

告达庭下调 β -catenin/survivin 抑制神经胶质瘤 C6 细胞迁移实验研究

费洪荣^{1,2}, 王桂玲², 赵莹², 周洪雷^{1*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016

摘要: **目的** 观察告达庭对大鼠神经胶质瘤 C6 细胞增殖和迁移能力的影响, 并初步探讨其内在的分子机制。**方法** MTT 法检测告达庭对 C6 细胞存活力的影响; 流式细胞术检测细胞周期的变化; 细胞划痕实验及 Transwell 迁移小室检测告达庭对 C6 细胞体外迁移能力的抑制作用; 免疫印迹实验检测告达庭对 C6 细胞内 β -catenin、Survivin 以及细胞周期相关蛋白 CyclinD1 和 Cdk4 蛋白表达的影响。**结果** 告达庭能够剂量依赖性地抑制 C6 细胞的增殖并阻滞细胞于 G₁ 期, 其机制与下调细胞周期素 CyclinD1 和 Cdk4 的表达相关; 告达庭给药后, C6 细胞的迁移能力明显受到抑制, 同时 β -catenin 及其下游因子 Survivin 的表达呈显著下降趋势。**结论** 告达庭具有抑制 C6 细胞的增殖和体外迁移能力的作用, 其机制可能与抑制 β -catenin 蛋白及 Survivin 的表达相关。

关键词: 告达庭; 神经胶质瘤; 细胞迁移; 细胞周期; β -catenin; Survivin

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)10-1439-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.016

Inhibition of Caudatin on migration of glioma C6 cells *in vitro* by downregulating β -catenin/survivin expression

FEI Hong-rong^{1,2}, WANG Gui-ling², ZHAO Ying², ZHOU Hong-lei¹

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. School of Pharmacy, Taishan Medical University, Taian 271016, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Caudatin on cell proliferation and migration of human glioma cell line C6 and the potential mechanisms. **Methods** Cell viability was evaluated by MTT assay. Cell cycle distribution was assessed by propidium iodide flow cytometry. Scarification test and Transwell assay were used to measure the cell migration. The effects of Caudatin on the expression of β -catenin, Survivin, CyclinD1, and Cdk4 were determined by Western blotting assay. **Results** Caudatin inhibited the C6 cell viability in a dose dependent manner, and caused an accumulation of C6 cells in G₁ phase, and Western blotting results suggested that Caudatin inhibited the expression of CyclinD1 and Cdk4. The migration ability of C6 cells was significantly blocked by Caudatin treatment. Caudatin could significantly down-regulate the expression of β -catenin and Survivin in C6 cells. **Conclusion** Caudatin could inhibit the C6 cell migration *in vitro* with a dose dependent way, and the potential mechanism might be related to inhibiting the expression of β -catenin and Survivin in C6 cells.

Key words: Caudatin; glioma; cell migration; cell cycle; β -catenin; Survivin

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 具有发病率高、病死率高和治愈率低的特点^[1]。胶质瘤以神经胶质细胞 (glia cells) 为主要细胞来源, 生理条件下胶质细胞支持并滋养神经元; 当神经胶质细胞生长调控异常而出现恶性增殖时, 便导致胶质瘤的发生^[2-3]。目前, 临床上手术切除和放射疗

法对胶质瘤患者都具有潜在的危险性, 因此寻找新的有效治疗药物及治疗方法显得尤为重要。

告达庭 (Caudatin) 是从萝藦科植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥根茎 (白首乌) 中分离得到的一种 C₂₁ 甾体苷元, 在肝癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤细胞中表现出较

收稿日期: 2013-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81272683); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2011HQ034)

作者简介: 费洪荣 (1977—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药活性成分。Tel: 13305385669 E-mail: hrfei530@sina.com.cn

*通信作者 周洪雷 E-mail: zhouhongleitcm@163.com

强的抑癌活性^[4], 可通过调节线粒体凋亡途径诱导肿瘤细胞发生凋亡, 也能借助抑制肿瘤内血管内皮生长因子(VEGF)的表达而抑制肿瘤血管生成^[5-6]。本研究以神经胶质瘤 C6 细胞为实验材料, 探讨告达庭对胶质瘤细胞增殖、迁移的影响及可能的分子机制, 为抗脑胶质瘤药物的研发提供新的选择依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

