

宝藿苣-I 对人食管癌细胞 Eca-109 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的影响

刘晓霞¹, 张永泽¹, 李振红³, 李菊梅⁴, 陈剑华¹, 单保恩^{2*}

1. 河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056029

2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011

3. 河北邯郸魏县医院, 河北 邯郸 056800

4. 河北工程大学临床医学院, 河北 邯郸 056029

摘要:目的 研究香加皮中提取的宝藿苣-I 对人食管癌细胞 Eca-109 的抑制作用及其对 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的影响。方法 RT-PCR 技术检测不同质量浓度宝藿苣-I 作用 48 h 后, 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达的变化, 采用流式细胞术分析 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白的表达。结果 宝藿苣-I (25、50 μ g/mL) 作用 48 h 后, Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 及蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.01$), 12.5 μ g/mL 处理组细胞的 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 及其蛋白表达水平与对照组相比无显著差异。结论 宝藿苣-I 可能通过下调 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 及其蛋白表达, 影响 Wnt/ β -catenin 信号转导通路, 发挥抑制 Eca-109 细胞增殖作用。

关键词: 香加皮; 宝藿苣-I; 食管癌; Wnt/ β -catenin 信号转导通路; Eca-109 细胞

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0124-03

Effect of baohuoside-I on Wnt/ β -catenin signaling pathway of human esophageal carcinoma cell Eca-109

LIU Xiao-xia¹, ZHANG Yong-ze¹, LI Zhen-hong³, LI Ju-mei⁴, CHEN Jian-hua¹, SHAN Bao-en²

1. Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056029, China

2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

3. Hospital of Wei County, Handan 056800, China

4. Clinical Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056029, China

Abstract: Objective To study the effect of baohuoside-I extracted from *Periplocae Cortex* on proliferation and Wnt/ β -catenin signaling pathway of human esophageal carcinoma cell Eca-109. **Methods** The expressions of β -catenin, Cyclin D1, and Survivin protein in Eca-109 cells were measured with flow cytometry (FCM). The expressions of β -catenin, Cyclin D1, and Survivin mRNA were detected by RT-PCR. **Results** After treatment with 25 and 50 μ g/mL of baohuoside-I for 48 h, the expression levels of β -catenin, Cyclin D1, Survivin mRNA, and protein were decreased significantly ($P < 0.01$), but with 12.5 μ g/mL of baohuoside-I the expression level was not decreased significantly compared with the control group. **Conclusion** Baohuoside-I from *Periplocae Cortex* could inhibit the proliferation of Eca-109 cells. This effect associates with down-regulation expression of β -catenin, Cyclin D1, Survivin, and their proteins, which affects on the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: *Periplocae Cortex*; baohuoside-I; esophageal carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Eca-109 cell

香加皮为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 的干燥根皮, 可用于治疗风寒湿痹、腰膝酸软等症。本课题组对香加皮水提物及其杠柳苷成分的抗肿瘤活性已有研究^[1-3], 也发现香加皮正丁醇相提取物中的宝藿苣-I 可抑制人食管癌 Eca-109 细胞增殖, 使细胞周期阻滞^[4]。为进一步探讨宝藿苣-I 抑制 Eca-109 增殖机制, 本实验研究宝藿苣-I 对 Eca-109 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的影响。

Wnt/ β -catenin 信号转导通路是细胞发育和生长调节的关键途径。研究发现^[5-8], 许多人类肿瘤中存在 Wnt/ β -catenin 信号转导通路异常。一些抗癌药物可从不同水平阻断 Wnt/ β -catenin 信号转导通路而发挥疗效。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的中枢成分, Cyclin D1 和 Survivin 为下游基因, 故本研究探讨宝藿苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 及蛋白表达的影响。

收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772752)

作者简介: 刘晓霞 (1976—), 女, 河北省永年县人, 讲师, 硕士, 研究方向为肿瘤免疫学。Tel: (0310)3115952 E-mail: givesunny@163.com

*通讯作者 单保恩 E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

宝藿苣-I 由华北制药集团新药研究开发中心提取 (质量分数 >96%), DMSO 溶解, RPMI 1640 培养基稀释 (DMSO 终体积分数 <0.1%)。RPMI 1640、Trizol 及 RT-PCR 酶混合物为美国 Gibco 公司产品。兔抗人 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 单克隆抗体为美国 Sigma 公司产品, 羊抗兔 IgG-PE 二抗购自 R&D 公司, β -catenin、Cyclin D1、Survivin 及 β -actin PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 顺铂为山东齐鲁制药厂产品 (批号 7120191DB)。

