

基于Wnt/ β -catenin和AMPK信号通路探讨小槐花黄酮抑制结肠癌细胞增殖和转移作用

王雪玉¹, 张一楠¹, 温廷婕¹, 储百旺¹, 王冬², 刘璨^{1*}, 孙华¹

1. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2. 天津医科大学肿瘤医院 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060

摘要: 目的 研究小槐花 *Desmodium caudatum* 抑制肿瘤细胞增殖和转移的作用, 并探讨其对Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 和腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路的调控作用。方法 采用不同条件制备8种小槐花提取物, MTT法检测小槐花提取物1~8对HCT-116、SW480细胞增殖的影响; 结晶紫染色检测小槐花提取物2、3对结肠癌HCT-116、SW480细胞集落形成的影响; 划痕实验检测小槐花提取物2、3对HCT-116、SW480细胞迁移的影响; 从活性较高的提取物2中提取分离出5个黄酮类化合物 (1~5), MTT法检测化合物1~5对HCT-116、SW480、HepG2、RAW264.7、LX-2细胞增殖的影响; 结晶紫染色检测化合物1(8-异戊烯基槲皮素, 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对HCT-116和SW480细胞集落形成的影响, 划痕实验检测8-异戊烯基槲皮素对HCT-116和SW480细胞转移的影响。Western blotting实验检测8-异戊烯基槲皮素对HCT-116和SW480细胞中AMPK和Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达的影响; 荧光素酶报告基因检测实验观察8-异戊烯基槲皮素对 β -catenin与T细胞因子 (TCF) 结合能力的影响。结果 与对照组比较, 小槐花根茎提取物2和3以及8-异戊烯基槲皮素能显著抑制结肠癌细胞的增殖和迁移 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与对照组比较, 8-异戊烯基槲皮素能够显著上调p-AMPK蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 显著下调AMPK、乙酰辅酶A羧化酶 (ACC)、肉毒碱棕榈酰基转移酶1A (CPT-1A) 和脂肪酸合成酶 (FAS) 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明其能够促进癌细胞AMPK信号通路的激活。与对照组比较, 8-异戊烯基槲皮素显著下调 β -catenin以及其下游糖原合酶激酶3 β (GSK-3 β)、核内原癌基因 (c-Myc) 和G₁/S-特异性周期蛋白-D1 (Cyclin D1) 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 同时显著降低TCF报告基因结合位点 (野生型) 和荧光素酶开放阅读框TOPflash (pGL3-OT) 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但不影响FOPflash (含突变位点) 活性, 表明其抑制 β -catenin的表达和 β -catenin/TCF复合物的结合。结论 小槐花黄酮8-异戊烯基槲皮素通过调控Wnt/ β -catenin和AMPK信号通路抑制结肠癌细胞增殖和转移。

关键词: 小槐花; 黄酮; 8-异戊烯基槲皮素; 结肠癌; 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK); Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 07-1462-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.009

Study on effect of *Desmodium caudatum* flavones inhibiting proliferation and metastasis on colon cancer cells based on Wnt/ β -catenin and AMPK signaling pathways

WANG Xueyu¹, ZHANG Yinan¹, WEN Tingjie¹, CHU Baiwang¹, WANG Dong², LIU Can¹, SUN Hua¹

1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Clinical Research Center for Malignant Tumor, Tianjin 300060, China

Abstract: Objectives To investigate the mechanism of *Desmodium caudatum* in inhibiting the proliferation and metastasis of tumor cells and its regulation on Wnt/ β -catenin and AMPK signaling pathways. **Methods** Eight extracts of *D. caudatum* were prepared

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 江苏省双创团队项目 (JSSCTD202133); 天津市自然科学基金项目 (18JCYBJC94800)

第一作者: 王雪玉 (1996—), 硕士研究生, 从事药物活性评价。E-mail: xueyu82208906@163.com

*共同通信作者: 孙华, 博士, 教授, 主要从事新药发现与作用机制研究。E-mail: sunhua@tust.edu.cn

刘璨, 博士, 讲师, 主要从事新药发现与作用机制研究。E-mail: canliu@tust.edu.cn

under different conditions. MTT assay was used to detect the effect of extract 1—8 on the proliferation of HCT-116 and SW480 cells. Crystal violet staining was used to detect the effect of extract 2 and 3 on colony formation of colon cancer HCT-116 and SW480 cells. Effects of extract 2 and 3 on HCT-116 and SW480 cells migration detected by scratch test. Western blotting assay was used to detect the effect of 8-prenylquercetin on AMPK and Wnt/ β -catenin signaling pathway related protein expression in HCT-116 and SW480 cells. The effect of 8-prenylquercetin on the binding ability of β -catenin and T cell factor (TCF) by luciferase reporter gene test. **Results** Compared with control group, extracts 2 and 3 and 8-prenylquercetin significantly inhibited the proliferation and migration of colon cancer cells. Compared with control group, 8-prenylquercetin could significantly up-regulate the expression of p-AMPK protein ($P < 0.05$ and 0.001) and down-regulate the expression of AMPK, ACC, p-ACC, CPT-1A and FAS proteins ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001), indicating that it could promote the activation of AMPK signaling pathway in cancer cells. In addition, compared with control group, 8-prenylquercetin downregulated the expression of β -catenin and its downstream proteins p-GSK 3 β , c-Myc and Cyclin D1 ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). Compared with control group, 8-prenylquercetin significantly reduced TOPflash activity in a concentration dependent manner, but not FOPflash activity, indicating that it inhibited β -catenin expression and β -catenin/TCF complex binding. **Conclusion** 8-prenylquercetin a flavonoid from *D. caudatum*, inhibits the proliferation and metastasis of tumor cells by regulating Wnt/ β -catenin and AMPK signaling pathways.

