

· 基础研究 ·

左旋紫草素靶向 Wnt/ β -catenin 通路抑制宫颈癌
HeLa 细胞增殖侵袭迁移的机制研究王焱哲^{1,2} 梁忠喆¹ 张莹轩¹ 朱芳芳¹ 郜洁³ 邓高丕³

摘要 目的 观察左旋紫草素对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭、迁移及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白的影响。方法 设置左旋紫草素浓度梯度为 0、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ ，干预 HeLa 细胞，MTS 法检测细胞增殖活力，并筛选最佳干预浓度进行后续实验。后续实验中分为对照组、左旋紫草素 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组。划痕实验检测 HeLa 细胞 24、48 h 后细胞的迁移能力；Transwell 实验检测左旋紫草素作用 HeLa 细胞 24 h 后细胞侵袭能力；Western Blot 检测左旋紫草素作用 HeLa 细胞 24 h 后 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP、LRP 的表达。结果 左旋紫草素 1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 在 24 h 可明显抑制 HeLa 细胞增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$)，其抑制作用呈现浓度依赖性；与对照组比较，左旋紫草素 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞穿过率明显降低，细胞穿过基质胶的能力随着药物浓度的加大而降低 ($P<0.01$)，同时 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP 蛋白表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 左旋紫草素可通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路，抑制 HeLa 细胞增殖、侵袭、迁移功能。

关键词 宫颈癌；左旋紫草素；癌症转移；Wnt/ β -catenin 通路

Mechanism Research of L-Shikonin Inhibited HeLa Cells Proliferation, Invasion, Migration via Wnt/ β -catenin Pathway in Cervical Cancer WANG Yan-xi^{1,2}, LIANG Zhong-zhe¹, ZHANG Ying-xuan¹, ZHU Fang-fang¹, GAO Jie³, and DENG Gao-pi³ 1 Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Department of Gynaecology, Shenzhen Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Shenzhen (518104); 3 Department of Gynaecology, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of L-shikonin on proliferation, invasion, migration and Wnt/ β -Catenin pathway protein of cervical cancer HeLa cells. **Methods** HeLa cells were intervened with L-shikonin concentration gradient of 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol/L}$. MTS was used to detect the proliferation of HeLa cells and to screen the optimal intervention concentration for subsequent experiments. Subsequent experiments were divided into control group and L-shikonin 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ group. Scratch test was used to detect the migration ability of HeLa cells for 24 and 48 h. Transwell test was used to detect the invasion ability of HeLa cells with L-shikonin for 24 h and the expression of Wnt/ β -Catenin pathway related proteins Wnt5a, β -Catenin, p-LRP and LRP were detected by Western Blot. **Results** L-shikonin 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol/L}$ could significantly inhibit the proliferation of HeLa cells in a concentration-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the cell penetration rate was decreased in L-shikonin 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ group and the cell penetration ability of matrix glue was decreased with the increase of drug concentration ($P<0.01$), and the expression of Wnt5a, p-LRP and β -catenin were also decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** L-shikonin can inhibit the proliferation, invasion and migration of HeLa cells by down regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS cervical cancer; L-shikonin; cancer metastasis; Wnt/ β -catenin pathway

基金项目：邓高丕广东省名中医传承工作室建设项目（No. 粤中医办函 20195 号）

作者单位：1. 广州中医药大学岭南医学研究中心（广州 510405）；2. 深圳市中西医结合医院妇科（广东 518104）；3. 广州中医药大学第一附属医院妇科（广州 510405）

通讯作者：邓高丕，Tel: 022-36588217, E-mail: denggaopi@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20201220. 404

世界范围内,宫颈癌的发病率占女性肿瘤相关死亡的第四位,每年约有 530 000 例的新发病例^[1]。发展中国家,宫颈癌相关性死亡比率更高。随着手术、放、化疗技术的提升,宫颈癌患者的 5 年生存率约达 80% 左右^[2]。但是,肿瘤一旦发生转移,将会在很大程度上降低宫颈癌患者的生存年限^[3]。因此,明确宫颈癌转移机制,制定有效的治疗方案是临床上亟待解决的问题。

