

·基础研究·

基于Notch信号通路探讨夏枯草抑制大肠癌细胞增殖及干性的机制

田浩源^{1,2}, 谢意³, 方翌^{1,4}, 程瑛³, 林妍², 苏代丰², 魏丽慧^{1,4*}

1 福建中医药大学科技创新与转化中心, 福建 福州 350122;

2 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122;

3 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

4 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122

* 通信作者: 魏丽慧, E-mail: 282117657@qq.com

收稿日期: 2023-07-05; 接受日期: 2023-11-25

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81703913, 81603413)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.03006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的** 以肿瘤干细胞为切入点, 基于Notch信号通路探究夏枯草对大肠癌细胞增殖及干性的调控机制。**方法** 体外培养大肠癌SW480细胞, 待细胞处于对数生长期后, 随机分成对照组和0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组。对照组不进行药物干预; 剩余3组分别添加0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL的夏枯草药液, 并将各组所含DMSO补足至等量, 干预24 h后进行后续实验。采用倒置显微镜观察大肠癌SW480细胞生长形态及密度, 0.4%台盼蓝染色法检测活细胞数并计算细胞存活率; CCK8法检测大肠癌SW480细胞的增殖抑制率; 流式细胞术检测大肠癌SW480细胞群中干细胞比例; 克隆球形成实验检测大肠癌SW480细胞的自我更新能力; Western blot法检测大肠癌SW480细胞内增殖调控蛋白c-Myc, 肿瘤干细胞特征标记物CD44、CD133、SOX2以及Notch信号通路相关蛋白Notch1、Hes1蛋白相对表达量。**结果** 与对照组比较, 0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌SW480细胞生长和细胞存活率随着加药浓度增加而受到明显抑制($P < 0.05$); 大肠癌SW480细胞增殖能力随着加药浓度增加而明显下降($P < 0.05$); 大肠癌SW480细胞群中肿瘤干细胞比例随着加药浓度增加而明显下降($P < 0.05$); 大肠癌SW480细胞自我更新能力随着加药浓度增加而明显抑制($P < 0.05$)。Western blot结果显示, 与对照组相比, 0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌SW480细胞增殖调控蛋白c-Myc, 肿瘤干细胞特征性标记物CD44、CD133、SOX2蛋白及通路相关蛋白Notch1、Hes1的相对表达量随着加药浓度增加而明显下调($P < 0.05$)。**结论** 夏枯草可以抑制大肠癌细胞的增殖及干性, 抑制Notch通路的活化可能是其发挥作用的重要机制。

关键词 大肠癌; 夏枯草; 增殖; 干性; Notch信号通路

大肠癌是致死率较高的消化系统癌症之一, 严重危害人类健康^[1]。目前, 根治性手术切除配合化疗是治疗大肠癌的首选方式, 但是大部分大肠癌患者通过手术及化疗后, 仍无法彻底清除癌症病灶, 会出现肿瘤的复发及转移^[1]。因此, 防治大肠癌复发及转移是当前治疗的重难点。

研究发现, 肿瘤组织中存在一种被命名为“肿瘤干细胞”的小群体, 具有持续增殖、自我更新和高致瘤特性, 是肿瘤发生、复发及转移的重要原因^[2]。因此, 寻找以肿瘤干细胞为靶向对象的有效抗癌药物对优化大肠癌临床治疗, 防治术后复发与转移, 进而促进肿瘤患者康复具有重要意义。

引用格式: 田浩源, 谢意, 方翌, 等. 基于Notch信号通路探讨夏枯草抑制大肠癌细胞增殖及干性的机制[J]. 康复学报, 2024, 34(3): 233-241.

TIAN H Y, XIE Y, FANG Y, et al. Mechanism of Spica Prunellae in suppressing proliferation and stem cell properties of colorectal cancer cells based on Notch signaling pathway [J]. Rehabil Med, 2024, 34(3): 233-241.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.03006

©《康复学报》编辑部, 开放获取CC BY-NC-ND 4.0协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

夏枯草作为天然药用植物,以其“清火明目,散肿消瘿”功效所著称,能防治胰腺癌、甲状腺癌等多种恶性肿瘤^[3]。课题组前期研究表明,夏枯草乙醇提取物可诱导人结肠癌细胞凋亡,抑制结肠癌细胞增殖^[4],但夏枯草是否影响大肠癌干细胞,及其抑制癌细胞增殖及干性的具体机制尚未阐明。因此,本文以肿瘤干细胞为切入点,探讨夏枯草对大肠癌细胞增殖及干性的调控作用和作用机制,为夏枯草防治大肠癌的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

CO₂恒温培养箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:3111);CountStar[®]全自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司,型号:IC1000);流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司,型号:MoFlo XDP);Leica Microsystems CMS GmbH(德国徕卡公司,型号:11090137001);Multiskan FC型酶标仪(美国赛默飞世尔仪器有限公司,型号:357-911802);ChemiDoc MP Imaging System(美国Bio-Rad公司,型号:734BR4832);高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司,型号:Neo 13R);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂,型号:RE-520A)。

1.2 实验试剂

L-15不完全培养液购自于江苏凯基生物技术股份有限公司;CCK-8试剂盒、SuperKine[™]增强型ECL发光液、Notch 1抗体均购自于Abbkine公司;β-Actin抗体购自于Beyotime公司;GAPDH抗体、Hes1抗体、CD44抗体、兔二抗、鼠二抗均购自于南京川博生物技术有限公司;c-Myc抗体、SOX2抗体均购自于Cell Signaling technology公司;CD133抗体购自于Proteintech Technology公司。

