

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.006

· 基础研究 ·

## 土木香内酯对人骨肉瘤 143B 细胞恶性生物学行为的影响

杨春梅<sup>a</sup>, 张露露<sup>a</sup>, 黄华坤<sup>a</sup>, 袁晓慧<sup>a</sup>, 张平<sup>a</sup>, 叶彩红<sup>a</sup>, 魏梦琪<sup>a</sup>, 黄衍然<sup>b</sup>, 罗小辑<sup>b</sup>, 罗进勇<sup>a</sup> (重庆医科大学 a. 检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室; b. 附属第一医院 骨科, 重庆 400016)

**[摘要]** **目的:** 探讨土木香内酯(alantolactone, ALT)对人骨肉瘤 143B 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其作用机制。**方法:** 用不同浓度(0、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$ )的 ALT 处理人骨肉瘤 143B 细胞后,用结晶紫染色法和 MTT 实验检测细胞的增殖能力,用划痕愈合实验、Transwell 小室法、Hoechst33258 染色法分别检测细胞的迁移、侵袭和凋亡水平,用 qPCR 及 Western blotting(WB)分别检测细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin、caspase-3、cleaved-caspase-3 (c-caspase-3)、PARP 和 cleaved-PARP (c-PARP) mRNA 和蛋白表达水平。用荧光素酶报告基因实验检测 T 细胞淋巴因子或淋巴增强因子(T cell lymphocyte factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)转录活性,qPCR 及 WB 检测  $\beta$ -catenin 及 MMP-7、c-Myc mRNA 和蛋白表达水平。**结果:** ALT 能够抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖、迁移和侵袭,同时促进细胞凋亡( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。经 8、10  $\mu\text{mol/L}$  ALT 处理后,143B 细胞中 PARP mRNA 和蛋白水平显著上调,c-caspase-3 和 c-PARP 蛋白水平表达增加(均  $P < 0.05$ ); E-cadherin mRNA 和蛋白水平表达上调、N-cadherin mRNA 和蛋白表达水平下调,同时 TCF/LEF 转录活性明显下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),  $\beta$ -catenin、MMP-7 和 c-Myc mRNA 和蛋白表达水平显著下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** ALT 通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性从而抑制人骨肉瘤 143B 细胞增殖、迁移和侵袭,并促进其凋亡。

**[关键词]** 土木香内酯;骨肉瘤;143B 细胞;迁移;侵袭;凋亡;Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

**[中图分类号]** R738.1;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)04-0377-08

## Effect of alantolactone on malignant biological behaviors of human osteosarcoma 143B cells

YANG Chunmei<sup>a</sup>, ZHANG Lulu<sup>a</sup>, HUANG Huakun<sup>a</sup>, YUAN Xiaohui<sup>a</sup>, ZHANG Ping<sup>a</sup>, YE Caihong<sup>a</sup>, WEI Mengqi<sup>a</sup>, HUANG Yanran<sup>b</sup>, LUO Xiaojib<sup>b</sup>, LUO Jinyong<sup>a</sup> (a. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics (Ministry of Education), School of Laboratory Medicine; b. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of alantolactone (ALT) on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human osteosarcoma 143B cells and the underlying mechanism. **Methods:** Osteosarcoma 143B cells were treated with different concentrations of ALT (0, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). Then, the cell proliferation ability was detected by crystal violet staining and MTT assay, cell migration was determined by Wound-healing test, cell invasion was analyzed by Transwell assay and cell apoptosis rate was detected by Hoechst33258 staining. The mRNA and protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, caspase-3, cleaved caspase-3 (c-caspase-3), poly ADP-ribose polymerase (PARP) and cleaved PARP (c-PARP) in 143B cells were detected by qPCR and Western blotting (WB), respectively. TCF/LEF (T cell lymphocyte factor/lymphoid enhancer factor) transcriptional activity was examined with Luciferase reporter gene assay. The mRNA and protein expressions of  $\beta$ -catenin as well as MMP-7 and c-Myc were detected by qPCR and WB, respectively. **Results:** ALT inhibited proliferation, migration and invasion of osteosarcoma 143B cells and promoted apoptosis ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After the treatment with ALT at 8, 10  $\mu\text{mol/L}$ , the mRNA and protein expressions of E-cadherin and PARP, as well as the protein expressions of c-caspase-3 and c-PARP were up-regulated, while the mRNA and protein expressions of N-cadherin were down-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); At the same time, the TCF/LEF transcriptional activity and the mRNA and protein expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-7 and c-Myc were significantly down-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** ALT may inhibit the proliferation, migration and invasion and promote cell apoptosis possibly through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in osteosarcoma 143B cells.

