

姜黄素对葡萄膜黑色素瘤细胞恶性生物学行为及 Wnt/ β -catenin 通路的抑制作用

盛小红 王利明 赵鑫 辛向阳

内蒙古包头医院眼科, 包头 014010

通信作者: 辛向阳, Email: zqsdtzxx@163.com

【摘要】 目的 探究姜黄素对葡萄膜黑色素瘤(UM)恶性生物学行为的抑制作用及机制。方法 应用含不同浓度(0、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素培养液培养 M23 细胞 48 h,于倒置显微镜下观察细胞形态学改变;采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测细胞存活率;分别采用平板克隆形成实验、流式细胞术、细胞划痕实验及 Transwell 实验检测 M23 细胞集落形成、凋亡、迁移及侵袭情况;采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 Wnt/ β -catenin 通路相关基因 *c-Myc*、细胞周期蛋白 D1(*Cyclin D1*)、*Survivin* 及基质金属蛋白酶 9(*MMP-9*) mRNA 相对表达情况;采用 Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 *c-Myc*、*Cyclin D1*、*Survivin*、*MMP-9*、 β -连环蛋白(β -catenin)、糖原合成酶激酶 3 β (*GSK-3 β*)、磷酸化 GSK-3 β (*p-GSK-3 β*)及轴抑制蛋白 2(*Axin2*)蛋白相对表达量。另取 20 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,左后腹皮下脂肪垫注射 M23 细胞悬浮液建立小鼠 M23 体内移植肿瘤模型,将造模成功小鼠按照随机数字表法随机平均分为模型组、姜黄素低剂量组、姜黄素中剂量组和姜黄素高剂量组,每组 5 只,分别腹腔内注射 0、10、20 和 40 mg/kg 姜黄素生理盐水溶液,连续注射 30 d 后剥离皮下瘤体并称质量。结果 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组和 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞存活率分别为(100.00 \pm 0.00)%、(83.78 \pm 4.59)%、(66.09 \pm 3.92)%和(47.16 \pm 3.63)%,细胞集落形成数分别为 128.67 \pm 9.18、100.33 \pm 8.73、58.67 \pm 6.55 和 31.67 \pm 4.92,细胞凋亡率分别为(1.33 \pm 0.29)%、(14.53 \pm 2.04)%、(27.23 \pm 3.56)%和(44.73 \pm 4.36)%,细胞迁移率分别为(89.76 \pm 4.57)%、(65.43 \pm 3.70)%、(34.83 \pm 2.19)%和(18.82 \pm 1.99)%,细胞侵袭数分别为 148.33 \pm 8.18、125.33 \pm 7.41、73.67 \pm 6.34、45.67 \pm 5.31,各组 M23 细胞存活率、集落形成数、细胞凋亡率、细胞迁移率、细胞侵袭数总体比较差异均有统计学意义($F=125.321$ 、 97.941 、 72.516 、 277.097 、 139.006 ,均 $P<0.001$)。随姜黄素作用浓度的增大,细胞存活率、集落形成数、细胞迁移率、细胞侵袭数均明显降低,细胞凋亡率均明显增加,组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。随姜黄素浓度的增大,细胞中 *c-Myc*、*Cyclin D1*、*Survivin* 和 *MMP-9* mRNA 和蛋白及 β -catenin 和 *p-GSK-3 β* 蛋白相对表达水平均明显降低,*Axin2* 蛋白相对表达水平明显升高,组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。小鼠荷瘤质量随姜黄素作用剂量的增加而降低,组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 姜黄素可抑制 UM 细胞 M23 增生、迁移、侵袭等恶性生物学行为,抑制肿瘤生长,促进细胞凋亡,其作用机制可能与阻断 Wnt/ β -catenin 通路激活有关。

【关键词】 姜黄素; 葡萄膜黑色素瘤; 生物学行为; Wnt/ β -catenin 通路

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2020MS08094)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220419-00170

Inhibitory effect of curcumin on malignant biological behavior and Wnt/ β -catenin pathway of uveal melanoma cells

Sheng Xiaohong, Wang Liming, Zhao Xin, Xin Xiangyang

Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Baotou Steel Hospital, Baotou 014010, China

Corresponding author: Xin Xiangyang, Email: zqsdtzxx@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the inhibitory effect of curcumin on the malignant biological behavior of uveal melanoma (UM) and its possible mechanism. **Methods** M23 cells were cultured in curcumin medium with different concentrations (0, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours, respectively. The morphological changes of cells were observed under an inverted microscope. The cell survival rate was detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) method. The apoptosis, colony formation, migration and invasion of cells were detected by flow cytometry, plate clone formation experiment, cell scratch experiment and Transwell assay, respectively. The relative expressions of genes

related to Wnt/ β -catenin pathway, *c-Myc*, *Cyclin D1*, *Survivin* and matrix metallo proteinase 9 (MMP-9) mRNA in cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The relative expressions of proteins related to Wnt/ β -catenin pathway, *c-Myc*, *Cyclin D1*, *Survivin*, MMP-9 and β -catenin, glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β) and axis inhibition protein 2 (Axin2) proteins were detected by Western blot. Another 20 female BALB/c mice were selected and injected with M23 cell suspension under the subcutaneous fat pad in the left posterior abdomen to establish the *in vivo* M23 transplanted tumor model. The mice successfully modeled were randomly divided into model group, low-dose curcumin group, medium-dose curcumin group and high-dose curcumin group according to the random number table method, which was intraperitoneally injected with 0, 10, 20 and 40 mg/kg curcumin physiological saline solution respectively. After a continuous injection for 30 days, the subcutaneous tumor was stripped and weighed. The animal experiment process followed the 3Rs principle of animal research and was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Inner Mongolia Baotou Steel Hospital (No. 2021MER-023).

