

# 黄精多糖调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对膀胱癌 UMUC3 细胞转移活性的影响

吕 艳<sup>1</sup>, 何 露<sup>1</sup>, 伍 庄<sup>1</sup>, 焉正庆<sup>2\*</sup>

(1. 华润武钢总医院泌尿外科, 湖北 武汉 430080; 2. 武汉理工大学医院外科, 湖北 武汉 430061)

**摘要:** **目的** 探究黄精多糖调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对膀胱癌 UMUC3 细胞转移能力的影响。**方法** 将膀胱癌 UMUC3 细胞随机分为对照组、黄精多糖组 (10  $\mu$ g/mL) 和抑制剂组 (KYA1797K, 5  $\mu$ mol/L)。通过蛋白免疫印迹实验分析 UMUC3 细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达; MTT 实验和细胞集落形成实验分析 UMUC3 细胞增殖能力; Transwell 实验分析 UMUC3 细胞侵袭能力; 细胞划痕实验分析 UMUC3 细胞迁移率; 流式细胞术检测 UMUC3 细胞凋亡率。**结果** 黄精多糖或抑制剂均可抑制膀胱癌 UMUC3 细胞的增殖和侵袭能力 ( $P < 0.05$ ), 降低细胞迁移率 ( $P < 0.05$ ), 促进膀胱癌 UMUC3 细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活 ( $P < 0.05$ )。**结论** 黄精多糖能够减弱膀胱癌 UMUC3 细胞的增殖、迁移以及侵袭能力, 并能促进膀胱癌 UMUC3 细胞凋亡, 其作用可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化有关。

**关键词:** 黄精多糖; 膀胱癌; UMUC3 细胞; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 增殖; 迁移; 凋亡; 侵袭

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)09-3137-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.049

膀胱癌是最常见的泌尿道恶性肿瘤,也是全球常见的癌症之一<sup>[1-2]</sup>。虽然多年来膀胱癌的临床诊疗方法基本没有变化,但随着膀胱癌进展机制的深入研究,多种相关分子信号已被发现<sup>[3-4]</sup>。其中,整合位点家族成员/ $\beta$  连环蛋白 (Wnt/ $\beta$ -catenin) 通路和膀胱癌进展的关系已成为研究热点<sup>[5-6]</sup>,以 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路为靶点的药物也在开发当中。中医药被认为是重要的治疗手段。黄精作为一种天然植物,含有多种成分,包括多糖、甾体、萜醌、生物碱、强心苷、木质素、维生素、各种酸等,具有多种生物功能<sup>[7]</sup>。其中,多糖类成分发挥重要药理作用<sup>[8-9]</sup>。现代药理学研究表明,黄精多糖具有许多生物活性,如抗氧化活性、抗衰老活性、抗疲劳作用、增强免疫作用、抗菌作用、抗炎作用、降血脂和抗动脉粥样硬化作用、抗骨质疏松作用、保肝作用、治疗糖尿病以及抗癌作用<sup>[10]</sup>。然而黄精多糖对膀胱癌的作用尚不明确。因此,本研究通过分析黄精多糖对膀胱癌 UMUC3 细胞增殖、转移的影响,以期对膀胱癌的治疗提供参考。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人膀胱癌细胞系 UMUC3 细胞,购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

**1.2 试剂** 黄精多糖 (纯度>80.0%,批号 JKB1109,上海经科化学科技有限公司)。Wnt3 $\alpha$  抗体 (批号 K27023-

NID,北京百奥莱博科技有限公司);  $\beta$ -catenin 抗体 (批号 2698S,美国 CST 公司); GAPDH 抗体 (批号 60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司); 胎牛血清 (批号 AU0600,上海中乔新舟生物科技有限公司); Wnt/ $\beta$ -catenin 通路阻断剂 KYA1797K (批号 HY-101090,美国 MCE 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 CA1020,北京索莱宝科技有限公司); 结晶紫染色试剂 (批号 TQMC0121,上海碧云天生物技术有限公司)。

