

## . 实验研究 .

# 槐定碱通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制人胶质瘤 U87 细胞迁移、侵袭

姜 羽 吕国伟 张文进 张 辉

**【摘要】目的** 探讨槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞迁移、侵袭能力的影响及其作用机制。**方法** 体外培养人胶质瘤 U87 细胞,加入槐定碱[0 mg/ml(对照组),1.0 mg/ml,2.0 mg/ml,3.0 mg/ml]共培养 24 h,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力,免疫印迹法检测细胞  $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin 和 MMP-9 蛋白表达,RT-PCR 检测细胞 Vimentin、MMP-9 mRNA 表达。**结果** 槐定碱明显抑制 U87 细胞迁移、侵袭能力( $P<0.001$ ),而且随浓度增加抑制作用明显增强( $P<0.001$ )。槐定碱明显抑制 U87 细胞  $\beta$ -catenin 蛋白、Vimentin 和 MMP-9 mRNA 和蛋白表达( $P<0.01$ ),明显增强 E-cadherin 蛋白表达( $P<0.01$ ),而且随浓度增加抑制作用明显增强( $P<0.01$ )。**结论** 槐定碱能抑制人胶质瘤 U87 细胞的迁移和侵袭,机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性,阻断细胞上皮间质转化过程。

**【关键词】** 胶质瘤;U87 细胞;细胞迁移;细胞侵袭;槐定碱;上皮间质转化

**【文章编号】** 1009-153X(2021)10-0789-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

## Sophoridine inhibits migration and invasion of human glioma U87 cells by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

JIANG Yu, LÜ Guo-wei, ZHANG Wen-jin, ZHANG Hui. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of sophoridine on the migration and invasion of human glioma U87 cells and its possible mechanism. **Methods** Human glioma U87 cells were co-cultured with sophoridine [0 mg/ml (control), 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 3.0 mg/ml] for 24h. The cell migration and invasion abilities were detected by scratch test and transwell assay, respectively. The protein expression levels of  $\beta$ -catenin, E-cadherin vimentin and MMP-9 was detected by western blotting. The mRNA expression levels of vimentin and MMP-9 were detected by RT-PCR. **Results** Sophoridine significantly inhibited the migration and invasion of U87 cells ( $P<0.001$ ), and the inhibitory effect was significantly enhanced with the increase in concentration of sophoridine ( $P<0.001$ ). Sophoridine significantly inhibited  $\beta$ -catenin protein, Vimentin and MMP-9 mRNA and protein expression and significantly enhanced E-cadherin protein expression in U87 cells ( $P<0.01$ ), and the inhibitory effect was significantly enhanced with increasing concentration of sophoridine ( $P<0.01$ ). **Conclusions** Sophoridine can inhibit the migration and invasion of human glioma U87 cells, which may be by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and blocking the process of epithelial-mesenchymal transition.

**【Key words】** Human glioma U87 cells; Sophoridine; Cell migration; Cell invasion; Epithelial-mesenchymal transition

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤<sup>[1,2]</sup>。Wnt 通路是细胞内一条在进化过程中高度保守的信号通路,分为 4 个分支,其中 Wnt/ $\beta$ -catenin 是经典路径,在肿瘤细胞增殖、凋亡、间质转化等多个方面具有调控作用<sup>[3,4]</sup>。研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的异常激活与胶质瘤等多种肿瘤有关<sup>[3,4]</sup>。槐定碱具有抗炎等药理学活性<sup>[5]</sup>,对多种肿瘤细胞有调控作用<sup>[6,7]</sup>。本研究探讨槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞系的

生物学行为产生影响,为胶质瘤的治疗寻找新的有效药物提供理论支撑。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** 将胶质瘤 U87 细胞株(中国科学院上海细胞库)于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 1640 培养液(美国 Invitrogen 公司)中培养,待细胞生长汇合度达到 80%以上时进行传代。以  $5 \times 10^5$  个/孔密度接种于 6 孔板培养 16 h,加入槐定碱(上海将来实业股份有限公司,批号 060736,纯度 >99.0%),浓度分别为 0 mg/ml(对照组)、1.0(低剂量)、2.0(中剂量)、3.0(高剂量)mg/ml,每个浓度设置 6 个复孔,继续培养 24 h,光学显微镜下观察细胞形态。

**1.2 细胞迁移** U87 细胞与槐定碱共培养 24 h,不含

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.10.013

基金项目:河南省 2016 年科技发展计划(162102310215)

