

## 苦参碱通过调控 $\beta$ -catenin 信号通路抑制肝癌细胞干性

戴美琴<sup>1</sup>, 蔡 茁<sup>3</sup>, 陈娜娜<sup>2</sup>, 李金州<sup>1</sup>, 温嘉泳<sup>1</sup>, 谭丽转<sup>1</sup>, 郭 丹<sup>1</sup>

南方医科大学<sup>1</sup>南方医院药学部,<sup>2</sup>药学院, 广东 广州 510515;<sup>3</sup>南部战区空军医院药剂科, 广东 广州 510602

**摘要:**目的 探讨苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞增殖活性、细胞干性、 $\beta$ -catenin转录活性以及AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin信号通路的影响。方法 应用MTT法检测细胞增殖活性, 平板克隆形成实验检测0 g/mL、200 g/mL、400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞的克隆形成能力, 荧光定量PCR分析0 g/mL、200 g/mL、400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞干性基因CD90、EpCAM(上皮细胞粘附分子)和CD133 mRNA的表达水平, 双荧光素酶报告基因检测0 g/mL、200 g/mL、400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞内 $\beta$ -catenin转录活性, Western blotting检测0 g/mL、400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞内AKT(蛋白激酶B)、GSK-3 $\beta$ 和 $\beta$ -catenin及其相应磷酸化蛋白的表达水平。结果 MTT实验结果显示, 苦参碱呈时间-浓度依赖性抑制肝癌HepG2和Huh7细胞的增殖, 处理24、48、72 h对HepG2细胞的半数抑制浓度依次为2369、1565、909.1  $\mu$ g/mL, 对Huh7细胞的半数抑制浓度依次为1355、781.8、612.8  $\mu$ g/mL。苦参碱浓度依赖性抑制肝癌细胞的克隆形成能力, 400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱能够显著抑制HepG2细胞的克隆形成能力( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 200 g/mL、400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱能够显著抑制Huh7细胞的克隆形成能力( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。苦参碱能够显著抑制肝癌细胞内CD90、EpCAM和CD133等干细胞标志物mRNA的表达, 其中400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱能够显著抑制HepG2细胞中CD90( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )、EpCAM( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )和CD133( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )mRNA的表达, 400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱能够显著抑制Huh7细胞中CD90( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )、EpCAM( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )和CD133( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )mRNA的表达。同时400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱显著抑制HepG2细胞( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )和Huh7细胞( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )内 $\beta$ -catenin的转录活性。研究结果显示400  $\mu$ g/mL、800  $\mu$ g/mL苦参碱能够显著降低HepG2和Huh7细胞内 $\beta$ -catenin和磷酸化的AKT和GSK-3 $\beta$ 蛋白水平, 增加 $\beta$ -catenin的磷酸化水平。结论 苦参碱可抑制肝癌HepG2和Huh7细胞的增殖、克隆形成以及肝癌干性基因CD90、EpCAM和CD133的表达, 其机制可能与抑制AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin信号通路, 从而降低 $\beta$ -catenin的转录活性有关。

**关键词:**苦参碱; 肝细胞癌; 肿瘤干性;  $\beta$ -catenin

## Matrine suppresses stemness of hepatocellular carcinoma cells by regulating $\beta$ -catenin signaling pathway

DAI Meiqin<sup>1</sup>, CAI Zhuo<sup>3</sup>, CHEN Nana<sup>2</sup>, LI Jinzhou<sup>1</sup>, WEN Jiayong<sup>1</sup>, TAN Lizhuan<sup>1</sup>, GUO Dan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, <sup>2</sup>College of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

<sup>3</sup>Department of Pharmacy, Air Force Hospital of Southern Military Command, Guangzhou 510602, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of matrine on the proliferation, tumor cell stemness,  $\beta$ -catenin transcriptional activity and AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway in human hepatocellular carcinoma (HCC) HepG2 and Huh7 cells.

**Methods** The proliferation and colony formation ability of HepG2 and Huh7 cells treated with 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL matrine were evaluated with MTT assay and colony formation assay, respectively. Real-time quantitative PCR was performed to detect the mRNA expressions of CD90, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and CD133, and dual-luciferase assay was used to detect the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin in the treated cells. The effects of matrine on the expressions of protein kinase B (AKT), P-AKT, GSK-3 $\beta$ , P-GSK-3 $\beta$ , P- $\beta$ -catenin and  $\beta$ -catenin proteins in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway were assessed using Western blotting. **Results** Matrine inhibited the proliferation of the two HCC cell lines in a time- and concentration-dependent manner. The half-inhibitory concentrations of matrine were 2369, 1565 and 909.1  $\mu$ g/mL at 24, 48 and 72 h in HepG2 cells, respectively, and were 1355, 781.8, and 612.8  $\mu$ g/mL in Huh7 cells, respectively. Matrine concentration-dependently suppressed colony formation of the HCC cells, producing significant inhibitory effects at 400  $\mu$ g/mL ( $P < 0.01$ ) and 800  $\mu$ g/mL ( $P < 0.001$ ) in HepG2 cells and at 200  $\mu$ g/mL ( $P < 0.05$ ), 400  $\mu$ g/mL ( $P < 0.01$ ), and 800  $\mu$ g/mL ( $P < 0.001$ ) in Huh7 cells. Matrine at 400 and 800  $\mu$ g/mL significantly inhibited the mRNA expression of CD90, EpCAM and CD133 and the transcriptional level of  $\beta$ -catenin in both HepG2 and Huh7 cells ( $P < 0.05$  or 0.01). Matrine at 400 and 800  $\mu$ g/mL also significantly decreased the protein levels of  $\beta$ -catenin, P-AKT and P-GSK-3 $\beta$  and increased the phosphorylation level of  $\beta$ -catenin in both of the cell lines. **Conclusion** Matrine inhibits the proliferation, colony formation, and the expressions of tumor stem cell markers CD90, EpCAM and CD133 in both HepG2 and Huh7 cells probably by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin.

