

# 飞燕草素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制乳腺癌的机制研究

蒋婷婷, 白金玉, 任青蔓, 李金原, 彭晓莉, 韩 彬\*

成都医学院公共卫生学院, 成都 610000

**摘要:**为研究飞燕草素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响。免疫组化检测裸鼠乳腺肿瘤组织和肺组织转移瘤 Ki-67 及乳腺肿瘤组织蛋白水解酶超家族基质金属蛋白酶-7 (matrix metalloproteinase 7, MMP-7) 的表达水平; Western blot 检测移植瘤 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路  $\beta$ -联蛋白 ( $\beta$ -catenin)、磷酸糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 及通路下游细胞周期相关蛋白 cyclinD1、原癌基因 c-myc 和 MMP-7 的蛋白水平表达, 体内外实验发现飞燕草素不仅能抑制裸鼠异种移植瘤生长及乳腺癌肿瘤组织和肺组织转移瘤 Ki-67 表达还可以明显降低乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路  $\beta$ -catenin 和 p-GSK-3 $\beta$  下游靶基因 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白的表达。本研究证实飞燕草素能通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 发挥抑制乳腺癌的作用。

**关键词:**飞燕草素; 乳腺癌; 细胞增殖; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-0981-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.009

## Delphinidin suppresses breast cancer by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

JIANG Ting-ting, BAI Jin-yu, REN Qing-man, LI Jin-yuan, PENG Xiao-li, HAN Bin\*

Department of Public Health, School of Preclinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610000, China

**Abstract:** In order to investigate the effect of delphinidin on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in breast cancer cells MDA-MB-231. Ki-67 and MMP-7 expression was detected in breast tumors and lung tissues by immunohistochemistry. Expression of  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), cyclinD1, c-myc and MMP-7 was tested by Western blot. Results showed that delphinidin inhibited the protein expression of GSK-3 $\beta$ , cyclinD1, c-myc and MMP-7. The *in vivo* finding revealed that administration of delphinidin significantly decreased the tumor volume and Ki-67 expression of tumour metastasis in MDA-MB-231 xenograft model by inhibiting tumour proliferation and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway. Taken together, our study demonstrated that delphinidin could against tumour *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the proliferation and metastasis of tumour via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words:** delphinidin; breast cancer; cell proliferation; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

乳腺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 位于女性肿瘤发病率第一位, 严重威胁女性的身心健康<sup>[1]</sup>。目前认为蔬菜水果中所含的植物化合物, 尤其是多酚类植物化合物可能是其预防控制脑血管疾病 (cerebrovascular disease, CVD) 发生发展的主要活性成分。花青素, 属黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、防治肿瘤和心血管疾病等多种生物学活性<sup>[2,3]</sup>。

课题组前期研究发现, 黑米花青素能够抑制裸鼠乳腺癌异种移植瘤生长<sup>[4]</sup>, 飞燕草素是花青素中常见的一种单体, 在花青素中丰度较高, 生物学活性也较强<sup>[5]</sup>。研究发现, 飞燕草素能抑制肿瘤细胞增殖, 血管生成和侵袭转移, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>, 但机制仍不清楚。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是在生物体进化过程中高度保守的信号转导途径。研究发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在细胞增殖、分化和凋亡等过程中发挥重要作用, 该信号通路的异常与细胞恶性生长和癌变密切相关<sup>[8]</sup>。抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活性, 可以阻止上皮间质转化, 进而抑制乳腺癌转

收稿日期: 2018-09-19 接受日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金 (81402675); 四川省教育厅课题 (17ZA0114, 17ZB0130); 成都医学院大学生创新项目 (201713705035)

\* 通信作者 Tel: 86-28-62739573; E-mail: hanbin19871102@126.com

移<sup>[9]</sup>。本研究通过飞燕草素干预乳腺癌移植瘤和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,探讨飞燕草素是否通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,发挥抗乳腺癌的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

飞燕草素(纯度 98%)购自美国 Sigma 公司;飞燕草素(纯度 25%)购自大兴安岭林格贝寒带生物科技股份有限公司;人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自中国科学院上海细胞库;细胞培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自德国 Gibco 公司;抗体购自美国 Millipore 公司。