白首乌采自山东省泰山山脉, 经泰山医学院生药教研室鉴定为萝藦科植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥根茎。Transwell 小室购自 BD Biosciences 公司; β -actin 抗体购自 Sigma 公司, CyclinD1 抗体和 Cdk4 购自 Santa Cruz 公司, β -catenin 抗体和 survivin 抗体购自 Cell Signaling Technology, 二抗均购自北京中杉金桥生物公司。ECL 显色试剂盒购自 PerkinElmer 公司。

1.2 细胞系

大鼠神经胶质瘤 C6 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3 仪器

台式离心机, 德国 Sigma 公司; 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus; 流式细胞仪, 美国 BD 公司; 蛋白质电泳与印迹系统, 美国 Bio-rad 公司。

2 方法

2.1 告达庭的分离纯化

根据文献方法^[7]从白首乌中分离纯化告达庭, 经 HPLC 测定其质量分数为 98.2%。

2.2 细胞培养

C6 细胞用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵箱培养。

2.3 MTT 法测定细胞活力

胰酶消化细胞并接种于 96 孔板中, 加入不同质量浓度 (0、10、25、50、100、150 μ g/mL) 的告达庭继续培养 24 h, 对照组加入二甲基亚砷 (DMSO)。终止培养前 4 h 加 5 g/L 的 MTT 20 μ L 于各孔中, 吸去培养液后加入 150 μ L DMSO, 室温振荡 10 min; 490 nm 波长下测定各孔的吸光度 (*A*) 值, 以同样的方法测 6 个平行孔, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$$

2.4 细胞周期分析

C6 细胞经告达庭 (0、25、100 μ g/mL) 处理 24 h 后, 胰酶消化并制备单细胞悬液; 细胞用 75% 的冷无水乙醇 4 °C 固定过夜, 加入终质量浓度为 50 mg/L 的 RNase A, 37 °C 孵育 30 min; 加入 PI 闭光染色 15 min 后上流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析细胞周期分布。

2.5 细胞划痕实验

将对数生长期的 C6 细胞接种于 24 孔培养板, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞密度约为 80% 时用灭菌枪头进行划痕。实验组加入不同质量浓度 (5、25、50 μ g/mL) 的告达庭溶液, 对照组加入 DMSO, 分组处理 24 h 后观察细胞生长情况并在显微镜下拍照。

2.6 细胞迁移实验

C6 细胞经无血清培养 24 h 后, 胰酶消化并计数。将 Transwell 小室 (8.0 μ m 聚碳酸酯微孔膜) 放入 24 孔培养板中, 上室加入适量细胞, 用含 0.1% 血清的培养基培养, 下室培养基含 10%血清和 2.5 mg/L 的纤维粘连蛋白。细胞经告达庭 (25、50 μ g/mL) 作用 24 h 后, 取出微孔膜在 90%乙醇中固定 10 min, 然后用脱脂棉球擦去膜上层细胞, 台盼蓝染色后倒置显微镜下计数膜下层附着的细胞数。随机取 6 个视野计数并计算平均值。

2.7 免疫印迹分析

细胞经告达庭 (25、50、100 μ g/mL) 作用 24 h, 加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上放置 20 min, 4 °C 13 000 $\times$ g 离心 20 min, 收集上清定量分析。取 30~40 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 实验, 电转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭过夜。加入一抗, 室温孵育 3 h 后加入二抗室温孵育 1.5 h, PBST 洗膜, 最后用 ECL 显色试剂盒在暗室曝光显影。实验重复 3 次。

2.8 统计分析

各组实验均独立重复 3 次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行组间统计。

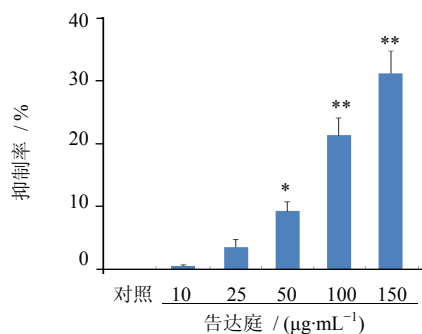
3 结果

3.1 告达庭抑制 C6 细胞的增殖

用不同质量浓度的告达庭处理 C6 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞活力。结果表明告达庭能够显著抑制 C6 细胞的增殖, 且抑制作用呈剂量依赖性。见图 1。

