◆肿瘤研究◆

# 大黄酚调控Wnt/β-catenin通路对胶质瘤U87细胞增殖、凋亡、侵袭能力及EMT的影响

韩庆亮[1]，张慧[1]，郑慧军[2]

1. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；2. 河南省中医院，河南 郑州 450002

［摘要］**目的：**探讨大黄酚调控Wnt/β-catenin信号通路抑制胶质瘤细胞的作用机制。**方法：**体外培养人脑胶质瘤细胞U87，用不同浓度（0、50、100、200 μmol/L）的大黄酚处理后，采用CCK-8法检测U87细胞增殖能力；划痕法检测细胞迁移能力；Transwell法检测细胞侵袭能力；流式细胞术检测细胞凋亡；蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2以及Wnt通路上皮细胞-间充质转化（EMT）相关蛋白β-catenin、E-cadherin、vimentin、MMP-9蛋白表达。**结果：**大黄酚能抑制U87细胞增殖、迁移及侵袭，诱导凋亡（$P<0.05$），下调Bcl-2、β-catenin、vimentin与MMP-9的表达水平，上调Bax与E-cadherin的表达水平（$P<0.05$），并呈浓度依赖关系。**结论：**大黄酚能抑制胶质瘤细胞U87增殖、迁移及侵袭能力，其机制可能与抑制Wnt/β-catenin信号通路有关。

［关键词］大黄酚；胶质瘤细胞U87；Wnt/β-catenin信号通路；上皮细胞-间充质转化

［中图分类号］R285 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）24-0112-07

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.24.022

## Effects of Chrysophanol Regulating Wnt/β-catenin Pathway on Proliferation, Apoptosis, Invasion Ability and EMT of Glioma U87 Cells

*HAN Qingliang*[1], *ZHANG Hui*[1], *ZHENG Huijun*[2]

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450046, China; 2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450002, China

**Abstract: Objective:** To investigate the mechanism of chrysophanol regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway to inhibit glioma cells. **Methods:** Human glioma cells U87 were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of chrysophanol (0, 50, 100, 200 μmol/L). The proliferation capacity of U87 cells was detected by CCK-8 method. Cell migration ability was detected by scratch method. Cell invasion ability was detected by Transwell method. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western Blot was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and β-catenin, E-cadherin, vimentin and MMP-9 proteins related to Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Wnt pathway. **Results:** Rhein could inhibit proliferation, migration and invasion of U87 cells, induce apoptosis ($P<0.05$), down-regulate the expression levels of Bcl-2, β-catenin, vimentin and MMP-9, and up-regulate the expression levels of Bax and E-cadherin ($P<0.05$), in a dose-dependent relationship.

［收稿日期］2023-06-19
［修回日期］2023-09-02
［基金项目］河南省中医药科学研究专项课题（2022ZY2014）；河南省中医药科学研究专项课题（2019ZY2052）
［作者简介］韩庆亮（1996-），男，住院医师，E-mail：746525886@qq.com。
［通信作者］郑慧军（1971-），男，主任医师，硕士研究生导师，E-mail：446393023@qq.com。

**Conclusion**：Chrysophanol can inhibit the proliferation，migration and invasion of glioma cells U87，and its mechanism may be related to the inhibition of Wnt/β-catenin signaling pathway.

