

毛萼乙素通过 Wnt/ β -catenin 通路抑制结肠癌细胞上皮间质转化^Δ

匡微^{1*}, 郑银彬², 李雨奇¹, 田平平³, 苏强^{4#}, 向小聪¹(1. 川北医学院附属南充市中心医院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属南充市中心医院心胸外科, 四川南充 637000; 3. 安徽医学高等专科学校医学技术学院, 合肥 230601; 4. 川北医学院附属南充市中心医院药学部, 四川南充 637000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2326-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.05



摘要 **目的** 研究毛萼乙素对结肠癌细胞上皮间质转化(EMT)的影响及机制。**方法** 以结肠癌细胞HT29、HCT116为研究对象。采用划痕愈合实验和Transwell实验检测毛萼乙素对2种细胞迁移和侵袭能力的影响;采用Western blot法检测毛萼乙素(1.0 $\mu\text{mol/L}$)、毛萼乙素+Wnt/ β -联蛋白(β -catenin)信号通路激动剂LiCl(1.0 $\mu\text{mol/L}$ 毛萼乙素+10 mmol/L LiCl)或毛萼乙素+Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂XAV939(1.0 $\mu\text{mol/L}$ 毛萼乙素+10 $\mu\text{mol/L}$ XAV939)对2种细胞的EMT相关蛋白[E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、锌指转录抑制因子Snail]和Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白[β -catenin、原癌基因蛋白c-myc、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、T细胞因子4(TCF4)]表达的影响。**结果** 毛萼乙素可显著抑制2种细胞的侵袭和迁移($P < 0.01$),并显著降低2种细胞中N-cadherin、Snail、 β -catenin、c-myc、cyclin D1、TCF4表达水平,显著升高E-cadherin表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。毛萼乙素与LiCl联用后,2种细胞中 β -catenin、c-myc、cyclin D1、TCF4及N-cadherin表达水平被逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与XAV939联用后,2种细胞中 β -catenin、N-cadherin的表达进一步下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),E-cadherin的表达进一步上调($P < 0.01$),且细胞迁移率也显著降低($P < 0.01$)。**结论** 毛萼乙素可通过抑制Wnt/ β -catenin通路激活抑制结肠癌细胞上皮间质转化。

关键词 毛萼乙素;结肠癌;Wnt/ β -catenin通路;上皮间质转化

Inhibitory effects of eriocalyxin B on epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells through the Wnt/ β -catenin pathway

KUANG Wei¹, ZHENG Yinbin², LI Yuqi¹, TIAN Pingping³, SU Qiang⁴, XIANG Xiacong¹(1. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Central Hospital Affiliated to North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2. Dept. of Cardio-Thoracic Surgery, Nanchong Central Hospital Affiliated to North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 3. School of Medical Technology, Anhui Medical College, Hefei 230601, China; 4. Dept. of Pharmacy, Nanchong Central Hospital Affiliated to North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects and mechanism of eriocalyxin B (EriB) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer cells. **METHODS** The colon cancer cells HT29 and HCT116 as research objects. Scratch-healing assay and Transwell assay were used to detect the effects of EriB on migration and invasion of two kinds of cells. Western blot method was used to detect the effects of EriB (1.0 $\mu\text{mol/L}$), EriB+Wnt/ β -catenin signaling pathway agonist LiCl (1.0 $\mu\text{mol/L}$ EriB+10 mmol/L LiCl) or EriB+Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor XAV939 (1.0 $\mu\text{mol/L}$ EriB+10 $\mu\text{mol/L}$ XAV939) on the expressions of EMT related proteins [E-cadherin, N-cadherin, Snail] and Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins [β -catenin, c-myc, cyclin D1, TCF4]. **RESULTS** EriB can significantly inhibit the invasion and migration of two kinds of cells ($P < 0.01$). EriB significantly reduced the protein expressions of N-cadherin, Snail, β -catenin, c-myc, cyclin D1 and TCF4 while increases the protein expression of E-cadherin ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After EriB combined with LiCl, the protein expressions of β -catenin, c-myc, cyclin D1 and TCF4 in the two kinds of cells were reversed ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After combined with XAV939, the protein expressions of β -catenin and N-cadherin were further down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the protein expression of E-cadherin was further up-regulated ($P < 0.01$), while migration rate was decreased significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS** EriB can inhibit the epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells by inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

Δ 基金项目 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No. 81903026);四川省科技计划项目(No.20YYJC2624);安徽高校自然科学基金研究项目(No.KJ2019A1110);南充市校科技战略合作专项(No. 19SXHZ0351)

* 第一作者 主管药师,硕士。研究方向:结肠癌治疗药物。E-mail:997547741@qq.com

通信作者 主任药师,硕士生导师。研究方向:结肠癌的发生发展机制及药物治疗。E-mail:187169442@qq.com

E-cadherin was further up-regulated ($P < 0.01$), while migration rate was decreased significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS** EriB can inhibit the epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells by inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

KEYWORDS eriocalyxin B; colon cancer; Wnt/ β -catenin pathway; epithelial-mesenchymal transition