1.3 实验药物与细胞株

夏枯草购于福建中医药大学国医堂中药房(批号:190826);大肠癌细胞株SW480购自上海中科院细胞库。

1.4 实验方法

1.4.1 夏枯草药液的制备 称取5 kg夏枯草药材,加入50 kg的65%乙醇使夏枯草充分浸润。采取加热回流的方式对药材进行提取,每次1.5 h,重复2次。将2次滤过所得滤液合并,减压(-0.09 MPa, 50 °C)回收乙醇,将药液浓缩成稠膏后经干燥、粉碎即得粉末。称取0.25 g粉末用0.5 mL二甲基亚砜(DMSO)进

行溶解,加PBS定容至1 mL,制成母液(0.25 g/mL),-20 °C保存备用。

1.4.2 细胞完全培养基配制 在L-15不完全培养基中加入10%体积的胎牛血清和1%体积的青霉素-链霉素,存于4 °C冰箱备用。

1.4.3 实验分组及干预 将大肠癌细胞SW480随机分成对照组和0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组,种板密度均为 2×10^5 个/mL。其中,对照组不进行药物干预;剩余3组分别加入0.1、0.2、0.4 mg/mL的夏枯草药液,将各组所含DMSO补足至等量,干预24 h后,进行后续实验。

1.5 观察指标

1.5.1 细胞存活率检测 按上述“1.4.3”方法将不同浓度的夏枯草药液干预过后的细胞用PBS清洗2次,并拍照记录。分别加入胰蛋白酶进行消化收集细胞,用1 mL L-15细胞培养液进行重悬,各组取20 μL细胞悬液分别与20 μL 0.4%的台盼蓝混匀,加入计数板中,用Count Star细胞计数仪计数,计算不同浓度下的细胞存活率。

1.5.2 CCK8法检测细胞增殖抑制率 将大肠癌细胞SW480按照 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板中,按“1.4.3”所述方法分组并干预24 h后,在每孔中加入10 μL CCK8溶液,置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育2 h。在450 nm吸光度下测定各组吸光度值,计算不同浓度下的大肠癌细胞SW480的增殖抑制率。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{加药组} - \text{空白组}}{\text{对照组} - \text{空白组}} \times 100\%$$

1.5.3 干细胞比例分析(侧群细胞分析) 将按“1.4.3”方法收集的细胞,用完全培养液重悬成 1.5×10^6 个/mL细胞悬液。每组均加入Hoechst 33342至终浓度5 μg/mL。另置与对照组完全相同的细胞悬液,加入维拉帕米至终浓度为50 μmol/L,作为阳性对照组。将以上各组细胞都置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育90 min,并每隔15 min震荡一次,期间保持避光。染色完毕后用预冷的PBS缓冲液洗涤细胞1次,最后PBS缓冲液重悬上机,上机检测前避光保存于冰上。采用MOFLO XDP分选型流式细胞仪进行分析,通过675 nm和450 nm通道的接收发射光滤片分别收集蓝光和红光的信号并以此为流式图中横、纵坐标,在流式细胞图中,以阳性对照组为参考,用门圈定出的左下角小细胞群是侧群细胞。以此部分细胞占总细胞数的百分比来表示大肠癌干细胞的比例。

1.5.4 细胞克隆球实验 细胞经不同浓度夏枯草药液干预24 h,消化离心收集细胞,并重新按1 000个/孔的密度分别接种于超低黏附6孔板中,用干细胞培养基孵育10 d。这期间,每隔3 d添加500 μ L干细胞培养基。在孵育完成后进行图片采集,并采用直接计数法进行计数。

1.5.5 Western blot 法检测 c-Myc、CD44、CD133、SOX2、Notch1、Hes1 蛋白相对表达量 用不同浓度夏枯草药液干预大肠癌细胞24 h后,弃上清,用常温的PBS清洗2次,加入细胞裂解液,在冰上裂解30 min以提取总蛋白,用BCA法测定总蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液(5 \times SDS-PAGE)使蛋白变性,然后进行SDS-PAGE电泳(90 V,20 min;120 V,40 min),接着用0.2 μ m PVDF膜进行转膜(110 V,150 min)。转膜结束加封闭液封闭2 h,按目的蛋白分子量大小裁膜,并加入对应的一抗c-Myc(1:1 000)、CD44(1:1 000)、CD133(1:1 000)、SOX2(1:1 000)、Notch1(1:1 000)、Hes1(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)、 β -actin(1:1 000),4 $^{\circ}$ C摇床孵育10~12 h。一抗孵育结束后用1 \times TBST清洗3次,每次10 min。再加入兔二抗或鼠二抗(1:10 000)常温孵育2 h,二抗孵育后用1 \times TBST清洗3次,每次10 min。用ECL化学发光法显影,在化学发光凝胶成像仪上检测目标蛋白表达情况。

1.6 统计学方法

采用SPSS 27.0统计软件处理数据。首先对数据采用Shapiro-Wilk检验的方法分析是否符合正态分布。若该数据符合正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析;两两比较则采用LSD-*t*检验的方式进行。对于非正态分布或方差不齐的数据,采用Kruskal-Wallis检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组生长情况比较

不同浓度的夏枯草药液处理大肠癌细胞后,显微镜下观察细胞的形态变化。对照组细胞形态饱满,生长分布密集;0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组中,细胞汇合度明显减少。见图1。用0.4%的台盼蓝对细胞进行计数,与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌细胞存活率分别为73.56%、68.06%、28.90%,细胞存活率随着药物浓度增加而明显下降($P < 0.05$)。见图2。

