

# 端锚聚合酶抑制剂 XAV939 抑制人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞增殖及作用机制研究<sup>Δ</sup>

董永红<sup>1\*</sup>, 彭雯<sup>2</sup>, 王耀华<sup>1#</sup>, 张丽艳<sup>3</sup> (1. 河北大学附属医院药剂科, 河北保定 071000; 2. 石家庄市第一医院药剂科, 石家庄 050011; 3. 辽宁中医药大学药学院, 沈阳 110032)

中图分类号 R966;R738 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1917-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.11

**摘要** 目的: 研究端锚聚合酶抑制剂 XAV939 对人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞增殖的抑制及其作用机制。方法: 以人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞为研究对象, 采用 CCK-8 法测定 0.5、1、5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 分别作用 24、48、72 h 后的细胞增殖情况, 并计算细胞抑制率; 采用流式细胞术检测 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后的细胞凋亡情况及周期分布; 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 采用蛋白质印迹法测定 0.5、1、5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后细胞中  $\beta$ -联蛋白( $\beta$ -catenin)、G<sub>1</sub>/S 期特异性周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 和基质金属蛋白酶 7 (MMP-7) 的相对表达量。结果: 1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 24、48、72 h 后, SOSP-9607 细胞的抑制率均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后, SOSP-9607 细胞的凋亡率从 3.71% 上升至 21.03% ( $P < 0.05$ ); G<sub>1</sub> 期细胞的比例由 45.5% 增至 54.8%, S 期细胞的比例由 27.4% 降至 24.0%, G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例由 22.2% 降至 16.2% ( $P < 0.05$ )。5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后, SOSP-9607 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 MMP-7 的相对表达量均显著下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论: 端锚聚合酶抑制剂 XAV939 能够抑制人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞的增殖, 其机制可能与其将细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期、阻断细胞外因子(Wnt)/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**关键词** 人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞; 端锚聚合酶抑制剂; XAV939; 细胞外因子/ $\beta$ -联蛋白信号通路; 增殖; 凋亡

## Study on Inhibitory Effect and Its Mechanism of Tankyrase Inhibitor XAV939 on the Generation of Human Osteosarcoma SOSP-9607 Cells

DONG Yonghong<sup>1</sup>, PENG Wen<sup>2</sup>, WANG Yaohua<sup>1</sup>, ZHANG Liyan<sup>3</sup> (1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Hebei University, Hebei Baoding 071000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Shijiazhuang Municipal First Hospital, Shijiazhuang 050011, China; 3. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of tankyrase inhibitor XAV939 on human osteosarcoma SOSP-9607 cells and its mechanism. METHODS: The human osteosarcoma SOSP-9607 cells were selected as research objects. The proliferation of osteosarcoma cells was determined by CCK-8 method after treated with 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 24, 48, 72 h, and the inhibitory rate was calculated. After treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 72 h, flow cytometry was applied to detect cell apoptosis and cell cycle distribution of osteosarcoma cells. Using glyceraldehyde-3-dehydrogenase (GAPDH) as internal reference, Western blot assay was used to detect the relative expression of  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 and MMP-7 in osteosarcoma cells after treated with 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 72 h. RESULTS: After treated with 1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 72 h, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 24, 48, 72 h, the inhibitory rates of SOSP-9607 cells were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 72 h, the apoptotic rate of SOSP-9607 cells was increased from 3.71% to 21.03% ( $P < 0.05$ ); the proportion of G<sub>1</sub>-phase cells increased from 45.5% to 54.8%, that of S-phase cells decreased from 27.4% to 24.0%, that of G<sub>2</sub>/M-phase cells decreased from 22.2% to 16.2% ( $P < 0.05$ ). After treated with 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 for 72 h, the relative expression of  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 and MMP-7 in SOSP-9607 cells decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Tankyrase inhibitor XAV939 can inhibit the proliferation of human osteosarcoma SOSP-9607 cells, the mechanism of which may be associated with arresting cells at G<sub>1</sub> phase and blocking signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin.

