

原花青素下调 wnt/ β - catenin 通路拮抗砷诱导的人肝细胞 L - 02 增殖

任庆新¹, 张卫兵¹, 黄建萍¹, 安娜¹, 柴婧²

1. 南通市疾病预防控制中心, 江苏 南通 226007; 2. 乌鲁木齐市疾病预防控制中心

摘要:目的 本次研究使用原花青素(Proanthocyanidins, PC)和亚砷酸钠(Sodium arsenite, NaAsO₂)对人肝细胞 L - 02 进行干预,探究砷致细胞增殖的效应,PC对砷作用的拮抗以及与 wnt/ β - catenin 信号通路的关系。方法 以不同剂量的 PC 单独或与 NaAsO₂联合干预细胞,利用细胞计数试剂盒 - 8(Cell Counting Kit - 8, CCK - 8)法检测细胞增殖活力,使用细胞划痕实验、Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力,使用实时聚合酶链反应(Real - time Polymerase Chain Reaction, Real - time PCR)法和免疫印迹(Western Blotting, WB)法检测相关因子的信使 RNA(message RNA, mRNA)和蛋白表达水平。结果 NaAsO₂致细胞增殖活性(1.740 ± 0.105)升高,迁移(556.000 ± 3.606)、侵袭(439.667 ± 8.622)能力增强,上调原癌基因 c - myc(0.739 ± 0.012)、细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)(0.943 ± 0.002)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)(1.020 ± 0.019)、凋亡抑制基因 survivin(0.571 ± 0.033)和基质金属蛋白酶 - 7(Matrix metalloproteinase - 7, MMP - 7)(0.695 ± 0.059)的蛋白表达水平,上调 wnt3a 和 β - 连环蛋白(β - catenin)的蛋白(分别为 1.044 ± 0.010, 0.958 ± 0.037)和 mRNA(分别为 1.789 ± 0.165, 1.596 ± 0.217)水平。当 PC 与 NaAsO₂联合处理后,相较于 NaAsO₂单独干预,c - myc(0.438 ± 0.046)等增殖相关蛋白及信号通路核心分子 wnt3a(0.822 ± 0.015)、 β - catenin(0.832 ± 0.064)表达水平下降,通路抑制因子糖原合成酶激酶 - 3 β (Glycogen synthase kinase - 3 β , GSK - 3 β)(0.885 ± 0.058)和轴蛋白(Axin)(0.749 ± 0.016)表达升高。结论 NaAsO₂诱导 L - 02 细胞增殖,这可能是由其激活了 wnt/ β - catenin 信号通路导致的;PC 可以下调 wnt/ β - catenin 通路,进而拮抗 NaAsO₂所致的细胞增殖。

关键词:砷;原花青素;增殖;wnt/ β - catenin 信号通路

中图分类号:R113 文献标志码:A 文章编号:1003 - 8507(2024)08 - 1486 - 08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202311249

Effects of proanthocyanidins down - regulating wnt/ β - catenin signaling pathway to antagonize arsenic - induced proliferation of human hepatocyte L - 02

REN Qing - xin*, ZHANG Wei - bing, HUANG Jian - ping, AN Na, CHAI Jing

* Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong, Jiangsu 226007, China

Abstract: Objective To explore the effect of arsenic on cell proliferation, the antagonism of PC against arsenic and the relationship associated to wnt/ β - catenin signaling pathway by using Proanthocyanidins (PC) and sodium arsenite (NaAsO₂) to intervene human hepatocyte L - 02. **Methods** We treated cells with different doses of PC alone or in combination with NaAsO₂. The cell activities were detected by Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8) method. Cell scratch experiment and Transwell experiment were used to detect the ability of cell migration and invasion. Real - time Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) method and western blotting (WB) method were used to detect the expression levels of message RNA (mRNA) and protein. **Results** NaAsO₂ increased the activity of cell proliferation (1.740 ± 0.105), enhanced the ability of migration (556.000 ± 3.606) and invasion (439.667 ± 8.622). NaAsO₂ up - regulated the protein expression of proto - oncogene c - myc (0.739 ± 0.012), cyclinD1 (0.943 ± 0.002), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (1.020 ± 0.019), apoptosis inhibitor gene survivin (0.571 ± 0.033) and Matrix Metalloproteinase - 7 (MMP - 7) (0.695 ± 0.059). NaAsO₂ could also up - regulate the protein and mRNA levels of pathway core moleculars wnt3a (protein: 1.044 ± 0.010, mRNA: 1.789 ± 0.165) and β - catenin (protein: 0.958 ± 0.037, mRNA: 1.596 ± 0.217). Compared with NaAsO₂ group, when PC

基金项目:国家自然科学基金项目(81760584)

作者简介:任庆新(1994—),男,硕士,医师,研究方向:天然产物与健康

通信作者:柴婧,E - mail: 943610839@qq.com

intervention was introduced, the levels of proliferation related proteins such as *c-myc* (0.438 ± 0.046) decreased. The levels of mRNA and protein of *wnt3a* (mRNA: 1.181 ± 0.018 , protein: 0.822 ± 0.015) and β -catenin (mRNA: 0.965 ± 0.078 , protein: 0.832 ± 0.064) decreased. The expression of pathway inhibitors Glycogen synthase kinase- 3β (GSK- 3β) (0.885 ± 0.058) and Axin (0.749 ± 0.016) increased. **Conclusion** NaAsO₂ induce L-02 cell proliferation, which may be due to its activation of *wnt*/ β -catenin signaling pathway. PC can down-regulate *wnt*/ β -catenin pathway, thereby antagonizing the cell proliferation induced by NaAsO₂.