**Keywords**：Chrysophanol；Glioma cell U87；Wnt/β-catenin signaling pathway；Epithelial-mesenchymal transition

胶质瘤是由大脑及脊髓胶质细胞癌变所致的原发性脑肿瘤，是发病率较高的肿瘤之一。尽管行手术积极治疗可显著改善病情，但由于肿瘤易复发且化疗和放疗耐药性高，患者预后较差。中医药在肿瘤治疗中发挥着愈来愈重要的作用，从天然产物中寻找新的高效低毒的抗胶质瘤药物成为研究热点[1]。大黄酚是大黄中提取出的一种天然蒽醌类化合物，具有抗氧化、抗炎、抗菌等多种药理作用[2-4]。有学者发现大黄酚对直肠癌、宫颈癌、肺癌等肿瘤有着一定抑制作用[5-7]。然而，大黄酚在胶质瘤中是否具有抗癌活性，以及所介导的肿瘤抑制功能涉及哪些分子机制尚不清楚。Wnt/β-连环蛋白(β-catenin)信号通路在细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成中起重要作用，Wnt/β-catenin 通路的异常表达与神经胶质瘤恶性肿瘤密切相关[8]。因此，本研究主要从大黄酚对 Wnt/β-catenin 信号通路的调控作用来分析其对胶质瘤细胞的作用机制，结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞与药物** 胶质瘤 U87MG 细胞株购自上海赛百慷生物科技有限公司，大黄酚(分析标准品，HPLC≥98%，货号：B20238-20mg)购自上海源叶生物科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技股份有限公司，货号：11011-8611)，二甲基亚砜(DMSO)(德国 Sigma-Aldrich 公司，货号：D2650)，DMEM 培养基(上海赛百慷生物技术股份有限公司，货号：iCell-0005)，24 孔 Transwell 小室(美国 Corning 公司，货号：CLS3378)，Matrigel 基质胶(美国 BD 公司，货号：356234)，磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶、青链霉素双抗混合液(北京索莱宝科技有限公司，货号：24800-50、T1350-100、P1400)，AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，货号：E-CK-A211)，BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技公司，货号：P0012)，RIPA 细胞裂解液(美国 GLPBIO 公司，货号：GK10023)，CCK-8 试剂盒、ECL 超敏化学发光试剂盒、HRP 标记山羊抗兔、β-actin、GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司，货号：PF00004、PK10002、SA00001-2、81115-1-RR、10494-1-AP)，兔抗人 Bax、Bcl-2、β-catenin、E-cadherin、vimentin、MMP-9 单克隆抗体(英国 Abcam 公司，货号：ab32503、ab182858、ab305261、ab40772、ab92547、ab137867)。酶标仪、$CO_2$恒温培养箱(美国 Thermo 公司，型号：3120、FC 型)，流式细胞仪(美国 BD 公司)；蛋白凝胶、电泳成像系统(BIO RAD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大黄酚预测靶点与胶质瘤靶点相关分析** 在 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)中，以大黄酚(CAS 号 481-74-3)为关键词进行搜索，查找大黄酚的 SDF 结构，并下载保存。并利用 SwissTargetPrediction 数据库(http://www.swisstargetprediction.ch/)预测大黄酚的潜在作用靶点。将“glioma”作为关键词在 GeneCareds(https://www.genecards.org/)数据库中分别检索出胶质瘤靶点。将大黄酚的潜在靶点和胶质瘤的作用靶点导入 Venny2.1.0(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)，取交集最终获得“大黄酚-胶质瘤”的交集靶点并绘制韦恩图。将交集靶点导入 String 数据库(https://cn.string-db.org/)，选择物种为“Homosapiens”，最小相互作用分数设置为 0.700，然后获得蛋白互作关系并查看相关通路。

**1.2.2 分组及细胞培养** 将 U87 细胞分为 4 组，分别为对照组(0 μmol/L)，低、中、高剂量组(分别给予 50、100、200 μmol/L 的大黄酚处理)。胶质瘤 U87 细胞用 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基，在 37 ℃、5%$CO_2$恒温培养箱中培养，待培养瓶中的细胞接近 80%～90%时，用 0.25%胰酶消化

传代。

**1.2.3 CCK-8实验检测细胞增殖能力** 取对数生长期的人胶质瘤U87细胞，将2×10⁴/孔的U87细胞接种于96孔培养板中，每组6个复孔，镜下观察细胞完全贴壁后，加入大黄酚(50、100、200 μmol/L)分别处理24、48 h后，每孔加入10 μL的CCK-8溶液，37 ℃培养4 h，用酶标仪在450 nm波长处测定光密度值并计算细胞增殖能力。

**1.2.4 划痕实验检测细胞迁移能力** 选取对数生长期的人胶质癌U87细胞接种于6孔培养板，每孔接种2×10⁵个，待细胞铺满后，用100 μL枪头垂直于孔板制造细胞划痕，划线完成后，用PBS洗涤漂浮细胞，并拍照记录划痕位置，然后加入新鲜无血清的DMEM培养基和不同浓度的大黄酚(50、100、200 μmol/L)。在$CO_2$恒温培养箱中继续培养24 h后，在显微镜下观察并拍照。

**1.2.5 Transwell实验检测细胞侵袭能力** 用不同浓度的大黄酚(50、100、200 μmol/L)处理U87细胞并调整细胞密度后，在Transwell小室上室加100 μL细胞悬液，将下室内加入DMEM培养液500 μL，每组3个复孔，37 ℃培养箱内放置24 h。取出小室，PBS洗涤2次，棉签轻轻擦拭，4%多聚甲醛固定30 min，结晶紫染色10 min，PBS洗涤并晾干，随机选取3个视野在显微镜下观察并统计细胞侵袭数。