结肠癌是一种高异质性疾病,尽管其早期患者可以通过手术和辅助方案治疗,但治疗后仍有部分患者容易复发^[1-2],且大多数患者在诊断时已经处于中晚期阶段,常规疗法已经很难有效^[3-4],亟需寻找新的有效治疗方案。目前,结肠癌细胞的高转移特性是导致结肠癌预后不良的主要原因,其中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤转移的重要因素。因此,开发可有效抑制结肠癌细胞EMT的药物尤为重要。

毛萼乙素是从疏花毛萼香茶菜中提取的一种具抗癌活性的二萜类化合物,已有报道显示,其在急性髓系白血病^[5]、乳腺癌^[6]、胰腺癌^[7]等恶性肿瘤中发挥了较好的治疗作用,但其是否可用于治疗结肠癌尚不明确。目前已有研究发现,异常的Wnt/ β -联蛋白(β -catenin)激活可直接驱动结肠癌的进展和转移^[8-10],但毛萼乙素是否可通过该信号通路治疗结肠癌尚不明确。基于此,笔者以结肠癌细胞HT29、HCT116为研究对象,探讨毛萼乙素对上述2种细胞侵袭、迁移的影响,并基于Wnt/ β -catenin信号通路初探毛萼乙素对结肠癌细胞EMT的作用,以期毛萼乙素治疗结肠癌提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有TS100F型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司)、DMi8型倒置显微镜(德国Leica公司)、810FUGE型低温高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、TD-5Z型台式低速多管架离心机(四川蜀科仪器有限公司)、DYY-6D型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、Gel Doc XR⁺全自动凝胶成像系统(上海艾研生物科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

毛萼乙素(货号84745-95-9)购自云南西力生物技术股份有限公司;LiCl(Wnt/ β -catenin信号通路激活剂)购自北京伊诺凯科技有限公司(货号A53473);XAV939(Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂)购自美国MCE公司(货号284028-89-3);兔源原癌基因蛋白质c-myc、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 β -catenin、T细胞因子4(TCF4)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、锌指转录抑制因子Snail、 β -肌动蛋白(β -actin)均购自山东华安生物科技有限公司(货号分别为HA721182、ET107-37、ET1607-15、ET1601-5、R1401-11、ER0722、EM1706-65、ET1701-80);羊抗免疫球蛋白G二抗购自美国Sigma公司(货号A6154);ECL化学发光试剂购自上海雅酶生物科技有限公司(货号SQ201);McCoy's 5A培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司(货号分别为16600108、10100147)。

1.3 细胞

结肠癌细胞HT29、HCT116购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

将HT29细胞或HCT116细胞培养于含10%胎牛血清的McCoy's 5A完全培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2.2 毛萼乙素对结肠癌细胞迁移能力的影响

将6孔板背面用记号笔画3条横穿过孔的直线,然后将HT29或HCT116细胞以 1.5×10^5 个/孔接种于6孔板中,待细胞完全贴壁后,使用枪头在细胞生长面垂直于背后直线划痕,并用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗掉落的细胞。将上述2种细胞分为对照组和毛萼乙素不同浓度组(1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$,浓度参考文献[5]设置),每组设3个复孔。培养0、24、48 h后,采用倒置显微镜观察划痕的愈合情况,并拍照。采用Image J v1.8.0软件测量划痕的距离,计算细胞迁移率[细胞迁移率=(0 h划痕宽度-不同时间点划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%]。

2.3 毛萼乙素对结肠癌细胞侵袭、迁移的影响

2.3.1 Transwell 侵袭实验 取对数生长期的HT29、HCT116细胞,制成细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的无血清细胞悬液,分别给予0(对照组)、1.0 $\mu\text{mol/L}$ (浓度根据“2.2”项下实验结果设置,下同)的毛萼乙素刺激,每组设置3个复孔。取上述细胞悬液200 μL 加到Transwell小室上层,下层中加入含20%胎牛血清的McCoy's 5A培养基600 μL 。将细胞侵袭小室置于培养箱中培养24 h,然后以4%多聚甲醛固定30 min,再用1%结晶紫染色30 min后,于倒置显微镜下观察穿过基底膜的侵袭细胞数。每个样本观察5个视野,取平均值作为检测结果。实验重复3次,然后计算细胞侵袭率[细胞侵袭率=(对照组侵袭数-实验组侵袭数)/对照组侵袭数 \times 100%]。

2.3.2 Transwell 迁移实验 实验前,在Transwell小室内膜上均匀铺入稀释后的Matrigel 50 μL ,待其凝结后,取对数生长期的HT29、HCT116细胞,制成细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的无血清细胞悬液,分别给予0(对照组)、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的毛萼乙素刺激,每组设置3个复孔。其余操作同“2.3.1”项,然后计算细胞迁移率[细胞迁移率=(对照组迁移数-实验组迁移数)/对照组迁移数 \times 100%]。

2.4 毛萼乙素对结肠癌细胞中EMT相关蛋白表达的影响

采用Western blot法进行实验。取HT29细胞或HCT116细胞按 2×10^5 个/孔接种于6孔板后分为对照组和毛萼乙素0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组。培养24 h后,收集细胞,加入RIPA裂解液裂解20 min,离心,取上清液,经BCA法检测蛋白浓度后,进行变性、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜;以5%脱脂奶粉溶液封闭1 h, PBST缓冲液清洗5 min \times 3次后,加入E-cadherin、N-cadherin、Snail、 β -actin一抗(稀释度均为1:500)孵育过夜;以PBST缓冲液清洗5 min \times 3次,加入二抗(稀释度