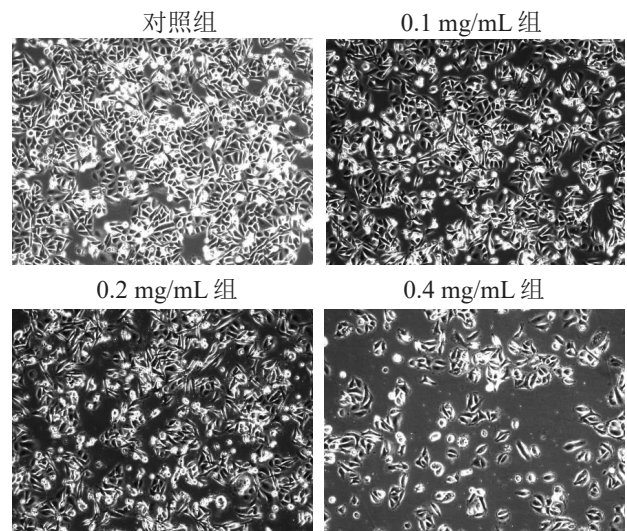
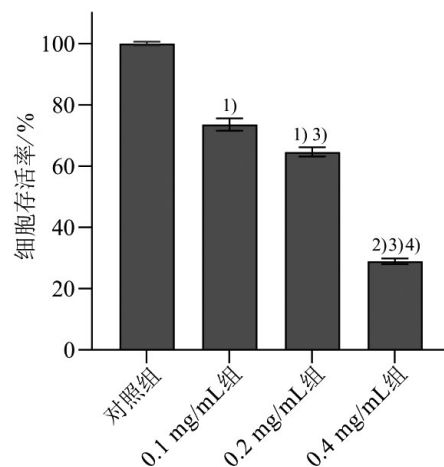


图1 4组生长情况比较($\times 10$)

Figure 1 Comparison of cell growth in four groups ($\times 10$)



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P < 0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P < 0.05$ 。

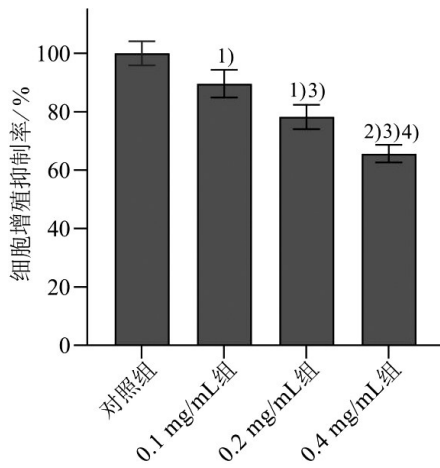
Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P < 0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P < 0.05$.

图2 4组细胞存活率比较

Figure 2 Comparison of cell survival rate in four groups

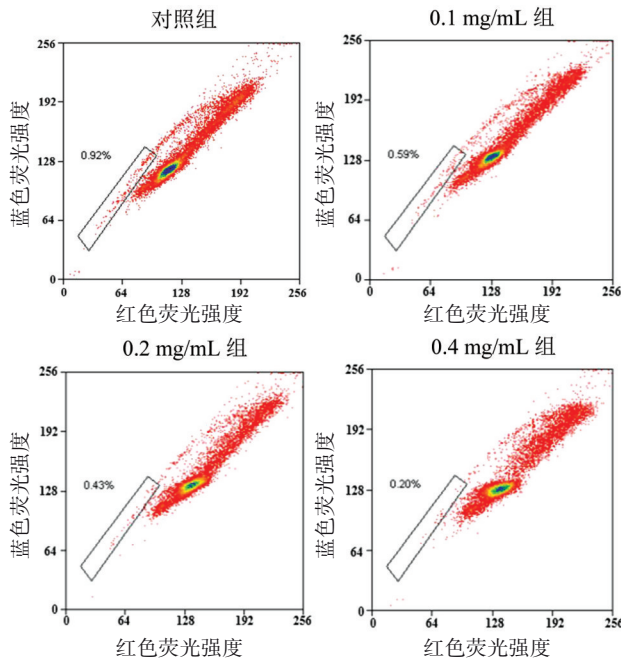
2.2 4组增殖情况比较

采用CCK8法检测不同浓度夏枯草对药液大肠癌细胞的增殖抑制率的影响。与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌细胞增殖抑制率分别为89.60%、78.21%、65.61%,细胞增殖抑制率随着药物浓度增加明显下降($P < 0.05$)。见图3。



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P < 0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P < 0.05$ 。
 Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P < 0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P < 0.05$ 。

图3 4组细胞增殖抑制率比较
 Figure 3 Comparison of cell proliferation inhibition rates in four groups



注:与对照组比较,1) $P < 0.01$;与0.1 mg/mL组比较,2) $P < 0.05$;与0.2 mg/mL组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 2) $P < 0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 3) $P < 0.05$ 。