**Keywords:** matrine; hepatocellular carcinoma; tumor cell stemness;  $\beta$ -catenin

收稿日期: 2019-07-07

基金项目: 广东省自然科学基金(2016A030313595); 广州市科技计划项目(201707010074)

作者简介: 戴美琴, 硕士研究生, E-mail: 1191571995@qq.com

通信作者: 郭 丹, 主任药师, 硕士生导师, E-mail: gdan\_2007@126.com

肝细胞癌(HCC)是恶性程度最高的消化系统肿瘤之一,其发病率和死亡率均位居恶性肿瘤前列<sup>[1]</sup>。研究发现,包括肝癌在内的大部分肿瘤都具有异质性,肿瘤中部分细胞亚群具有干细胞样特征——较强的自我更新能力、侵袭能力、耐药性和可能存在的多潜能分化能力。这群细胞被称为肿瘤干细胞(CSCs)或肿瘤起始细胞(TICs)<sup>[2]</sup>。肿瘤干细胞与肿瘤复发、转移以及耐药密切相关。在肝癌中分离到表达干性标志物 CD90、EpCAM(上皮细胞粘附分子)和 CD133 的肝癌干细胞,这些干性基因的表达受到上游 Wnt/ $\beta$ -catenin 等信号通路的调控<sup>[3]</sup>。苦参碱是从天然豆科植物苦参根中分离提取的生物碱<sup>[4]</sup>,具有抗病毒、免疫抑制、抗肿瘤、抗肝纤维化以及调节心律失常等药理作用<sup>[5-9]</sup>。近年来,临床上将苦参碱与其它化疗药物联合试用于肿瘤的治疗,并取得一定的疗效<sup>[10-11]</sup>。有研究报道,苦参碱抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡和自噬,抗肿瘤血管生成等<sup>[12-14]</sup>。但其具体作用机制尚未明确。我们以往的研究发现,苦参碱具有抑制肝癌 Hep3B 细胞生长和  $\beta$ -catenin 转录活性的作用,本研究旨在探讨苦参碱对肝癌细胞干性的影响,并从 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨其作用机制,为临床应用苦参碱防治肝癌转移复发提供实验和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株购自美国典型培养物中心(ATCC),人肝癌 Huh7 细胞株购买于中国科学院细胞库。

1.1.2 药物与试剂 苦参碱注射液(广州白云山明兴制药有限公司);DMEM 高糖细胞培养基(Gibco);MTT (Sigma);PBS(博士德);二甲基亚砜(Sigma);4%多聚甲醛(Biosharp);结晶紫(远航化工厂);RIPA 裂解液(康为世纪);蛋白酶抑制剂(康为世纪),磷酸酶抑制剂(康为世纪),Pierce BCA Protein Assay Kit 试剂盒(Thermo Scientific);一抗 AKT, P-AKT, GSK3 $\beta$ , P-GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, P- $\beta$ -catenin(Cell signaling technology);二抗(碧云天);Immobilon ECL 发光液(弗德),荧光素酶质粒 TOP<sup>Flash</sup>和 FOP<sup>Flash</sup>(Upstate),pRL-TK(Promega),双荧光素酶报告系统(Promega),Lipofectamin 2000(Invitrogen),SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II 试剂盒(Takara),RT-PCR 逆转录试剂盒(Takara)。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞增殖活性 取生长状态良好并处于对数生长期的人肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞,吸弃培养液,用胰酶消化后制备单细胞悬液,根据  $2.5 \times 10^3$  孔的细胞密度接种于 96 孔板,各组设置 3 个复孔。待细胞过夜贴壁稳定生长后,吸弃培养基,孔内加入含有不同浓

度梯度苦参碱(0、200、400、800、1 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养液。并于苦参碱处理 24、48、72 h 后加入终浓度为 0.5 mg/mL MTT 溶液,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱继续孵育 4 h。吸弃培养液,加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,震荡 10 min 至甲臞结晶完全溶解,在多功能酶标仪检测吸光度  $A_{490 \text{ nm}}$ 。并根据公式计算苦参碱对肝癌细胞生长的抑制率,并用 Prism 5.0 软件计算 IC<sub>50</sub>。细胞生长抑制率按以下公式计算:抑制率%=(1- $A_{\text{处理组}}/A_{\text{对照组}}$ ) $\times 100\%$ 。