为1:5 000)孵育1 h;加入ECL化学发光试剂显色,以全自动凝胶成像系统成像,采用Image J v1.8.0软件进行分析,以目的蛋白与内参(β -actin)的灰度值比值表示其表达水平。

2.5 毛萆乙素联合Wnt/ β -catenin信号通路激动剂对该信号通路相关蛋白及N-cadherin蛋白表达的影响

采用Western blot法进行实验。取HT29细胞或HCT116细胞按 2×10^5 个/孔接种于6孔板后,分为对照组、毛萆乙素组($1.0 \mu\text{mol/L}$)、Licl^[11]组(10 mmol/L)、毛萆乙素+Licl组($1.0 \mu\text{mol/L}$ 毛萆乙素+ 10 mmol/L Licl)。培养24 h后,收集细胞,按“2.4”项下方法处理细胞并进行电泳,然后加入 β -catenin、c-myc、cyclin D1、TCF4、N-cadherin、 β -actin一抗(稀释度均为1:500)孵育过夜;以PBST缓冲液清洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次,加入二抗(稀释度为1:5 000)孵育1 h,按“2.4”项下方法进行显色及灰度值分析。

2.6 毛萆乙素联合Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂对结肠癌细胞迁移率及 β -catenin、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达的影响

将6孔板背面用记号笔画3条横穿过孔的直线,然后将HT29细胞或HCT116细胞按 1.5×10^5 个/孔接种于6孔板中,待细胞完全贴壁后,分别给予0(对照组)、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的毛萆乙素以及 $10 \mu\text{mol/L}$ XAV939^[12]和 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 毛萆乙素+ $10 \mu\text{mol/L}$ XAV939刺激,每组设置3个复孔,同“2.2”项下方法进行划痕愈合实验,并检测培养24、48 h后的细胞迁移率。取HT29细胞或HCT116细胞按 2×10^5 个/孔接种于6孔板后分为对照组、毛萆乙素组($1.0 \mu\text{mol/L}$)、XAV939组($10 \mu\text{mol/L}$)、毛萆乙素+XAV939组($1.0 \mu\text{mol/L}$ 毛萆乙素+ $10 \mu\text{mol/L}$ XAV939)。培养24 h后,收集细胞,按“2.4”项下方法处理细胞并进行电泳,然后加入 β -catenin、N-cadherin、E-cadherin、 β -actin一抗(稀释度均为1:500)孵育过夜;以PBST缓冲液清洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次,加入二抗(稀释度为1:5 000)孵育1 h,按“2.4”项下方法进行显色及灰度值分析。

2.7 统计学方法

所有数据使用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及SNK-*q*检验,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

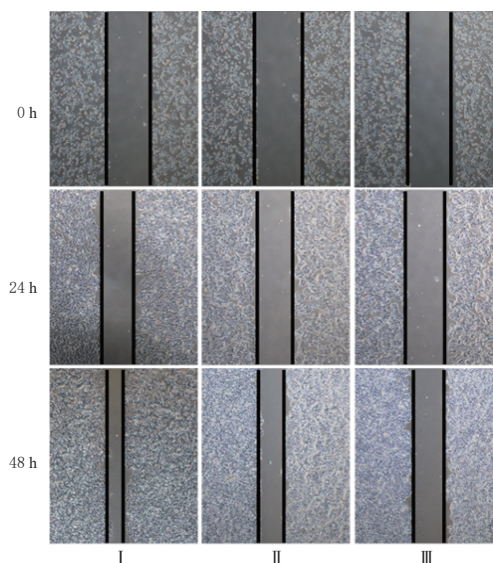
3 结果

3.1 毛萆乙素对结肠癌细胞迁移能力的影响结果

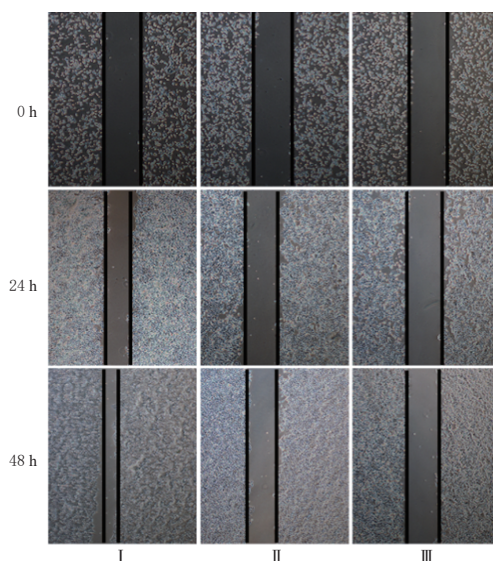
与对照组比较,毛萆乙素 1.0 、 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 组2种结肠癌细胞的迁移率均显著降低($P<0.01$),且呈一定浓度和时间依赖趋势。结果见图1。