### 1.2 主要仪器

主要使用仪器包括美国 Thermo 公司的台式高速冷冻离心机和 ND-2000 微量紫外可见分光光度计;日本 Olympus 公司的 IX71 型倒置荧光相差显微镜;美国 Bio-Rad 公司的 ChemiDoc XRS 化学发光成像仪。

### 1.3 细胞培养

MDA-MB-231 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,常规方法进行传代,选对数生长期细胞实验。

### 1.4 飞燕草素干预乳腺癌裸鼠移植瘤

12 只 6 周龄雌性 BALB/c nude 裸鼠购于四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所(SYXK(川)2018-058)。重量 15 ~ 20 g,饲养于相对湿度 40% ~ 60%,温度 23 ~ 25 °C 的 SPF 级动物实验室。裸鼠适应性喂养 3 天后,随机分为对照组(灌胃灭菌水)和飞燕草素干预组,每组 6 只。裸鼠右侧腋窝处注射细胞浓度  $4 \times 10^6/0.2$  mL 的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,每隔 3 天用游标卡尺测量移植瘤的最大直径和最小直径,按  $V = 0.52 \times D^2 \times L$  公式计算肿瘤体积。飞燕草素干预组从接种日开始,用飞燕草素(100 mg/kg/天)灌胃,持续 28 天。实验结束后,处死动物,取下肿瘤,切下约 1 cm × 1 cm 组织块,多聚甲醛浸泡约 1 周后,进行包埋和切片。

### 1.5 免疫组化染色

对组织切片进行免疫组化染色,辣根过氧化物酶显色试剂盒进行显色处理,用 PBS 缓冲液作为阴性对照,免疫组化染色后以细胞核呈中等强度棕黄色判定为阳性细胞,在低倍镜下( $\times 10$ )浏览整张切片选择热点区域,用高倍( $\times 40$ )对阳性细胞进行计数,结果表示为阳性细胞在整张切片中同类型细胞

中的百分比。

## 1.6 数据统计学处理方法

数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 飞燕草素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响

通过 Western blot 检测乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平。由图 2 可见,飞燕草素作用 MDA-MB-231 细胞,能明显降低细胞  $\beta$ -catenin 和 p-GSK-3 $\beta$  的蛋白表达水平。

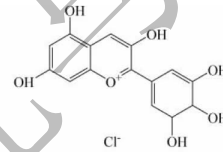


图 1 飞燕草素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of delphinidin

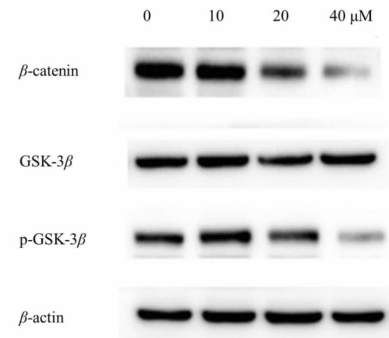


图 2 飞燕草素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响

Fig. 2 The effect of delphinidin on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in breast cancer cells MDA-MB-231

### 2.2 飞燕草素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶基因 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白表达的影响

通过 Western blot 检测乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶基因 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白表达的影响。由图 3 可见,飞燕草素作用 MDA-MB-231 细胞,能明显降低 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白表达水平。

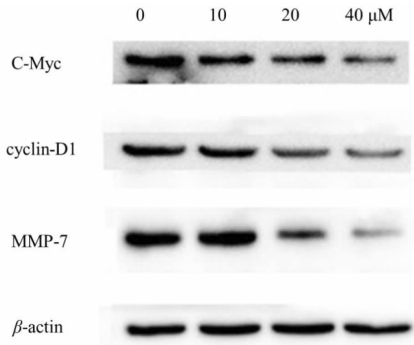


图3 飞燕草素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白表达的影响

Fig. 3 The effect of delphinidin on c-myc, cyclin D1 and MMP-7 in breast cancer cells MDA-MB-231

### 2.3 飞燕草素对裸鼠异种移植瘤体积的影响

飞燕草素干预裸鼠后,与对照组(灌胃灭菌水)相比,飞燕草素能够降低裸鼠异种移植瘤体积,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

