

吉祥草活性成分 RCE-4 抑制宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、侵袭和迁移的活性及机制研究

陈重旭¹, 游方芳¹, 金桂兰², 程凡¹, 邹坤¹, 邢翔飞², 奚炜², 陈剑锋^{1*}

¹三峡大学生物与制药学院 三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室; ²宜昌市第一人民医院, 宜昌 443002

摘要: 本文探讨吉祥草活性单体 RCE-4 对宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、侵袭和迁移的影响及机制。采用 MTT 法和克隆形成实验检测 RCE-4 对 Ca Ski 细胞增殖的影响, 划痕实验及 Transwell 小室实验研究 RCE-4 对 Ca Ski 细胞的迁移和侵袭的影响, 间接免疫荧光实验和 Western blot 法检测 RCE-4 对 β -catenin 和 YAP/TAZ 蛋白入核转运的影响, 采用 Western blot 法检测 RCE-4 对 Wnt/ β -catenin、Hippo/YAP 信号通路及下游靶蛋白表达的影响。结果显示, RCE-4 可以显著抑制 Ca Ski 细胞的增殖、迁移和侵袭; RCE-4 处理后, β -catenin 和 YAP/TAZ 蛋白入核减弱, GSK3 β 、p- β -catenin、p-YAP、p-LATS1 的蛋白表达量增加, PAK4、p-GSK3 β 、 β -catenin、MST1、LATS1、NUAK2、YAP/TAZ、YAP 的蛋白表达量减少, 下游靶蛋白 MMPs、c-Myc、SOX2、CYR61、VCAM-1、ICAM-1 的表达被抑制, 提示 RCE-4 体外可能通过对 Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 信号通路的调控发挥其抗 Ca Ski 细胞侵袭和迁移的作用。

关键词: RCE-4; 侵袭; 迁移; Wnt/ β -catenin; Hippo/YAP

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)9-1558-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.9.1014

Study on the activity and mechanism of RCE-4, the active ingredient of *Reineckia carnea*, in inhibiting the proliferation, invasion and migration of cervical cancer Ca Ski cells

CHEN Chong-xu¹, YOU Fang-fang¹, JIN Gui-lan²,
CHENG Fan¹, ZOU Kun¹, XING Xiang-fei², XI Wei², CHEN Jian-feng^{1*}

¹Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University;

²The First People's Hospital of Yichang and The People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: This article investigated the effect and mechanism of RCE-4 on proliferation, invasion and migration of cervical cancer Ca Ski cells. The effect of RCE-4 on the proliferation of Ca Ski cells was detected by MTT method and clone formation method. The scratch experiment and Transwell chamber experiment were performed to assess the effect of RCE-4 on the migration and invasion of Ca Ski cells. Indirect immunofluorescence experiment and Western blot method were used for detection. The effect of RCE-4 on the transport of β -catenin and YAP/TAZ proteins into the nucleus. Western blot was used to detect the effect of RCE-4 on the expression of Wnt/ β -catenin, Hippo/YAP signaling pathway-related proteins and downstream target proteins. The results showed that RCE-4 can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of Ca Ski cells; after RCE-4 treatment, β -catenin and YAP/TAZ proteins enter the nucleus attenuated, and the protein expression of GSK3 β , p- β -catenin, p-YAP, p-LATS1 increased, and the protein expression of PAK4, β -catenin, MST1, LATS1, NUAK2, YAP/TAZ, and YAP were decreased, and the expression of the downstream target proteins MMPs, c-Myc, SOX2, CYR61, VCAM-1, ICAM-1 were inhibited, suggesting that RCE-4 may exert its anti-Ca Ski cell invasion and migration effects through regulation of Wnt/ β -catenin and Hippo/YAP signaling pathways *in vitro*.

收稿日期: 2021-02-01 接受日期: 2021-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(81773952); 湖北省卫生健康委员会中医药科研项目(ZY2019M028)

* 通信作者 E-mail: chenjianfeng2003@126.com

Key words: RCE-4; invasion; metastasis; Wnt/ β -catenin; Hippo/YAP

宫颈癌是一种常见的妇科恶性肿瘤,目前临床上对其治疗仍以手术和放化疗为主,但由于宫颈癌多为浸润性肿瘤,具有易转移、易扩散的特点,往往导致治疗预期不佳^[1]。因此,寻找能抑制其侵袭和迁移的新型抗宫颈癌化疗药物备受关注。天然来源的药物因其多靶点、有效低毒的优势一直受到学者的重视。RCE-4 是本实验室从百合科铃兰族吉祥草 (*Reineckia carnea* (Andr.) Kunth) 植物中分离得到的一个螺甾烷型皂苷,化学名称为(1 β , 3 β , 5 β , 25S)-螺甾烷-1,3-diol-1-[α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-木吡喃糖苷],结构见图 1,其在吉祥草总皂苷中的含量最高(达 13%),同时其药理活性也最好,RCE-4 现已作为吉祥草的标志性成分被湖北省地方中药材标准收录^[2]。

本实验室前期研究发现,RCE-4 对宫颈癌 Ca Ski 细胞具有较好的选择性细胞毒性^[3,4],能显著抑制裸小鼠 Ca Ski 细胞移植瘤生长,最高抑瘤率可达到 69.1%,给药组小鼠的子宫、卵巢等重要组织均未见瘤细胞转移、浸润和病理改变^[5]。在前期结果的启发下,我们推测 RCE-4 可能具有抑制宫颈癌细胞侵袭和迁移的作用,目前相关活性及其分子作用机制尚未见任何报道。

Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 是与肿瘤侵袭和迁移关联较为密切的两条细胞内信号通路,二者均通过其核心信号分子(β -catenin 和 YAP/TAZ)由胞浆进入细胞核后与转录因子结合转录下游靶基因从而调控肿瘤的侵袭和迁移^[6-8]。阻断 Wnt/ β -catenin 通路对肿瘤的增殖具有显著的抑制作用^[9]。Wnt/ β -catenin 信号转导通路的异常激活可引起生长发育缺陷和肿瘤的发生以及迁移、侵袭^[10,11]。下调 Wnt/ β -catenin 通路下游蛋白如 MMP2、MMP9 等可抑制肿瘤细胞的转移^[12]。与 Wnt/ β -catenin 通路的生物学功能相反,Hippo/YAP 通路活化后抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[13]。在没有 Hippo 相关激活因子刺激的情况下,非磷酸化状态的 YAP 转移入核,与转录激活因子 TEAD/TEF 家族相互作用来调节靶基因的表达^[14]。胞外刺激信号可通过尚不明确的机制活化 Mst1/2,再通过一系列的级联磷酸化反应磷酸化其他核心成员。

因此,本研究将以宫颈癌 Ca Ski 细胞为对象,通过 Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 两条信号通路系

统研究 RCE-4 对宫颈癌增殖、侵袭和迁移的影响及其分子作用机制,为 RCE-4 将来的临床应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株

人宫颈癌 Ca Ski 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供,本实验室培养保存。细胞培养于含 10% 胎牛血清、青链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中培养。

1.2 主要试剂

RCE-4 由本实验室从吉祥草中分离并进行结构鉴定,结构见图 1;一抗 p-GSK3 β 、GSK3 β 、p- β -catenin、 β -catenin、c-Myc、MMP2、MMP7、MMP9、MMP14、VCAM-1、ICAM-1、MST1、p-MST1、NUAK2、LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP、CYR61、SOX2、PAK4、YAP/TAZ 和 β -actin(美国 Cell Signaling Technology 公司);二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG(爱必信生物科技有限公司);1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);MTT(美国 Amersco 公司);ECL 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司);DAPI 染色试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司);FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

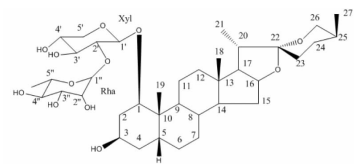


图 1 RCE-4 的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of RCE-4

1.3 实验仪器

酶标仪(瑞士 TECAN infinite F200 PRO);荧光显微镜(宁波舜宇仪器有限公司 XD30A-RFL);CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司);超低温保存箱(安徽中科都菱商用电器股份有限公司);低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(德国,ependorf 公司);超纯水仪(上海和泰仪器有限公司 Smart-S15UVF);电泳仪(北京基昂生物科技有限公司)。