3.2 毛萆乙素对结肠癌细胞侵袭、迁移的影响结果

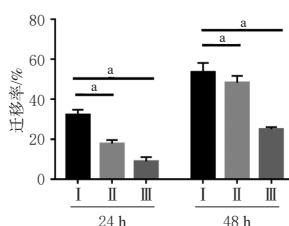
与对照组比较,毛萆乙素 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 组2种结肠癌细胞的侵袭率及迁移率均显著降低($P<0.01$)。结果见图2。



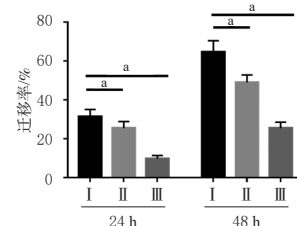
A. HT29细胞划痕愈合实验



B. HCT116细胞划痕愈合实验



C. HT29细胞迁移率的测定结果



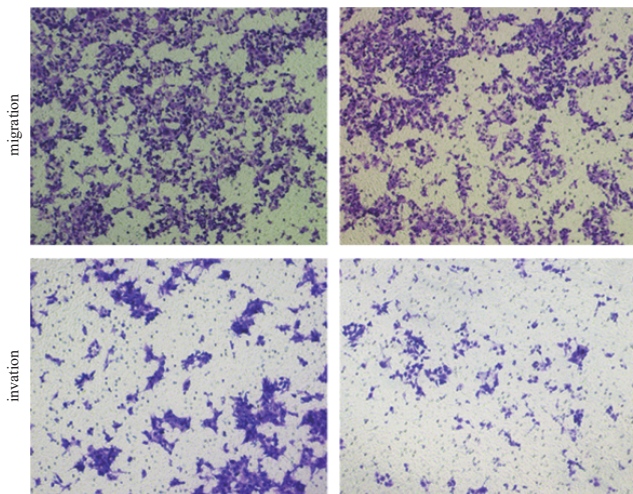
D. HCT116细胞迁移率的测定结果

I:对照组;II:毛萆乙素 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 组;III:毛萆乙素 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 组;a:与对照组比较, $P<0.01$

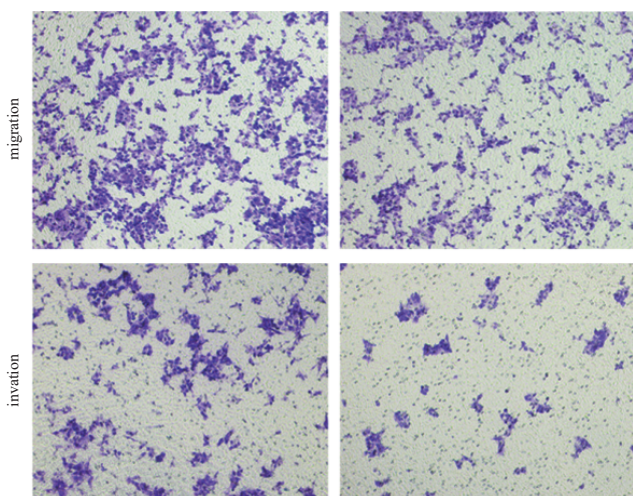
图1 毛萆乙素对2种结肠癌细胞迁移能力的影响结果

3.3 毛萆乙素对结肠癌细胞EMT相关蛋白表达的影响结果

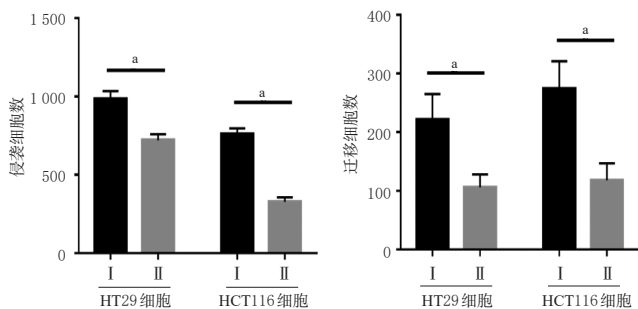
与对照组比较,毛萆乙素 1.0 、 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 组2种结肠癌细胞中N-cadherin、Snail表达水平均显著降低($P<0.01$),E-cadherin表达水平均显著升高($P<0.01$);毛萆乙素 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 组HT29中E-cadherin表达水平显著升



A. HT29细胞Transwell实验



B. HCT116细胞Transwell实验



C. 2种细胞侵袭细胞数的测定结果

D. 2种细胞迁移细胞数的测定结果

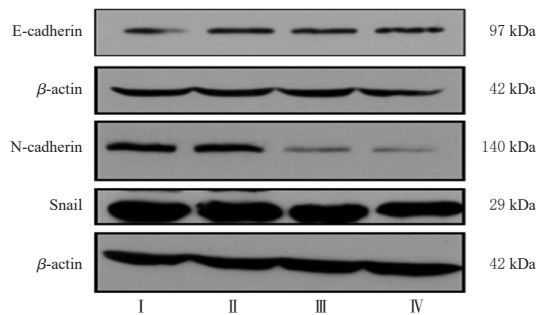
I: 对照组; II: 毛萆乙素1.0 μmol/L组; a: 与对照组比较, $P < 0.01$