1.2.2 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 取生长状态良好并处于对数生长期的人肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞,吸弃培养液,用胰酶消化后制备单细胞悬液,以  $3 \times 10^3$  孔的细胞密度接种于 6 孔板中,呈十字型摇晃均匀。待细胞过夜贴壁稳定生长后,吸弃培养基,孔内加入含有不同浓度梯度苦参碱(0、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养液。待苦参碱处理 48 h 后,换成不含药的完全培养液,继续培养至出现肉眼可见克隆斑。吸弃板中培养液,用 PBS 清洗 2 次后加入 1 mL 4%多聚甲醛固定细胞,10 min 后吸弃固定液,加入 1 mL 0.5%结晶紫染色 10 min 后流水冲洗多余染液,晾干后对板内克隆斑进行拍照和计数。根据如下公式计算各组的细胞克隆形成率:克隆形成率%=(克隆形成数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 qRT-PCR 检测肝癌细胞干性标志基因表达 取生长状态良好并处于对数生长期的人肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞制备单细胞悬液,以  $1 \times 10^5$  孔的细胞密度接种于 6 孔板中,待细胞过夜贴壁稳定生长后,吸弃培养基,孔内加入含有不同浓度梯度苦参碱(0、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养液。苦参碱处理 48 h 根据总 RNA 提取试剂盒对肝癌细胞内总 RNA 提取,采用逆转录试剂盒对提取的 RNA 样本进行逆转录成 cDNA,逆转录结束后,运用实时荧光定量 PCR 反应对 cDNA 进行扩增检测目的基因的 mRNA 表达水平。引物:CD133:F:5'-TTCTATGCTGTGTCCTGGGGC-3'; R: 5'-TTGTTG GTGCAAGCTCTTCAAGGT-3'; CD90:F:5'-AAGTG TCACTGGCATGTATACAC-3';R:5'-GGTCCTTTTCA CCAGCAA-3';EpCAM:F:5'-GTGCTGGTGTGTGAA CACTG-3'; R: 5'-AGCCACATCAGCTATGTCCA-3'。根据 qRT-PCR 检测结果,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法对数据进行定量,它表示处理中目的基因表达水平是对照组的  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  倍。

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}})_{\text{处理组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$$

1.2.4 双荧光素酶报告基因系统检测转录活性 取生长状态良好并处于对数生长期的人肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞制备单细胞悬液,以  $3 \times 10^3$  孔的细胞密度接种于 96 孔板中,每组设置 3 个副孔。待细胞过夜贴壁稳定生长后,使用 Lipofectamin 2000 将荧光素酶质粒 TOP<sup>Flash</sup>, FOP<sup>Flash</sup> 和 pRL-TK(双荧光素酶报告系统内参)共转染进入肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞内。孵育 24 h 后,分别加

入含浓度梯度苦参碱(0、400、800  $\mu\text{g/mL}$ )继续孵育24 h,根据双荧光素酶系统操作说明裂解细胞,并在多功能酶标仪下测定发光值。实验数据在经内参校正后采用TOP/FOP数值表征 $\beta$ -catenin的转录活性。以对照组均值为100%计,其他处理组与对照组的比值为相对转录活性。

**1.2.5 Western blotting法检测蛋白表达水平** 人肝癌HepG2和Huh7细胞经不同浓度梯度的含苦参碱(0、400、800  $\mu\text{g/mL}$ )培养液处理48 h后,于冰上用RIPA裂解液进行裂解,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min后吸取上清液。采用Pierce BCA Protein Assay Kit试剂盒检测蛋白浓度,蛋白样品浓度采用上样缓冲液(5 $\times$ )和稀释液将蛋白调整至所需浓度,接着将蛋白样品置于100  $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中变性5 min。待蛋白样品冷却经10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后转至PVDF膜。采用5%BSA封闭1 h后,置于一抗中4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育至12 h。用TBST洗膜3次后,在室温下用二抗孵育1 h,经TBST将二抗清洗后加ECL化学发光液于多功能成像系统下采集曝光图片。

### 1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.0软件对实验结果进行统计分析并作图,多组间比较采用One way-ANOVA,数据以均值 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 苦参碱对人肝癌HepG2和Huh7细胞增殖活性的抑制作用

不同浓度药物(0、200、400、800和1600  $\mu\text{g/mL}$ )处理24、48、72 h后,苦参碱呈时间-浓度依赖性地抑制人肝癌HepG2和Huh7细胞的增殖活性(图1)。在人肝癌HepG2和Huh7细胞中,浓度为400  $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱作用48 h后即呈现显著的抗增殖作用,抑制率分别为

(16.63 $\pm$ 2.27)%和(23.27 $\pm$ 1.11)%,苦参碱在24、48、72 h对HepG2细胞的半数抑制浓度依次为2369、1565和909.1  $\mu\text{g/mL}$ ,对Huh7细胞的半数浓度依次为1355、781.8、612.8  $\mu\text{g/mL}$ (表1)。

