

• 药理与临床 •

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的白头翁皂苷 D 对结肠癌上皮间质转化的影响

彭宇辉¹, 王敏敏¹, 雷家荣¹, 唐晓梦¹, 何紫雨¹, 刘晓虹¹, 明天琪¹, 李煜兵¹, 冉宇鑫², 郑凯杰¹, 徐海波^{1*}

1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学基尔健康学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究白头翁皂苷 D 对结肠癌上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响, 并基于无翅型 MMTV 整合位点家族 (wingless type MMTV integration site family, Wnt) / β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路研究其作用机制。方法 通过 MTT 细胞增殖实验研究白头翁皂苷 D 对人结肠癌 LoVo 细胞的影响, 细胞划痕实验研究白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞迁移的影响, Transwell 细胞侵袭实验研究白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞侵袭的影响, 锚定非依赖性克隆形成实验研究白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞恶性转化的影响; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 LoVo 细胞 EMT 相关基因和 Wnt/ β -catenin 信号通路基因的 mRNA 水平, 采用 Western blotting 法检测 LoVo 细胞 EMT 相关蛋白和 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的表达水平。**结果** 白头翁皂苷 D 显著抑制 LoVo 细胞增殖活性、迁移、侵袭和克隆形成, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 可显著降低 EMT 相关的波形蛋白 (Vimentin) 和蜗牛蛋白 (Snail) 的 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)、升高 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.01$), 降低 Wnt/ β -catenin 信号通路中 Wnt3a、 β -catenin、T 细胞因子 4 (T-cell factor 4, TCF4) 和原癌基因 (myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-Myc) 的 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 升高糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。白头翁皂苷 D 抑制 LoVo 细胞迁移和调节 E-cadherin 与 Vimentin 表达的作用可被 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 协同增强, 也被 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 SKL2001 拮抗减弱。**结论** 白头翁皂苷 D 可抑制结肠癌的 EMT, 其机制在于抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。

关键词: 结肠癌; 上皮间质转化; Wnt/ β -catenin 信号通路; 白头翁皂苷 D; LoVo 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0499-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.013

Effect of Pulsatilla saponin D on epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer by regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway

PENG Yuhui¹, WANG Minmin¹, LEI Jiarong¹, TANG Xiaomeng¹, HE Ziyu¹, LIU Xiaohong¹, MING Tianqi¹, LI Yubing¹, RAN Yuxin², ZHENG Kaijie¹, XU Haibo¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. CDUTCM-KEELE Joint Health and Medical Sciences Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Pulsatilla saponin D (PSD) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colorectal cancer, and explore its action mechanisms based on the wingless type MMTV integration site family (Wnt)/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Effect of PSD on the cell viability of LoVo cells was determined with the MTT assay. Effect of PSD on the migration of LoVo cells was assessed with the scratch wound healing assay. Effect of PSD on the invasion of LoVo cells was

收稿日期: 2024-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573813); 四川省自然科学基金面上项目 (2023NSFSC0653)

作者简介: 彭宇辉, 硕士研究生, 研究方向为中药抗肿瘤药理。E-mail: 1971466353@qq.com

*通信作者: 徐海波, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: xuhb@hotmail.com

examined with the Transwell invasion assay. Effect of PSD on the malignant transformation of LoVo cells was appraised with the anchorage-independent colony formation assay. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was carried out to detect the effect of PSD on the mRNA levels of EMT-related genes and the genes of Wnt/ β -catenin signaling pathway in LoVo cells. Western blotting was performed to measure the effect of PSD on the expression levels of EMT-related proteins and the proteins of Wnt/ β -catenin signaling pathway in LoVo cells. **Results** PSD significantly inhibited the proliferation activity, migration, invasion and colony formation of LoVo cells. Compared with the control group, PSD could reduce the mRNA and protein levels of EMT-related Vimentin and Snail ($P < 0.05, 0.01$), increased the mRNA and protein levels of E-cadherin ($P < 0.01$). It decreased the mRNA and protein levels of Wnt3a, β -catenin, T-cell factor 4 (TCF4), and myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) in Wnt/ β -catenin signaling pathway ($P < 0.05, 0.01$), increased the mRNA and protein levels of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) ($P < 0.05, 0.01$). Furthermore, the inhibition of cell migration and the regulation of the expressions of E-cadherin and vimentin in LoVo cells by PSD were synergized by Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor IWR-1, and antagonized by Wnt/ β -catenin signaling pathway activator SKL2001. **Conclusion** PSD may suppress the EMT of colorectal cancer, potentially by inhibiting the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Pulsatilla saponin D; LoVo cell

结肠癌是全球发病率第 3 高的恶性肿瘤, 约 90% 结肠癌患者死于肿瘤侵袭和转移^[1]。据报道, 超过 20% 的结肠癌患者会发生肝转移^[2], 这极大地降低了患者生存率。结肠癌转移的病理机制非常复杂, 其涉及遗传异常、肿瘤细胞的异质性、肿瘤微环境和肿瘤上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 等因素^[3]。

EMT 是细胞的一种生理、病理现象, 是具有极性的上皮细胞转化成具有活动能力、能够在细胞基质自由移动的间质细胞的过程。EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤发生侵袭转移的初始过程, 在肿瘤侵袭、血型扩散和化疗耐药中均有重要作用^[4-5]。无翅型 MMTV 整合位点家族 (wingless type MMTV integration site family, Wnt) 信号通路是调节生长发育的关键通路之一, 其与肿瘤发生发展也密切相关^[6]。Wnt 信号通路分为经典 Wnt 通路, 即 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路和非经典 Wnt 通路, 其中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活可以促进肿瘤 EMT^[7]。在正常情况下, Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制, Wnt 配体的缺失导致重组轴抑制蛋白 (recombinant axis inhibition protein, Axin)/糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)/腺瘤性结肠息肉病蛋白 (adenomatous polyposis coli protein, APC)/酪氨酸蛋白激酶 1 α 蛋白 (casein kinase 1 alpha, CK1 α) 复合物将细胞浆内的 β -catenin 蛋白磷酸化而降解, 同时 T 细胞因子 (T-cell factor, TCF)/淋巴增强因子 (lymphoid enhancer-binding factor, LEF) 与共抑制因子结合而抑制靶基因表达。当 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活时, Wnt 配体与卷曲蛋白