**[Key words]** alantolactone (ALT); osteosarcoma; 143B cell; migration; invasion; apoptosis; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(4): 377-384. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.006]

**[基金项目]** 重庆市科技计划资助项目(No. cstc2017jcyjAX0039)。Project supported by the Scientific and Technological Research Program of Chongqing (No. cstc2017jcyjAX0039)

**[作者简介]** 杨春梅(1996-),女,硕士生,主要从事干细胞定向分化和骨肿瘤的基础研究,E-mail: 1005139776@qq.com

**[通信作者]** 罗进勇(LUO Jinyong, corresponding author),博士,教授,主要从事干细胞定向分化和骨肿瘤的基础研究,E-mail: luojinyong888@hotmail.com

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤,好发于儿童和青少年,具有高度侵袭性和早期全身转移的特征<sup>[1]</sup>。近年来,随着外科手术、放疗、化疗和免疫、基因及分子靶向等治疗手段的开展,骨肉瘤患者的5年生存率逐步提高,但是药物的不良反应和患者生存率并未得到显著改善<sup>[2]</sup>。目前,用于治疗骨肉瘤的药物(如顺铂、多柔比星、甲氨蝶呤和异环磷酰胺)不仅使许多患者出现贫血、出血、听力损伤、肝肾功能衰竭等诸多毒性反应,还容易产生药物耐受<sup>[3]</sup>。因此,研发新的不良反应小、安全有效的药物对骨肉瘤治疗具有重要的作用。土木香内酯(alantolactone, ALT)为倍半萜烯内酯类化合物,广泛存在于菊科属植物中,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤及保肝降糖等多种生物学作用<sup>[4-6]</sup>。研究<sup>[7-12]</sup>表明,ALT对多种肿瘤如结肠癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌、肺癌及白血病等均具有明显的抑制作用。然而,有关ALT对骨肉瘤作用的研究鲜见报道。本研究通过研究ALT对骨肉瘤143B细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其作用机制,旨在为临床更加安全有效的应用ALT治疗骨肉瘤提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

人骨肉瘤143B细胞由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

DMEM高糖培养液和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国HyClone公司,链霉素和青霉素购自美国Gibco公司,ALT购自成都瑞芬思生物科技有限公司(纯度为98.06%,批号:T-023-181216),结晶紫染色液、Hoechst 33258染色液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白提取试剂盒及Western blotting(WB)检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司,MTT试剂购自美国Sigma公司,PVDF膜、化学发光试剂盒、基质胶和Transwell小室购自美国Millipore公司,荧光素酶报告质粒(Top-luc)由美国芝加哥大学何通川教授惠赠,荧光素酶分析试剂盒购自美国New England Biolabs公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒及PCR相关试剂均购自日本TaKaRa公司,PCR引物由金斯瑞生物科技有限公司合成,鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体购自南京钟鼎生物技术有限公司,兔抗人上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、cleaved caspase-3(c-caspase-3)、caspase-3、人多聚ADP核糖聚合酶(human poly ADP ribose polymerase, PARP)、cleaved PARP(c-PARP)以及基质金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)、 $\beta$ -catenin和c-Myc单克隆抗体均购自美国

CST公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔或山羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司,ECL试剂盒购自美国Millipore公司。

### 1.2 细胞培养

骨肉瘤143B细胞在含有10% FBS、100 U/ml青霉素和100  $\mu$ g/ml链霉素的DMEM高糖培养液中置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养,每隔2~3 d用0.3%胰酶进行消化和传代,待细胞处于对数生长期时用于后续实验。

### 1.3 结晶紫染色法检测ALT对143B细胞存活率的影响

将长势良好的143B细胞以 $3 \times 10^4$ 个/孔的密度接种在24孔板中,孵箱培养12 h后用不同浓度(0、4、6、8、10  $\mu$ mol/L)的ALT处理,同时设置DMSO(终体积分数为0.03%)处理的细胞作为对照组,每组设3个复孔。待ALT作用24、48和72 h后,吸弃培养基,用PBS洗涤2遍,加入4%多聚甲醛溶液固定20 min,弃去溶液;避光加入结晶紫染液染色10 min,最后冲洗除去残余的结晶紫染液,干燥后在扫描仪下成像。成像完成后,用20%乙酸溶液充分溶解,在酶联免疫检测仪波长590 nm处检测各孔的光密度(D)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(对照组D值-处理组D值)/对照组D值 $\times 100\%$ 。

### 1.4 MTT实验检测ALT对143B细胞增殖的影响

收集143B细胞,以500个/孔的密度接种于96孔板中,细胞培养12 h后,用不同浓度的ALT处理,调零组不加细胞而加入等体积的细胞培养液,另设DMSO(终体积分数为0.03%)作为对照组,每组设4个复孔。24、48和72 h后,每孔加入20  $\mu$ l MTT溶液(5 mg/ml),继续孵育4 h后弃上清液,加入150  $\mu$ l DMSO,振荡器避光振荡10 min使结晶充分溶解;用酶标仪于492 nm波长处测定D值,计算细胞增殖率。ALT处理组细胞增殖率=(各浓度处理组D值-调零组D值)/(0  $\mu$ mol/L处理组D值-调零组D值) $\times 100\%$ ;对照组细胞增殖率=(对照组D值-调零组D值)/(0  $\mu$ mol/L处理组D值-调零组D值) $\times 100\%$ 。

### 1.5 划痕愈合实验检测ALT对143B细胞迁移的影响

当143B细胞汇合度达80%~90%时,用胰酶消化并重悬至单个细胞,以每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔板,培养至细胞贴壁长满后,用200  $\mu$ l移液器枪头沿着6孔板直径在细胞培养板上垂直划痕,PBS冲洗3次后,加入2 ml不含FBS的DMEM培养液,用不同浓度的ALT处理0、9和18 h,记录不同时间点每组细胞同一位置的划痕区域,用Image J软件计算划痕区域的面积变化。划痕愈合率=(0 h划痕面积-18 h划

