

- global burden of disease 2010 study [J]. *Circulation*, 2014, 129 (14):1483 – 1492
- 2 Di Cesare M, Bennett JE, Best N, *et al.* The contributions of risk factor trends to cardiometabolic mortality decline in 26 industrialized countries [J]. *Int J Epidemiol*, 2013, 42(3): 838 – 848
- 3 Hao G, Wang Z, Zhang L, *et al.* Prevalence of microalbuminuria among middle – aged population of China; a multiple center cardiovascular epidemiological study [J]. *Angiology*, 2015, 66(1):49 – 56
- 4 国家“九五”科技攻关课题协作组. 我国中年人群心血管病主要危险因素流行现状及从 80 年代初至 90 年代末的变化趋势 [J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(2): 74 – 79
- 5 武阳丰, 谢高强, 李莹, 等. 中国部分中年人群糖尿病患病率、知晓率、治疗率及控制率现况调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26 (8): 564 – 568
- 6 Zhou M, Astell – Burt T, Bi Y, *et al.* Geographical variation in diabetes prevalence and detection in china; multilevel spatial analysis of 98,058 adults [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(1):72 – 81
- 7 Wang Z, Chen Z, Zhang L, *et al.* Status of hypertension in China; results from the China hypertension survey, 2012 – 2015 [J]. *Circulation*, 2018, 137(22):2344 – 2356
- 8 秦晨曦, 余灿清, 杜怀东, 等. 中国 10 个地区成年人食物摄入频率特征差异的分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(9):911 – 916
- 9 李夏, 吕筠, 郭彧, 等. 中国慢性病前瞻性研究:10 个项目地区成年人饮茶行为特征差异分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(11):1200 – 1204
- 10 Paula TP, Viana LV, Neto AT, *et al.* Effects of the DASH diet and walking on blood pressure in patients with type 2 diabetes and uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2015, 17(11):895 – 901
- 11 Su D, Du H, Zhang X, *et al.* Season and outdoor temperature in relation to detection and control of hypertension in a large rural Chinese population [J]. *Int J Epidemiol*, 2014, 43(6):1835 – 1845
- 12 吴来阳, 王馨, 王增武, 等. 浅谈国内外高血压管理模式 [J]. *中国医学前沿杂志:电子版*, 2015, 7(7):12 – 17
- 13 胡大一, 全其广. 中国胆固醇教育计划——站在新的起跑线上 [J]. *中国医药导刊*, 2008, 10(4):479 – 480
- 14 姜莹莹, 董文兰, 毛凡, 等. 国家慢性病综合防控示范区健康促进工作评价 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2014, 22(2): 129 – 131
- 15 李勇. 创无烟单位对职工控烟知信行改变的效果评价 [J]. *中国健康教育*, 2012, 28(7):581 – 582
- 16 白承续, 徐文婕, 花晨曦, 等. 北京市学校控烟干预效果评价 [J]. *中国生育健康杂志*, 2017, 28(5):461 – 464
- 17 Zhang M, Deng Q, Wang L, *et al.* Prevalence of dyslipidemia and achievement of low – density lipoprotein cholesterol targets in Chinese adults: a nationally representative survey of 163,641 adults [J]. *Int J Cardiol*, 2018; 260:196 – 203
- 18 He J, Gu D, Reynolds K, *et al.* Serum total and lipoprotein cholesterol levels and awareness, treatment, and control of hypercholesterolemia in China [J]. *Circulation*, 2004, 110(4): 405 – 411

(收稿日期:2018 – 06 – 04)

(修回日期:2018 – 06 – 27)