(frizzled, FZD)/低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein-related protein, LRP) 结合。随后, LRP 受体被 CK1 α 和 GSK-3 β 磷酸化, 引发 Axin/GSK-3 β /APC 蛋白质复合物解体, 从而导致细胞浆内的 β -catenin 不被降解而转入细胞核内。 β -catenin、LEF 和 TCF 蛋白形成转录复合物, 启动下游原癌基因 (myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-Myc)、波形蛋白 (Vimentin) 和蜗牛蛋白 (Snail) 等转录, 促进肿瘤的发生、发展、EMT 和转移^[8]。

研究表明, 许多中药成分, 如熊果酸^[9]、小檗碱^[10]和姜黄素^[11]等均有良好的抗癌作用。白头翁皂苷 D 来源于毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根, 其具有较强的抗肿瘤作用^[12], 但白头翁皂苷 D 抗结肠癌的机制尚未明晰。本研究明确了白头翁皂苷 D 对结肠癌的影响, 并基于 Wnt/ β -catenin 信号通路研究其作用机制, 为白头翁防治结肠癌提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

人结肠癌 LoVo 细胞由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 药品与试剂

白头翁皂苷 D (质量分数 > 98.6%, 批号 247596)、Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 (批号 280452)、Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 SKL2001 (批号 431237) 购自美国 MedChemExpress 生物科技公司; 5-氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-Fu, 批号 WXBC7976V) 购自美国 Sigma 公司; Ham's F-12K 培养液 (批号 BC20230422) 购自南京生航生物技术有限公司; 胎牛血清 (批号 C8010-500mL) 购

自上海泰坦科技股份有限公司；细胞外基质(extracellular matrix, ECM)胶(批号 E1270-5ML)购自德国 Merck 公司。胰蛋白酶细胞消化液(批号 C0203)、MTT 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒(批号 C0009S)、BCA 蛋白检测试剂盒(批号 040224240531)、BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒(批号 120622230413)、RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒(批号 Z928240930)均购自上海碧云天生物科技有限公司。海马无翅基因 3a (recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a, Wnt3a, 批号 00140305)、 β -catenin (批号 00051813)、TCF4 (批号 00111097)、c-Myc (批号 00138557)、GSK-3 β (批号 00075495)、E-钙黏蛋白(E-cadherin) (批号 00081113)、Vimentin (批号 00066574)、Snail (批号 00139047)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 10029187)抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司；青链霉素混合液(批号 G4003-100ML)、2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (批号 MPC2407073)和 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 CR2403010)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 仪器

3001 型多功能酶标仪、Forma 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；SW-CT-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)；MF53-N 型倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公司)；1000 Touch Thermal Cycler 型 CFX96 触屏实时荧光定量 PCR 检测系统、170-8070 型 ChemiDoc XRS⁺ 系统化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

用 Ham's F-12K 培养液(含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素混合液)于 37℃、5%CO₂ 的条件下培养人结肠癌 LoVo 细胞。每 2 天更换 1 次培养液，待细胞长满 85%以上时，用胰蛋白酶消化传代。

2.2 细胞增殖实验

取对数生长期 LoVo 细胞，按 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板，孵育 24 h 后，用浓度 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 和 32.00 $\mu\text{mol/L}$ 的白头翁皂苷 D 继续孵育细胞 48 h。更换含 MTT 溶液的培养液继续孵育 4 h，然后加入 100 μL DMSO，避光振摇 15 min 后，于 570 nm 波长下检测吸光度

(A) 值，计算细胞存活率及半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞划痕实验

取对数生长期 LoVo 细胞，按 2×10^4 个/孔密度接种于 24 孔板，将细胞分为对照组和白头翁皂苷 D 低、中、高剂量(7.5、15.0、30.0 $\mu\text{mol/L}$)组及 5-Fu (20 $\mu\text{mol/L}$)组，待细胞长至 80%，用 10 μL 吸头在细胞单层上做十字划痕，除对照组外，其余各组加入相应浓度含药培养液孵育细胞 24 h，在不同时间点(0、12、24 h)于显微镜下观察，计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (0 \text{ h 划痕面积} - \text{不同时间点划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.4 细胞侵袭实验

取冻存于 -20℃ 的 ECM 胶，于 4℃ 过夜。将 ECM 胶用培养液 1:1 稀释后，迅速添加至 24 孔板的 Transwell 上室(50 μL /孔)，并置于 37℃ 细胞培养箱内凝固 1 h。消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞，用无血清培养液调整细胞密度至 1×10^6 个/mL。细胞分组同“2.3”项下方法，在 Transwell 上室中分别加入细胞悬液(1×10^5 个/孔)，在 Transwell 下室中，除对照组外，分别加入相应浓度含药培养液，孵育 24 h 后，用棉签小心地擦除上室中的细胞和 ECM 胶，用 4%多聚甲醛固定 Transwell 下室的细胞 10 min，再用 0.1%结晶紫染色细胞 15 min，于倒置显微镜下观察，并用 Image-J 软件分析。

2.5 锚定非依赖性克隆形成实验

将 1%琼脂糖凝固于 6 孔板(1 mL/孔)中，随后将 LoVo 细胞按 5×10^4 个/孔密度接种于琼脂糖，细胞分组同“2.3”项下方法，各组培养液处理细胞 14 d，于光学显微镜下观测细胞克隆形成情况。

