

# 槐耳浸膏通过下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号抑制大肠癌干细胞

张涛, 王科, 张均书, 王晓蕾, 陈志刚, 倪超, 邱福铭, 黄建\*

\*通讯作者: 黄建教授, 浙江大学医学院附属第二医院, 肿瘤研究所, 浙江省杭州, 310009

联系电话: +86-571-87315009 传真: +86-571-87022776 电子邮件: drhuangjian@zju.edu.cn

## 摘要:

肿瘤干细胞(Cancer Stem Cell, CSC)是导致恶性肿瘤发生、转移、复发及治疗抵抗的主要根源之一。该研究评估槐耳浸膏是否具有抗大肠癌 CSC 作用, 及探讨相关抗癌机制。结果显示, 槐耳浸膏有效抑制原代大肠癌细胞球的形成 ( $P < 0.05$ ), 并减少 ALDH 阳性肿瘤细胞群比率。Western blot 和 WNT/ $\beta$ -catenin 报告基因表明, 槐耳浸膏下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 自我更新信号。该文第一次报道槐耳浸膏是一种有效抗大肠癌 CSC 的药物, 并且明确 Wnt /  $\beta$ -catenin 信号是其靶点, 为大肠癌的治疗提供了一种新的选择。

**关键词:** 槐耳浸膏; 抗肿瘤活性; 大肠癌; 肿瘤干细胞

## 前言

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一，近年来我国的大肠癌发病率及死亡率呈明显的上升趋势。大肠癌的发生是复杂的过程，包括上皮细胞增殖，分化和凋亡的调控异常。最近的证据显示肿瘤干细胞(Cancer Stem Cell, CSC)是导致恶性肿瘤发生、转移、复发及治疗抵抗的主要根源。CSC 是肿瘤内一小群具有强致瘤性、自我更新(Self-renewal)能力及多向分化潜能的细胞亚群 [1; 2; 3; 4; 5; 6]。目前许多癌症治疗方法失败，包括化疗和放射治疗，主要原因是其由于不能有效的完全杀灭 CSC，残存的细胞将重新生成肿瘤 [7; 8; 9; 10]。因此，寻找高效、低毒的选择性杀伤 CSC 药物已是目前抗肿瘤治疗的一个主要的研究方向。目前有几种天然产物可能对 CSC 有效如姜黄素、萝卜硫素和 epigallocatechin-3-gallate [11; 12; 13]。

槐耳浸膏（槐耳提取物）在中国被用于治疗多种疾病[14]。它是一种药用真菌提取物，其有效成分为蛋白聚糖（含 8.72% 水，12.93% 氨基酸和 41.53% 多糖）[15; 16]。最近报道，槐耳浸膏通过抑制肿瘤生长，诱导细胞凋亡，与抗血管生成，从而起到抗癌的效果 [15; 17; 18]。然而，目前仍然没有其相关抗大肠癌 CSC 方面的研究。

Wnt 通路在调控干细胞的自我更新中具有重要作用。Wnt 靶基因的激活依赖于  $\beta$ -catenin 入核，进而与转录因子 TCF/LEF 结合形成复合物，共同起始下游调控基因的转录 [19; 20]。 $\beta$ -catenin 在核内量受 APC 复合物调节 [21; 22]。肿瘤细胞的 Wnt 通路的过度激活导致化疗和放疗的耐受 [23; 24]。这意味着去  $\beta$ -catenin 调节对抑制 CSC 起着

重要的作用。如果下调  $\beta$ -catenin 的转录活性，肿瘤生长会被抑制。因此，寻找药物能靶向该通路及其下游分子显得非常重要的。

在本课题中，我们研究了槐耳浸膏对大肠癌干细胞的影响。结果表明，槐耳通过下调  $\beta$ -catenin 和 Wnt 信号通路从而抑制 CSC，为明确槐耳浸膏的作用机理及临床应用提供实验依据。

## 材料与amp;方法

### 材料

槐耳浸膏来自启东盖天力制药有限公司（中国）。DMEM/F12 购自 Invitrogen 公司。胎牛血清（FBS）购自四季青生物公司（中国杭州）。抗  $\beta$ -catenin(1:3000)，抗 cyclin D1 (1:3000) 和抗  $\beta$ -actin (1:1000) 抗体购自 Cell Signaling 公司。胶原酶和透明质酸购自 Sigma 公司。