作者单位:450000 郑州,郑州大学附属郑州中心医院神经外科(姜羽、吕国伟、张文进、张辉)

通讯作者:张辉,E-mail:chy298a@163.com

胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中饥饿处理 12 h; 用 10 μl 的移液枪头垂直于板面划痕, 每 4 h 观察一次细胞迁移状态, 倒置荧光显微镜下拍照, 作图软件处理, 计算每组细胞 24 时和 0 时的划痕宽度之比。

1.3 细胞侵袭 U87 细胞与槐定碱共培养 24 h, 不含胎牛血清的培养基中饥饿处理 12 h, 胰蛋白酶消化后洗涤、离心, 用不含胎牛血清的培养基重悬, 调整密度约 2×10<sup>5</sup> 个/ml; 将 Transwell 小室(上海 Abcam 公司)置于 24 孔板内, 加入 300 μl 完全培养液, 室温下静置 30 min, 使基质胶水化, 向外室内加入 500 μl 完全培养液, 将 200 μl 细胞悬液接种于小室内, 培养 24 h, 进行 GISMA 染色, 用棉签擦拭小室内侧, 流水冲洗染液; 用手术刀片将膜取下, 置于载玻片上, 于倒置显微镜下观察、计数并拍照; 每张玻片取上下左右中 5 个视野计数细胞, 取平均数。

1.4 免疫印迹法检测相关蛋白表达 U87 细胞与槐定碱共培养 24 h, 用 RIPA 细胞裂解液裂解, 提取蛋白质, 凝胶电泳后, 转移至 NC 膜, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 摇育封闭 2 h, 先后加入稀释后的 E-cadherin (1:1 000; 美国 Abcam 公司)、Vimentin (1:1 000; 美国 Abcam 公司) 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 (1:1 000; 美国 Abcam 公司) 一抗、二抗 (1:5 000), TBST 洗涤 NC 膜; ECL 显色; 将胶片扫描后用 BandsCan 5.0 软件进行灰度分析。

1.5 RT-PCR 检测相关 mRNA 水平 U87 细胞与槐定碱共培养 24 h, Trizol (美国 Gibco 公司) 提取总 RNA, 行逆转录反应。取 2 μl RNA 进行 PCR 扩增: 内参 β-actin 正义链 5'-CTAGGCTAGCGCTAATCGAC-3', 反义链 5'-TCGGCATTATTACGCTAGA-3'; Vimentin 正义链 5'-GCTTAGCGCCCTAGCTAGGCT-3', 反义链 5'-TCGGCTTAGCCGATCGATC-3'; MMP-9 正义链 5'-TAGCTTTCGTAGCCTAGCCT-3', 反义链 5'-TAGGCTTCGTACGATAACGA-3' (上海生工生物工

程有限公司合成)。扩增条件: 94 °C 预变性 2 min, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 总延伸 6 min。取 5 μl PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用图像记录分析系统对目的基因、参比基因的条带灰度值进行分析。

1.6 统计学分析 用 SPSS 19.0 软件进行分析; 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用多因素方差分析和 LSD-t 检验;  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 槐定碱对 U87 细胞形态的影响 对照组 U87 细胞为梭形间质细胞状态, 呈现上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 形态变化; 中剂量槐定碱组呈现正常上皮细胞形态。

2.2 槐定碱对 U87 细胞迁移和侵袭活性的影响 与对照组相比, 槐定碱组 U87 细胞迁移、侵袭活性显著降低 ( $P < 0.001$ ), 且随药物浓度的增加, 迁移、侵袭活性明显降低 ( $P < 0.001$ )。见图 1、2。

2.3 槐定碱对 U87 细胞 β-catenin 和 E-cadherin 蛋白表达的影响 槐定碱组 U87 细胞 β-catenin 蛋白表达水平显著低于对照组 ( $P < 0.001$ ), 且随药物浓度的增加而明显降低 ( $P < 0.001$ ); 槐定碱组 U87 细胞 E-cadherin 蛋白表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.001$ ), 且随药物浓度的增加而明显增高 ( $P < 0.001$ )。见图 3。

2.4 槐定碱对 U87 细胞 Vimentin 和 MMP-9 mRNA 和蛋白表达的影响 槐定碱组 U87 细胞 Vimentin 和 MMP-9 mRNA 和蛋白表达这篇均显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 且随药物浓度的增加明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 4、5。

