哇巴因抑制Wnt/ β -catenin信号通路和对肿瘤细胞的细胞毒作用

李诗乐[†], 孙琦[†], 李军君[†], 王中原, 苏子杰, 宋佳兴, 李莹, 吕德生^{*}

深圳大学医学部基础医学院药理学系, 深圳 518060

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: delu@szu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-08; 接受日期: 2017-11-01; 网络版发表日期: 2018-01-16

国家自然科学基金(批准号: 81372342, 31501143)、广东省自然科学基金(批准号: 2014A030310168, 2017A030310329)、深圳市海内外高层次人才创新创业团队(批准号: kqtd20140630100658078)、深圳市重点实验室项目(批准号: zdsy20130329101130496)、深圳市基础研究项目(批准号: jcyj20150525092941006, jcyj20150525092941030)和深圳大学新引进教师科研启动项目(批准号: 2016085)资助

摘要 哇巴因是一种强心苷类药物, 临床上常用于治疗充血性心力衰竭与心律失常. 近期的研究发现, 哇巴因具有抗肿瘤活性, 但其作用机制不甚明了. Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活与多种肿瘤的发生发展密切相关. 本项研究发现, 哇巴因是一种新颖的Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂, 其作用靶点是低密度脂蛋白受体相关蛋白6 (LRP6)和 β -连环蛋白(β -catenin). 在人大肠癌HCT116和非小细胞肺癌A549细胞中, 纳摩尔浓度的哇巴因有效地降低磷酸化LRP6、总LRP6、活化 β -catenin和总 β -catenin的蛋白水平. 另外, 哇巴因还可有效地抑制Wnt/ β -catenin信号通路靶基因*CD44*和纤维蛋白连接素(*fibronectin*)的表达. 进一步研究发现, 哇巴因对HCT116和A549细胞具有明显的杀伤活性, 并能够诱导其凋亡. 该研究首次阐明了哇巴因抑制Wnt/ β -catenin信号通路的分子机制.

关键词 哇巴因, Wnt/ β -catenin信号通路, 细胞毒性

Wnt/ β -catenin信号通路(简称Wnt信号通路)是一条在生物进化过程中高度保守的信号系统, 该通路的异常活化与肿瘤的发生发展密切相关^[1-3]. Wnt信号通路是由Wnt信号分子及其跨膜受体蛋白、胞质信号传导蛋白、调节因子、核内转录因子及下游靶基因共同组成的复杂信号传导系统. Wnt信号分子与跨膜受体Frizzleds (Fzd)和共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6)结合后, 通过蓬乱蛋白(dishevelled, DVL), 阻止 β -catenin-AXIN-APC-GSK-3 β 破坏复合物的形成, 细胞质中游离状态的 β -catenin蛋白在胞质中聚集, 最

后进入细胞核内, 与转录因子TCF/LEF结合, 进而激活靶基因如*c-myc*, *cyclin D1*, *fibronectin*和*CD44*等的转录活性, 促进细胞的增殖和分化^[4,5].

Wnt信号通路的异常活化与多种恶性肿瘤密切相关, 该通路的多个成员都参与了肿瘤的发生发展过程. 研究发现, Wnt基因家族成员*Wnt2*, *Wnt4*和*Wnt10b*, 以及Wnt受体Fzd1, Fzd2和共受体LRP6在一些乳腺癌中表达上调^[6,7]. 胞内Wnt抑制因子WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1)减少或*WIF*基因的甲基化突变均可诱发食管癌和鼻咽癌及垂体瘤^[8]. 卵巢癌中检测到的 β -catenin的突变率在16%~54%^[9], 胃癌细胞中 β -catenin突变率也

引用格式: 李诗乐, 孙琦, 李军君, 等. 哇巴因抑制Wnt/ β -catenin信号通路和对肿瘤细胞的细胞毒作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 65-72
Li S Y, Sun Q, Li J J, et al. Ouabain inhibits Wnt/ β -catenin signaling and induces cytotoxicity in cancer cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 65-72, doi: 10.1360/N052017-00222

近30%^[10]. 约85%的结肠癌与抑癌基因APC的突变或失活有关^[11].