Key words: *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.; flavones; 8-prenylquercetin; colon cancer; AMPK; Wnt/ β -catenin

癌症是危害人类的重大公共卫生问题,其发病率和死亡率逐年攀升。结肠癌是全球癌症死亡的第4大原因,是多种遗传和表观遗传修饰累积导致结肠上皮细胞向浸润性腺癌转化的结果^[1]。近年来,癌症研究在了解肿瘤转移过程中的分子机制以及开发靶向和个性化治疗方面取得了实质性的成果^[2]。异常的Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路能够促进癌症干细胞的更新、细胞增殖和分化^[3]。当存在Wnt配体时,Wnt受体结合Axin,而 β -catenin不结合Axin,也就不会接触糖原合酶激酶3(GSK-3)以及腺瘤性结肠息肉病(APC)基因,游离的 β -catenin入核与T细胞因子(TCF)结合成 β -catenin/TCF复合体,启动下游基因[核内原癌基因(*c-Myc*)、*G₁/S*-特异性周期蛋白-D1(*Cyclin D1*)等]转录,导致癌症的发生。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路是一种能量传感器和调节器,通过调节能量代谢来影响癌细胞的增殖、凋亡、迁移和自噬^[4]。乙酰辅酶A羧化酶(ACC)是AMPK下游的重要信号分子,调节脂质合成和脂肪酸氧化^[5]。AMPK的激活抑制了ACC的活性和丙二酰辅酶A的产生,同时增加肉毒碱棕榈酰基转移酶1A(CPT-1A)的表达^[6-7]。据报道,AMPK激活剂二甲双胍可通过激活AMPK信号通路来抑制结肠癌上皮细胞增殖^[8]。此外,阿卡地新(AICAR)和苯乙双胍可通过促进AMPK磷酸化和ACC磷酸化来抑制黑色素瘤细胞的生长^[9]。

小槐花是一种小型豆科植物,广泛生长在中国、日本、韩国和印度^[10-12]。在中国,小槐花作为一种传统的中药材,广泛生长于安徽、浙江等省的

谷、草地中。小槐花常以根或全株用药,用于治疗风湿性背痛、腹泻、黄疸肝炎和脓肿,也可用作驱虫剂。在日本,它可以用来防止味噌变质。有研究发现小槐花提取物中含有大量的黄酮类物质,而黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、改善糖脂代谢等活性。本课题组前期研究发现小槐花提取物具有降血糖和调血脂双重活性,后又从小槐花提取物中提取分离出了黄酮类化合物,发现黄酮类化合物也具有降血糖和调血脂双重活性^[13]。研究报道小槐花中的活性成分还具有抗肿瘤活性。朱丹^[14]发现小槐花中的不同组分分别对肝癌细胞HepG2、乳腺癌细胞MCF-7以及宫颈癌细胞HeLa的生长有抑制作用。另外,也有文献报道小槐花总黄酮可以抑制HeLa细胞的增殖^[15],但迄今为止,对小槐花在结肠癌中抗肿瘤作用的分子机制研究较少。本研究旨在研究小槐花提取物和提取物中黄酮类化合物抑制结肠癌增殖和转移的作用,并基于Wnt/ β -catenin和AMPK信号通路探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药材

小槐花于2019年12月购自中国广西壮族自治区河池市,经中国医学科学院协和药物研究所马林教授鉴定为豆科山蚂蝗属植物小槐花 *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC., 样品编号(ID-S-2960),存放在中国医学科学院协和药物研究所植物标本室。

1.2 细胞

人结肠癌细胞(HCT-116、SW480)、人肝癌细胞(HepG2)、小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)、人肝星状细胞(LX-2)、人肾上皮细

胞(293T)均来源于国家实验室细胞资源共享服务平台(北京)。

1.3 主要试剂

AICAR(北京索莱宝科技有限公司,批号IA1503,质量分数 $\geq 98\%$);胎牛血清(北京民海生物科技有限公司);1%青霉素-链霉素溶液(美国Hyclone公司);IMDM(美国Gibco公司);DMEM(美国Gibco公司);喜树碱(上海毕得医药,批号BD38860,质量分数98%);结晶紫(美国西格玛奥德里奇公司); β -catenin抗体、c-Myc抗体、Cyclin D1抗体、GSK-3 β 抗体、p-GSK-3 β 抗体、AMPK抗体、p-AMPK抗体、ACC抗体、CPT-1A抗体、 α -微管蛋白(α -Tubulin)抗体、脂肪酸合成酶(FAS)抗体(美国CST公司);山羊抗小鼠IgG或山羊抗兔IgG(南京建成生物工程研究所);ECL超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司);Lipo 2000转染试剂(美国英杰生命技术有限公司);萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海百泰生物科技有限公司)。

1.4 主要仪器

MULTISKAN MK3酶标仪、3111二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技有限公司);Ci-L光学显微镜(尼康光学仪器中国有限公司);DYY-11蛋白电泳仪、DYCP-40E转膜仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 小槐花提取物的制备

根据本课题组前期研究^[13],将小槐花的根茎、叶分别磨成粉末,用甲醇或乙醇在室温提取72 h或回流条件下提取3 h。用10倍溶剂提取,共提取2次。将提取液真空浓缩得到提取物1~8(具体见表1)。所有的提取物在使用前均在室温下存放于干燥器中。

2.2 细胞培养

HCT-116和SW480细胞培养于添加10%胎牛

血清和1%青霉素-链霉素溶液的IMDM中。HepG2和LX-2细胞培养于添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的含葡萄糖1 g·L⁻¹的DMEM中。RAW264.7和293T细胞培养于添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的含葡萄糖4.5 g·L⁻¹的DMEM中。细胞在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

2.3 小槐花提取物对肿瘤细胞增殖和转移的作用研究

2.3.1 MTT法检测小槐花提取物1~8抑制肿瘤细胞增殖^[16] 将HCT-116、SW480细胞以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种于96孔板,培养24 h。分别加入0.02、0.20、2.00、20.00、200.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提取物1~8及喜树碱培养48 h。孵育后,每孔加20 μL 质量浓度为5 mg·mL⁻¹的MTT,37℃培养4 h。弃去培养基,将蓝紫色结晶甲瓟溶于100 μL DMSO中,37℃培养10 min。用MULTISKAN MK3酶标仪在492和630 nm处测量吸光度(A)值,计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3.2 集落形成抑制实验^[17] 将300~500个HCT-116细胞接种到6孔板中,37℃培养24 h。分别加入提取物2、3(10、20、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)继续培养7~10 d,对照组不加药,观察到集落后,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞2次,甲醇固定20 min。除去甲醇,用结晶紫染色5 min,拍照、显微镜下计数。