淫羊藿苷通过 Wnt/ β – catenin 信号通路对卵巢癌细胞 CAOV3 增殖的影响

陈 茹 苏 莹 柳 江

摘 要 **目的** 研究淫羊藿苷通过 Wnt/ β – catenin 信号通路抑制卵巢癌细胞 CAOV3 的增殖。**方法** 通过四甲基偶氮唑盐 (MTT) 实验选择适当的淫羊藿苷浓度并探讨其对卵巢癌细胞 CAOV3 生长、增殖的影响, 倒置显微镜观察细胞形态学变化, 采用荧光实时定量 PCR (RT – PCR) 法检测 β – catenin 及 Wnt 信号通路靶基因 c – myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达水平, 利用 Western blot 法检测 β – catenin、c – myc 和 cyclinD1 的蛋白表达水平。**结果** MTT 结果显示, 淫羊藿苷能显著抑制 CAOV3 的生长增殖; 倒置显微镜下发现淫羊藿苷能使 CAOV3 细胞形态发生明显变化; RT – PCR 检测结果表明淫羊藿苷可降低 β – catenin 的 mRNA 的表达以及抑制 Wnt 信号通路靶基因 c – myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达; Western blot 法检测结果表明淫羊藿苷可下调 β – catenin、c – myc 和 cyclinD1 的蛋白表达。**结论** 淫羊藿苷可以抑制人卵巢癌细胞 CAOV3 增殖, 其机制可能是通过抑制 Wnt/ β – catenin 信号通路来实现的。

关键词 淫羊藿苷 卵巢癌细胞 CAOV3 Wnt/ β – catenin 信号通路

中图分类号 R737.31

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.011

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2014211C132)

作者单位:830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院肿瘤科

通讯作者:柳江, 电子信箱:dempseywell@163.com

Effects of Icariin on the Proliferation of Ovarian Cancer CAOV3 by Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. Chen Ru, Su Ying, Liu Jiang.
Department of Oncology, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Xinjiang 830001, China

Abstract Objective To study the inhibitory effect of icariin on the growth of ovarian cancer cell line CAOV3 through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** The concentration of icariin and the effect of icariin on the growth and proliferation of ovarian cancer cell line CAOV3 were detected by MTT assay. The morphological changes were observed by inverted microscope. The RT-PCR method was used to detect the mRNA levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 in Wnt signaling pathway. The protein expression levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 were detected by Western blot. **Results** MTT assay showed that icariin significantly inhibited the proliferation of CAOV3 cells, and the morphological changes of CAOV3 cells were observed under inverted microscope. The results of RT-PCR showed that icariin could decrease the expression of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 mRNA in Wnt signaling pathway. Western blot analysis showed that icariin could down-regulate the protein expression of β -catenin, c-Myc and cyclinD1. **Conclusion** Icariin can inhibit the proliferation of human ovarian cancer cell line CAOV3, and its mechanism may be achieved by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words Icariin; Ovarian cancer cell line CAOV3; Wnt/ β -catenin signaling pathway

在妇科恶性肿瘤中,卵巢癌属于高发类型,在全球范围内,卵巢癌在女性癌症病死率中占第 15 位^[1]。近年来卵巢癌的发生率呈逐年升高的趋势,并且其具有病程发展迅速、病死率高的特点。由于卵巢癌在早期没有典型的临床病症、肿瘤细胞增殖速度迅速及恶化程度极高、没有准确性较高的肿瘤标志物等有效的筛查手段等原因,在确诊卵巢癌时已经有约 70% 的病例处于晚期^[2]。目前,临床上对于卵巢癌的治疗手段多数以手术为主化疗为辅,但治疗效果仍然不容乐观^[3]。

Wnt 属于分泌性糖蛋白家族,是调控细胞增殖、细胞分化、细胞迁移及细胞极性的关键信号分子。当 Wnt 信号通路发生异常调节时,可引起免疫机制的失衡,并参与肿瘤的发生、发展^[4]。 β -catenin 属于一种多功能胞质蛋白,在 Wnt 信号通路中起到重要作用,不仅是 Wnt 信号转导通路的关键调控点,还是上皮钙黏素复合体的主要成分^[5-7]。在生理状态下,胞质内的大部分 β -catenin 参与细胞黏附,而当 Wnt 信号通路激活后可抑制 β -catenin 的降解及磷酸化,使得多余的 β -catenin 与核内的转录因子结合,启动与细胞增殖有关的基因发生转录^[8-10]。因此,Wnt/ β -catenin 信号通路与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。