图4 4组肿瘤干细胞比例比较

Figure 4 Comparison of proportion of colorectal cancer stem cells in four groups

2.3 4组肿瘤干细胞比例比较

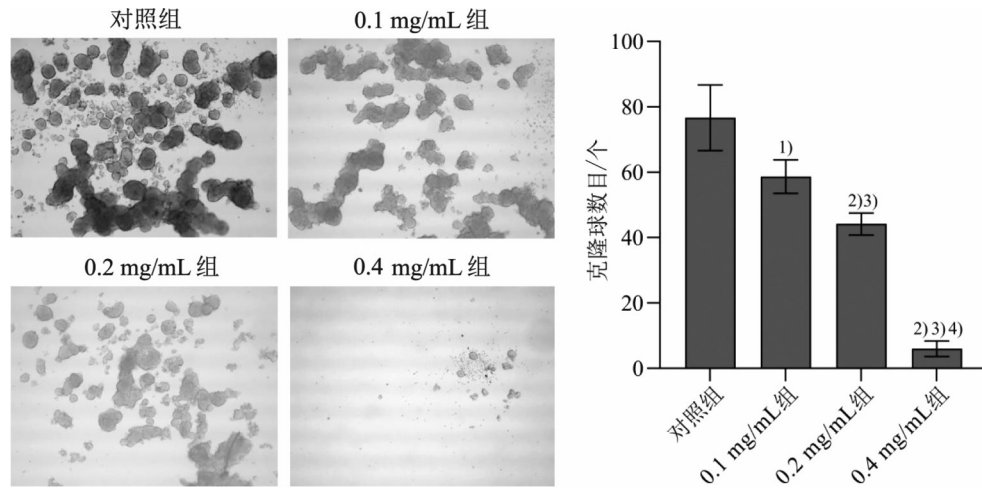
采用流式细胞仪分析不同浓度夏枯草药液对大肠癌干细胞比例的影响。对照组大肠癌干细胞比例为0.78%,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组干细胞比例分别为0.52%、0.41%、0.27%,干细胞比例随着药物浓度增加明显下降($P < 0.05$)。见图4。

2.4 4组自我更新能力比较

在显微镜下观察不同浓度的夏枯草药液干预对大肠癌细胞自我更新能力的影响。对照组克隆球形成细胞数量较多,与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组克隆球数量明显下降,且随着夏枯草药液浓度的增加而明显下降($P < 0.05$)。见图5。

2.5 4组c-Myc蛋白相对表达量比较

与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌细胞增殖调控蛋白c-Myc相对表达量明显减少,且随着夏枯草药液浓度的增加而明显减少($P < 0.05$)。见图6。

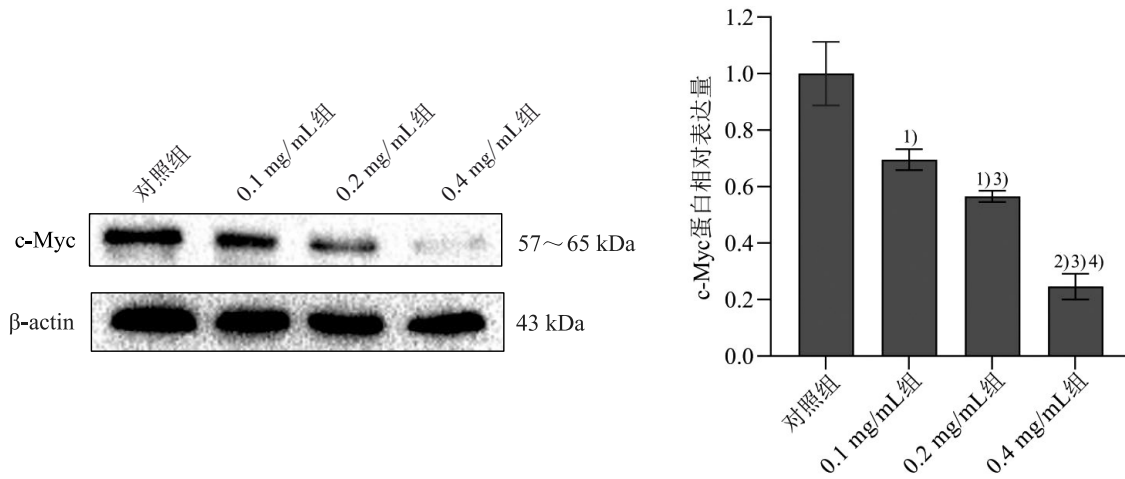


注:与对照组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P<0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P<0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P<0.05$.

图5 4组克隆球数目比较(×10)

Figure 5 Comparison of number of cell clonal spheres in four groups (×10)



注:与对照组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P<0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P<0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P<0.05$.

图6 4组c-Myc蛋白相对表达量比较

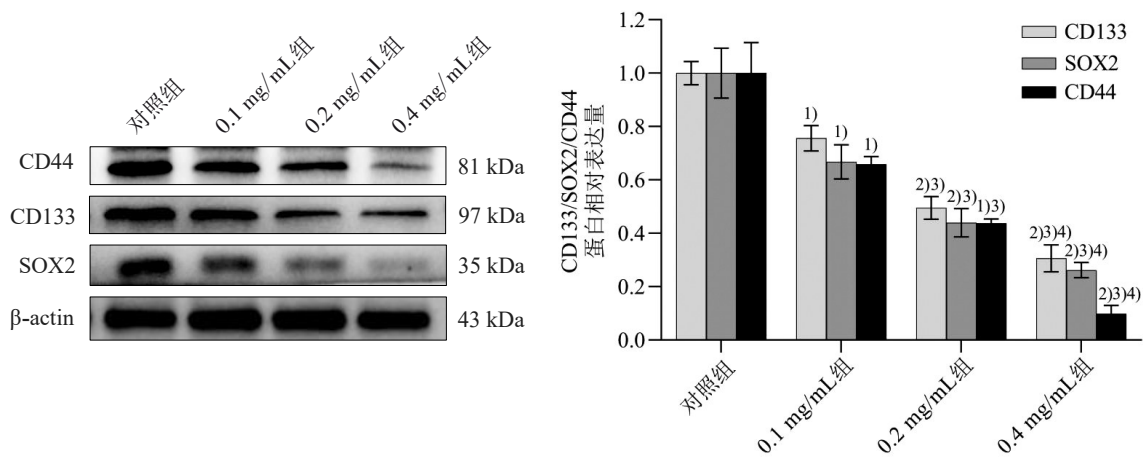
Figure 6 Comparison of relative protein expression of c-Myc in four groups