3.2 告达庭诱导 C6 细胞阻滞于 G₁ 期

由于告达庭对 C6 细胞的生长具有显著的抑制



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 1 告达庭对 C6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Caudatin on proliferation of C6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

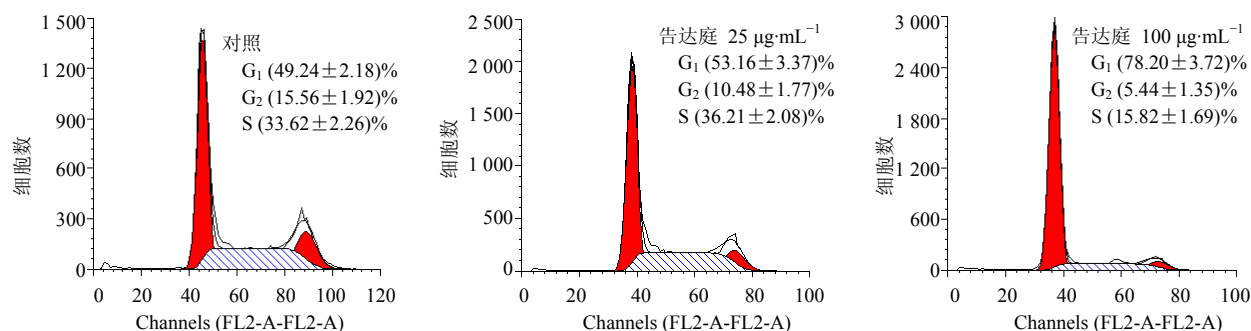


图 2 告达庭对 C6 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Caudatin on cell cycle distribution of C6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

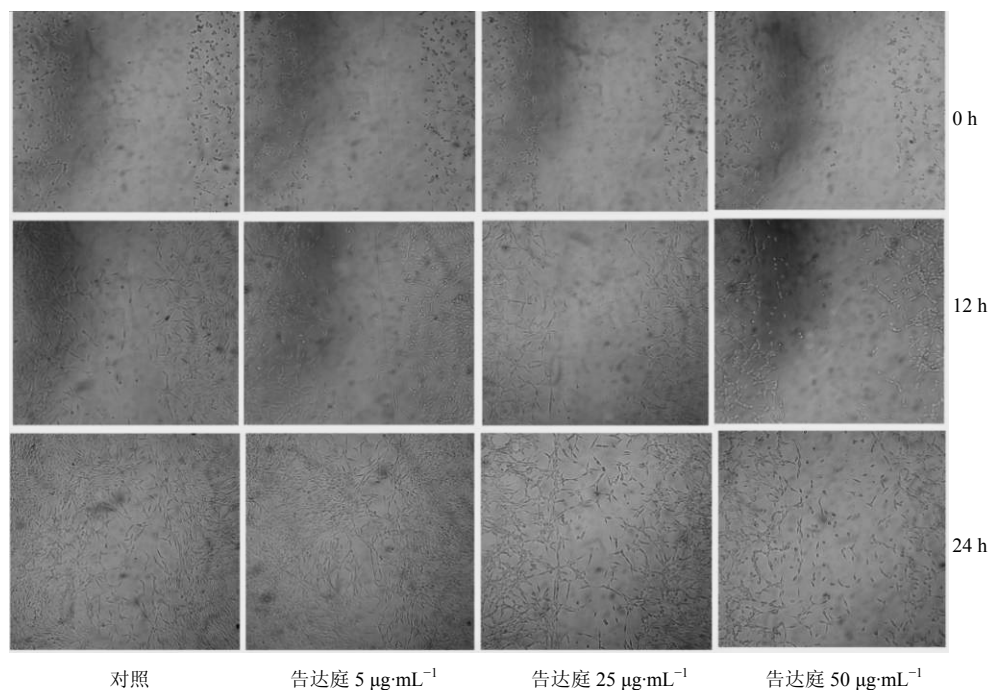


图 3 告达庭对 C6 细胞迁移的影响 (划痕实验)

Fig. 3 Effect of Caudatin on cell migration of C6 cells (scarification test)

作用, 推测告达庭可能对细胞周期具有调节作用, 因此采用流式细胞术检测了告达庭对 C6 细胞周期的影响。从图 2 可以看出, C6 细胞经告达庭作用 24 h 后, G₁ 期细胞数量显著增加, 而 G₂ 期细胞数目则减少。