1.4 MTT 实验

将对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化计数后,用含 10% 胎牛血清的培养基配置成适合浓度的细胞悬液。以 2×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板中,设置 6 个平行孔,在 37°C , 5% CO_2 的无菌培养箱中培养 12 h,加入含有不同浓度 RCE-4 处理 48 h,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 孵育 4 h 后弃去培养基,加入 150 μL DMSO,震动 5 min,490 nm 处测量 OD 值。

1.5 平板克隆形成实验

取对数生长期的 Ca Ski 细胞,常规消化,制备单细胞悬液并计数。以 3 000 个/孔的密度接种到 6 孔板中,以十字方向轻晃动培养皿,使细胞分散均匀。在 37°C , 5% CO_2 的无菌培养箱中培养 24 h 后,将细胞用不同浓度的 RCE-4 分别处理 24、48、72 h。处理后用无药物培养基代替并培养 14 天。在此期间,每两天更换一次培养基。孵育完成后,PBS 小心洗涤 6 孔板两次,在室温下用甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min。拍照并使用 ImageJ 软件 (1.44I 版) 计数菌落数。

1.6 划痕实验

取对数生长期的 Ca Ski 细胞,以 5×10^5 /孔的密度接种在 6 孔板中。当细胞汇合度达到 90% 时,以 200 μL 移液枪吸管头部刮出三个平行伤口,并用 PBS 清洗孔板两次以去除掉落的细胞。使用含有 2% FBS 的培养基培养以消除细胞增殖的影响。每组给予不同浓度的药物,处理 24 h 后置细胞培养板于倒置显微镜下观察拍照。

1.7 Transwell 侵袭实验

将基质胶 (50 μL , 用无血清培养基以 1:4 稀释) 垂直添加到 Transwell 小室 (BD Biosciences, San Jose, CA) 的底部,并将小室在培养箱中干燥以备使用。取对数生长期的 Ca Ski 细胞,消化重悬,调整浓度至 1×10^6 个/mL。将 200 μL 细胞悬液添加到上腔室中,并同时给药。在下腔室中加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。在 37°C 下孵育 24 h 后,使用棉签去除残留在膜上表面的非侵入性细胞,用甲醇固定穿过膜的细胞 10 min,用 0.1% 结晶紫染色 15 min,然后在 400 倍光学显微镜下随机选择 5 个视野进行计数。

1.8 Transwell 迁移实验

Transwell 迁移实验的步骤与侵袭实验步骤相同,只是 Transwell 上腔室的表面没有被基质胶覆

盖。

1.9 间接免疫荧光实验

取对数生长期的 Ca Ski 细胞,常规消化,制备单细胞悬液并接种于孔板中。将玻璃盖玻片上的细胞孵育至 60% ~ 80% 汇合度,在不同浓度药物的作用后,取出细胞爬片,PBS 洗 3 次,100% 甲醇冷却并固定 15 min,并用 PBS-0.1% Triton X-100 渗透 15 min,3% BSA 封闭后,将细胞与抗 β -catenin 和抗 YAP/TAZ 抗体在 4°C 孵育过夜。PBS 洗三次后,将细胞与抗兔荧光素异硫氰酸酯偶联的二抗 (Bio-world, 1:200 稀释) 避光孵育 2 h,并用 DAPI 染色细胞核,然后通过荧光显微镜进行观察、拍照。

1.10 Western blot 实验

取对数生长期的 Ca Ski 细胞用不同浓度的 RCE-4 处理 6、12、24 h 后,用含有蛋白酶抑制剂 (1% PMSF, 1% 磷酸化蛋白酶抑制剂) 的 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白质,在冰上孵育 30 min,并在 4°C 下以 12 000 rpm 离心 10 min,以获得蛋白质。核蛋白通过核蛋白提取试剂盒 (GBCBIOT Technologies, 中国广州) 提取。上清液中的蛋白质含量使用 BCA 分析试剂盒 (中国北京碧云天) 进行测量。用 $5 \times$ 上样缓冲液和水将蛋白质样品调整至相同浓度。在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上分离蛋白质,然后将其转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (北京 Labgic Technology Co., Ltd.) 上。用 5% 脱脂奶将膜封闭 2 h 后,将蛋白质样品与相应的一抗在 4°C 下孵育 16 h。用 Tris 缓冲盐水 Tween-20 (TBST) 洗涤 3 次 \times 10 min,然后使用适当的二抗进行孵育。随后使用 ECL 试剂 (北京碧云天) 可视化凝胶条带,并使用发光成像系统 (Tanon 5200) 记录结果。

1.11 统计分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism 软件 (5.0 版, LaJolla, CA, 美国) 进行,以 mean \pm SD 表示且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 RCE-4 对 Ca Ski 细胞增殖的抑制作用

为了研究 RCE-4 对 Ca Ski 细胞增殖的影响,使用 MTT 法检测了细胞系的增殖能力。MTT 实验结果 (见图 2A) 表明,RCE-4 对 Ca Ski 细胞具有显著的抑制作用,IC₅₀ 为 4.71 μM 。采用平板克隆形成实

验反映单个细胞的增殖能力,在孔板中接种密度较小的细胞使之成为单个细胞,能形成可见克隆的细胞必为贴壁且有增殖能力的细胞。克隆形成实验结

果(见图 2B、2C)显示,与对照组相比,RCE-4 能以剂量和时间依赖方式明显减少 Ca Ski 细胞的集落。

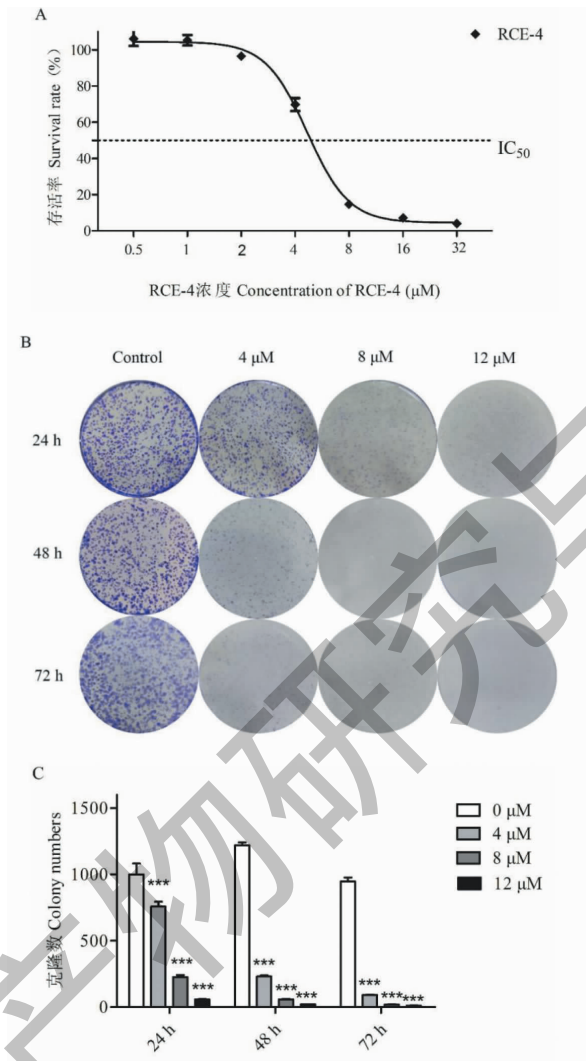


图 2 RCE-4 对 Ca Ski 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 RCE-4 can inhibit the proliferation of Ca Ski cells