### 2.2 苦参碱显著抑制肝癌HepG2和Huh7细胞克隆形成

MTT实验结果主要表征细胞活力,而细胞克隆形成实验则更准确表征细胞增殖能力和细胞干性。肿瘤干细胞往往具有较强的克隆形成能力。图2显示,克隆斑的形成数量随苦参碱药物浓度增加而呈浓度依赖性减少,在HepG2细胞中,400  $\mu\text{g/mL}$ 和800  $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱处理组的克隆形成率分别为(50.51 $\pm$ 5.736)%, (38.89 $\pm$ 13.66)%,与0  $\mu\text{g/mL}$ 组相比较均具有统计学差异。在Huh7细胞内,200、400、800  $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱处理组的克隆形成率分别为(64.20 $\pm$ 5.685)%, (53.09 $\pm$ 13.01)%, (16.05 $\pm$ 8.553)%,与0  $\mu\text{g/mL}$ 组相比较均具有统计学差异。

### 2.3 苦参碱显著抑制肝癌HepG2和Huh7细胞内干性标志物CD90、EpCAM和CD133 mRNA的表达

实时荧光定量PCR检测结果显示,在肝癌HepG2和Huh7细胞,苦参碱能够呈浓度依赖性抑制肝癌细胞的中CD90、EpCAM和CD133等肿瘤干性标志物的表达(图3)。其中400、800  $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱能够显著抑制HepG2细胞中CD90( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )、EpCAM( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )和CD133( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ) mRNA的表达,400、800  $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱能够显著抑制Huh7细胞中CD90( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ )、EpCAM( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )和CD133( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ) mRNA的表达。

### 2.4 苦参碱显著抑制肝癌HepG2和Huh7细胞内 $\beta$ -catenin的转录活性

为进一步探讨苦参碱抑制肝癌细胞干性的作用机制,采用双荧光素酶报告系统检测苦参碱对肝癌细胞 $\beta$ -

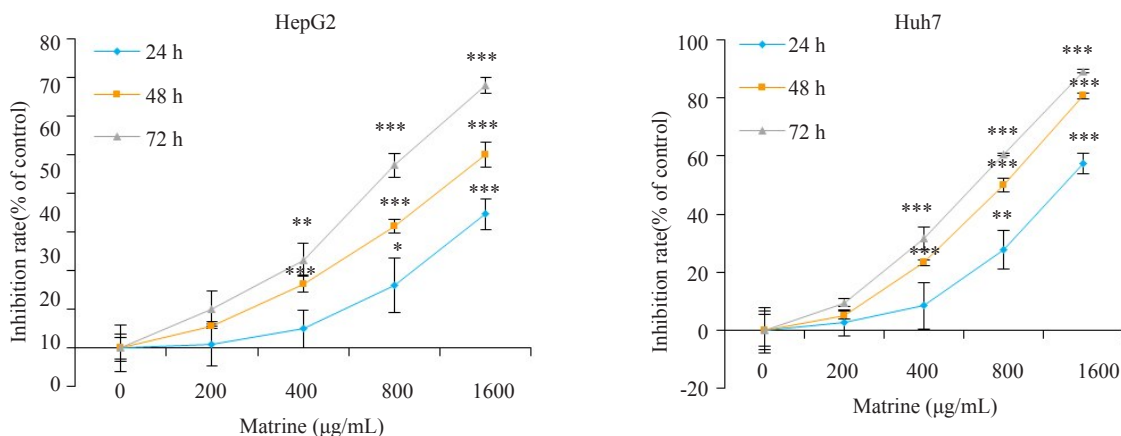


图1 苦参碱对肝癌HepG2和Huh7细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of matrine on proliferation of HepG2 and Huh7 cells (Mean $\pm$ SD,  $n=3$ ). Compared with control, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

表1 苦参碱抑制肝癌细胞增殖的IC<sub>50</sub>

Tab.1 IC<sub>50</sub> of matrine in HCC cells

Incubation time with matrine Time (h)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	HepG2	Huh7
24	2369	1355
48	1565	781.8
72	909.1	612.8

catenin的转录活性的影响。在肝癌HepG2和Huh7细胞,苦参碱能够呈浓度依赖性抑制肝癌细胞内的β-catenin的转录活性,400 μg/mL的苦参碱对HepG2和Huh7细胞的抑制率分别为(24.74±4.682)%和(32.98±3.871)%。800 μg/mL药物浓度处理时,HepG2和Huh7细胞内β-catenin的转录活性抑制率分别为(51.42±5.256)%和(53.04±5.939)%(图4)。