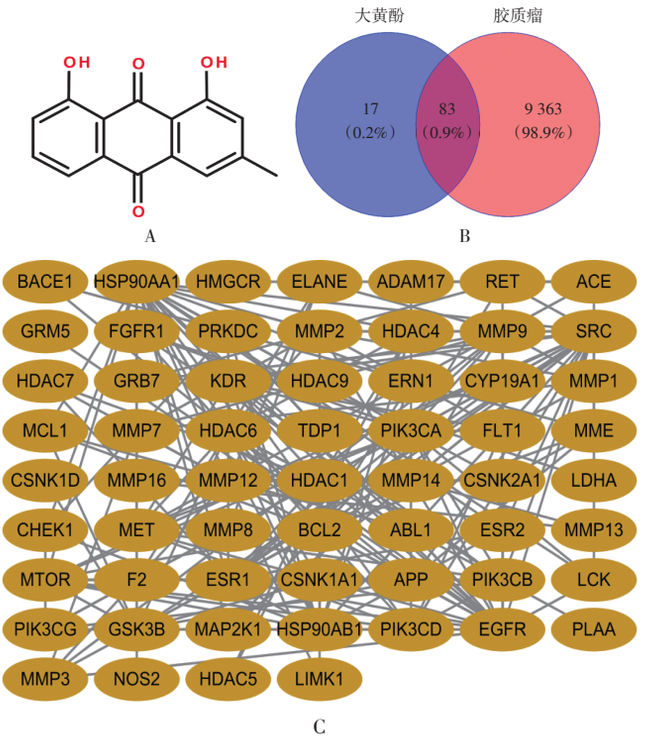
**1.2.6 流式细胞仪技术检测细胞凋亡** 按“1.2.2项”方法处理U87细胞，培养24 h后用2 mL EP管收集细胞，低温离心后PBS洗涤2次，按照Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡试剂盒说明书要求，在EP管中加入500 μL的Binding Buffer重悬细胞，再各加入5 μL Annexin V-FITC和PI的染液，室温避光孵育15 min后，采用流式细胞仪上机检测细胞的凋亡率。

**1.2.7 蛋白质印迹(Western Blot)检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2以及Wnt通路相关蛋白表达** 按“1.2.2项”方法处理U87细胞，培养24 h后收集细胞，加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA细胞裂解液，冰浴1 h后，用BCA试剂盒进行蛋白定量，行SDS-PAGE电泳，将蛋白质转移至PVDF膜上，脱脂奶粉室温封闭2 h，奶粉稀释一抗：兔抗人Bax(1∶1 000)和Bcl-2(1∶1 000)、β-catenin(1∶1 000)、vimentin(1∶1 000)与MMP-9单克隆抗体(1∶1 000)、E-cadherin(1∶1 000)于4 ℃冰箱摇床过夜。二抗：HRP标记山羊抗兔(1∶5 000)室温孵育1 h，上机观察蛋白信号。采用image J软件分析蛋白条带灰度值。

**1.2.8 统计学方法** 采用SPSS21.0软件分析数据，实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)，所有统计分析均采用GraphPad Prism软件作图。$P<0.05$代表差异有统计学意义。所有实验均重复3次。

## 2 结果

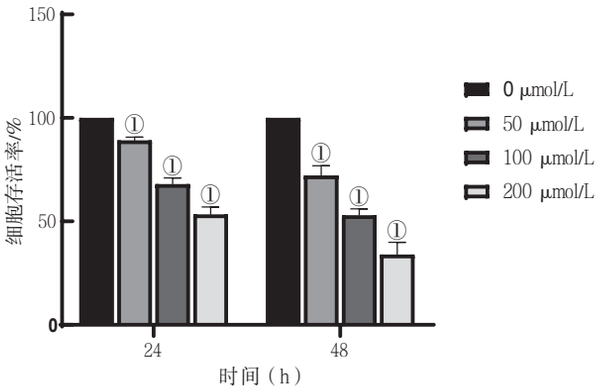
**2.1 大黄酚预测靶点与胶质瘤靶点构建与分析** 见图1。使用PubChem数据库确认大黄酚的结构，通过Swiss Target Prediction数据库，对化合物预测产生的靶点进行筛检与检查，剔除重复、非人源与不规范的靶点，最终得到100个靶点。借助GeneCards数据库，以“glioma”为关键词，共获得恶性胶质瘤靶点10 231个。从图1可见，对大黄酚预测作用靶点和胶质瘤靶点进行交互处理，得到83个共同靶点。利用String数据库分析，最终发现大黄酚与Wnt信号通路下游相关蛋白GSK3-β、MMP等较为密切，并选取Wnt/β-catenin为后续实验通路，验证大黄酚是否通过该通路来抑制胶质瘤生长。