注:(A)RCE-4 处理 Ca Ski 细胞 48 h 后通过 MTT 法测定评估增殖抑制效应;(B)Ca Ski 细胞分别用各种浓度(0、4、8 和 12 μM)的 RCE-4 处理 24 h、48 h 和 72 h。细胞活力通过集落形成试验确定;(C)直方图表示 Ca Ski 细胞集落数的数目。数据表示为三个实验的平均值 ± SD。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。Note:(A) Ca Ski cells were treated with RCE-4 for 48 h, and proliferation inhibition was assessed by MTT assay;(B) The Ca Ski cells were treated with various concentrations (0, 4, 8 and 12 μM) of RCE-4, respectively for 24 h, 48 h, and 72 h. The cell viability was determined by colony formation assay;(C) The histogram indicates the number of Ca Ski cell colony numbers. Data are expressed as the mean ± SD of three experiments. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

2.2 RCE-4 对 Ca Ski 细胞迁移的影响

我们采用了划痕实验和 Transwell 迁移来探讨 RCE-4 对 Ca Ski 细胞体外迁移的影响。划痕试验(见图 3A、3B)和 Transwell 小室实验(见图 3C、3D)的结果均表明,RCE-4 能极显著($P < 0.001$)的抑制 Ca Ski 细胞的体外迁移。

2.3 RCE-4 对 Ca Ski 细胞侵袭的影响

为了阐明 RCE-4 在抑制 Ca Ski 细胞侵袭中的影响,我们采用了 Transwell 侵袭实验。在 Transwell 小室的底部添加基质胶,以模仿体内细胞外基质。结果如图 4A、4B 所示,RCE-4 以剂量依赖性方式显著抑制 Ca Ski 细胞的侵袭($P < 0.001$)。

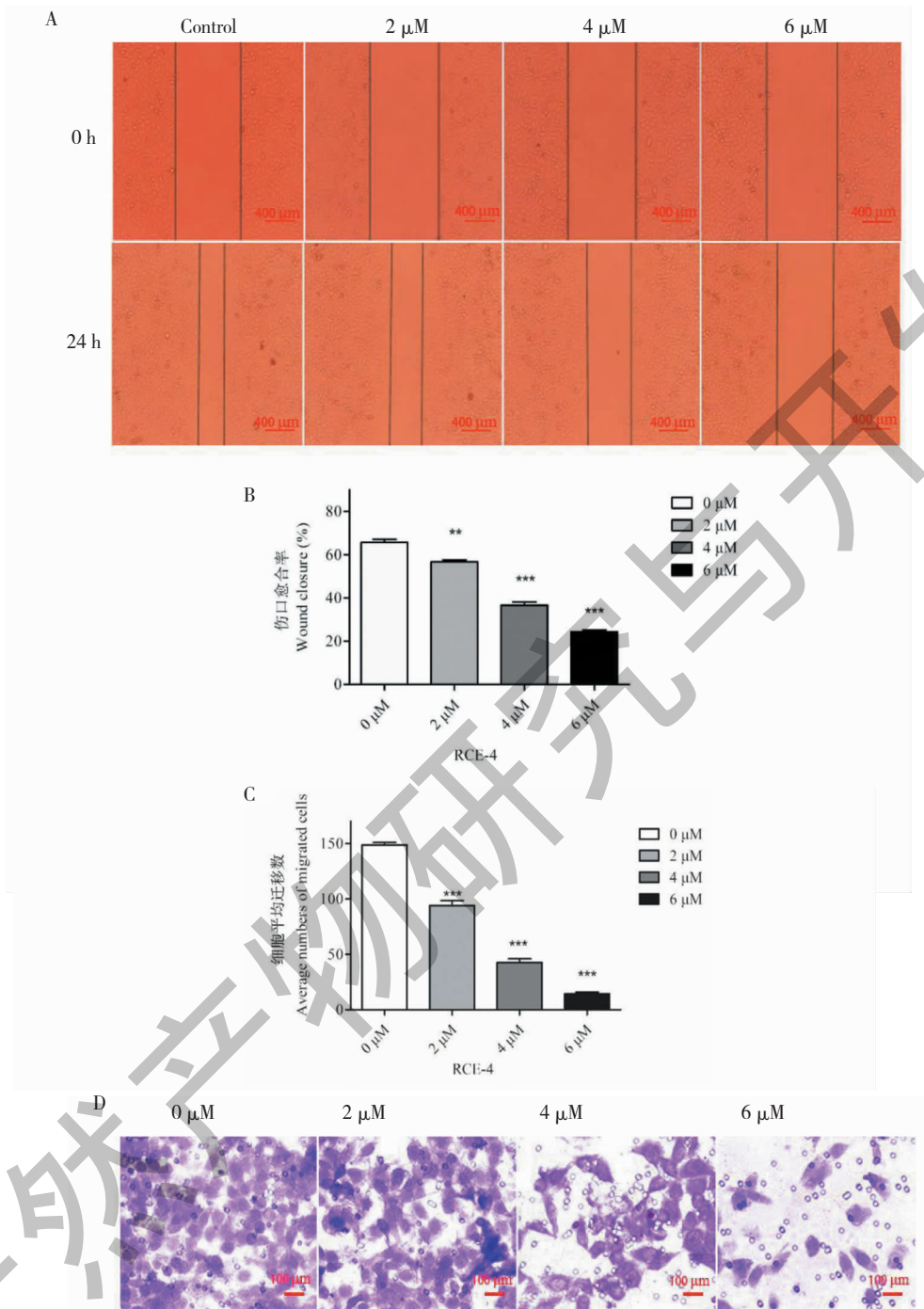


图3 RCE-4抑制了Ca Ski细胞的迁移

Fig. 3 RCE-4 can inhibit the migration of Ca Ski cells

注:(A)用不同浓度的RCE-4处理接种在六孔板上的Ca Ski细胞。给药24 h后,细胞迁移的变化。比例尺:400 μm;(B)直方图表示24 h后Ca Ski细胞中伤口愈合的百分比;(C)在具有不同浓度的RCE-4的Ca Ski细胞上进行Transwell迁移测定24 h。将穿过膜的细胞染色并在显微镜下观察;(D)直方图表示穿过膜的Ca Ski细胞的数量。比例尺:100 μm。数据表示为三个实验的平均值±SD。与对照组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:(A) Ca Ski cells inoculated on six-well plates were treated with various concentrations of RCE-4. After administration for 24 hours, the cells migration was recorded. Scale bars: 400 μm;(B) The histogram indicates the percentage of wound healing in Ca Ski cells after 24 h;(C) Transwell migration assays were performed on Ca Ski cells for 24 h with different concentrations of RCE-4. The cells that passed through the membrane were stained and observed under a microscope;(D) The histogram indicates the number of Ca Ski cells passing through the membrane. Scale bars: 100 μm. Data are expressed as the mean ± SD of three experiments. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