2.3.3 划痕实验^[18] 将HCT-116细胞以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种于12孔板中,37℃培养24 h,待细胞生长至80%左右时,在每孔中心画2个无细胞交叉划痕区。用PBS冲洗细胞3次,置于含1%胎牛血清的IMDM培养基继续培养。加入提取物2、3(20、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),对照组不加药,分别于给药0、12、24、48 h后在倒置显微镜下拍照。

2.4 小槐花提取物中黄酮类化合物的分离纯化

根据本课题组前期研究^[13],将较高活性且提取率高的槐花根茎提取物2先用大孔树脂经不同浓度的乙醇和水进行梯度洗脱,得到不同组分。再用硅胶柱色谱进行梯度洗脱,流动相为醋酸乙酯/石油醚=1:9~9:1(体积比),再重结晶得到5种黄酮类化合物,分别为8-异戊烯基槲皮素(1)、槲皮素(2)、8-异戊烯基柚皮素(3)、柚皮素(4)和芹菜素(5)。

2.5 黄酮类化合物对肿瘤细胞增殖和转移的作用研究

将HCT-116、SW480、HepG2、RAW264.7和LX-2细胞以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种于96孔板,

表1 小槐花提取物1~8

Table 1 Extracts 1—8 of *Desmodium caudatum*

编号	部位	溶剂	提取条件
1	根、茎	甲醇	回流
2	根、茎	甲醇	室温
3	根、茎	乙醇	室温
4	根、茎	乙醇	回流
5	叶	乙醇	室温
6	叶	乙醇	回流
7	叶	甲醇	室温
8	叶	甲醇	回流

MTT法检测化合物1~5(0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞增殖的影响,方法同“2.3.1”项;结晶紫染色检测化合物1(8-异戊烯基槲皮素,0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HCT-116和SW480细胞集落形成的抑制作用,方法同“2.3.2”项;划痕实验检测8-异戊烯基槲皮素(1、2、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HCT-116和SW480细胞转移的抑制作用,方法同“2.3.3”项。

2.6 蛋白表达的检测

将HCT-116和SW480细胞以 $5\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度接种到培养皿中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养24 h。分别加入8-异戊烯基槲皮素(0、5、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与阳性对照AICAR(250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或槲皮素(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)静置培养48 h,对照组不加药。弃去原培养基,用胰蛋白酶消化后,2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min。加入裂解液,于冰上裂解60 min,随即 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,收集上清液,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用快速蛋白测定染料一步测定蛋白浓度。用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离等量的蛋白,并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,转膜2 h。将PVDF膜放入含有5%脱脂牛奶的PBST(含0.5%聚山梨酯-20的PBS)中室温封闭1 h。用PBST洗涤后,分别在1:1 000稀释的 β -catenin抗体、c-Myc抗体、Cyclin D1抗体、GSK-3 β 抗体、p-GSK-3 β 抗体、AMPK抗体、p-AMPK抗体、ACC抗体、CPT-1A抗体、 α -Tubulin抗体、FAS抗体中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用PBST洗涤3次后,放入1:5 000稀释的山羊抗小鼠IgG或山羊抗兔IgG室温孵育2 h。使用ECL超敏发光液在凝胶成像系统中检测蛋白表达情况,并用Image J软件分析结果^[16]。

2.7 荧光素酶报告基因实验

293T细胞($1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$)接种于6孔板中,当细胞生长到70%左右时,用3.2 μg 荧光素酶报告质粒(TOP/FOP flash)和3.2 μL Lipo 2000转染试剂转染细胞6 h。质粒转染后,更换新鲜培养基,加入8-异戊烯基槲皮素(0、5、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)继续培养48 h。采用萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒进行荧光素酶报告基因检测^[19-20]。

2.8 统计分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 23.0软件,通过方差齐性和最小显著性差异(LSD)多重比较确定显著性差异,组间比较采用 T 检验、单因素方差分析(ANOVA)。

3 结果

3.1 小槐花提取物1~8抑制癌细胞增殖

如表2所示,用甲醇在室温下提取的小槐花根茎提取物2和用乙醇在室温下提取的小槐花根茎提取物3对HCT-116和SW480细胞的增殖抑制活性最好。

表2 提取物1~8对HCT-116和SW480细胞增殖的抑制作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Inhibition of extracts 1—8 on proliferation of HCT-116 and SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	HCT-116	SW480
提取物1	81.71 $\pm$ 8.93	161.72 $\pm$ 6.80
提取物2	67.51 $\pm$ 8.46	139.35 $\pm$ 2.73
提取物3	43.90 $\pm$ 7.50	112.19 $\pm$ 4.04
提取物4	112.61 $\pm$ 2.08	156.37 $\pm$ 11.00
提取物5	>200	160.36 $\pm$ 16.31
提取物6	>200	>200
提取物7	>200	>200
提取物8	>200	>200
喜树碱	0.02 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03

3.2 小槐花提取物抑制癌细胞集落形成

如图1所示,提取物2和3在质量浓度10~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均能显著抑制HCT-116细胞集落的形成($P<0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明,小槐花提取物2、3除了抑制细胞增殖外,还能抑制集落的形成,从而降低结肠癌细胞的存活能力。

3.3 小槐花提取物抑制癌细胞迁移

为了进一步评价提取物是否抑制癌细胞的迁移和侵袭,采用体外划痕实验对其进行了评价。如图2所示,提取物2和3在20~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能显著抑制HCT-116细胞12、24、48 h时迁移率($P<0.01$ 、0.001)。结果表明,提取物2和3能显著抑制HCT-116细胞的迁移,且呈浓度和时间相关性。