左旋紫草素是从中药紫草根中提取的一种萜醌衍生物,具有广泛的抗炎、抗肿瘤生物活性^[4,5]。研究表明,左旋紫草素对多种肿瘤细胞的增殖、分化、转移具有显著的抑制作用,其可诱导胆囊癌细胞 G0/G1 期停滞^[6],降低胶质母细胞瘤细胞线粒体膜电位,激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、Caspase-8、Caspase-9 等凋亡蛋白,诱导凋亡^[7],同时抑制 E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) 的表达^[8],抑制癌细胞转移。为此笔者开展本项研究,以宫颈癌 HeLa 细胞为研究载体,研究左旋紫草素对 HeLa 细胞增殖、迁移、侵袭及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白的影响,以期为新药的开发与宫颈癌的治疗提供依据。

材料与方法

1 细胞及其培养 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞由广州中医药大学岭南医学研究中心妇科实验室提供。细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期的细胞进行后续试验。

2 药物、试剂及仪器 左旋紫草素 (批号: B50783) 购买于源叶生物, HPLC $\geq$ 98%; 胎牛血清 (批号: 10099)、RPMI-1640 培养基 (批号: 31870082)、胰蛋白酶 (批号: 25200056) 购买于 Gibco 公司; MTS (批号: G3580) 试剂盒购买于 PROMEGA; Matrigel Matrix 基质胶 (批号: 356234)、Transwell 小室 (批号: 353097) 购买自美国 BD 公司; 结晶紫染色液 (批号: C0121) 及 4% 的多聚甲醛 (批号: P0099) 购买于上海碧云天生物科技有限公司。一抗及二抗 Wnt5a (批号: 2392)、 β -catenin (批号: D10A8)、p-LRP (批号: 2568)、LRP (批号: 3395)、Actin (批号: 4970)、Anti-rabbit IgG (批号: 7074) 购买于 CST 公司。全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司)、全自动凝胶成像图像分析仪 (Bio-Rad 公司)、倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 等。

3 细胞增殖活力检测 应用 MTS 试剂盒检测细胞增殖活力。取对数生长期的细胞,接种于 96 孔板,12 000 个/孔,待细胞融合面积达 40%~50%,进行加药干预。应用 DMSO 溶解左旋紫草素,设置浓度梯度为 0、0.5、1、2、4、8 μ mol/L,加药培养 24 h,每组设置 4 个副孔。培养结束后,每孔加入 20 μ L MTS 试剂,于培养箱中继续培养 2 h。应用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔吸光度。

4 细胞迁移检测 划痕实验检测细胞迁移能力。设置实验分组为对照组、左旋紫草素 0.5、1、2 μ mol/L 组。将 6 孔板底部划线做标记,取对数生长期的细胞接种于 6 孔板,待细胞融合面积达 80% 以上,应用 10 μ L 枪头垂直用力划痕,PBS 漂洗 3 遍,去除悬浮细胞,将不同浓度的药物溶解于 1% 的 FBS 中,并拍照。24、48 h 后再次拍照观察各组细胞的划痕愈合情况。

5 细胞侵袭检测 应用 Transwell 小室检测细胞侵袭能力。具体分组同 4。按照 1:8 的比例稀释基质胶,取 80 μ L 稀释后的基质胶平铺于 Transwell 小室内,避免产生气泡。待胶凝固后,应用 1640 水化 30 min。1640 重悬细胞接种于小室内,培养基中加入不同浓度的左旋紫草素,小室外加入 750 μ L 的 20% FBS,于 37℃ 培养箱中培养 24 h。吸弃培养基,应用预冷的 PBS 漂洗后,多聚甲醛固定 15 min,甲醇透化 5 min,0.1% 结晶紫染色 15 min 后,棉棒轻拭去小室内基质胶及细胞。显微镜下观察各组细胞的穿过情况,并拍照计数。

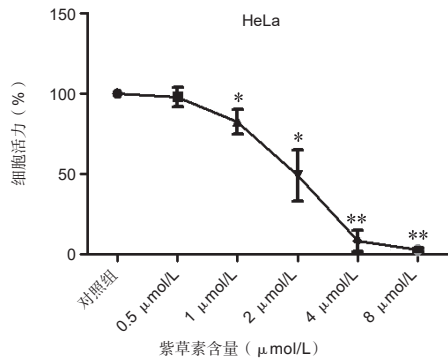
6 细胞总蛋白的提取及 Western Blot 实验 细胞药物干预结束后,应用预冷的 PBS 冲洗 3 遍,加入适量的 RIPA 裂解液,充分裂解后,12 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,应用 5 $\times$ 的 loading buffer 进行蛋白变性。上样等量蛋白进行电泳,后转膜至 PVDF 膜上。5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h,4℃ 一抗封闭过夜。一抗稀释浓度: Wnt5a (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000)、p-LRP (1:1 000)、LRP (1:1 000)、Actin (1:2 000)。TBST 洗膜后,二抗 (Anti-rabbit IgG 1:2 000) 室温孵育 1 h,洗膜后显影。