Keywords: Arsenic; Proanthocyanidins; Proliferation; *Wnt*/ β -catenin signaling pathway

砷 (Arsenic, As) 具有毒性和致癌等作用^[1-4]。肝脏是机体中毒、致癌的重要靶器官。砷可致肝细胞增殖^[5-6], *c-myc* 是一种原癌基因^[7], 细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1) 是细胞周期的正向调控蛋白^[8-9], 研究发现亚砷酸钠 (Sodium arsenite, NaAsO₂) 上调 *c-myc* 和 cyclinD1, 致大鼠肝上皮细胞 TRL1215 增殖^[10]。

wnt/ β -catenin 信号通路与细胞增殖联系紧密^[11-12], β -连环蛋白 (β -catenin) 的水平受其与轴蛋白 (Axin)/糖原合成酶激酶- 3β (Glycogen synthase kinase- 3β , GSK- 3β)/结肠癌抑制因子 (Adenomatous polyposis coli, APC)/酪蛋白激酶 1 α (Casein kinase 1 α , CK1 α) 组成的复合体控制。细胞在正常状态下, 复合体磷酸化降解 β -catenin。当 *wnt* 信号存在时, 细胞会分泌 *wnt* 蛋白 (包括 *wnt1*, *wnt3a*, *wnt7a* 等), *wnt* 蛋白与细胞膜上卷曲蛋白 (Frizzled) 家族的七次跨膜受体结合, 将 *wnt* 信号传入细胞, 致复合体解体。因此, β -catenin 不能被降解, 进而进入细胞核, 结合胸腺粗提因子/白细胞移动增强因子 (Thymus crude factor/Leukokinsin-enhancing factor, TCF/LEF), 上调 *c-myc*、cyclinD1^[12-13], 肿瘤生物标记物基质金属蛋白酶-7 (Matrix metalloproteinase-7, MMP-7)^[14]、血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)^[15] 及凋亡抑制基因 survivin^[16] 等, 导致细胞增殖。

原花青素 (Proanthocyanidins, PC) 是一种天然多酚化合物^[17], 可抑制人食管癌 ECA109 细胞增殖^[18]。Vaid^[19] 报道, PC 可以促使 β -catenin 降解, 抑制黑色素瘤细胞生长。而 PC 能否通过调控 *wnt*/ β -catenin 通路, 拮抗砷致肝细胞增殖未见报道。本研究以 NaAsO₂ 和 PC 干预人肝细胞 L-02, 观察 *wnt*/ β -catenin 通路及增殖相关指标的变化, 为 PC 的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象 人肝细胞 (L-02 细胞) 购自和元生物技术 (上海) 有限公司, 由人正常肝组织原代提取。

1.2 试剂耗材 NaAsO₂ (上海化学试剂公司, 分析纯), PC (标准品, 购自天津尖峰天然产物研究开发有限公司) 性状: 红棕色粉末, 气微、味涩, 溶于水和大多

有机溶剂; 纯度: 本研究所使用的 PC 为纯化的小分子二聚体, 纯度大于 98%; 成分: PC 是以黄烷-3-醇为结构单元通过 C-C 键聚合而形成的化合物。Dickkopf 相关蛋白 1 重组蛋白 (武汉优尔生科技股份有限公司), CCK-8 试剂 (上海尚宝生物科技有限公司), *wnt3a*、VEGF、*c-myc*、cyclinD1 抗体 (英国 Abcam 公司), Axin、APC、survivin、MMP-7 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), β -catenin、GSK- 3β 抗体 (美国 CST 公司), *wnt3a*、 β -catenin、GAPDH 引物 (生物工程 (上海) 有限公司), Transwell 小室 (美国 Corning 生物技术有限公司)。

1.3 仪器 酶标仪 (680, 美国 Bio-Rad 公司), 倒置相差显微镜 (AE31, 麦克奥迪集团), 超微量核酸分析仪 (A280, 上海金鹏分析仪器有限公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio 6, 美国应用生物系统公司), 逆转录仪 (ABI 9700, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司)。

1.4 细胞培养及分组 以不同剂量 NaAsO₂ 干预细胞 12 h, 24 h, 48 h, 筛选出最易促进细胞增殖的 NaAsO₂ 剂量和时间。施加 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L 的 PC 干预, 以确定 PC 发挥作用的最适剂量。将细胞随机分为 4 组: 空白对照组、NaAsO₂ 组、PC 组、PC + NaAsO₂ 组, 测定细胞的迁移、侵袭能力, 各相关指标水平。引入通路抑制剂 Dickkopf 家族成员-1 (Dickkopf-1, DKK-1) 干预, 将细胞分为 DKK-1 组、PC + DKK-1 组、NaAsO₂ + DKK-1 组、NaAsO₂ + DKK-1 + PC 组, 验证 PC 作用。

1.5 细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 法检测细胞增殖活力 取对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板内, 加入 100 μ l 干预试剂, 培养至规定时间后, 用 200 μ l 移液管吸去各孔培养液, 各孔加入 10 μ l CCK-8 试剂和 90 μ l 完全培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中约 2 h。之后用酶标仪测定 490 nm 波长处的 OD 值。计算公式为“细胞增殖活力% = (加药细胞 OD - 空白 OD) \div (对照细胞 OD - 空白 OD) \times 100%”。每组试验重复 3 次。

1.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 准备 6 孔板, 使用马克笔在每孔底部画 3 条平行横线, 距离均等。取细胞接种于板内, 每孔掌握为 1 ml, 含 1 ~ 4 \times

10^5 个细胞,待细胞铺满培养板孔底部后,使用 200 μl 移液器吸头,在长满细胞的孔内垂直于板孔底平面和马克笔所画线划 3 条线,线间距离相等,以划痕与马克笔线交叉处为观察点。吸去原培养基,用无菌磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)清洗各孔,再干预细胞。培养到规定时间后,通过显微镜观察细胞迁移的状况及形态,拍照并测量痕宽。每组试验重复 3 次。

1.7 Transwell 法检测细胞迁移、侵袭能力 上室加入 200 μl 含 NaAsO_2 或 PC 的培养基与细胞的混悬液,下室加入 600 μl 无血清培养基,培养至规定时间。将上下室培养液吸出,再用 PBS 各冲洗 2 遍。在下室加入 4% 多聚甲醛 600 μl ,将上室放入下室中 20 min。接着将上室底膜晾干,在下室加入 0.1% 结晶紫染液,染液的体积与多聚甲醛相同,将上室再次放入下室中 20 min,将细胞染成紫色,用 PBS 将上室的底膜洗 2 遍,用棉球将小室底部固定不紧密的细胞轻轻擦掉。在显微镜下拍照、计数。侵袭实验中,在上室底部聚碳酸酯膜上铺一层基质胶,以模仿细胞外基质,其余操作同迁移实验。每组试验重复 3 次。

