

石见穿多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控骨肉瘤细胞的迁移和侵袭

李 增， 张 瑞， 张晓坚， 杜书章*
(郑州大学第一附属医院 药学部，河南 郑州 450000)

摘要：目的 探讨石见穿多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控骨肉瘤细胞的迁移和侵袭。**方法** 不同浓度石见穿多糖（0、0.25、0.5、1 mg/mL）处理人 OS MG63 细胞 24 h，划痕实验检测细胞迁移能力，Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力，RT-PCR 检测人 OS 细胞 β -catenin mRNA 表达，Western blot 检测人 OS MG63 细胞 Vimentin、E-cadherin 蛋白表达。**结果** 石见穿多糖抑制细胞迁移、侵袭（ $P<0.01$ ），降低 β -catenin mRNA 及 Vimentin 蛋白表达（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），促进 E-cadherin 蛋白表达（ $P<0.01$ ），且上述作用呈现剂量依赖性。**结论** 石见穿多糖能抑制人 OS MG63 细胞的迁移和侵袭能力，这种作用可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路，从而阻断 EMT 过程而引起的。**关键词：**石见穿多糖；人 OS MG63 细胞；迁移；侵袭；Wnt/ β -catenin 信号通路
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2020)09-2324-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.014

Salvia chinensis Benth. polysaccharides regulate the migration and invasion of osteosarcoma cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway

LI Zeng， ZHANG Rui， ZHANG Xiao-jian， DU Shu-zhang*
(Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate how *Salvia chinensis* Benth. polysaccharides (SBPs) regulate the migration and invasion of osteosarcoma cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **METHODS** Human osteosarcoma MG63 cells co-cultured with different concentrations of SBPs (0, 0.25, 0.5, 1mg/mL) for 24h were subjected to the detection of cell migration ability by scratch test, the determination of β -catenin mRNA expression by RT-PCR, and the expression of Vimentin and E-cadherin by Western blot. **RESULTS** SBPs dose-dependently inhibited the cell migration and invasion ($P<0.01$), reduced β -catenin mRNA and Vimentin protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), and promoted E-cadherin protein expression ($P<0.01$). **CONCLUSION** SBPs' inhibition upon the migration and invasion of human osteosarcoma MG63 cells may contribute to their efficacy in inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway and blocking intracellular EMT.
KEY WORDS: *Salvia chinensis* Benth. polysaccharides (SBPs); human osteosarcoma MG63 cells; migration; invasion; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨肉瘤（Osteosarcoma，OS）是世界范围内最常见的恶性骨肿瘤之一，发病人群多为儿童和青少年，男性发病率高于女性^[1]，OS 具有强的转移性和侵袭性，临床上，该病具有预后性差、致死率高等特点，一般治疗手段为化疗加上手术切除，但其恶化程度高，且化疗药耐受性高，因此患者治疗后

5 年存活率不足 70%^[2]，此外，化疗药价格昂贵，治疗效果差强人意，且副作用较大。
Wnt 通路是生物体细胞内一条进化过程中高度保守的信号通路，近年来在肿瘤细胞的研究中被广泛关注。Wnt 信号通路分为 4 个分支，分别为经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路、Wnt/ Ca^{2+} 信号通路、

收稿日期：2020-01-14
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81873188）
作者简介：李 增（1981—），男，主管药师，研究方向为中药药理。E-mail: l. n_ snow@163.com
* 通信作者：杜书章（1969—），男，主任药师，硕士生导师，研究方向为临床药理学，药物经济学。E-mail: dushuzhang911@163.com

调节纺锤体方向和非对称细胞分裂的路径以及平面细胞极性路径^[3]，其中 Wnt/ β -catenin 经典路径是研究最多的一条分支，该信号路径能调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、细胞间质化等多个方面的生物学功能^[4]。大量研究表明，Wnt/ β -catenin 通路的异常激活与多种癌症有关^[3]，同时有研究证实，Wnt/ β -catenin 通路 OS 的发生发展密切相关^[4]。

石见穿为唇形科鼠尾草属植物华鼠尾草，其有效成分石见穿多糖已被证实具有良好的抗癌效果，对多种肿瘤细胞有抑制作用^[5]，但其对 OS 的作用影响尚鲜有报道。本研究拟探讨石见穿多糖能否对人 OS MG63 细胞系的生物学行为产生影响，及其可能存在的作用机制，为临床 OS 的治疗寻找新的有效药物提供理论支撑。