图2 毛萆乙素对2种结肠癌细胞侵袭、迁移的影响结果

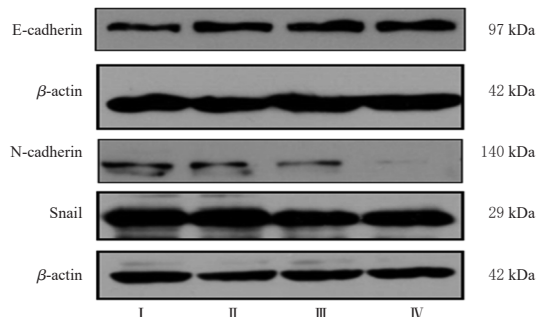
高($P < 0.01$), HCT116细胞中Snail表达水平显著降低($P < 0.05$), 表明毛萆乙素可以抑制结肠癌细胞EMT。结果见图3、表1。

3.4 毛萆乙素联合Wnt/ β -catenin信号通路激动剂对该信号通路相关蛋白及N-cadherin蛋白表达的影响结果

与对照组比较, 毛萆乙素组2种结肠癌细胞中Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白(β -catenin、c-myc、cyclin



A. HT29细胞中EMT相关蛋白的表达



B. HCT116细胞中EMT相关蛋白的表达

I: 对照组; II: 毛萆乙素0.5 μmol/L组; III: 毛萆乙素1.0 μmol/L组; IV: 毛萆乙素1.5 μmol/L组

图3 2种结肠癌细胞中EMT相关蛋白表达的电泳图

表1 2种结肠癌细胞中EMT相关蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

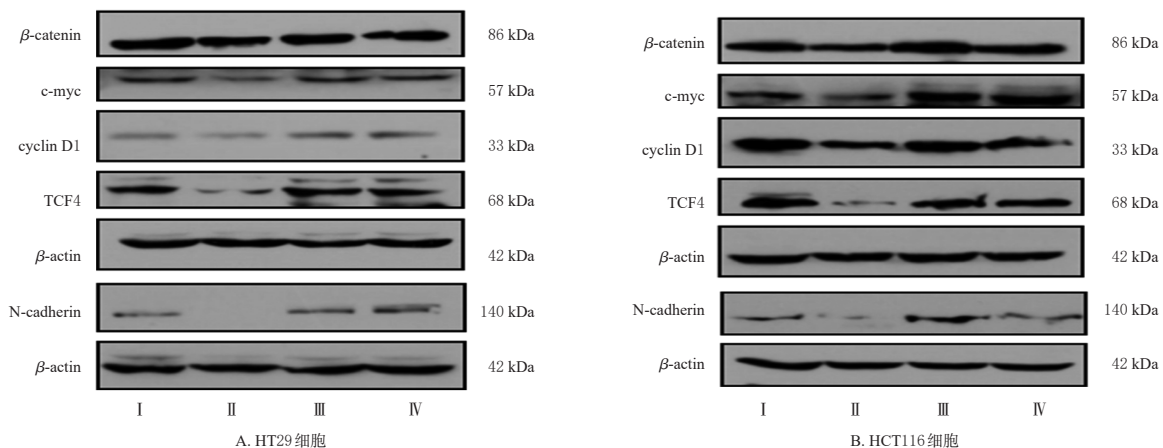
组别	E-cadherin		N-cadherin		Snail	
	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞
对照组	52.56 ± 2.01	57.54 ± 4.51	102.21 ± 10.52	25.68 ± 2.57	82.93 ± 2.41	134.18 ± 2.78
毛萆乙素0.5 μmol/L组	65.88 ± 3.22 ^a	68.75 ± 5.63	88.45 ± 3.51	24.14 ± 3.10	77.72 ± 2.54	118.52 ± 5.21 ^b
毛萆乙素1.0 μmol/L组	80.83 ± 5.11 ^a	79.66 ± 8.98 ^a	22.01 ± 2.41 ^b	11.39 ± 4.22 ^b	58.49 ± 3.21 ^b	100.42 ± 7.43 ^b
毛萆乙素1.5 μmol/L组	95.12 ± 4.32 ^a	87.84 ± 4.74 ^a	12.89 ± 3.31 ^b	1.50 ± 0.01 ^b	47.66 ± 2.21 ^b	92.84 ± 5.41 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.05$

D1、TCF4)及N-cadherin的表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Licl组2种结肠癌细胞中上述几种蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与毛萆乙素组比较, 毛萆乙素+Licl组2种结肠癌细胞中上述几种蛋白的表达水平被显著逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图4、表2。

3.5 毛萆乙素联合Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂对结肠癌细胞迁移率和 β -catenin、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达的影响

与对照组比较, 毛萆乙素组2种结肠癌细胞的迁移率及 β -catenin、N-cadherin表达水平均显著降低($P < 0.01$), E-cadherin表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与毛萆乙素组比较, 毛萆乙素+XAV939组2种结肠癌细胞的迁移率及 β -catenin、N-cadherin表达水平均进一步降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), E-cadherin表达水平进一步升高($P < 0.01$)。结果见图5、表3。



