

# 羟基红花黄色素 A 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制卵巢癌生长

龚建明 周莹巧 林 琪

**摘要** 目的 研究羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 对卵巢癌的抑制作用及其机制。方法 HSYA 作用卵巢癌细胞株 HO-8910PM 24h 后, CCK-8 法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot 法检测卵巢癌细胞中 Nuclear  $\beta$ -catenin、menin、MMP7、Survivin 蛋白的表达; 建立起裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型, 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 menin、MMP7、Survivin 阳性表达。结果 与对照组比较, HSYA 可明显抑制体外卵巢癌细胞生长, 并诱导细胞凋亡; HSYA 可抑制卵巢癌细胞 Nuclear  $\beta$ -catenin、MMP7、Survivin 蛋白表达, 而促进细胞内 menin 蛋白表达; 体内实验中 HSYA 可显著抑制裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长, 亦降低卵巢癌组织中 MMP7、Survivin 的阳性表达, 但促进癌组织中 menin 阳性表达。结论 HSYA 可能通过促进 menin 表达, 导致  $\beta$ -catenin 降解, 减少下游的癌基因 MMP-7、Survivin 表达, 进而抑制卵巢癌细胞的生长, 促进其凋亡。

**关键词** 羟基红花黄色素 A Nuclear  $\beta$ -catenin Menin MMP7 Survivin

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.028

**Hydroxysafflor Yellow A Inhibits Ovarian Cancer Growth through Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway.** Gong Jianming, Zhou Yingqiao, Lin Qi. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To explore the effect and the mechanism of HSYA in the growth inhibition of ovarian cancer. **Methods** After ovarian cancer cells HO-8910PM were treated with HSYA for 24h, cell growth was measured by the cell counting Kit-8 (CCK-8) and apoptosis was evaluated by flow cytometry. The expression of Nuclear  $\beta$ -catenin, menin, MMP7, Survivin in ovarian cancer cells was analyzed by Western blot assay. HO-8910PM cells were injected into nude mice to establish engrafted tumor model. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of menin, MMP7, Survivin in the ovarian tumors. **Results** Compared with the control group, HSYA could significantly inhibit the growth of ovarian cancer cells in vitro and induce apoptosis. HSYA can inhibit the expression of Nuclear  $\beta$ -catenin, MMP7 and Survivin in ovarian cancer cells, and promote the expression of menin in cells. In vivo experiment HSYA can markedly inhibit the growth of ovarian cancer transplanted subcutaneously in nude mice. After HSYA treatment, the positive expression of MMP7 and Survivin in ovarian cancer tissue decreased, while the expression of menin increased. **Conclusion** HSYA may inhibit the growth and promote apoptosis of ovarian cancer cells by promoting the expression of menin, leading to the degradation of  $\beta$ -catenin and reducing the expression of MMP-7 and Survivin.

**Key words** HSYA; Nuclear  $\beta$ -catenin; Menin; MMP7; Survivin

卵巢癌是女性生殖器官常见的肿瘤之一, 病死率位居第 1 位, 对女性生命造成严重威胁。尽管目前手术及化疗技术有一定的改进, 但复发率和耐药性仍较高。故迫切需要寻找一种有效的抗卵巢癌的药物。Meselhy 等<sup>[1]</sup>从红花中分离得到羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA), 该成分是红花活血化瘀的主要有效成分。历代医书均有详细记载, 已有报道其对多种瘀血凝结阻滞型恶性肿瘤均有疗效, 但

其抗癌机制有待进一步研究<sup>[2,3]</sup>。本研究探讨 HSYA 对体内外卵巢癌生长的影响及其机制, 为 HSYA 治疗卵巢癌提供有益的实验基础。

## 材料与方法

1. 药品试剂: CCK-8 试剂盒、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 胎牛血清、RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; Nuclear  $\beta$ -catenin、menin、MMP7、Survivin 抗体购自美国 Sigma 公司; 细胞核蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 人卵巢癌细胞株 HO-8910PM 购自中科院上海细胞库; HSYA 标准品购自中国药品生物制品检定所, 取 HSYA 用 0.9% 氯化钠溶液配置

基金项目: 浙江省温州市公益性科技计划项目 (Y20160034)