2.6 qRT-PCR 检测 mRNA 相对表达

取对数生长期 LoVo 细胞按 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板，培养 24 h 后，细胞分组同“2.3”项下方法，分别用各培养液处理细胞 48 h，用 RNAeasy™ 动物 RNA 试剂盒抽提细胞总 RNA，并用 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒逆转录得到 cDNA，随后用 2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 在 CFX96 T 触屏实时荧光定量 PCR 检测系统上进行扩增。qRT-PCR 反应程序为 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 15 s、60℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s，

40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算样本 mRNA 相对水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: CATGAAGTGTGACGTGGACATC R: CAGGAGGAGCAATGATCTTGATC
E-cadherin	F: ACCGAGAGAGTTTCCCTACGTA R: CCTGTACGTGGTGGGATTGA
Vimentin	F: GGAGAAATTGCAGGAGGAG R: TCCACTTTGCGTTCAAGG
Snail	F: CTAATCCAGAGTTTACCTTCCAGC R: TTTCCCACTGTCCTCATCTGA
Wnt3a	F: ATCGGTGACTTCTCAAGGACAAG R: GTGGGCACCTTGAAGTAGGTGTA
GSK-3 β	F: CAAGAAGTCAGCTATACAGACAC R: GGAGCTCTCGATTCTTAAATCTC
TCF4	F: ACTGTCCAGAGAAGAGCAAGCGA R: TTTCCATAGTTATCCCGCGCGGA
β -catenin	F: GCAACTAAACAGGAAGGGATGGA R: TCTATACCACCCACTTGGCAGA
c-Myc	F: GCGACTCTGAGGAGGAACAAGAAG R: CGTAGTTGTGCTGATGTGTGGAGA

2.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取对数生长期 LoVo 细胞按 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 用含白头翁皂苷 D (7.5、15.0 和 30.0 $\mu\text{mol/L}$) 或 5-Fu (20 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液处理细胞 48 h。用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 并用 BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 45 min 后, 加入一抗 Wnt3a (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000)、TCF4 (1:1 000)、c-Myc (1:1 000)、GSK-3 β (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:1 000)、Snail (1:1 000)、GAPDH (1:2 000), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇孵育过夜。次日, 二抗 (1:2 000) 室温轻摇孵育 90 min, 用 TBST 洗膜 3 次。用 ECL 化学发光试剂在 ChemiDoc XRS+System 凝胶成像系统显影蛋白条带, 以 GAPDH 为内参, 用 Image-J 软件分析蛋白表达量。

2.8 白头翁皂苷 D 抗结肠癌作用机制的验证

取对数生长期 LoVo 细胞, 将细胞分对照组、白头翁皂苷 D 组 (15 $\mu\text{mol/L}$)、IWR-1 组 (10 $\mu\text{mol/L}$)、SKL2001 组 (20 $\mu\text{mol/L}$)、白头翁皂苷 D+IWR-1 组 (10 $\mu\text{mol/L}$)、白头翁皂苷 D (15 $\mu\text{mol/L}$) + SKL2001 组 (20 $\mu\text{mol/L}$), 分别按“2.3”“2.6”“2.7”项下方法验证白头翁皂苷 D 抗 LoVo 细胞的作用机制。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和绘图。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 t 检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 LoVo 细胞增殖的影响

用不同浓度的白头翁皂苷 D 处理 LoVo 细胞 48 h 后, LoVo 细胞的增殖活性降低。白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞 IC₅₀ 为 12.90 $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明, 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞增殖活性具有较好的抑制作用, 且呈现浓度相关性。在后续药理实验中, 将白头翁皂苷 D 浓度设置为 7.5、15.0、30.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 对 LoVo 细胞迁移的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 各剂量组和 5-Fu 组 LoVo 细胞迁移率显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo 细胞迁移, 且该作用呈现剂量相关性。

3.3 对 LoVo 细胞侵袭的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 各剂量组和 5-Fu 组 LoVo 细胞侵袭数量显著减少 ($P < 0.05$ 、0.01), 提示白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo 细胞侵袭, 且该作用呈现剂量相关性。

3.4 对 LoVo 细胞克隆形成的影响

如图 3 所示, 药物处理 LoVo 细胞 14 d 后, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 各剂量组和 5-Fu 组细胞克隆数量显著减少 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo 细胞克隆形成, 且该作用呈现剂量相关性, 提示白头翁皂苷 D 可抑制 LoVo 细胞的恶性转化。

3.5 对 LoVo 细胞 EMT 相关基因表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 各剂量和 5-Fu 显著升高 LoVo 细胞 E-cadherin 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$), 降低 Vimentin 和 Snail 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。与对照组比较, 白头翁皂苷 D 和 5-Fu 显著增加 LoVo 细胞 E-cadherin 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 降低 Vimentin 和 Snail 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂量相关性。结果表明, 白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo 细胞 EMT。

3.6 对结肠癌细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 白头翁皂苷 D 和 5-Fu 显著降低 LoVo 细胞 Wnt3a、 β -catenin、TCF4 和 c-Myc 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$), 升高 GSK-3 β