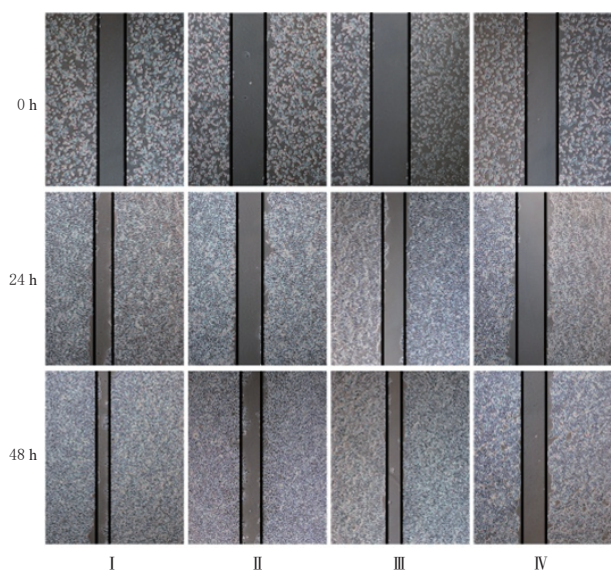
I : 对照组; II : 毛萆乙素组; III : Licl组; IV : 毛萆乙素+Licl组

图4 2种结肠癌细胞中Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白及N-cadherin表达的电泳图

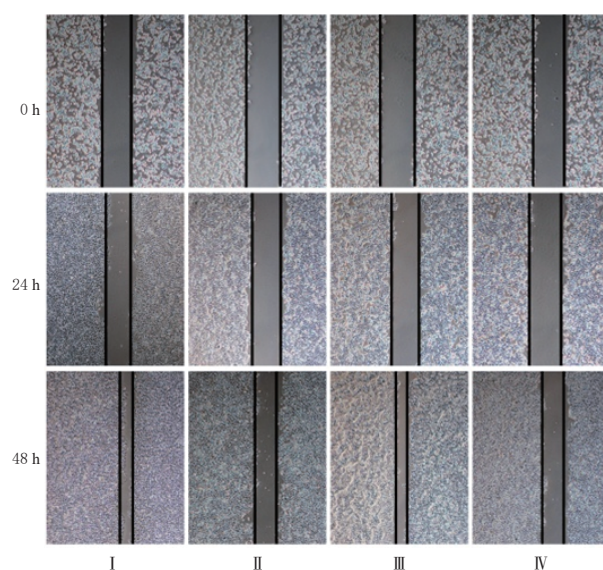
表2 2种结肠癌细胞中Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白及N-cadherin蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	β-catenin		c-myc		cyclin D1		TCF4		N-cadherin	
	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞
对照组	134.79 ± 5.67	104.24 ± 5.47	40.64 ± 1.53	77.92 ± 2.04	18.85 ± 3.21	116.48 ± 2.32	69.07 ± 5.21	77.62 ± 1.69	17.67 ± 2.51	25.15 ± 4.21
毛萆乙素组	106.03 ± 5.64 ^a	82.62 ± 8.12 ^b	19.68 ± 4.57 ^a	62.31 ± 2.64 ^b	12.39 ± 1.19 ^b	84.31 ± 1.52 ^c	18.00 ± 3.11 ^a	13.34 ± 4.41 ^a	0.92 ± 0.01 ^a	7.86 ± 0.59 ^a
Licl组	149.65 ± 4.21 ^b	120.56 ± 5.12 ^b	50.89 ± 4.25 ^b	106.10 ± 4.25 ^a	29.94 ± 1.21 ^a	128.66 ± 3.41 ^b	95.81 ± 4.85 ^b	86.54 ± 2.21 ^b	23.68 ± 0.95 ^b	78.17 ± 1.12 ^b
毛萆乙素+Licl组	121.53 ± 6.54 ^c	101.08 ± 8.12 ^c	35.31 ± 3.21 ^d	95.8 ± 11.64 ^d	24.79 ± 3.92 ^d	104.73 ± 7.21 ^d	64.95 ± 3.47 ^d	75.90 ± 3.21 ^d	21.21 ± 3.29 ^d	28.15 ± 3.13 ^d

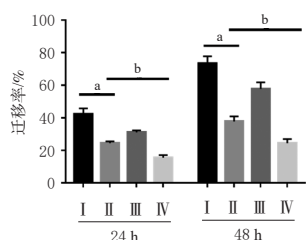
a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.05$; c: 与毛萆乙素组比较, $P < 0.05$; d: 与毛萆乙素组比较, $P < 0.01$