2.6 4组CD44、CD133、SOX2蛋白相对表达量比较

与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌干细胞标记物CD44、CD133、SOX2蛋白相对表达量明显下降,且这3个蛋白相对表达量随着夏枯草药液浓度的增加而明显下降($P<0.05$)。见图7。

2.7 4组Notch1/Hes1通路蛋白相对表达量比较

与对照组相比,0.1 mg/mL组、0.2 mg/mL组、0.4 mg/mL组大肠癌细胞Notch1(NICD)和Hes1的蛋白相对表达量明显下调,且这2个蛋白相对表达量随着夏枯草药液浓度的增加而明显下调($P<0.05$)。见图8。

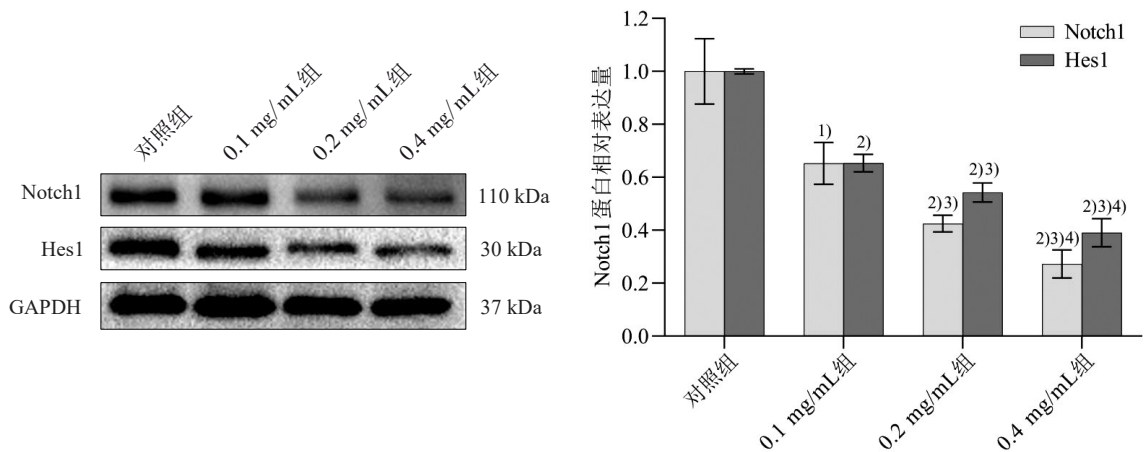


注:与对照组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P < 0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P < 0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P < 0.05$.

图7 4组SOX2、CD44、CD133蛋白相对表达量比较

Figure 7 Comparison of relative protein expression of SOX2, CD44 and CD133 in four groups



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与0.1 mg/mL组比较,3) $P < 0.05$;与0.2 mg/mL组比较,4) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; compared with the 0.1 mg/mL group, 3) $P < 0.05$; compared with the 0.2 mg/mL group, 4) $P < 0.05$.

图8 4组Notch1、Hes1蛋白相对表达量比较

Figure 8 Comparison of relative protein expression of Notch1 and Hes1 in four groups

3 讨论

大肠癌作为难治的恶性肿瘤,以手术结合化疗为主的治疗手段虽然疗效较为明显,但治疗后脏器转移的风险仍然广泛存在。近年来有大量研究表明,上皮来源肿瘤如大肠癌,其始动发生大多源自于肿瘤干细胞,这类细胞具有多向分化潜能明显和增殖能力极强的特点,是恶性肿瘤发生、发展的主要原因之一^[5]。此外,肿瘤干细胞对于放化疗手段的耐受性很强,患者在经过相关治疗后,虽然普通肿瘤细胞可以被杀死,但是肿瘤干细胞却可以长期

存在,一旦外界生存条件具备,肿瘤干细胞即可恢复生长,导致肿瘤复发、转移^[6]。因此,以肿瘤干细胞为对象的靶向治疗对防治大肠癌患者病灶复发、转移,延长大肠癌患者生存期而言具有重要意义。

现代研究发现,夏枯草具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[7]。陈蕾等^[8]研究发现夏枯草中含有的槲皮素有效成分,能诱导甲状腺癌细胞发生凋亡和G2/M周期阻滞;郑学芝等^[9]研究发现,夏枯草可抑制食管癌Eca-109细胞Survivin表达,促进Caspase-3表达,进而诱导细胞凋亡。课题组前期研究

发现,夏枯草干预后,能明显抑制结肠癌细胞的增殖、肿瘤血管新生,诱导结肠癌细胞凋亡^[10-11],并且可以抑制结肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/5-FU 和亲本 HCT-8 细胞的活力^[12],与 5-FU 联用时,还可以增强 HCT-8/5-FU 对 5-FU 的敏感性,逆转细胞株对 5-FU 的耐药性^[13]。但夏枯草是否具有调控大肠癌干细胞的作用尚未阐明。因此,本项目探讨夏枯草对大肠癌干细胞的作用,结果发现,夏枯草不仅具有抑制大肠癌细胞生长及增殖的作用,并且可以明显降低大肠癌干细胞比例,抑制大肠癌细胞自我更新能力。