痕面积)/0 h 划痕面积×100%。

1.6 Transwell 小室法检测 ALT 对 143B 细胞侵袭的影响

Transwell 小室中加入 30 μl 稀释 10 倍的基质胶, 放入 37 °C 孵箱待胶均匀凝固。后加入 300 μl 含有 2.5×10<sup>4</sup> 个 143B 细胞的 DMEM, 使用不同浓度的 ALT 处理, 另设 DMSO (终体积分数为 0.03%) 作为对照组, 将小室放进含 500 μl 10% FBS 的 24 孔板中培养 24 h, 用棉签擦拭上层膜表面的非侵入细胞。下层侵入细胞用 4% 多聚甲醛固定后, 10% 结晶紫染色 10 min。显微镜下拍照, 每组随机选取膜的 3 个独立区域(×100)计数侵袭细胞数(用 ImageJ 软件统计穿膜细胞数并计算平均值)。

1.7 Hoechst33258 染色法检测 ALT 对 143B 细胞凋亡的影响

将 143B 细胞接种于 24 孔板中(2.5×10<sup>4</sup> 个/孔)培养 12 h 后, 用不同浓度的 ALT 处理, 另设 DMSO (终体积分数为 0.03%) 作为对照组, 每组设置 3 个复孔。细胞培养 24 h 后, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 10 min; 用 PBS 洗涤 2 遍, 加入 200 μl/孔 Hoechst33258 染色液(用 PBS 稀释, 体积稀释比例为 1:100), 室温放置 3~5 min; 吸除 Hoechst33258 染色液, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 在荧光显微镜下观察并拍照。当细胞凋亡时, 细胞核呈亮蓝色荧光和浓缩的碎裂核。每组随机观察 3 个视野(×100), 计数凋亡细胞数, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=视野中的凋亡细胞数/

视野中的总细胞数×100%。

1.8 荧光素酶报告基因实验验证 Wnt 信号通路的活性

将长势良好的 143B 细胞接种于 T25 培养瓶中, 当细胞汇合度达 60%~70% 时, 将 T25 中的培养基换成 DMEM 培养液, 加入转染体系: 5 μl 转染试剂 Lipofectamine2000+3 μg 质粒+200 μl DMEM 培养液, 4 h 后再换成 5 ml 的 10% FBS。待 T25 长满后, 胰酶消化细胞铺至 24 孔板中, 待细胞贴壁后按不同浓度(0、4、6、8、10 μmol/L)的 ALT 处理, 另设 DMSO (终体积分数为 0.03%) 作为对照组, 每组设置 3 个复孔。细胞培养 12 h 后, 吸取每孔上清 10 μl 用于测定荧光素酶活性(具体实验体系参考说明书), 以此反映 Wnt/β-catenin 信号通路的活性。

1.9 qPCR 法检测 ALT 对 143B 细胞中凋亡和 Wnt 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响

用不同浓度的 ALT 处理 143B 细胞, 另设 DMSO (终体积分数为 0.03%) 作为对照组, 培养 48 h, 收集细胞, 用 TRIzol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 并逆转录为 cDNA; 应用 qPCR 法扩增 E-cadherin、N-cadherin、caspase-3、PARP 以及 Wnt/β-catenin 信号通路中 β-catenin 和下游靶分子 MMP-7、c-Myc mRNA 表达水平, 引物序列见表 1。反应条件: 95 °C 变性 5 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。β-actin 为内参照, 以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
E-cadherin	ATCCAGTGAACAACGATGGC	TGCTGCTTGGCCTCAAATC
N-cadherin	AAACAGCAACGACGGGTTAG	AACAGACACGGTTGCAGTTG
Caspase-3	TTCATCCAGTCGCTTGTGTC	ATTCTGTTGCCACCTTTCGG
PARP	TGATAGCAGCAAGGATCCCATC	TACGCATTGTGTGTGGTTGC
β-catenin	CTGCAGGGGTCTCTGTG	TGCATATGTCGCCACACC
MMP-7	TTTGATGGGCCAGGAAACAC	TGGCCAAGTTCATGAGTTGC
c-Myc	CGTCCTGGGAAGGGAGAT	CGCTGCTATGGGCAAAGT
β-actin	CCACGAAACTACCTTCAACTCC	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT

1.10 WB 检测 ALT 对 143B 细胞中凋亡和 Wnt 信号通路相关蛋白表达的影响

用不同浓度的 ALT 处理 143B 细胞, 另设 DMSO (终体积分数为 0.03%) 作为对照组, 培养 36 h, 用预冷的 PBS 冲洗 3 次后加入蛋白裂解液裂解细胞, 抽取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 另加入蛋白上样缓冲液后, 于沸水中水浴处理 10 min 使蛋白变性。取

35 μg 蛋白, 进行 10%SDS-PAGE、转 PVDF 膜, 用 5% 牛血清白蛋白的封闭 3 h, 于 4 °C 下加入 CST 一抗(均以 1:1 000 稀释)12~16 h, 用 TBST 洗膜 3 次(10 min/次); 后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 或山羊抗鼠 IgG 二抗(1:5 000)于 37 °C 孵育 1 h, 再用 TBST 洗膜 3 次(10 min/次); 用 ECL 试剂显影。采用 Image J 图像分析软件测定各目的蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白