**KEYWORDS** Human osteosarcoma SOSP-9607 cells; Tankyrase inhibitor; XAV939; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; Proliferation; Apoptosis

骨肉瘤是起源于骨间叶细胞的原发性恶性骨肿瘤,

<sup>Δ</sup>基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(No.2016010505-301)

\* 主管药师。研究方向: 临床药理学。E-mail: 162101395@qq.com

# 通信作者: 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理学。电话:

0312-5981533。E-mail: lemonwangyaohua@163.com

好发于青少年, 且多发病于胫骨近端、股骨远端和长骨干骺端<sup>[1]</sup>。骨肉瘤的血行转移发生早且发生率很高, 患者病情进展迅速, 病死率较高<sup>[2]</sup>。虽然接受手术联合化疗的骨肉瘤患者 5 年生存率可达 50%~70%<sup>[3]</sup>, 但近 30 年来, 由于患者对传统铂类化疗药物的耐受, 其 5 年生存

率并无明显提升,且发生转移的患者5年生存率仅为20%~30%<sup>[4]</sup>。因此,寻找具有新靶点的骨肉瘤靶向治疗药物是目前国内外研究的主要方向和热点。

端锚聚合酶是一种多功能蛋白质翻译修饰酶,是多腺苷二磷酸核糖聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]家族的一员,其主要结构域为锚蛋白重复序列。该酶不仅可与端粒重复序列因子结合,还能与轴抑制蛋白羧基端的高度保守结构域结合,实现了对端粒酶的抑制作用,以进一步调节细胞外因子(Wnt)/ $\beta$ -联蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路<sup>[5]</sup>。XAV939是2009年《自然》(Nature)杂志报道的一种端锚聚合酶抑制剂,其分子式为C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,分子量为312.31,是基于端锚聚合酶1/2的晶体结构直接合成的,其可通过稳定轴抑制蛋白的表达选择性阻滞Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活化,从而限制肿瘤细胞的增殖与生长<sup>[6]</sup>。有研究者证实,XAV939能够抑制Hela、MCF-7等乳腺癌细胞系的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,显著抑制其增殖<sup>[7]</sup>;此外,XAV939对结直肠癌<sup>[8]</sup>、肝癌<sup>[9]</sup>的抑制作用已经相关临床前研究证实。但其对骨肉瘤的治疗作用尚鲜见相关文献报道。为此,本研究拟探究XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞增殖的抑制作用,并初步探讨其分子机制,以期为骨肉瘤的靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

371型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Electron公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司);Model 680型酶标仪、Gel Doc EZ型全自动凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);DFC-259型倒置显微镜(德国Leica公司);FA2004A型电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司);SK-30型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);KH-300GDV型超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

端锚聚合酶抑制剂XAV939(批号:044M4713V,纯度:>99%)、十二烷基磺酸钠(批号:09/2016)、考马斯亮蓝G-250(批号:07/2016)、蛋白裂解液(批号:01/2017)、硝酸纤维素膜(批号:11/2016)均购自美国Sigma公司;RPMI-1640培养基(批号:20160924)、胎牛血清(批号:201702124)、L-谷氨酰胺(批号:20161109)、青霉素及链霉素(批号:20170117)、磷酸盐缓冲液[PBS,pH=7.4(下同),批号:20170105]、胰蛋白酶(批号:20170209)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;CCK-8检测试剂盒(上海碧云天生物研究所,批号:P0018);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(含Annexin V-FITC染料、PI染料、PBS,北京雷根生物技术有限公司,批号:DG0043);Hoechst 33342/PI细胞凋亡检测试剂盒(含Hoechst

33342染料、PI染料、PBS,北京旷博生物技术有限公司,批号:RR013A);蛋白质印迹法(Western blot)封闭缓冲液(pH=7.4,批号:HE209354)、羊抗兔二抗(批号:QE218426)均购自美国Thermo公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号:SC-5364)、G<sub>1</sub>/S期特异性周期蛋白D1(Cyclin D1,批号:SC-5289)一抗、基质金属蛋白酶-7(MMP-7,批号:SC-785)一抗及 $\beta$ -catenin(批号:SC-6586)一抗均购自美国Santa Cruz公司;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 细胞

人骨肉瘤SOSP-9607细胞由中国科学院上海细胞生物研究所提供。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

用二甲亚砜(DMSO)溶解XAV939,制成XAV939浓度为10 mmol/L的贮备液,超声(功率:200 W,频率:25 kHz)10 min后,经0.22  $\mu$ m微孔滤膜滤过,滤液于4  $^{\circ}$ C避光保存,备用。临用前用培养基稀释至相应浓度。