注：A. 大黄酚化学结构；B. 大黄酚与胶质瘤共同靶点；C. 药物-疾病相关靶点图

**图1 大黄酚预测靶点与胶质瘤靶点交互图**

**2.2　大黄酚对胶质瘤U87细胞增殖的影响**　见图2。与对照组比较，不同浓度的大黄酚在24、48 h作用时间里对U87细胞的增殖活性降低（$P<0.01$），并具有时间和浓度依赖性。大黄酚作用24 h后U87细胞的半数抑制浓度（$IC_{50}$）为118.1 μmol/L，因此选取24 h为后续药物作用时间。




注：①与对照组比较，$P<0.05$

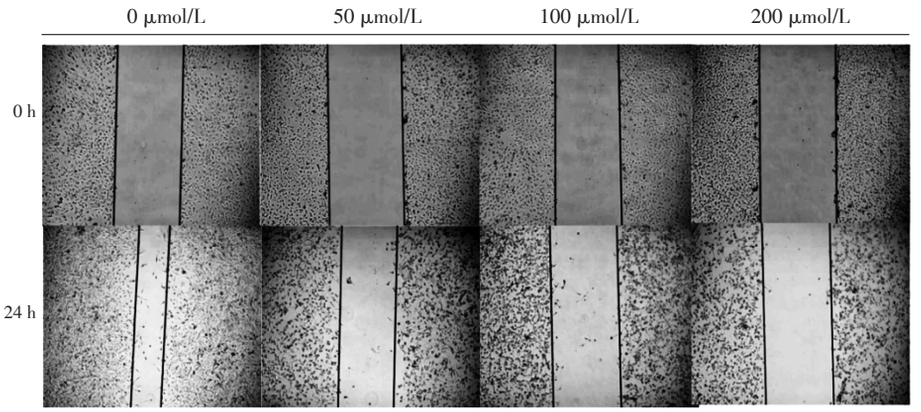
图2　大黄酚对人胶质瘤U87细胞增殖活性的影响

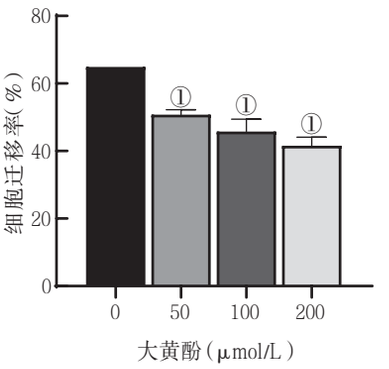
**2.3　大黄酚对胶质瘤U87细胞迁移能力的影响**　见图3。与对照组比较，不同浓度的大黄酚与U87细胞作用24 h后，U87细胞迁移能力明显减弱（$P<0.05$），且随着药物浓度的增加，抑制迁移能力增强。

**2.4　大黄酚对胶质瘤U87细胞侵袭能力的影响**　见图4。与对照组比较，大黄酚低、中、高剂量组中侵袭细胞数量明显减少（$P<0.05$），呈浓度依赖性。

**2.5　大黄酚对胶质瘤U87细胞凋亡的影响**　见图5。与对照组比较，当大黄酚浓度为50 μmol/L，不能促进U87细胞凋亡（$P>0.05$）；大黄酚浓度为100、200 μmol/L，能促进U87细胞凋亡（$P<0.05$），且呈浓度依赖性。