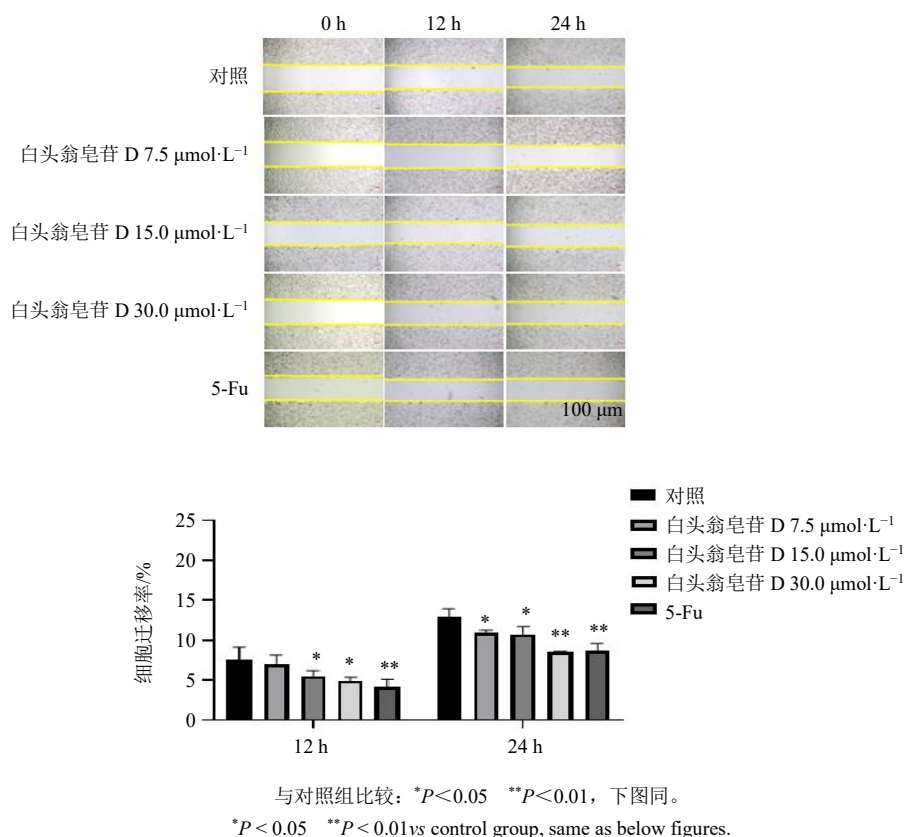


图 1 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of Pulsatilla saponin D on LoVo cell migration rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