### 细胞培养

按照浙江大学附属浙二医院人体试验委员会试验标准，并于术前经患者本人及家属同意，取结肠癌组织，剪碎癌组织，用胶原酶（1.25 mg/ml）和透明质酸（1.5 mg/ml）在 37° C 消化 1 小时后，将细胞接种置于含 DMEM/F12 完全培养液的培养瓶中培养。根据细胞的状态及培养液颜色的变化，每隔 3~4 天更换培养液，并反复用酶消化法与机械法去除成纤维细胞。

### 细胞活性分析

用 MTS 试剂盒评估槐耳浸膏对肿瘤细胞的活性影响。收集长势形态良好的处于对数生长期的原代大肠癌细胞（T1 与 T2），将  $2-5 \times 10^4$

的细胞接种于每孔含 100  $\mu$ l 培养基 96 孔板中,加入不同浓度的药物,培养 48 小时后,加入 10  $\mu$ l MTS 试剂,继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。酶标检测仪 490 nm 波长下检测 OD 值,计算各浓度药物作用后细胞的存活率。

### 细胞形态的观察

原代大肠癌细胞接种在 24 孔培养板中,每孔 10,000 个细胞,待其粘附生长,加入终浓度为 8mg/ml 槐耳浸膏共培养 48 小时后。观察细胞的形态,并在 Olympus 显微镜下拍照。

### 细胞球形成实验

原代大肠癌细胞培养在无血清 DMEM/F12 培养液内: DMEM/F12 培养液、100 unit/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素,2% (v/v) B27 添加剂 (50 $\times$ ), 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 4 mg/ml BSA, 4  $\mu$ g/ml 胰岛素。原代大肠癌细胞用胰酶消化成单细胞后,以较低密度接种于 96 孔低粘附件板内 (100~200 细胞/孔)。加药或不加药培养 10~14 天,显微镜下观察细胞球大小及数量。

### ALDEFLUOR 分析

ALDH 阳性肿瘤细胞中富含大肠癌 CSC。利用 Aldefluor 试剂盒检测肿瘤细胞的 ALDEFLUOR 活性。收集胰酶消化后的单细胞,与含有乙醛脱氢酶的底物试剂在 37 $^{\circ}$ C 下温育 40 分钟;在相同的条件下,一小部分细胞与乙醛脱氢酶抑制剂二乙基氨基温育作为阴性对照。然后上流式细胞仪检测细胞 ALDH 活性。

### Western blot 分析

大肠癌细胞用槐耳浸膏 (2, 4mg/ml) 处理 48 小时后, 收取细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液 [20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 1% NP-40, 5 mmol/l EDTA and 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (pH 7.5)]. 用抗  $\beta$ -catenin, 抗 cyclin D1 and 抗  $\beta$ -actin 抗体进行免疫印迹分析, 山羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗, 免疫反应条带用化学发光底物显色。

### **TOP / FOP 报告基因分析**

TOP/FOP flash 双报告系统用来评估  $\beta$ -catenin 诱导的 TCF/LEF 转录活性。TOP/FOP flash 质粒赠自朱永良博士 (浙江大学医学院)。细胞转染 TOP flash 质粒(10  $\mu$ g/100  $\mu$ l) 或 FOP flash 质粒 (10  $\mu$ g/100  $\mu$ l), 24 小时后, 加入不同浓度的槐耳, 继续培养 24 小时。PBS 洗涤细胞, 双荧光素酶报告基因检测系统测量荧光素酶活性。

### **统计分析**

统计学差异采用单因素方差分析。数据表示为三次独立的实验手段, P 值<0.05 被认为有统计学意义。

## **结果**

### **槐耳浸膏抑制大肠癌细胞的生长**

利用 MTS 法检测不同浓度槐耳浸膏对大肠癌细胞的细胞毒性。随着槐耳浓度的增加, 细胞的存活减少, 其 IC<sub>50</sub> 为约 8mg/ml( 图 1A)。结果表明槐耳具有抗大肠癌细胞增殖活性作用。