### 2.2 细胞培养

将人骨肉瘤SOSP-9607细胞株置于含10%热灭活胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、25  $\mu$ g/mL链霉素和50 U/mL青霉素的RPMI-1640培养基中,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、100%饱和湿度的细胞培养箱中进行培养。待细胞生长至培养容器底面积的70%以上时,用PBS清洗,以胰蛋白酶消化传代,每隔2~3 d换液1次。每天均使用倒置显微镜观察,记录细胞数量和状态等指标。

### 2.3 细胞增殖检测

取对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度,按每孔 $5.0 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔板中,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育24 h。分别设立空白对照组和给药组,空白对照组加入等体积的培养基,给药组分别加入不同浓度(0.5、1、5、10  $\mu$ mol/L)的XAV939(浓度选择参考文献[7-8]),每组设置3个复孔(下同)。更换培养基后,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下再分别培养24、48、72 h。终止培养后,每孔加入CCK-8试剂20  $\mu$ L,于37  $^{\circ}$ C条件下避光反应4 h。使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度(OD)值,计算细胞抑制率[细胞抑制率(%)=(1-给药组平均OD值)/空白对照组平均OD值 $\times$ 100%],空白对照组的细胞抑制率为0<sup>[10]</sup>。

### 2.4 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞,按每孔 $5.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔板中,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育24 h。分别设立空白对照组和给药组,空白对照组加入等体积的培养基,给药组加入5  $\mu$ mol/L的XAV939(综合考虑试验成本及前期毒性试验结果),更换培养基后,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下再培养72 h。使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况:收集并调整细胞悬液至

约 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,以转速800 r/min离心3 min,沉淀用PBS清洗2次后,重悬于PBS 200  $\mu\text{L}$ 中;加入Annexin V-FITC染料10  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀,于室温下避光反应15 min,再加入PI染料10  $\mu\text{L}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应5 min。使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果采用Cell Quest 3.0软件分析。

### 2.5 细胞周期分析

取对数生长期细胞,按每孔 $5.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔板中,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下孵育24 h。分别设立空白对照组和给药组,空白对照组加入等体积的培养基,给药组加入5  $\mu\text{mol/L}$ 的XAV939(综合考虑试验成本及前期毒性试验结果),更换培养基后,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下再培养72 h。使用Hoechst 33342/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞周期;收集细胞并调整细胞悬液至约 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,以转速800 r/min离心3 min,沉淀用PBS清洗2次后,重悬于PBS 200  $\mu\text{L}$ 中;加入Hoechst 33342染料10  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀,于室温下避光反应15 min,再加入PI染料10  $\mu\text{L}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应5 min。使用流式细胞仪检测细胞周期,结果采用Cell Quest 3.0软件分析。

### 2.6 蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期细胞,按每孔 $5.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔板中,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下孵育24 h。分别设立空白对照组和给药组,空白对照组加入等体积的培养基,给药组分别加入不同浓度(0.5、1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )的XAV939,更换培养基后,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下再培养72 h。培养结束后收集细胞,加入预冷的蛋白裂解液100  $\mu\text{L}$ 重悬细胞,冰上孵育60 min,裂解细胞,裂解液以转速12 000 r/min离心10 min后,收集上清液。上清液于100  $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中静置5 min以变性蛋白。取蛋白20  $\mu\text{g}$ 进行10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳分离,并转移至硝酸纤维素膜上,于室温下在封闭缓冲液中孵育30 min,加入GAPDH一抗(1:500)、Cyclin D1一抗(1:300)、MMP-7一抗(1:500)、 $\beta$ -catenin一抗(1:300),室温下孵育60 min。洗膜后,加入羊抗兔二抗(1:300),室温下孵育60 min,采用化学发光法以考马斯亮蓝G-250标记,于凝胶成像系统上分析。以GAPDH为内参,用目标蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值来表示目标蛋白的相对表达量,空白对照组各蛋白的相对表达量均为1<sup>[11]</sup>。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 15.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验;计数资料以率表示,采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞增殖的影响

与空白对照组比较,1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939作用72 h后,5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939作用24、48、72 h后,SOSP-9607细