通过靶向阻断异常活化的Wnt信号通路, 抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞的凋亡, 已经成为抗肿瘤药物领域的研究热点. 本课题组近期成功鉴定了两种新颖的Wnt信号通路抑制剂——盐霉素^[12]和灵菌红素^[13], 这两种药物分别选择性地诱导慢性淋巴细胞性白血病细胞的凋亡和抑制乳腺癌的发生发展. 本研究利用Wnt信号通路特异性的报告基因进行小分子化合物筛选, 发现治疗心力衰竭和心房颤动的常用药物哇巴因能够有效地抑制Wnt报告基因的活性. 本课题组系统地研究了哇巴因抑制Wnt信号通路的分子机制, 并验证了哇巴因对肿瘤细胞的细胞毒性作用.

1 材料与方法

1.1 试剂和质粒

哇巴因(ouabain)购自Sigma-Aldrich (美国). 荧光素酶报告基因*SuperTopFlash*由美国加州大学圣地亚哥分校Karl Willert教授赠送. 报告基因质粒NFAT-Luc和Wnt1, Wnt3a, LRP6, DVL2, β -catenin, NFATc, β -gal表达质粒按照以前研究中描述的方法制备^[12,14]. Lipofectamine2000转染试剂购自Invitrogen (美国).

1.2 荧光素酶活性

接种 2.5×10^5 HEK293T细胞于24孔板中, 培养24 h后, 用Lipofectamine2000转染试剂将0.25 g报告基因质粒, 50 ng对照质粒pCMX β -gal, 和50~200 ng Wnt1, Wnt1/LRP6, DVL2, β -catenin等表达质粒, 转染于HEK293T细胞中. 转染24 h后, 细胞用对照DMSO和不同浓度的哇巴因进行处理. Wnt3a条件培养基(Wnt3a-CM)和对照培养基按照以前研究中描述的方法进行制备^[15]. 采用Promega公司的报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性, 并用 β -gal数值矫正因转染效率差异引起的荧光素酶活性.

1.3 细胞培养和转染

HEK293T, HCT116和A549细胞培养使用加有10%胎牛血清, 100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM培养基. 细胞于37℃, 5% CO₂培养箱中培养. 质粒转染根据Lipofectamine2000转染试剂说明书进行

操作.

1.4 免疫印迹分析

细胞经DMSO或不同浓度哇巴因处理后, 收集细胞, 加入细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β -glycerol phosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 2 μ g/mL leupeptin和1 mmol/L PMSF)裂解并超声处理. 蛋白质定量后, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 经SDS-PAGE分离的样本将被转移到硝酸纤维素薄膜上, 进行免疫反应. anti-phospho LRP6 (Ser1490)抗体(Cell Signaling Technology, 美国), anti-LRP6抗体(Cell Signaling Technology), anti-nonphospho (active) β -catenin抗体(Millipore, 美国), anti- β -catenin抗体(Santa Cruz Biotechnology, 美国)和anti-GAPDH抗体(Abmart, 美国)被用于免疫印迹分析.

1.5 实时荧光定量PCR

HCT116和A549细胞, 分别用DMSO, 15.625和31.25 nmol/L哇巴因处理24 h. 采用RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂提取总RNA, 并用反转录试剂盒Primescrip RT Reagent Kit (TaKaRa)制备cDNA. 制备好的cDNA用FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, 瑞士)试剂盒进行实时定量PCR, 以检测哇巴因对Wnt信号通路下游靶基因*CD44*, *fibronectin*的mRNA表达的影响. 引物设计如下: CD44: sense, 5'-AGC-CCATGTTGTAGCAAACC-3'; antisense, 5'-TGAG-GTACAGGCCCTCTGAT-3'; fibronectin: sense, 5'-AC-CTACGGATGACTCGTGCTTT-3'; antisense, 5'-TTCA-GACATTCGTTCCCACTCA-3'; GAPDH: sense, 5'-CCAGAACATCATCCCTGCCTCTACT-3'; antisense, 5'-GGTTTTTCTAGACGGCAGGTACAGGT-3'.