**1.3 仪器** TMR-100 型全自动酶标仪 (上海净信实业发展有限公司); XB220A 型电子天平 (美国普利赛斯公司); Gel-View 5000Plus 型智能凝胶成像系统 (广州博鹭腾生物科技有限公司); MF53-N 型荧光显微镜 (广州明美电子有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养、分组及给药** 膀胱癌 UMUC3 细胞在含 10% 胎牛血清的培养基中培养,培养环境温度 (37  $\pm$  0.5)  $^{\circ}$ C、相对湿度 (55  $\pm$  1%)、5% ~ 8% CO<sub>2</sub>。当 UMUC3 细胞生长至对数生长期时,通过胰酶消化,将细胞分为对照组、黄精多糖组和抑制剂组。UMUC3 细胞培养 24 h 后,黄精多糖组细胞使用 10  $\mu$ g/mL 黄精多糖处理,抑制剂组细胞使用 5  $\mu$ mol/L 抑制剂处理,对照组细胞不作处理,各组处理 24 h 后进行后续检测。

**收稿日期:** 2024-06-12

**基金项目:** 2022 年湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (B2022111)

**作者简介:** 吕 艳 (1979—),女,硕士,副主任医师,从事泌尿系结石、肿瘤及尿控研究。Tel: 13971344233, E-mail: justdoityzq123@163.com

**\* 通信作者:** 焉正庆 (1979—),男,主治医师,从事外科基础与临床研究。Tel: 18071419982, E-mail: Yanzhengqing99@163.com

2.2 MTT 实验和细胞集落实验分析 UMUC3 细胞增殖能力

2.2.1 MTT 实验 取对数生长期 UMUC3 细胞，以每孔  $2.0\times10^3$  个的密度接种到 96 孔板中，按“2.1”项下方法处理，分别于培养 12、24、36 h 后每孔加入 10  $\mu$ L MTT 溶液，在 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  环境下继续孵育 3 h，用酶标仪记录 450 nm 波长处光密度 (OD) 值。

2.2.2 细胞集落形成实验 按“2.1”项下方法处理细胞，每组细胞收集 200 个转移至含软琼脂培养基的培养皿中培养 2 周，随后使用 0.1% 结晶紫染色 30 min，于显微镜下观察 UMUC3 细胞的集落数量。

2.3 Transwell 实验分析 UMUC3 细胞侵袭能力 按“2.1”项下方法处理细胞，收集细胞悬浮于无血清培养基中 ( $3.0\times10^5/\text{mL}$ )，接种于上室。将含 10% 胎牛血清的培养基加入基底外侧小室中，于 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h。将 Transwell 培养物用无菌磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，甲醇固定 30 min，然后在室温下用 0.1% 结晶紫染色 30 min，于显微镜下观察细胞侵袭数量。

2.4 细胞划痕实验分析 UMUC3 细胞迁移能力 按“2.1”项下方法处理细胞，用 200  $\mu$ L 规格的移液枪头垂直培养皿底部，在培养皿底部正中间位置划痕，尽可能保证培养皿每孔细胞的划痕笔直、宽度一致，划痕完成后，使用磷酸盐缓冲液漂洗 UMUC3 细胞 3 次以除去漂浮的细胞，更换含胎牛血清的培养基，此时在显微镜下记录划痕宽度，并将其记为 0 h 的结果。24 h 后再次于显微镜下记录各实验组细胞划痕的宽度。

2.5 流式细胞术实验检测 UMUC3 细胞凋亡率 按“2.1”项下方法处理细胞，用磷酸盐缓冲液洗涤 UMUC3 细胞，并调整密度至  $1.0\times10^6/\text{mL}$ 。将 UMUC3 细胞悬浮于 150  $\mu$ L 缓冲液中，用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  膜联蛋白 V 异硫氰酸荧光素和 5  $\mu\text{L}$  碘化丙锭于 4  $^{\circ}$ C 下避光染色 20 min，用流式细胞仪分析 UMUC3 细胞凋亡情况。

2.6 蛋白免疫印迹法检测 UMUC3 细胞 Wnt3 $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin 蛋白表达 按“2.1”项下方法处理细胞，收集各组细胞，使用考马斯亮蓝进行蛋白定量。通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白 (30  $\mu\text{g}$ ) 并转移到硝酸纤维素膜，用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h，以防止抗体的非特异性结合，加入一抗于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日洗膜后加二抗孵育，通过化学发光法显影。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析，事后检验采用 Tukey 法。  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄精多糖对 UMUC3 细胞增殖活性的影响 如图 1、表 1 所示，与对照组比较，黄精多糖组和抑制剂组 UMUC3 细胞增殖能力降低 ( $P<0.05$ )。