1.8 信号通路抑制剂 DKK-1 的使用 DKK-1 是 wnt/β -catenin 信号通路的抑制剂,其可以与 wnt 蛋白竞争性结合细胞膜上的低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 5/6, LRP5/6),阻止 wnt -Frizzled 复合体形成,进而阻止 wnt 信号传入细胞,最终抑制 wnt/β -catenin 信号通路^[20]。先将 DKK-1 用缓冲液和完全培养基配制成 20 ng/ml 的浓度^[21]。在 6 孔板培养细胞,待密度 >90% 后,用 PBS 清洗,每孔加入 2.5 ml 的含 DKK-1 培养基,培养 4~6 h 后,将含有 DKK-1 的培养液吸除,再用 PBS 清洗,加入新的完全培养基。

1.9 免疫印迹(Western Blotting, WB)法测定蛋白水平 在提取出来的蛋白上清液中加入上样缓冲液,贴封口膜沸水浴 10 min,将其冷却至室温,置于 -20°C 冰箱保存。制备分离胶和浓缩胶,将制好的胶固定在电泳盒里,在上样孔依次加入 10 μl 各剂量组融化后的蛋白样品,开始电泳。在电泳结束后取出凝胶,按照湿转法进行电转,根据所测蛋白分子量选择电转条件。电转结束后,使用脱脂奶粉配置封闭液,封闭 2 h。再孵育一抗 16~18 h,二抗 2 h,回收二抗,进行曝光。每组试验重复 3 次。

1.10 实时聚合酶链反应(Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR)法测定 mRNA 水平 以 mRNA 为模板,应用逆转录酶、T 重复寡核苷酸(Oligo(dT)),逆转录成互补 DNA(complementary

DNA, cDNA),再以 cDNA 为模板进行扩增,最后计算得出 mRNA 水平。取细胞提取 mRNA,将其逆转录得到 cDNA。取 cDNA 加入引物、绿色荧光染料混合液(Green Master Mix)、荧光定量 PCR 参比染料(ROX Reference Dye)、焦碳酸二乙酯(Diethyl Pyrocarbonate, DEPC)水,轻轻混匀,上 PCR 机进行检测,得到循环阈值(Cycle threshold, Ct)。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算,得出 mRNA 的相对表达量。每组试验重复 3 次。

表 1 PCR 实验所需引物

Table 1 Primers for PCR experiments

引物名称	引物序列
wnt3a	
正向引物序列	5' - TGACACGCTCATGTGCAGAA - 3'
反向引物序列	5' - ACACCATCCCACCAAACCTCG - 3'
β -catenin	
正向引物序列	5' - CATCTACACAGTTTGATGCTGCT - 3'
反向引物序列	5' - GCAGTTTGTCACTTCAGGGA - 3'
GAPDH	
正向引物序列	5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3'
反向引物序列	5' - GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3'

1.11 统计分析 以 Excel 2010 软件录入实验数据,应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。各指标首先以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,再采用方差分析法进行多组比较,组间的多重比较使用 Bonferroni 法,所有检验均采用双侧检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

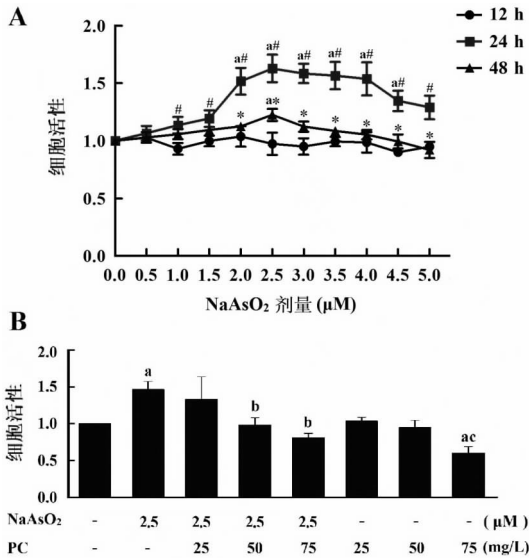
2.1 NaAsO_2 和 PC 对 L-02 细胞增殖活力的影响

如图 1A 所示,在 12 h 干预下,各剂量组与空白对照组之间差异无统计学意义($F = 0.968$, $P = 0.497$);在 24 h 干预下,以 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 μM 的 NaAsO_2 处理后,细胞活性相较于空白对照组增高(P 均 < 0.05);在 48 h 干预下,以 2.5 μM 的 NaAsO_2 处理后,细胞活性相较于空白对照组升高($t = 7.466$, $P = 0.002$)。此外,1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 μM 的 NaAsO_2 干预 24 h 后的细胞增殖活力高于在这些剂量下干预 12 h 后的细胞(P 均 < 0.05);2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 μM 的 NaAsO_2 干预 24 h 后的细胞增殖活力高于在这些剂量下干预 48 h 后的细胞(P 均 < 0.05)。因此,本研究选择 2.5 μM 和 24 h 为 NaAsO_2 干预的剂量和时间。

如图 1B 所示,与对照组相比,2.5 μM NaAsO_2 干预 24 h 后,细胞活力提升(1.470 ± 0.105) ($t = 7.768$, $P = 0.001$)。与 NaAsO_2 组相比,当其与 50 mg/L(0.983 ± 0.101) 和 75 mg/L(0.808 ± 0.062) 的 PC 联合干预 24 h 时,细胞活力下降($t = 5.795$, P

= 0.004; $t = 9.396$, $P = 0.001$)。与空白对照组和 25 mg/L 的 PC 单独处理组 (1.039 ± 0.052) 相比, 75 mg/L 的 PC 干预 24 h 后, 细胞活力下降 (0.603 ± 0.089) ($t = 7.738$, $P = 0.002$; $t = 7.344$, $P = 0.002$)。故选择 50 mg/L 作为 PC 的剂量。