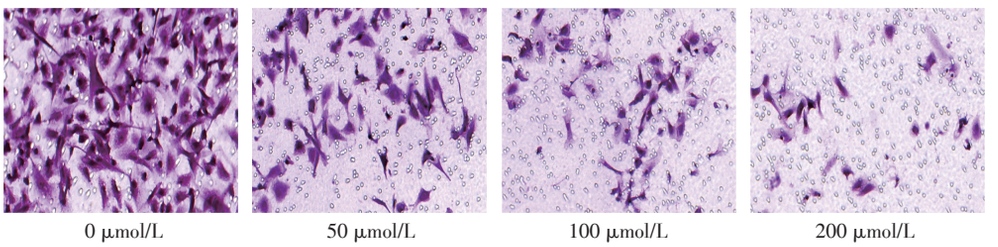
**2.6　大黄酚对胶质瘤U87细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的影响**　见图6。与对照组比较，在大黄酚低剂量组中，Bax和Bcl-2的蛋白表达量无显著变化（$P>0.05$）；在大黄酚中、高剂量组中，Bax的蛋白表达量显著上升（$P<0.05$），Bcl-2的蛋白表达量显著下降（$P<0.05$），且呈浓度依赖性。

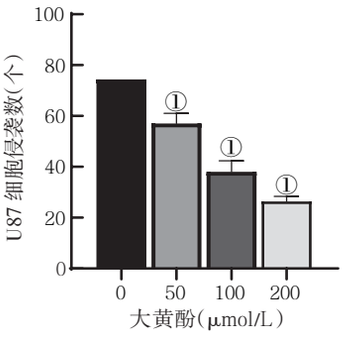



注：①与对照组比较，$P<0.05$

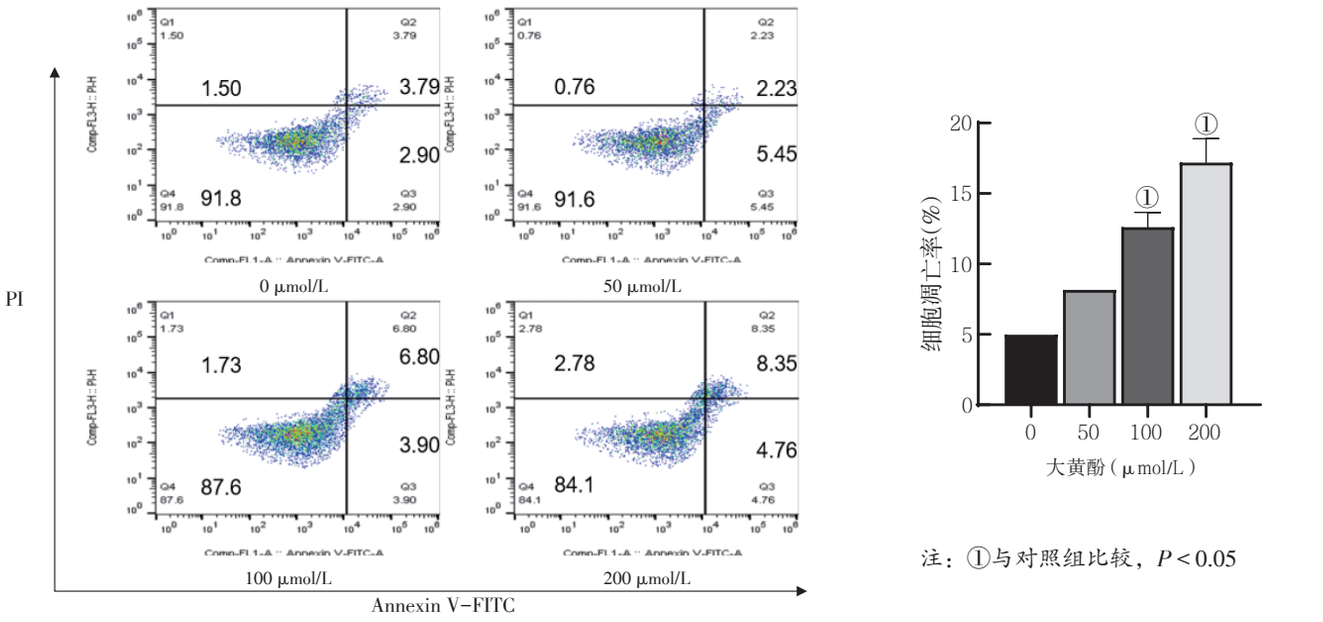