3.4 黄酮类化合物抑制癌细胞增殖

如表3所示,除柚皮素(4)外,其余4种黄酮类化合物对肿瘤细胞增殖均有抑制活性。从结构特点上分析,异戊烯基黄酮类化合物(1和3)比其对应的母核结构(2和4)具有更强的抑制活性。其中,8-异戊烯基槲皮素(1)抑制活性最好。除结肠癌细胞外,8-异戊烯基槲皮素也能抑制RAW264.7的增殖,但对HepG2和LX-2的抑制活性较低,说明8-异戊烯基槲皮素对不同肿瘤细胞具有一定选择性。

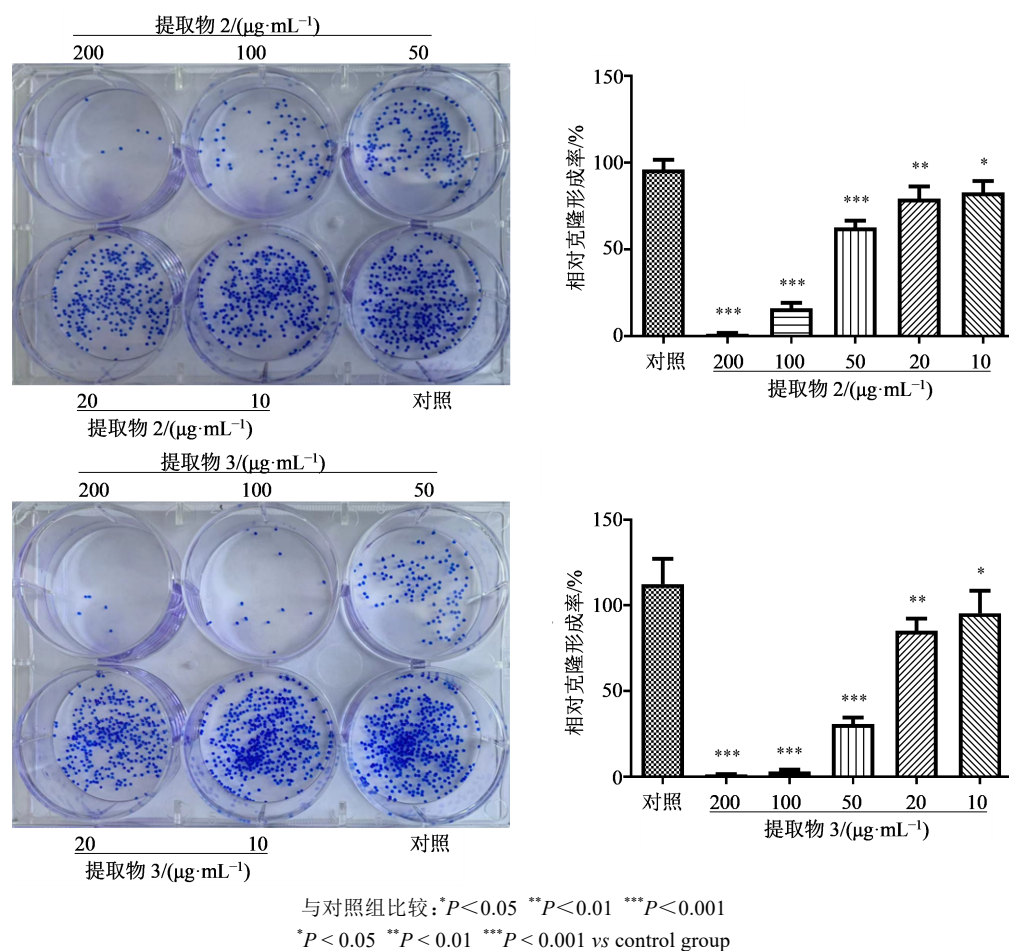


图1 小槐花提取物2和3对HCT-116细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of *Desmodium caudatum* extracts 2 and 3 on colony formation of HCT-116 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

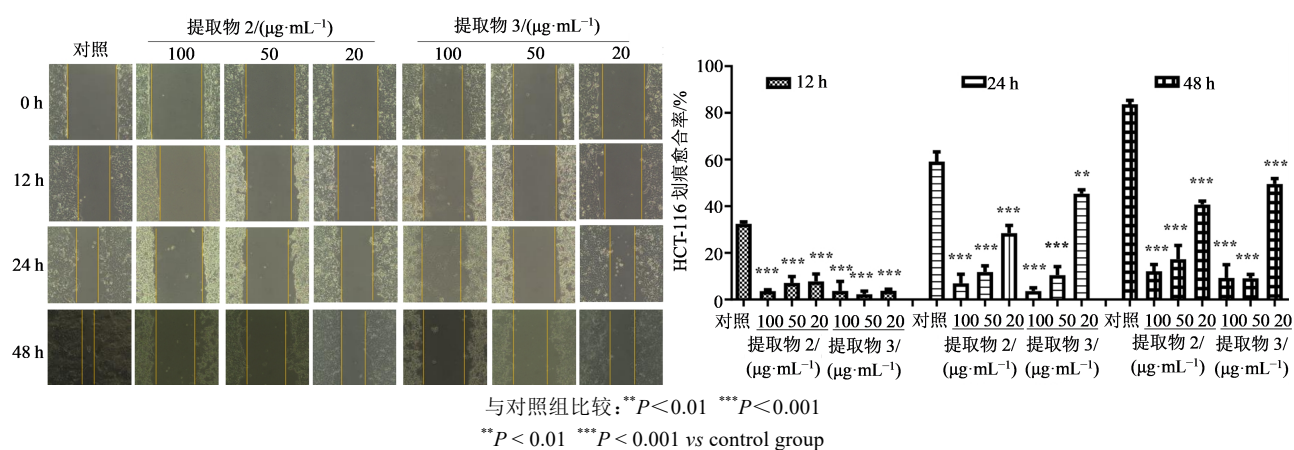


图2 不同浓度提取物2和3对HCT-116细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of extracts 2 and 3 on HCT-116 cell migration by scratch assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 黄酮类化合物抑制癌细胞集落形成