淫羊藿含有多种药理活性成分,除了一些必需微量元素外,主要含有生物碱、黄酮类等化合物。中药淫羊藿具有多种药理活性,如增强性腺功能、提高机体免疫力、抗氧化延缓衰老等作用,其中淫羊藿苷(icariin)属黄酮类化合物,是淫羊藿的主要活性成分之一^[11]。有研究报道证实,淫羊藿苷可抑制肿瘤细胞增殖及恶化,诱导癌细胞凋亡,但关于淫羊藿苷对

卵巢癌的研究报道较为少见^[12]。

本实验旨在研究淫羊藿苷对人卵巢癌细胞 CAOV3 生长抑制及过程中可能的相关机制,为淫羊藿苷在临床上对卵巢癌的治疗奠定基础。

资料与方法

1. 材料和试剂:淫羊藿苷、MTT (Sigma, Saint Louis, MO, USA);人卵巢癌细胞 CAOV3 (中国科学院细胞库,上海,中国);GAPDH、 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 人一抗、HRP 标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,武汉,中国);DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA);RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光实时定量 PCR (RT-PCR) 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),引物合成 (TaKaRa, 大连,中国);BCA 蛋白定量试剂盒、细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司,南通市,中国)。

2. 细胞培养:人卵巢癌细胞 CAOV3 在 37℃、5% CO₂ 的条件下孵箱中培养,培养细胞数量达 85% 融合时,胰酶消化处理后,用 DMEM (含 10% 胎牛血清)培养基稀释细胞悬液,将细胞目的浓度调整为 2×10^8 /L,计数后接种于对应的培养板中,备后续实验使用。

3. 检测细胞增殖抑制率:淫羊藿苷处理细胞后 MTT 比色测定细胞增殖能力:将细胞 CAOV3 接种于 96 孔板中,浓度为 1×10^5 /ml,每孔 100 μ l。24h 后加入淫羊藿苷(终浓度分别为 10、20、40、60、80 μ g/ml),每个浓度重复 5 个孔,独立重复 6 次,对照组不给药。在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养孵育 24、48 及 72h,换去药液。每孔加入 10 μ l 的 MTT,浓度为 5mg/ml,4h 后,通过酶标仪检测各孔 570 nm 波长的吸光度(A)值。按以下公式计算细胞抑制率:抑制率(%)=(正

常对照组 A 值 - 实验组 A 值 / 正常对照组 A 值) × 100%。

4. 细胞形态学观察: 将人卵巢癌细胞 CAOV3 培养好后, 分别用含 0、20、40 和 60 μg/ml 淫羊藿苷的培养液, 在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养 24h, 各组用倒置显微镜 (Nikon, Tokyo, Japan) 观察并拍摄细胞形态变化。

5. RT-PCR 检测 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达: 将培养好的细胞接种于 6 孔板, 10⁴ 个细胞/孔, 24h 后吸去上清液, 分别用含 0、20、40 和 60 μg/ml 淫羊藿苷的培养液培养 24h 后, 收集各组细胞, 依照 RNA 提取试剂盒说明书中的方法提取待检组织中的总 RNA, 采用紫外可见分光光度计 (日本 Hitachi 公司) 检测总 RNA 的浓度和纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$ 为合格)。然后按照反转录试剂盒说明书方法进行反转录得到 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 按照 RT-PCR 试剂盒说明书方法检测 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达。引物序列如表 1 所示, 反应条件为: 95℃ 10min, 95℃ 15s, 60℃ 1min, 扩增 40 个循环。从仪器软件中输出 Ct 值, 计算相对表达量采用 2^{-ΔCt} 方法, 按照下列公式计算: ΔCt (目的基因) = Ct (目的基因) - Ct (对照基因)。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')
β-catenin	正向引物 GCTTGGAAATGAGACTGCTGA
	反向引物 CTGGCCATATCCACCAGAGT
c-myc	正向引物 AGCGACTCTGAGGAGGAACA
	反向引物 TCCAGCAGAAGGTGATCCA
cyclinD1	正向引物 TGCCACAGATGTGAAGTTCATT
	反向引物 CAGTCCGGGTCACACTTGAT
GAPDH	正向引物 CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
	反向引物 GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