1.2 细胞株及其培养

人食管癌细胞 Eca-109 由河北医科大学第四医

院科研中心提供。用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养。

1.3 RT-PCR 检测 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达

收集经不同质量浓度 (12.5、25、50 μ g/mL)^[4] 宝藿苣-I 作用 48 h 后的 Eca-109 细胞, 按 Trizol 试剂说明常规提取各组细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶中, 80 V 恒压电泳 30 min 后, 凝胶成像系统观察电泳结果, 应用 gel-pro 凝胶分析软件对电泳谱带进行分析, 用校正值 (β -catenin/ β -actin、Cyclin D1/ β -actin、Survivin/ β -actin) 表示 mRNA 水平, 重复 3 次。引物序列及扩增条件见表 1。

表 1 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 及 β -actin PCR 引物序列及扩增条件

Table 1 Primer sequences and amplification conditions of β -catenin, Cyclin D1, Survivin, and β -actin PCR

基因名称	引物序列	退火温度/°C	产物长度/bp
β -catenin	5'-GCAGGCACT-3'	55	265
	5'-CATGCGTGGCAG-3'		
Cyclin D1	5'-ATGCCAACCTCCTCAACGACC-3'	55	512
	5'-TGGCACAGAGGGCAACGAAGG-3'		
Survivin	5'-CGGCATGGGTGCCCCGACGTTG-3'	55	447
	5'-TTGAGGCCTCTGGCCGGAGC-3'		
β -actin	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	55	838
	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'		

1.4 流式细胞术检测细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达

收集经不同质量浓度 (12.5、25、50 μ g/mL) 宝藿苣-I 作用 48 h 后的 Eca-109 细胞, 经 70%乙醇固定后加入兔抗人 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 单克隆抗体, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤, 加入 PE-羊抗兔 IgG 二抗, 37 °C 孵育 50 min, PBS 洗涤, 流式细胞仪检测, 以 X-mode 值表示 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 相对表达水平。

1.5 统计学方法

应用 SPSS11.5 软件对所有数据进行统计学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 宝藿苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达的影响

宝藿苣-I 处理 Eca-109 细胞 48 h 后, 25、50 μ g/mL 宝藿苣-I 组 Eca-109 细胞的 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P <$

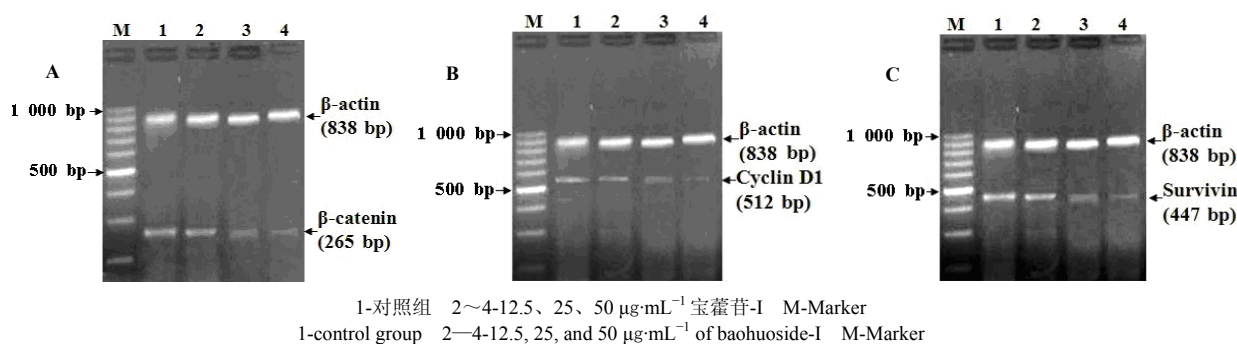
0.01), 且随宝藿苣-I 质量浓度增加表达水平逐渐降低; 12.5 μ g/mL 处理组细胞的 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达水平与对照组相比无明显差异。结果见图 1 和表 2。

2.2 宝藿苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达的影响

宝藿苣-I 处理 Eca-109 细胞 48 h 后, 25、50 μ g/mL 宝藿苣-I 组 Eca-109 细胞的 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), 且随宝藿苣-I 质量浓度增加蛋白表达水平逐渐降低; 12.5 μ g/mL 宝藿苣-I 组 Eca-109 细胞的 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达水平与对照组相比无明显差异。结果见表 3。