条带灰度值与内参照蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

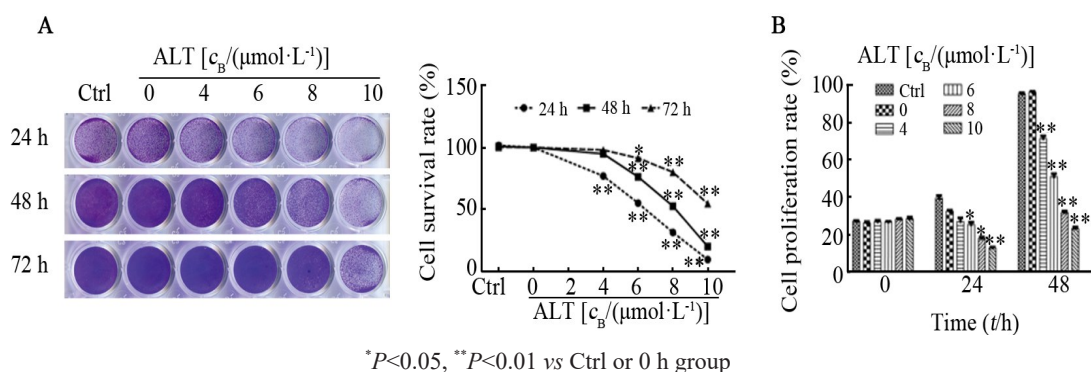
### 1.11 统计学处理

上述各项实验均独立重复3次。应用SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计分析和作图。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(组内两两比较采用LSD- $t$ 检验)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ALT明显抑制143B细胞的增殖

经ALT(0、4、6、8和10  $\mu\text{mol/L}$ )处理143B细胞后,结晶紫染色结果(图1A)显示,与对照组相比,ALT可抑制143B细胞的增殖(均 $P < 0.01$ )。MTT实验结果(图1B)显示,8和10  $\mu\text{mol/L}$ 的ALT处理可明显抑制143B细胞的增殖活力( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果表明,ALT可显著抑制人骨肉瘤143B细胞的增殖。



A: The proliferation of 143B cells was detected by crystal violet staining;  
B: The cell proliferation of 143B cells was detected by MTT assay

图1 ALT对143B细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of ALT on the proliferation of 143B cells

### 2.2 ALT显著抑制143B细胞的迁移和侵袭

经0、4、8和10  $\mu\text{mol/L}$ 的ATL处理143B细胞后,划痕愈合实验结果(图2A)显示,培养18 h后,对照组划痕愈合率高达(84.25 $\pm$ 7.36)%,而10  $\mu\text{mol/L}$ 的ALT处理组的细胞划痕愈合率为(17.83 $\pm$ 5.96)%,表明ALT能显著抑制143B的迁移( $P < 0.01$ )。Transwell实验结果(图2B)显示,8和10  $\mu\text{mol/L}$ 的ALT处理后,穿膜细胞数量明显减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),说明ALT能抑制143B细胞的侵袭。qPCR和WB实验结果(图2C、D)显示,ALT显著升高143B细胞中E-cadherin mRNA和蛋白表达水平的同时,降低N-cadherin的表达水平( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。实验结果表明,ALT可抑制人骨肉瘤143B细胞的迁移和侵袭。

### 2.3 ALT促进143B细胞的凋亡

用不同浓度的ALT(0、4、8和10  $\mu\text{mol/L}$ )处理后,Hoechst33258染色法检测结果(图3A)显示,与对照组相比,ALT处理组143B细胞中出现细胞核高亮、核固缩、核碎裂以及染色质凝集现象的细胞数量明显增多( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );WB实验结果(图3B)显示,ALT处理组细胞中凋亡相关分子c-caspase-3、PARP和c-PARP蛋白的表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$ );qPCR检测结果(图3C)显示,ALT处理组细

胞中PARP mRNA水平上调( $P < 0.05$ ),而caspase-3则无明显变化( $P > 0.05$ )。实验结果表明,ALT可促进人骨肉瘤143B细胞的凋亡。

### 2.4 ALT抑制143B细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活性

经8和10  $\mu\text{mol/L}$ ALT处理后,荧光素酶报告基因实验结果(图4A)显示,与对照组相比,143B细胞T细胞淋巴因子或淋巴增强因子(T cell lymphocyte factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)的转录活性明显下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );qPCR检测结果(图4B)显示,细胞中 $\beta$ -catenin、MMP-7、c-Myc mRNA表达水平均有不同程度的下调( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。WB检测结果(图4C)显示,细胞中 $\beta$ -catenin及下游靶分子MMP-7、c-Myc蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.01$ )。结果表明,ALT可抑制人骨肉瘤143B细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活性。