图3　大黄酚对人胶质瘤U87细胞迁移能力的影响（×100）



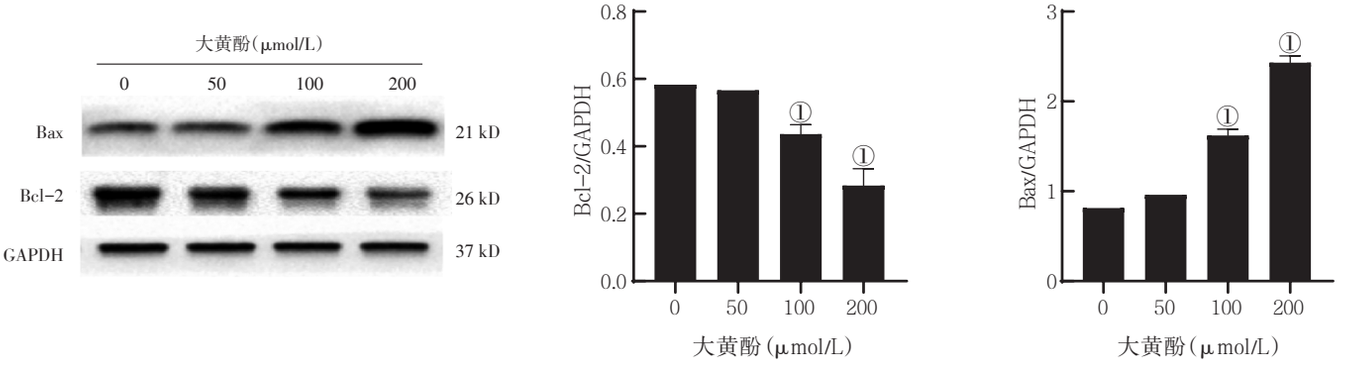

注：①与对照组比较，$P<0.05$

图4　大黄酚对人胶质瘤U87细胞侵袭能力的影响（×200）




注：①与对照组比较，$P<0.05$

图 5　大黄酚对人胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响




注：①与对照组比较，$P<0.05$

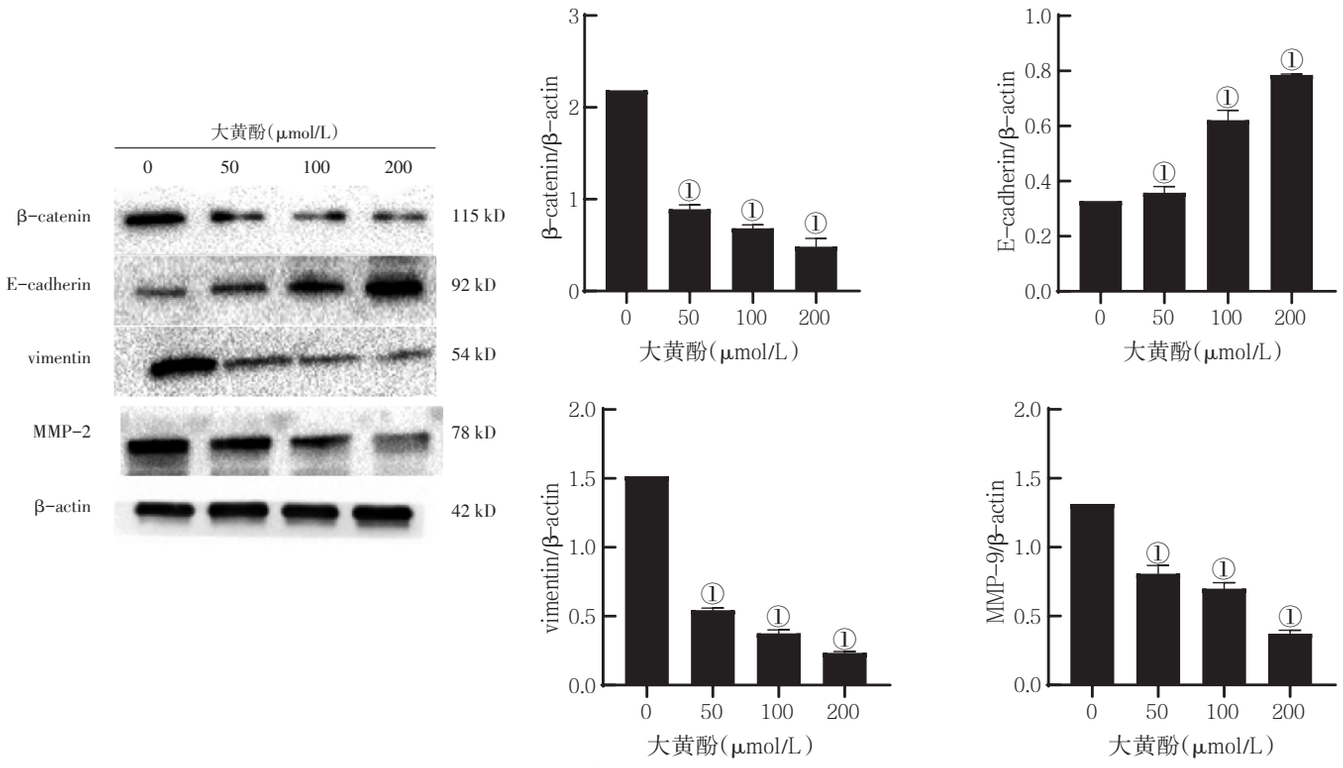
图 6　大黄酚对人胶质瘤 U87 细胞凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的影响