Results The cell survival rate, the number of colony formation, the apoptosis rate, the cell invasion rate and the cell migration rate were (100.00 \pm 0.00)%, 128.67 \pm 9.18, (1.33 \pm 0.29)%, (89.76 \pm 4.57)% and 148.33 \pm 8.18 in 0 μ mol/L curcumin group, (83.78 \pm 4.59)%, 100.33 \pm 8.73, (14.53 \pm 2.04)%, (65.43 \pm 3.70)% and 125.33 \pm 7.41 in 10 μ mol/L curcumin group, (66.09 \pm 3.92)%, 58.67 \pm 6.55, (27.23 \pm 3.56)%, (34.83 \pm 2.19)% and 73.67 \pm 6.34 in 20 μ mol/L curcumin group, and (47.16 \pm 3.63)%, 31.67 \pm 4.92, (44.73 \pm 4.36)%, (18.82 \pm 1.99)% and 45.67 \pm 5.31 in 40 μ mol/L curcumin group. There were statistically significant differences in the survival rate, colony formation number, cell apoptosis rate, migration rate and invasion rate of M23 cells among the four groups ($F=125.321, 97.941, 72.516, 277.097, 139.006$; all at $P<0.001$). With the increase of curcumin concentration, the cell survival rate, colony formation number, cell migration rate and cell invasion number decreased obviously, and the cell apoptosis rate increased obviously, and the pairwise comparisons showed significant differences (all at $P<0.05$). With the increase of curcumin concentration, the relative expression levels of *c-Myc*, *Cyclin D1*, *Survivin*, MMP-9 mRNA and proteins, β -catenin and p-GSK-3 β proteins decreased significantly, while the relative expression level of Axin2 protein increased significantly, showing significant differences in pairwise comparisons (all at $P<0.05$). The tumor tissue weight of mice decreased with the increase of curcumin dosage, and the pairwise comparisons were statistically significant (all at $P<0.05$).

Conclusions Curcumin can inhibit the proliferation, migration, invasion and other malignant biological behaviors of UM M23 cells, inhibit tumor growth and promote cell apoptosis. Its mechanism may be related to blocking the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

[Key words] Curcumin; Uveal melanoma; Biological behavior; Wnt/ β -catenin pathway

Fund program: Natural Science Fund Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2020MS08094)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220419-00170

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成人常见的原发性眼内肿瘤, 起源于脉络膜、睫状体或虹膜内的黑色素细胞^[1]。目前, 针对该肿瘤的临床一线治疗方法包括手术切除、放射治疗和眼球摘除; 然而, 高达 50% 的 UM 会发生转移, 1 年生存率仅为 15%^[2-3]。因此, 积极探索 UM 潜在转移机制并开发有效方法对于提高患者生存率至关重要。Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 通路是调节胚胎发育和细胞干性的关键级联反应之一^[4]; 其在肿瘤增生和发展中发挥关键作用, 在结肠癌、乳腺癌等多种癌症中均已证实被激活^[5-6]。对不同病理类型的 UM 进行微小 RNA 差异表达谱分析发现, 差异微小 RNA 靶基因广泛参与 Wnt 通路, 且该通路参与了肿瘤的生长与转移^[7]。阻断 Wnt/ β -catenin 通路可抑制 UM 细胞的生长、迁移和侵袭等恶性表型^[8]。以上研究结果提示, Wnt/ β -catenin 通路可能是干预 UM 转移及发展的有效分子机制靶点。姜黄

素是一种从姜黄的根茎中提取的天然活性酚类化合物。研究发现, 其可抑制黑色素瘤肺转移^[9], 还可通过线粒体途径诱导人 UM 细胞死亡^[10], 提示姜黄素对 UM 可能具有一定治疗潜力。M23 细胞是实验研究中常用的人 UM 细胞系、细胞株之一, 本研究拟探讨姜黄素对体外培养 M23 细胞增生、凋亡、迁移及侵袭等生物学行为的作用及 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响, 以为 UM 的预防转移、治疗及预后提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及实验动物 人 UM 细胞系 M23 购自上海细胞库 (美国菌种保藏中心)。6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 20 只, 体质量 (16 \pm 2) g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [许可证号: SCXK (鲁) 2019-

0003]。所有小鼠于相同环境恒温(22±2)℃、恒湿(55±5)%下普通饲养,自由进食饮水,12 h 光-暗交替,适应性培养 1 周。动物实验过程遵循动物福利 3R 原则,经内蒙古包钢医院实验动物伦理委员会审核批准(批文号:2021MER-023)。

1.1.2 主要试剂及仪器 姜黄素(纯度≥98%)(458-37-7,四川维克奇生物科技有限公司);Matrigel 基质胶(356234,美国 BD 公司);细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK8) (sc0105,上海生博生物医药科技有限公司);Annexin V-FITC/PI 流式细胞凋亡检测试剂盒(KGA106,南京凯基生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020,北京索莱宝科技有限公司);兔抗 β-catenin (ab223075)、兔抗轴抑制蛋白 2 (axis inhibition protein 2, Axin2) (ab109307)、兔抗细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) (ab16663)、兔抗 Survivin (ab76424)、兔抗 c-Myc (ab32072) 单克隆抗体,兔抗基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo proteinase 9, MMP-9) (ab38898) 多克隆抗体,辣根过氧化物酶偶联的二抗 (ab150077,美国 Abcam 公司);兔抗糖原合成酶激酶 3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β) 单克隆抗体 (YT782,北京百奥莱德科技有限公司);兔抗磷酸化 GSK-3β (p-GSK-3β) 多克隆抗体 (PL0303230,加拿大 PL Laboratories 公司)。IX70 型倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Allegra 64R 低温高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 ABI 公司);Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏、培养及培养液配制 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液复苏 M23 细胞,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,传代 2~3 次。采用 848.32 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液溶解 20 mg 姜黄素以制备原始浓度为 80 μmol/L 姜黄素的条件培养液,后取适量 80 μmol/L 姜黄素的条件培养液进行倍比稀释以制备含 20、40 μmol/L 姜黄素的条件培养液。