为了验证提取物8-异戊烯基槲皮素(1)的增殖抑制活性,进一步对集落形成抑制活性进行了评价。如图3所示,8-异戊烯基槲皮素各浓度能够显著抑制HCT-116细胞集落形成($P < 0.01, 0.001$),

1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-异戊烯基槲皮素显著抑制SW480细胞集落的形成($P < 0.01, 0.001$)。结果表明,8-异戊烯基槲皮素除了抑制细胞增殖外,还能抑制集落的形成,从而降低结肠癌细胞的存活能力。

表3 黄酮类化合物1~5的抗肿瘤增殖活性
Table 3 Anti-tumor proliferative activity of flavonoids 1—5

组别	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	HCT-116	SW480	HepG2	RAW 264.7	LX-2
1	3.13±0.31	6.44±0.59	25.31±0.19	3.91±1.10	28.40±7.70
2	26.47±5.36	37.56±6.70	>100	12.34±2.24	>100
3	37.95±1.33	22.86±0.89	40.64±1.32	29.68±6.25	41.39±3.76
4	>100	>100	>100	>100	>100
5	30.74±2.44	58.75±6.20	33.38±2.29	31.51±0.45	77.45±9.36
喜树碱	0.06±0.02	0.16±0.03	0.03±0.00	0.03±0.00	0.07±0.02

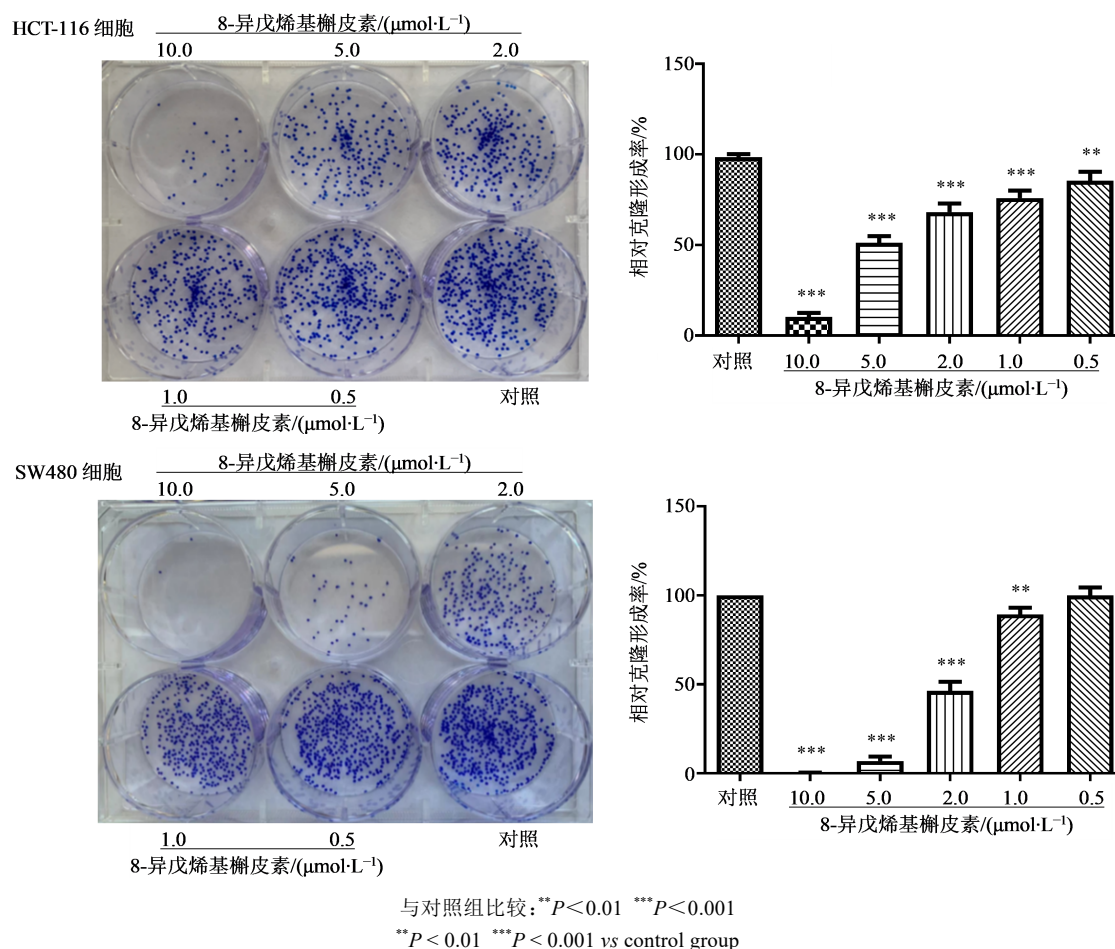


图3 8-异戊烯基槲皮素对HCT-116和SW480细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Effects of 8-prenylquercetin on colony formation of HCT-116 and SW480 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 黄酮类化合物抑制癌细胞迁移

如图4所示,在12、24和48 h对照组细胞向划痕处明显迁移。与对照组比较,经1~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的8-异戊烯基槲皮素处理的SW480细胞在24、48 h细胞迁移率显著降低($P < 0.01$ 、0.001)。除1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用48 h外,用8-异戊烯基槲皮素处理的HCT-116细胞与对照组比较显示了对细胞迁移的显著抑制作用($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.7 8-异戊烯基槲皮素激活HCT-116细胞的AMPK信号通路

如图5所示,在HCT-116细胞中,与对照组比较,用20、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的8-异戊烯基槲皮素处理后,p-AMPK蛋白表达显著提高($P < 0.001$),AMPK、CPT-1A、ACC和FAS蛋白表达显著降低($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。ACC和CPT-1A是AMPK下游的2个重要信号分子,与FAS一起调节脂肪酸的氧化与合成,脂肪酸作为癌细胞的能量来源之一,促进某些恶性