### 3 讨论

EMT 指源于上皮的肿瘤细胞失去极性, 向具有间质表型细胞转化的过程<sup>[8]</sup>。Wnt/β-catenin 信号通

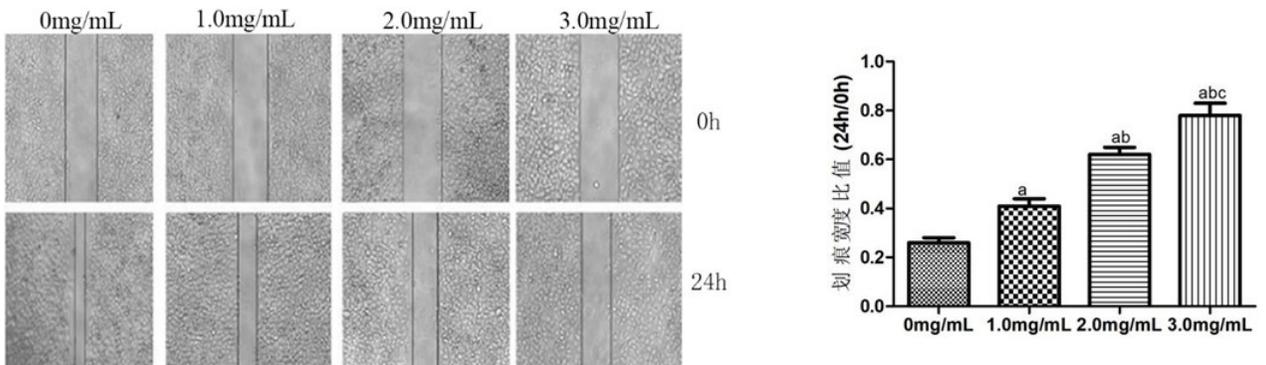


图 1 划痕实验检测槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞迁移能力的影响 (40×) 与 0 mg/ml 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与 1.0 mg/ml 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与 2.0 mg/ml 组相比, c  $P < 0.05$

路的异常激活是导致 EMT 的重要因素<sup>[3,8-10]</sup>,该信号通路与胶质瘤的发展有密切关系<sup>[11]</sup>。

槐定碱是中药苦豆子的有效活性成分之一,能通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖、侵袭<sup>[5-7]</sup>。研究发现,槐定碱能通过抑制 NF- $\kappa$ B 介导的抗凋亡通路及激活 Caspase 级联反应,诱导胶质瘤细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。另有研究证实,槐定碱能通过诱导 ROS 聚集,激活线粒体途径而发挥抗肿瘤活性<sup>[13]</sup>。本研究发现,槐定

碱能抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。为了进一步探讨槐定碱对胶质瘤 U87 细胞可能存在的作用机制,我们进一步检测了 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中因子的表达。本研究发现,槐定碱能显著抑制细胞内  $\beta$ -catenin 的表达,提示槐定碱可能对人胶质瘤细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性具有抑制作用。 $\beta$ -catenin 参与胶质瘤细胞的增殖和侵袭过程的调控,当其表达被抑制后,胶质瘤细胞的增殖和侵袭相应