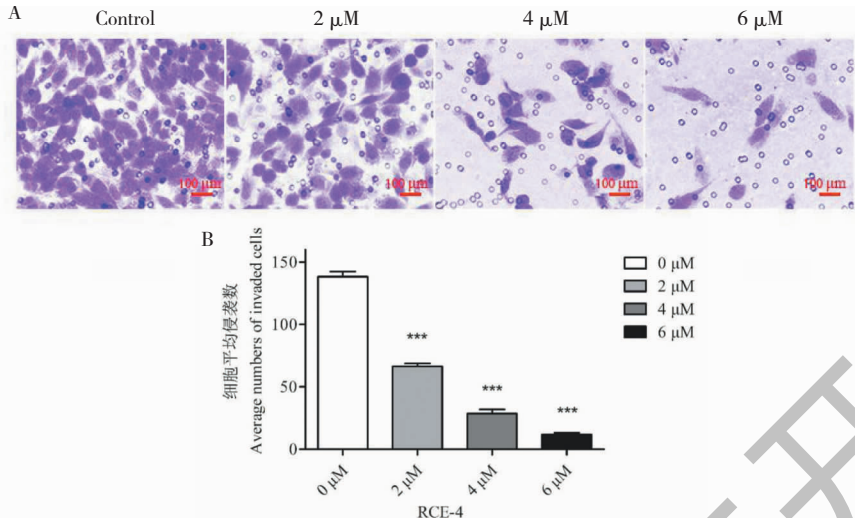


图4 RCE-4 抑制了 Ca Ski 细胞的侵袭

Fig. 4 RCE-4 can inhibit the invasion of Ca Ski cells

注:(A)在不同浓度的 RCE-4 上对 Ca Ski 细胞进行 24 h Transwell 侵袭测定。将基质胶添加到 Transwell 腔室的底部,以模拟体内的细胞外基质。将通过基质胶的细胞染色并在显微镜下观察。比例尺:100 μm;(B)直方图表示穿过基质胶的 Ca Ski 细胞的数量。数据表示为三个实验的平均值 ± SD。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。Note: (A) Transwell invasion assays were performed on Ca Ski cells for 24 h in different concentrations of RCE-4. Matrigel was added to the bottom of the Transwell chambers to mimic the extracellular matrix in the body. The cells that passed through the matrigel were stained and observed under a microscope. Scale bars: 100 μm; (B) The histogram indicates the number of Ca Ski cells passing through the matrigel. Data are expressed as the mean ± SD of three experiments. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

2.4 RCE-4 对 β -catenin 由胞浆入核的影响

β -catenin 由胞浆入核是整个 Wnt/ β -catenin 信号通路激活的关键环节。 β -catenin 入核后与转录因子结合,转录出诸多下游蛋白,从而促进肿瘤细胞迁移。我们分别采用间接免疫荧光实验及 Western blot 方法来评估 RCE-4 对 β -catenin 入核的影响。间接免疫荧光实验(见图 5A、5B)和 Western blot 实验(见图 5C、5D)结果均表明,RCE-4 以时间和剂量依赖的方式显著的抑制了 β -catenin 由胞浆进入细胞核。

2.5 RCE-4 对 YAP/TAZ 由胞浆入核的影响

同 β -catenin 相似,YAP/TAZ 蛋白分子由胞浆入核是整个 Hippo/YAP 信号通路激活的关键环节。YAP/TAZ 入核后与转录因子结合,转录出诸多下游蛋白,从而促进肿瘤细胞侵袭。我们同样分别采用间接免疫荧光实验及 Western blot 方法来评估 RCE-4 对 YAP/TAZ 入核的影响。间接免疫荧光实验(见图 6A、6B)和 Western blot 实验(见图 6C、6D)结果均表明,RCE-4 以时间和剂量依赖的方式显著的抑制了 YAP/TAZ 由胞浆进入细胞核。

2.6 RCE-4 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控

在 Wnt/ β -catenin 信号通路中,PAK4、GSK3 β 和

磷酸化的 β -catenin 等共同调控着 β -catenin 的入核,其下游转录产物主要为基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员,与肿瘤细胞的侵袭能力密切相关。Western blot 实验结果(见图 7A ~ 7D、8A ~ 8D)显示,不同浓度的 RCE-4 作用 Ca ski 细胞 6 h 和 12 h 之后可以显著增强 p- β -catenin 的表达,作用 24 h 之后可以显著增强 GSK3 β 的表达。同时,Wnt/ β -catenin 信号通路中的其它关键蛋白如 PAK4、p-GSK3 β 、 β -catenin 以及下游转录产物 MMP2、MMP7、MMP9、MMP14、c-Myc 均以时间和剂量依赖的方式被显著抑制,表明 RCE-4 抑制了 Ca Ski 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。

2.7 RCE-4 对 Hippo/YAP 信号通路的调控

在 Hippo/YAP 信号通路中,MST1、p-MST1、NUAK2、LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP 等共同调控着 YAP/TAZ 的入核,其下游转录产物主要为包括 VCAM-1、ICAM-1、CYR61、SOX2 等成员,与肿瘤细胞的迁移能力密切相关。Western blot 实验结果(见图 8A ~ 8D、9A ~ 9D)显示,RCE-4 可以以时间和剂量依赖的方式显著抑制 MST1、LATS1、NUAK2、YAP/TAZ、YAP、VCAM-1、ICAM-1、CYR61、SOX2 的表达,在作用 6 h 和 12 h 的时候显著增强 p-YAP、p-LATS1