胞的抑制率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见表1。

表1 不同浓度XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Effects of difference concentration of XAV939 on the proliferation of human osteosarcoma SOSP-9607 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	细胞抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
0.5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939组	5.36 $\pm$ 2.41	7.95 $\pm$ 2.73	10.35 $\pm$ 3.35
1 $\mu\text{mol/L}$ XAV939组	7.88 $\pm$ 1.33	13.31 $\pm$ 4.19	18.52 $\pm$ 3.07*
5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939组	17.25 $\pm$ 1.89*	36.25 $\pm$ 1.73**	45.23 $\pm$ 2.73**
10 $\mu\text{mol/L}$ XAV939组	37.56 $\pm$ 2.22**	53.79 $\pm$ 2.64**	66.24 $\pm$ 2.45**

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

### 3.2 XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞凋亡的影响

经5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939作用72 h后,SOSP-9607细胞的凋亡率从3.71%上升至21.03%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图1。

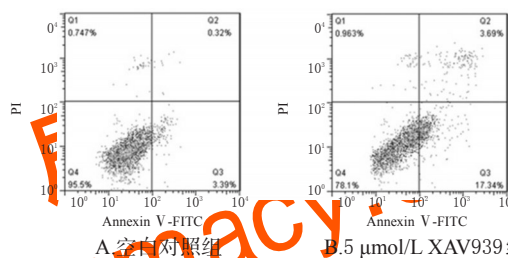


图1 XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞凋亡影响的流式细胞图

Fig 1 Flow cytometry diagrams of the effects of XAV939 on the cell apoptosis of human osteosarcoma SOSP-9607 cells

### 3.3 XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞周期分布的影响

经5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939作用72 h后, $G_1$ 期细胞的比例由45.5%增至54.8%,S期细胞的比例由27.4%降至24.0%, $G_2/M$ 期细胞的比例由22.2%降至16.2%,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图2。

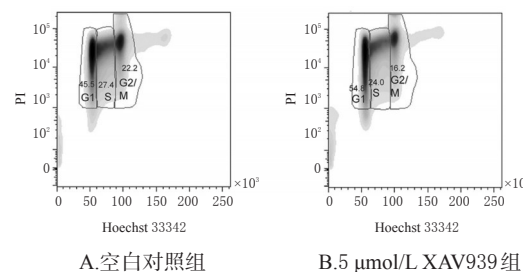
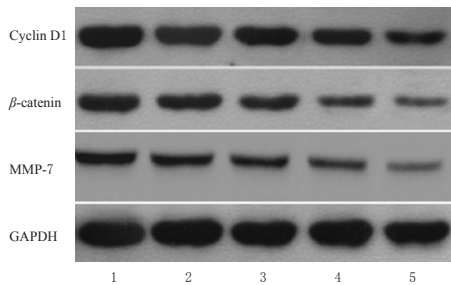


图2 XAV939对人骨肉瘤SOSP-9607细胞周期影响的流式细胞图

Fig 2 Flow cytometry diagrams of the effects of XAV939 on the cell cycle of human osteosarcoma SOSP-9607 cells

### 3.4 XAV939 对人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞中 $\beta$ -catenin、Cyclin D1、MMP-7 表达的影响

与空白对照组比较, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后, SOSP-9607 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、MMP-7 的相对表达量均显著下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 详见图 3、表 2。



注: 1. 空白对照组; 2. 0.5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 组; 3. 1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 组; 4. 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 组; 5. 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 组

Note: 1. blank control group; 2. 0.5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 group; 3. 1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 group; 4. 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 group; 5. 10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 group

图 3 不同浓度 XAV939 对人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、MMP-7 表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoretic diagrams of the effects of different concentration of XAV939 on the expression of  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 and MMP-7 in human osteosarcoma SOSP-9607 cells

表 2 不同浓度 XAV939 对人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、MMP-7 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 2 Effects of different concentration of XAV939 on the expression of  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 and MMP-7 in osteosarcoma SOSP-9607 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	相对表达量		
	$\beta$ -catenin	Cyclin D1	MMP-7
空白对照组	1	1	1
0.5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 组	0.97 $\pm$ 0.08	0.95 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.09
1 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 组	0.84 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.07
5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 组	0.52 $\pm$ 0.06*	0.73 $\pm$ 0.12*	0.47 $\pm$ 0.04*
10 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 组	0.27 $\pm$ 0.04**	0.43 $\pm$ 0.05**	0.31 $\pm$ 0.06**