3.2 黄精多糖对 UMUC3 细胞侵袭能力的影响 如图 2、表 2 所示，与对照组比较，黄精多糖组和抑制剂组 UMUC3 细胞侵袭能力降低 ( $P<0.05$ )。

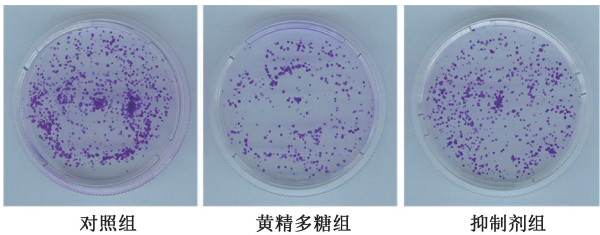


图 1 黄精多糖对 UMUC3 细胞集落形成的影响

表 1 黄精多糖对 UMUC3 细胞生长的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别    | OD 值 (490 nm)   |                 |                   | 集落形成<br>数量/个     |
|-------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|
|       | 12 h            | 24 h            | 36 h              |                  |
| 对照组   | 0.51 $\pm$ 0.03 | 0.85 $\pm$ 0.05 | 1.77 $\pm$ 0.02   | 35.27 $\pm$ 3.22 |
| 黄精多糖组 | 0.46 $\pm$ 0.02 | 0.63 $\pm$ 0.07 | 0.82 $\pm$ 0.03 * | 15.31 $\pm$ 2.06 |
| 抑制剂组  | 0.49 $\pm$ 0.06 | 0.72 $\pm$ 0.05 | 1.03 $\pm$ 0.03 * | 13.07 $\pm$ 1.82 |

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

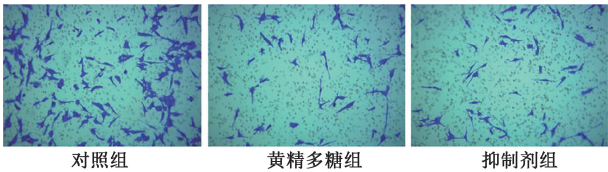


图 2 黄精多糖对 UMUC3 细胞侵袭的影响 ( $\times 400$ )

表 2 黄精多糖对 UMUC3 细胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别    | 侵袭数量/个             |
|-------|--------------------|
| 对照组   | 82.29 $\pm$ 5.39   |
| 黄精多糖组 | 39.22 $\pm$ 2.68 * |
| 抑制剂组  | 35.23 $\pm$ 5.63 * |

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

3.3 黄精多糖对 UMUC3 细胞迁移能力的影响 如图 3、表 3 所示，与对照组比较，黄精多糖组和抑制剂组 UMUC3 细胞迁移能力降低 ( $P<0.05$ )。

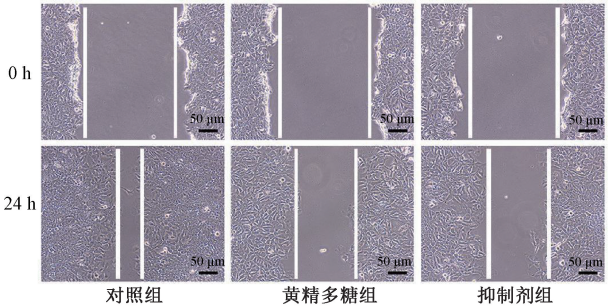


图 3 黄精多糖对 UMUC3 细胞迁移的影响 ( $\times 200$ )

表 3 黄精多糖对 UMUC3 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别    | 迁移率/%             |
|-------|-------------------|
| 对照组   | 12.61 $\pm$ 0.98  |
| 黄精多糖组 | 5.38 $\pm$ 0.52 * |
| 抑制剂组  | 5.02 $\pm$ 0.63 * |

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

3.4 黄精多糖对 UMUC3 细胞凋亡率的影响 如图 4、表 4 所示，与对照组比较，黄精多糖组和抑制剂组 UMUC3 细胞凋亡率升高 ( $P<0.05$ )。

3.5 黄精多糖对 UMUC3 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响 如图 5、表 5 所示，与对照组比较，黄精多糖组和抑制剂组 UMUC3 细胞 Wnt3 $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )。

表 4 黄精多糖对 UMUC3 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别    | 凋亡率/%             |
|-------|-------------------|
| 对照组   | 2.50 $\pm$ 0.08   |
| 黄精多糖组 | 8.33 $\pm$ 0.05 * |
| 抑制剂组  | 7.99 $\pm$ 0.11 * |