6. Western blot 法检测 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白的表达: 将培养好的细胞接种于 6 孔板, 10⁴ 个细胞/孔, 24h 后吸去上清液, 分别用含 0、20、40 和 60 μg/ml 淫羊藿苷的培养液培养 24h 后, 收集各组

细胞, 用细胞裂解液裂解细胞, 高速离心机低温离心 15min, 收集上清。用 BCA 试剂盒测定提取蛋白浓度, 取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 将分离的蛋白电转移至 PVDF 膜上。封闭液室温封闭 1h, 加入一抗孵育 (1:1000), 4℃ 过夜。TTBS 充分洗膜后, 加入二抗 (1:2000) 室温孵育 1h, ECL 暗室显影, 凝胶成像仪 (Bio-Rad Laboratories, California, USA) 扫描纪录, 以 GAPDH 作为内参, 进行灰度分析比较。

7. 统计学处理: 采用 SPSS 17.0 统计学软件处理数据, 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, ANOVA 单因素方差分析对所得数据进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 淫羊藿苷对 CAOV3 细胞增殖抑制的影响: 分别用含 0、10、20、40、60、80 μg/ml 淫羊藿苷的培养液培养 24、48、72h 后, 各组中均可显著抑制 CAOV3 细胞的增殖, 随着浓度和时间的增加, 增殖抑制率明显升高 ($P < 0.01$), 并呈现出明显的剂量依赖性。详见表 2。在本研究的后续实验中选取 20、40、60 μg/ml 淫羊藿苷作为给药浓度, 作用时间为 24h。

表 2 不同浓度淫羊藿苷对 CAOV3 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

浓度 (μg/ml)	增殖抑制率		
	24h	48h	72h
对照组 (0)	0	0	0
10	2.91 ± 0.12 *	5.32 ± 1.13 *	8.92 ± 1.33 *
20	13.43 ± 0.31 *	18.32 ± 2.31 *	22.25 ± 1.12 *
40	24.75 ± 1.32 *	28.51 ± 1.28 *	36.47 ± 2.21 *
60	41.23 ± 2.21 *	49.43 ± 1.41 *	56.43 ± 2.01 *
80	47.43 ± 2.62 *	58.43 ± 3.27 *	67.43 ± 1.78 *

与对照组比较, * $P < 0.01$

2. 淫羊藿苷对 CAOV3 细胞形态的影响: 如图 1 所示, 与对照组比较, 分别用含 20、40、60 μg/ml 淫羊藿苷的培养液培养 24h 后, 各组中细胞形态明显改变, 细胞皱缩, 贴壁不牢, 增殖细胞数明显得到抑制, 并且具有明显的剂量依赖性。

淫羊藿苷 (μg/ml)

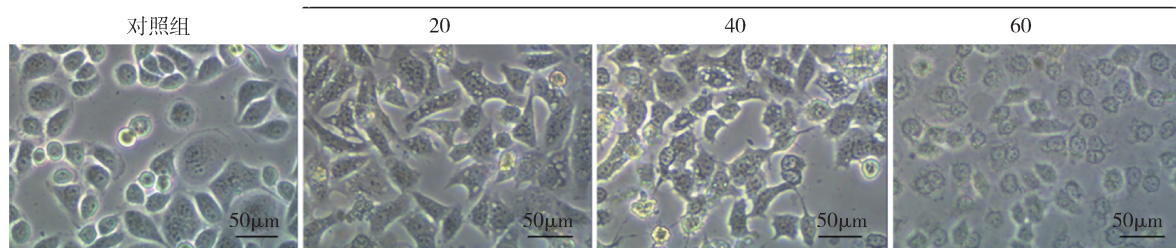


图 1 不同浓度的淫羊藿苷处理 24h 后, 倒置显微镜下观察淫羊藿苷对 CAOV3 细胞形态的影响

3. 淫羊藿苷对 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 mRNA 水平的影响:如图 2 所示,分别用含 20、40、60 $\mu\text{g/ml}$ 淫羊藿苷的培养液培养 24h 后,与对照组比