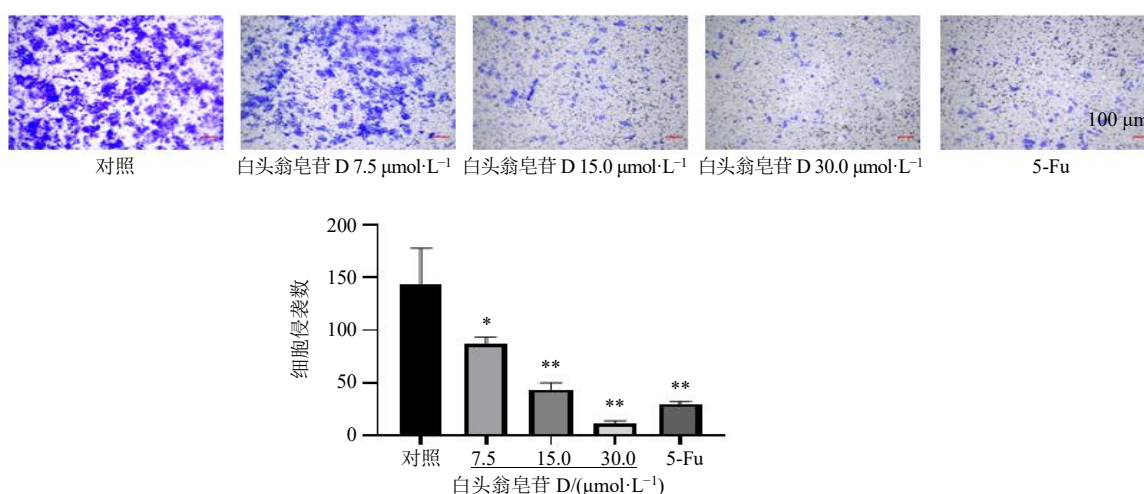


图 2 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

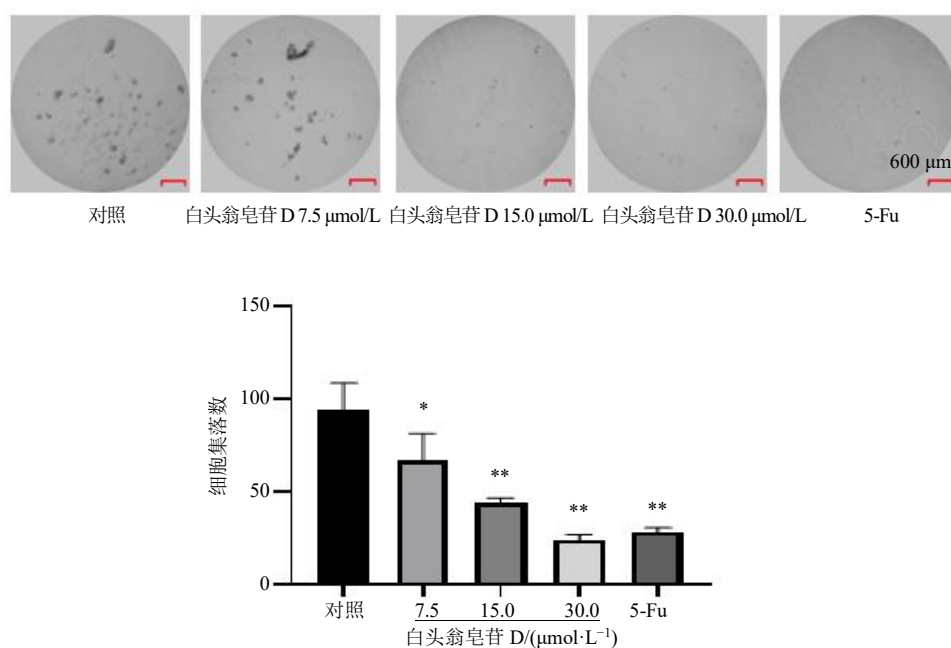
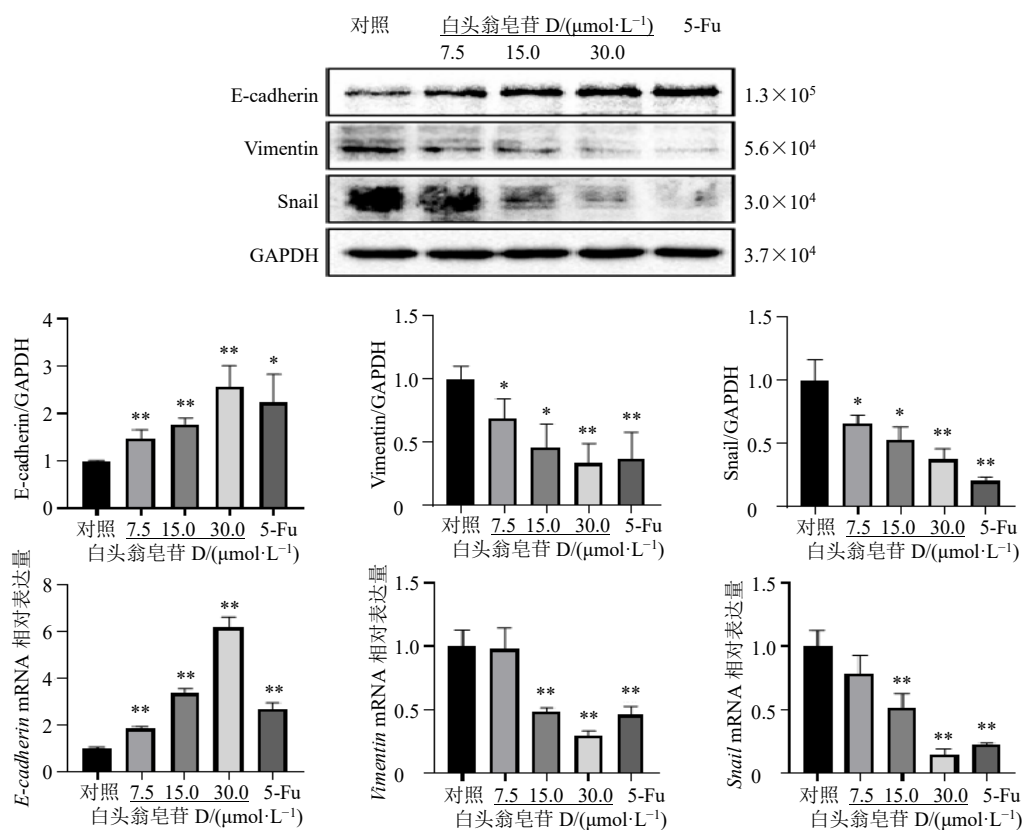
Fig. 2 Effect of Pulsatilla saponin D on invasion of LoVo cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

的 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。与对照组比较, 白头翁皂苷 D 和 5-Fu 显著降低 LoVo 细胞 Wnt3a、 β -catenin、TCF4 和 c-Myc 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加 GSK-3 β 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。以上结果表明,

白头翁皂苷 D 可抑制结肠癌细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路。

3.7 Wnt/ β -catenin 信号激动剂、抑制剂对白头翁皂苷 D 药理作用的验证

如图 6-A 所示, 药物处理 12 h 和 24 h 后, 与

图 3 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 3 Effect of Pulsatilla saponin D on colony formation of LoVo cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)图 4 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞 EMT 相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of Pulsatilla saponin D on expressions of EMT-related genes in LoVo cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

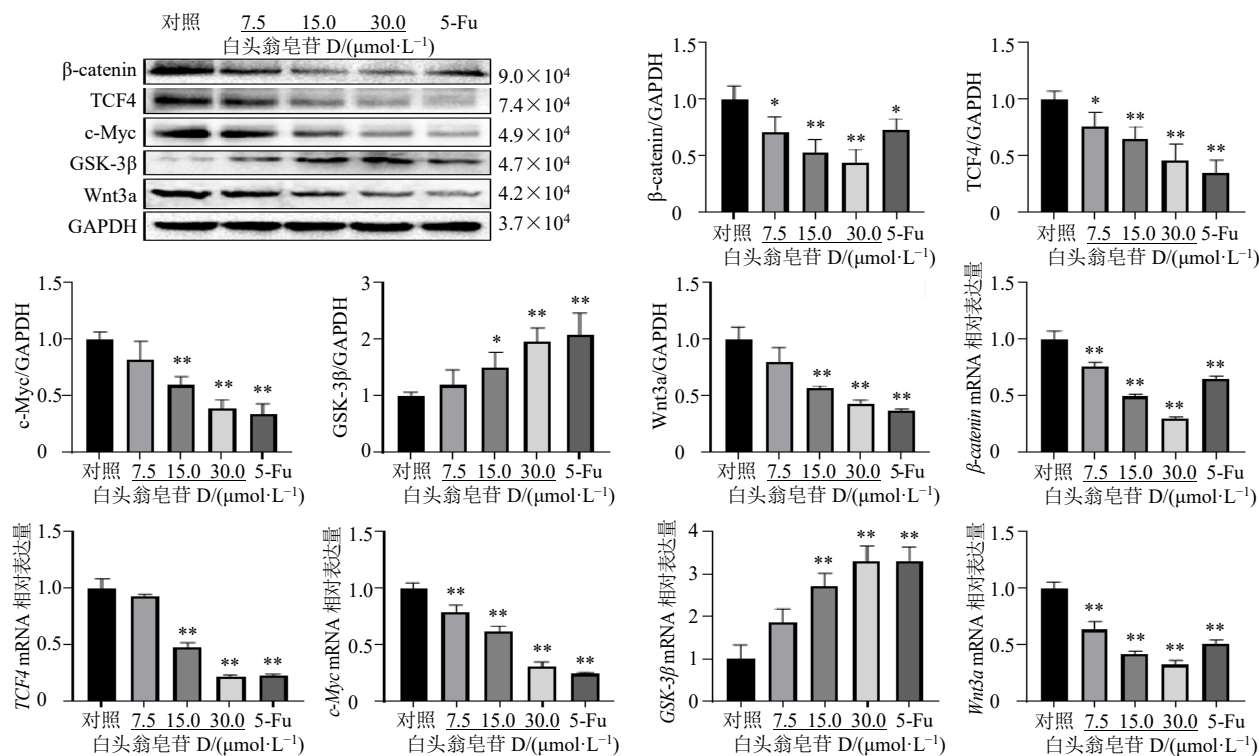


图 5 白头翁皂苷 D 对 LoVo 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Pulsatilla saponin D on Wnt/β-catenin signaling pathway activity in LoVo cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