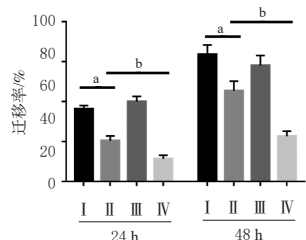
A. HT29细胞划痕愈合实验



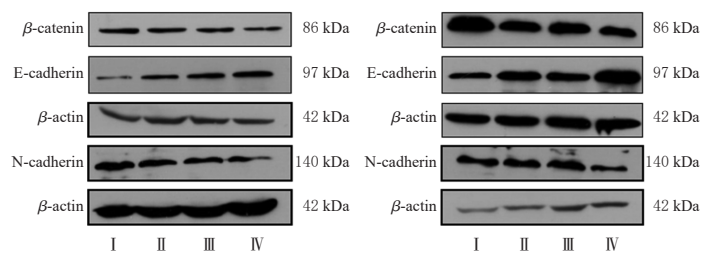
B. HCT116细胞划痕愈合实验



C. HT29细胞迁移率的测定结果



D. HCT116细胞迁移率的测定结果



E. HT29细胞

F. HCT116细胞

I : 对照组; II : 毛萆乙素组; III : XAV939组; IV : 毛萆乙素+XAV939组; a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与毛萆乙素组比较, $P < 0.01$

图5 毛萆乙素联合XAV939对2种结肠癌细胞迁移能力及β-catenin、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达的影响

表3 2种结肠癌细胞中 β -catenin、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$,%)

组别	β -catenin		E-cadherin		N-cadherin	
	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞	HT29细胞	HCT116细胞
对照组	103.58±8.26	175.17±9.81	29.22±2.36	60.08±2.76	63.97±3.51	447.02±16.84
毛萆乙素组	68.98±3.74 ^a	102.92±9.22 ^a	62.32±4.27 ^b	92.08±3.80 ^b	42.41±1.13 ^c	300.53±10.64 ^d
XAV939组	79.40±2.56 ^a	94.89±7.43 ^a	104.48±14.87 ^b	71.80±2.31 ^b	36.23±1.60 ^c	245.63±9.98 ^d
毛萆乙素+XAV939组	55.44±2.21 ^a	72.78±6.12 ^a	149.43±10.62 ^d	134.52±5.98 ^d	21.51±2.95 ^d	131.48±8.31 ^d

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与对照组比较, $P<0.05$;c:与毛萆乙素组比较, $P<0.05$;d:与毛萆乙素组比较, $P<0.01$

4 讨论

肿瘤转移是结肠癌相关死亡的主要原因^[13-14],转移性结肠癌预后较差,传统的治疗方法如手术切除和化疗并不能有效防止肿瘤转移^[15]。目前临床仍缺乏能够有效抑制结肠癌细胞转移的方案,因此,开发抗结肠癌细胞转移药物显得尤为重要。

细胞的侵袭和迁移是结肠癌发生转移的重要过程^[16]。本研究通过划痕愈合实验和Transwell实验检测毛萆乙素抑制结肠癌细胞侵袭和迁移的能力,结果发现毛萆乙素能够显著降低结肠癌细胞的侵袭率和迁移率,且其迁移能力具有一定浓度和时间依赖趋势。

EMT是肿瘤细胞转移最主要的原因^[17],故本研究检测不同浓度毛萆乙素处理结肠癌细胞后EMT相关蛋白的表达水平。结果发现,毛萆乙素能够抑制结肠癌间质细胞标志物N-cadherin以及与EMT呈正相关的转录因子Snail的表达,同时还能促进上皮细胞表型标志物E-cadherin的表达,这表明毛萆乙素可以抑制结肠癌细胞EMT。

目前研究显示,Wnt/ β -catenin信号通路是调节结肠癌EMT的关键信号通路^[18],且其在结肠癌中被高度激活^[19-20],因此,抑制该信号通路活性对结肠癌的治疗具有重要作用。本研究通过检测Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白 β -catenin及其下游靶蛋白(c-myc、cyclin D1、TCF4)的表达情况,并通过利用该信号通路激活剂LiCl进行功能回复实验,以探讨毛萆乙素抑制结肠癌细胞EMT是否与抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活有关。结果发现,毛萆乙素可以抑制Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白的表达,且该抑制作用能被该信号通路激活剂LiCl逆转,这表明毛萆乙素可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活抑制结肠癌细胞EMT。

为进一步研究毛萆乙素在今后临床转化中的应用价值,本研究检测毛萆乙素与Wnt/ β -catenin通路抑制剂XAV939的相互作用。结果发现,两者联用后,结肠癌细胞迁移率及 β -catenin、N-cadherin蛋白表达水平进一步降低,这表明毛萆乙素与Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂XAV939之间存在协同作用。