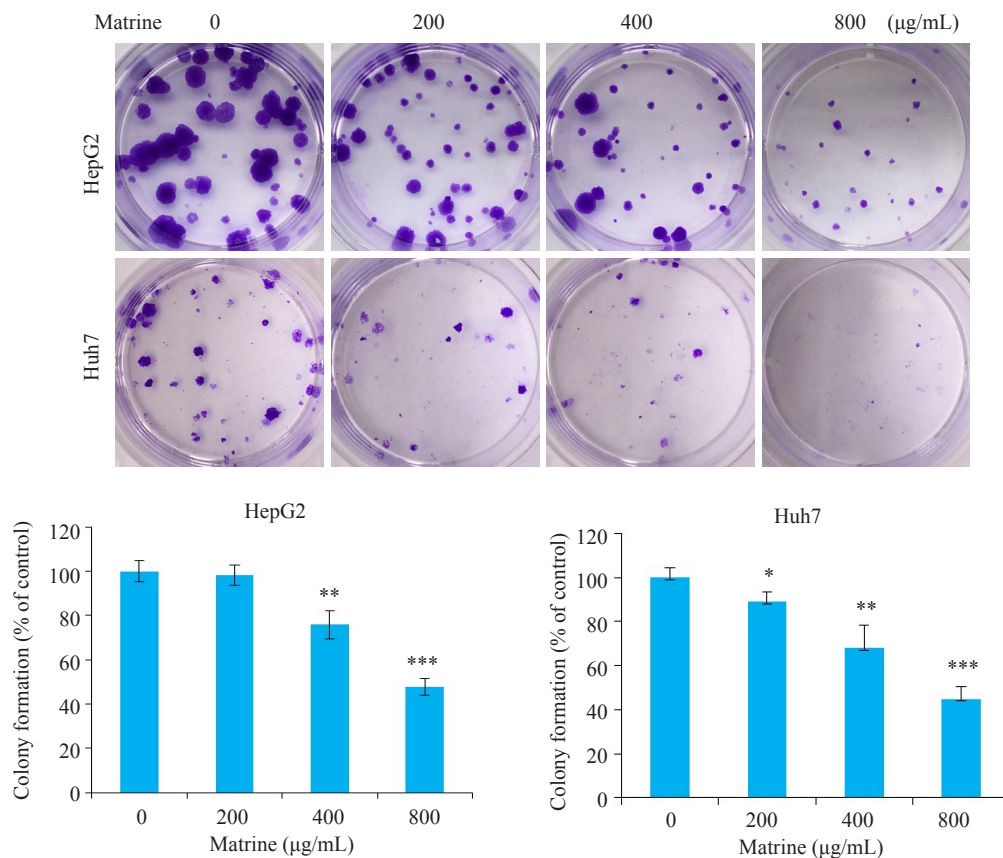


图2 苦参碱对肝癌HepG2和Huh7细胞克隆形成能力的影响镜下观察(上)及统计学分析(下)

Fig.2 Effects of matrine on colony formation of HepG2 and Huh7 cells. Upper panel: Microscopic observation; Lower panel: Statistical analysis (Mean±SD, n=3). Compared with control, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### 2.5 苦参碱对肝癌细胞内Wnt/β-catenin信号通路的影响

研究发现,400 μg/mL和800 μg/mL苦参碱处理48 h后,肝癌HepG2和Huh7细胞中磷酸化AKT(P-AKT)、磷酸化GSK-3β(P-GSK-3β)和β-catenin蛋白水平显著降低,同时磷酸化β-catenin(P-β-catenin)蛋白表达增加。

### 3 讨论

肝细胞癌是复发率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,易于转移,对传统的化疗药和靶向药耐药,导致预后较差。研究发现,肝癌中存在着一群具有自我更新、多向分化、无限增殖潜能、及致瘤性等生物学特性的干细胞,特异性地表达CD90、EpCAM、CD133等干性基因,介导肿瘤细胞的异常增殖,转移和耐药<sup>[15]</sup>。因此,从天然

产物中筛选特异性抑制肝癌细胞干性的药物,应用于临床肝癌的治疗意义重大。苦参碱是从传统中药苦参根中提取出的主要生物碱,临床上具有抗肿瘤,抗炎等作用<sup>[16-17]</sup>。研究报道,苦参碱能够抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤的耐药等<sup>[18]</sup>。我们的研究结果显示,苦参碱能够呈浓度-时间依赖性地抑制肝癌HepG2和Huh7细胞的增殖活性,并且显著抑制肝癌细胞的克隆形成能力,表明苦参碱能够抑制肝癌细胞无限增殖的干性,进而发挥抗肿瘤作用。CD90、EpCAM、CD133是肝癌干细胞的特异性标志物,CD90是一细胞表面糖蛋白,附着在细胞膜的胞浆面,参与肿瘤干细胞的增殖分化、机体免疫反应、细胞因子释放等过程,与肝癌干细胞的增殖分化,克隆形成密切相关<sup>[19]</sup>。EpCAM