1.2.2 CCK8 法检测细胞存活率 收集对数生长期 M23 细胞,分别采用含 0、20、40 及 80 μmol/L 姜黄素培养液重悬细胞,调整细胞密度为 2×10⁴ 个/ml。细胞以每孔 2×10³ 个密度接种于 96 孔板中,每个浓度各设置 5 个复孔。培养 48 h 后,各孔加入 10 μl CCK8 溶液,37℃下孵育 2 h,采用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 (absorbance, A) 值,细胞存活率 (%) = 各浓度姜黄素组 A 值/0 μmol/L 姜黄素组 A 值×100%。实验重复 3 次。

1.2.3 平板克隆形成实验检测细胞集落数 收集对数生长期 M23 细胞,采用含 0、20、40 和 80 μmol/L 姜黄素的 DMEM 完全培养液重悬,以每孔 1×10³ 个细胞密度接种至 6 孔板内,每 3 天更换 1 次培养液;培养 2 周后, PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min,0.1% 结晶紫溶液染色 20 min, PBS 洗涤 2 次,晾干,观察集落形成情况并计数。光学显微镜下观察细胞形态, ImageJ 软件统计细胞克隆形成的集落数目,超过 50 个细胞的集落被认为 1 个集落形成。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集对数生长期 M23 细胞,采用含 0、20、40 和 80 μmol/L 姜黄素的 DMEM 完全培养液重悬,以每孔 1×10⁵ 个细胞接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 1 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 5 min, 收集细胞,加入结合缓冲液重悬并调整细胞密度为 1×10⁶ 个/ml,连续加入 5 μl Annexin V-FITC 溶液、5 μl PI 溶液,室温避光染色 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移率 收集对数期 M23 细胞,以每孔 5×10⁵ 个接种至 24 孔板内培养,直至细胞融合,利用无菌 10 μl 移液枪头尖端划线, PBS 洗涤,更换不含胎牛血清的含 0、20、40 和 80 μmol/L 姜黄素的 DMEM 培养液继续培养 48 h;在划痕后 0 h 和 48 h 拍照,采用 ImageJ 软件测量划痕宽度。计算细胞迁移率,细胞迁移率 (%) = (0 h 划痕宽度-48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭数 采用 Matrigel 基质胶涂布 Transwell 上室,4℃下干燥,将不同浓度姜黄素处理 48 h 后的各组细胞用胰蛋白酶消化,采用不含胎牛血清的对应培养液重悬;调整细胞密度为 2×10⁶ 个/ml,以 100 μl/孔接种至 Transwell 24 孔板上室,下室加入 500 μl 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,48 h 后用 95% 乙醇固定 Transwell 下侧侵入的细胞 30 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,400 倍光学显微镜下随机选取 5 个视野进行观察并拍照,统计细胞数目,重复计数 3 次,取平均值。实验重复 3 次。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测 Wnt/β-catenin 通路相关基因表达 采用含 0、20、40、80 μmol/L 姜黄素的 DMEM 完全培养液重悬对数生长期 M23 细胞,以 1×10⁵ 个/孔接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。采用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度后,通过琼脂糖凝胶电泳技术检测 RNA 完整性,利用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为

cDNA。c-Myc 基因引物序列:正向为 5'-GGCAAAGGTCAGAGTCTGG-3',反向为 5'-GTGCATTTTCGGTTGTTGC-3';Cyclin D1 基因引物序列:正向为 5'-CCGCCTCACACGCTFCCTCTC-3',反向为 5'-TCCTCCTCGGCGGCCTTGGGG-3';Survivin 基因引物序列:正向为 5'-TGGACAAACAAAGAGCCAAGAA-3',反向为 5'-TAGAGCAAAGCCACAAAACCAA-3';MMP-9 基因引物序列:正向为 5'-TTGACAGCGACAAGAAGTGG-3',反向为 5'-GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3';GAPDH 基因引物序列:正向为 5'-ATTTGGTCGTATTGGGCG-3',反向为 5'-TGGAAGATGGGTGATGGGATT-3'。各基因引物由上海生工生物工程有限公司合成。以 cDNA 为模板,对各基因引物于 ABI7300 系统上进行实时荧光定量 PCR 分析,反应条件:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 5 s,58 ℃ 退火及延伸 1 min,共 39 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.8 Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达水平 采用含 0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的 DMEM 完全培养液重悬对数生长期 M23 细胞,以 1×10^5 个孔密度接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,PBS 清洗 3 次,RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白。采用 BCA 法定总蛋白浓度,上样 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,湿法转印至 PVDF 膜;取 PVDF 膜于含 0.05 g/ml 脱脂奶粉的三乙醇胺缓冲盐水溶液 (tris buffered saline, TBS) 中室温封闭 1 h,置于相应一抗 (均 1:1 000 稀释) 中 4 ℃ 孵育过夜,TBS 洗膜 3 次;辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次;ECL 发光液显色,全自动凝胶成像系统拍照。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值比值表示各蛋白相对表达量。

1.2.9 UM 荷瘤小鼠模型的建立及分组处理 于 20 只小鼠左后腹皮下脂肪垫注射 M23 细胞悬浮液 100 μl (1×10^7 个细胞),接种 5 d 后接种部位可触摸到结节为造模成功。将造模成功小鼠按照随机数字表法随机分为模型组、姜黄素低、中和高剂量组,每组各 5 只,分别于腹腔内注射含 0、10、20 和 40 mg/kg 姜黄素的生理盐水溶液,每日注射 1 次,连续注射 30 d。

1.2.10 肿瘤质量检测 各组小鼠末次给药后禁食 24 h,颈椎脱臼法处死后,剥离小鼠左后腹皮下瘤体并称取肿瘤质量,比较各组小鼠肿瘤质量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。各计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间计量资料差异总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态及存活率比较

倒置显微镜下观察可见,M23 细胞相互连接紧密,呈融合状纺锤形;经不同浓度姜黄素作用后细胞逐渐变得扁平、狭长,假足状突起逐渐增多,细胞密度逐渐减小(图 1)。不同浓度姜黄素组间 M23 细胞存活率总体比较差异有统计学意义 ($F = 125.321, P < 0.001$);M23 细胞存活率随姜黄素浓度升高而降低,组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