**2.7　大黄酚对胶质瘤 U87 细胞 Wnt 通路相关蛋白表达的影响**　见图 7。与对照组比较，不同浓度大黄酚作用 U87 细胞 24 h 后，其所表达的 β-catenin、vimentin 与 MMP-9 的蛋白水平明显降低（$P<0.05$），E-cadherin 的蛋白水平明显增加（$P<0.05$），且呈浓度依赖性。

## 3　讨论

中医学认为，胶质瘤病位虽然在脑，但与肝、脾、肾等腑脏有关，痰、瘀、毒、虚为其主要致病因素。感受邪毒、饮食偏嗜是外在病因；精神情志失调、先天不足，或后天失养，或久病耗伤、正气虚弱是胶质瘤发病的内在病因[10-11]。

大黄是多年生草本植物，药用部位主要是根及根茎，具有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效[12]。目前，大黄中的蒽醌类成分大黄酚已被证实对肿瘤发展有着很好的抑制作用[13]。代继源等[14]发现，大黄酚可通过影响 AMPK 信号通路因子能抑制结肠癌细胞增殖、侵袭。Trybus W 等[6]发现，大黄酚可以通过影响线粒体途径抑制宫颈癌细胞增殖，促进凋亡。Zhang J 等[7]发现，在肺癌细胞中大黄酚通过调节 ROS/HIF-1α/VEGF 信号通路来表现出抗癌活性。Park D 等[15]发现，大黄酚可促进口腔鳞癌细胞凋亡，其主要机制可能是通过调节 PI3K/AKT/mTOR 通路来实现。然而，大黄酚对胶质瘤 U87 细




注：①与对照组比较，$P<0.05$

**图7 大黄酚对Wnt信号通路相关蛋白表达影响**

胞的增殖和凋亡的影响，特别是对U87细胞迁移和侵袭能力的影响的研究尚未见报道。本研究结果显示，大黄酚呈浓度依赖性，抑制胶质瘤U87细胞的增殖，促进凋亡；大黄酚能使Bax的表达量升高、Bcl-2的表达量降低，并且能明显减弱U87细胞的迁移和侵袭能力。

Wnt信号通路在胚胎发育、正常干细胞以及肿瘤细胞的增殖分化中发挥重要作用[8]。其下游关键因子β-catenin的激活会引起上皮细胞-间充质转化(EMT)，其作用与各种癌症的侵袭和转移直接相关[16]。EMT是上皮细胞失去细胞极性和黏附性从而转化为间充质细胞的重要过程，间充质细胞具有增加的侵袭性或转移性表型[17]。EMT引起的高侵袭和迁移能力可使手术难以完全切除肿瘤，最终导致肿瘤复发[18]。E-cadherin表达降低能促进EMT和癌症转移[19]，vimentin的过度表达与多种癌症的侵袭性和转移增加有关[20-21]。MMP-9已被发现与癌症的病理学有关，与侵袭、转移和血管生成密切相关[22]。MMP-9在肿瘤细胞中的高表达可增加vimentin的表达和降低E-cadherin的表达，促进EMT的发生。因此，抑制EMT相关通路是抗肿瘤药物的重要作用机制[23-24]。本研究结果发现，大黄酚能显著抑制U87细胞的β-catenin、MMP-9、vimentin表达，促进E-cadherin表达，提示大黄酚能够阻断U87细胞EMT进程，进而降低胶质瘤的转移和侵袭风险。

综上所述，通过预测大黄酚靶点与胶质瘤的相互作用，并验证了大黄酚能够抑制U87细胞的增殖、迁移和侵袭，并诱导凋亡，其作用机制可能与抑制Wnt/β-catenin信号通路有关。

## [参考文献]

[1] BEHL T, SHARMA A, SHARMA L, et al. Current Perspective on the Natural Compounds and Drug Delivery Techniques in Glioblastoma Multiforme[J]. Cancers, 2021, 13(11): 2765.