= 17.205, $P < 0.001$)。



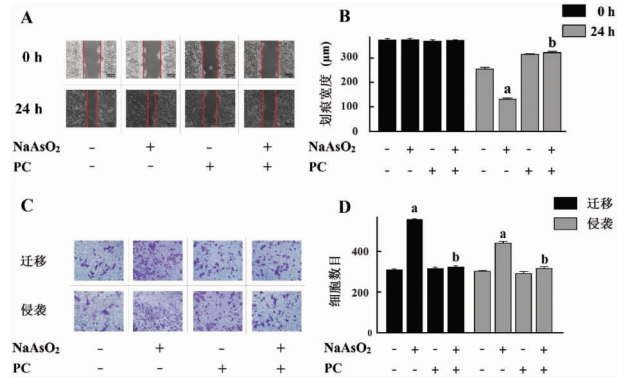
注:图 1A:a 表示表示干预某时间后,细胞增殖活力与对照组相比差异具有统计学意义;#表示以某一剂量干预时,与 12 h 干预组差异具有统计学意义;*表示以某一剂量干预时,与 24 h 干预组差异具有统计学意义($P < 0.05$);图 1B:a 表示与对照组差异具有统计学意义;b 表示与 NaAsO₂ 干预组差异具有统计学意义;c 表示与 25 mg/L PC 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 1 不同时间、剂量 NaAsO₂ 和 PC 干预对 L-02 细胞增殖活力的影响 ($n = 3$)

Fig. 1 Effects of different time and doses of NaAsO₂ and PC intervention on proliferation activity of L-02 cells ($n = 3$)

2.2 PC 抑制 NaAsO₂ 引起的肝 L-02 细胞迁移、侵袭能力提升 如图 2A、图 2B 所示,与划痕 0 时刻的痕道宽度相比,24 h 后四个干预组的痕道宽度均狭窄,相较于空白对照组 (259.997 ± 7.644),NaAsO₂ 组 (123.890 ± 5.565) 的痕道宽度减小 ($t = 29.931$, $P < 0.001$),而 NaAsO₂ + PC 组 (316.313 ± 5.945) 的痕道宽于 NaAsO₂ 组 ($t = 40.926$, $P < 0.001$)。从镜下看出 NaAsO₂ 组细胞有排列紊乱、成层生长的趋势,PC 抑制此趋势。

如图 2C、图 2D 所示,相较于空白对照组,NaAsO₂ 组的迁移 (556.000 ± 3.606)、侵袭 (439.667 ± 8.622) 能力提高 ($t_{\text{迁移}} = -74.300$, $P < 0.001$; $t_{\text{侵袭}} = -25.146$, $P < 0.001$);与 NaAsO₂ 组相比,PC + NaAsO₂ 组的迁移 (322.000 ± 6.245)、侵袭 (315.333 ± 9.074)、能力下降 ($t_{\text{迁移}} = 56.205$, $P < 0.001$; $t_{\text{侵袭}}$



注:a 表示与对照组差异具有统计学意义;b 表示与 NaAsO₂ 干预组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 2 PC 与 NaAsO₂ 对 L-02 细胞迁移、侵袭能力的影响(划痕实验为 40 ×,Transwell 实验为 200 ×, $n = 3$)

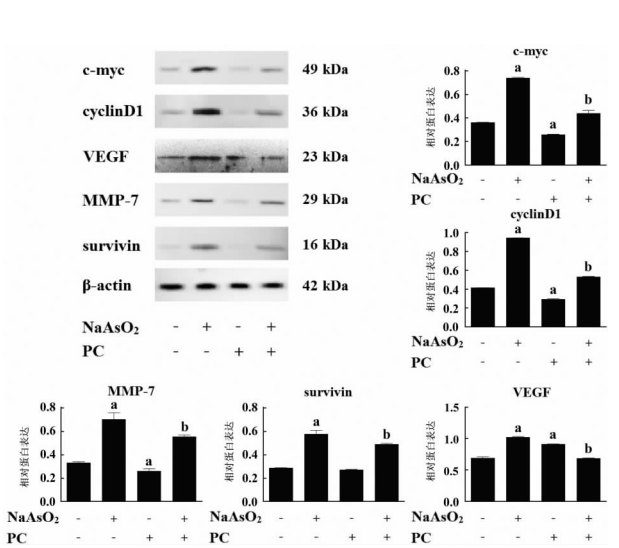
Fig. 2 Effects of PC and NaAsO₂ on migration and invasion ability of L-02 cells (Cell scratch experiment 40 ×, Transwell experiment 200 ×, $n = 3$)

2.3 PC 和 NaAsO₂ 对细胞增殖指标蛋白表达的影响

如图 3 所示,相较于空白对照组,NaAsO₂ 组 c - myc (0.739 ± 0.012)、cyclinD1 (0.943 ± 0.002)、VEGF (1.020 ± 0.019)、MMP - 7 (0.695 ± 0.059)、survivin (0.571 ± 0.033) 升高 (P 均 < 0.05)。PC 组 c - myc (0.257 ± 0.007)、cyclinD1 (0.291 ± 0.013)、MMP - 7 (0.240 ± 0.001) 降低 (P 均 < 0.05)。相较于 NaAsO₂ 组,PC + NaAsO₂ 组 c - myc (0.438 ± 0.046)、cyclinD1 (0.530 ± 0.009)、VEGF (0.683 ± 0.022)、MMP - 7 (0.548 ± 0.015)、survivin (0.484 ± 0.009) 水平下降 (P 均 < 0.05)。以上结果阐明 PC 具有拮抗 NaAsO₂ 促增殖的作用。