7 统计学方法 应用 Stata 14.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 不同浓度左旋紫草素对 HeLa 细胞增殖的

抑制作用比较(图 1) 与对照组比较,左旋紫草素 1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 在 24 h 对 HeLa 细胞均有不同程度的抑制作用,且差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。2 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度在 24 h 时接近 IC_{50} 。4 $\mu\text{mol/L}$ 与 8 $\mu\text{mol/L}$ 的药效浓度对细胞的抑制作用过强,因此设置浓度梯度为 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。



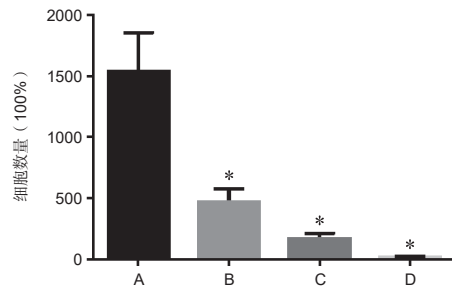
注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 1 不同浓度左旋紫草素干预 HeLa 细胞增殖活力比较

2 各组 HeLa 细胞迁移作用比较(图 2) 与对照组比较, 0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ 的左旋紫草素可以明显抑制 HeLa 细胞的迁移能力, 2 $\mu\text{mol/L}$ 的药效浓度较高,

在 1% 血清的条件下, 造成了细胞的大量死亡, 故迁移作用不明显。且药物对细胞的影响随着作用时间的延长而加剧。

3 各组 HeLa 细胞侵袭作用比较(图 3、4) 左旋紫草素作用 HeLa 细胞 24 h 后, 与对照组比较, 左旋紫草素 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞穿过率明显降低, 细胞穿过基质胶的能力随着药物浓度的加大而降低($P<0.01$)。



注: A 为对照组; B 为左旋紫草素 0.5 $\mu\text{mol/L}$; C 为左旋紫草素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; D 为左旋紫草素 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; 图 5、6 同; 与对照组比较, * $P<0.01$

图 4 穿膜细胞数量统计图

4 各组 HeLa 细胞 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP、LRP 蛋白表达比较(图 5、6) 与对照组比较, 左旋

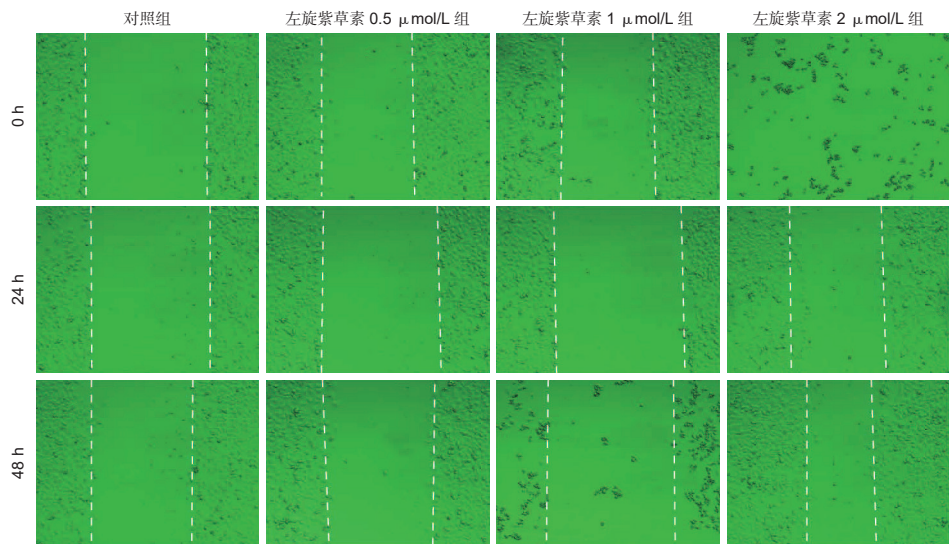


图 2 各组 HeLa 细胞迁移作用比较 ($\times 100$)