1.6 细胞MTT实验

HEK293T, HCT116和A549细胞分别以 1×10^4 cells/well密度接种于96孔板, 过夜培养后, 用DMSO, 3.9, 7.8, 15.63, 31.25和62.5 nmol/L的哇巴因分别处理细胞后24 h, 每孔加入3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐MTT溶液(5 mg/mL), 继续孵育4 h, 终止培养. 采用DMSO溶解细胞中的蓝紫色结晶甲臞, 用

酶联免疫检测仪在570 nm/L波长处测定其吸光值。

1.7 细胞流式分析

细胞经DMSO和不同浓度的哇巴因处理后,用无EDTA的胰酶消化回收。用预冷的PBS洗涤细胞两次,加入1×Annexin V Binding Buffer, Annexin V-FITC和PI,反应15 min后,使用40 μm 细胞筛网(BD)过滤没有消化成单细胞的细胞团块,1 h之内BD Calibur上机检测。

1.8 统计分析

用Microsoft Excel或GraphPad Prism5软件进行实

验数据分析,选用Student *t*检验,数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SD}$,当 $P < 0.05$ 时,表示有显著性差异。

2 结果

2.1 哇巴因抑制Wnt/ β -catenin信号通路

SuperTopFlash 报告基因的启动子区含有16个TCF/LEF转录因子的结合位点,其荧光素酶的表达高低代表了Wnt信号通路的激活水平^[12]。在前期工作中,利用*SuperTopFlash*报告基因系统,筛选新颖的Wnt信号通路抑制剂,发现哇巴因(图1A)能有效地抑制Wnt

图1 哇巴因特异性抑制Wnt/ β -catenin信号通路

A: 哇巴因化学结构; B: 在HEK293T细胞中转染Wnt信号通路特异性的荧光素酶报告基因*SuperTopFlash*, 随之细胞用对照培养基和Wnt3a条件培养基(Wnt3a-CM)处理; C~E: *SuperTopFlash*报告基因和对照质粒pcDNA或Wnt1和LRP6表达质粒(C)或DVL2表达质粒(D)或 β -catenin表达质粒(E)共转染于HEK293细胞; F: 将*NFAT-Luc*报告基因和对照质粒或NFATc表达质粒共转染于HEK293细胞, 24 h后, 用对照或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理24 h, 回收细胞, 检测荧光素酶报告基因的活性。每个样本用 β -gal的活性数值进行校正

报告基因的活性。为了进一步确认哇巴因抑制Wnt信号通路的能力, 将*SuperTopFlash*报告基因质粒转染入HEK293T细胞, 用Wnt3a条件培养基(Wnt3a-CM)激活Wnt信号通路, Wnt3a-CM诱导报告基因的转录活性增加~6.6倍(图1B)。不同浓度的哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理细胞24 h后, 药物对Wnt报告基因转录活性的抑制作用, 随着浓度的增加而增强呈浓度依赖性(图1B)。另外, 将*SuperTopFlash*报告基因分别与Wnt1和LRP6表达质粒, 或DVL2表达质粒, 或 β -catenin表达质粒共同转染入HEK293T细胞, 哇巴因明显降低Wnt1和LRP6(图1C), DVL2(图1D), β -catenin(图1E)诱导的报告基因转录活性。在对照实验中, 同等浓度的哇巴因处理并不抑制*NEAT*报告基因的荧光素酶活性(图1F)。这些结果表明, 哇巴因能够特异性地抑制Wnt信号通路。

2.2 哇巴因通过作用于LRP6和 β -catenin分子抑制Wnt/ β -catenin信号通路

为了鉴定哇巴因在Wnt信号通路上的可能作用靶点, 将Wnt1表达质粒与*SuperTopFlash*报告基因共转染入HEK293T细胞, 以激活报告基因的转录活性。Wnt1增加了磷酸化LRP6和总的LRP6水平, 哇巴因处理转染细胞后, 明显降低了磷酸化LRP6和总的LRP6水平(图2A)。进而转染 β -catenin表达质粒入HEK293T细胞以激活Wnt信号通路, 哇巴因以浓度依赖的方式降低 β -catenin和活化的 β -catenin蛋白水平(图2B)。这些结果