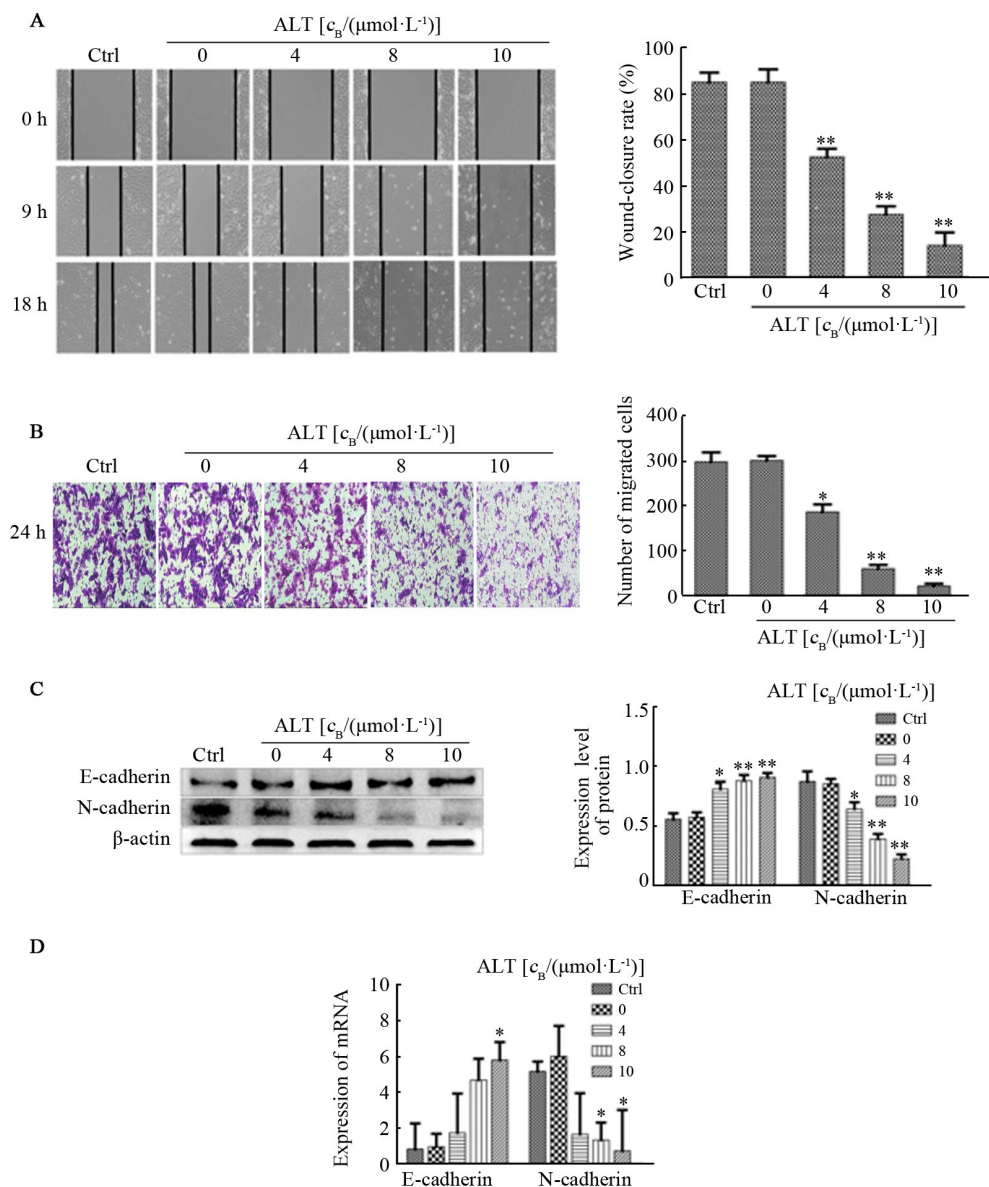
## 3 讨论

骨肉瘤是一种恶性程度高、侵袭能力强、易发生肺转移的骨肿瘤。近年来,随着治疗手段不断改进,在一定程度上提高了骨肉瘤患者的5年生存率,但目前各种化疗药物(如顺铂、甲氨蝶呤)存在毒副作用

大、并发症多等问题使患者治疗效果并不理想<sup>[13-14]</sup>。因此,研发更加安全有效的抗肿瘤药物已成为人们关注的重点。现有研究<sup>[4-6]</sup>表明,ALT 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤及保肝降糖等多种生物活性。ALT 可通过抑制 ERK 信号通路的活性来有效抑制多发性骨髓瘤 RPMI-8226 细胞的增殖并促进其凋亡,同时还可抑制裸鼠皮下移植瘤的生长<sup>[15]</sup>。ALT 通过选择性地抑制线粒体和 PI3K/AKT 信号通路的活性,抑制三阴性乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖<sup>[16]</sup>。上述研究结果表明,ALT 可以通过多种信号通路发挥抑癌作用。然而目前尚未见 ALT 对人骨肉瘤的影响和作用机制

的研究报道。

本研究采用划痕愈合实验、Transwell 小室法检测了 ALT 对 143B 细胞的迁移和侵袭的影响,结果显示 ALT 处理组中细胞的划痕愈合率和穿膜细胞数明显减少;qPCR 及 WB 实验结果同样表明,ALT 能上调 143B 细胞中迁移和侵袭相关分子 E-cadherin mRNA 和蛋白水平,下调 N-cadherin mRNA 和蛋白水平,从而抑制细胞的迁移和侵袭。证实了 ALT 能明显抑制人骨肉瘤 143B 细胞的迁移和侵袭是肿瘤转移关键因素的观察<sup>[17]</sup>。