除了研究槐耳的抗增殖作用, 我们还探讨了槐耳对大肠癌细胞的形态学影响。作为对照的大肠癌细胞呈典型的上皮细胞形态( 图 1B)。

加入槐耳后，显著的改变了细胞形态。处理后的大肠癌细胞膜收缩，细胞变得不规则形或圆形，并伴有细胞数量减少。

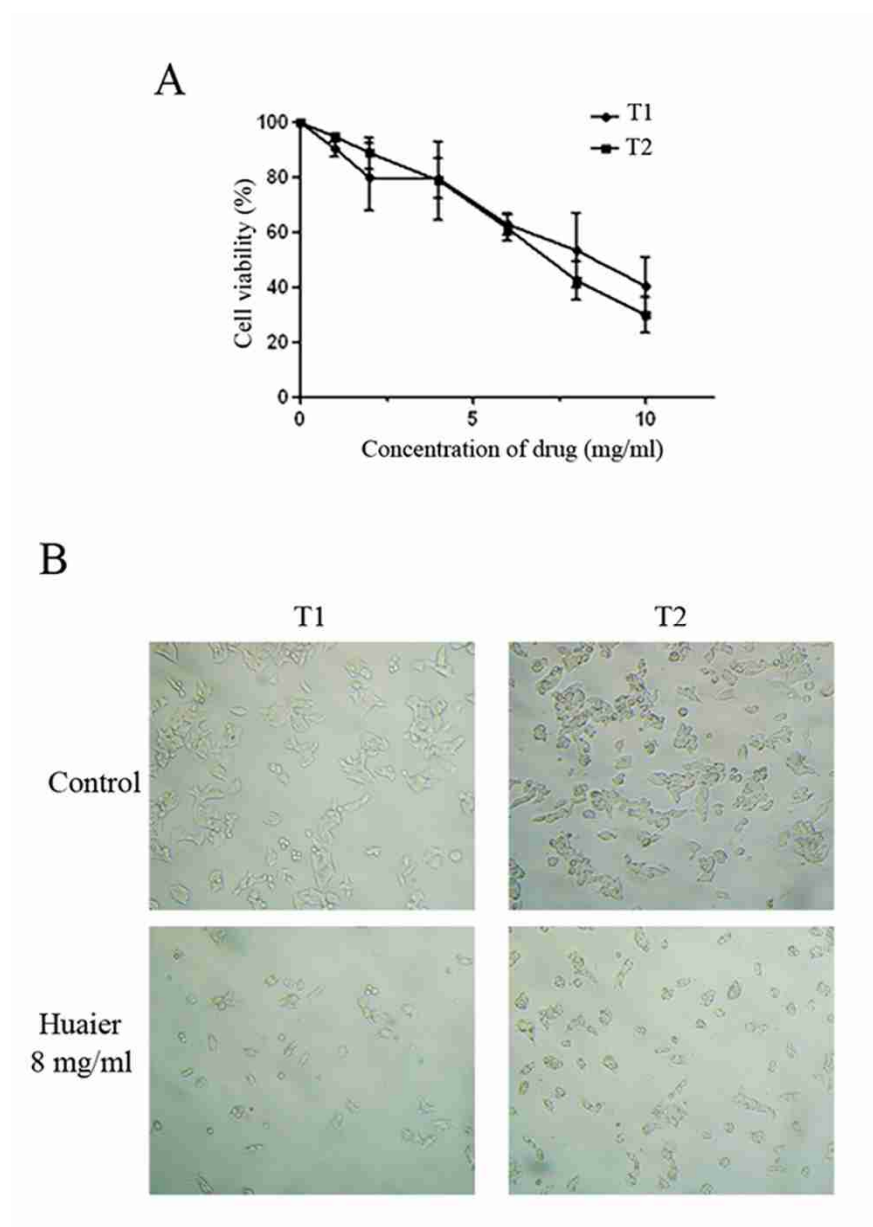


图 2. 槐耳浸膏抑制大肠癌细胞的活性。(A) 大肠癌细胞与不同浓度的槐耳共孵育 48 小时后的 MTS 结果；(B) 槐耳影响肿瘤细胞形态。

### 槐耳浸膏抑制细胞球的形成

为评估槐耳浸膏是否可以影响大肠癌细胞球的形成，原代大肠癌

细胞与不同浓度的槐耳浸膏在无血清条件培养基下共培养 14 天。结果表明，与那些未经处理比较，不仅肿瘤细胞球的数目显著下降，球的大小也显著的缩小 ( $P < 0.05$ )。值得注意的是，槐耳能够抑制细胞球形成的浓度是其 IC50 的-15 倍。