1 材料

1.1 细胞株 人 OS MG63 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物与试剂 石见穿多糖 (SBPs) 购自上海将来实业股份有限公司 (国药准字 H20180625)；含双抗的 1640 培养基 (批号 M0655)、胎牛血清 (批号 M4667) 购自美国 Gibco 公司；TRIzol (批号 A001-3-2)、逆转录试剂盒 (批号 A005-1-2) 购自美国 Invitrogen 公司； β -catenin 引物由上海生工生物工程有限公司合成；兔抗人 Vimentin (批号 ab190321)、E-cadherin (批号 ab180323) 一抗购自上海艾博抗贸易有限公司；鼠抗人 β -actin (批号 AF5001) 购自碧云天生物技术有限公司；Transwell 小室 (批号 ab195443) 购自上海艾博抗贸易有限公司。

1.3 仪器 双人水平超净工作台 (上海巴玖实业有限公司)；二氧化碳细胞孵育箱 (美国 Thermo 公司)；低温高速离心机 (美国 Thermo 公司)；S1000 型 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司)；电转仪系统 (美国 Bio-Rad 公司)；DYC-p32 型电泳仪 (上海巴玖实业有限公司)；转膜仪 (南京生兴生物经济技术有限公司)；图像记录分析系统：大连 Jim-X Scientific 公司；倒置荧光显微镜 (DMIL LED Fluo, 德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞复苏和培养 将冻存的人 OS MG63 细胞株解冻、复苏，培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 1640 培养液中，于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养，待其贴壁。每天注意观察细胞的生长状态，以细胞液的颜色、形状判断是否需要换液，换

液周期一般为 2~3 d。待细胞生长汇合度达到 80% 以上时，则需要进行传代，传代比例一般为 1:5~1:8。

2.2 划痕实验检测石见穿多糖对人 OS MG63 细胞迁移能力的影响 将人 OS MG63 细胞以约 5×10⁵/孔接种于 6 孔板，于细胞培养箱中继续培养 16 h 后，加入含不同浓度石见穿多糖的细胞培养液，加入药物浓度分别为 0 (对照组)、0.25、0.5、1 mg/mL，每组设置 6 个复孔^[6]。在培养箱中继续培养 24 h，用不含 FBS 的 RPMI-1640 培养液饥饿处理 12 h；用 10 μ L 的移液枪头垂直于板面划痕，每 4 小时观察一次细胞迁移状态，于倒置荧光显微镜下拍照，用作图软件处理，比较每组细胞 0 h 和 24 h 的划痕宽度。

2.3 Transwell 小室检测石见穿多糖对人 OS MG63 细胞侵袭能力的影响 将 OS MG63 细胞与不同浓度的石见穿多糖 (0、0.25、0.5、1 mg/mL) 共培养 24 h，加入不含 FBS 的培养基，饥饿处理 12 h，胰蛋白酶消化后，将细胞洗涤、离心，用不含 FBS 的培养基重悬细胞，调整细胞浓度约 2×10⁵/mL；将小室置于 24 孔板内，加入 300 μ L 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液，室温下静置 30 min 左右，使基质胶水化，向外室内加入 500 μ L 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液，将 200 μ L 单细胞悬液接种于小室内，培养 24 h 后，进行 GISMA 染色，向每孔加入 400 μ L A 液染色 4 min，加入 800 μ L B 液染色 8 min，用棉签擦拭小室内侧，流水冲洗染液；用手术刀片将膜取下，置于载玻片上，于倒置显微镜下观察、计数并拍照；每张玻片取上下左右中 5 个视野计数细胞，取平均数。

2.4 RT-PCR 检测石见穿对人 OS MG63 细胞 β -catenin mRNA 表达的影响 将 OS MG63 细胞与不同浓度的石见穿多糖 (0、0.25、0.5、1 mg/mL) 共培养 24 h，TRIzol 提取细胞总 RNA，行逆转录反应。取 2 μ L RNA 进行 PCR 扩增，引物序列，内参 β -actin 正向 5'-CTACGTCGGCTTAGCGCAAC-3'，反向 5'-TAGGCTTAGCTAGCTTCGAA-3'； β -catenin 正向 5'-TAGGCTTAGCTAGCCTAGCC-3'，反向 5'-TAGCGGCTATCGGCTAGCAC-3'，扩增条件为 94℃ 预变性 2 min，1 个循环；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min，共 35 个循环；72℃ 总延伸 6 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外线投射仪下观察电泳条带，分析系统分析目的基因和参比基因的条带灰度值。