3 讨论

Wnt/ β -catenin 信号转导通路的中枢成分是 β -catenin。在正常细胞中, 细胞内仅有少量游离的 β -catenin 存在, 不能进入细胞核调控相应基因表达。细胞内游离的 β -catenin 异常积累, 可与 T 细胞因子-4 (T cell factor-4, Tcf-4) 结合, 进入细胞核内, 启动

图 1 宝藜苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin (A)、Cyclin D1 (B)、Survivin (C) mRNA 表达的影响Fig. 1 Effect of baohuoside-I on expression of β -catenin (A), Cyclin D1 (B), and Survivin (C) mRNA in Eca-109 cells表 2 宝藜苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达的影响Table 2 Effect of baohuoside-I on expression of β -catenin, Cyclin D1, and Survivin mRNA in Eca-109 cells

宝藜苣-I/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	β -catenin/ β -actin	Cyclin D1/ β -actin	Survivin/ β -actin
0 (对照)	0.595 ± 0.003	1.029 ± 0.122	0.873 ± 0.047
12.5	0.577 ± 0.003	0.982 ± 0.064	0.725 ± 0.115
25	$0.372 \pm 0.009^{**}$	$0.631 \pm 0.041^{**}$	$0.317 \pm 0.073^{**}$
50	$0.216 \pm 0.161^{**}$	$0.317 \pm 0.059^{**}$	$0.204 \pm 0.051^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$, 表 3 同 $^{**}P < 0.01$ vs control group, Table 3 is same表 3 宝藜苣-I 对 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达的影响Table 3 Effect of baohuoside-I on expression of β -catenin, Cyclin D1, and Survivin protein in Eca-109 cells

宝藜苣-I/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	蛋白表达 (X-mode 值)		
	β -catenin	Cyclin D1	Survivin
0 (对照)	7.314 ± 0.074	9.150 ± 0.666	17.917 ± 0.504
12.5	7.163 ± 0.126	8.317 ± 0.387	17.067 ± 0.388
25	$5.366 \pm 0.062^{**}$	$5.883 \pm 0.643^{**}$	$9.517 \pm 0.542^{**}$
50	$3.978 \pm 0.091^{**}$	$3.067 \pm 0.668^{**}$	$6.117 \pm 0.564^{**}$

下游靶基因 cyclin D1、survivin 等的异常转录^[9]。本研究应用流式细胞术检测不同质量浓度宝藜苣-I 作用于 Eca-109 细胞后 β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达水平, 结果显示, 宝藜苣-I 作用后, β -catenin、Cyclin D1、Survivin 蛋白表达水平均有不同程度的下降, 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$), 而 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与对照组相比虽有所降低, 但无统计学意义。本研究还检测了 Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达水平的变化, 结果显示, 宝藜苣-I 作用后, Eca-109 细胞 β -catenin、Cyclin D1、Survivin mRNA 表达水平均有不同程度下降, 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$), 而 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与对照组相比虽有所降低, 但无统计学意义。本研究结果提示, 宝藜苣-I 可能通过下调 β -catenin mRNA 表达, 抑制 Cyclin D1、Survivin

mRNA 表达, 从而抑制 Eca-109 细胞增殖^[4]。宝藜苣-I 的具体抗肿瘤作用及其机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 单保恩, 李俊新, 荆相瑜, 等. 中药香加皮提取物的体内抑瘤效果研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(4): 302-304.
- [2] 王利萍, 刘建利. 香加皮的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 493-496.
- [3] 单保恩, 赵连梅, 艾军, 等. 香加皮羽扇豆烷乙酸酯对人外周血淋巴细胞免疫调节功能的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1035-1039.
- [4] 刘晓霞, 刘红珍, 陈剑华, 等. 宝藜苣-I 对人食管癌细胞 Eca-109 增殖及细胞周期的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1590-1593.
- [5] Zhao D H, Hong J J, Guo S Y, *et al.* Aberrant expression and function of TCF-4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 [J]. *Cell Res*, 2004, 14(1): 74-80.
- [6] 刘莉, 刘都礼. β -连环蛋白在食管癌中的表达及临床意义 [J]. 四川大学学报, 2004, 35(4): 483-485.
- [7] 宋银宏. Wnt/ β -catenin 信号转导途径与宫颈癌 [J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2006, 33(4): 237-240.
- [8] 林琼琼, 李锦添, 王敏. Wnt/ β -catenin 通路在鼻咽癌分化中的作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(4): 384-387.
- [9] Song Y S, Park E H, Hur G M, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(1): 53-61.