Myc 基因家族是最早发现的核转录原癌基因家族之一,其中包括 c-Myc、n-Myc 等成员^[14]。Myc 家族产物具有刺激细胞生长、抑制细胞分化和延长细胞寿命的作用,其中 c-Myc 与肿瘤的发展和增殖有密切关系,是研究最广泛的原癌基因之一^[15]。c-Myc 的参与可以影响细胞的增殖,高水平的 c-Myc 表达则能够明显地刺激肝癌的生长,相反地,抑制 c-Myc 的表达则能够明显地抑制肝癌的生长能力^[15]。高杨^[16]发现 KRT18 可以增强 c-Myc 通路进而促进胰腺癌增殖、侵袭、转移。任玲^[17]发现,在结肠癌细胞中,RNF8 通过 K63 连接的多聚泛素化可以促进 β -catenin 从细胞质转移到细胞核,从而增加 c-Myc 基因的表达,进而促进结肠癌细胞的增殖。王锋^[18]发现通过降低 c-Myc 的表达,可以有效地抑制胃癌细胞的增殖和肿瘤的生长。本研究结果发现,通过夏枯草的干预,大肠癌细胞的增殖能力明显减弱,c-Myc 蛋白相对表达量也明显降低,这表明夏枯草可能对大肠癌细胞的增殖产生有效抑制作用。

干细胞作为独具特色的肿瘤细胞群之一,在通常情况下,可以通过识别其自身特异性标记物的表达情况来探究其干性,其中被广为关注的标记物有 CD133、CD44、SOX2 等。CD133 作为一种细胞表面跨膜糖蛋白,位于微突出处,其所在区域的主要功能是主导细胞分化,对维持细胞增殖能力具有重要作用^[19]。CD133 在大肠癌干细胞、肝癌干细胞和肺癌干细胞等多种实体肿瘤干细胞中均有表达,CD133 的高度表达可以加强肿瘤干细胞自我更新^[20]。在 CD133 阳性的肿瘤干细胞中,SOX2、OCT4 等干性标志物也呈现出高表达^[21]。现有病理研究表明,SOX2 在结肠癌组织中高表达,促进结直肠癌肿瘤干细胞的形成,并调控肿瘤组织发育和维持肿瘤干细胞的分化过程;在 SOX2 过表达情况下,肿瘤细胞增殖及迁移速度明显加快^[22]。CD44 作为一种细胞表面跨膜糖蛋白,能够与其他干性因子如 SOX2、OCT4 等相

互作用并增强干性因子的表达。研究显示 CD44 阳性细胞具有干细胞特性,拥有较强的分化潜能和成瘤能力^[23]。CD44 主要参与异质性黏附,该生理过程主要促进肿瘤细胞侵袭转移,增强克隆球形形成能力^[24]。因此,对 CD133、CD44 和 SOX2 进行调控并抑制其表达,可以抑制大肠癌干细胞自我更新及增殖。本研究还发现经夏枯草干预过的大肠癌细胞 CD133、CD44、SOX2 蛋白表达量明显减少,提示夏枯草可以对干细胞产生有效抑制作用。

Notch 通路在干细胞的维持中起着至关重要的作用^[25]。在通路相关配体与受体结合后,Notch 信号通路被正式激活。该过程中会被 γ -分泌酶复合物裂解成 NICD 形式的活性蛋白。NICD 蛋白进入细胞核并结合到转录抑制因子 CSL 上,形成一个名为 NICD/CSL 转录激活复合体,转录抑制作用被解除。该复合体会影响下游 Hes、Hey 和 Herp 等转录抑制因子家族的靶基因,从而调节细胞的增殖、分化和凋亡^[26]。在研究肿瘤干细胞增殖方面,黄鹏等^[27]探讨了 Notch 信号系统和 Panc-1 胰腺癌干细胞增殖与分化的关系,通过使用 Notch1 激活剂 rh NF- κ B 和抑制剂 MW167,对比 2 组细胞干性基因的表达及细胞周期的变化,证明当 Notch 信号转导通路活化时,胰腺癌干细胞选择增殖,当 Notch 信号系统被抑制,胰腺癌干细胞选择分化。张欣等^[28]发现 Notch 通路可以通过调控 PI3K/Akt 通路,维持胶质瘤干细胞自我更新能力。宁晓燕等^[29]发现体外培养的人胰腺癌细胞株 Panc1 肿瘤细胞球表面干性标志物 CD24、CD44、CD133 等高表达,能够外排荧光染料 Hoechst 33342,并且 Notch、Wnt/ β -catenin 等自我更新信号通路激活,具有肿瘤干细胞特性。因此,在 Notch 通路活化增强的情况下,肿瘤干细胞特异性、增殖能力和自我更新能力都将极大提高。本研究为此也探讨了夏枯草干预对 Notch 通路的影响。结果显示,夏枯草明显抑制通路中 Notch 活化形式 NICD 蛋白的表达及通路下游 Hes1 蛋白的表达。

综上所述,夏枯草具有抑制大肠癌细胞增殖、干性及下调 Notch 信号通路活化的作用。恶性肿瘤的易复发特性是其治疗的难点所在。具有“无限增殖、自我更新、对化疗耐受性强”特点的肿瘤干细胞是癌症治疗的重难点,也是导致化疗及术后复发的主要原因^[30]。因此,研究靶向肿瘤的干细胞治疗药物也与肿瘤康复治疗的重点相一致。现有证据表明,传统中医药可对肿瘤干细胞产生明显抑制作用。课题组前期也发现片仔癀通过调控 Wnt/ β -catenin、Hedgehog 信号通路抑制大肠癌干细胞自我

更新及致瘤能力^[6];半枝莲可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制大肠癌干细胞瘤体生长,并抑制大肠癌干细胞增殖、自我更新、致瘤性和迁移的作用^[31]。可见,夏枯草具有靶向肿瘤干细胞并抑制其干细胞特性的作用,对减少化疗及术后复发,促进肿瘤患者康复具有重要意义。

