

· 论著 ·

泽漆抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及其凋亡机制研究

王筱婧¹, 王东兴², 范洁³, 高越⁴, 张海³ (1. 中国药学会国际交流部, 北京 100022; 2. 陆军总医院 263 临床部, 北京 101149; 3. 同济大学附属第一妇婴保健院, 上海 201204; 4. 第二军医大学药学院实验教学中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究泽漆对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用及其作用机制。方法 用 MTT 法检测细胞活力; 用荧光显微镜法测定 MDA-MB-231 细胞的活性氧(ROS)生成量; 用流式细胞仪检测细胞的凋亡率; 用 TUNEL 检测法检测细胞凋亡 DNA 碎片; 用 Western blot 检测 caspase-9、caspase-3、PARP 等凋亡相关因子的水平变化。结果 MTT 试验显示泽漆提取物对 MDA-MB-231 细胞具有显著的抑制作用, 但作用可被 ROS 抑制剂 NAC 及 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 所消除; 荧光显微镜检测显示泽漆提取物能显著提高 ROS 的生成; 流式细胞仪检测显示泽漆提取物处理后, PI 染色阳性细胞明显增加, 但被 NAC 减弱。Caspase-9、caspase-3 在提取物处理后均转为激活形式, PARP 被剪切。TUNEL 法显示, 提取物处理后细胞凋亡碎片明显增多, 而提前加入 ROS 抑制剂 NAC 和 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 能使泽漆提取物诱导凋亡的 DNA 碎片明显减少。结论 泽漆乙酸乙酯提取物可以有效抑制 MDA-MB-231 细胞的生长, 诱导其凋亡, 其作用机制可能与 ROS 过量生成所致的线粒体损伤途径有关。

[关键词] 泽漆; MDA-MB-231 细胞; 三阴乳腺癌; ROS; 线粒体途径; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0337-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.012

Inhibitory effect of *Euphorbia helioscopia* on human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its possible mechanism of apoptosis

WANG Xiaojing¹, WANG Dongxing², FAN Jie³, GAO Yue⁴, ZHANG Hai³ (1. International Cooperation Department, Chinese Pharmaceutical Association, Beijing 100022, China; 2. 263 Clinical Division, Army General Hospital, Beijing 100022, China; 3. Shanghai First Maternal and Infant Hospital affiliated to Tongji University, Shanghai 201204, China; 4. Center of Experimental Teaching, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Euphorbia helioscopia* on MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods** The cell viability was detected by MTT assay. The production of ROS in MDA-MB-231 cells was measured by fluorescence microscopy. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. Apoptosis DNA fragments were detected by TUNEL assay. Western blot was used to assess the expression of caspase-9, caspase-3 and PARP. **Results** MTT assay showed that the extract significantly inhibited the viability of MDA-MB-231 cells, which can be diminished by the ROS inhibitor NAC and the caspase inhibitor Z-VAD-FMK. The marked increase in the production of ROS induced by the extract was observed with fluorescence microscopy. Flow cytometry showed that the PI positive staining cells increased significantly after the treatment of the extract, but was diminished by NAC. Caspase-9 and caspase-3 were activated after the treatment of the extract while the PARP was cleaved. TUNEL showed that a significant increase in apoptotic DNA fragmentation induced by the extract, which can be diminished by NAC and Z-VAD-FMK. **Conclusion** Ethyl acetate extract inhibited the MDA-MB-231 cells and induced apoptosis. The mechanism may involve with the mitochondrial damage due to the excessive ROS.

[Key words] *Euphorbia helioscopia*; MDA-MB-231 cells; triple-negative breast cancer; ROS; mitochondrial pathway; apoptosis

[作者简介] 王筱婧, 博士. Tel: (010)58699272; Email: xjwang6699@126.com

[通讯作者] 张海, 博士, 副主任药师. 研究方向: 中药复方制剂的二次创新开发与药物相互作用研究. Tel: (021)20261151; Email: zhxdks2005@126.com

在癌症治疗中, 严重不良反应及耐药性的产生是当今医学界关注的焦点^[1]。越来越多的研究表明, 传统中草药及其活性成分对癌症的治疗具有良好效果。目前已有许多中药提取物或活性单体化合物的抗癌活性被证实^[2]。发掘粗提物的生物活性是进一步进行单体研究的基础。乳腺癌是女性最常发