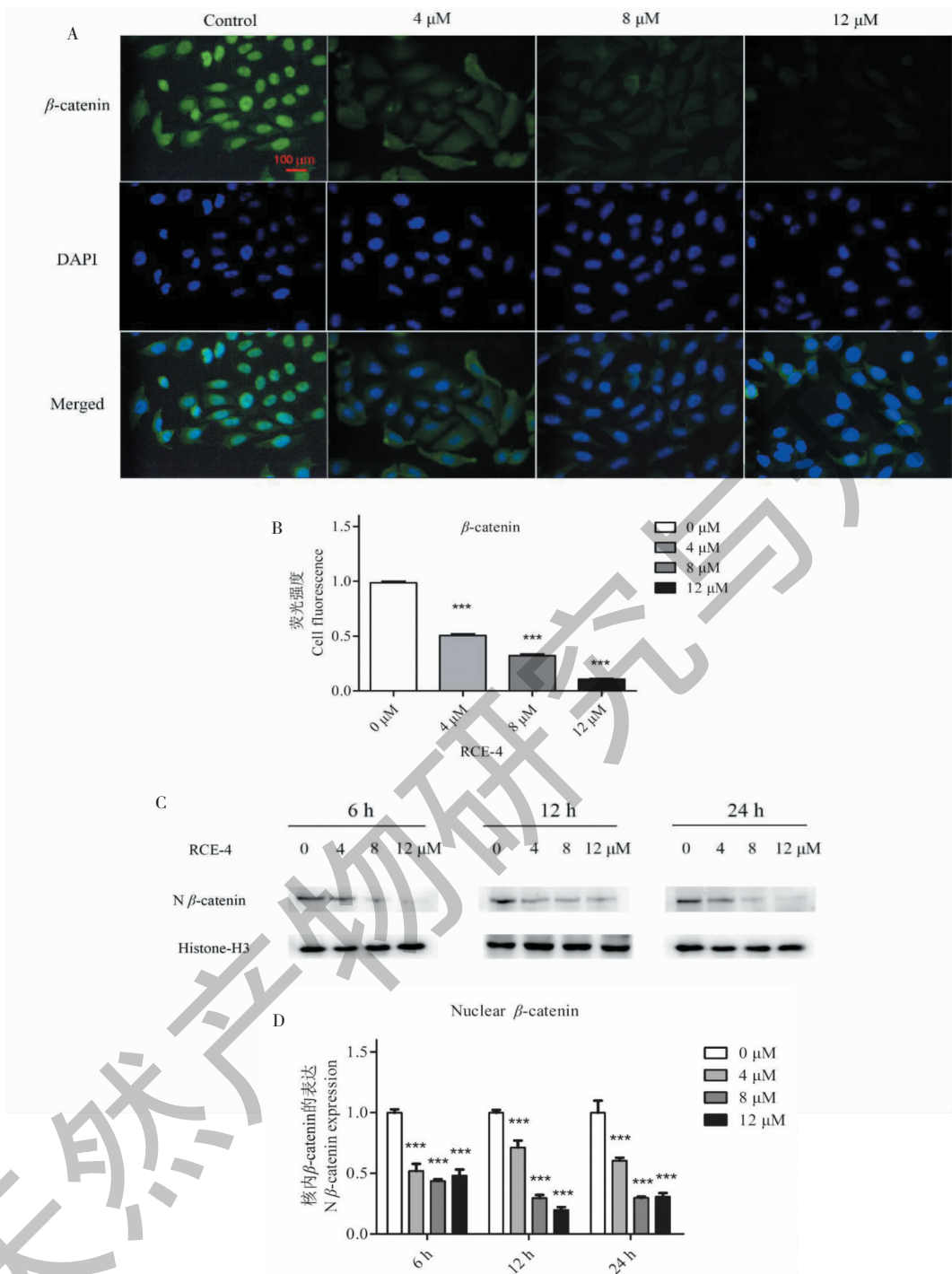


图5 RCE-4对 β -catenin核转录的抑制作用

Fig. 5 RCE-4 inhibits the nuclear translocation of β -catenin

注:(A)通过免疫荧光评估 β -catenin在Ca Ski细胞中的位置。使用抗 β -catenin抗体对培养的Ca Ski细胞进行免疫荧光染色。比例尺:100 μm ;(B)直方图表示(A)中的细胞荧光强度比;(C)在用各种浓度的RCE-4处理6、12、24 h后,通过蛋白质印迹法检测到 β -catenin的表达;(D)直方图显示(C)中的相对蛋白质。绿色表示 β -catenin的表达,蓝色表示核染色的DAPI。条形图表示上述蛋白质的平均值 \pm SD。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。Note:(A) The location of β -catenin in Ca Ski cells was assessed by immunofluorescence. Cultured Ca Ski cells were suffered immunofluorescence staining with anti- β -catenin antibody. Scale bars: 100 μm ;(B) The histogram indicates the cell fluorescence intensity ratio in (A);(C) The expression of β -catenin was detected by western blotting after treatment with various concentrations of RCE-4 for 6 h, 12 h and 24 h;(D) The histogram shows the relative protein in (C). The green indicated the expression of β -catenin, and the blue denoted nuclear stained DAPI. The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

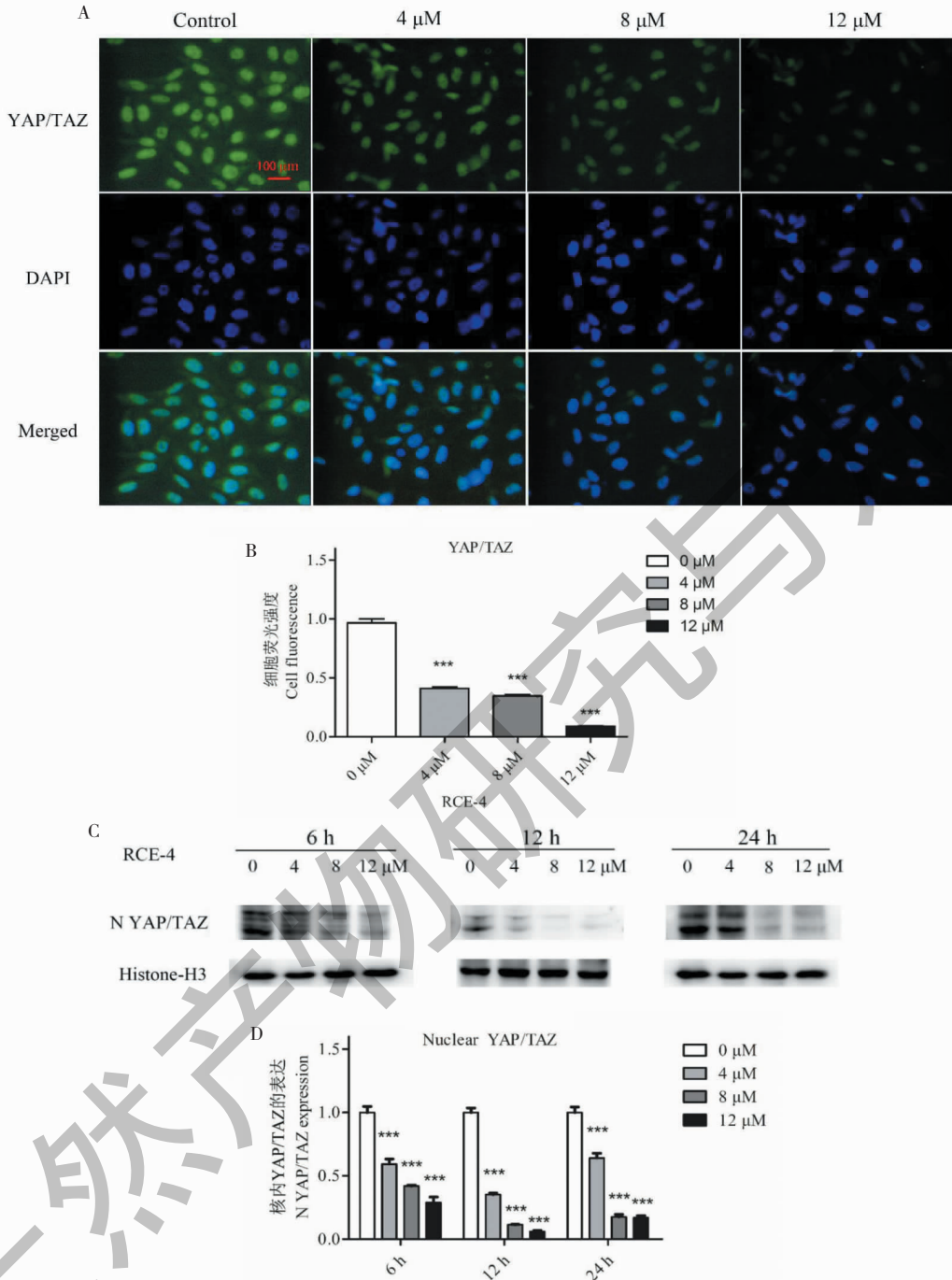


图 6 RCE-4 对 YAP/TAZ 核转录的抑制作用

Fig. 6 RCE-4 inhibits the nuclear translocation of YAP/TAZ

注:(A)通过免疫荧光测定法评估 YAP/TAZ 在 Ca Ski 细胞中的位置。用抗 YAP/TAZ 抗体对培养的 Ca Ski 细胞进行免疫荧光染色。比例尺:100 μm ; (B)直方图表示(A)中的细胞荧光强度比; (C)在用各种浓度的 RCE-4 处理 6 h、12 h 和 24 h 后,通过蛋白质印迹法检测到 YAP/TAZ 的表达; (D)直方图表示(C)中的相对蛋白质表达。绿色表示 YAP/TAZ 的表达,蓝色表示核染色的 DAPI。条形图表示上述蛋白质的平均值 \pm SD。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。Note: (A) The location of YAP/TAZ in Ca Ski cells was assessed by immunofluorescence assays. Cultured Ca Ski cells were subjected to immunofluorescence staining with anti-YAP/TAZ antibody. Scale bars: 100 μm ; (B) The histogram indicates the cell fluorescence intensity ratio in (A); (C) The expression of YAP/TAZ was detected by western blotting after treatment with various concentrations of RCE-4 for 6 h, 12 h and 24 h; (D) The histogram indicates the relative protein expression in (C). The green indicated the expression of YAP/TAZ, and the blue denoted nuclear stained DAPI. The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