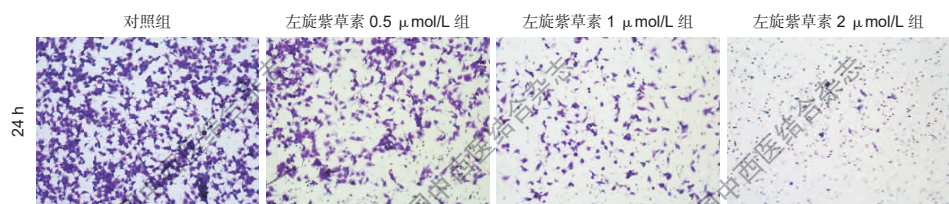


图 3 各组 HeLa 细胞侵袭作用比较 (结晶紫染色, $\times 100$)

紫草素 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP 蛋白表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 而对 LRP 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

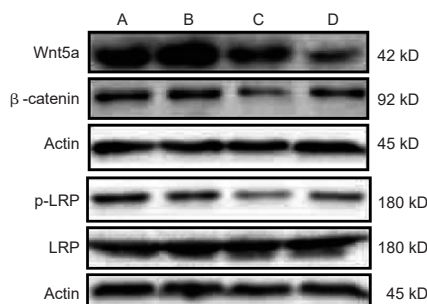
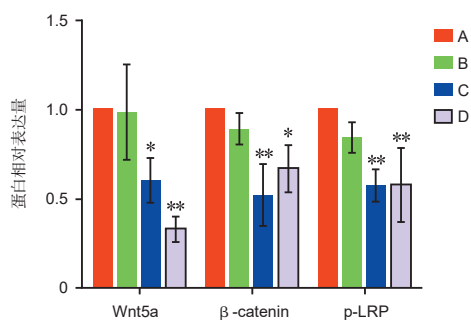


图 5 各组 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP、LRP 蛋白电泳图



注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 6 各组 Wnt5a、 β -catenin、p-LRP 蛋白相对表达量统计图

讨 论

癌症是全世界公认的亟待解决的健康问题, 癌症的复发转移是造成癌性死亡的主要原因^[9,10]。癌肿的侵袭转移主要有 4 个过程: (1) 原发灶肿瘤细胞的大量增殖和血管新生; (2) 肿瘤细胞脱落, 侵袭基底膜; (3) 进入脉管系统形成癌栓, 后迁移到其他部位; (4) 黏附于靶器官, 形成微小的转移灶, 完成癌症的转移过程^[11,12]。癌肿干细胞特性, 使其可以无限制繁殖^[13]。其存在多种信号通路来干扰并侵袭正常细胞, 如侵袭、迁移及 EMT 过程^[14,15]。抑制癌细胞的增殖, 诱导凋亡, 抑制其局部和远方转移是防治癌症的关键。

Wnt/ β -catenin 信号参与生物体生长、发育、分化等诸多环节, 其异常激活, 与癌症的转移机制密切相关^[16-18]。 β -catenin 是该通路中枢性信号转导分子。当胞外信号诱导其激活时, wnt 配体与低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 相结合, 造成胞内 β -catenin 的累积, 其可与转录因子 TCF/LEF 结合, 进而激活其下游靶基因的表达^[19]。在一项关于非小细胞肺癌的研究中发现, Wnt/ β -catenin 通路的活化程度与肺癌患者的生存率呈负相关, 机制研究发现激

活 Wnt 信号, 诱导 A549 细胞 EMT, 促进侵袭、迁移的发生^[20]。据报道, 转录因子 DSCC1 在乳腺癌组织中异常表达, 其上调激活了 Wnt/ β -catenin 信号, 抑制 P53 信号, 促进乳腺癌的发展进程^[21]。此外, 非编码 RNA miR-197、Lnc-ToB1-AS1 也可通过调控 Wnt/ β -catenin 通路活性, 干扰疾病进展^[22,23]。由此可见, 靶向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, 有望成为治疗疾病的新靶点。

紫草是一种传统中药, 在我国分布广泛, 资源丰富, 具有清热凉血的作用。左旋紫草素是从紫草科多年生植物紫草的根部提取纯化的有效成分之一, 现代药理研究表明, 天然紫草素及其衍生物具有更加广泛的药用价值, 主要包括有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗菌、镇静等作用^[4]。左旋紫草素在抗肿瘤方面的机制, 研究较为广泛, 其可抑制多种癌细胞的增殖, 诱导凋亡、自噬性细胞死亡, 抑制其转移机制, 且可一定程度上参与癌症耐药机制的调控^[6,24]。据报道, 紫草素可通过抑制细胞外 ERK 信号通路活性, 上调 Cbl-b 蛋白, 显著的抑制肺癌 NCI-H460 细胞的增殖, 诱导肺癌细胞的凋亡^[25]; 紫草素亦可诱导 MMP-2/9 表达, 并且活化 PI3K/Akt 通路, 抑制前列腺癌的转移^[26]。