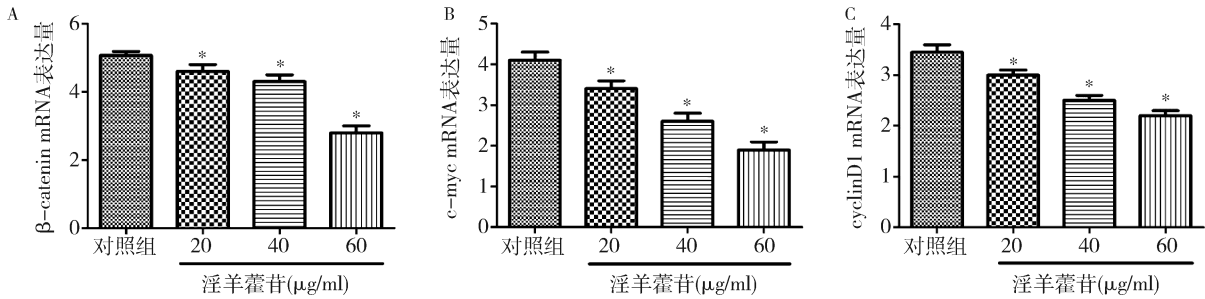


图 2 RT-PCR 检测淫羊藿苷对 CAOV3 细胞 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达水平的影响
A. β -catenin mRNA 的表达;B. c-myc mRNA 的表达;C. cyclinD1 mRNA 的表达。与对照组比较,淫羊藿苷各浓度组中 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 的表达水平均被显著抑制,* $P < 0.01$

4. 淫羊藿苷对 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达水平的影响:分别用含 20、40、60 $\mu\text{g/ml}$ 淫羊藿苷的培养液培养 24h 后,与对照组比较,各组中 β -

catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达水平也被显著抑制 ($P < 0.01$),且具有一定的浓度依赖性(图 3)。

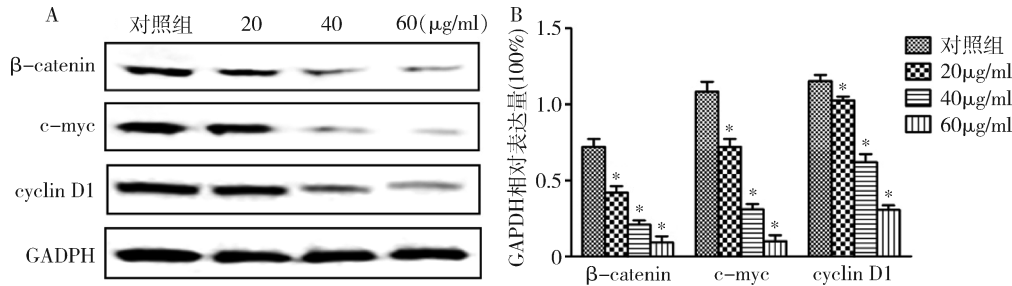


图 3 Western blot 法检测淫羊藿苷对 CAOV3 细胞 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 的蛋白结果
A. β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 的蛋白;B. β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白的灰度分析结果,* $P < 0.01$

讨 论

卵巢癌以其恶化程度高,病情进展迅速为特点,是病死率较高的妇科恶性肿瘤,而早期缺乏有效的筛查手段以及长期有效的治疗方案的缺乏是卵巢癌病死率居高不下的原因。因此,寻找新的有效的治疗方法一直以来都是卵巢癌研究领域的热点。

β -catenin 作为一种细胞间的黏附分子,当其存在于细胞膜上时有参与细胞黏附的功能,一旦发生细胞核的转位或被降解,黏附活性则消失^[13]。有研究表明 β -catenin 不仅有介导细胞黏附的功能,还具有信号转导作用,Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活是人类肿瘤发生的重要机制之一, β -catenin 的过度表达也是此信号通路激活的主要表现^[14]。原癌基因 cyclinD1 和 c-myc,在细胞的增生、分化与凋亡过程中起到重要作用,并且与多种肿瘤发生、发展有关。近年来研究显示,cyclinD1、c-myc 在 Wnt 信号通路