2.4 PC 和 NaAsO₂ 对 wnt/β - catenin 信号通路各蛋白水平的影响

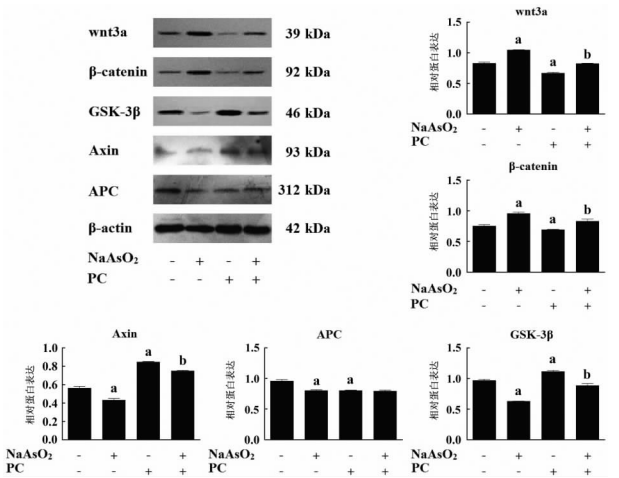
如图 4 所示,与空白对照组相比,NaAsO₂ 组的 wnt3a (1.044 ± 0.010)、β - catenin (0.958 ± 0.037) 水平升高,GSK - 3β (0.630 ± 0.004)、Axin (0.430 ± 0.037)、APC (0.801 ± 0.030) 下降 (P 均 < 0.05);PC 组 wnt3a (0.666 ± 0.031)、β - catenin (0.682 ± 0.009)、APC (0.801 ± 0.018) 下降,GSK - 3β (1.114 ± 0.039)、Axin (0.845 ± 0.012) 上升 (P 均 < 0.05)。与 NaAsO₂ 组相比,PC + NaAsO₂ 组 wnt3a (0.822 ± 0.015)、β - catenin (0.832 ± 0.064) 降低,GSK - 3β (0.885 ± 0.058)、Axin (0.749 ± 0.016) 水平升高 (P 均 < 0.05)。以上结果表明 NaAsO₂ 上调 wnt/β - catenin 通路,PC 对 NaAsO₂ 具有抑制作用。



注:a 表示与空白对照组差异具有统计学意义;b 表示与 NaAsO₂ 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 3 PC 和 NaAsO₂ 对细胞增殖指标蛋白表达的影响($n = 3$)

Fig. 3 Effects of PC and NaAsO₂ on the index protein expression of cell proliferation ($n = 3$)



注:a 表示与空白对照组差异具有统计学意义;b 表示与 NaAsO₂ 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

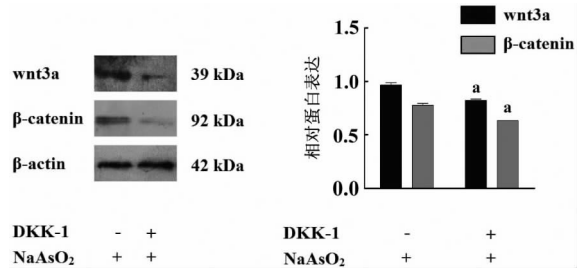
图 4 PC 和 NaAsO₂ 对 wnt/β-catenin 信号通路指标蛋白表达的影响($n = 3$)

Fig. 4 Effects of PC and NaAsO₂ on the protein expression of wnt/β-catenin signaling pathway ($n = 3$)

2.5 PC 通过 wnt/β-catenin 信号通路对 NaAsO₂ 致增殖效应的拮抗作用

首先需要确定抑制剂的有效性。如图 5 所示,与 NaAsO₂ 组相比,NaAsO₂ + DKK-1 组的 wnt3a(0.825 ± 0.024)、β-catenin(0.633 ± 0.002) 下降($t_{wnt3a} = 5.430, P = 0.006; t_{\beta-catenin} = 7.730, P = 0.002$),故抑制方式有效。

如图 6 所示,在不施加 NaAsO₂ 时,相较于 DKK-1 组,PC + DKK-1 干预后 c-myc(0.310 ± 0.003)、

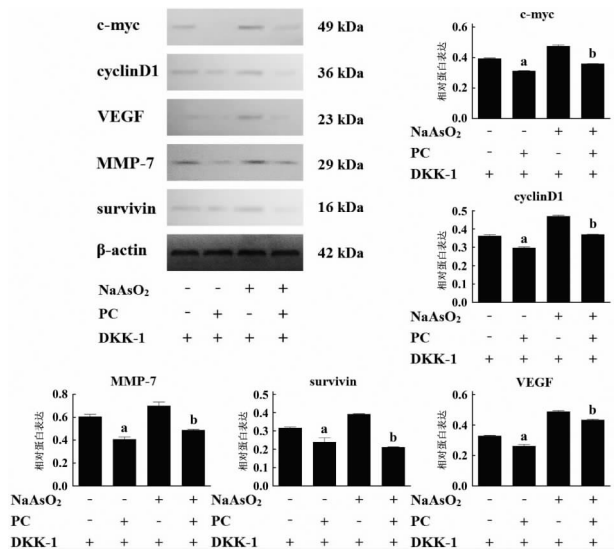


注:a 表示与 NaAsO₂ 组差异具有统计学意义。

图 5 抑制剂 DKK-1 对于 wnt/β-catenin 信号通路的抑制作用($n = 3$)

Fig. 5 Inhibitory effects of DKK-1 on wnt/β-catenin signaling pathway ($n = 3$)

cyclinD1 (0.297 ± 0.006)、VEGF (0.260 ± 0.011)、MMP-7(0.406 ± 0.022)、survivin(0.239 ± 0.024) 水平下降(P 均 < 0.05)。当施加 NaAsO₂ 时,相较于 DKK1 + NaAsO₂ 组,DKK1 + NaAsO₂ + PC 联合干预组的 c-myc (0.358 ± 0.000)、cyclinD1 (0.370 ± 0.002)、VEGF (0.432 ± 0.006)、MMP-7 (0.487 ± 0.008)、survivin(0.212 ± 0.002) 下降(P 均 < 0.05)。本结果表明 PC 与 DKK-1 具有协同作用。



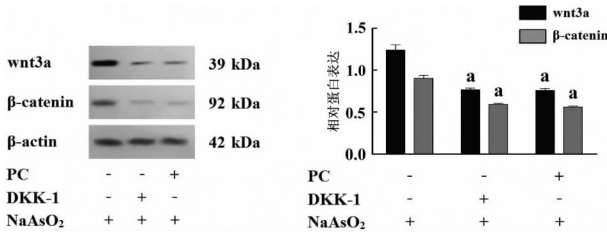
注:a 表示与 DKK-1 组差异具有统计学意义;b 表示与 DKK1 + NaAsO₂ 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 6 PC 通过 wnt/β-catenin 信号通路对 NaAsO₂ 致增殖效应的拮抗作用($n = 3$)