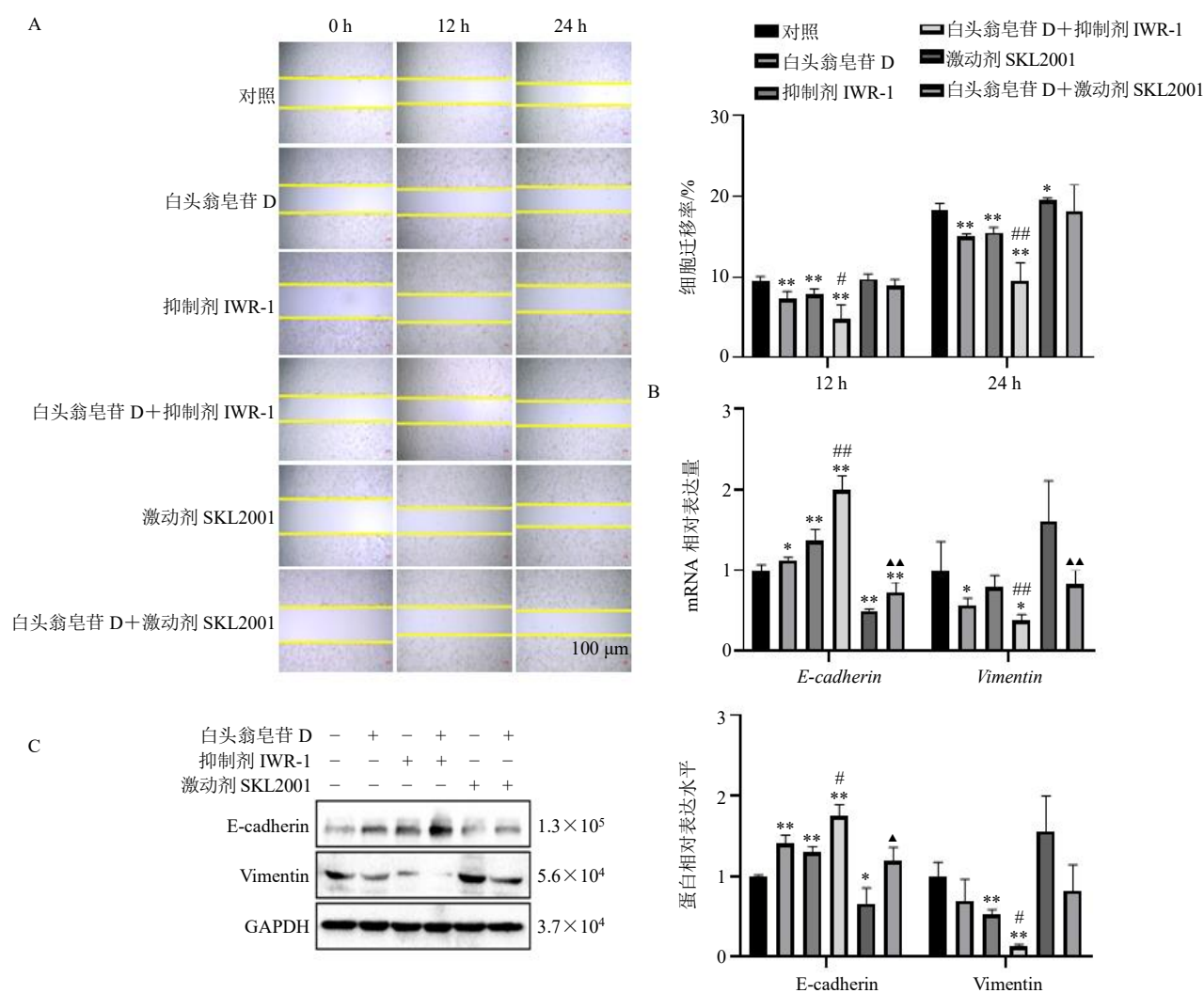
对照组比较,白头翁皂苷 D (15 μmol/L) 显著抑制 LoVo 细胞迁移,且该作用可被 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 (10 μmol/L) 协同增强,也被 Wnt/β-catenin 信号通路激动剂 SKL2001 (20 μmol/L) 拮抗减弱 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 6-B 所示,与对照组比较,白头翁皂苷 D (15 μmol/L) 显著升高 LoVo 细胞 *E-cadherin* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$),降低 *Vimentin* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$),且该作用可被 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 (10 μmol/L) 协同增强,也被 Wnt/β-catenin 信号通路激动剂 SKL2001 (20 μmol/L) 拮抗减弱 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 6-C 所示,与对照组比较,白头翁皂苷 D (15 μmol/L) 显著升高 LoVo 细胞 *E-cadherin* 的蛋白表达 ($P < 0.01$),但降低 *Vimentin* 的蛋白表达,且该作用可被 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 (10 μmol/L) 协同增强,也被 Wnt/β-catenin 信号通路激动剂 SKL2001 (20 μmol/L) 拮抗减弱 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

白头翁的主要活性成分白头翁皂苷 D 对甲状腺癌^[13]、肺癌^[14]、食管癌^[15]和乳腺癌^[16]等具有良好的抗癌作用。本研究结果表明,白头翁皂苷 D 能够