2.5 Western blot 检测石见穿对人 OS MG63 细胞 Vimentin、E-cadherin 蛋白表达的影响 将 OS MG63 细胞与不同浓度的石见穿多糖（0、0.25、0.5、1 mg/mL）共培养 24 h，用 RIPA 细胞裂解液裂解，提取蛋白质，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后将蛋白质转移至 NC 膜，置于含有 5%脱脂奶粉的 TBST 中摇育封闭 2 h；加入稀释后的一抗，TBST 洗涤；加入二抗，TBST 洗涤，ECL 显色；将胶片扫描后用 Bandscan 5.0 软件进行灰度分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间的比较用

方差分析分析，组内两两比较用 LSD-*t* 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 石见穿多糖对人 OS MG63 细胞迁移能力的影响 石见穿多糖组划痕比值（24 h/0 h）高于对照组 ($P<0.01$)，且随着药物浓度的增加，划痕比值随之增加，呈剂量依赖性，说明石见穿多糖能抑制细胞的迁移。Transwell 结果显示，石见穿多糖组细胞透过上室 Matrigel 胶的数量少于对照组 ($P<0.01$)，随着石见穿多糖浓度的增加，侵袭细胞数逐渐减少，呈剂量依赖性，说明石见穿多糖能抑制细胞的侵袭能力。见图 1~2、表 1。

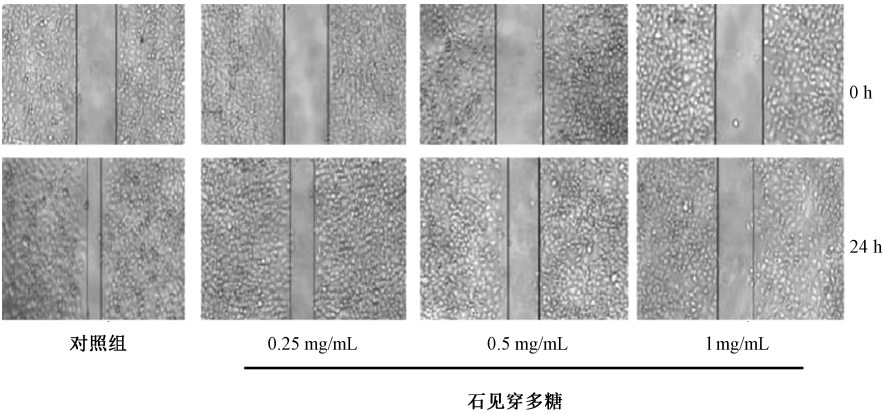


图 1 划痕检测各组人 OS MG63 细胞迁移 (×40)
Fig. 1 Detection of human OS MG63 cells migration by scratch test (×40)

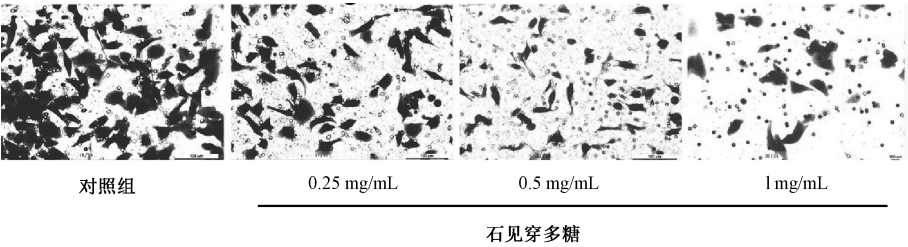


图 2 Transwell 检测各组人 OS MG63 细胞侵袭能力 (×20)
Fig. 2 Detection of the invasion ability of human OS MG63 cells in each group by Transwell (×20)

表 1 石见穿多糖对人 OS MG63 细胞迁移、侵袭能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Effects of SBPs on the migration and invasion ability of human OS MG63 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	划痕比值(24 h/0 h)	迁移细胞数/个
对照组	0.23±0.02	143.4±9.08
石见穿多糖 0.25 mg/mL 组	0.46±0.07**	69.5±7.47**
石见穿多糖 0.5 mg/mL 组	0.62±0.04**##	41.8±4.54**##
石见穿多糖 1 mg/mL 组	0.72±0.09**##△	19.0±3.01**##△△

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 0.25 mg/mL 石见穿多糖组比较，## $P<0.01$ ；与 0.5 mg/mL 石见穿多糖组比较，△ $P<0.05$ ，△△ $P<0.01$ 。