Fig. 6 Antagonistic effect of PC on proliferation induced by NaAsO₂ through wnt/β-catenin signaling pathway ($n = 3$)

将 PC 的作用与抑制剂进行比较,如图 7 所示,与 NaAsO₂ 组相比,NaAsO₂ + DKK-1 组的 wnt3a(0.766 ± 0.021)、β-catenin(0.593 ± 0.012) 表达减少(t_{wnt3a}

= 12.062, $P < 0.001$; $t_{\beta\text{-catenin}} = 14.910$, $P < 0.001$), NaAsO₂ + PC 组的 wnt3a(0.759 ± 0.022)、β - catenin (0.561 ± 0.012) 水平降低 ($t_{\text{wnt3a}} = 12.188$, $P < 0.001$; $t_{\beta\text{-catenin}} = 16.456$, $P < 0.001$)。这验证了 PC 下调 wnt/β - catenin 信号通路,拮抗细胞增殖。

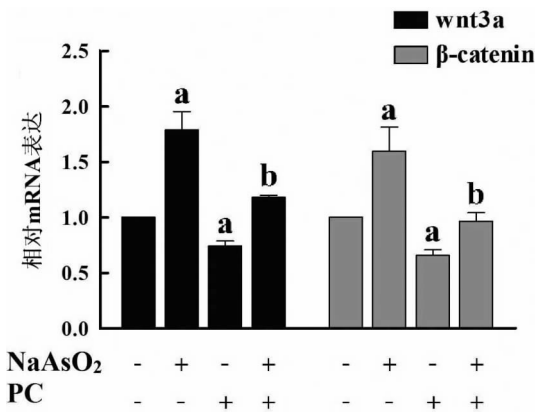


注:a 表示与 NaAsO₂组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 7 PC 作用与抑制剂作用的比较($n = 3$)

Fig. 7 Comparison of the effect of PC and inhibitor ($n = 3$)

2.6 PC 和 NaAsO₂对 wnt3a、β - catenin 的 mRNA 表达的影响 如图 8 所示,与空白对照组相比,NaAsO₂组 wnt3a (1.789 ± 0.165)、β - catenin (1.596 ± 0.217) 的 mRNA 水平升高 ($t_{\text{wnt3a}} = -8.290$, $P = 0.001$, $t_{\beta\text{-catenin}} = -4.752$, $P = 0.009$),PC 组 wnt3a (0.741 ± 0.046)、β - catenin (0.657 ± 0.052) 的 mRNA 降低 ($t_{\text{wnt3a}} = 9.801$, $P = 0.001$; $t_{\beta\text{-catenin}} = 11.542$, $P < 0.001$)。相较于 NaAsO₂组,NaAsO₂ + PC 组 wnt3a (1.181 ± 0.018)、β - catenin (0.965 ± 0.078) 的 mRNA 表达降低 ($t_{\text{wnt3a}} = 6.352$, $P = 0.003$; $t_{\beta\text{-catenin}} = 4.738$, $P = 0.009$)。



注:a 表示与空白对照组差异具有统计学意义;b 表示与 NaAsO₂组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 8 PC 和 NaAsO₂对 wnt3a、β - catenin 的 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 8 Effects of PC and NaAsO₂ on mRNA expression of wnt3a and β - catenin ($n = 3$)

3 讨论

砷具有致增殖效应^[22],wnt/β - catenin 信号通路与增殖联系紧密^[23]。PC 是一种天然多酚化合物,可拮抗氧化损伤^[24],也有抑制细胞增殖的作用^[25]。本研究发现,NaAsO₂使细胞增殖活性升高,上调 wnt/β - catenin 通路;当 PC 与 NaAsO₂联合处理后,相较于 NaAsO₂组,增殖蛋白水平下降,通路负性因子 GSK - 3β 和 Axin 表达升高。这说明上调 wnt/β - catenin 通路是砷促使细胞增殖的途径之一,而 PC 可以抑制该通路,拮抗砷的促增殖作用。

Patterson^[26]的研究发现,以 2.0 μM 的 NaAsO₂处理自然永生化人表皮细胞 11 d 后,细胞的集落形成能力增强;当 wnt/β - catenin 信号通路激活后,即可上调致增殖的分子^[27]。在 Zeng 等人^[28]的研究中,以 0.1 μM 的 NaAsO₂干预人成骨 hFOB 1.19 细胞 24 h 后,发现 β - catenin 表达升高,与本研究结果一致。PC 具有一定的抗增殖功效^[18, 25, 29 - 31],Prasad^[32]的研究表明,PC 可以抑制细胞周期蛋白依赖激酶(Cyclin - dependent kinases, Cdk)活性,进而抑制 cyclinD1 表达,诱导细胞周期变慢,增殖活力降低。Vaid 等人^[33]指出,β - catenin 是 PC 的特异性分子靶点之一,可直接受 PC 调控,进一步抑制增殖蛋白表达,这与本研究发现的 PC 下调 β - catenin 蛋白和 mRNA 水平的现象相一致。本研究也发现,对于 β - catenin 上游的 wnt3a 分子,PC 起到下调作用,这就使通路的起始信号减少,阻碍 wnt 蛋白激活散乱蛋白(Dsh),进而更少地触发细胞内信号转导。由此可见,PC 能够在 wnt/β - catenin 通路中的不同环节产生抑制效应。当 PC 与通路抑制剂联合使用时,比单纯使用抑制剂更抑制增殖蛋白表达,这验证了 PC 下调 wnt/β - catenin 通路产生抑增殖的效应。