2.2 不同浓度姜黄素组细胞集落形成数比较

随着姜黄素作用浓度增大,细胞集落数逐渐减少(图 2)。不同浓度姜黄素组 M23 细胞集落形成数总体比较差异有统计学意义 ($F = 97.941, P < 0.001$);M23 细胞集落形成数随姜黄素浓度增大而减少,组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

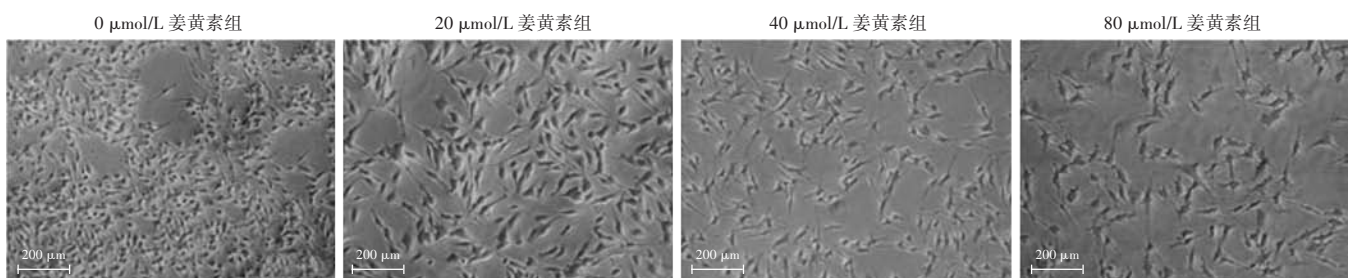


图 1 光学显微镜下不同浓度姜黄素组 M23 细胞形态图 ($\times 100$, 标尺 = 200 μm) 随着姜黄素浓度的增加,细胞密度逐渐降低,其中 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞呈融合状纺锤形,不同浓度姜黄素组处理后细胞逐渐变得扁平、狭长

Figure 1 Observation of M23 cells after 48-hour treatment in different concentrations of curcumin groups ($\times 100$, scale = 200 μm) The cell density was gradually reduced with the increase of curcumin concentration. The cells in 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group were fused and spindle-shaped, and the cells gradually became flattened, long and narrow after treatment with different concentrations of curcumin

表 1 不同浓度姜黄素组 M23 细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of survival rate of M23 cells among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	细胞存活率
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	100.00 \pm 0.00
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	83.78 \pm 4.59 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	66.09 \pm 3.92 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	47.16 \pm 3.63 ^{abc}
<i>F</i> 值		125.321
<i>P</i> 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^a $P < 0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^b $P < 0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^a $P < 0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^b $P < 0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

表 2 不同浓度姜黄素组细胞集落形成数量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{个}$)
Table 2 Comparison of colony formation number of M23 cells among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x} \pm s, \text{pcs}$)

组别	样本量	集落形成数
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	128.7 \pm 9.2
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	100.3 \pm 8.7 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	58.7 \pm 6.6 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	31.7 \pm 4.9 ^{abc}
<i>F</i> 值		97.941
<i>P</i> 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^a $P < 0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^b $P < 0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^a $P < 0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^b $P < 0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

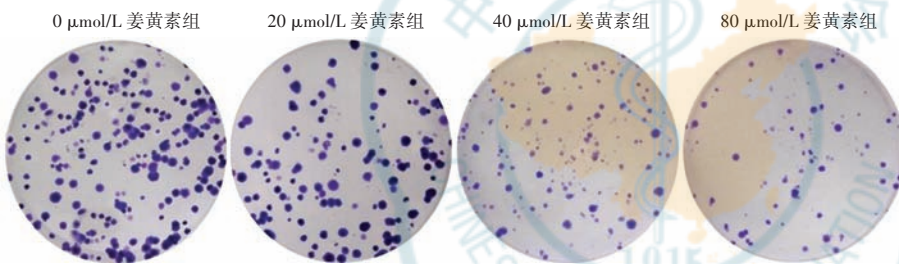


图 2 各浓度姜黄素组 M23 细胞集落形成情况 细胞集落数随着姜黄素浓度的增加而逐渐减少
Figure 2 Colony formation of M23 cells in different concentrations of curcumin groups The colony formation number was gradually decreased with the increase of curcumin concentration

2.3 不同浓度姜黄素组细胞凋亡率比较

流式细胞术检测结果显示,随姜黄素浓度增大,早期凋亡及晚期凋亡细胞逐渐增多(图 3)。不同浓度姜黄素组细胞凋亡率总体比较差异有统计学意义($F = 72.516, P < 0.001$);M23 细胞凋亡率随姜黄素作用浓度增加而逐渐升高,组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

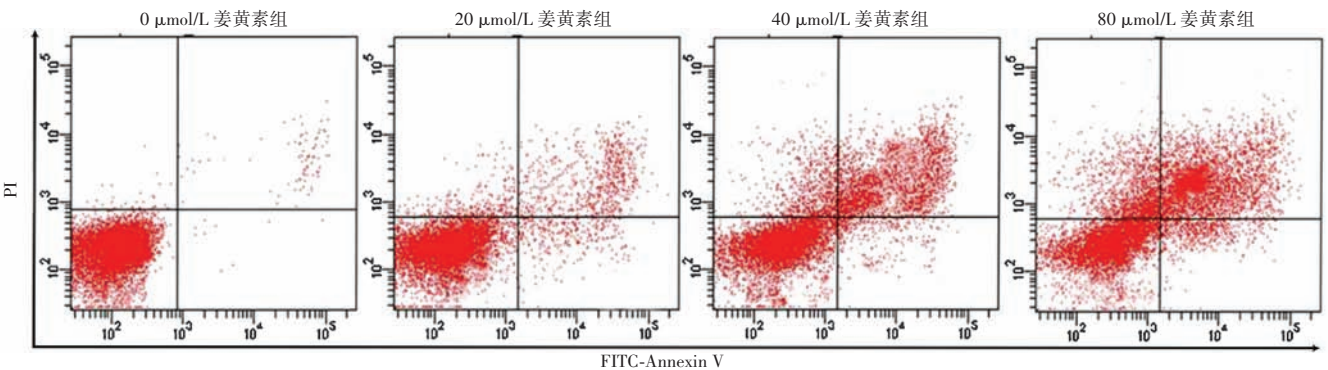


图 3 不同浓度姜黄素组细胞凋亡流式细胞图 细胞早期及晚期凋亡率随着姜黄素浓度的增加而逐渐升高
Figure 3 Flow cytometry of M23 cell apoptosis of various concentrations of curcumin groups The early and late apoptosis rates were gradually increased with the increase of curcumin concentration