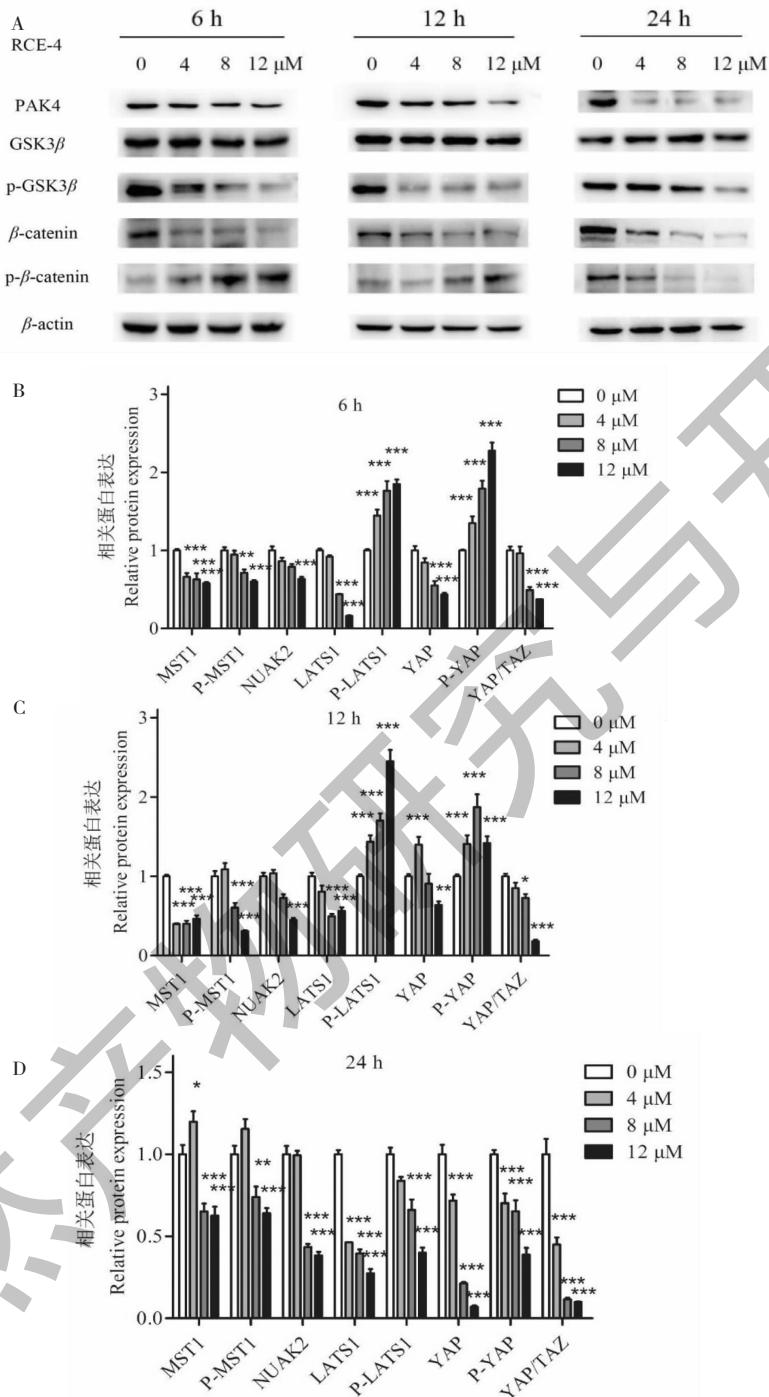


图7 RCE-4对Wnt/ β -catenin信号通路的调控

Fig. 7 RCE-4 inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway

注:(A)在用不同浓度的RCE-4处理6 h、12 h和24 h后通过免疫印迹检测PAK4、GSK3 β 、p-GSK3 β 、 β -catenin和p- β -catenin的表达。 β -actin作为内参;(B)直方图表示(A)中6 h的相对蛋白表达;(C)直方图表示(A)中12 h的相对蛋白质表达;(D)直方图显示(A)中24 h的相对蛋白质表达。条形图表示上述蛋白质的平均值 \pm SD。与对照组相比,* P < 0.05,** P < 0.01,*** P < 0.001。Note:(A) The expressions of PAK4,GSK3 β ,p-GSK3 β , β -catenin and p- β -catenin and were detected after treatment with various concentrations of RCE-4 for 6 h,12 h and 24 h by immunoblotting. β -actin was included as loading control;(B) The histogram indicates the relative protein expression of 6 h in (A);(C) The histogram indicates the relative protein expression of 12 h in (A);(D) The histogram shows the relative protein expression of 24 h in (A). The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group,* P < 0.05,** P < 0.01,*** P < 0.001.

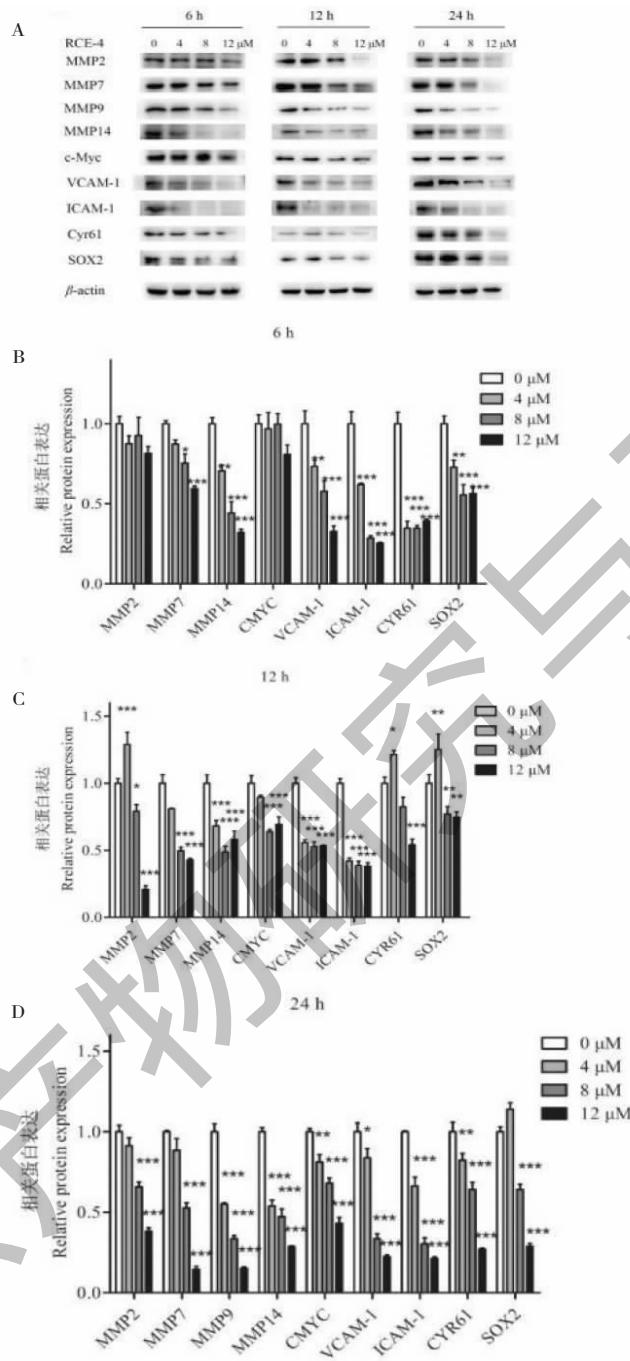


图8 RCE-4 对下游靶蛋白表达的影响

Fig. 8 RCE-4 inhibits the downstream target proteins expression

注:(A)经不同浓度的 RCE-4 处理 6、12 和 24 h 后,免疫印迹法检测 MMP2、MMP7、MMP9、MMP14、c-Myc、VCAM-1、ICAM-1、CYR61 和 SOX2 的表达。 β -actin 作为内参。(B)直方图显示(A)中 6 h 的相对蛋白表达。(C)直方图显示(A)中 12 h 的相对蛋白质表达。(D)直方图显示(A)中 24 h 的相对蛋白质表达。条形图表示上述蛋白质的平均值 \pm SD。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: (A) The expressions of MMP2, MMP7, MMP9, MMP14, c-Myc, VCAM-1, ICAM-1, CYR61 and SOX2 were detected after treatment with various concentrations of RCE-4 for 6, 12 and 24 h by immunoblotting, β -actin was included as loading control; (B) The histogram shows the relative protein expression of 6 h in (A); (C) The histogram shows the relative protein expression of 12 h in (A); (D) The histogram shows the relative protein expression of 24 h in (A). The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