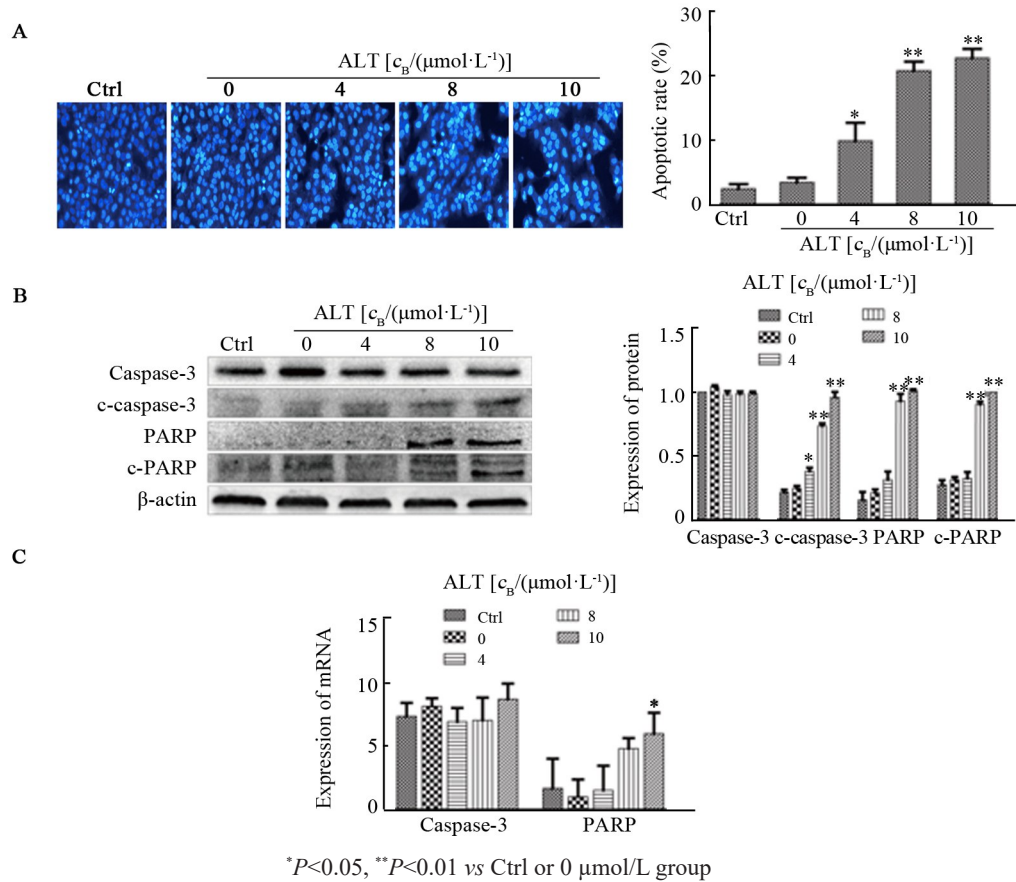


\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Ctrl or 0 μmol/L group

A: The migration of 143B cells was detected by Wound-healing test; B: The invasion of 143B cells was detected by Transwell assay (crystal violet staining,×100); C:The expressions of E-cadherin and N-cadherin were detected by WB; D: The mRNA expressions of E-cadherin and N-cadherin were detected by qPCR

图 2 ALT 对 143B 细胞迁移和侵袭的影响(×100)

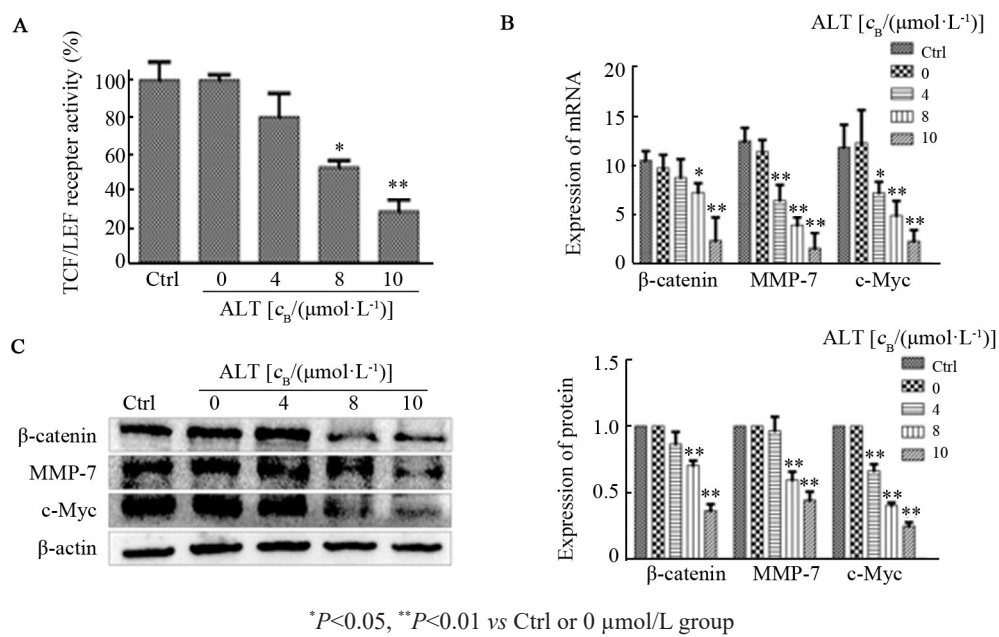
Fig.2 Effects of ALT on the migration and invasion of 143B cells (×100)