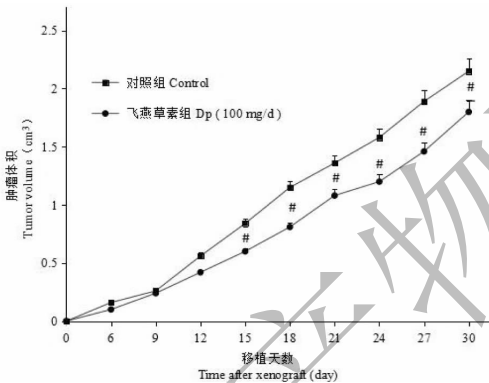


图4 飞燕草素对裸鼠异种移植瘤体积的影响

Fig. 4 Effect of delphinidin on growth xenograft tumor of nude mice

注:与对照组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, # $P < 0.05$ 。

### 2.4 飞燕草素对裸鼠异种移植瘤 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响

Western blot 检测裸鼠 MDA-MB-231 细胞异种移植瘤组织 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路  $\beta$ -联蛋白( $\beta$ -catenin)和 GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平。由图 5 可见,与对照组(灌胃灭菌水)相比,飞燕草素能降低裸鼠肿瘤组织中  $\beta$ -catenin 和 p-GSK-3 $\beta$  的蛋白表达水平。

### 2.5 飞燕草素对裸鼠移植瘤和肺转移瘤 Ki-67 及乳腺肿瘤 MMP-7 表达的影响

免疫组化检测肿瘤组织 MMP-7 的表达水平,由

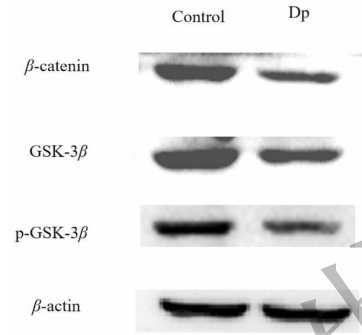


图5 飞燕草素对裸鼠移植瘤 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响

Fig. 5 Effect of delphinidin on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in xenografted tumor

图 6 可见,飞燕草素干预组肿瘤组织 MMP-7 表达明显低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

Ki-67 蛋白是检测细胞增殖的重要指标,与乳腺癌的发生发展及预后有关<sup>[10]</sup>。我们检测了 Ki-67 在肿瘤组织中的表达,结果表明对照组和飞燕草素干预组的肿瘤组织中 Ki-67 有阳性表达(图 6),阳性细胞数百分比分别为 82% 和 57.8%,飞燕草素干预组肿瘤组织 Ki-67 表达明显低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );Ki-67 在裸鼠对照组和飞燕草素干预组的肺组织转移瘤中有阳性表达(图 6),阳性细胞数百分比分别为 64.4% 和 36%,飞燕草素干预组肺组织转移瘤 Ki-67 表达明显低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

Ki-67 是增殖细胞表达的核抗原,在乳腺癌、肺癌等肿瘤组织中高表达,是反映肿瘤细胞增殖活性的可靠指标<sup>[11]</sup>。本实验研究发现飞燕草素能显著抑制裸鼠乳腺癌肿瘤组织和肺组织转移瘤 Ki-67 表达,表明飞燕草素具有抑制肿瘤组织细胞增殖的作用。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在细胞的增殖及分化过程中起到重要作用。该信号通路中任何一个信号分子异常都会导致  $\beta$ -catenin 在胞质和胞核内聚集,促使通路下游的靶基因转录活性增高,导致细胞异常增殖<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -catenin 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中的关键分子,其异常表达是乳腺癌发生过程中的早期分子事件,与乳腺癌转移和预后不良相关<sup>[13]</sup>。GSK-3 是在进化中非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,其普遍存在于真核细胞,GSK-3 磷酸化后,调节细胞分化、增殖以及凋亡等。GSK-3 $\beta$  磷酸化后,可避免  $\beta$ -catenin 被 GSK-3 $\beta$  磷酸化,使  $\beta$ -catenin 在胞质