在本研究中应用左旋紫草素干预宫颈癌 HeLa 细胞, 发现其可明显的抑制 HeLa 细胞的增殖, 呈现浓度依赖特点; 抑制 HeLa 细胞的侵袭和迁移; 左旋紫草素还可抑制 HeLa 细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路, 下调 Wnt5a、p-LRP 的表达, 从而降低通路下游 β -catenin 的表达, 表现出抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭和迁移的特性。

综上所述, 左旋紫草素可靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路, 通过抑制该通路相关基因的表达, 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的活力, 抑制其侵袭迁移功能。左旋紫草素可作为一个潜在的治疗宫颈癌的药物, 其具体应用尚需进一步探索。

利益冲突: 本研究不存在利益冲突, 相关作者一致同意文章发表。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67 (1): 7-30.
- [2] Petignat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer[J]. BMJ, 2007, 335 (7623): 765-768.
- [3] Li H, Zhang W, Yan M, et al. Nucleolar and spindle-associated protein 1 promotes metastasis

- of cervical carcinoma cells by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1): 33.
- [4] Liu T, Xia Y, Li J, et al. Shikonin attenuates concanavalin a-induced acute liver injury in mice via inhibition of the JNK pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 2748367.
- [5] Liang W, Cai A, Chen G, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38267.
- [6] Zhai T, Hei Z, Ma Q, et al. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38 (6): 3473–3480.
- [7] Jing H, Sun W, Fan J, et al. Shikonin induces apoptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (4): 3009–3016.
- [8] Chen Y, Chen Z, Chen L, et al. Shikonin inhibits triple-negative breast cancer-cell metastasis by reversing the epithelial-to-mesenchymal transition via glycogen synthase kinase 3 β -regulated suppression of β -catenin signaling[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 166: 33–45.
- [9] Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases[J]. *Cancer*, 2017, 123 (12): 2219–2229.
- [10] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66 (2): 115–132.
- [11] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2006, 12 (8): 895–904.
- [12] Vivien M. Tracking metastasis and tricking cancer[J]. *Nature*, 2013, 494 (7435): 133–136.
- [13] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8 (10): 755–768.
- [14] Tang C, Liang Q, Yang L, et al. RAB31 Targeted by MiR-30c-2-3p regulates the GLI1 signaling pathway, affecting gastric cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 554.
- [15] Cao Q, Liu F, Li C, et al. Testes-specific protease 50 (TSP50) promotes invasion and metastasis by inducing EMT in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 94.
- [16] Waggoner S, Chernicky C. Molecular biology of cervical and vulvar carcinoma[M]. *Gynecologic cancer: Controversies in management*, Elsevier Ltd, 2004: 16706.
- [17] Fujiwara K, Monk B, Devouassoux-Shisheboran M. Adenocarcinoma of the uterine cervix: Why is it different? [J]. *Curr Oncol Rep*, 2014, 16 (12): 416.
- [18] Gao T, Yu L, Fang Z, et al. KIF18B promotes tumor progression in osteosarcoma by activating β -catenin[J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17 (23): 71–386.
- [19] 陈益鲁. Wnt 信号通路在超长方案促排卵 PCOS 患者卵子成熟中的调控研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [20] Yang S, Liu Y, Li M, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1): 124.
- [21] Jin G, Wang W, Cheng P, et al. DNA replication and sister chromatid cohesion 1 promotes breast carcinoma progression by modulating the Wnt/ β -catenin signaling and p53 protein[J]. *J Biosci*, 2020, 45: 127.
- [22] Hu Z, Wang P, Lin J, et al. MicroRNA-197 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51 (1): 470–486.
- [23] Jiang K, Zhi X, Ma Y, et al. Long non-coding RNA TOB1-AS1 modulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion through miR-23a/NEU1 axis via Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (22): 9890–9899.
- [24] Chen Y, Wang T, Du J, et al. The critical role of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in shikonin-induced apoptosis and proliferation inhibition of chronic myeloid leukemia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47 (3): 981–993.
- [25] Galve-Roperh I, Rueda D, Del Pulgar TG, et al. Cbl-b-regulated extracellular signal-regulated kinase signaling is involved in the shikonin-induced apoptosis of lung cancer cells *in vitro*[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9 (4): 1265–1270.
- [26] Chen Y, Zheng L, Liu J, et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21 (2): 447–455.

(收稿: 2019-08-29 在线: 2021-03-29)

责任编辑: 汤 静