提示, 哇巴因通过作用于LRP6和 β -catenin分子, 抑制Wnt/ β -catenin信号通路。

2.3 哇巴因对肿瘤细胞中Wnt/ β -catenin信号通路的抑制作用

为了确定哇巴因对肿瘤细胞中Wnt信号通路的影响, 采用不同浓度的哇巴因处理大肠癌HCT116和非小细胞肺癌A549细胞, 免疫印迹分析表明, 31.25 nmol/L哇巴因足以降低这两种肿瘤细胞中的磷酸化LRP6和总的LRP6水平, 但对 β -catenin的影响并不明显。当哇巴因浓度提高到62.5 nmol/L时, 观察到药物对 β -catenin和活化的 β -catenin表达的抑制作用(图3)。这些结果进一步提示, 在肿瘤细胞中哇巴因能够靶向作用于LRP6和 β -catenin分子, 但这两种分子对哇巴因作用的敏感性可能是不同的。

为了研究哇巴因对Wnt信号通路靶基因表达的影响, 不同浓度的哇巴因处理HCT116和A549细胞后, 采用实时荧光定量PCR检测Wnt信号通路靶基因*CD44*和*fibronectin*的mRNA水平, 图4表明, 哇巴因可有效地降低肿瘤细胞中*CD44*和*fibronectin*的表达水平(图4), 该结果再次证实哇巴因对Wnt信号通路的抑制作用。

2.4 哇巴因对肿瘤细胞的细胞毒作用, 并诱导肿瘤细胞凋亡

为了确定哇巴因对肿瘤细胞的杀伤作用, 用不同浓度的哇巴因分别处理HEK293T, HCT116和A549细胞24和48 h, 然后用MTT方法测定药物的细胞毒作用。

图2 哇巴因对HEK293T细胞中Wnt/ β -catenin信号通路的抑制作用

A: 将Wnt1表达质粒与*SuperTopFlash*报告基因共转染入HEK293T细胞。细胞用对照DMSO或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理24 h后, 用免疫印迹法检测磷酸化LRP6、总LRP6和 β -catenin蛋白水平; B: 将 β -catenin表达质粒与*SuperTopFlash*报告基因共转染入HEK293T细胞。细胞用对照或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理24 h后, 用免疫印迹法检测磷酸化LRP6、总LRP6、 β -catenin和活化 β -catenin蛋白水平

图3 哇巴因对肿瘤细胞中Wnt/β-catenin信号通路的抑制作用

HCT116 (A)和A549 (B)细胞用对照DMSO或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理24 h后,用免疫印迹法检测磷酸化LRP6、总LRP6、β-catenin和活化β-catenin蛋白水平

图4 哇巴因抑制Wnt/β-catenin信号通路靶基因的表达

HCT116 (A和B)和A549 (C和D)细胞用对照DMSO或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)处理24 h后,提取总RNA,反转录成cDNA,实时定量PCR检测Wnt信号通路靶基因CD44和fibronectin的表达. *: $P < 0.05$

MTT结果表明,哇巴因对HEK293T细胞并没有明显的细胞毒作用,但对HCT116和A549细胞表现出明显的杀伤作用,这种作用呈浓度依赖性(图5A~C)。哇巴因对HCT116细胞处理24和48 h后的 IC_{50} 分别为75.3和50.0 nmol/L (图5B)。药物对A549细胞处理24和48 h后的 IC_{50} 分别为77.0和52.5 nmol/L (图5C)。这些结果提示,哇巴因对肿瘤细胞可能有选择性的杀伤作用。