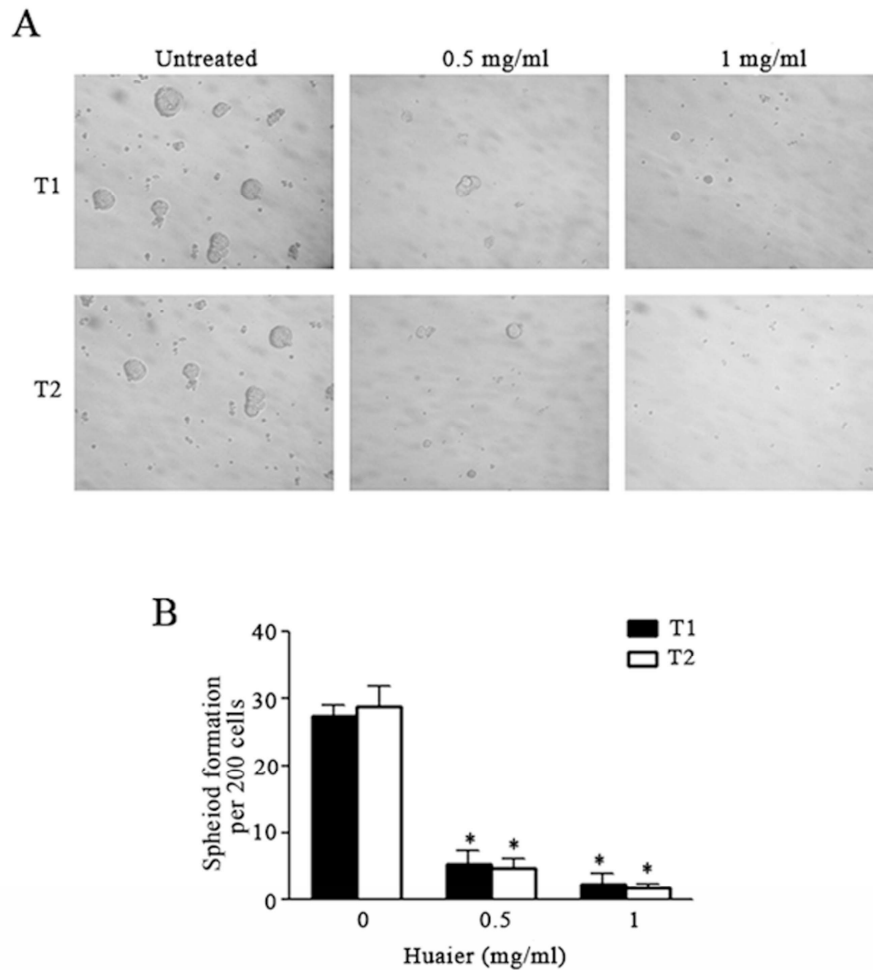


图 2. 槐耳浸膏抑制大肠癌细胞球的形成。(A) 大肠癌细胞与槐耳共孵育 14 天后，显微镜下观察大肠癌细胞球的大小；(B) 药物影响细胞球形成的定量研究

### 槐耳浸膏可有效地清除 ALDH 阳性细胞

ALDH 阳性细胞是 CSC 标志物之一，高表达 ALDH 活性被认为

CSC 的特征。为评估槐耳是否可以杀伤 CSC，我们加入不同浓度的槐耳与原代大肠癌细胞共培养 7 天。研究发现槐耳治疗组中 ALDH 阳性细胞比例较对照组显著降低（图 3）（ $P < 0.05$ ）。这一发现提供了一个事实，槐耳能够在体外有效的消灭肿瘤干细胞，而其浓度仅为 0.25-0.5mg/ml。此外，有证据显示，如奥沙利铂等常规治疗失败主要原因与化疗后 CSC 的富集密切相关。我们的研究结果表明，槐耳能够克服这些问题。