PC 是一种强效抗氧化剂,清除细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)^[34],ROS 水平增高是砷的致癌效应中重要的途径^[35 - 36]。Haack 等人^[37]指出,内源性 ROS 提高 Dsh 蛋白表达,激活 wnt/β - catenin 通路,故降低 ROS 水平不仅是 PC 缓解氧化损伤的机制,也可能是 PC 抑制 wnt/β - catenin 通路的途径。对于 PC 样品,在动物实验或实际临床方面已有应用,目前关于其应用更多围绕抗氧化特性展开:PC 通过核因子 E2 相关因子 2(Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2, Nrf2)通路拮抗砷致小鼠肝脏氧化损伤^[38],也使受试者的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)水平升高,达到抗氧化的作用^[39],然而,PC 在抑制增殖、抗癌方面的临床应用暂未见报道。本研究发现 NaAsO₂诱导 L - 02 细胞增殖,这可

能是由其激活 wnt/ β - catenin 通路导致的;PC 下调通路,进而拮抗 NaAsO₂所致的细胞增殖。因此,本研究提供了 PC 应用的新思路,在后续研究中,我们将继续深入探索 PC 抗增殖的机制,为 PC 的功效提供理论依据。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Ghadersarbazi Z, Ghiasi F, Ghorbani F, et al. Toxicity assessment of Arsenic on common carp (*Cyprinus carpio*) and development of natural sorbents to reduce the bioconcentration by RSM methodology [J]. *Chemosphere*, 2019, 224: 247 - 255.
- [2] 杨瑞瑛,李子杰,林勤,等. 砷中毒大鼠体内各脏器、组织中砷的分布[J]. *中国地方病防治杂志*, 2005, (5): 260 - 262.
Yang RY, Li ZJ, Lin Q, et al. Distribution of Arsenic in arsenic - poisoning rat organs [J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*, 2005, (5): 260 - 262.
- [3] Zheng LY, Umans JG, Tellez - Plaza M, et al. Urine Arsenic and prevalent albuminuria: evidence from a population - based study [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2013, 61(3): 385 - 394.
- [4] 曾磊,汪永萍. 全球两亿人饮用水砷超标[J]. *生态经济*, 2018, 34(11): 6 - 9.
Zeng L, Wang YP. Arsenic in drinking water exceeds the standard for 200 million people worldwide [J]. *Ecological Economics*, 2018, 34(11): 6 - 9.
- [5] 廖春华,边寰锋,方道奎,等. 低剂量亚砷酸钠诱导人 THLE - 3 细胞增殖 hormesis 效应与 IL - 6 mRNA 表达变化[J]. *毒理学杂志*, 2019, 33(6): 473 - 476.
Liao CH, Bian HF, Fang DK, et al. Low dose Sodium arsenite induces hormesis effect on human THLE - 3 cell proliferation and changes in IL - 6 mRNA expression [J]. *Journal of Toxicology*, 2019, 33(6): 473 - 476.
- [6] 王晨璐,吴顺华,张露露. 亚砷酸钠对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34(2): 102 - 105.
Wang CL, Wu SH, Zhang LL. Effects of exposure to Sodium arsenite on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells of rats [J]. *Journal of Environment and Health*, 2017, 34(2): 102 - 105.
- [7] 陈善萍,王俊利,韦贵将. 肿瘤分子标志物 c - myc 基因的研究进展[J]. *右江医学*, 2016, 44(2): 211 - 213.
Chen SP, Wang JL, Wei GJ. Research progress on tumor molecular marker c - myc gene [J]. *Youjiang Medical Journal*, 2016, 44(2): 211 - 213.
- [8] 王前,邓晶,蒋永新. cyclinD1 的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(2): 350 - 353.
Wang Q, Deng J, Jiang YX. Research progress of cyclinD1 [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2009, 17(2): 350 - 353.
- [9] Zhou JX, Niehans GA, Shar A, et al. Mechanisms of G1 checkpoint loss in resected early stage non - small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2001, 32(1): 27 - 38.
- [10] Chen H, Liu J, Zhao CQ, et al. Association of c - myc overexpression and hyperproliferation with arsenite - induced malignant transformation [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 175(3): 260 - 268.
- [11] Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome [J]. *Cell*, 1982, 31(1): 99 - 109.
- [12] 张世蕪,张旭. Wnt 信号通路在肿瘤调控方面的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1): 14 - 18.
Zhang SP, Zhang X. Research progress of Wnt signaling pathway in tumor regulation [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(1): 14 - 18.
- [13] Lin GY, Liu BN, Meng ZW, et al. MiR - 26a enhances invasive capacity by suppressing GSK3 β in human lung cancer cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 352(2): 364 - 374.
- [14] 熊海林,孙爱华,周思维,等. CXCL4 对非小细胞肺癌 H460 细胞顺铂耐药性的影响及其机制探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(18): 2846 - 2850.
Xiong HL, Sun AH, Zhou SW, et al. The effect of CXCL4 on cisplatin resistance in non - small cell lung cancer H460 cells and its mechanism [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2018, 26(18): 2846 - 2850.
- [15] Han DD, Cao CJ, Su Y, et al. Ginkgo biloba exocarp extracts inhibits angiogenesis and its effects on Wnt/ β - catenin - VEGF signaling pathway in Lewis lung cancer [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 192: 406 - 412.
- [16] 王海霞,张蕾,刘玲娟,等. Wnt/ β - catenin 通路激活促进慢性缺氧 H9c2 细胞中抗凋亡因子 bcl - 2 及 survivin 表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(11): 1509 - 1513.
Wang HX, Zhang L, Liu LJ, et al. Activation of Wnt/ β - catenin signaling pathway promotes anti - apoptotic genes bcl - 2 and survivin expression in H9c2 cell subject to chronic hypoxia [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2017, 42(11): 1509 - 1513.
- [17] Taheri R, Connolly BA, Brand MH, et al. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(36): 8581 - 8588.
- [18] Guo FM, Hu YH, Niu Q, et al. Grape seed Proanthocyanidin extract inhibits human esophageal squamous cancerous cell line ECA109 via the NF - κ B signaling pathway [J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018: 3403972.
- [19] Vaid M, Singh T, Prasad R, et al. Bioactive proanthocyanidins inhibit growth and induce apoptosis in human melanoma cells by decreasing the accumulation of β - catenin [J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(2): 624 - 634.
- [20] Williams BO, Insogna KL. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009, 24(2): 171 - 178.
- [21] 李伟,谢肖俊,陈胜林,等. Wnt/ β - Catenin 信号通路在肝癌发生中的分子机制研究[J]. *中国现代手术学杂志*, 2014, 18(1): 3 - 8.
Li W, Xie XJ, Chen SL, et al. The study of Wnt/ β - catenin signaling pathway in the molecular mechanism of liver cancer [J]. *Chinese Journal of Modern Operative Surgery*, 2014, 18(1): 3 - 8.