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

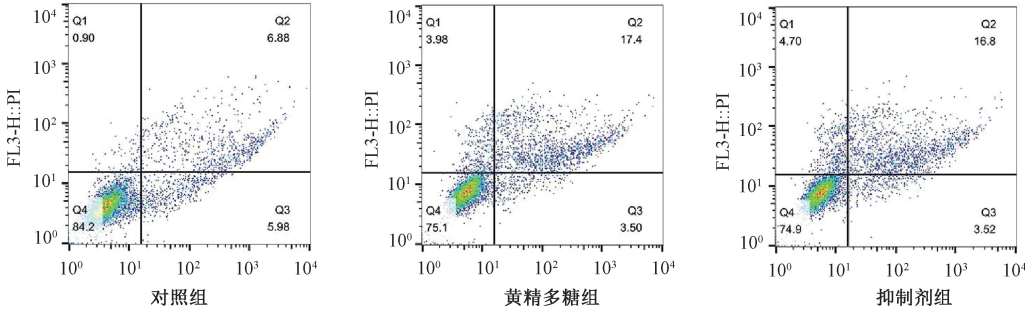


图 4 黄精多糖对 UMUC3 细胞凋亡的影响

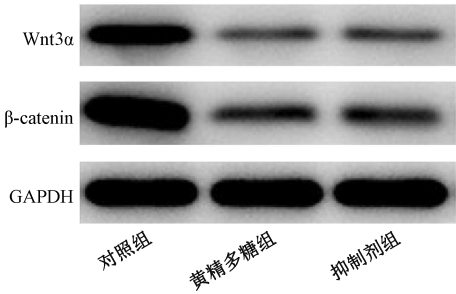


图 5 各组细胞 Wnt、 $\beta$ -cateni 蛋白条带图

表 5 黄精多糖对 UMUC3 细胞 Wnt、 $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别    | Wnt3 $\alpha$     | $\beta$ -catenin  |
|-------|-------------------|-------------------|
| 对照组   | 0.91 $\pm$ 0.05   | 0.79 $\pm$ 0.09   |
| 黄精多糖组 | 0.51 $\pm$ 0.03 * | 0.39 $\pm$ 0.08 * |
| 抑制剂组  | 0.55 $\pm$ 0.06 * | 0.40 $\pm$ 0.06 * |

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

4 讨论

近年来，Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路广泛涉及人类癌症和动物实验癌症模型<sup>[11]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的异常激活与患病率的增加、恶性进展、不良预后的发展，甚至癌症相关死亡率的上升密切相关<sup>[12-13]</sup>。早期的实验研究提出，有效抑制这一信号传导可能为治疗各种类型的癌症提供有前景的治疗选择<sup>[14]</sup>。迄今为止，许多针对癌症中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的治疗方法已经开发出来，这将为临床开发更满意和精确的治疗方法提供新的机会<sup>[15-16]</sup>。本研究采用 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂处理膀胱癌 UMUC3 细胞后发现，细胞的增殖、侵袭和迁移能力下降，同时凋亡率增加。上述结果提示，与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在其他肿瘤中的情况类似，Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路能够参与膀胱癌 UMUC3 细胞的转移。

目前，国内外关于黄精多糖的抗癌作用已有报道，例

如，黄精多糖不仅能抑制肝细胞癌移植瘤的生长，使癌细胞停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期，增加 caspase 3、8、9 的表达，这一作用与调节 Toll 样受体 4/非经典核因子- $\kappa$ B 通路相关<sup>[17]</sup>。在乳腺癌模型小鼠体内，相关研究表明黄精多糖虽然对肿瘤的体积变化方面没有改变作用，但是能够使三阴性乳腺癌小鼠体内的骨髓造血干祖细胞和常见淋巴样祖细胞比例增加，并减少肿瘤浸润免疫细胞中髓系细胞比例，提示黄精多糖能够通过维持造血和淋巴再生来辅助三阴性乳腺癌治疗，具有持久的抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。目前，国内外尚未开展过黄精多糖对膀胱癌的系统性研究。本研究发现，黄精多糖能够降低膀胱癌 UMUC3 细胞增殖、侵袭、迁移能力，并能促进膀胱癌 UMUC3 细胞凋亡。这一结果与黄精多糖对其他肿瘤细胞的抑制作用相似，然而目前已有的研究结果中，少有报道黄精多糖对癌细胞侵袭和迁移的影响。转移与侵袭能力是癌细胞向其他组织转移活性的体现，本研究结果提示黄精多糖对膀胱癌细胞转移具有抑制作用。本研究结果还显示，黄精多糖能够下调 Wnt3 $\alpha$  和  $\beta$ -catenin 蛋白表达。由于既往研究与本研究结果均显示 Wnt/ $\beta$ -catenin 对膀胱癌进展的作用具有促进作用<sup>[5-6]</sup>，由此推测，通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化可能是黄精多糖对膀胱癌 UMUC3 细胞生长抑制作用的关键所在。此外，黄精多糖对 Wnt 通路的调节作用已有报道，例如，黄精多糖通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路起到改善大鼠心肌梗死的作用<sup>[19-20]</sup>。这些结论进一步证实了黄精多糖对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控作用。