3.3 告达庭抑制 C6 细胞的迁移

通过细胞划痕实验发现, 告达庭作用于 C6 细胞 24 h, 可明显抑制细胞的迁移 ($P < 0.05$), 表明告达庭处理后 C6 细胞的迁移能力明显下降 (图 3)。细胞小室迁移实验结果表明, 相对于未经告达庭处理的 C6 细胞, 经告达庭处理后, 穿膜细胞的数量分别降低到正常条件下的 79.5% 和 20% (图 4)。

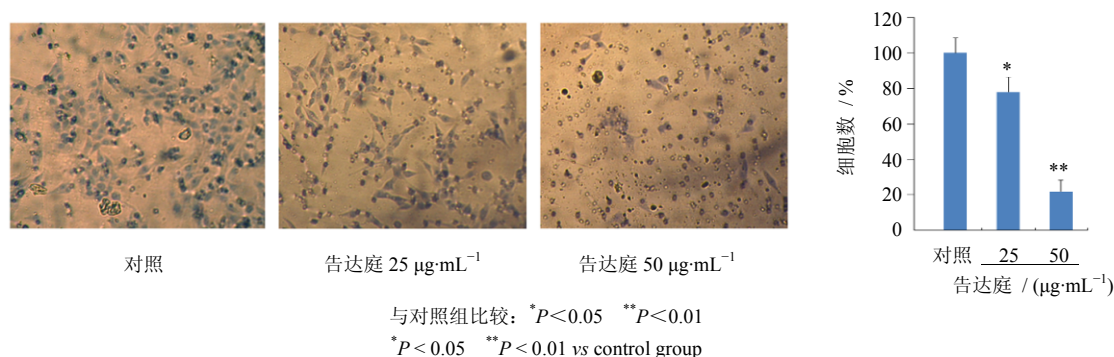


图4 告达庭对C6细胞迁移的影响(迁移小室实验)

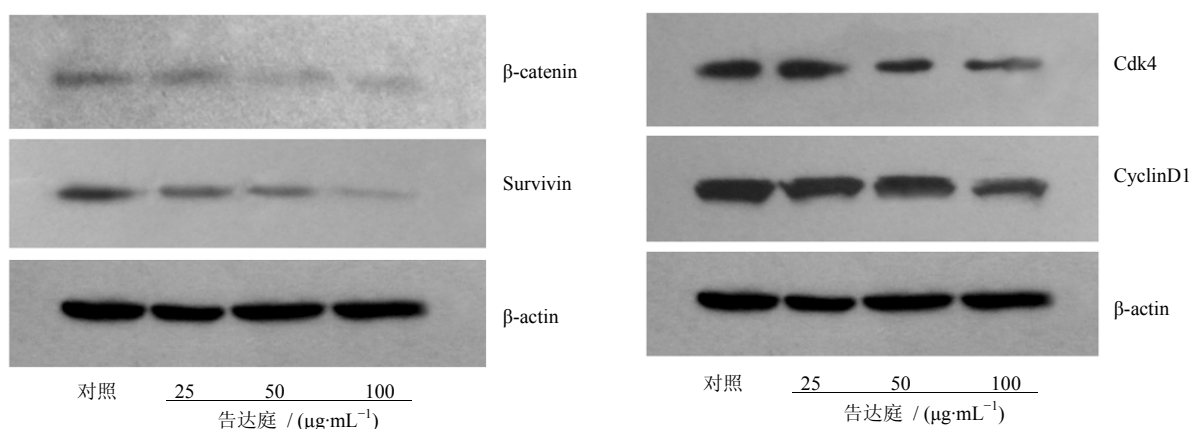
Fig. 4 Effect of Caudatin on cell migration of C6 cells (Transwell assay)

3.4 告达庭抑制C6细胞内 β -catenin、Survivin、CyclinD1和Cdk4的蛋白表达

Wnt/ β -catenin 作为细胞内一条主要的信号通路,与细胞的增殖、迁移和分化密切相关。因此,采用免疫印迹实验观察了告达庭对 β -catenin 表达的影响。从图5可以看出,告达庭作用C6细胞24 h后,细胞内 β -catenin 的蛋白水平下降,同时