综上所述,毛萆乙素可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活抑制结肠癌细胞EMT。

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] BAXTER N N, KENNEDY E B, BERGSLAND E, et al. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: ASCO guideline update[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(8):892-910.
- [3] EDGE S B, COMPTON C C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(6):1471-1474.
- [4] KANWAR S S, POOLLA A, MAJUMDAR A P. Regulation of colon cancer recurrence and development of therapeutic strategies[J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012, 3(1):1-9.
- [5] WANG L, ZHAO W L, YAN J S, et al. Eriocalyxin B induces apoptosis of T(8;21) leukemia cells through NF-kappaB and MAPK signaling pathways and triggers degradation of AML1-ETO oncoprotein in a caspase-3-dependent manner[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(2):306-317.
- [6] ZHOU X N, YUE G G, CHAN A M, et al. Eriocalyxin B, a novel autophagy inducer, exerts anti-tumor activity through the suppression of Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in breast cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 142:58-70.
- [7] LI L, ZHAO S L, YUE G G L, et al. *Isodon eriocalyx* and its bioactive component Eriocalyxin B enhance cytotoxic and apoptotic effects of gemcitabine in pancreatic cancer [J]. Phytomedicine, 2018, 44:56-64.
- [8] HUANG C T, DU R J, JIA X C, et al. CDK15 promotes colorectal cancer progression via phosphorylating PAK4 and regulating β -catenin/MEK-ERK signaling pathway [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(1):14-27.
- [9] CASPI M, WITTENSTEIN A, KAZELNIK M, et al. Therapeutic targeting of the oncogenic Wnt signaling pathway for treating colorectal cancer and other colonic disorders[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 169:118-136.
- [10] WAN C H, MAHARA S, SUN C, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 screen of Wnt/ β -catenin signaling identifies therapeutic targets for colorectal cancer[J]. Sci Adv, 2021, 7(21):eabf2567.
- [11] LI W J, XIONG Y, CHEN W P, et al. Wnt/ β -catenin signaling may induce senescence of chondrocytes in osteoarthritis[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3):2631-2638.
- [12] ZHONG Y Y, WANG K, ZHANG Y, et al. Ocular Wnt/ β -catenin pathway inhibitor XAV939-loaded liposomes for treating alkali-burned corneal wound and neovascularization[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9:753879.
- [13] BAE J A, BAE W K, KIM S J, et al. A new KSRP-binding

- compound suppresses distant metastasis of colorectal cancer by targeting the oncogenic KITENIN complex[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1):78.
- [14] ZHONG Y, LONG T, GU C S, et al. MYH₉-dependent polarization of ATG9B promotes colorectal cancer metastasis by accelerating focal adhesion assembly[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(12):3251-3269.
- [15] BILLER L H, SCHRAG D. A review of the diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer-reply[J]. JAMA, 2021, 325(23):2405.
- [16] ZANOTELLI M R, ZHANG J, REINHART-KING C A. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis[J]. Cell Metab, 2021, 33(7):1307-1321.
- [17] DE CRAENE B, BERX G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):97-110.
- [18] LI Q Y, LAI Q H, HE C C, et al. RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):334.
- [19] CHERIYAMUNDATH S, BEN-ZE'EV A. Wnt/ β -catenin target genes in colon cancer metastasis: the special case of L1CAM[J]. Cancers, 2020, 12(11):3444.
- [20] WANG W, LIU H Y, WANG S, et al. A diterpenoid derivative 15-oxospiramilactone inhibits Wnt/ β -catenin signaling and colon cancer cell tumorigenesis[J]. Cell Res, 2011, 21(5):730-740.
- (收稿日期:2022-03-04 修回日期:2022-08-25)
(编辑:唐晓莲)

(上接第2325页)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:355-356.
- [2] GUO C J, HE J L, SONG X, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin: a review in recent years[J]. Pharmacol Res, 2019, 149:104463.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第五十九卷第一分册[M]. 北京:科学出版社, 1989:53.
- [4] KUMAR N, KUMAR R, KISHORE K. *Onosma* L.: a review of phytochemistry and ethnopharmacology[J]. Pharmacogn Rev, 2013, 7(14):140-151.
- [5] SHOAIB A, BADRUDDEEN, DIXIT R K, et al. Beneficial effects of n-hexane bark extract of *Onosma echioides* L. on diabetic peripheral neuropathy[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):16524-16532.
- [6] NIKITA G, VIVEK P, CHHAYA G. Wound-healing activity of an oligomer of alkannin/shikonin, isolated from root bark of *Onosma echioides*[J]. Nat Prod Res, 2015, 29(16):1584-1588.
- [7] 邵鑫, 蒋先虹, 王瑞, 等. 紫草素对人结肠癌细胞HCT116自噬和凋亡的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(1):51-55.
- [8] SAGRATINI G, CRISTALLI G, GIARDINÀ D, et al. Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L.: extraction method study and quantification[J]. J Sep Sci, 2008, 31(6/7):945-952.
- [9] SHOAIB A, DIXIT R K, BADRUDDEEN, et al. Cure of human diabetic neuropathy by HPLC validated bark extract of *Onosma echioides* L. root[J]. Nat Prod Res, 2019, 33(18):2699-2703.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:39, 59, 114, 234.
- [11] 黄建猷, 胡筱希, 谭晓, 等. 瑶药消瘤藤的质量标准研究[J]. 中国药房, 2021, 32(21):2624-2630.
- [12] 咎珂, 苏蕊, 滕爱君, 等. 新疆紫草 HPLC 特征图谱和紫草类药材 6 种萘醌类成分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9):1526-1535.
- [13] 马留纯, 马生军, 朱金芳, 等. 新疆紫草的 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定[J]. 中国药房, 2020, 31(14):1732-1738.
- [14] WANG F F, MAYCA POZO F, TIAN D M, et al. Shikonin inhibits cancer through P21 upregulation and apoptosis induction[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:861.
- [15] 詹志来, 郭兰萍, 金艳, 等. 中药材品质评价与规格等级的历史沿革[J]. 中国现代中药, 2017, 19(6):868-876.
- (收稿日期:2022-03-21 修回日期:2022-09-01)
(编辑:胡晓霖)