综上所述，黄精多糖能够有效抑制膀胱癌 UMUC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，并能够促进膀胱癌 UMUC3 细胞凋亡，其作用可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化相关。

参考文献：

[ 1 ] 王 磊,于汝通,孙国良,等. 非肌层浸润性膀胱癌组织

Ki-67、p53 和 CK-20 表达变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2023, 63(13): 74-76.

[ 2 ] 朱 瑞, 冯岳龙, 杨淑萍, 等. 膀胱癌术后复发危险因素分析及模型构建[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(5): 845-849.

[ 3 ] 孟 倩, 张 曼. 膜联蛋白 A2 质粒的构建及其在膀胱癌 pumc-91 细胞增殖和迁移中的作用[J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2023, 44(4): 511-517.

[ 4 ] 向玲宝, 朱 奕, 左 玲, 等. 五味子乙素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制膀胱癌增殖、迁移和侵袭[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(8): 568-574; 580.

[ 5 ] 肖 萍, 吴少华, 王新胜, 等. CYFIP2 过表达对膀胱癌 T24 细胞的生物学功能和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响[J]. 国际生物医学工程杂志, 2023, 46(2): 116-121.

[ 6 ] 夏伦斌, 乔德亮, 毕少帅. 黄精多糖提取技术工艺的研究进展[J]. 山东化工, 2023, 52(6): 58-60.

[ 7 ] 罗 婷, 罗 丹, 甘 露. 黄精多糖的现代药理作用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2023, 16(2): 177-180.

[ 8 ] 陆紫楠, 金晨钟, 胡一鸿, 等. 黄精多糖药食同源作用及其研究进展[J]. 现代食品, 2023, 29(4): 72-74.

[ 9 ] 田 磊, 柳春燕, 韩 军, 等. 黄精多糖结构特征及其生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(3): 519-530.

[10] Liu J, Xiao Q, Xiao J, *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.

[11] Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(6): 863-877.

[12] Zhao H, Ming T, Tang S, *et al.* Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144.

[13] Yu F, Yu C, Li F, *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 307.

[14] Rim E Y, Clevers H, Nusse R. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators[J]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 571-598.

[15] 岑红霞, 蔡思铭, 姜虹羽, 等. miR-1294 靶向 SOX15 调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进小儿急性淋巴细胞白血病细胞增殖的机制研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2023, 31(2): 344-351.

[16] 周婉桢, 滕银成. 非经典 Wnt 通路在卵巢癌中的作用与潜在治疗意义研究进展[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2023, 43(8): 1056-1063.

[17] Xu Y, Guo Y, Lu C, *et al.* *Polygonatum sibiricum* polysaccharide inhibited liver cancer in a simulated tumor microenvironment by eliminating TLR4/STAT3 pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(9): 1249-1259.

[18] Xie Y, Jiang Z, Yang R, *et al.* Polysaccharide-rich extract from *Polygonatum sibiricum* protects hematopoiesis in bone marrow suppressed by triple negative breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111338.

[19] 安 晏, 李雨松, 颜晓静. 黄精多糖对急性心肌梗死模型大鼠心肌损伤的改善作用[J]. 中国药房, 2021, 32(13): 1572-1577.

[20] 李 丽, 龙子江, 高华武, 等. 黄精多糖对急性心肌梗死模型大鼠炎症及氧化应激反应的影响[J]. 实验动物科学, 2016, 33(5): 33-38.