2.4 不同浓度姜黄素组细胞迁移率比较

随着姜黄素作用浓度增加,细胞生长迁移速度减慢(图 4)。不同浓度姜黄素组 M23 细胞迁移率总体比较差异有统计学意义($F = 277.097, P < 0.001$);其中 M23 细胞迁移率随姜黄素作用浓度增加而降低,组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P <$

0.05)(表 4)。

2.5 不同浓度姜黄素组细胞侵袭数目比较

随着姜黄素浓度增加,侵袭细胞密度逐渐减小(图 5)。不同浓度姜黄素组 M23 侵袭细胞数总体比较差异有统计学意义($F = 139.006, P < 0.001$);M23 侵袭细胞数随姜黄素作用浓度增加而减少,各组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 5)。

表 3 不同浓度姜黄素组细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 3 Comparison of apoptosis rates of M23 cells among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	细胞凋亡率
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	1.33 \pm 0.29
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	14.53 \pm 2.04 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	27.23 \pm 3.56 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	44.73 \pm 4.36 ^{abc}
F 值		72.516
P 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^a $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^b $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^a $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^b $P<0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

表 4 不同浓度姜黄素组细胞迁移率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 4 Comparison of M23 cell migration rate among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	细胞迁移率
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	89.76 \pm 4.57
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	65.43 \pm 3.70 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	34.83 \pm 2.19 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	18.82 \pm 1.99 ^{abc}
F 值		277.097
P 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^a $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^b $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, ^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^a $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^b $P<0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

2.6 不同浓度姜黄素组 Wnt/ β -catenin 通路相关基因表达水平比较

不同浓度姜黄素组 M23 细胞 c-Myc、CyclinD1、Survivin 及 MMP-9 mRNA 相对表达水平总体比较差异均有统计学意义 ($F = 241.558, 269.804, 179.680, 284.000$, 均 $P<0.001$); 其中 M23 细胞 c-Myc、Cyclin D1、Survivin 及 MMP-9 mRNA 相对表达水平均随姜黄素作用浓度增加而降低, 组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 6)。

2.7 不同浓度姜黄素组 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达水平比较

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 及 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞 β -catenin、p-GSK-3 β 、c-Myc、Cyclin D1、Survivin 及 MMP-9 蛋白电泳条带灰度值逐渐减弱, Axin2 蛋白表达强度逐渐增强 (图 6)。不同浓度姜黄素组 GSK-3 β 蛋白相对表达水平总体比较差异无统计学意义 ($F = 0.494, P>0.05$), β -catenin、p-GSK-3 β 、c-Myc、Cyclin D1、Survivin、MMP-9 和 Axin2 蛋白相对表达水平总体比较差异均有统计学意义 ($F = 182.877, 183.026, 55.200, 150.128, 136.000, 139.611, 92.211$, 均 $P<0.001$); 随姜黄素浓度增大, β -catenin、p-GSK-3 β 、c-Myc、Cyclin D1、Survivin 及 MMP-9 蛋白相对表达水平明显降低, Axin2 蛋白相对表达水平明显升高, 组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 7)。

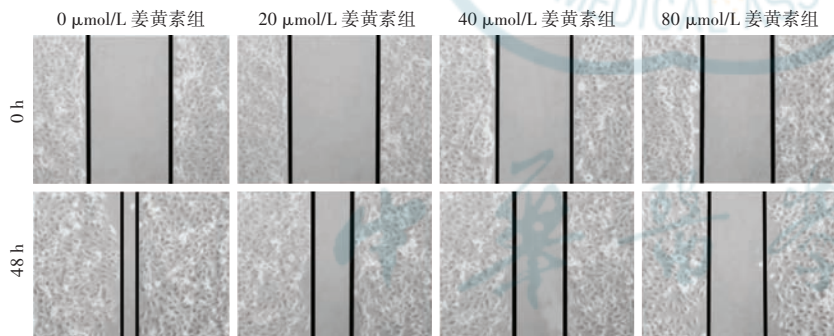


图 4 不同浓度姜黄素组细胞迁移情况 细胞迁移速度随着姜黄素浓度的增加逐渐减慢
Figure 4 Migration of M23 cells in different concentrations of curcumin groups The cell migration rate was gradually lowered with the increase of curcumin concentration

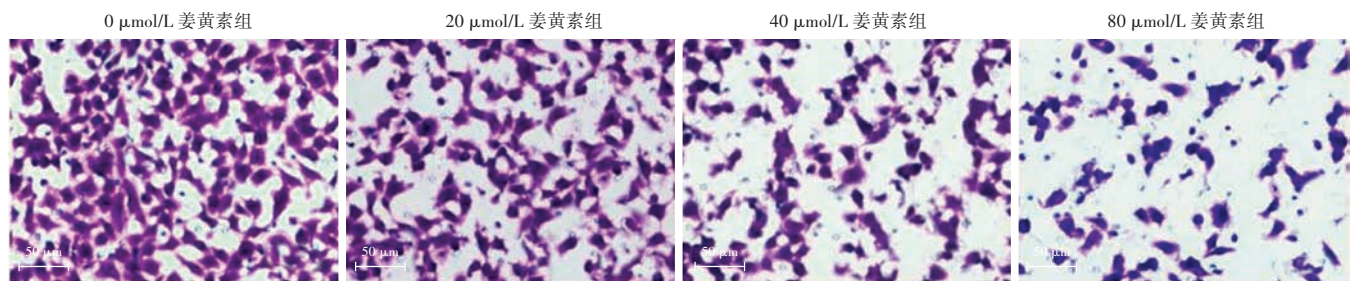


图 5 各浓度姜黄素组细胞侵袭情况 (结晶紫 $\times 400$, 标尺 = 50 μm) 侵袭细胞密度随着姜黄素浓度的增加逐渐降低
Figure 5 Invasion of M23 cells in different concentrations of curcumin groups (crystal violet $\times 400$, scale = 50 μm) The invading cell density was gradually reduced with the increase of curcumin concentration