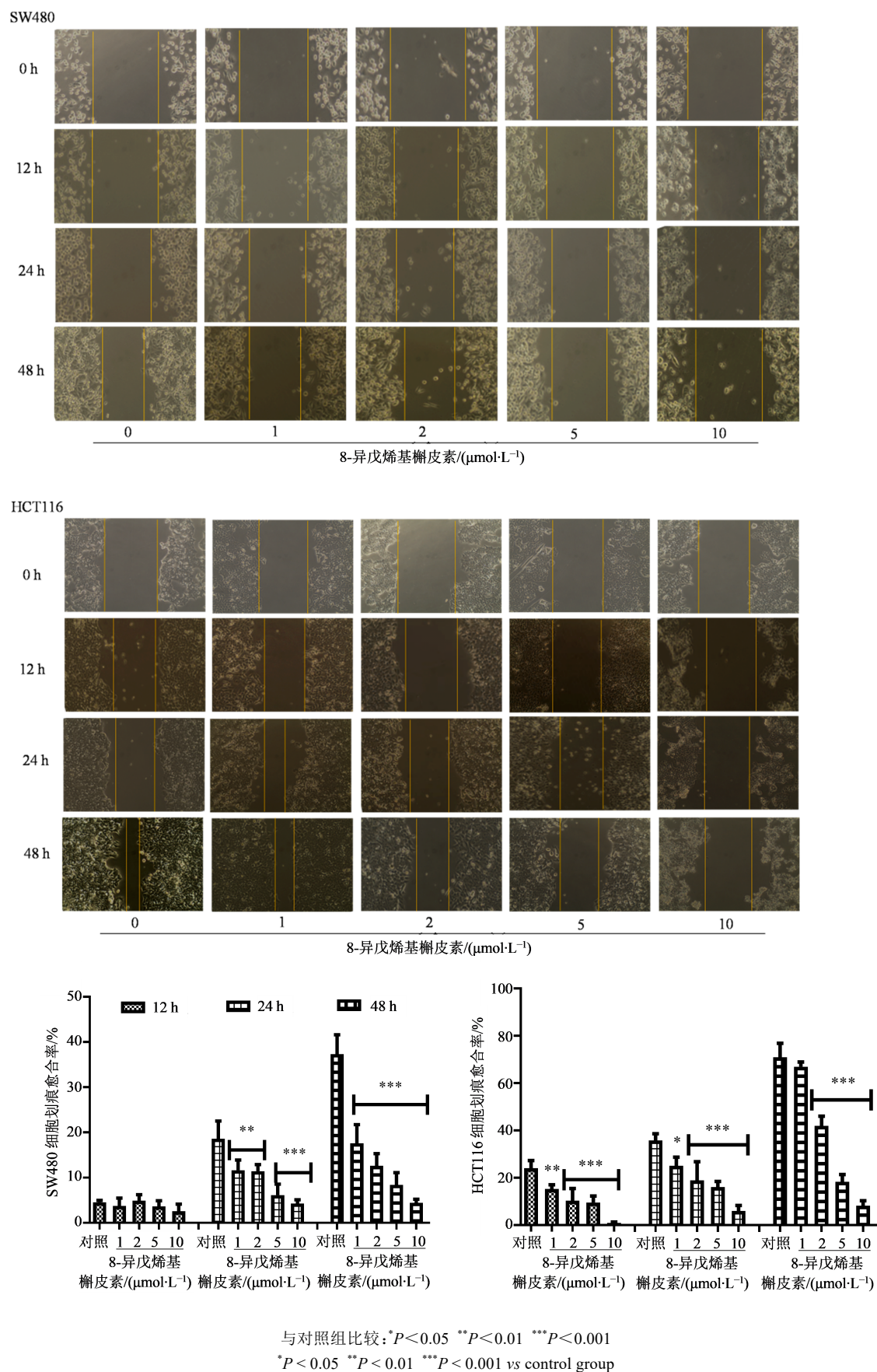


图4 不同浓度的8-异戊烯基槲皮素对细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of different concentrations of 8-prenylquercetin on cell migration by scratch assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

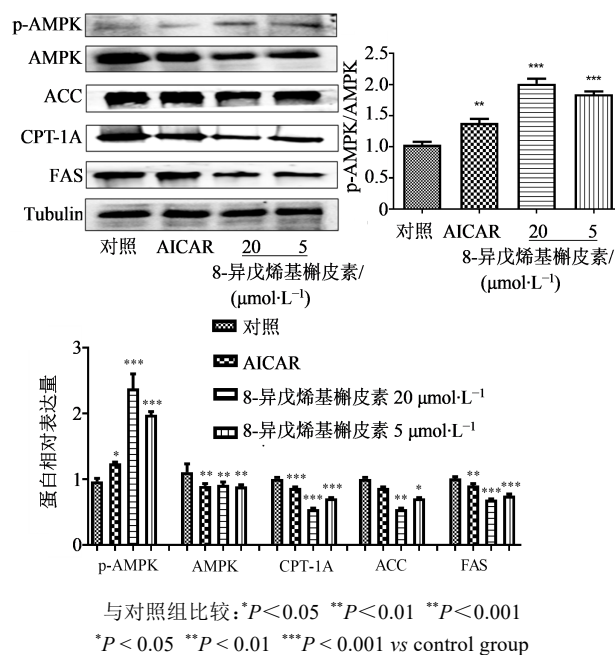


图5 8-异戊烯基槲皮素激活HCT-116细胞的AMPK信号通路($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 8-Prenylquercetin activates AMPK signaling pathway of HCT-116 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