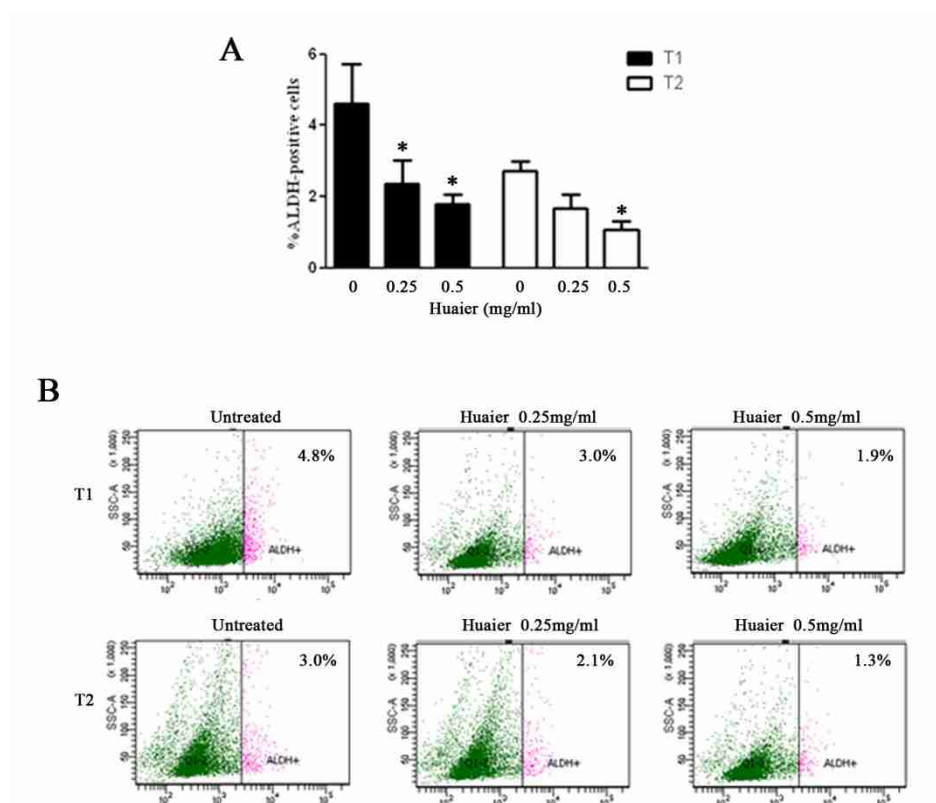


图 3. 槐耳浸膏减少 ALDH 阳性细胞比率。(A)ALDH 阳性细胞亚群在总肿瘤细胞中的比率。(B) 流式实验代表图。

### 槐耳浸膏下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号

通过  $\beta$ -catenin 激活 Wnt 信号通路，导致大量下游分子的磷酸化，



是 CSC 实现自我更新的一个关键途径， $\beta$ -catenin 在肿瘤细胞中组成性表达。图中显示大肠癌细胞对不同浓度的槐耳具有剂量依赖性，细胞内总  $\beta$ -catenin 表达下调，导致下游靶蛋白 cyclin D1 表达的下降(图 4A)。我们用 TOP/FOP flash 报告基因，进一步研究  $\beta$ -catenin 下调对下游分子的活性影响。通过 TCF/LEF 荧光素酶检测，观察到槐耳处理后大肠癌细胞 TOP 活性显著下降(图 4B) ( $P < 0.05$ )。总之，这些数据表明，槐耳下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号，进而可能影响 CSC 的自我更新。