[2] 薛占霞，高永山，沈丽霞，等. 大黄酚通过抗氧化应激改善高血氨小鼠学习记忆功能障碍[J]. 中国药理学通报，2015，31(9)：1330-1331.

[3] 朱培，闫东梅，郑伟. 大黄酚通过抑制巨噬细胞的TNF-α从而改善LPS诱导的小鼠炎症反应[J]. 中国实验诊断学，2021，25(1)：98-101.

[4] 毛腾霄，黄晓婧，黄敏，等. 60Co-γ辐照对大黄化学成分及抗

菌活性的影响[J]. 中成药，2022，44(11)：3724-3727.
[5] 万秀霞，孙秀萍，佟晶洁. 大黄酚对结肠癌的抗肿瘤作用[J]. 山东大学学报(医学版)，2019，57(5)：74-79，86.
[6] TRYBUS W，KRÓL T，TRYBUS E，et al. The potential antitumor effect of chrysophanol in relation to cervical cancer cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry，2021，122(6)：639-652.
[7] ZHANG J，WANG Q，WANG Q，et al. Chrysophanol exhibits anti-cancer activities in lung cancer cell through regulating ROS/HIF-1a/VEGF signaling pathway[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2020，393(3)：469-480.
[8] LATOUR M，HER N G，KESARI S，et al. WNT Signaling as a Therapeutic Target for Glioblastoma[J]. International Journal of Molecular Sciences，2021，22(16)：8428.
[9] 陈奕祺，李柳宁. 刘伟胜中医辨证治疗脑瘤经验浅谈[J]. 江苏中医药，2017，49(6)：17-19，22.
[10] 程孟祺，秦英刚，姜菊玲，等. 中医药治疗脑胶质瘤临床研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2020，22(12)：147-151.
[11] 白若冰，荔志云，任海军. 中医中药在脑胶质瘤治疗中的作用研究[J]. 西部中医药，2018，31(1)：134-137.
[12] 何元松，李焐仪，孟保华. 大黄的研究现状[J]. 成都大学学报(自然科学版)，2022，41(2)：113-118.
[13] 徐静，吴孟华，张建业，等. 大黄蒽醌类化合物调节细胞自噬抑制肿瘤的研究进展[J]. 中药材，2021，44(7)：1797-1801.
[14] 代继源，刘文杰，王春辉. 大黄酚介导AMPK依赖性信号通路抑制结肠癌SW480细胞的增殖、侵袭和裸鼠体内肿瘤形成[J]. 中国免疫学杂志，2020，36(14)：1688-1694.
[15] PARK D，PARK B，KANG H M，et al. Chrysophanol-Induced Autophagy Disrupts Apoptosis via the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells[J]. Medicine，2022，59(1)：42.
[16] CHENG Y Z. FEZF1-AS1 is a key regulator of cell cycle，epithelial-mesenchymal transitionand Wnt/β-catenin signaling in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Bioscience Reports，2019，39(1)：BSR20180906-BSR20180906.
[17] 张可华，宋建国. EMT与肿瘤[J]. 生命的化学，2008，28(5)：523-526.
[18] NEHA T，ALEXANDER G，MARIANTHI T，et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. Seminars in Cancer Biology，2012，22(3)：194-207.
[19] SHU J，WANG L，HAN F，et al. BTBD7 Downregulates E-Cadherin and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer[J]. BioMed Research International，2019，2019：5937635.
[20] 付祎婷，程爱兰. 波形蛋白诱导EMT在肿瘤侵袭转移中的研究进展[J]. 中南医学科学杂志，2019，47(1)：89-91，94.
[21] ZHANG H，WU X S，XIAO Y Z，et al. Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT，migration，and invasion in gastric cancer cells[J]. Journal of Molecular Medicine (Berlin，Germany)，2019，97(2)：163-176.
[22] HUANG H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors：Recent Advances[J]. Sensors(Basel，Switzerland)，2018，18(10)：3249-3249.
[23] LIU Z Z，AFTAB T，WESTMAYS J A. MMP9 differentially regulates proteins involved in actin polymerization and cell migration during EMT of lens epithelial cells[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science，2021，62(8)：11988.
[24] 郝俊龙，王亚鹏，杨凯，等. 葡萄糖转运蛋白-1通过Wnt/β-catenin通路促进骨肉瘤MG63细胞迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2018，25(5)：469-474.

(责任编辑：吴凌，李海霞)