的肿瘤,也是女性主要的致死原因之一。其中,三阴乳腺癌(triple-negative breast cancers)发病率占所有乳腺癌的16%,因缺乏雌激素受体、孕酮受体和ERBB2/HER2基因扩增而得名^[3]。该病恶性程度高,对目前的靶向治疗易产生耐药^[4],因此寻找一种行之有效的替代疗法非常重要。

细胞凋亡在清除肿瘤细胞中起重要作用,促凋亡物质可以有效抑制肿瘤生长^[5]。细胞凋亡是一种程序化的细胞死亡,通过线粒体和死亡受体途径产生^[6]。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)的激活对上述两种途径至关重要,后续可以裂解许多蛋白,包括一些关键底物。细胞色素c(cytochrome-c)被释放到细胞质,与凋亡酶激活因子(Apaf-1)相结合,然后激活procaspase-9,caspase-9再募集和激活执行蛋白procaspase-3,从而引起细胞凋亡^[7]。

中药泽漆是大戟属植物泽漆 *Euphorbia helioscopia* L. 的干燥全草,分布于除新疆、西藏以外的我国各地。据《本草纲目》记载,泽漆有利水消肿、消痰退热、散结杀虫等功效。临床用于治疗腹水、水肿、肺结核、颈淋巴结核、痰多喘咳、癣疮以及癌症等。现代药理研究表明泽漆具有止咳平喘、抗菌及抗肿瘤作用^[8],但关于其在乳腺细胞凋亡方面的研究尚未见报道。基于细胞凋亡在肿瘤治疗中的重要性,本研究拟通过三阴乳腺癌细胞MDA-MB-231的细胞凋亡及相关信号途径来研究泽漆的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基(DMEM),胎牛血清(FBS),谷氨酰胺和青霉素/链霉素(美国GIBCO公司); β -actin(德国Santa Cruz Biotechnology公司);caspases-3,PARP(美国Cell Signaling Technology公司);抗caspase-9(美国Thermo Fisher Scientific公司);所有第二抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司);Z-VAD-FMK(美国Calbiochem公司);噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、2,7'-二氢荧光素(DCFH2-DA)均购自美国Sigma公司。本研究中使用的所有其他化学品均购自德国Merck公司及美国Sigma公司。

1.2 泽漆提取物的制备 泽漆药材购自安徽亳州药材市场,根据预实验,提取过程为:加8倍水浸泡45 min后,煎煮,2次 \times 2 h,合并提取液,浓缩为浸膏,醇沉72 h,醇沉浓度为70%,浓缩后依次以石油醚、乙酸乙酯萃取,取乙酸乙酯部分浓缩为浸膏,冷

藏备用。

1.3 细胞培养 三阴乳腺癌细胞株MDA-MB-231,雌激素受体阳性细胞株MCF-7和正常乳房上皮细胞株MCF-10A购自ATCC。MDA-MB-231和MCF-10A细胞在DMEM/F12(含有10% FBS,2 mmol/L谷氨酰胺,1%青链霉素)中培养,培养环境:37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。MCF-7于DMEM(含有10% FBS,2 mmol/L谷氨酰胺,0.5 mg/ml氢化可的松,10 mg/ml胰岛素,20 ng/ml人表皮生长因子,1%青链霉素)中培养,培养环境:37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。细胞种在24孔板上。

1.4 MTT法检测细胞活力 将培养好的细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 个/孔,加入不同浓度的泽漆提取物(0~400 μ g/ml),放入培养箱培养24 h,结束前2 h加入400 μ l 0.5 mg/ml MTT的二甲基亚砜(DMSO)溶液。取出后加入异丙醇和0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)混合液溶解MTT结晶。用酶标仪在570 nm处测吸光度。计算细胞活力,细胞相对活力=药物组吸光度/对照组吸光度 \times 100%。

1.5 活性氧(ROS)生成检测 用荧光显微镜法测定ROS生成量,主要操作:细胞与200 μ g/ml的泽漆提取物共培养,分别于15、30、45、60 min时间点取上清液,加入荧光探针DCFH2-DA(10 mmol/L),37 $^{\circ}$ C孵育30 min。通过检测由DCFH2-DA氧化而生成的二氯荧光黄(DCF)来考察细胞内ROS的生成。用荧光显微镜检测DCF染色的细胞数。用LS 5.0软件分析定量。计算相对荧光强度,即相对ROS生成量。