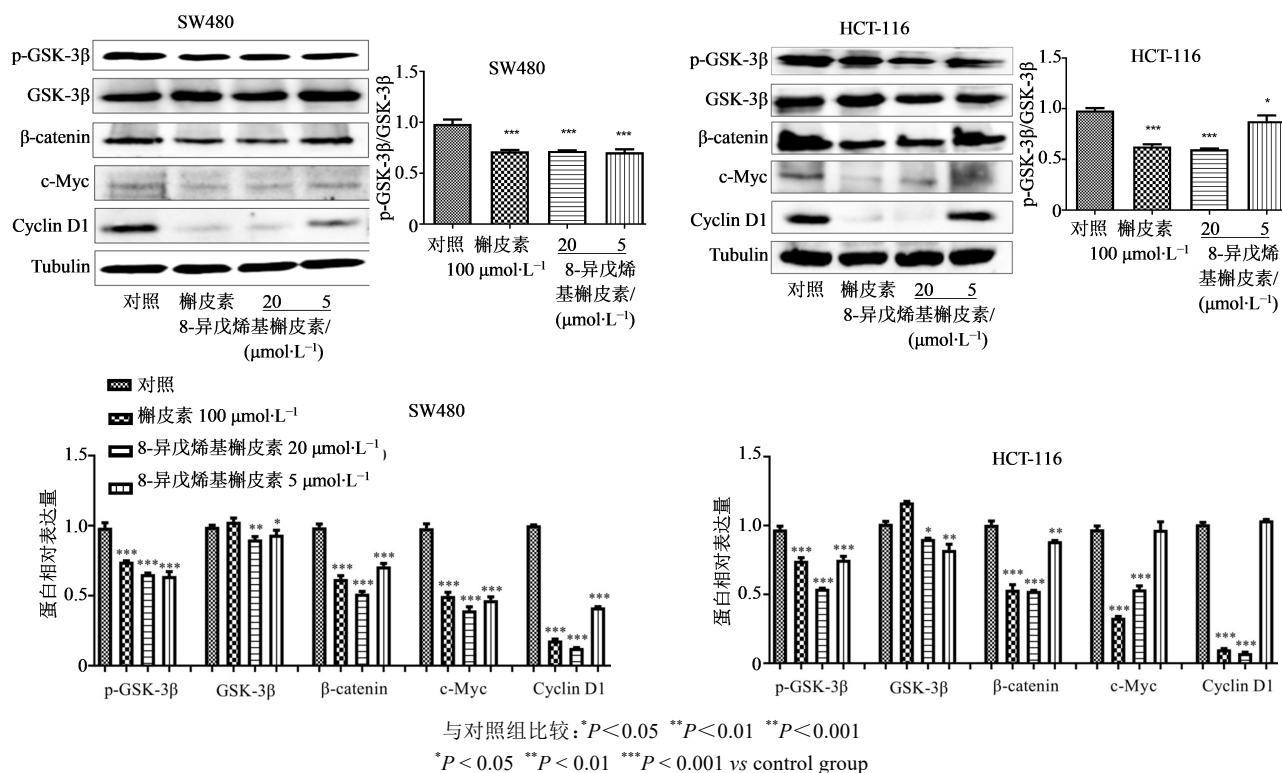


图6 Western blotting法分析8-异戊烯基槲皮素抑制Wnt/β-catenin信号通路($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 8-Prenylquercetin inhibits Wnt/β-catenin signaling pathway via Western blotting ($\bar{x} \pm s, n=3$)

白的表达,与文献报道一致。

为了进一步验证上述结论,进行了荧光素酶报告基因检测实验,探究化合物抑制β-catenin与TCF

肿瘤的发展^[21]。结果表明,8-异戊烯基槲皮素能够促进结肠癌细胞AMPK信号通路的激活。

3.8 8-异戊烯基槲皮素对Wnt/β-catenin通路的影响

如图6所示,与对照组比较,在20、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,8-异戊烯基槲皮素显著下调SW480和HCT-116细胞中的β-catenin、p-GSK-3β/GSK-3β蛋白表达量($P < 0.05, 0.001$);20、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-异戊烯基槲皮素能显著抑制SW480细胞β-catenin下游c-Myc和Cyclin D1蛋白水平($P < 0.001$),并呈浓度相关性;20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-异戊烯基槲皮素显著抑制SW480细胞c-Myc和Cyclin D1蛋白水平($P < 0.001$)。结果表明8-异戊烯基槲皮素通过抑制β-catenin和p-GSK-3β蛋白表达,来抑制Wnt/β-catenin信号通路,从而减少c-Myc和Cyclin D1蛋白水平。有文献报道槲皮素(2)参与调控Wnt/β-catenin信号通路的活性^[22],因此从小槐花中提取的另一个组分槲皮素作为阳性对照^[22],结果发现100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槲皮素明显影响了Wnt/β-catenin信号通路相关蛋

结合能力。其中,TCF报告基因包含2组三拷贝的结合位点(野生型)和荧光素酶开放阅读框TOPflash(pGL3-OT);FOPflash(pGL3-OF)含有突

变的TCF结合位点,因此被用作阴性对照^[18]。结果显示(图7),8-异戊烯基槲皮素显著降低了TOPflash活性,且呈浓度相关性($IC_{50}=2.39\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),而对FOPflash活性无影响,证明化合物抑制了 β -catenin与TCF的结合。

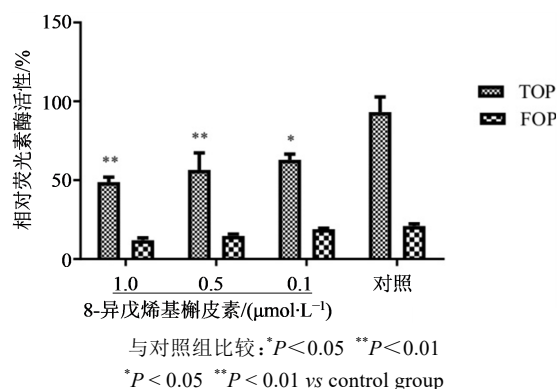


图7 荧光素酶报告基因方法分析8-异戊烯基槲皮素抑制 β -catenin与TCF结合($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 7 Analysis of inhibition of 8-prenylquercetin on combination of β -catenin and TCF by luciferase reporter gene method ($\bar{x}\pm s, n=3$)