参考文献

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] ZHOU Y J, XIA L Z, WANG H R, et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(70): 33403-33415.
- [3] 向润清,张艳娇,黄宽,等.夏枯草提取物的药理作用和研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2020, 29(8): 37-42.
XIANG R Q, ZHANG Y J, HUANG K, et al. Pharmacological effects and research progress of *Prunella Vulgaris* extract [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharmacology*, 2020, 29(8): 37-42.
- [4] 方翌,张铃,蔡巧燕,等.夏枯草乙醇提取物抑制人结肠癌细胞 HCT-8 增殖及诱导细胞凋亡[J]. *福建中医药*, 2016, 47(5): 11-13.
FANG Y, ZHANG L, CAI Q Y, et al. Ethanol extract of *Prunella Vulgaris* inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cell HCT-8 [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2016, 47(5): 11-13.
- [5] YIN W, WANG J L, JIANG L L, et al. Cancer and stem cells [J]. *Exp Biol Med*, 2021, 246(16): 1791-1801.
- [6] 魏丽慧,方翌,沈阿灵,等.片仔癀对大肠癌干细胞自我更新及致瘤能力的抑制作用[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(1): 465-468.
WEI L H, FANG Y, SHEN A L, et al. Inhibition of Pien Tze Huang in self-renewal and carcinogenicity of colorectal cancer stem cells [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(1): 465-468.
- [7] 王巧琼,杨冬梅,陈临江,等.中药夏枯草化学成分及药理作用研究概述[J]. *广东化工*, 2021, 48(24): 6-7, 10.
WANG Q Q, YANG D M, CHEN L J, et al. Summary of the research on the chemical constituents and pharmacological actions of *Prunella Vulgaris* [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2021, 48(24): 6-7, 10.
- [8] 陈蕾,卢泽容,黄雨晴,等.夏枯草有效成分对儿童甲状腺癌的抑制作用研究[J]. *发育医学电子杂志*, 2022, 10(4): 241-249.
CHEN L, LU Z R, HUANG Y Q, et al. Study of the inhibitory effect of *Prunella Spica's* effective components on thyroid cancer in children [J]. *J Dev Med Electron Version*, 2022, 10(4): 241-249.
- [9] 郑学芝,郭冉,李佳,等.夏枯草对食管癌细胞 Survivin 和 Caspase-3 表达的影响及机制研究[J]. *中国食物与营养*, 2021, 27(8): 63-65.
ZHENG X Z, GUO R, LI J, et al. Effects and mechanism of *Prunella Vulgaris* on expressions of survivin and caspase-3 in esophageal cancer cells [J]. *Food Nutr China*, 2021, 27(8): 63-65.
- [10] PENG J, CHEN Y, LIN J, et al. *Patrinia scabiosaefolia* extract suppresses proliferation and promotes apoptosis by inhibiting the STAT3 pathway in human multiple myeloma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(2): 313-318.
- [11] FANG Y, ZHANG L, FENG J, et al. *Spica Prunellae* extract suppresses the growth of human colon carcinoma cells by targeting multiple oncogenes via activating miR-34a [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1895-1901.
- [12] LIN W, ZHENG L, ZHUANG Q, et al. *Spica Prunellae* promotes cancer cell apoptosis, inhibits cell proliferation and tumor angiogenesis in a mouse model of colorectal cancer via suppression of STAT3 pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 144.
- [13] FANG Y, YANG C, ZHANG L, et al. *Spica Prunella* extract enhances fluorouracil sensitivity of 5-fluorouracil-resistant human colon carcinoma HCT-8/5-FU cells via TOP2 α and miR-494 [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5953619.
- [14] ZHU P, LI Y, LI P, et al. c-Myc induced the regulation of long non-coding RNA RHPN1-AS1 on breast cancer cell proliferation via inhibiting P53 [J]. *Mol Genet Genomics*, 2019, 294(5): 1219-1229.
- [15] BORZI C, CALZOLARI L, FERRETTI A M, et al. c-Myc shuttled by tumour-derived extracellular vesicles promotes lung bronchial cell proliferation through miR-19b and miR-92a [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 759.
- [16] 高杨. KRT18 增强 c-Myc 通路促进胰腺癌增殖、侵袭、转移的分子机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2022: 58-62.
GAO Y. KRT18 enhances the c-Myc pathway to promote the proliferation, invasion and metastasis of pancreatic cancer [D]. Shenyang: China Medical University, 2022: 58-62.
- [17] 任玲. RNF8 通过 β -catenin 调控癌基因 c-Myc 表达并促进结肠癌增殖[D]. 沈阳:中国医科大学, 2020: 7-11.
REN L. RNF8 induces β -catenin-mediated c-myc expression and promotes colon cancer proliferation [D]. Shenyang: China Medical University, 2020: 7-11.
- [18] 王锋. 桑辛素通过下调 c-Myc 的表达来抑制胃癌细胞的增殖和肿瘤生长[D]. 重庆:西南大学, 2017: 7-11.
WANG F. Morusin inhibits cell proliferation and tumor growth by down-regulating c-Myc in human gastric cancer [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 7-11.
- [19] GROVER R, DRALL S, POONIA N, et al. CD44 and CD133 aptamer directed nanocarriers for cancer stem cells targeting [J]. *Eur Polym J*, 2023, 183: 111770.
- [20] BAI Y D, SHI M L, LI S Q, et al. The expression and function of PD-L1 in CD133+ human liver cancer stem-like cells [J]. *Chin J Oncol*, 2023, 45(2): 117-128.
- [21] 姚博文,李亚昭,廖子君,等.白花蛇舌草总黄酮对肝细胞癌干细胞增殖及凋亡的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2023, 44(3): 389-395.
YAO B W, LI Y Z, LIAO Z J, et al. Effects of total flavone of *Oldenlandia Diffusa* on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma stem cell [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*, 2023, 44(3): 389-395.
- [22] TAKEDA K, MIZUSHIMA T, YOKOYAMA Y, et al. Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17639.
- [23] SU Y J, LAI H M, CHANG Y W, et al. Direct reprogramming of