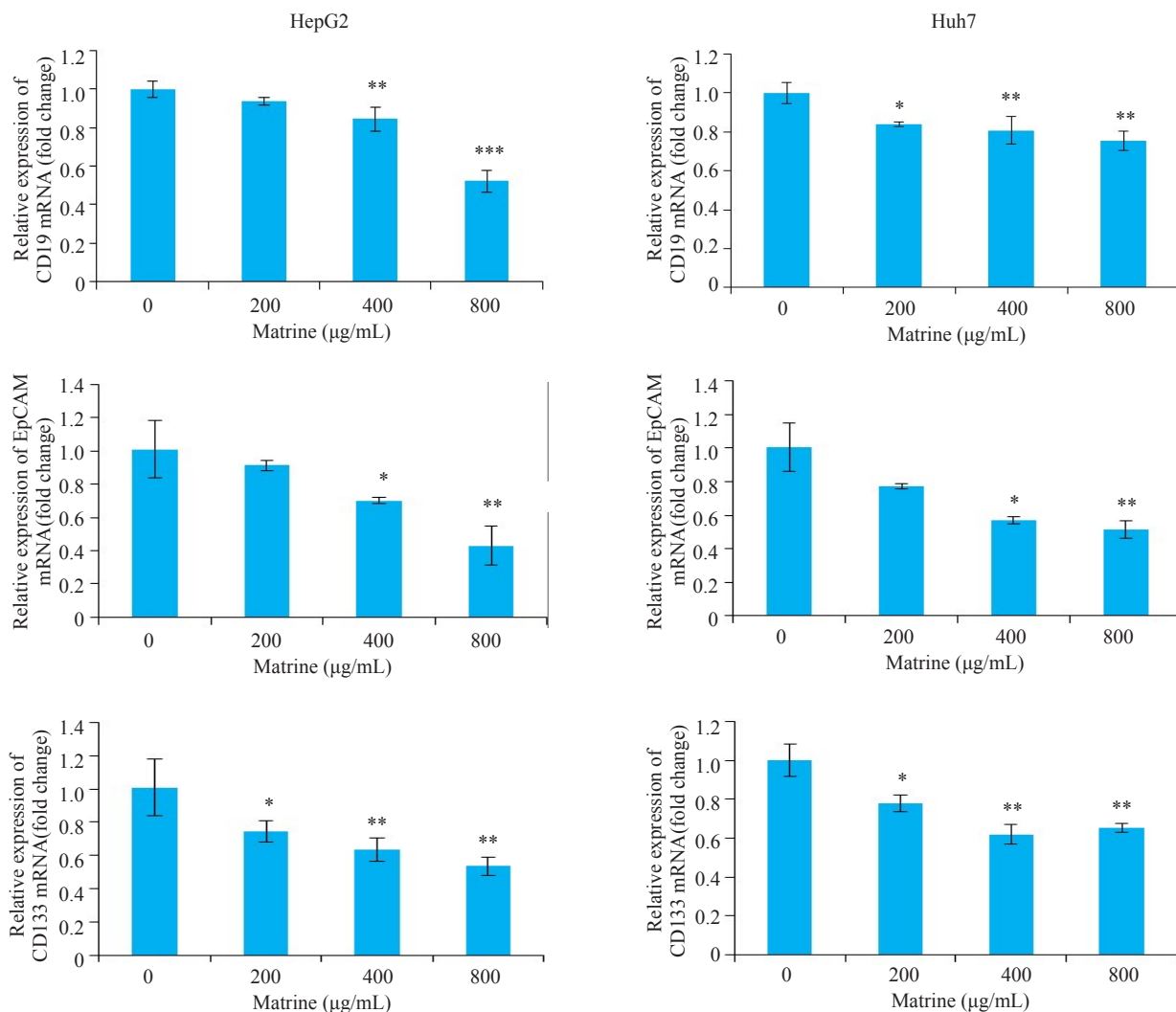


图3 苦参碱对肝癌HepG2和Huh7细胞中CD90、EpCAM和CD133 mRNA表达水平的影响

Fig.3 Effects of matrine on expressions of CD90, EpCAM and CD133 mRNA in HepG2 and Huh7 cells (Mean±SD, n=3). Compared with control, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

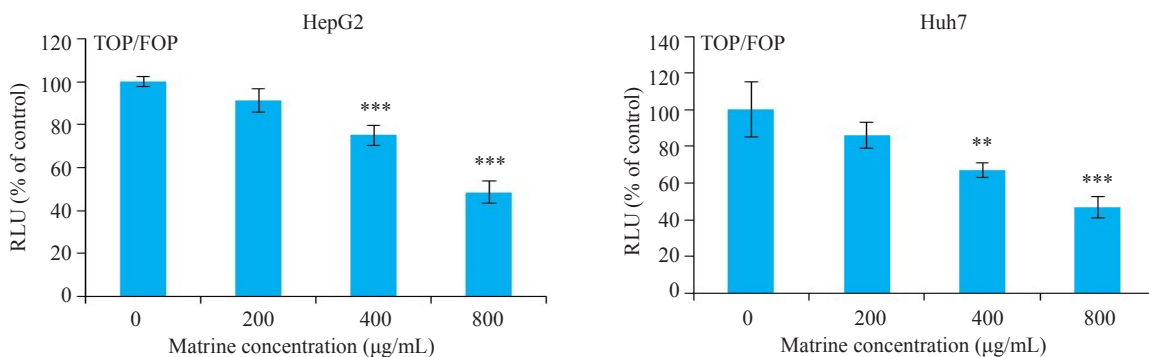


图4 苦参碱对肝癌HepG2和Huh7细胞内β-catenin转录活性的影响

Fig.4 Effects of matrine on transcriptional activity of β-catenin in HepG2 and Huh7 cells (Mean±SD, n=3). Compared with control, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

是黏附分子家族成员之一,属于上皮细胞间黏附分子,在细胞发生癌变过程中发挥着关键作用,能够调控肿瘤干细胞的侵袭、增殖、分化等功能,也是一类特异性的肝

癌干细胞标记物,研究发现EpCAM 可以通过促进细胞增殖、免疫逃逸等机制促进肿瘤的发生发展<sup>[20-21]</sup>。CD133也是肝癌干细胞的特异性表面标记物之一,在肝