抑制 LoVo 细胞增殖,这与白头翁皂苷 D 通过调控 AKT/mTOR 信号通路、抑制结肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的报道一致^[17]。

原发性肿瘤的侵袭转移是肿瘤恶化导致患者死亡的重要原因^[18]。EMT 是肿瘤细胞失去上皮细胞特性并获得间质细胞特征的过程,其导致肿瘤细胞从原发部位脱离并获得运动能力^[19]。在 EMT 过程中,*E-cadherin* 水平降低,间充质状态相关标志物 (*Vimentin*、*N-cadherin* 等) 表达升高^[19]。*E-cadherin* 作为上皮细胞的标志之一,其缺失能破坏细胞间的连接并导致肿瘤细胞彼此分离,最终引发间充质细胞状态和转移表型^[20]。*Vimentin* 是一种中间丝蛋白,可支撑间充质细胞的细胞器,通过改变细胞形状与运动促进 EMT^[21]。*Snail* 是 EMT 主要调控因子之一,可通过抑制 *E-cadherin* 表达而促进 EMT。因此,抑制 *Vimentin* 和 *Snail* 表达是抗肿瘤 EMT 的重要策略^[22]。LoVo 细胞来源于转移性结肠癌病灶,具有高侵袭性与迁移能力,研究结果发现,白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo 细胞侵袭、迁移和恶性转化,促进 LoVo 细胞 *E-cadherin* 的表达,并降低 *Vimentin* 和 *Snail* 的表达,提示白头翁皂苷 D 能够抑制 LoVo



A-白头翁皂苷 D 联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂或激动剂对 LoVo 细胞迁移率的影响; B-白头翁皂苷 D 联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂或激动剂对 LoVo 细胞 EMT 相关 mRNA 水平的影响; C-白头翁皂苷 D 联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂或激动剂对 LoVo 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 IWR-1 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 SKL2001 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

A-effects of Pulsatilla saponin D with Wnt/ β -catenin pathway inhibitor or activator on LoVo cell migration rate; B-effects of Pulsatilla saponin D with Wnt/ β -catenin pathway inhibitor or activator on EMT-related mRNA levels in LoVo cells; C-effects of Pulsatilla saponin D with Wnt/ β -catenin pathway inhibitor or activator on EMT-related protein expressions in LoVo cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs IWR-1 group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs SKL2001 group.

图 6 Wnt/ β -catenin 信号激动剂或抑制剂对白头翁皂苷 D 药理作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3 \sim 4$)

Fig. 6 Effect of Wnt/ β -catenin pathway activator or inhibitor on pharmacological effects of Pulsatilla saponin D ($\bar{x} \pm s$, $n = 3 \sim 4$)

细胞 EMT。Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活可促进肿瘤发生发展、转移扩散以及对化疗耐药^[23]。Wnt3a 作为经典的 Wnt 配体,在结肠癌组织中高表达,上调 Wnt3a 可促进结肠癌增殖和转移^[24]。 β -catenin 是经典 Wnt/ β -catenin 通路的核心因子, β -catenin 异常高表达是结肠癌的重要病理因素,蓄积的 β -catenin 可导致 Wnt/ β -catenin 信号通路活性增

强,从而激活下游癌基因的转录^[25]。TCF4 也是结肠癌发生发展的重要促进因子,其上调可以诱导结肠癌增殖和侵袭^[26]。 β -catenin/TCF4 相互作用是 Wnt 信号通路中的“分子开关”,可促进肿瘤的转移与复发^[27]。而 c-Myc 作为 β -catenin/TCF 转录复合物的直接靶基因之一,可正向调节多个关键的细胞周期蛋白,促进肿瘤增殖^[28]。GSK-3 β 是 Wnt/ β -catenin

信号通路中的一种激酶,可磷酸化 β -catenin,引发后者的泛素化和蛋白酶降解,从而下调 Wnt/ β -catenin 信号通路活性^[29]。本研究发现,白头翁皂苷 D 显著降低结肠癌细胞 Wnt3a、 β -catenin、TCF4 和 c-Myc 的 mRNA 和蛋白水平,并增强 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白表达。这与白头翁皂苷 D 通过调控 Wnt/ β -catenin 通路抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的结果相似^[30],提示白头翁皂苷 D 可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性来发挥抗结肠癌作用。

EMT 与 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性呈正相关,Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可以促进 EMT 相关因子表达而引发 EMT。此外,Wnt/ β -catenin 信号通路还通过影响肿瘤细胞干性而促进 EMT^[25]。本研究发现,白头翁皂苷 D 可以降低结肠癌细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性,同时抑制结肠癌的 EMT。E-cadherin 与 Vimentin 作为 EMT 标志基因同时也是 Wnt 通路的关键靶标^[31]。结果表明,白头翁皂苷 D 与 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 联用,E-cadherin mRNA 与蛋白表达水平进一步升高,Vimentin mRNA 与蛋白表达水平进一步降低,与 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 SKL2001 联用则相反,表明白头翁皂苷 D 抗结肠癌 EMT 的作用可被 IWR-1 协同增强,也被 SKL2001 拮抗减弱。以上结果表明,白头翁皂苷 D 可抑制结肠癌的 EMT,其机制在于抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。