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

## 4 讨论

骨肉瘤在骨肿瘤中的占比高达 20%, 是最常见的原发性恶性骨肿瘤<sup>[12]</sup>。临床上骨肉瘤绝大部分为高度恶性, 且常发生于青少年的长骨干骺端等部位, 且 90% 以上的骨肉瘤患者会发生肺部转移<sup>[13]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是一个多环节、多作用位点的生长发育调控信号通路, 在动物胚胎发育和肿瘤发生的过程中具有重要作用<sup>[14]</sup>。近来研究发现, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是激活骨肉瘤细胞发生转移的重要诱导因子, 在高转移性骨肉瘤细胞系中,  $\beta$ -catenin 蛋白的表达明显上调<sup>[14]</sup>。Wnt 与  $\beta$ -catenin 受体竞争性结合, 抑制细胞质中  $\beta$ -catenin 的降解, 导致

胞浆中高浓度的  $\beta$ -catenin 通过转转移至细胞核内, 调控相关靶基因表达和细胞周期分布, 从而发挥抗凋亡等一系列作用<sup>[15]</sup>。因此, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可能成为骨肉瘤治疗药物研发的重要靶点。

端锚聚合酶抑制剂 XAV939 是一个由生物遗传学方法合成的端锚聚合酶小分子抑制剂, 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的正向调控因子<sup>[16]</sup>。XAV939 可与端锚聚合酶的 PARP 结构域结合, 稳定  $\beta$ -catenin 降解复合物中的轴抑制蛋白, 选择性抑制  $\beta$ -catenin 介导的转录作用, 从而减少下游靶基因的激活; 另一方面, XAV939 还可直接抑制端粒酶活性, 限制染色体末端的延伸, 从而起到阻止细胞增殖的作用<sup>[17]</sup>。现有文献已报道了 XAV939 通过阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 DLD-1<sup>[18]</sup>、SKOV3<sup>[18]</sup>、MCF-7<sup>[19]</sup> 等多种肿瘤细胞系的增殖, 但鲜见 XAV939 对骨肉瘤细胞系抑制作用的相关报道。为此, 本研究将 XAV939 作用于人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞, 通过 CCK-8 法测定不同浓度 XAV939 分别作用 24、48、72 h 后的细胞增殖情况, 结果发现 1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 24、48、72 h 后均可不同程度地抑制 SOSP-9607 细胞增殖, 且较高浓度的 XAV939 具有更显著的增殖抑制作用。凋亡抵抗是保证肿瘤细胞存活的关键分子机制。Shin JH 等<sup>[20]</sup>研究发现, XAV939 能够使细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 阻滞细胞进入 S 期。本研究通过流式细胞术检测 5  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 作用 72 h 后的细胞凋亡情况和周期分布, 发现 XAV939 显著提高了 SOSP-9607 细胞的凋亡率, 并将细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 导致 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例下降。这提示 XAV939 能够诱导骨肉瘤细胞凋亡, 并可干扰细胞的周期分布。

Wisman GB 等<sup>[21]</sup>研究发现, 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路后, 骨肉瘤细胞核中的  $\beta$ -catenin 水平下调, 进而抑制 MMP-7、Cyclin D1 等下游靶基因的表达, 其一方面下调了 *c-myc* 和 *Survivin* 等基因的表达以及 Cyclin D1 蛋白的水平, 并通过调节细胞周期来抑制细胞增殖、促进细胞凋亡或坏死; 另一方面通过下调 MMP-7 蛋白的表达, 抑制了细胞外基质的降解, 从而抑制骨肉瘤细胞的转移。动物实验研究也证实, 在骨肉瘤小鼠模型中, 通过注射 Wnt 拮抗药抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 可明显抑制小鼠体内骨肉瘤移植瘤细胞的生长和转移<sup>[22]</sup>。本研究采用 Western blot 法检测不同浓度 XAV939 对人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响, 结果发现 5、10  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 能显著抑制 SOSP-9607 细胞  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、MMP-7 蛋白的表达。这提示 XAV939 可能通过阻滞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来抑制 SOSP-9607 细胞的增殖, 并促进其凋亡, 与文献报道的 XAV939 对结直肠癌细胞<sup>[8]</sup>和肝癌细胞<sup>[9]</sup>的抑制作用及其机制基本相同。