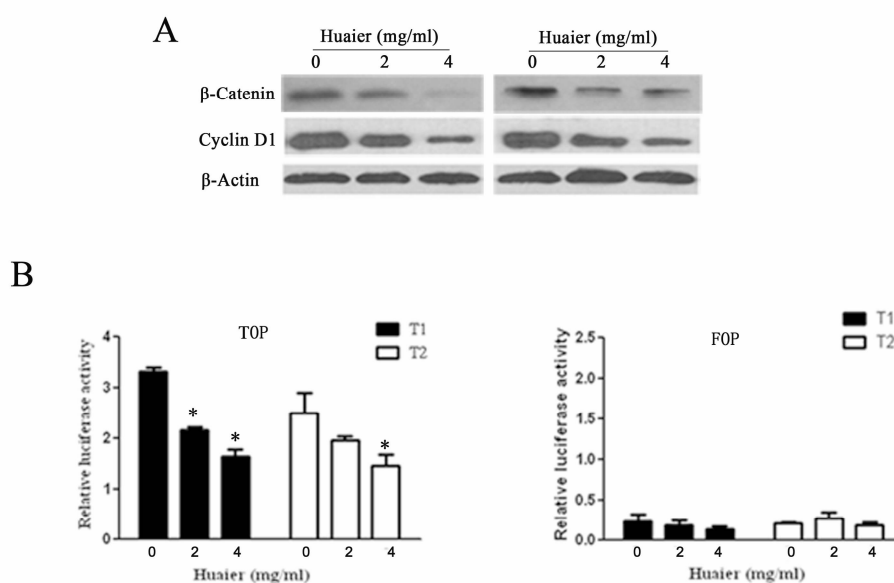


图 4. 槐耳浸膏下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号。(A) western blot 检测槐耳处理后大肠癌细胞  $\beta$ -catenin 和 cyclin D1 蛋白的表达。(B) 槐耳处理大肠癌细胞 24 小时后，TOP/FOP Flash 报告基因检测荧光素酶的活性，槐耳可减少 TOP 报告基因的表达。

## 讨论

槐耳浸膏，来自中国传统中药的药用真菌提取物，已被用于多种癌症的抗癌疗效的研究。比如，槐耳已发现可抑制乳腺癌细胞的增殖，诱导细胞凋亡。此外，槐耳还具有多种生物活性，如激活免疫系统，抗肿瘤转移，和逆转耐药，这些发现让研究者对槐耳治疗与预防肿瘤产生期望。其实，在中国，应用于原发性肝癌的治疗已多年 [25]。然而，其对大肠癌干细胞的影响及作用机制尚待研究。

在本课题中，我们观察到槐耳具有较强的抗大肠癌 CSC 作用。虽然目前还没有确切的标准定义 CSC，现在仍然有几种方法分离和鉴定大肠癌 CSC。方法之一是利用特定的 CSC 标志物如 ALDH1 [26; 27; 28]，ALDH1 是一种新的 CSC 标志物，特异性优于已经报道的 CD133 及 CD44 等标志物 [29]。研究表明肠道内的 ALDH 阳性细胞数目较少，位于粘膜隐窝底部。从正常上皮向肿瘤在转变过程中，ALDH 阳性细胞的数量增加，只要 25 个细胞就可在 NOD/SCID 鼠形成肿瘤。因此，我们采用 ALDH 标记肿瘤细胞，用来评估槐耳抑制 CSC 的能力。结果显示，槐耳可以有效的清除 ALDH 阳性细胞。另一种方法就是判断肿瘤细胞是否形成细胞球，大肠癌 CSC 能在无血清的特殊培养基下的低黏附板成球，而普通细胞则不能存活 [30; 31]。我们的结果显示，槐耳能够有效的抑制肿瘤细胞球形成。

我们研究表明，槐耳靶向抑制 Wnt / $\beta$ -catenin 通路，及  $\beta$ -catenin 表达降低，从而阐明了其抗癌机制。值得注意的是，在 48 小时内，在所有肿瘤细胞中  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 的水平下调，结果提示，槐耳可能通过 Wnt 信号通路抑制大肠癌，可作为癌症治疗的理想药物。

## 结论

在本研究中，我们清楚地表明，槐耳浸膏能够有效的抑制肿瘤细胞球形成和 ALDH 阳性细胞比率。其机制可能是下调 Wnt /  $\beta$  -catenin 信号自我更新途径有关。这项研究表明，槐耳对癌症治疗可能是非常有益。

## 参考文献

- [1] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (2001) 105-111.
- [2] P. Dalerba, R.W. Cho, M.F. Clarke, Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58 (2007) 267-284.
- [3] L. Ricci-Vitiani, D.G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, R. De Maria, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445 (2007) 111-115.
- [4] M.J. Smalley, T.C. Dale, Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18 (1999) 215-230.
- [5] G. Dontu, K.W. Jackson, E. McNicholas, M.J. Kawamura, W.M. Abdallah, M.S. Wicha, Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 6 (2004) R605-615.
- [6] S. Liu, G. Dontu, I.D. Mantle, S. Patel, N.S. Ahn, K.W. Jackson, P.

Suri, M.S. Wicha, Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66 (2006) 6063-6071.

[7] D. Bose, L.J. Zimmerman, M. Pierobon, E. Petricoin, F. Tozzi, A. Parikh, F. Fan, N. Dallas, L. Xia, P. Gaur, S. Samuel, D.C. Liebler, L.M. Ellis, Chemoresistant colorectal cancer cells and cancer stem cells mediate growth and survival of bystander cells. *Br J Cancer* 105 (2011) 1759-1767.