综上,白头翁皂苷 D 能够显著抑制人结肠癌细胞增殖、侵袭、迁移和恶性转化,调节结肠癌的 EMT 相关基因表达,抑制结肠癌的 Wnt/ β -catenin 信号通路。但是,本文仅在体外实验方面对相关机制进行了研究。今后,将进一步开展体内动物实验,更加深入地揭示白头翁皂苷 D 抗结肠癌 EMT 的分子机制,为临床上使用白头翁防治结肠癌转移提供的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Saha S, Ghosh S, Ghosh S, *et al.* Unraveling the complexities of colorectal cancer and its promising therapies - An updated review [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143(Pt 1): 113325.
- [2] Lou P W, Luo D M, Huang Y T, *et al.* Establishment and validation of a prognostic nomogram for predicting postoperative overall survival in advanced stage III-IV colorectal cancer patients [J]. *Cancer Med*, 2024, 13(22): e70385.
- [3] Guo Y Y, Hu C L, Cai K T, *et al.* KRAS inhibitors may prevent colorectal cancer metachronous metastasis by suppressing TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31(1): 24.
- [4] Tolve Ghasaban F, Moghbeli M. Long non-coding RNAs as the pivotal regulators of epithelial mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin signaling pathway in tumor cells [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 263: 155683.
- [5] Haque M, Shyanti R K, Mishra M K. Targeted therapy approaches for epithelial-mesenchymal transition in triple negative breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1431418.
- [6] Zhao H, Ming T Q, Tang S, *et al.* Wnt signaling in colorectal cancer: Pathogenic role and therapeutic target [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144.
- [7] Wang X P, Xue X X, Pang M S, *et al.* Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer: Signaling pathways and therapeutic targets [J]. *MedComm*, 2024, 5(8): e659.
- [8] Song P, Gao Z R, Bao Y G, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling pathway in carcinogenesis and cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 46.
- [9] Zhao H, Tang S, Tao Q, *et al.* Ursolic acid suppresses colorectal cancer by down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(9): 3981-3993.
- [10] Sun Q, Yang H, Liu M L, *et al.* Berberine suppresses colorectal cancer by regulation of Hedgehog signaling pathway activity and gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154227.
- [11] Ming T Q, Lei J R, Peng Y H, *et al.* Curcumin suppresses colorectal cancer by induction of ferroptosis via regulation of p53 and solute carrier family 7 member 11/glutathione/glutathione peroxidase 4 signaling axis [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(8): 3954-3972.
- [12] 庞淼, 彤小聪, 蔡春娥. 白头翁皂苷 D 对胶质瘤细胞转移和凋亡的影响及机制研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47(6): 587-594.
- [13] 潘巧虹, 周影, 颜卫文, 等. 白头翁皂苷 D 通过调控 circ_0001178/miR-885-5p 对甲状腺癌细胞的生物学行为的影响 [J]. 河北医药, 2024, 46(9): 1296-1300.
- [14] Lu Y Y, He W B, Huang X X, *et al.* Pulsatilla saponin D regulates ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (RAC3) to overcome resistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 55.
- [15] 王凯, 李伟伟, 王佳. 白头翁皂苷 D 介导 AMPK/COX-2 通路对食管癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 河北医药, 2022, 44(13): 1943-1947.
- [16] Wang K, Tu Y B, Wan J B, *et al.* Synergistic anti-breast

- cancer effect of pulsatilla saponin D and camptothecin through interrupting autophagic-lysosomal function and promoting p62-mediated ubiquitinated protein aggregation [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(6): 804-816.
- [17] Son M K, Jung K H, Hong S W, *et al.* SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 26-33.
- [18] Li H, Wu F, Han Y Q, *et al.* CircRNA regulates lung cancer metastasis [J]. *Gene*, 2025, 935: 149060.
- [19] Sun Q, Xu J J, Yuan F E, *et al.* RND1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and temozolomide resistance of glioblastoma via AKT/GSK3- β pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2321770.
- [20] Zhang Z K, Xue B, Chen Y Q, *et al.* A systematic review and meta-analysis combined with bioinformatic analysis on the predictive value of E-cadherin in patients with renal cell carcinoma [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2024, 24(9): 859-871.
- [21] Satam S, Palekar N, Premkumar K, *et al.* Sirtinol, a SIRT1 inhibitor, inhibits the EMT and metastasis of 4T1 breast cancer cells and impacts the tumor microenvironment [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2024, 46(6): 829-842.
- [22] Kielbik M, Szulc-Kielbik I, Klink M. Snail transcription factors - Characteristics, regulation and molecular targets relevant in vital cellular activities of ovarian cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2024, 1871(5): 119705.
- [23] Shen X T, Gao C D, Li H Y, *et al.* Natural compounds: Wnt pathway inhibitors with therapeutic potential in lung cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1250893.
- [24] Zuo X L, Wang X C, Ma T Z, *et al.* TNFRSF19 within the 13q12.12 risk locus functions as a lung cancer suppressor by binding Wnt3a to inhibit Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Cancer Res*, 2024, 22(3): 227-239.
- [25] Sun L B, Xing J P, Zhou X P, *et al.* Wnt/ β -catenin signalling, epithelial-mesenchymal transition and crosslink signalling in colorectal cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 175: 116685.
- [26] Li Y S, Sun J M, Granados-López A J, *et al.* *In vitro* study of miRNA-369-3p targeting TCF4 regulating the malignant biological behavior of colon cancer cells [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2023, 14(5): 2124-2133.
- [27] 付正豪, 闫干干, 戚海燕, 等. 靶向 β -catenin/TCF4 相互作用抑制剂在肿瘤分子治疗中的研究进展 [J]. *药学报*, 2021, 56(5): 1238-1245.
- [28] Tian H Z, Pan Q G, Wu J F, *et al.* Icaritin ameliorates Coxsackievirus B3-induced viral myocarditis by modulating the S100 calcium binding protein A6/ β -catenin/ c-Myc signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156214.
- [29] Luan H W, Wang T, Li F M, *et al.* IGSF9 promotes tumor invasion and metastasis through GSK-3 β / β -catenin mediated EMT in lung cancer [J]. *Neoplasia*, 2024, 58: 101067.
- [30] 冯晓灵, 刘丹. 白头翁皂苷 D 对人乳腺癌 MCF-7 细胞中 Wnt/ β -链蛋白信号通路的影响 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2017, 36(3): 379-383.
- [31] Thapa R, Gupta S, Gupta G, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition to mitigate age-related progression in lung cancer [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 102:102576.

[责任编辑 罗 曦]