1.6 凋亡细胞的测定 用碘化丙啶(PI)染色法测定MDA-MB-231凋亡细胞率。主要操作为:提前1 h加入或不加入N-乙酰半胱氨酸(NAC,1 mmol/L)的MDA-MB-231细胞与泽漆提取物(200 mg/ml)共培养,分别于6、12、24 h时间点取细胞,胰蛋白酶消化,PBS洗2遍,离心(800 r/min)5 min。然后,制成细胞悬液,约 1×10^7 个/ml,取100 μ l,加入PI溶液(30 μ g/ml碘化丙啶,1.0 g/L Tritonx-100,37 mg/ml EDTA,1.0 g/L RNaseA),于室温进行染色,15 min,流式细胞仪检测,用CELLquest软件进行分析,统计MDA-MB-231细胞的凋亡率。

1.7 细胞凋亡DNA碎片检测 用TUNEL检测法检测细胞凋亡DNA碎片,主要过程为:用抑制剂(提前1 h)和泽漆提取物(200 mg/ml,24 h)处理细胞,收集凋亡细胞(2×10^4 个/孔,于8孔板),用4%甲醛固定,包埋在载玻片上。用biotin-dNTP标记

DNA 碎片 3'-OH 末端, 37 °C, 1.5 h, 然后载玻片与辣根过氧化物酶标记的抗生蛋白链菌素共孵育, 随后与 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 和 H₂O₂ 共孵育。荧光显微镜检测 DNA 碎片核荧光。取一方形区域, LS 5.0 分析定量荧光强度。相对荧光强度与凋亡细胞数成正比, 对照组细胞强度值设为 100%。

1.8 Western blot 法检测蛋白含量 MDA-MB-231 细胞 1×10⁶ 个/孔, 加入或不加入泽漆提取物 (0~200 μg/ml) 共孵育, 收集细胞, 用 PBS 洗 2 遍, 用 100 μl 裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH = 8, 320 mmol/L 蔗糖, 1% Triton X-100, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 混悬。细胞裂解液放置冰上 20 min, 离心 (15 000 r/min), 30 min, 4 °C。蛋白抽提物加入样品缓冲液 (62 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS, 10% 甘油, 5% β-巯基乙醇), 97 °C 煮沸 5 min。取等量蛋白 (50 mg) 上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 过夜, 用含 5% 脱脂乳粉和 1% 吐温-20 的 PBS 封闭 1 h, 加一抗过夜, 然后加辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗鼠抗体孵育 2 h, 化学发光法检测蛋白含量, 用 AlphaEase 软件做定量分析。

1.9 统计学分析 用方差分析法做统计分析, 多重比较用 Dunnett 法。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。所有数据统计用 SPSS18.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 泽漆提取物对人乳腺肿瘤细胞的抑制 对三阴性乳腺癌肿瘤细胞 MDA-MB-231、雌激素受体乳腺癌肿瘤细胞株 MCF-7 和正常乳房上皮细胞 MCF-10A 分别用不同浓度的泽漆提取物 (50、100、150、200、400 μg/ml) 处理 24 h。结果显示, 泽漆提取物能抑制 3 种细胞的活力, 尤其对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用最为明显, 且呈剂量依赖性 (图 1)。

2.2 泽漆提取物诱导 ROS 产生 过量 ROS 的产生会损伤线粒体, 从而导致 MDA-MB-231 细胞凋亡。实验结果表明, MDA-MB-231 细胞与泽漆提取物共孵育, ROS 生成从 15~45 min 显著提高。而提前 1 h 加入 ROS 抑制剂 NAC, ROS 生成变化不大 (图 2A)。而 MTT 试验结果显示, ROS 抑制剂 NAC 能显著消除泽漆提取物对 MDA-MB-231 的细胞毒作用 (图 2B)。