中是非常重要的靶基因,免疫组化研究证实多种肿瘤中 cyclinD1、c-myc、 β -catenin 的异常表达和 Wnt 信号通路激活有关,Wnt 信号途径激活时,进入细胞核的 β -catenin 增加,进一步活化 cyclinD1 和 c-myc 等基因的表达,促进细胞增殖^[15,16]。在细胞核内,如果 β -catenin 异常蓄积并活化基因时, β -catenin 基因就成了癌基因,已有研究证明 β -catenin 与多种消化系统、血液系统、生殖系统的肿瘤发生有关^[17]。

本实验中在卵巢癌细胞 CAOV3 中分别加入不同终浓度的淫羊藿苷,24、48 及 72h 后检测指标。MTT 检测结果显示,与对照组比较,淫羊藿苷能显著抑制细胞 CAOV3 的活性,随着浓度和时间的增加,增殖抑制率明显升高,并呈现出明显的浓度依赖性。淫羊藿为一种常见中药,具有免疫调节、延缓衰老等作用,在大量肝癌、乳腺癌等疾病的研究中淫羊藿苷有明显的

抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡的作用^[18,19]。目前,对淫羊藿苷抑制卵巢癌细胞 CAOV3 增殖的作用机制尚未完全明确,推测可能是通过改变 CAOV3 细胞膜生化特性、使其细胞周期相的 S 期减小,影响其生理活动和物质代谢进而抑制 CAOV3 细胞生长。国外有相关研究表明淫羊藿苷可明显调节影响肺癌恶性增殖的 JAK2/STAT3 信号通路的活性^[20]。结合本研究结果,证明淫羊藿苷在体外具有抑制 CAOV3 细胞增殖的作用。倒置显微镜下发现淫羊藿苷处理以后,增殖的 CAOV3 细胞数目减少,形态发生明显变化,细胞逐渐皱缩,从细胞形态学上进一步证明淫羊藿苷在体外具有明显抑制 CAOV3 细胞生长的作用。分析其原因,可能是随着淫羊藿苷浓度的增加及药效的深入,抑制 CAOV3 细胞增殖的效果增强,加剧 CAOV3 细胞的凋亡,明显降低其迁徙能力,因而在形态学上表现出明显的细胞逐渐皱缩并数目减少。

RT-PCR 检测结果表明,淫羊藿苷可降低 β -catenin mRNA 的表达以及抑制 Wnt 信号通路靶基因 c-myc 和 cyclinD1 mRNA 的表达,分析原因可能为 cyclinD1 为特异性周期蛋白,在正常细胞的增殖和生长过程中起着主要作用,其过度表达是多种原发性恶性肿瘤的特征;c-myc 是 myc 基因家族的重要成员之一,是一种可使细胞无限增殖、促进细胞分裂的基因,其低表达,能使细胞生长停滞、促进细胞分化。cyclinD1 和 c-myc 在 Wnt 信号通路中起着核心作用,两者共同影响肿瘤疾病的进展, β -catenin 基因则主要通过激活 cyclinD1 而参与肿瘤的发生。

淫羊藿苷对细胞周期有特异的阻断作用,能干扰和抑制 DNA 的复制与合成,杀伤处于增殖期的细胞。因此,淫羊藿苷抑制癌细胞增殖的作用可能是通过抑制 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 mRNA 水平的表达。Utsuki 等^[21]对患者肿瘤组织中 cyclinD1 和 β -catenin 的表达水平进行分析发现,随着肿瘤的恶化, cyclinD1 和 β -catenin 的 mRNA 表达水平逐渐升高。此外,还有研究发现,肾母细胞瘤细胞中 β -catenin、cyclinD1 和 c-myc mRNA 的阳性表达率较正常肾组织明显升高,说明 β -catenin、cyclinD1 和 c-myc mRNA 的高表达在肾母细胞瘤形成中可能起着重要作用^[22]。其研究结论与本研究相结合能够更好的说明淫羊藿苷的作用机制是通过降低 β -catenin、cyclinD1 和 c-myc 的表达,并且 Western blot 法检测结果同时也表明淫羊藿苷可下调 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 的蛋白表达。表明淫羊藿苷能够下调 β -

catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白,使其不能与核内的转录因子结合,进而影响细胞的增殖。Li 等^[23]研究表明,淫羊藿苷能够通过作用于 microRNA-21 进而影响 PTEN、RECK 和 Bcl-2 蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的增殖,并诱导肿瘤细胞发生凋亡。本研究发现淫羊藿苷抗肿瘤的新的作用机制,即通过降低 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 的表达,产生抑制肿瘤细胞增殖的作用。本实验结果可为淫羊藿苷对卵巢癌的药物治疗作用提供一定的理论基础。

综上所述,本研究证明淫羊藿苷可以抑制人卵巢癌 CAOV3 细胞株的增殖,其作用机制可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来实现的。

参考文献

- 狄文,胡媛. 卵巢癌的大数据研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(1):18-22
- Varga D, Deniz M, Schwentner L, et al. Ovarian cancer: in search of better marker systems based on DNA repair defects[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(1):640-673
- Yang L, Zhang B, Xing G, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus primary debulking surgery in advanced epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of peri-operative outcome[J]. PLoS One, 2017, 12(10):e0186725
- Che J, Yue D, Zhang B, et al. Claudin-3 inhibits lung squamous cell carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and invasion via suppression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Int J Med Sci, 2018,15(4):339-351
- 宋盼盼,钱晓云,周函,等. 上皮钙黏蛋白和神经钙黏蛋白以及 β -连环蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,51(6):440-445
- Wang B, Tian T, Kalland KH, et al. Targeting Wnt/ β -catenin signaling for cancer immunotherapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, S0165-6147(18):30060-30069
- 移志刚,周开升,蒲彦川,等. Wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤耐药中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2016,43(6):455-457
- 吴校林,朱锐,李彬,等. Wnt3a 通过整合素连接激酶调节血管平滑肌细胞迁移和黏附[J]. 重庆医学,2017,46(36):5049-5051
- 纪晓花,王玲,高占海,等. β -catenin 与食管鳞癌发生发展的关系[J]. 山东医药,2016,56(19):103-105
- 王文娟,赵丹,徐静,等. 双氢青蒿素通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号抑制骨肉瘤细胞系体外增殖和侵袭[J]. 基础医学与临床, 2014,34(8):1017-1022
- 纪昕. 淫羊藿苷免疫调节作用的研究进展[J]. 河北医药,2016, 38(5):753-756
- 马婷,王丽娜,李子坚,等. 淫羊藿苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(9):1505-1508
- 孙琳,张文静,吴靖芳. E-钙黏素、 β -连环蛋白与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国老年学,2017,37(11):2832-2834
- 戴朦,沈国栋,王俊,等. Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白在卵巢癌中的改变[J]. 中国临床保健杂志,2016,19(4):441-444

- 15 杨志烈,王成龙,赵东峰,等. 淫羊藿苷对环磷酰胺化疗导致小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化障碍的保护作用[J]. 中国组织工程研究,2016,20(6):777-784
- 16 郭建霞,张小云,赵春林,等. Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子与结肠癌患者预后的相关性研究[J]. 河北医药,2016,38(3):371-373
- 17 李华,周德俊. Wnt2/ β -catenin 信号通路及其在肿瘤中的作用[J]. 广东医学,2015,36(2):320-323
- 18 张淑琴,负向阳,郑倩,等. 淫羊藿素对 3 种人肿瘤细胞增殖抑制作用的比较[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(8):1919-1921
- 19 郭莉,张炯,柴生颢,等. 淫羊藿苷对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(3):643-645
- 20 Zhu S, Wang Z, Li Z, *et al.* Icaritin suppresses multiple myeloma, by inhibiting IL - 6/JAK2/STAT3 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12):10460-10472
- 21 Utsuki S, Sato Y, Oka H, *et al.* Relationship between the expression of E - , N - cadherins and beta - catenin and tumor grade in astrocytomas [J]. *J Neurooncol*, 2002, 5(3):187-192
- 22 Yang J, Jiang H, Wang X, *et al.* The expression and clinical significance of β - catenin, cyclinD1 and C - myc in childhood nephroblastoma[J]. *J China Pediatric Blood & Cancer*, 2013, 18(3):116-119
- 23 Li J, Jiang K, Zhao F. Icaritin regulates the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells through microRNA - 21 by targeting PTEN, RECK and Bel - 2 [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6):2829-2836