- stem cell properties in colon cancer cells by CD44 [J]. *EMBO J*, 2011, 30(15):3186-3199.
- [24] YAN X D, HAN D L, CHEN Z Q, et al. RUNX2 interacts with BRG1 to target CD44 for promoting invasion and migration of colorectal cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:505.
- [25] 齐飞. 基于Notch通路探讨片仔癀对大肠癌干细胞增殖、凋亡、分化的影响及作用机制[D]. 福州:福建中医药大学, 2016: 17-19.
- QI F. Pien Tze Huang inhibits proliferation, induces apoptosis and differentiation of colorectal cancer stem cells via suppressing Notch signaling pathway [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2016: 17-19.
- [26] SILVA V R, SANTOS L S, DIAS R B, et al. Emerging agents that target signaling pathways to eradicate colorectal cancer stem cells [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(12):1275-1313.
- [27] 黄鹏, 王春友, 吴河水, 等. Notch1信号系统对胰腺癌干细胞增殖与分化的调控[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2010, 16(5):359-362.
- HUANG P, WANG C Y, WU H S, et al. Regulating effect of Notch 1 signaling on differentiation and proliferation of stem cells of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Chin J Hepatobiliary Surg*, 2010, 16(5):359-362.
- [28] 张欣, 林雨, 海龙, 等. NOTCH通路依赖PI3K/AKT通路调控胶质瘤干细胞增殖和自我更新能力[J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(9):640-646.
- ZHANG X, LIN Y, HAI L, et al. NOTCH signaling pathway regulates glioma stem-like cell proliferation and selfrenewal abilities via PI3K/AKT activity [J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2018, 45(9): 640-646.
- [29] 宁晓燕, 陈晓武, 柳勤译, 等. 二甲双胍靶向Notch信号通路抑制胰腺癌干细胞自我更新[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2020, 29(2):204-207.
- NING X Y, CHEN X W, LIU Q Y, et al. Metformin inhibits the self-renewal of pancreatic cancer stem cells targeting Notch signaling pathway [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 29(2): 204-207.
- [30] NAJAFI M, MORTEZAEI K, MAJIDPOOR J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers [J]. *Life Sci*, 2019, 234:116781.
- [31] 张晶晶. 基于Wnt/ β -catenin信号通路研究半枝莲抑制大肠癌干细胞生物学功能的作用机制[D]. 福州:福建中医药大学, 2021:23-29.
- ZHANG J J, *SCUTELLARIA BARBATA* D. Don inhibits the biological functions of colorectal cancer stem cells based on Wnt/ β -catenin signaling pathway [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2021:23-29.

Mechanism of Spica Prunellae in Suppressing Proliferation and Stem Cell Properties of Colorectal Cancer Cells Based on Notch Signaling Pathway

TIAN Haoyuan^{1,2}, XIE Yi³, FANG Yi^{1,4}, CHENG Ying³, LIN Yan², SU Daifeng², WEI Lihui^{1,4*}

¹ Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

³ Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

⁴ Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: WEI Lihui, E-mail: 282117657@qq.com

ABSTRACT Objective From the perspective of colorectal cancer stem cells, the purpose of this study was to explore the effect and its mechanism of Spica Prunellae on the proliferation and stemness of colorectal cancer cells based on Notch signaling pathway. **Methods** Colorectal cancer SW480 cells were cultured *in vitro*. When the cells were in logarithmic growth phase, they were randomly divided into control group, 0.1 mg/mL group, 0.2 mg/mL group and 0.4 mg/mL group. The control group did not receive drug intervention; the other three groups were added with 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL Spica Prunellae solution, respectively. Meanwhile, DMSO in each group was supplemented to the same amount. After 24 hours of intervention, the subsequent experiments were performed. The cell growth morphology and density were observed by inverted microscope. The number of viable cells was detected by 0.4% Trypan blue staining and cell survival rate was calculated. The proliferation inhibition rate of colorectal cancer cells was detected using Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay. Flow cytometry was used to detect the proportion of stem cells in colorectal cancer cells. The self-renewal ability of colorectal cancer cells was detected by sphere formation assay. Western blot method was used to detect the relative expression of c-Myc, CD44, CD133, SOX2 and Notch pathway-related proteins Notch1 and Hes1 in colorectal cancer cells. **Results** Compared with the control group, the proliferation and viability of colorectal cancer SW480 cells in the 0.1, 0.2, and 0.4 mg/mL groups were significantly inhibited with the increase of Spica Prunellae concentration ($P < 0.05$). The proliferation ability of colorectal cancer SW480 cells significantly decreased with the increase of Spica Prunellae concentration ($P < 0.05$). The proportion of cancer stem cells in colorectal cancer SW480 cells significantly decreased with the increase of Spica Prunellae concentration ($P < 0.05$). The self-renewal ability of colorectal cancer SW480 cells was significantly inhibited with the increase of Spica Prunellae concentration ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative protein expression of c-Myc, CD44, CD133, SOX2, Notch1, and Hes1 in colorectal cancer SW480 cells was significantly down-regulated with the increase of Spica Prunellae concentration in the 0.1, 0.2, and 0.4 mg/mL groups. **Conclusion** Spica Prunellae can inhibit the proliferation and stem cell properties of colorectal cancer cells, and inhibition of the Notch pathway activation may be one of the important mechanisms.

KEY WORDS colorectal cancer; Spica Prunellae; proliferation; stemness; Notch signaling pathway

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.03006