作者单位: 325000 温州医科大学附属第一医院妇产科

通讯作者: 龚建明, 电子信箱: jamydoctor@126.com

成所需的浓度,微孔滤膜过滤除菌, -20℃ 保存代用。雌性 BALB/c 裸鼠, 8 ~ 10 周龄, 体质量 18 ~ 20g, 购自中科院上海实验动物中心。

2. 细胞培养及分组: 细胞株 HO - 8910PM 培养在含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液中, 培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱下培养。细胞实验分为两组, 即对照组 (以 0.9% 灭菌氯化钠溶液处理细胞株 HO - 8910PM) 和 HSYA 组 (以 200 μmol/L HSYA 作用 HO - 8910PM 24h)。

3. CCK - 8 法检测细胞增殖: 收集处于对数生长期的 HO - 8910PM 细胞, 制成单细胞悬液, 接种到 96 孔板, 各孔细胞均匀, 过夜贴壁后, 分别加入不同浓度 HSYA (50、100、200 和 400 μmol/L), 每组 3 孔, 置于 37℃ 培养箱作用 24h, 同时设置空白调零组, 以及阴性对照组。药物作用结束前 1h, 各孔加入 CCK - 8 溶液 0.01ml, 继续培养 1h, 酶标仪测 A450 值, 实验重复 3 次。细胞存活率 = (实验组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) / (对照组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) × 100%。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡: 将对数生长期 HO - 8910PM 细胞 (1 × 10<sup>6</sup> 个/ml) 接种在 6 孔培养板中, HSYA 组每孔加入 200 μmol/L HSYA 作用 24h, 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化, 1000r/min 离心 5min, 按试剂盒说明 1:1:50 比例将 AnnexinV - FITC、PI、HEPES 缓冲液配成染液, 每 100 μl 染液重悬 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 室温避光培养 15min 上机检测, 激发波长 488nm, 发射波长 530nm。

5. Western blot 法检测卵巢癌 HO - 8910PM 细胞 Nuclear β - catenin、menin、MMP7、Survivin 蛋白的表达: 收集各组细胞, 加入含有 PMSF 的细胞裂解液, 提取上清液为细胞总蛋白。按试剂盒说明书提取细胞核蛋白。测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品上样, 于 12% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2h, 转膜, 用 10% 脱脂奶粉封闭后加入 β - catenin 抗体、menin 抗体、MMP7 抗体、Survivin 抗体为第一抗体, 4℃ 过夜, 再度洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗中, 室温孵育 2h, ECL 显色, X 线胶片曝光。

6. 裸鼠卵巢癌皮下移植瘤的建立: 选择 8 ~ 10 周龄雌性 BALB/c 裸鼠, 将 2 × 10<sup>6</sup> 个 HO - 8910PM 细胞悬浮于 0.2ml 培养基中, 注射到裸鼠背部靠近右侧后肢皮下建立裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型, 接种 2 周后, 挑选出移植瘤体积直径约 10mm 的裸鼠。再将

组灌胃予 0.9% 氯化钠溶液 0.2ml/只; HSYA 组灌胃予 HSYA 50mg/kg, 每 2 天给药 1 次, 共 2 周。第 8 周处死裸鼠留取皮下移植瘤组织。

7. 免疫组织化学法检测 menin、MMP7、Survivin 表达: 所有标本经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 石蜡切片脱蜡水化后, 按照试剂盒所示的操作步骤进行染色, 在高倍镜 (×400) 下随机选择 20 个视野, 计算镜下阳性细胞所占比例。

8. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析, 结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. HSYA 对卵巢癌 HO - 8910PM 细胞增殖的影响: 卵巢癌 HO - 8910PM 细胞经不同浓度 HSYA (50、100、200 和 400 μmol/L) 作用 24h 后, 细胞存活率分别为 79.3%、63.7%、49.5% 和 37.6%, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (*P* 均 < 0.01); HSYA 作用卵巢癌 HO - 8910PM 细胞 24h 后 IC<sub>50</sub> 为 179.4 μmol/L, 因此本实验中选取 HSYA 最佳浓度为 200 μmol/L。

2. HSYA 对卵巢癌 HO - 8910PM 细胞凋亡的影响: 200 μmol/L HSYA 作用 HO - 8910PM 细胞 24h 后, 诱导 10.73% ± 2.38% 的 HO - 8910PM 细胞凋亡, 与对照组 (4.91% ± 0.15%) 比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。