表 5 不同浓度姜黄素组侵袭细胞数比较 ($\bar{x}\pm s$, 个)

Table 5 Comparison of the number of M23 invaded cells among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x}\pm s$, pcs)

组别	样本量	侵袭细胞数
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	148.33 \pm 8.18
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	125.33 \pm 7.41 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	73.67 \pm 6.34 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	45.67 \pm 5.31 ^{abc}
F 值		139.006
P 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^a $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^b $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^a $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^b $P<0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

表 6 不同浓度姜黄素组 Wnt/ β -catenin 通路相关基因 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Comparison of mRNA expression levels of genes related to Wnt/ β -catenin pathway among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	c-Myc	Cyclin D1	Survivin	MMP-9
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	5	1.01 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.01 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	5	0.86 \pm 0.05 ^a	0.91 \pm 0.05 ^a	0.92 \pm 0.06 ^a	0.83 \pm 0.05 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	5	0.58 \pm 0.04 ^{ab}	0.52 \pm 0.04 ^{ab}	0.61 \pm 0.03 ^{ab}	0.51 \pm 0.04 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	5	0.27 \pm 0.03 ^{abc}	0.32 \pm 0.02 ^{abc}	0.42 \pm 0.02 ^{abc}	0.26 \pm 0.02 ^{abc}
F 值		241.558	269.804	179.680	284.000
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^a $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^b $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) Cyclin D1:细胞周期蛋白 D1;MMP-9:基质金属蛋白酶 9

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^a $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^b $P<0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Cyclin D1: cyclic protein D1; MMP-9: matrix metalloproteinase 9

表 7 不同浓度姜黄素组 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Comparison of relative expression levels of proteins related to Wnt/ β -catenin pathway among different concentrations of curcumin groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	β -catenin	GSK-3 β	p-GSK-3 β	Axin2	c-Myc	Cyclin D1	Survivin	MMP-9
0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	0.82 \pm 0.06	0.79 \pm 0.03	0.75 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02	0.41 \pm 0.04	0.76 \pm 0.05	0.84 \pm 0.06	0.73 \pm 0.05
20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	0.57 \pm 0.04 ^a	0.80 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.03 ^a	0.32 \pm 0.03 ^a	0.68 \pm 0.03 ^a	0.61 \pm 0.04 ^a	0.42 \pm 0.04 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	0.29 \pm 0.02 ^{ab}	0.82 \pm 0.04	0.31 \pm 0.02 ^{ab}	0.46 \pm 0.04 ^{ab}	0.26 \pm 0.02 ^{ab}	0.46 \pm 0.03 ^{ab}	0.43 \pm 0.03 ^{ab}	0.27 \pm 0.03 ^{ab}
80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组	3	0.16 \pm 0.01 ^{abc}	0.83 \pm 0.05	0.19 \pm 0.02 ^{abc}	0.62 \pm 0.03 ^{abc}	0.13 \pm 0.01 ^{abc}	0.22 \pm 0.02 ^{abc}	0.20 \pm 0.02 ^{abc}	0.15 \pm 0.02 ^{abc}
F 值		182.877	0.494	183.026	92.211	55.200	150.128	136.000	139.611
P 值		<0.001	0.696	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^a $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^b $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) GSK-3 β :糖原合成酶激酶 3 β ;Axin2:轴抑制蛋白 2;Cyclin D1:细胞周期蛋白 D1;MMP-9:基质金属蛋白酶 9

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^a $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^b $P<0.05$; compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group,^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; Axin2: axis inhibition protein 2; Cyclin D1: cyclic protein D1; MMP-9: matrix metalloproteinase 9

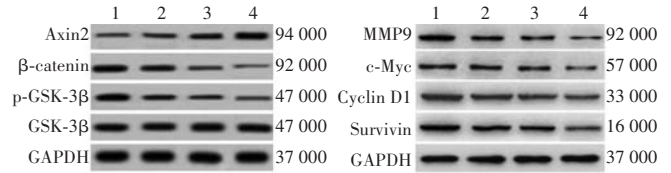


图 6 各浓度姜黄素组 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 Western blot 电泳图 1:0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;2:20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;3:40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;4:80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组 Axin2:轴抑制蛋白 2;GSK-3 β :糖原合成酶激酶 3 β ;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;MMP-9:基质金属蛋白酶 9;Cyclin D1:细胞周期蛋白 D1

Figure 6 Electrophoretogram of proteins related to Wnt/ β -catenin pathway in different concentrations of curcumin groups by Western blot 1: 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group; 4: 80 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group. Axin2: axis inhibition protein 2; GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; Cyclin D1: cyclic protein D1

2.8 各组小鼠肿瘤质量比较

随着姜黄素作用浓度增加,小鼠荷瘤组织整体变小(图 7)。各组小鼠荷瘤组织质量总体比较差异有统计学意义($F=58.026$, $P<0.001$);其中小鼠荷瘤组织质量随姜黄素作用剂量增加而降低,组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 8)。

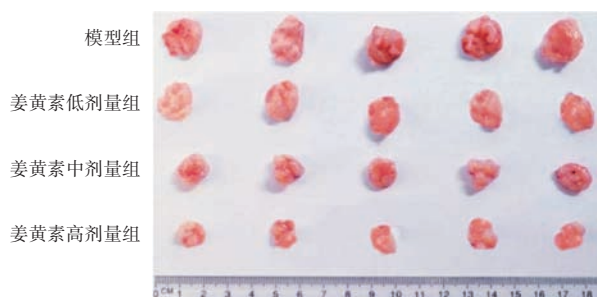


图 7 各组小鼠荷瘤组织观察 随姜黄素作用浓度增大, 荷瘤组织整体变小

Figure 7 Observation of tumor tissue of mice in different groups
With the increase of curcumin concentration, the tumor tissue became smaller