- in the elderly: safety considerations [J]. *Drug Safety: an International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience*, 2009, 32(6): 457-474.
- [19] 易端, 朱薇, 孟秀丽, 等. 腰椎间盘突出症患者疼痛与睡眠质量的相关性研究[J]. *中国微创外科杂志*, 2019, 19(11): 973-976.
- Yi D, Zhu W, Meng XL, et al. A study on relationship between sleep quality and pain in patients with lumbar disc herniation[J]. *Chinese Journal of Minimally Invasive Surgery*, 2019, 19(11): 973-976.
- [20] Pan F, Tian J, Cicuttini F, et al. Sleep disturbance and its association with pain severity and multisite pain: a prospective 10.7-Year study[J]. *Pain and Therapy*, 2020, 9(2): 751-763.
- [21] Shang Z, Liu YQ, Xue DY, et al. The role of Life satisfaction and living arrangements in the association between chronic disease and depression: a National cross-sectional survey[J]. *Frontiers in Psychology*, 2023, 14: 1266059.
- [22] 杨瑞希, 唐程梦, 张铭, 等. 中国西部青少年欺凌与自杀倾向的关系: 焦虑的中介作用和孤独感的调节作用[J]. *现代预防医学*, 2023, 50(12): 2172-2178.
- Yang RX, Tang CM, Zhang M, et al. Bullying and suicidality among adolescents in western China: the mediating role of anxiety and moderating role of loneliness[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2023, 50(12): 2172-2178.
- 收稿日期: 2023-12-04
-
- (上接第 1492 页)
- [22] Chen CZ, Jiang XJ, Gu SY, et al. MicroRNA-155 regulates arsenite-induced malignant transformation by targeting Nrf2-mediated oxidative damage in human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology Letters*, 2017, 278: 38-47.
- [23] Chen X, Yang J, Evans PM, et al. Wnt signaling: the good and the bad[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008, 40(7): 577-594.
- [24] Zhen JL, Qu ZZ, Fang HB, et al. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on pentylentetrazole-induced kindling and associated cognitive impairment in rats [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 34(2): 391-398.
- [25] 齐玲, 钟越, 任旷, 等. 越桔原花青素抑制胶质瘤细胞生长作用[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(3): 315-317.
- Qi L, Zhong Y, Ren K, et al. Effects of vaccinium vitis procyanidin on growth of glioma cells in vitro[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2016, 32(3): 315-317.
- [26] Patterson TJ, Reznikova TV, Phillips MA, et al. Arsenite maintains germinative state in cultured human epidermal cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 207(1): 69-77.
- [27] Schaefer KN, Peifer M. Wnt/Beta-Catenin signaling regulation and a role for biomolecular condensates[J]. *Developmental Cell*, 2019, 48(4): 429-444.
- [28] Zeng QB, Xu YY, Yu X, et al. Silencing GSK3 β instead of DKK1 can inhibit osteogenic differentiation caused by co-exposure to fluoride and Arsenic[J]. *Bone*, 2019, 123: 196-203.
- [29] Zhang Y, Chen S, Wei C, et al. Dietary compound proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves attenuate chemotherapy-resistant ovarian cancer stem cell traits via targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway and inducing G1 cell cycle arrest[J]. *Food & Function*, 2018, 9(1): 525-533.
- [30] Subkamkaew C, Limtrakul dejkriengkraikul P, Yodkeeree S. Proanthocyanidin-Rich fractions from red rice extract enhance TNF- α -Induced cell death and suppress invasion of human lung adenocarcinoma cell A549[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3393.
- [31] Liu GJ, Shi AM, Wang NN, et al. Polyphenolic Proanthocyanidin-B2 suppresses proliferation of liver cancer cells and hepatocellular carcinogenesis through directly binding and inhibiting AKT activity[J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101701.
- [32] Prasad R, Katiyar SK. Bioactive phytochemical proanthocyanidins inhibit growth of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting multiple signaling molecules [J]. *PLOS One*, 2012, 7(9): e46404.
- [33] Vaid M, Singh T, Prasad R, et al. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE2 receptors and β -catenin signaling molecules [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2015, 5(11): 3325-3338.
- [34] Shao ZH, Vanden hoek TL, Li CQ, et al. Synergistic effect of *Scutellaria baicalensis* and grape seed proanthocyanidins on scavenging reactive Oxygen species in vitro [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2004, 32(1): 89-95.
- [35] Na AR, Chung YM, Lee SB, et al. A critical role for Romo1-derived ROS in cell proliferation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(2): 672-678.
- [36] Chowdhury R, Chatterjee R, Giri AK, et al. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS Generation, Erk signaling and CyclinA expression [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 198(2): 263-271.
- [37] Haack F, Lemcke H, Ewald R, et al. Spatio-temporal model of endogenous ROS and raft-dependent WNT/ β -catenin signaling driving cell fate commitment in human neural progenitor cells [J]. *PLOS Computational Biology*, 2015, 11(3): e1004106.
- [38] 李婧, 胡静, 季学闻. GSPE 通过 Nrf2 信号通路拮抗砷所致的小鼠肝脏氧化损伤[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2023, 32(7): 771-774.
- Li J, Hu J, Ji XW. GSPE antagonizes Arsenic induced liver oxidative damage in mice through Nrf2 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 32(7): 771-774.
- [39] 周建设, 王建新. 原花青素抗氧化的临床研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(12): 1717-1718.
- Zhou JS, Wang JX. Clinical study on antioxidant properties of proanthocyanidins [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2007, 27(12): 1717-1718.
- 收稿日期: 2023-11-13