3. HSYA 对卵巢癌 HO - 8910PM 细胞内 Nuclear β - catenin、menin、MMP7、Survivin 蛋白表达的影响: 与对照组比较, HSYA 组 Nuclear β - catenin、MMP7、Survivin 蛋白表达水平均下降 (*P* < 0.01, *P* < 0.01, *P* < 0.05)。HSYA 组 menin 蛋白与对照组比较表达水平明显上调 (*P* < 0.01, 图 1)。

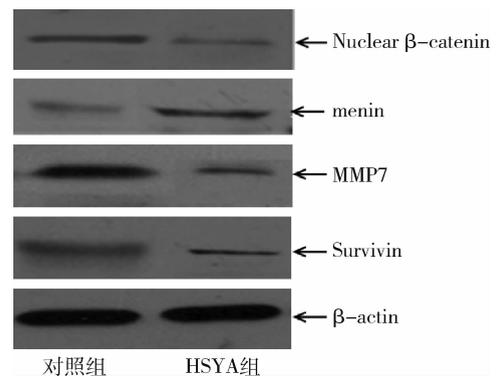


图 1 HSYA 对 HO - 8910PM 细胞 Nuclear β - catenin、menin、MMP7、Survivin 蛋白表达的影响

4. HSYA 对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长的抑制作用:实验结束后,仔细剥离皮下移植瘤组织并称量,HSYA 组肿瘤平均重量为  $0.66 \pm 0.08g$ ,与对照组 ( $1.01 \pm 0.18g$ ) 比较,瘤重明显减轻 ( $P < 0.01$ ),抑瘤率为 34.7%。

5. HSYA 对裸鼠肿瘤组织中 menin、MMP7、Survivin 表达的影响:免疫组织化学染色可见 HSYA 组肿瘤组织中 menin、MMP7 和 Survivin 阳性表达率分别为  $43.6\% \pm 5.1\%$ 、 $11.9\% \pm 2.6\%$  和  $21.3\% \pm 1.8\%$ ,对照组肿瘤组织中 menin、MMP7 和 Survivin 蛋白阳性表达率分别为  $15.3\% \pm 2.7\%$ 、 $29.6\% \pm 3.8\%$  和  $56.1\% \pm 4.7\%$ ;与对照组比较,HSYA 组肿瘤组织中 MMP7 和 Survivin 阳性表达率均下降,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );menin 阳性表达率明显上调 ( $P < 0.01$ ),详见图 2。

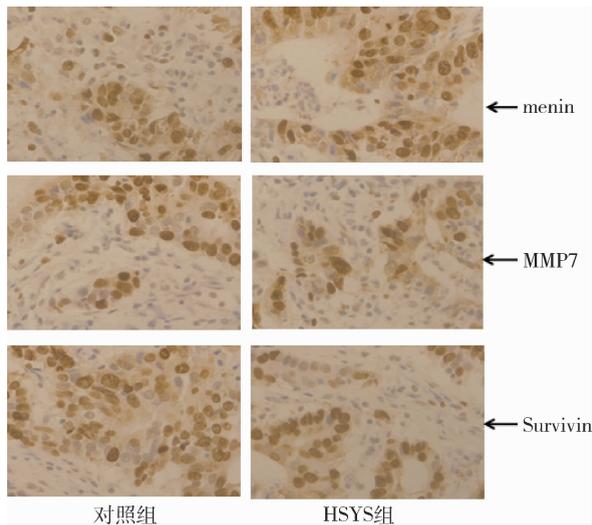


图 2 HSYA 对裸鼠肿瘤组织中 menin、MMP7、Survivin 表达的影响 ( $\times 400$ )

### 讨 论

HSYA 为红花中提取的活血功效成分,具有活血通经,散瘀止痛的作用,有助于局部肿块的消散及改善微循环,增强巨噬细胞的吞噬能力,有利减少肿瘤的转移和扩散<sup>[4,5]</sup>。在治疗胰腺癌、肠癌、肾癌及宫颈癌等多种恶性肿瘤,均有较多的研究。但在治疗卵巢癌方面研究甚少。

在体外实验中,HSYA 能抑制体外卵巢癌 HO - 8910PM 细胞的生长,同时流式检测凋亡表明 HSYA 能促进卵巢癌细胞凋亡。在体内实验中,建立起卵巢癌移植瘤模型,观察到 HSYA 可显著抑制卵巢癌移植瘤生长。本研究进一步阐述 HSYA 抗卵巢癌机制