(收稿日期:2018-05-07)

(修回日期:2018-06-14)

NLRP3/caspase - 1/IL - 1 β 信号通路在 HK - 2 细胞高糖缺氧复氧损伤中的作用

肖业达 黄亚医 黄 婷 汪华新 赵 博 王雅枫

摘 要 **目的** 探讨 Nod 样受体蛋白 3 炎性体(nod - like receptor protein - 3, NLRP3)/半胱天冬酶 - 1(caspase - 1)/白介素 - 1 β (interleukin - 1 β , IL - 1 β)信号通路介导的高糖缺氧复氧诱导人肾小管上皮细胞(human renal proximal tubular cells, HK - 2)的损伤。**方法** 采用数字表法将人肾小管上皮细胞(HK - 2)随机分为 5 组($n = 5$),即低糖组(NG 组)、低糖缺氧复氧组(NHR 组)、高糖组(HG 组)、高糖缺氧复氧组(HHR 组)和高糖缺氧复氧 + NLRP3 抑制剂 BAY11 - 7082(5 μ mol/L)组(HHR - BAY 组)。采用高糖(30mmol/L)刺激 72h 建立高糖模型,缺氧 4h 复氧 2h 建立缺氧复氧模型。CCK - 8 检测细胞存活率;酶标仪测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性;荧光探针 DCFH - DA 法检测细胞内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)含量;ELISA 法检测 IL - 1 β 含量和 caspase - 1 活性;免疫印迹法和免疫荧光法检测细胞 NLRP3 蛋白的表达。**结果** 与 NG 组比较, NHR 组与 HG 组 ROS 和 IL - 1 β 含量, caspase - 1 活性, NLRP3 表达升高, 细胞存活率, SOD 活性降低(P 均 < 0.05); 分别与 HG 组和 NHR 组比较, HHR 组 ROS 和 IL - 1 β 含量, caspase - 1 活性, NLRP3 表达升高, 细胞存活率, SOD 活性降低(P 均 < 0.05); 而 NLRP3 抑制剂 BAY11 - 7082 预处理可显著抑制细胞损伤和氧化应激水平, 下调 NLRP3 蛋白水平, caspase - 1 活性和 IL - 1 β 含量(P 均 < 0.05)。**结论** NLRP3/caspase - 1/IL - 1 β 信号通路参与了高糖缺氧复氧诱导的 HK - 2 细胞损伤过程。

关键词 NLRP3/caspase - 1/IL - 1 β 信号通路 高糖 缺氧复氧 人肾小管上皮细胞

中图分类号 R692.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.012

Role of NLRP3/Caspase - 1/IL - 1 β Signaling Pathway in High Glucose and Hypoxia/reoxygenation Induced Injury in Human Renal Proximal Tubular Cells. Xiao Yeda, Huang Yayi, Huang Ting, *et al.* Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To evaluate whether NLRP3/caspase - 1/IL - 1 β signaling pathway mediates high glucose and hypoxia/reoxygenation induced injury in human renal proximal tubular cells (HK - 2). **Methods** HK - 2 cells were randomly divided into five groups ($n = 5$): normal glucose group (group NG), normal glucose and hypoxia/reoxygenation group (group NHR), high glucose group (group HG), high glucose and hypoxia/reoxygenation group (group HHR), high glucose and hypoxia/reoxygenation + BAY11 - 7082 (NLRP3

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2016CFB167);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042017k0147)

作者单位:430060 武汉大学人民医院麻醉科

通讯作者:肖业达,电子信箱:xiaoyeda008@126.com