综上所述, XAV939 能够抑制人骨肉瘤 SOSP-9607 细胞的增殖, 并促进细胞凋亡, 其机制可能与其将细胞

周期阻滞于G<sub>1</sub>期、阻断Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路有关。尽管XAV939在体外显示出对骨肉瘤细胞较强的抑制作用,但其具体机制及在人体内的作用仍有待后续研究深入探讨。

### 参考文献

- [1] LUETKE A, MEYERS PA, LEWIS I, et al. Osteosarcoma treatment-where do we stand: a state of the art review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4): 523-532.
- [2] GLOVER J, MAN TK, BARKAUSKAS DA, et al. Osteosarcoma enters a post genomic era with in silico opportunities: generation of the high dimensional database for facilitating sarcoma biology research; a report from the Children's Oncology Group and the QuadW Foundation [J]. *PLoS One*, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181204.
- [3] ISAKOFF MS, BIELACK SS, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-3035.
- [4] 沈志华, 郭菁菁. 黄芩苷对人骨肉瘤MG63细胞凋亡及MMPs表达的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(4): 488-490.
- [5] AFIFI MM, AUSTIN LA, MACKEY MA, et al. XAV939: from a small inhibitor to a potent drug bioconjugate when delivered by gold nanoparticles[J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(2): 207-215.
- [6] HUANG SM, MISHINA YM, LIU S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling[J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 614-620.
- [7] BAO R, CHRISTOVA T, SONG S, et al. Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signaling in breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0048670.
- [8] WU X, LUO F, LI J, et al. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(4): 1333-1340.
- [9] STEWART DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014. DOI: 10.1093/jnci/djt356.
- [10] SUN Q, JIA N, WANG W, et al. Activation of SIRT1 by curcumin blocks the neurotoxicity of amyloid- $\beta$  25-35 in rat cortical neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(1): 89-94.
- [11] COMINCINI S, ALLAVENA G, PALUMBO S, et al. MicroRNA-17 regulates the expression of ATG7 and modulates the autophagy process, improving the sensitivity to temozolomide and low-dose ionizing radiation treatments in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(7): 574-586.
- [12] 康晓征, 黄真, 石安辉, 等. 骨肉瘤肺转移存在诊断治疗不足: 中国骨肉瘤肺转移多学科诊疗现状调查[J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(3): 153-160.
- [13] MARTINS-NEVES SR, PAIVA-OLIVEIRA DI, WIJERS-KOSTER PM, et al. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(2): 286-295.
- [14] ZHANG R, OYAJOBIBO, HARRIS SE, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 145-156.
- [15] NAGARAJ AB, JOSEPH P, KOVALENKO O, et al. Critical role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23720-23734.
- [16] SPROWL-TANIO S, HABOWSKI AN, PATE KT, et al. Lactate/pyruvate transporter MCT-1 is a direct Wnt target that confers sensitivity to 3-bromopyruvate in colon cancer [J]. *Cancer Metab*, 2016. DOI: 10.1186/s40170-016-0159-3.
- [17] TIAN XH, HOU WJ, FANG Y, et al. XAV939: a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013. DOI: 10.1186/1756-9966-32-100.
- [18] HUANG L, JIN Y, FENG S, et al. Role of Wnt/ $\beta$  catenin, Wnt/c-Jun N terminal kinase and Wnt/ $Ca^{2+}$  pathways in cisplatin induced chemoresistance in ovarian cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3851-3858.
- [19] ZHAO Y, GE CC, WANG J, et al. MEK inhibitor, PD98059, promotes breast cancer cell migration by inducing  $\beta$ -catenin nuclear accumulation[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 3055-3063.
- [20] SHIN JH, KIM H, RHYU IJ, et al. Axin is expressed in mitochondria and suppresses mitochondrial ATP synthesis in HeLa cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 340(1): 12-21.
- [21] WISMAN GB, NIJHUIS ER, HOQUE MO, et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(8): 1908-1914.
- [22] ROY NK, DEKA A, BORDOLOI D, et al. The potential role of boswellic acids in cancer prevention and treatment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(1): 74-86.

(收稿日期:2018-01-04 修回日期:2018-05-09)

(编辑:张元媛)