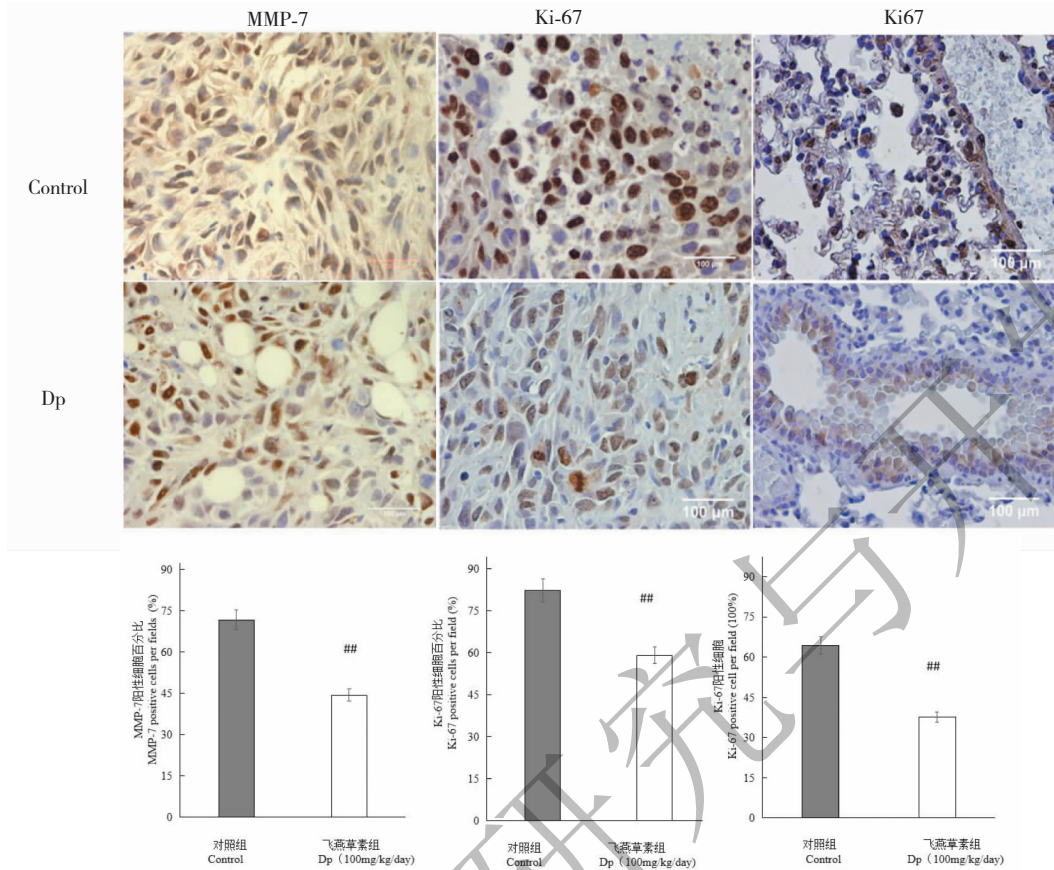


图6 飞燕草素对裸鼠移植瘤和肺转移瘤 Ki-67 及乳腺癌组织 MMP-7 表达的影响 ( $\times 400$ )

Fig. 6 Effect of delphinidin on Ki-67 or MMP-7 expression in xenografted tumor and pulmonary metastatic tumor ( $\times 400$ )

注:与对照组比较,  $^{##}P < 0.01$ 。

Note: Compare with control,  $^{##}P < 0.01$ .

中逐渐堆积,活化 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。GSK-3 $\beta$  在调节细胞分化、增殖以及凋亡中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化后促进  $\beta$ -catenin 入核激活下游靶基因转录,调控细胞周期、分化、生长和迁移<sup>[15]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 下游靶基因众多,如细胞周期相关蛋白 cyclinD1、原癌基因 c-myc 和 MMP-7。研究发现 cyclinD1、c-myc 和 MMP-7 在乳腺癌中过表达<sup>[16]</sup>。Cyclin D1 高表达可促进乳腺癌侵袭和转移<sup>[17]</sup>。c-myc 可促进细胞过度增殖,抑制细胞凋亡,进而促进肿瘤的发生发展<sup>[18]</sup>。降低 MMP-7 的表达水平可减慢肿瘤生长,降低肿瘤细胞侵袭能力<sup>[19]</sup>。

本研究发现飞燕草素能明显降低乳腺癌 MDA-MB-231 细胞  $\beta$ -catenin 和 p-GSK-3 $\beta$  的蛋白表达水平,能显著降低 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶基因 c-myc、cyclin D1 和 MMP-7 蛋白的表达。飞燕草素