表 8 各组小鼠荷瘤组织质量比较 ($\bar{x} \pm s, g$)
Table 8 Comparison of tumor tissue weight among different groups ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	样本量	荷瘤质量
模型组	5	0.43±0.04
姜黄素低剂量组	5	0.37±0.03 ^a
姜黄素中剂量组	5	0.28±0.03 ^{ab}
姜黄素高剂量组	5	0.19±0.02 ^{abc}
F 值		58.026
P 值		<0.001

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$; 与姜黄素低剂量组比较, ^b $P < 0.05$; 与姜黄素中剂量组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with model group, ^a $P < 0.05$; compared with low-dose curcumin group, ^b $P < 0.05$; compared with medium-dose curcumin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

3 讨论

UM 转移是导致患者死亡的重要原因, 积极寻找能够减少 UM 细胞增生、迁移及侵袭的潜在化合物是建立新的有效治疗 UM 策略的重要一步。据报道, 姜黄素作为一种有效的抗癌候选药物, 可参与多种癌症的发展, 并影响肿瘤相关信号通路和分子靶点, 抑制癌细胞存活、迁移和侵袭^[11]。Xie 等^[12]研究发现, 含姜黄素纳米颗粒/原位水凝胶复合物可实现对人 UM 细胞增生的长效抑制作用, 对改善预后、抑制 UM 进展和转移至关重要, 但体内外条件下姜黄素对 UM 是否具有积极干预作用仍待探究。本研究中, M23 细胞于体外条件下经不同浓度姜黄素作用后, 细胞增生、集落形成、迁移及侵袭能力减弱, 细胞凋亡率升高; 体内实验结果显示, 姜黄素作用可显著抑制异种移植肿瘤生长, 且作用效果呈剂量依赖性, 说明姜黄素对 UM 细胞的恶性生物学行为具有抑制作用, 在机体内可发挥抗

UM 效果, 对于 UM 后期转移性进展可能具有一定的干预作用。

c-Myc 是一种促存活蛋白, 通常在肿瘤细胞中过度表达, 参与调节细胞存活、化学抗性和肿瘤发生等多种生理过程, 已被证明与肿瘤转移和不良临床结果有关^[13-14]; 其表达上调可导致癌细胞的干细胞特征和侵袭性^[15]。Cyclin D1 是细胞周期 G1~S 期过渡进程的重要调节剂, 在包括细胞增生、线粒体活性调节、DNA 修复和细胞迁移控制等细胞生物学过程中发挥关键作用^[16]。Survivin 与细胞凋亡抑制相关, 其在多种恶性肿瘤, 如结肠癌、肺癌、乳腺癌和黑色素瘤中的表达水平显著升高, 可促进上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 和干性过程^[17]。EMT 是癌症发展和转移第一阶段的关键机制, 通过改变细胞间黏附和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑, 有利于恶性肿瘤 ECM 内的侵入性迁移^[18]。MMP-9 为旁分泌癌细胞分泌的明胶酶, 可参与 ECM 组织重塑和降解过程, 其表达被视为肿瘤侵袭的主要先决条件^[19]。c-Myc、Cyclin D1、Survivin 和 MMP-9 均为 Wnt/ β -catenin 通路的关键下游因子^[20]。本研究结果显示, 经姜黄素作用后, M23 细胞中的 c-Myc、Cyclin D1、Survivin 及 MMP-9 mRNA 相对表达水平均降低, 提示姜黄素对 UM 细胞恶性生物学行为的抗性效果可能是通过干扰其存活蛋白表达, 介导增生周期紊乱, 促进其凋亡并降低其对基底膜屏障的降解作用来实现的。

Wnt/ β -catenin 通路与肿瘤发生、进展、转移和耐药性密切相关, 已成为抗肿瘤治疗的有效靶标^[21]。当 Wnt 通路未被激活时, β -catenin 被包含结肠腺瘤息肉蛋白、酪蛋白激酶 1、GSK-3 β 和 Axin1 或 Axin2 的多蛋白复合物磷酸化, 随后经历泛素依赖性蛋白水解; 但当该通路被激活时, 复合物被灭活, 导致 β -catenin 在细胞质中积累并转移至细胞核, 与转录因子 TCF/LEF 结合并激活下游调节细胞增生、细胞周期及细胞间黏附靶基因的转录与表达, Axin2 负反馈调控 Wnt/ β -catenin 通路活性^[22-23]。研究发现, 抑制 Wnt/ β -catenin 通路可下调 p-GSK-3 β 和 β -catenin 表达, 且能减弱癌细胞增生、迁移及侵袭能力^[24]。姜黄素已被证实参与多种癌细胞中 Wnt/ β -catenin 通路的下调^[25-27]。本研究结果显示, 经姜黄素作用后, M23 细胞中 β -catenin 及 p-GSK-3 β 蛋白相对表达水平显著下调, Axin2 蛋白相对表达水平有所提高, 提示姜黄素可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活, 进而减少下游靶基因 c-Myc、Cyclin D1、Survivin 和 MMP-9 等的转录。

综上所述,姜黄素可抑制 UM 细胞的恶性生物学行为,其作用机制可能与阻断 Wnt/ β -catenin 通路激活有关。该研究结果对 UM 临床药物治疗靶点及用药选择提供了一定参考,对干预 UM 恶性进展及改善预后具有一定的积极意义。但本研究仅选择了 UM 单一细胞株进行探究,未来尚需扩大细胞类型进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 盛小红:研究实施、数据分析及文章撰写;王利明、赵鑫:研究实施、数据采集及分析;辛向阳:酝酿和设计实验、文章审阅及定稿