3.2 石见穿多糖对人 OS MG63 细胞 β -catenin mRNA 表达的影响 石见穿多糖组 β -catenin mRNA 表达低于对照组 ($P<0.01$)，且随着药物浓度的增加， β -catenin mRNA 的表达逐渐减弱。见图

3、表 2。
3.3 石见穿多糖对人 OS MG63 细胞 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响 石见穿多糖组细胞 E-cadherin 蛋白的表达高于对照组 ($P<0.01$)，且

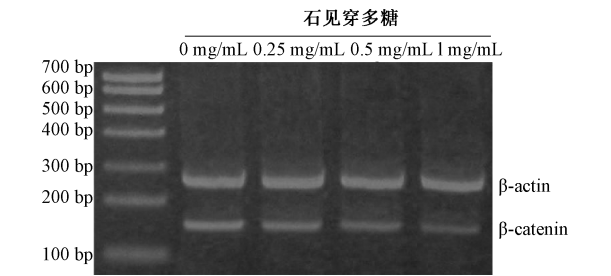


图 3 RT-PCR 检测各组人 OS MG63 细胞 β -catenina mRNA 表达

Fig. 3 Detection of β -catenina mRNA expression of human OS MG63 cells in each group by RT-PCR

随着药物浓度的增加，呈剂量依赖性；石见穿多糖

表 2 石见穿多糖对人 OS MG63 细胞 β -catenin mRNA 及 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effects of SBPs on the expression of β -catenin mRNA, E-cadherin and Vimentin protein in human OS MG63 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	β -catenin mRNA	E-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
对照组	0.81±0.09	0.29±0.08	0.86±0.12
石见穿多糖 0.25 mg/mL 组	0.63±0.11 **	0.48±0.03 **	0.70±0.08 *
石见穿多糖 0.5 mg/mL 组	0.50±0.08 ** #	0.66±0.04 ** ##	0.34±0.06 ** ##
石见穿多糖 1 mg/mL 组	0.33±0.09 ** ## △	0.91±0.05 ** ## △ △	0.16±0.03 ** ## △ △

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 0.25 mg/mL 石见穿多糖组比较, ## $P<0.01$; 与 0.5 mg/mL 石见穿多糖组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。

4 讨论

迁移和侵袭是 OS 细胞最主要的特点，也是导致癌症恶化和扩散的最主要原因^[7]。上皮间质转化 (epothelial-mesenchymal transition, EMT) 指源于上皮的肿瘤细胞失去极性而向具有间质表型细胞转化的过程，在此过程中，上皮细胞粘附性降低，极性消失，使细胞的转移和侵袭能力增强^[8]。Wnt/ β -catenin 信号通路是导致 EMT 的重要因素^[8]，正常细胞 β -catenin 与 E-cadherin 相结合形成复合体，维持细胞的极性，使细胞间接触稳定，限制细胞的移动；当 Wnt 通路被异常激活时，该复合体被破坏，细胞 E-cadherin 表达下降，Vimentin 等能刺激细胞移动的蛋白表达上调，各种蛋白相互作用，使细胞失去极性，细胞间连接变得疏松，从而导致细胞粘附力下降，移动能力增强，发生迁移或侵袭^[7-8]。有研究证实，在 OS 细胞中，Wnt 信号通路的异常激活促进了肿瘤的增殖和早期肺部转移，而抑制 Wnt 通路的活性可以抑制 OS 干细胞的自我更新，从而抑制癌症的侵袭性和耐药性^[9]。

石见穿多糖在临床上多用于治疗各种感染性疾病，近年来，大量药理实验证实其对多种细胞系具有细胞毒性作用，能诱导细胞凋亡和线粒体损伤，

组细胞 Vimentin 蛋白表达弱于对照组 ($P<0.05$, $P<0.01$)，且该抑制作用随着药物浓度的增加而增加。见图 4、表 2。



图 4 Western blot 检测各组人 OS MG63 细胞蛋白表达

Fig. 4 Detection of protein expression of human OS MG63 cells in each group by Western blot

同时能通过对血管内皮生长因子、白细胞介素的调控而抑制肿瘤细胞的转移和侵袭^[10]，但其对于膀胱癌细胞的影响尚鲜有研究。本研究发现，石见穿多糖能显著抑制人 OS 细胞的转移和侵袭，且在一定范围内呈现剂量依赖性。