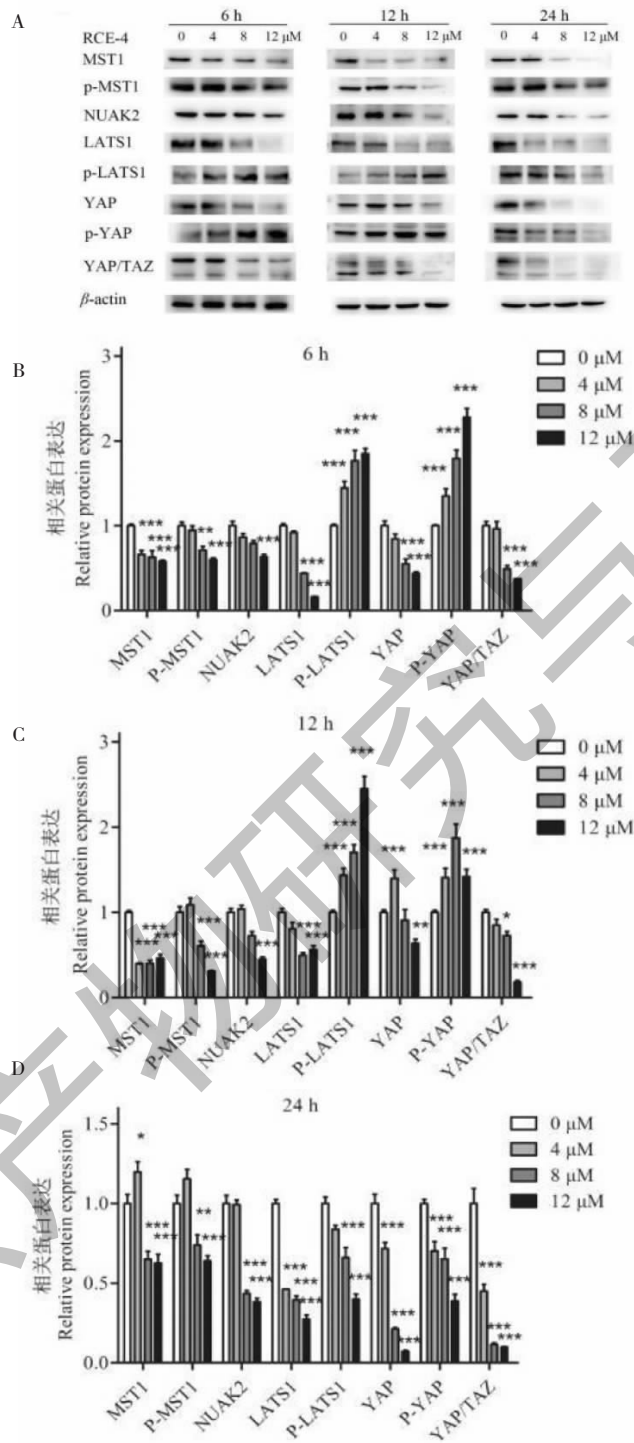


图9 RCE-4对Hippo/YAP信号通路的调控

Fig. 9 RCE-4 activates Hippo/YAP signaling pathway

注:(A)用不同浓度的RCE-4处理6、12和24 h后,检测MST1、p-MST1、NUAK2、LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP和YAP/TAZ的表达。 β -actin作为内参;(B)直方图表示(A)中6 h的相对蛋白表达;(C)直方图表示(A)中12 h的相对蛋白质表达;(D)直方图显示(A)中24 h的相对蛋白质表达。条形图表示上述蛋白质的平均值 \pm SD。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:(A) The expressions of MST1, p-MST1, NUAK2, LATS1, p-LATS1, YAP, p-YAP and YAP/TAZ were detected after treatment with various concentrations of RCE-4 for 6, 12 and 24 h by immunoblotting. β -actin was included as loading control;(B) The histogram indicates the relative protein expression of 6 h in (A); (C) The histogram indicates the relative protein expression of 12 h in (A); (D) The histogram shows the relative protein expression of 24 h in (A). The bar graphs represent the mean \pm SD of the above proteins. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

的表达,表明 RCE-4 显著激活了 Ca Ski 细胞中 Hippo/YAP 信号通路。详细机制图如图 10 所示。

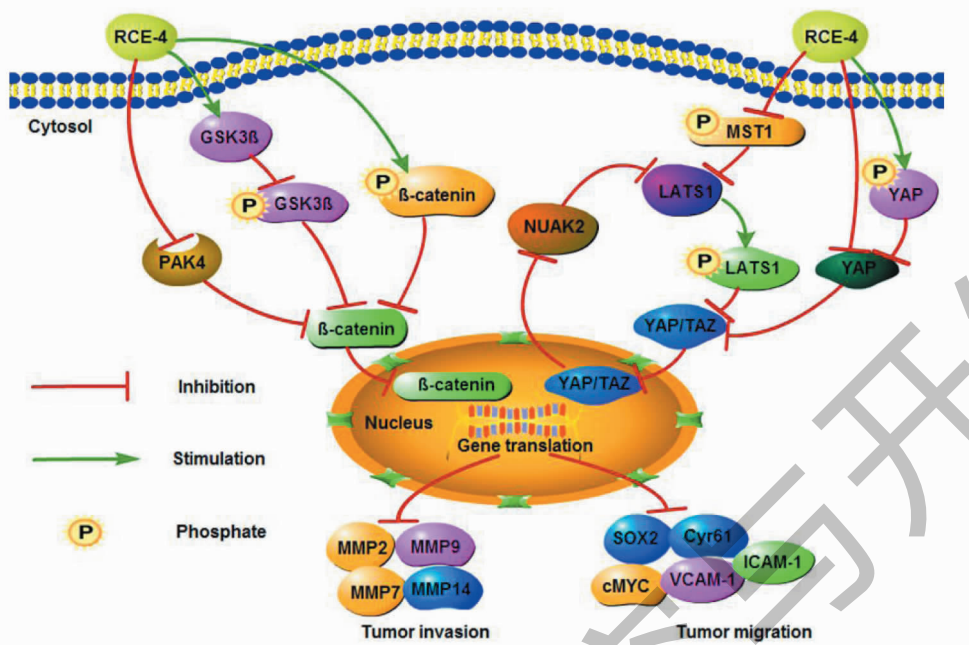


图 10 图文概要

Fig. 10 Graphical abstract

注:RCE-4 抑制 Ca Ski 细胞迁移和侵袭的示意图。RCE-4 处理后,抑制了 β -catenin 和 YAP/TAZ 蛋白入核,GSK3 β 、p- β -catenin、p-YAP、p-LATS1 的蛋白表达量增加,PAK4、p-GSK3 β 、 β -catenin、MST1、LATS1、NUAK2、YAP/TAZ、YAP 的蛋白表达量减少,下游靶蛋白 MMPs、c-Myc、SOX2、CYR61、VCAM-1、ICAM-1 的表达被抑制,提示 RCE-4 体外可能通过对 Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 信号通路的调控发挥其抗 Ca Ski 细胞侵袭和迁移的作用。Note: Schematic diagram of RCE-4 inhibiting Ca Ski cell migration and invasion. After RCE-4 treatment, β -catenin and YAP/TAZ protein were inhibited from entering the nucleus, and the protein expression of GSK3 β , p- β -catenin, p-YAP, and p-LATS1 increased, and PAK4, p-GSK3 β , β -catenin, The protein expression of MST1, LATS1, NUAK2, YAP/TAZ, and YAP is reduced, and the expression of downstream target proteins MMPs, c-Myc, SOX2, CYR61, VCAM-1, and ICAM-1 are inhibited, suggesting that RCE-4 may be The regulation of Wnt/ β -catenin and Hippo/YAP signaling pathway exerts its anti-Ca Ski cell invasion and migration effect.