A: The apoptosis of 143B cells was detected by Hoechst 33258 assay ( $\times 100$ ); B: The expressions of apoptosis related proteins were detected by WB; C: The expressions of apoptosis related target genes were detected by qPCR

图3 ALT对143B细胞凋亡及凋亡相关分子表达的影响

Fig.3 Effects of ALT on the apoptosis and expression of apoptotic molecules in 143B cells



A: The transcriptional activity of TCF/LEF in 143B cells was detected by Luciferase reporter gene assay; B: The expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-7 and c-Myc were detected by qPCR; C: The expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-7 and c-Myc in 143B cells were detected by WB

图4 ALT对Wnt信号通路相关分子 $\beta$ -catenin及MMP-7、c-Myc蛋白和mRNA表达的影响

Fig.4 Effects of ALT on the mRNA and protein expressions of Wnt signaling pathway related molecules  $\beta$ -catenin, MMP-7 and c-Myc



细胞的凋亡是一个极为复杂的过程,是一系列调控因子共同作用的最终结果<sup>[18]</sup>。Caspase 家族是一个包含众多蛋白酶的家族,目前发现人体内 caspase 蛋白家族成员至少有 11 种,其中 caspase-3 在细胞凋亡过程中发挥凋亡执行因子的作用,当 caspase-3 发生剪切时,可促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。PARP 在体外可被多种 caspase 剪切,在体内则是 caspase-3 的主要剪切对象<sup>[20]</sup>。c-PARP 升高被认为是细胞凋亡的重要指标,同时也是 caspase-3 激活的指标<sup>[21]</sup>。本研究通过 Hoechst33258 染色法和 qPCR 及 WB 检测 143B 细胞中凋亡水平及其相关标志物的表达水平,结果显示,c-caspase-3、PARP 和 c-PARP 蛋白水平均上调,进一步提示 ALT 能诱导人骨肉瘤 143B 细胞凋亡。

$\beta$ -catenin 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的关键分子,一方面与黏附相关蛋白结合形成复合物,调控细胞的黏附作用;另一方面进入细胞核调控信号转导过程,影响细胞的增殖和凋亡<sup>[22]</sup>。研究<sup>[23-24]</sup>表明,当细胞中  $\beta$ -catenin 与黏附相关蛋白形成的复合物降解受阻时, $\beta$ -catenin 聚积于细胞质,最终入核与 TCF/LEF 结合,启动下游靶基因(如 MMP-7、c-Myc)的转录,导致细胞异常增殖。本研究结果表明,ALT 可抑制骨肉瘤 143B 细胞中 TCF/LEF 的转录活性,并在 mRNA 和蛋白水平上下调  $\beta$ -catenin 及下游靶分子 MMP-7 和 c-Myc 的表达。结果提示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与 ALT 对人骨肉瘤 143B 细胞的调控。有研究<sup>[25-31]</sup>发现,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径在调控淋巴瘤、胃癌、乳腺癌、脑胶质瘤、白血病、结肠癌和非小细胞肺癌等多种肿瘤细胞的发生发展过程中发挥重要作用。

综上所述,ALT 可通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性来抑制人骨肉瘤 143B 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并诱导细胞凋亡。研究结果提示,ALT 有望作为一种安全有效的抗肿瘤新型药物,为后续进一步治疗骨肉瘤等疾病提供了新思路。后续本课题组将进一步了解 ALT 在实验动物体内对骨肉瘤细胞的影响,并对其具体的作用机制进行深入研究。