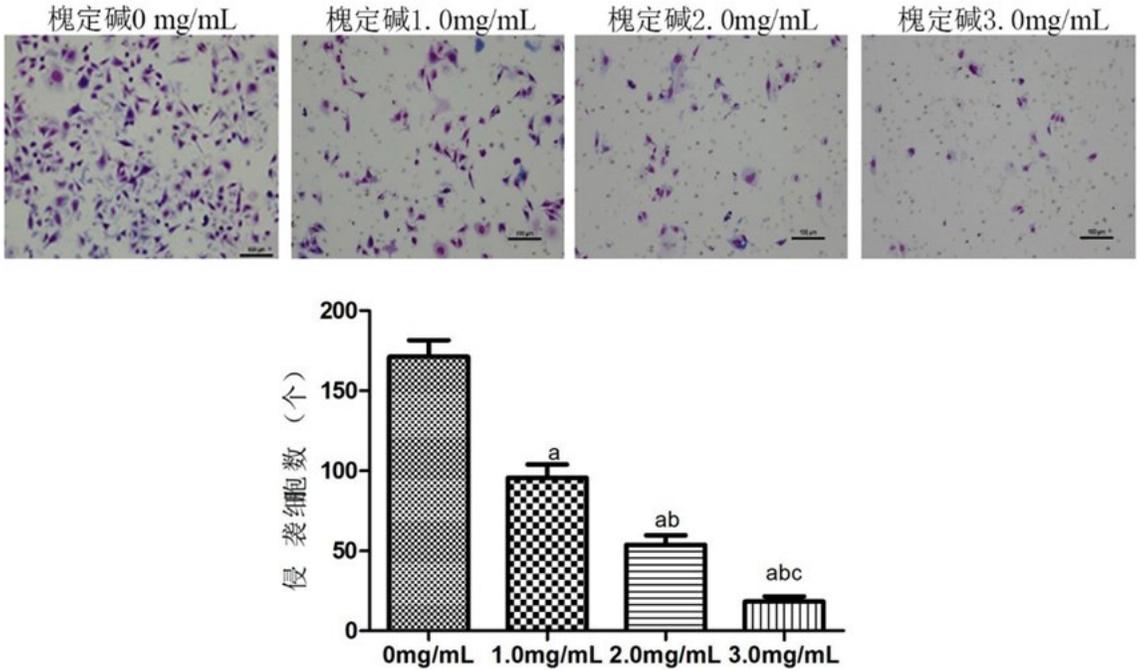


图2 Transwell 小室实验检测槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞侵袭能力的影响(100 $\times$ )  
与 0 mg/ml 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与 1.0 mg/ml 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与 2.0 mg/ml 组相比, c  $P < 0.05$

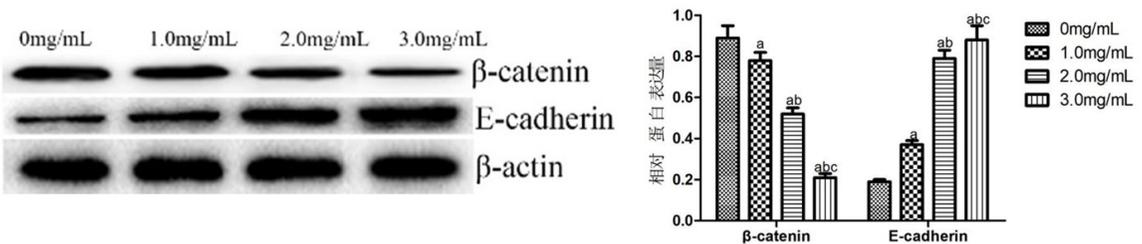


图3 免疫印迹法检测槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞  $\beta$ -catenin、E-cadherin 蛋白表达的影响  
与 0 mg/ml 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与 1.0 mg/ml 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与 2.0 mg/ml 组相比, c  $P < 0.05$

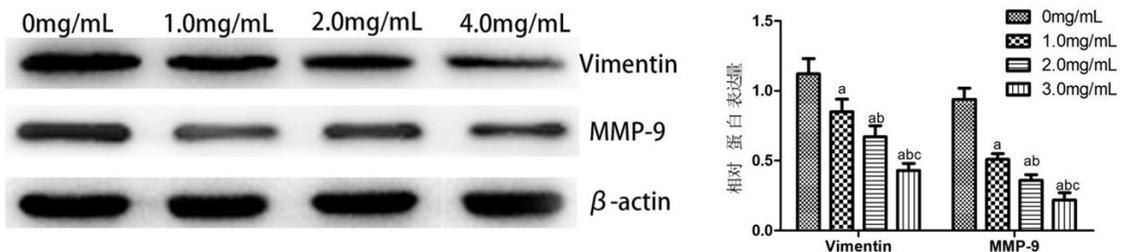


图4 免疫印迹法检测槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞 Vimentin、MMP-9 蛋白表达的影响  
与 0 mg/ml 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与 1.0 mg/ml 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与 2.0 mg/ml 组相比, c  $P < 0.05$

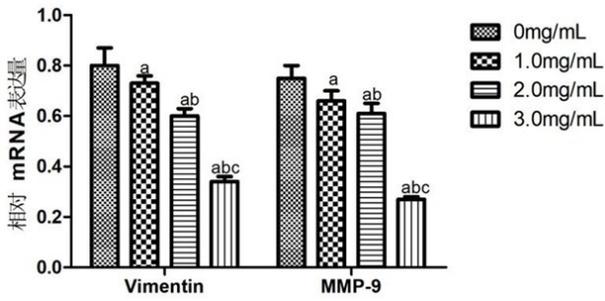


图 5 RT-PCR 检测槐定碱对人胶质瘤 U87 细胞 Vimentin、MMP-9mRNA 表达的影响

与 0 mg/ml 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与 1.0 mg/ml 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与 2.0 mg/ml 组相比, c  $P < 0.05$

