制 GBC-SD 细胞的肿瘤发生。本研究为 RSV 治疗胆囊癌涉及的分子机制提供了新思路。

参考文献

- 1 Sharma A, Sharma KL, Gupta A, et al. Gallbladder cancer epidemiology, pathogenesis and molecular genetics: recent update[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(22): 3978–3998. DOI: 10.3748/wjg.v23.i22.3978.
- 2 Matsushita S, Onishi H, Nakano K, et al. Hedgehog signaling pathway is a potential therapeutic target for gallbladder cancer[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(3): 272–280. DOI: 10.1111/cas.12354.
- 3 Rauf A, Imran M, Butt MS, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: a review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(9): 1428–1447. DOI: 10.1080/10408398.2016.1263597.
- 4 张文兴, 李嘉懿. 白藜芦醇白蛋白纳米粒对人胆囊癌 GBC-SD 细胞凋亡的影响 [J]. *中医肿瘤杂志*, 2019, 1(4): 45–48. [Zhang WX, Li JY. Effect of resveratrol bovine serum albumin nanoparticles on apoptosis of human gallbladder carcinoma GBCSD cells[J]. *Journal of Oncology in Chinese Medicine*, 2019, 1(4): 45–48. DOI: 10.19811/j.cnki.issn2096-6628.2019.04.010.
- 5 胜利, 安利峰, 何焯, 等. 白藜芦醇抑制胆囊癌细胞生长与诱导细胞凋亡的实验研究 [J]. *中药材*, 2005, 28(6): 489–491. [Sheng L, An LF, He Y, et al. Experimental study on inhibiting growth and inducing apoptosis of gallbladder carcinoma cells by resveratrol[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2005, 28(6): 489–491. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2005.06.020.
- 6 Mo WH, Xu XF, Xu L, et al. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell[J]. *Pancreatology*, 2011, 11(6): 601–609. DOI: 10.1159/000333542.
- 7 Gao Q, Yuan Y, Gan HZ, et al. Resveratrol inhibits the hedgehog signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition and suppresses gastric cancer invasion and metastasis[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(5): 2381–2387. DOI: 10.3892/ol.2015.2988.
- 8 Ferraresi A, Esposito A, Girone G, et al. Resveratrol contrasts LPA-induced ovarian cancer cell migration and platinum resistance by rescuing hedgehog-mediated autophagy[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3213–3213. DOI: 10.3390/CELLS10113213.
- 9 Guo K, Feng YQ, Zheng XE, et al. Resveratrol and

- its analogs: potent agents to reverse epithelial-to-mesenchymal transition in tumors[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 644134. DOI: 10.3389/FONC.2021.644134.
- 10 Yin BB, Wu SJ, Zong HJ, et al. Preliminary screening and identification of stem cell-like sphere clones in a gallbladder cancer cell line GBC-SD[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12(4): 256-263. DOI: 10.1631/jzus. B1000303.
- 11 Chen HP, Wu XJ, Duan YT, et al. Ursolic acid isolated from *Isodon excisoides* induces apoptosis and inhibits invasion of GBC-SD gallbladder carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(2): 1467-1474. DOI: 10.3892/ol.2019.10397.
- 12 Randi G, Franceschi S, La Vecchia C. Gallbladder cancer worldwide: geographical distribution and risk factors[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(7): 1591-1602. DOI: 10.1002/ijc.21683.
- 13 Bal MM, Ramadwar M, Deodhar K, et al. Pathology of gallbladder carcinoma: current understanding and new perspectives[J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(3): 509-525. DOI: 10.1007/s12253-014-9886-3.
- 14 Roncoroni L, Elli L, Braidotti P, et al. Transglutaminase 2 mediates the cytotoxicity of resveratrol in a human cholangiocarcinoma and gallbladder cancer cell lines[J]. *Nutr Cancer*, 2018, 70(5): 761-769. DOI: 10.1080/01635581.2018.1470648.
- 15 Xu SW, Zhan M, Wang J. Epithelial-to-mesenchymal transition in gallbladder cancer: from clinical evidence to cellular regulatory networks[J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17069. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.69.
- 16 Xie F, Xu XP, Xu AG, et al. Aberrant activation of Sonic hedgehog signaling in chronic cholecystitis and gallbladder carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(3): 513-521. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.10.017.
- 17 Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- 18 Liu XF, Wang K, Du HC. LncRNA SNHG6 regulating Hedgehog signaling pathway and affecting the biological function of gallbladder carcinoma cells through targeting miR-26b-5p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(14): 7598-7611. DOI: 10.26355/eurrev_202007_22258.
- 19 Tian L, Deng ZD, Xu L, et al. Downregulation of ASPP2 promotes gallbladder cancer metastasis and macrophage recruitment via aPKC- ι /GLI1 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1115. DOI: 10.1038/s41419-018-1145-1.

收稿日期: 2023年03月21日 修回日期: 2023年07月24日
本文编辑: 钟巧妮 周璐敏