3 讨论

本实验室前期通过 MTT 实验已显示 RCE-4 可呈时间和剂量依赖的方式抑制 Ca Ski 细胞的增殖,本研究克隆形成实验的结果进一步的验证了 RCE-4 的有效性。另外,通过划痕实验以及 Transwell 小室体外侵袭实验检测了 RCE-4 对 Ca Ski 细胞侵袭和迁移的影响。结果显示,RCE-4 能显著抑制 Ca Ski 细胞的迁移和侵袭能力,且具有浓度依赖性。

Wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤的迁移中发挥着重要作用, β -catenin 的入核是该通路激活的关键^[15]。结果显示,RCE-4 可通过抑制 p-GSK3 β 的表达、促进 β -catenin 的磷酸化以及抑制 PAK4 的表达三种途径共同抑制 β -catenin 的入核,进而抑制下游基因基质金属蛋白酶 MMP2/7/9/14 等的转录。有意思的是,最新的研究发现,抑制 PAK4 的活性可以协同增强 PD-1 免疫阻断疗法的治疗效果^[16]。PD-1

疗法在肿瘤组织缺乏免疫细胞预先浸润的情况下,疗效甚微,这也是 PD-1 疗法产生抗药性的主要原因^[17]。使用 PAK4 抑制剂后可显著增强体内瘤组织对 PD-1 阻断疗法的响应,考虑到 RCE-4 对 PAK4 显著的抑制作用,这为我们提供了新的研究方向。

Hippo/YAP 信号通路与肿瘤细胞侵袭的关系也已得到证实^[18],但到目前为止,针对 Hippo/YAP 信号通路的药物还相对较少。2018 年,Gill 等^[19]发现,该通路围绕 YAP/TAZ 分子入核过程存在着一个特殊的正反馈循环,该循环由 NUAK2、LATS1、p-LATS1、胞浆内和细胞核内 YAP/TAZ 五个蛋白分子组成,NUAK2 可以通过抑制 LATS1 的表达以阻止 LATS1 的磷酸化,从而促进 YAP/TAZ 复合物分子由胞浆向细胞核的转移,进入核内的 YAP/TAZ 分子与 NUAK2 转录子结合,转录出的 NUAK2 进入胞浆,以此形成正反馈循环。该循环的发现使 Hippo/

YAP 信号通路更显复杂,也解释了调控 Hippo/YAP 信号通路以抑制肿瘤细胞侵袭的困难性。本实验结果显示,RCE-4 可以通过多条途径,包括抑制 MST1 的磷酸化,增强 YAP 的磷酸化以及减少 YAP 的表达等共同抑制 YAP/TAZ 的入核,核内 YAP/TAZ 的减少又导致 NUA2 的表达降低,从而打破了此正反馈循环。循环的打破导致其下游细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、CYR61 以及 SOX2 等蛋白表达的减少,Ca Ski 细胞的迁移能力被显著抑制。

值得注意的是,细胞内 Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 两条信号通路并非毫无联系,二者在很多方面存在交互作用^[20,21],比如磷酸化的 YAP/TAZ 能与 β -catenin 结合导致 β -catenin 滞留在胞质中,从而抑制 β -catenin 的转录活性^[22]。YAP 可以诱导 GSK3 β 的失活,失活的 GSK3 β 进而稳定胞质的 β -catenin,促进 β -catenin 的核转移^[23]。本研究尚未对两条信号通路的互反馈调控进行深入研究,同时,本阶段的研究也具有一定的局限性,对于如 Hela、SiHa 等其它宫颈癌细胞株还未进行验证,以及缺少动物实验结果,这也是我们下一步的研究方向。

综上所述,RCE-4 具有较好的抑制 Ca Ski 细胞侵袭和迁移的能力,其分子作用机制主要是通过阻止 β -catenin 和 YAP/TAZ 的入核这一关键环节从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化以及激活 Hippo/YAP 信号通路来实现。

参考文献

- Olusola P, Banerjee HN, Phillely JV, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities [J]. *Cells*, 2019, 8: 622-634.
- Administration HFAD. Quality Standards for Traditional Chinese Medicines in Hubei Province (湖北省中药材质量标准) [M]. Hubei, Science and Technology Press, 2009.
- Wang G, Huang W, He H, et al. Growth inhibition and apoptosis-inducing effect on human cancer cells by RCE-4, a spirostanol saponin derivative from natural medicines [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 31: 219-224.
- Xiang W, Zhang RJ, Jin GL, et al. RCE4, a potential anticervical cancer drug isolated from *reineckia carnea*, induces autophagy via the dual blockade of PI3K and ERK pathways in cervical cancer CaSki cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 45: 245-254.
- Yang XJ, Bai CH, Zou K, et al. Steroidal saponin RCE-4 from *reineckia carnea* inhibits growth of human cervical cancer xenograft in nude mice [J]. *J Thir Mili Med Univ (第三军医大学学报)*, 2016, 38: 476-482.
- Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 1-17.
- Liu F, Millar SE. Wnt/ β -catenin signaling in oral tissue development and disease [J]. *J Dent Res*, 2010, 89: 318-330.
- Pocaterra A, Romani P, Dupont S. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(2): jcs230425.
- Jiang TT, Bai JY, Ren QM, et al. Delphinidin suppresses breast cancer by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*. 2019, 31: 981-985.
- Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development [J]. *J Cancer Res Clin*, 2003, 129: 199-221.
- Macdonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- Ren BX, Ren HH, Chen XY, et al. Effects of rosmarinic acid on cell proliferation, apoptosis and migration in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30: 1300-1305.
- Gumbiner BM, Kim NG. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127: 709-717.
- Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2015, 47(1): 16-28.
- Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, et al. Wnt signaling pathway in development and cancer [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69: 185-196.
- Gabriel A, Davis YT, Wei L, et al. PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy [J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(1): 46-58.
- Chaker M, Minden A, Chen S, et al. Rho GTPase effectors and NAD metabolism in cancer immune suppression [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2017, 22(1): 9-17.
- Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 116.
- Gill MK, Christova T, Zhang YY, et al. A feed forward loop enforces YAP/TAZ signaling during tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3510.
- Bernascone I, Martin-Belmonte F. Crossroads of Wnt and Hippo in epithelial tissues [J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23:

- 380-389.
- 21 Andl T, Zhang Y. Reaping Wnt after calming Hippo: Wnt and Hippo signaling cross paths in lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9:4174-4179.
- 22 Kim M, Jho E. Cross-talk between Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways: a brief review [J]. *BMB Rep*, 2014, 47: 540-545.
- 23 Konsavage WM, Yochum GS. Intersection of Hippo/YAP and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2013, 45(2):71-79.

基于代谢组学和网络药理学的温经汤抗肺癌研究

目前,传统的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗方法有许多缺点,使用免疫抑制剂的肿瘤免疫疗法是全球最主要的治疗类型。尽管取得了一些成功,但只有不到 30% 的患者受益于这种疗法。最糟糕的是,在使用免疫疗法时,通常会遇到免疫相关不良反应,包括胃肠道毒性、肝炎和内分泌疾病等。因此,寻找一种副作用较小的替代疗法是必要和紧迫的。

温经汤是一种被广泛使用的中药经典方剂,临床上已成功用于治疗各种肺系统疾病。然而,温经汤的关键活性成分和作用靶点尚不清楚。来自澳门科技大学中药学院的 Li 等人对温经汤抗非小细胞肺癌作用进行了研究,该研究首次通过整合网络药理学、代谢组学和生物学方法探讨了温经汤治疗非小细胞肺癌的药理作用机制。网络药理学结果推测,Tricin 是该方中的主要生物活性成分,其能够靶向 PRKCA 抑制癌细胞生长。代谢组学分析表明,受鞘氨醇激酶 1 和鞘氨醇激酶 2 调节的鞘氨醇-1-磷酸(参与鞘脂信号传导)是温经汤治疗组和对照组之间的血浆差异代谢物。体外实验表明,Tricin 对 Lewis 肺癌细胞的增殖、促凋亡、迁移和集落形成具有明显的作用。通过一系列验证实验表明,Tricin 主要通过抑制 PRKCA/SPHK/S1P 信号通路和抗凋亡信号通路抑制肿瘤生长。另一方面,温经汤能抑制肿瘤生长,延长动物生存时间,高剂量的 Tricin 在动物实验中更有效。总之,该研究证实了温经汤及其主要活性成分 Tricin 是 NSCLC 患者有希望的替代疗法,相关研究发表在《Pharmacological Research》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661821001584>

原文标题:Metabolomics and integrated network pharmacology analysis reveal Tricin as the active anti-cancer component of Weijing decoction by suppression of PRKCA and sphingolipid signaling