[8] C.E. Eyler, J.N. Rich, Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26 (2008) 2839-2845.

[9] J.N. Rich, S. Bao, Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 1 (2007) 353-355.

[10] K. Wang, L. Liu, T. Zhang, Y.L. Zhu, F. Qiu, X.G. Wu, X.L. Wang, F.Q. Hu, Jian Huang, Oxaliplatin-incorporating micelles eliminate both cancer stem-like and bulk cell populations in colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine* 6 (December 2011 ) 1–12.

[11] Y. Li, T. Zhang, H. Korkaya, S. Liu, H.F. Lee, B. Newman, Y. Yu, S.G. Clouthier, S.J. Schwartz, M.S. Wicha, D. Sun, Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 16 (2010) 2580-2590.

[12] Y. Yu, S.S. Kanwar, B.B. Patel, J. Nautiyal, F.H. Sarkar, A.P.

- Majumdar, Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* 2 (2009) 321-328.
- [13] Y. Li, M.S. Wicha, S.J. Schwartz, D. Sun, Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem* 22 (2011) 799-806.
- [14] L.X. Li, Y.H. Wang., Progress on Experimental Research and Clinical Application of Trametes Robiniophila. *Bulletin of Chinese Cancer* 16 (2007) 110-113.
- [15] N. Zhang, X. Kong, S. Yan, C. Yuan, Q. Yang, Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis. *Cancer Sci* 101 (2010) 2375-2383.
- [16] C.P. Guo Y, Chen Y, Isolation and analysis of the polysaccharide of Huaier mycelium. *Chin J Biochem Pharm* (1993) 56–59.
- [17] J. Ren, C. Zheng, G. Feng, H. Liang, X. Xia, J. Fang, X. Duan, H. Zhao, Inhibitory effect of extract of fungi of Huaier on hepatocellular carcinoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 29 (2009) 198-201.
- [18] X. Xu, Q. Wei, K. Wang, Q. Ling, H. Xie, L. Zhou, S. Zheng, Anticancer Effects of Huaier are Associated with Down-Regulation of P53. *Asian Pac J Cancer Prev* 12 (2011) 2251-2254.
- [19] H. Clevers, Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127 (2006) 469-480.

- [20] G. Dontu, W.M. Abdallah, J.M. Foley, K.W. Jackson, M.F. Clarke, M.J. Kawamura, M.S. Wicha, In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17 (2003) 1253-1270.
- [21] S.Y. Lin, W. Xia, J.C. Wang, K.Y. Kwong, B. Spohn, Y. Wen, R.G. Pestell, M.C. Hung, Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 4262-4266.
- [22] F. Takahashi-Yanaga, T. Sasaguri, GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy. *Cell Signal* 20 (2008) 581-589.
- [23] M. Dean, T. Fojo, S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 275-284.
- [24] A. Nicolini, P. Ferrari, M. Fini, V. Borsari, P. Fallahi, A. Antonelli, P. Berti, A. Carpi, P. Miccoli, Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 12 (2011) 196-205.
- [25] L.Y. Wei Huang, Hong Wu, Jiayin Yang, Wentao Wang, Mingqing XU., Retrospective Cohort Study on Clinical Value of Huaier Granule in Postoperative Patients with Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Chinese Journal of Bases and Clinics In General Surgery* 17 (2010).

[26] Y. Chen, D.J. Orlicky, A. Matsumoto, S. Singh, D.C. Thompson, V. Vasiliou, Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 405 (2011) 173-179.

[27] T. Vogler, L. Kriegl, D. Horst, J. Engel, S. Sagebiel, A.J. Schaffauer, T. Kirchner, A. Jung, The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. *Exp Mol Pathol* 92 (2012) 111-117.

[28] C. Ginestier, M.H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C.G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M.S. Wicha, G. Dontu, ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1 (2007) 555-567.

[29] E.H. Huang, M.J. Hynes, T. Zhang, C. Ginestier, G. Dontu, H. Appelman, J.Z. Fields, M.S. Wicha, B.M. Boman, Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69 (2009) 3382-3389.

[30] P. Cammareri, Y. Lombardo, M.G. Francipane, S. Bonventre, M. Todaro, G. Stassi, Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol* 86 (2008) 311-324.

[31] X. Fan, N. Ouyang, H. Teng, H. Yao, Isolation and characterization

of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis* 26 (2011) 1279-1285.