的分子机制,可能与 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路相关。

Wnt 信号通路是一条在进化上高度保守的信号途径,它有着广泛的生物学效应,对细胞增殖、细胞分化、凋亡和坏死等有着重要影响。Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路激活时, $\beta$  - catenin 的定位由胞质转为胞核,与转录因子结合启动靶基因的转录,如基质金属蛋白酶(MMP7)、凋亡抑制蛋白(Survivin)、细胞周期蛋白(Cyclin)、原癌基因(C - myc)等基因转录,这些基因能促进恶性肿瘤的发生、发展。 $\beta$  - catenin 在 Wnt 信号通路开放的过程中发挥重要作用,通过检测细胞内  $\beta$  - catenin 的表达水平可以判断 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路的激活情况<sup>[6]</sup>。

menin 是多发性内分泌腺瘤病 1(MEN1)型基因编码的肿瘤抑制因子,MEN1 基因主要分布在细胞核中,在细胞质中和端粒附近也有分布。有研究表明,menin 与 Wnt 信号通路有密切关系,menin 可以作用于 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路中的  $\beta$  - catenin。menin 缺失可以导致  $\beta$  - catenin 在细胞核内的聚集以及 Wnt 信号通路的激活;menin 可以通过穿梭运动对细胞核内的  $\beta$  - catenin 蛋白进行转运,促进其降解,从而抑制 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路的转录活性<sup>[7,8]</sup>。详见图 3。本实验证明,与对照组比较,HSYA 组卵巢癌细胞 menin 蛋白表达显著上调,Nuclear  $\beta$  - catenin 蛋白表达明显减少。这表明 HSYA 可能通过促进 menin 表达,促进  $\beta$  - catenin 降解,减少  $\beta$  - catenin 在细胞核内的聚集,从而抑制 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路的转录活性,实现其抗卵巢癌机制。为此,本研究进一步检测 HSYA 是否抑制卵巢癌细胞 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路下游癌基因 MMP - 7、Survivin 表达,且 MMP - 7、Survivin 与卵巢癌的恶性程度密切相关。

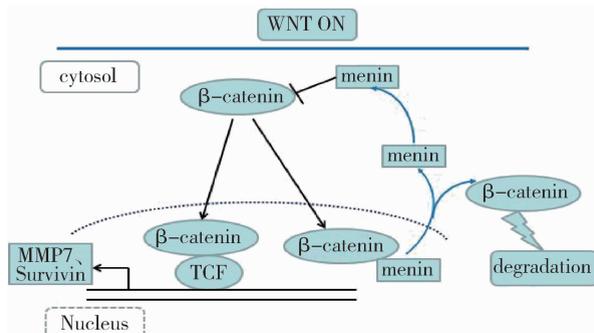


图 3 Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路

MMP - 7 又称为基质溶解素,是 MMPs 家族中结构最小的成员,由肿瘤细胞及宿主细胞分泌。它既可有效降解基膜成分,又对血管壁和淋巴管的主要成分

-弹性蛋白具有分解作用,在肿瘤浸润和转移中起关键作用。它的表达也被认为是一种肿瘤诱导的宿主反应,可以促进肿瘤的生长。Shigemasa 等<sup>[9]</sup>研究表明,MMP-7 在卵巢黏液性癌组织的表达比正常组织高。Acar 等<sup>[10]</sup>通过 ELISA 检测显示,MMP-7 可作为卵巢癌恶性程度的一个重要标志物。Sillanpaa 等<sup>[11]</sup>通过对卵巢癌组织的检测及预后随访表明,MMP-7 是卵巢癌的一个独立预后预测因子。

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员,具有抑制细胞凋亡和调节细胞增殖的双重作用,在多种恶性肿瘤组织中,包括白血病、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、肾癌等组织中 Survivin 呈异常表达<sup>[12-14]</sup>。Survivin 的异常高表达预示癌症患者生存率低<sup>[15]</sup>。许多研究表明,Survivin 表达水平与卵巢癌恶性程度密切相关,肿瘤的分化程度越低,则 Survivin 表达水平越高。Survivin 可能通过加快细胞向 S 期转换,抑制 G<sub>1</sub> 期静止,促进癌细胞增殖,增强其转移侵袭能力,进而促进相应肿瘤的发生转移。