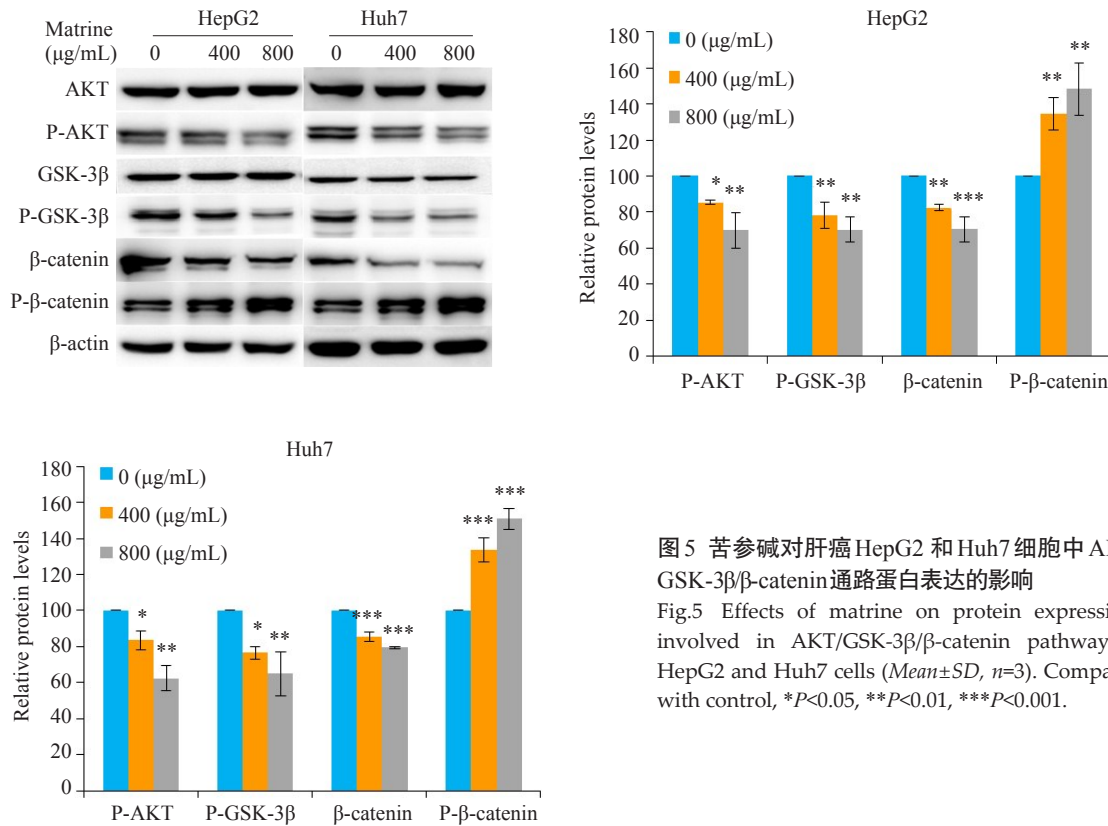


图5 苦参碱对肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞中 AKT/GSK-3β/β-catenin 通路蛋白表达的影响  
Fig.5 Effects of matrine on protein expressions involved in AKT/GSK-3β/β-catenin pathway in HepG2 and Huh7 cells (Mean±SD, n=3). Compared with control, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

癌干细胞的增殖,侵袭和分化方面发挥重要作用<sup>[22]</sup>。本研究发现苦参碱能够显著抑制 CD90、EpCAM、CD133 三个肝癌干性标志物的 mRNA 的表达,进一步提示苦参碱具有抑制肝癌细胞干性的作用。

Wnt/β-catenin 信号通路被发现在大于 40% 的肝癌细胞中被激活,参与调控肿瘤细胞增殖、分化、转移及维持肝癌细胞干性<sup>[23]</sup>。活化的 β-catenin 转录入核,能够促进 CD90、EpCAM、CD133 等干性基因的表达,继而诱导肿瘤细胞的转移和无限增殖<sup>[24-27]</sup>。我们以往的研究曾发现,苦参碱抑制肝癌 Hep3B 细胞生长和 β-catenin 的转录活性,因此我们推测苦参碱抗肝癌细胞干性的作用与 Wnt/β-catenin 信号通路相关。在 β-catenin 信号通路未被激活时,GSK3β 通常与 APC、Axin 形成复合物,将胞浆中的 β-catenin 进行磷酸化,从而促进其泛素化降解。而在生长旺盛的肝癌细胞中,GSK-3β 可被上游活化的蛋白激酶 AKT 磷酸化,失去磷酸化 β-catenin 的作用,积累的 β-catenin 发生核转位<sup>[28]</sup>。本研究显示,苦参碱能够显著抑制 AKT 和 GSK-3β 的磷酸化,同时增加 β-catenin 的磷酸化水平,降低 β-catenin 蛋白水平,表明苦参碱通过抑制 AKT 和 GSK-3β 磷酸化后,使 GSK3β 恢复磷酸化 β-catenin 的能力,从而促进 β-catenin 的磷酸化使其发生降解。荧光素酶报告基因结果显示苦参碱能够显著抑制肝癌细胞内 β-catenin 的转录活性,进一步表明苦参碱能够通过抑制肝癌细胞内 β-catenin 信号通路的激活,进而抑制 β-catenin 的转录活性和下游肝癌细胞干性基