受到影响<sup>[14]</sup>。

E-cadherin 是 Wnt 信号通路中一个重要的因子,其表达缺失是 EMT 过程的重要标志<sup>[9,10]</sup>。可以通过恢复 E-cadherin 的表达而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭活性<sup>[10,15]</sup>。本研究结果发现,槐定碱能有效促进细胞内 E-cadherin 的表达,我们推测槐定碱对人胶质瘤细胞迁移和侵袭的抑制,与抑制细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 活性,同时刺激 E-cadherin 表达而抑制 EMT 过程有关。在肿瘤细胞中,占主导地位的 E-cadherin 的表达降低能导致肿瘤细胞播散,同时能增加细胞内 Vimentin 的活性<sup>[9]</sup>。Vimentin 主要作用在于调节细胞收缩、黏附和迁移,是 EMT 途径另一重要的蛋白之一<sup>[9,10]</sup>。本研究发现,槐定碱在促进人胶质瘤细胞内 E-cadherin 表达的同时,能抑制 Vimentin 的活性,我们推测槐定碱可能通过刺激人胶质瘤细胞内 E-cadherin 表达,抑制 Vimentin 的活性,而阻断细胞内 EMT 过程,减弱细胞的迁移和侵袭能力。

MMP-9 为 Wnt 信号通路另一重要下游靶基因,为降解细胞外基质和基底膜的关键酶,也可以诱导 EMT 过程<sup>[16]</sup>。本研究发现,槐定碱能抑制 MMP-9 的表达,进一步说明槐定碱对人胶质瘤细胞迁移和侵袭能力的抑制作用与其对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活性的抑制作用密切相关。

综上所述,槐定碱能抑制人胶质瘤 U87 细胞的迁移和侵袭,机制可能是通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性,阻断 EMT 过程。

【参考文献】

[1] Schiffer D, Annovazzi L, Mellai M. A comprehensive view of tumor stem cells and their regulation by the microenvironment in glioblastoma [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(3): 527-529.

[2] Ottenhausen M, Krieg SM, Meyer B, et al. Functional pre-

operative and intraoperative mapping and monitoring: increasing safety and efficacy in glioma surgery [J]. *Neurosurg Focus*, 2015, 38(1): E3.

[3] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors [J]. *Cancer Treatment Rev*, 2018, 62: 50-60.

[4] 邵伟,赵玉红,李勤,等. Wnt 信号通路对脑胶质瘤凋亡的影响及其机制[J]. *中国地方病防治杂志*, 2017, 32(6):712-713.

[5] 李明潺,王玉丽,董林易. 槐定碱对肺癌 A549 细胞体外增殖和侵袭抑制作用及机制的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(13):1111-1116.

[7] 陈晓杰,高社干,齐义军,等. 槐定碱下调 FoxM1 在食管胃交界腺癌中的增殖、凋亡研究[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(20):1842-1847.

[8] Kaizhi L, Xuemei Z, Jingyong S, et al. Oldhamianoside II inhibits prostate cancer progression via regulation of EMT and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018 (6): 9457-9463.

[9] 孙坚皓,孙建广,黄世磊,等. 抑制组织蛋白酶 B 表达对骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2019, 54(2):267-271.

[10] Aruga N, Kijima H, Masuda R, et al. Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) is correlated with patient's prognosis of lung squamous cell carcinoma [J]. *Tokai J Exp Clin Med*, 2018, 43(1): 5-13.

[11] 陈亮,李青松. Wnt 信号通路在胶质瘤中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(2): 184-188.

[12] 赵树鹏,靳彩玲,高国军,等. 槐定碱对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭及相关信号通路的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(3):360-365.

[13] 王文鑫,陈少伟,廖圣芳,等. 槐定碱抑制人胶质瘤 U87MG 细胞株增殖及其作用机制研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2017, 16(3):207-211.

[14] 王忠.  $\beta$ -catenin 对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究[D]. 2017.

[15] 郝家涛,王帅,蒋伟. 小激活 RNA 上调上皮钙黏蛋白在恶性肿瘤中表达的分子机制及其生物学意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(1):109-115.

[16] 孟祥武,陈娟,黄森,等. VEGF 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对少突胶质前体细胞增殖迁移的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(6):40-45.