Wnt/ β -catenin 通路的下游因子Survivin 的表达也受到抑制。

流式细胞仪结果发现告达庭可使C6细胞周期阻滞在G₁期,进一步采用免疫印迹实验观察告达庭对细胞周期相关蛋白CyclinD1和Cdk4表达的影响,结果发现告达庭能够抑制C6细胞中CyclinD1和Cdk4蛋白的表达(图5)。

图5 告达庭对C6细胞中 β -catenin、Survivin、Cdk4和CyclinD1蛋白表达的影响Fig. 5 Effect of Caudatin on protein expression of β -catenin, Survivin, Cdk4, and CyclinD1 in C6 cells

4 讨论

本研究首先应用MTT法检测了告达庭对C6细胞生存力的影响,发现告达庭能够降低胶质瘤细胞的活力。流式细胞术结果表明,C6细胞经告达庭作用24 h后,G₁期细胞增多,而G₂期细胞数目则明显减少。细胞周期是保证细胞进行生命活动的基本过程。细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cdks)和Cdk抑制因子(CKIs)是参与细胞周期调控的主要蛋白因子^[8]。Cyclin D1是调控细胞周期G₁期的关键蛋白,可通过结合并激活细胞周期蛋白依赖性激酶Cdk4,推动细胞周期由G₁时

期进入到S时期^[9]。本研究结果表明,告达庭能够抑制C6细胞内CyclinD1的表达,可能与阻滞C6细胞于G₁期相关。

应用细胞体外划痕实验和细胞迁移小室法,本研究发现告达庭能够剂量依赖性地抑制C6细胞的迁移。Wnt信号传导途径与肿瘤有着密切的关系,其通路的异常活化参与多种癌症的发病过程^[10]。 β -catenin作为Wnt信号通路的关键因子,病理状态下可与T细胞因子-4(T cell factor-4, Tcf-4)结合,进入细胞核内,启动下游靶基因Cyclin D1和Survivin等的异常转录,调控细胞增殖、凋亡和迁

移等相关活动^[11-12]。现已证实 survivin 基因参与了人脑胶质瘤的发生发展,并且与肿瘤对化疗药物的耐药性相关,因其在肿瘤细胞中普遍高表达,靶向抑制 survivin 基因的表达可能会有助于胶质瘤的治疗^[13]。免疫印迹结果表明,告达庭能够抑制 C6 细胞中 β -catenin 及其下游因子 Survivin 蛋白的表达。

本研究结果提示,告达庭可能通过下调 CyclinD1 和 Cdk4 的表达而阻滞细胞周期的进程;通过下调 β -catenin 及其下游蛋白因子 Survivin 的表达而抑制 C6 细胞的迁移。

参考文献

- [1] 刘宏胜,王金环,徐新女,等.白藜芦醇抑制人脑胶质瘤 U251 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1375-1377.
- [2] Wypych D, Pomorski P. Calcium signaling in glioma cells--the role of nucleotide receptors [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 986: 61-79.
- [3] Mawson A R. Retinoids in the treatment of glioma: a new perspective [J]. *Cancer Manag Res*, 2012, 4: 233-241.
- [4] 彭蕴茹,丁永芳,李友宾,等.白首乌研究现状 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 370-378.
- [5] Fei H R, Cui L Y, Zhang Z R, *et al.* Caudatin inhibits carcinomic human alveolar basal epithelial cell growth and angiogenesis through modulating GSK3 β / β -catenin pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11): 3403-3410.
- [6] Fei H R, Chen H L, Xiao T, *et al.* Caudatin induces cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cell [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 131-138.
- [7] 张建烽,友宾,钱士辉,等.白首乌化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 814-816.
- [8] Caldon C E, Sutherland R L, Musgrove E. Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(10): 1918-1928.
- [9] Al-Khalaf H H, Colak D, Al-Saif M, *et al.* p16 (INK4a) positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21111.
- [10] Anastas J N, Moon R T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26.
- [11] Chan D W, Mak C S, Leung T H, *et al.* Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling in endometrial cancer [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(12): 1546-1556.
- [12] Ponce D P, Yefi R, Cabello P, *et al.* CK2 functionally interacts with AKT/PKB to promote the β -catenin-dependent expression of survivin and enhance cell survival [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 356(1/2): 127-132.
- [13] Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A, *et al.* RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects *in vitro* and in established glioma xenografts *in vivo* [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(10): 1074-1089.