β -catenin 是该通路的核心因子，大量研究发现，癌症的发生与 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活有关^[3]，结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌细胞质都存在 β -catenin 的聚集^[11-12]，有学者发现 OS 细胞核内 β -catenin 的表达显著增加，而敲除 β -catenin 后，膀胱癌细胞的迁移核侵袭能力都有所减弱^[13]。本研究以 β -catenin 作为 Wnt 经典通路的标志因子，用不同浓度的石见穿多糖与人 OS MG63 细胞共培养 24 h，石见穿多糖能显著抑制细胞内 β -catenin mRNA 表达，且呈现剂量依赖性，提示石见穿多糖可能对人 OS 细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性具有抑制作用。

E-cadherin 的表达缺失是 EMT 过程中的重要标志。在许多类型的肿瘤中，可以通过恢复 E-cadherin 的表达而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[7,14]。体外研究证实，通过给 E-cadherin 表达缺陷的细胞转染该蛋白基因后，肿瘤的侵袭性消失^[15]。本研究发现，石见穿多糖能刺激细胞内

E-cadherin 的表达,且随着药物浓度的增加,E-cadherin 的表达随之增加,推测石见穿多糖可能通过刺激人 OS MG63 细胞内 E-cadherin 表达而抑制 EMT 过程,从而减弱细胞的迁移和侵袭能力。

同一肿瘤细胞系中,占主导地位的 E-cadherin 负性化的作用导致癌症细胞播散,并增加了细胞内 Vimentin 的活性。Vimentin 属于中间丝家族成员,其主要作用在于调节细胞收缩、粘附和迁移其作为间质细胞的标志性蛋白,是 EMT 途径另一重要的蛋白之一^[16]。实验结果发现,石见穿多糖在刺激人 OS MG63 细胞内 E-cadherin 表达的同时,抑制了 Vimentin 的表达。石见穿多糖可能通过刺激人 OS 细胞内 E-cadherin 表达,抑制 Vimentin 的表达,而阻断细胞内 EMT 过程,从而减弱细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述,石见穿多糖能抑制人 OS MG63 细胞的迁移和侵袭能力,这种作用可能使通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性,从而阻断细胞内 EMT 过程而引起的。

参考文献:

[1] 龙作尧,鲁亚杰,李明辉,等.骨肉瘤患者的个体化疗与药敏相关基因的临床研究[J].中国骨与关节杂志,2019,8(3):229-234.

[2] 文英霞,刘芳琴.围术期心理护理干预对骨肉瘤手术患者应激状态的影响[J].中国肿瘤临床与康复,2019,26(2):234-237.

[3] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 50-60.

[4] 洪 嵩,蔡东峰,张 靖,等. miR-552 靶向调控 Wnt 抑制因子-1 促进 MG-63 骨肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2019,24(6):494-499.

[5] 刘生锋,刘泰荣,殷娣娣,等. 中药抗膀胱癌实验研究进展[J]. 中成药,2016,38(1):151-155.

[6] 魏 清,周政涛. 石见穿多糖诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. 湖北中医药大学学报,2014,16(2):17-18.

[7] 孙坚皓,孙建广,黄世磊,等. 抑制组织蛋白酶 B 表达对骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2019,54(2):267-271.

[8] Li K, Zhan X, Sun J, *et al.* Oldhamianoside II inhibits prostate cancer progression via regulation of EMT and the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6):9457-9463.

[9] Ma Y, Ren Y, Han E Q, *et al.* Inhibition of the Wnt- β -catenin and Notch signaling pathways sensitizes osteosarcoma cells to chemotherapy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(2):274-279.

[10] 刘 媛,钱荣康,钱荣华. 石见穿及其提取物抗肿瘤的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(30):3417-3420.

[11] Harb J, Lin P J, Hao J. Recent development of Wnt signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics[J]. *Curr Oncol Rep*, 2019,21(2):12.

[12] Qu Y, Olsen J R, Yuan X, *et al.* Small molecule promotes β -catenin citrullination and inhibits Wnt signaling in cancer[J]. *Nat Chem Biol*, 2018,14(1):94-101.

[13] Liu W, Zhao Z, Wang Y, *et al.* Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(3):343.

[14] 周忠志,黄新灵,杨双喜,等. 沉默 MMP-13 对皮肤基底细胞癌细胞侵袭、迁移及 Wnt 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(9):2204-2206.

[15] Wong S H M, Fang C M, Chuah L H, *et al.* E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018,121:11-22.

[16] Zhu J, Wen K. Astragaloside IV inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway in gastric cancer cells[J]. *Phytother Res*, 2018,32(7):1289-1296.