本实验结果表明,HSYA 组卵巢癌细胞 MMP-7、Survivin 蛋白水平均下降,免疫组化结果显示 HSYA 亦能抑制 MMP-7、Survivin 蛋白在体内卵巢癌组织中的表达。表明 HSYA 能抑制 MMP-7、Survivin 在体内外卵巢癌细胞中过度表达,发挥抗癌作用。HSYA 可能通过促进 menin 表达,减少  $\beta$ -catenin 在细胞核内的聚集,其下游的癌基因 MMP-7、Survivin 表达亦减少,从而抑制卵巢癌细胞的生长。

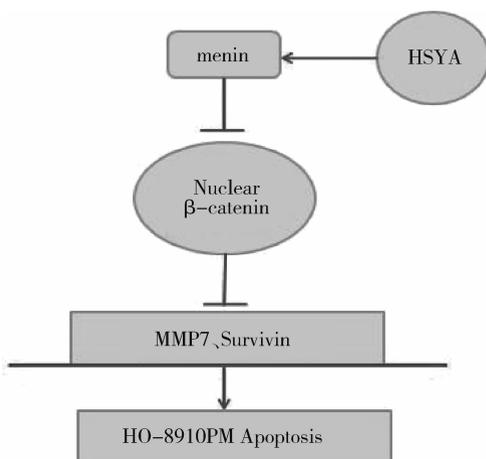


图 4 HSYA 作用机制模式图

综上所述,HSYA 可能通过促进 menin 表达,导致  $\beta$ -catenin 降解,减少  $\beta$ -catenin 在细胞核内的聚集,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的转录活性,减少下游的癌基因 MMP-7、Survivin 表达,进而抑制卵巢

癌细胞的生长,促进其凋亡(图 4)。本研究为临床上应用 HSYA 治疗卵巢癌提供了实验基础,有一定的临床意义。

#### 参考文献

- Meslehy MR, Kadota S, Momose Y, *et al.* Two new quinone-alone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca<sup>2+</sup> antagonist activity of tinctormine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(10): 1796-1802
- 奚胜艳,张前,刘朝阳,等. 羟基红花黄色素 A 对人胃癌移植瘤裸鼠组织 bFGF 蛋白及 MMP 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(21): 2877-2880
- Yang F, Li J, Zhu J, *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits angiogenesis of hepatocellular carcinoma via blocking ERK/MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway in H22 tumor-bearing mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 5(754): 105-114
- 金国梁,张勤. 抗癌防癌中药[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001: 137
- 王熙熙,王景景,王旭,等. 羟基红花黄色素 A 抑制异常增殖血管内皮细胞的机制研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(8): 679-684
- Yuan Y, Niu CC, Deng G, *et al.* The Wnt Sa/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(1): 63-69
- Ziqiang Y, Carmen SC, Masako S, *et al.* Loss of MEN1 activates DNMT1 implicating DNA hypermethylation as a driver of MEN1 tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12633-12650
- Jiang X, Cao Y, Li F, *et al.* Targeting  $\beta$ -catenin signaling for therapeutic intervention in MEN1-deficient pancreatic neuroendocrine tumours[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(12): 5809-5822
- Shigemasa K, Tanimoto H, Sakata K, *et al.* Induction of matrix metalloproteinase-7 is common in mucinous ovarian tumors including early stage disease [J]. *Med Oncol*, 2000, 17(1): 52-58
- Acar A, Onan A, Coskun U, *et al.* Clinical significance of serum MMP-2 and MMP-7 in patients with ovarian cancer[J]. *Med Oncol*, 2008, 25(3): 279-283
- Sillanpaa SM, Anttila MA, Voutilainen KA, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 in epithelial ovarian cancer and its relation to beta-catenin expression [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(8): 1792-1799
- Gu Y, Jin S, Wang F, *et al.* Clinicopathological significance of PI<sub>3</sub>K, Akt and survivin expression in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(4): 471-475
- Yu S, Zhang Z, Zhang B, *et al.* Clinical significance of PI<sub>3</sub>CA and survivin in primary adenocarcinoma lung carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(6): 983-985
- Shintani M, Sangawa A, Yamao N, *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear and cytoplasmic survivin in gastrointestinal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12): 2919-2927
- Meng JR, Tang HZ, Zhou KZ, *et al.* TFF3 and survivin expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer [J]. *Clin Exp Med*, 2013, 13(4): 297-303

(收稿日期:2019-02-12)

(修回日期:2019-03-13)