## 【参 考 文 献】

- [1] CHEN Y Q, CAO J, ZHANG N, et al. Advances in differentiation therapy for osteosarcoma[J]. Drug Discov Today, 2019: S1359-S6446(19)30339-3. DOI:10.1016/j.drudis.2019.08.010.
- [2] 牛晓辉. 骨肉瘤治疗的历史、现状和未来[J]. 骨科临床与研究杂志, 2019(5): 257-260. DOI:10.19548/j.2096-269x.2019.05.001.
- [3] HATTINGER C M, FANELLI M, TAVANTI E, et al. Advances in emerging drugs for osteosarcoma[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(3): 495-514. DOI:10.1517/14728214.2015.1051965.
- [4] 李文希. 土木香生物活性研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(46): 80-81. DOI:10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.46.033.
- [5] 靳文军, 谭小武. 土木香内酯抗肿瘤的研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2017, 19(8): 101-104. DOI:10.3969/j.issn.1672-9463.2017.08.037.
- [6] 阿塞木古丽·热音拜克, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 恩特马克·布拉提白. 土木香内生真菌 YIGZ-3 抗菌活性及菌种鉴定[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2017, 38(5): 71-76. DOI:10.3969/j.cnki.jdx.2017.05.014.
- [7] DING Y S, WANG H G, NIU J J, et al. Induction of ROS overload by alantolactone prompts oxidative DNA damage and apoptosis in colorectal cancer cells[J/OL]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 558[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849014/>. DOI:10.3390/ijms17040558.
- [8] ZHANG X, ZHANG H M. Alantolactone induces gastric cancer BGC-823 cell apoptosis by regulating reactive oxygen species generation and the AKT signaling pathway[J/OL]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 4795-4802 [2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6507453/>. DOI:10.3892/ol.2019.10172.
- [9] YIN C T, DAI X X, HUANG X J, et al. Alantolactone promotes ER stress-mediated apoptosis by inhibition of TrxR1 in triple-negative breast cancer cell lines and in a mouse model[J/OL]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 2194-2206[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6378194/>. DOI:10.1111/jcmm.14139.
- [10] ZHENG H L, YANG L H, KANG Y T, et al. Alantolactone sensitizes human pancreatic cancer cells to EGFR inhibitors through the inhibition of STAT3 signaling[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(4): 565-576. DOI:10.1002/mc.22951.
- [11] WANG J Q, ZHANG Y B, LIU X, et al. Alantolactone enhances gemcitabine sensitivity of lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated endoplasmic Reticulum stress and Akt/GSK3 $\beta$  pathway[J/OL]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 1026-1038[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657978/>. DOI:10.3892/ijmm.2019.4268.
- [12] XU X G, HUANG L, ZHANG Z L, et al. Targeting non-oncogene ROS pathway by alantolactone in B cell acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Life Sci, 2019, 227: 153-165. DOI:10.1016/j.lfs.2019.04.034.
- [13] 李胜, 王威, 李建军. 骨肉瘤靶向治疗研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(22): 99-102. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.22.030.
- [14] 张健峰, 刘云霞. 骨肉瘤治疗的研究进展[J]. 浙江医学, 2019, 41(7): 723-727, 730. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.7.2018-1469.
- [15] 姚瑶, 孙月月, 夏丹丹, 等. 土木香内酯对 RPMI-8226 细胞的增殖抑制作用及其相关机制研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5): 1336-1340. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2015.05.021.
- [16] 张秀娟, 李磊, 何丽娟. 异土木香内酯通过线粒体和 PI $_3$ K/AKT 通路诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(8): 601-607. DOI:10.11669/cpj.2018.08.008.
- [17] 刘广臣. 趋化因子 CXCL6 与其受体 CXCR2 调控  $\beta$ -catenin 促进骨肉瘤转移机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [18] 邹敏, 徐金军. 苦参碱对人骨肉瘤 MG63 细胞增殖、凋亡的影响及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(2): 140-142. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.02.013.
- [19] 吴倩, 江波. 松乳菇多糖对人骨肉瘤 MG-63 细胞 Caspase-3、Caspase-9、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(6): 744-748. DOI:10.16809/j.cnki.2096-3653.2018090401.
- [20] 姚志莹, 李蕾, 张昱. PARP-1 抑制剂对细胞周期特异性毒物诱导的骨肉瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(1):

- 40-42. DOI:10.13350/j.cjpb.140110.
- [21] DASOVICH M, LEUNG A K L. A nucleolar PARTnership expands PARP roles in RNA biology and the clinical potential of PARP inhibitors[J]. *Mol Cell*, 2019, 75(6): 1089-1091. DOI:10.1016/j.molcel.2019.09.001.
- [22] 谢晓亮, 李玉梅, 朱海霞, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路对骨肉瘤干细胞调节作用[J]. *国际骨科学杂志*, 2019, 40(3): 127-130. DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2019.03.001.
- [23] WANG H, HU Y, HE F, et al. All-trans retinoic acid and COX-2 cross-talk to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation via Wnt/ $\beta$ -catenin in mesenchymal stem cells[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2019, 118: 109279. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109279.
- [24] DI FIORE R, GUERCIO A, PULEIO R, et al. Modeling human osteosarcoma in mice through 3AB-OS cancer stem cell xenografts [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11): 3380-3392. DOI: 10.1002/jcb.24214.
- [25] 秦贝贝, 李亚青, 李小丽, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 通路关键分子在NK/T细胞淋巴瘤组织中的表达及其临床意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(2): 230-234, 438. DOI:10.13481/j.1671-587x.20150205.
- [26] 胡倩, 杜超, 董辉, 等. VD通过VDR下调 $\beta$ -catenin磷酸化水平抑制胃癌细胞增殖[J]. *中国细胞生物学报*, 2019, 41(7): 1356-1364.
- [27] 杨红敏. 乳腺癌中Wnt信号通路关键因子 $\beta$ -catenin的突变和表达研究[J]. *数理医药学杂志*, 2019, 32(8): 1124-1126.
- [28] 张猛, 沙林, 马庆防, 等. GOLPH<sub>3</sub>通过WNT信号通路调控胶质瘤细胞增殖及其机制的研究[J]. *癌症进展*, 2019, 17(16): 1889-1893, 1915. DOI:10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.16.08.
- [29] 丁薇, 李玉峰.  $\beta$ -catenin在慢性髓系白血病中的作用机制研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(2): 600-602. DOI:CNKI:SUN:XYSY.0.2018-02-053.
- [30] 韩崢, 黄晓东, 刘蒙, 等. 那可丁通过下调钙黏素17及Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路抑制结肠癌SW480细胞迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(10): 1089-1094. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.006.
- [31] 王秋琼, 熊弢, 陈江勇, 等. SOX9通过Wnt/ $\beta$ -catenin途径驱动非小细胞肺癌A549细胞的上皮-间质转化[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(12): 1345-1349. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.008.

[收稿日期] 2019-10-18

[修回日期] 2020-02-07

[本文编辑] 党瑞山