还能降低乳腺癌组织中 MMP-7 的表达水平。实验结果提示飞燕草素具有抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的作用。

综上所述,本研究结果表明飞燕草素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,发挥抑制乳腺癌的作用,其机制值得进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Mezencev R. Epidemiology of gliomas in women diagnosed with breast cancer supports the protective role of estrogenic exposure[J]. Bratisl Med J, 2018, 119:463-468.
- 2 Dangles O, Fenger JA. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition[J]. Molecules, 2018, 23: E1970.
- 3 Li JR, Li HY, Yu K, et al. Effect and mechanism of purple sweet potato anthocyanins on liver cancer[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30:41-44.
- 4 Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, et al. Anticancer activities of an

- anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62: 1128-1136.
- 5 Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals [J]. *Phytother Res*, 2016, 30: 1379-1391.
  - 6 Yang X, Luo E, Liu X, et al. Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HO-TAIR signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 423.
  - 7 Chen J, Zhu Y, Zhang W, et al. Delphinidin induced protective autophagy via mTOR pathway suppression and AMPK pathway activation in HER-2 positive breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2018, 27: 342.
  - 8 Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, et al. Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance [J]. *J Hepato Cell Carcinoma*, 2018, 5: 61-73.
  - 9 Kwon YJ, Ye DJ, Baek HS, et al. 7, 12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene increases cell proliferation and invasion through induction of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and EMT process [J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33: 729-742.
  - 10 Ayad E, Soliman A, Anis SE, et al. Ki-67 assessment in breast cancer in an Egyptian population: a comparative study between manual assessment on optical microscopy and digital quantitative assessment [J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13: 63.
  - 11 Abdel-Salam IM, Ashmawy AM, Hilal AM, et al. Chemical composition of aqueous ethanolextract of *Luffa cylindrica* leaves and Its effect on representation of caspase-8, caspase-3, and the proliferation marker Ki-67 in intrinsic molecular subtypes of breast cancer *in vitro* [J]. *Chem Biodivers*, 2018, 15: e1800045.
  - 12 Liang X, Wang S, Wang X, et al. Leptin promotes the growth of breast cancer by upregulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16: 767-771.
  - 13 Bagheri M, Fazli M, Saeednia S, et al. Pomegranate peel extract inhibits expression of  $\beta$ -catenin, epithelial mesenchymal transition, and metastasis in triple negative breast cancer cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64: 86-91.
  - 14 Zhang W, Cui Y, Gao J, et al. Recombinant osteopontin improves neurological functional recovery and protects against apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway following intracerebral hemorrhage [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1588-1596.
  - 15 Wan XY, Yang Z, Li Y, et al. Research progress of Wnt signal pathway and malignant tumors [J]. *Chin Med Herald (中国医药导报)*, 2016, 13: 71-73.
  - 16 Yuan H, Wei R, Xiao Y, et al. RHBDF1 regulates APC-mediated stimulation of the epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation of colorectal cancer cells in part via the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368: 24-36.
  - 17 Bobustuc GC, Kassam AB, Rovin RA, et al. MGMT inhibition in ER positive breast cancer leads to CDC2, TOP2A, AURKB, CDC20, KIF20A, cyclin A2, cyclin B2, cyclin D1, ER $\alpha$  and Survivin inhibition and enhances response to temozolomide [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 29727-29742.
  - 18 Azarnezhad A, Tabrizi M, Javan F, et al. Detection of CCND1, C-MYC and FGFR1 amplification using modified SYBR Green qPCR and FISH in breast cancer [J]. *Turk J Med Sci*, 2018, 48: 759-767.
  - 19 Chou AK, Hsiao CL, Shih TC, et al. The contribution of Matrix Metalloproteinase-7 promoter genotypes in breast cancer in Taiwan [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37: 4973-4977.

(上接第 980 页)

- 21 Chen B, Fan DQ, Zhu KX, et al. Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of *Scylla paramamosain* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2015, 47: 833-846.
- 22 Jiang W. Extraction and anti-bacterial mechanism of the anti-bacterial essential oil of *Ledum Palustre* L. from Changbai Mountain [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2012.
- 23 Hwang BK, Lee CH, Chang IS, et al. Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis [J]. *J Membrane Sci*, 2012, 22: 33-41.