4 讨论

传统中药作为肿瘤治疗的重要手段,具有毒性低和多维度治疗的优势,从中药中发现先导化合物也是药物研发的重要途径。本研究从提取物和活性单体两方面分析了中药小槐花抑制肿瘤细胞的活性与作用机制。据报道,8-异戊烯基槲皮素具有抑制增殖和增加HT-29细胞中caspase活性的作用^[23],但其在其他肿瘤细胞中的生物学活性和分子机制尚不清楚。在本研究中发现小槐花根茎提取物2和3对肿瘤细胞增殖、迁移和集落形成具有抑制作用;8-异戊烯基槲皮素选择性抑制HCT-116、SW480和RAW264.7细胞的增殖,但对HepG2和LX-2细胞的毒性较低,同时还能抑制结肠癌细胞的迁移和集落形成。

异常激活的Wnt/ β -catenin信号通路与肿瘤发展和转移密切相关,能量传感器AMPK作为癌症潜在的治疗靶点也引起了广泛的关注,但到目前为止同时作用于两条通路上的研究鲜有报道。本研究发现小槐花中黄酮成分对人结肠癌细胞的Wnt和AMPK信号通路具有双重调节作用。8-异戊烯基槲皮素能够显著上调p-AMPK蛋白表达,而AMPK以及其下游的ACC、p-ACC、CPT-1A和FAS表达显著下调,说明8-异戊烯基槲皮素促进了癌细胞AMPK信号通路的激活。8-异戊烯基槲皮素与槲皮素相比,前者对 β -catenin、p-GSK-3 β 、c-Myc和Cyclin D1

蛋白水平的下调作用更明显,同时抑制了 β -catenin与TCF的结合,表明其抑制了Wnt/ β -catenin信号通路。结果表明,8-异戊烯基槲皮素通过调控AMPK通路和Wnt/ β -catenin通路进而抑制肿瘤细胞的增殖和迁移。此外,由于小槐花中的活性成分复杂,因此8-异戊烯基槲皮素在小槐花中的含量及其抗肿瘤活性的关系仍有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tripathi S, Belkacemi L, Cheung M S, et al. Correlation between gene variants, signaling pathways, and efficacy of chemotherapy drugs against colon cancers [J]. Cancer Inform, 2016, 15: 1-13.
- [2] Occhiuzzi M A, Lico G, Ioele G, et al. Recent advances in PI3K/PKB/mTOR inhibitors as new anticancer agents [J]. Eur J Med Chem, 2023, 246: 114971.
- [3] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 165.
- [4] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 31-37.
- [5] Hardie D G, Pan D A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase [J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(Pt 6): 1064-1070.
- [6] Zhang M D, Wang Z X, Hao S Y, et al. Synthesis of natural 3'-Prenylchalconaringenin and biological evaluation of ameliorating non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome [J]. Eur J Med Chem, 2020, 205: 112649.
- [7] He Y F, Mai C T, Pan H D, et al. Targeting immunometabolism by active ingredients derived from traditional Chinese medicines for treatment of rheumatoid arthritis [J]. Chin Herb Med, 2021, 13(4): 451-460.
- [8] Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(7): 662-671.
- [9] Petti C, Vegetti C, Molla A, et al. AMPK activators inhibit the proliferation of human melanomas bearing the activated MAPK pathway [J]. Melanoma Res, 2012, 22(5): 341-350.
- [10] Li W, Sun Y N, Yan X T, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from Desmodium caudatum leaves and stems [J]. Arch Pharm Res, 2014, 37(6): 721-727.
- [11] Sasaki H, Shibata H, Imabayashi K, et al. Prenylated flavonoids from the stems and leaves of Desmodium

- caudatum and evaluation of their inhibitory activity against the film-forming growth of *Zygosaccharomyces rouxii* F51 [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(27): 6345-6353.
- [12] Sasaki H, Kashiwada Y, Shibata H, et al. Prenylated flavonoids from the roots of *Desmodium caudatum* and evaluation of their antifungal activity [J]. *Planta Med*, 2012, 78(17): 1851-1856.
- [13] Zhang Y N, Zhang X T, Xiao Z Y, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic dual activities of extracts and flavonoids from *Desmodium caudatum* and an efficient synthesis of the most potent 8-prenylquercetin [J]. *Fitoterapia*, 2022, 156: 105083.
- [14] 朱丹. 小槐花大极性部位抗肿瘤活性物质研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- Zhu D. Study on anti-tumor active substances in the polar parts of *Sophora japonica* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2014.
- [15] Xu Q N, Zhu D, Wang G H, et al. Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35 (22): 4534-4541.
- [16] Qin Y G, Lu H. *In vitro* evaluation of anti-hepatoma activity of brevilin A: Involvement of Stat3/Snail and Wnt/ β -catenin pathways [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(8): 4390-4396.
- [17] Xiong Y P, Zhou L, Su Z J, et al. Longdaysin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exhibits antitumor activity against breast cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 993-1005.
- [18] Kim W K, Byun W S, Chung H J, et al. Esculetin suppresses tumor growth and metastasis by targeting Axin2/E-cadherin axis in colorectal cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 152: 71-83.
- [19] Or C R, Huang C W, Chang C C, et al. Obatoclax, a pan-BCL-2 inhibitor, downregulates survivin to induce apoptosis in human colorectal carcinoma cells via suppressing WNT/ β -catenin signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1773.
- [20] Xu X Y, Li J Y, Sun X, et al. Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26161-26176.
- [21] Wang C, Ma J, Zhang N, et al. The acetyl-CoA carboxylase enzyme: A target for cancer therapy ? [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(6): 667-676.
- [22] Amado N G, Predes D, Moreno M M, et al. Flavonoids and Wnt/ β -catenin signaling: Potential role in colorectal cancer therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 12094-12106.
- [23] Daskiewicz J B, Depeint F, Viornery L, et al. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: An SAR study [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(8): 2790-2804.

[责任编辑 兰新新]