参考文献

- [1] Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer [J]. *Eye (Lond)*, 2017, 31(2): 241–257. DOI: 10. 1038/eye. 2016. 275.
- [2] Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, et al. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects [J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(1): 38–44. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2016-309034.
- [3] Lorenzo D, Ochoa M, Piulats JM, et al. Prognostic factors and decision tree for long-term survival in metastatic uveal melanoma [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(4): 1130–1139. DOI: 10. 4143/crt. 2017. 171.
- [4] Ghosh N, Hossain U, Mandal A, et al. The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1443(1): 54–74. DOI: 10. 1111/nyas. 14027.
- [5] Razak S, Afsar T, Ullah A, et al. Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J/OL]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1043 [2023-03-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30367624>. DOI: 10. 1186/s12885-018-4959-4.
- [6] Altundag K. Physical activity and breast cancer: role of inhibition of Wnt signaling in triple negative breast cancer [J/OL]. *J BUON*, 2020, 25(1): 582 [2023-03-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32277686>.
- [7] 刘忆南, 邵蕾, 魏文斌. 不同病理类型的葡萄膜黑色素瘤中微小 RNA 差异表达谱分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(9): 778–785. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 09. 003.
Liu YN, Shao L, Wei WB. Differential expression profile of microRNAs in different types of uveal melanoma [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(9): 778–785. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 09. 003.
- [8] Zheng L, Pan J. The anti-malarial drug artesunate blocks Wnt/ β -catenin pathway and inhibits growth, migration and invasion of uveal melanoma cells [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(10): 988–998. DOI: 10. 2174/1568009618666180425142653.
- [9] 张雨莎, 柳慧, 占秋晓, 等. 姜黄素阻断 DAMPs-TLR4 信号通路抑制黑色素瘤肺转移的效应及机制? [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2016, 45(3): 273–277. DOI: 10. 3870/j. issn. 1672-0741. 2016. 03. 007.
Zhang YS, Liu H, Zhan QX, et al. Inhibitory effect of curcumin on lung metastasis of melanoma B16 cells via blocking DAMPs-TLR4 signal pathway [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2016, 45(3): 273–277. DOI: 10. 3870/j. issn. 1672-0741. 2016. 03. 007.
- [10] Lu C, Song E, Hu DN, et al. Curcumin induces cell death in human uveal melanoma cells through mitochondrial pathway [J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(4): 352–360. DOI: 10. 3109/02713680903521944.
- [11] Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2376 [2023-03-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31590362>. DOI: 10. 3390/nu11102376.
- [12] Xie L, Yue W, Ibrahim K, et al. A long-acting curcumin nanoparticle/in situ hydrogel composite for the treatment of uveal melanoma [J/OL]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9): 1335 [2023-03-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34575410>. DOI: 10. 3390/pharmaceutics13091335.
- [13] Destefanis F, Manara V, Bellosta P. Myc as a regulator of ribosome biogenesis and cell competition: a link to cancer [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4037 [2023-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32516899>. DOI: 10. 3390/ijms21114037.
- [14] Hou J, Huang P, Lan C, et al. ZC3H15 promotes gastric cancer progression by targeting the FBXW7/c-Myc pathway [J/OL]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 32 [2023-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35064102>. DOI: 10. 1038/s41420-022-00815-x.
- [15] Yin L, Li Q, Mrdenovic S, et al. KRT13 promotes stemness and drives metastasis in breast cancer through a plakoglobin/c-Myc signaling pathway [J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2022, 24(1): 7 [2023-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35078507>. DOI: 10. 1186/s13058-022-01502-6.
- [16] Ramos-García P, Gil-Montoya JA, Scully C, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis [J]. *Oral Dis*, 2017, 23(7): 897–912. DOI: 10. 1111/odi. 12620.
- [17] Wang Z, Li Y, Liu M, et al. 3BDO inhibits the proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and stemness via suppressing survivin in human glioblastoma cells [J]. *J Cancer*, 2022, 13(4): 1203–1213. DOI: 10. 7150/jca. 66674.
- [18] Pečina-Šlaus N, Kafka A, Gotovac Jerčić K, et al. Comparable genomic copy number aberrations differ across astrocytoma malignancy grades [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1251 [2023-03-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30871102>. DOI: 10. 3390/ijms20051251.
- [19] Huang CY, Yang JL, Chen JJ, et al. Fluoroquinolones suppress TGF- β and PMA-induced MMP-9 production in cancer cells: implications in repurposing quinolone antibiotics for cancer treatment [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11602 [2023-03-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34769032>. DOI: 10. 3390/ijms222111602.
- [20] Yin S, Liu H, Wang J, et al. Osthole induces apoptosis and inhibits proliferation, invasion, and migration of human cervical carcinoma HeLa cells [J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8885093 [2023-03-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34539807>. DOI: 10. 1155/2021/8885093.
- [21] Wei Z, Wang W, Li Q, et al. The microRNA miR-19a-3p suppresses cell growth, migration, and invasion in multiple myeloma via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(2): 1053–1064. DOI: 10. 21037/ter-20-3490.
- [22] Bao Y, Cui J, Yue Y, et al. ERBB3 binding protein 1 promotes the progression of malignant melanoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 44 [2023-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35093077>. DOI: 10. 1186/s12935-022-02473-6.
- [23] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985–999. DOI: 10. 1016/j. cell. 2017. 05. 016.
- [24] Li W, Li J, Mu H, et al. MiR-503 suppresses cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting HMGA2 and inactivating WNT signaling pathway [J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 164 [2023-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31249473>. DOI: 10. 1186/s12935-019-0875-1.
- [25] Ghasemi F, Shafiee M, Banikazemi Z, et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells [J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(10): 152556 [2023-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31358480>. DOI: 10. 1016/j. prp. 2019. 152556.
- [26] Hao J, Dai X, Gao J, et al. Curcumin suppresses colorectal tumorigenesis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway by downregulating Axin2 [J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 21(3): 186 [2023-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33574925>. DOI: 10. 3892/ol. 2021. 12447.
- [27] Shao J, Shi CJ, Li Y, et al. LincROR mediates the suppressive effects of curcumin on hepatocellular carcinoma through inactivating Wnt/ β -Catenin signaling [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 847 [2023-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32714183>. DOI: 10. 3389/fphar. 2020. 00847.

(收稿日期: 2023-05-17 修回日期: 2023-11-28)

(本文编辑: 张宇 骆世平)