因的表达。那么,苦参碱作用的靶分子是什么? 通过何种方式抑制 AKT 的磷酸化呢? AKT 上游信号主要涉及磷脂酰肌醇-3 激酶的激活和雷帕霉素靶蛋白的活化两条途径<sup>[29]</sup>,文献报道和我们实验曾发现苦参碱具有诱导肝癌细胞自噬的作用,提示药物可能抑制雷帕霉素靶蛋白的活化。在下一步的工作中,我们拟采用 RNA 干扰等实验方法进一步研究 β-catenin 信号通路对肝癌细胞干性的调控作用,阐明苦参碱的作用靶点。

综上所述,苦参碱通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路的活化,继而干扰 CD90、EpCAM、CD133 等干性标志物的表达,从而削弱肝癌细胞无限增殖、分化等恶性生物学特性,发挥抗肿瘤作用。研究结果对临床应用苦参碱治疗肝细胞癌具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Costentin CC. Hepatocellular carcinoma surveillance [J]. Presse Med, 2017, 46(4): 381-5.
- [2] Zhang PY, Yang YJ, Xue Y, et al. Cancer stem cells: targeting tumors at the source [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(10): 1821-8.
- [3] Ji JF, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma [J]. Semin Oncol, 2012, 39(4): 461-72.
- [4] Sun J, Mao J, Liu X, et al. Separation and mechanism elucidation for six structure-like matrine-type alkaloids by micellar liquid chromatography [J]. J Sep Sci, 2009, 32(12): 2043-50.
- [5] Guzman JR, Koo JS, Goldsmith JR, et al. Oxymatrine prevents NF-kappa B nuclear translocation and ameliorates acute intestinal

- inflammation[J]. *Sci Rep*, 2013, 32(1): 1629.
- [6] Zhang B, Liu ZY, Li YY, et al. Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44(5): 573-9.
- [7] Yang Y, Xiu J, Zhang X, et al. Antiviral effect of matrine against human enterovirus 71[J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10370-6.
- [8] Chai NL, Fu Q, Shi H, et al. Oxymatrine liposome attenuates hepatic fibrosis *via* targeting hepatic stellate cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(31): 4199-206.
- [9] Cao YG, Jing S, Li L, et al. Antiarrhythmic effects and Ionic mechanisms of oxymatrine from *Sophora flavescens* [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(12): 1844-9.
- [10] 何成邦, 孙成芝. 复方苦参注射液治疗中晚期肝癌30例疗效观察[J]. *山东医药*, 2010, 50(25): 23.
- [11] Yang CL, Liu SS, Ma YG, et al. The influence of intraoperative pleural perfusion with matrine-cisplatin or cisplatin on stromal cell-derived factor-1 in non-small cell lung cancer patients with subclinical pleural metastasis [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 574-81.
- [12] Sun X, Zhuo XB, Hu YP, et al. A novel matrine derivative WM622 inhibits hepatocellular carcinoma by inhibiting PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 449(1/2): 47-54.
- [13] Wang B, Xu J, Wang H, et al. Effect and mechanism of sophoridine to suppress hepatocellular carcinoma *in vitro* and *vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95(3): 324-30.
- [14] Wang Y, Zhang S, Liu J, et al. Matrine inhibits the invasive and migratory properties of human hepatocellular carcinoma by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 911-9.
- [15] Chiba T, Iwama A, Yokosuka O. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Therapeutic implications based on stem cell biology [J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(1): 50-7.
- [16] Huang H, Du T, Xu GB, et al. Matrine suppresses invasion of castration-resistant prostate cancer cells by downregulating MMP-2/9 *via* NF-kappa B signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 640-8.
- [17] Wang X, Lin H, Zhang R. The clinical efficacy and adverse effects of interferon combined with matrine in chronic hepatitis B: A systematic review and Meta-Analysis [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(6): 849-57.
- [18] Zhou BG, Wei CS, Zhang S, et al. Matrine reversed multidrug resistance of breast cancer MCF-7/ADR cells through PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5): 3885-91.
- [19] Zhang XL, Jia Q, Lv L, et al. Tumorspheres derived from HCC cells are enriched with cancer stem cell-like cells and present high chemoresistance dependent on the Akt pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15(6): 755-63.
- [20] Dolle L, Theise ND, Schmelzer E, et al. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(4): G233-50.
- [21] Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, et al. High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6(2): 253.
- [22] Guerra-Rebollo M, Garrido C, Sánchez-Cid L, et al. Targeting of replicating CD133 and OCT4/SOX2 expressing glioma stem cells selects a cell population that reinitiates tumors upon release of therapeutic pressure [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9549.
- [23] Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control [J]. *Science*, 2014, 346(625): 1248012.
- [24] Yamashita T, Budhu A, Forgues M, et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10831-9.
- [25] Zhou FQ, Qi YM, Xu H, et al. Expression of EpCAM and Wnt/β-catenin in human colon cancer [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 4485-94.
- [26] Skowron MA, Niegisch G, Fritz G, et al. Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(8): 144.
- [27] Shevchenko V, Arnotskaya N, Korneyko M, et al. Proteins of the Wnt signaling pathway as targets for the regulation of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 3080-8.
- [28] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1483-7.
- [29] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(10): 1515-27.

(编辑:孙昌朋)