进一步用细胞流式技术检测哇巴因对HCT116和A549细胞凋亡的影响。如图5D和5E所示,与DMSO对照组相比,31.25和62.5 nmol/L哇巴因处理HCT116细胞48 h后,凋亡细胞占总细胞数的比率分别为21.77%和36.79% (图5D)。在A549细胞中,31.25和62.5 nmol/L哇巴因诱导凋亡细胞的比率分别为27.98%和38.88% (图5E)。这些结果表明,纳摩尔浓度的哇巴因具有显著

图5 哇巴因对肿瘤细胞的细胞毒作用, 并诱导肿瘤细胞凋亡(网络版彩图)

用对照DMSO或哇巴因(15.625~62.5 nmol/L)分别处理HEK293T (A), HCT116 (B)和A549细胞(C) 24和48 h. 用MTT方法检测药物的细胞毒作用. 用对照DMSO或31.25, 62.5 nmol/L哇巴因分别处理HCT116 (D)和A549 (E)细胞48 h后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡. *: $P < 0.05$

的促细胞凋亡作用.

3 讨论

自1967年, Shiratori^[16]首次证明了哇巴因在体内外具有抑制恶性肿瘤细胞增殖作用以来, 强心苷类药物如地高辛、哇巴因、毒毛花苷G等在预防与治疗肿瘤方面逐步引起重视. 强心苷类药物可以抑制低氧诱导因子HIF- α 的表达^[17], 并抑制DNA拓扑异构酶II的催化活性^[18]. 2016年, Özdemir等人^[19]发现包括哇巴因在内的强心苷类药物诱导细胞凋亡并激活Rho/Rho激酶

途径中的ROCK蛋白. 本研究首次阐述了强心苷类药物哇巴因对Wnt信号通路的抑制作用. 哇巴因靶向作用于Wnt信号通路中的共受体LRP6和关键蛋白分子 β -catenin, 通过抑制这两种分子的表达和活性, 下调肿瘤相关的靶基因CD44, fibronectin的转录, 导致Wnt信号通路的阻断(图6). 本研究支持强心苷类药物通过作用于多个信号通路, 发挥其抗肿瘤作用. 本课题组的初步研究结果提示, 另一种强心苷类药物地高辛也能够抑制Wnt信号通路, 然而, 是否其他强心苷类药物也具有Wnt信号通路抑制活性还有待进一步的研究.

图6 哇巴因调控Wnt信号通路的作用机制(网络版彩图)

最近的一项研究报道哇巴因与化疗药顺铂的联用,能够抑制Wnt信号通路中关键分子 β -catenin的入核,进而逆转食管癌对顺铂的耐药性^[20]。该研究提示,哇巴因与其他化疗药联用,可以通过增强其对Wnt信号通路的抑制作用,从而提高其抗肿瘤活性。本课题

组认为,通过探讨哇巴因或其他强心苷类药物与临床上常用的化疗药联合使用,寻找能够增强其Wnt信号通路抑制作用的化疗药,将可能产生治疗肿瘤的新颖疗法。

本研究结果表明,哇巴因在纳摩尔浓度就可杀伤大肠癌细胞HCT116和肺癌细胞A549,并诱导其凋亡。有研究报道,哇巴因通过调控 Na^+/K^+ 泵的双向运输功能抑制乳腺癌细胞^[21]和肺癌细胞^[22]的迁移,还可以通过降低JNK途径依赖的Bcl-2表达,诱导非小细胞肺癌细胞的自噬^[23]。在Burkitt淋巴瘤Raji细胞中,哇巴因也具有诱导其凋亡和自噬的作用^[24],这些研究说明哇巴因可以杀伤多种肿瘤细胞。由于哇巴因对Wnt信号通路的抑制作用,哇巴因及其他强心苷类药物将可能在治疗由Wnt信号通路异常引起的恶性肿瘤中发挥重要作用。

综上所述,本研究组发现强心苷类药物哇巴因是一种新颖的Wnt信号通路抑制剂。哇巴因通过降低Wnt信号通路中的LRP6和 β -catenin的表达和活化,有效地抑制Wnt信号通路的异常激活。本研究揭示了强心苷类药物抗肿瘤作用的新机制。

参考文献

- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17: 45–51
- Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 387–398
- Driehuis E, Clevers H. WNT signalling events near the cell membrane and their pharmacological targeting for the treatment of cancer. *Br J Pharmacol*, 2017, in press doi: 10.1111/bph.13758
- Kim W, Kim M, Jho E H. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*, 2013, 450: 9–21
- Duchartre Y, Kim Y M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 141–149
- Liu C C, Prior J, Piwnica-Worms D, et al. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5136–5141
- Pohl S G, Brook N, Agostino M, et al. Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, 2017, 6: e310
- Chan S L, Cui Y, van Hasselt A, et al. The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. *Lab Invest*, 2007, 87: 644–650
- Wu R, Zhai Y, Fearon E R, et al. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*, 2001, 61: 8247–8255
- Clents W M, Wang J, Sarnaik A, et al. β -Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res*, 2002, 62: 3503–3506
- Schatoff E M, Leach B I, Dow L E. Wnt signaling and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2017, 13: 101–110
- Lu D, Choi M Y, Yu J, et al. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13253–13257
- Wang Z, Li B, Zhou L, et al. Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 13150–13155
- Lu D, Zhao Y, Tawatao R, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:

- 3118–3123
- 15 Willert K, Shibamoto S, Nusse R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev*, 1999, 13: 1768–1773
- 16 Shiratori O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *Gan*, 1967, 58: 521–528
- 17 Zhang H, Qian D Z, Tan Y S, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 19579–19586
- 18 Bielawski K, Winnicka K, Bielawska A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 1493–1497
- 19 Özdemir A, Şimay Y D, İbişoğlu B, et al. Cardiac glycoside-induced cell death and Rho/Rho kinase pathway: implication of different regulation in cancer cell lines. *Steroids*, 2016, 109: 29–43
- 20 Shen Y, Wang Q, Tian Y. Reversal effect of ouabain on multidrug resistance in esophageal carcinoma EC109/CDDP cells by inhibiting the translocation of Wnt/ β -catenin into the nucleus. *Tumor Biol*, 2016, 37: 15937–15947
- 21 Magpusao A N, Omolloh G, Johnson J, et al. Cardiac glycoside activities link Na⁺/K⁺ ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *ACS Chem. Biol*, 2015, 10: 561–569
- 22 Liu N, Li Y, Su S, et al. Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lungcancer cell line. *Oncol Lett*, 2013, 6: 475–479
- 23 Trenti A, Grumati P, Cusinato F, et al. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89: 197–209
- 24 Meng L, Wen Y, Zhou M, et al. Ouabain induces apoptosis and autophagy in Burkitt's lymphoma Raji cells. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1841–1848

Ouabain inhibits Wnt/ β -catenin signaling and induces cytotoxicity in cancer cells

LI ShiYue, SUN Qi, LI JunJun, WANG ZhongYuan, SU ZiJie, SONG JiaXing, LI Ying & LV DeSheng

Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

Ouabain, a cardiac glycoside found in plants, is primarily used in the treatment of congestive heart failure and arrhythmia. Recently ouabain has been shown to exert anticancer effects, but the underlying mechanism is not clear. Aberrant activation of the Wnt/ β -catenin signaling cascade is associated with numerous human cancers. In this study, we identified ouabain as a potent inhibitor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting the low density lipoprotein-receptor-related protein 6 (LRP6) and β -catenin. In colon cancer HCT116 and non-small cell lung cancer A549 cells, nanomolar concentrations of ouabain significantly decreased the levels of phosphorylated LRP6, total LRP6, active β -catenin and β -catenin. In addition, ouabain inhibited β -catenin-stimulated Wnt target gene expression, including expression of *CD44* and *fibronectin*. Furthermore, ouabain reduced the viability of HCT116 and A549 cells and induced apoptosis in both cell lines. This study clarified the molecular mechanism underlying anti-cancer activity of ouabain through blocking the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

ouabain, Wnt/ β -catenin signaling, cytotoxicity

doi: [10.1360/N052017-00222](https://doi.org/10.1360/N052017-00222)