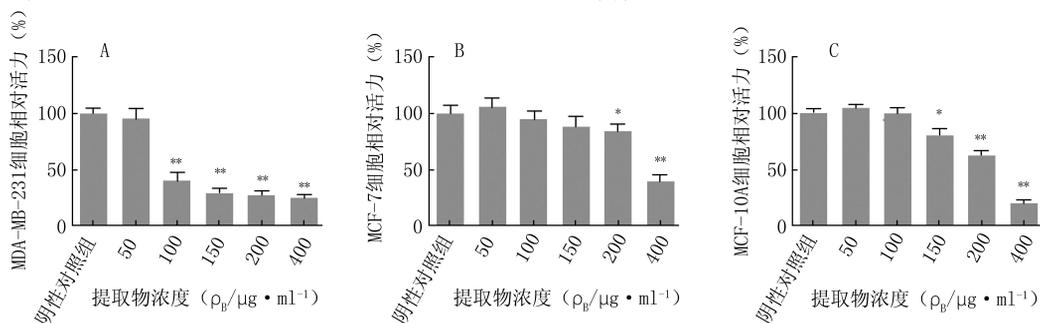


图 1 不同浓度泽漆提取物对 3 种细胞活力的影响

A. MDA-MB-231; B. MCF-7; C. MCF-10A

* P<0.05; ** P<0.01, 与阴性对照组比较

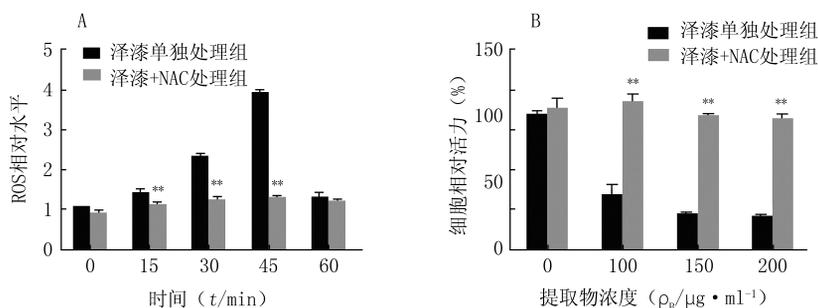


图 2 不同时间点泽漆提取物单独处理与加入 NAC 对

MDA-MB-231 细胞 ROS 生成及对细胞活力的影响

A. ROS 相对水平; B. 细胞相对活力; ** P<0.01, 与泽漆单独处理组比较

2.3 泽漆提取物诱导乳腺肿瘤 MDA-MB-231 细胞凋亡 为确认泽漆提取物是否导致后续细胞凋

亡,本实验采用碘化丙啶(PI)染色法测定 MDA-MB-231 凋亡细胞率。实验结果显示,泽漆提取物与 MDA-MB-231 细胞株共培养,PI 染色阳性细胞数从 6~24 h 逐渐增加,提示后续细胞凋亡逐渐增加。在 6、12、24 h 的细胞凋亡率分别为 33.5%、78.2% 和 93.1%。而提前用 ROS 抑制剂 NAC (1 mmol/L)处理显著抑制了泽漆提取物诱导的细胞凋亡;在 12 和 24 h 凋亡率分别为 18.6% 和 20.8%。以上结果进一步证明,泽漆提取物诱导的 ROS 生成,导致了后续的细胞凋亡(图 3)。

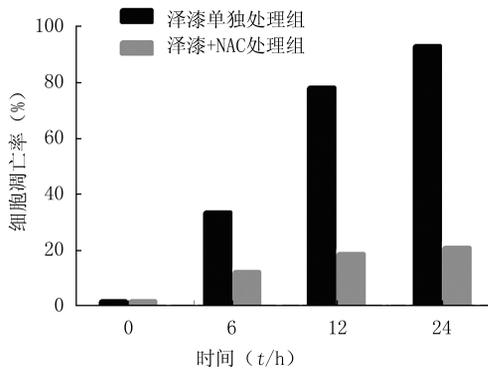


图 3 不同时间点泽漆提取物单独处理与加入 NAC 对细胞凋亡率的影响

2.4 泽漆提取物通过线粒体途径诱导细胞凋亡

Western blot 试验结果显示,用泽漆提取物处理前,procaspase-9 和 procaspase-3 大部分表达为非激活形式。而经过泽漆提取物处理后开始裂解为活性形式,且呈剂量依赖性(200 mg/ml, 24 h)。泽漆提取物处理后的细胞 caspase-3 水平明显提高。Caspase-3 能剪切 DNA 修复酶 PARP,而 PARP 剪切是细胞凋亡的一个重要指标。试验结果发现 caspase-3 将分子量 116 000 的 PARP 剪切为 89 000 的碎片(图 4)。MTT 试验结果显示,caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 能显著消除泽漆提取物对 MDA-MB-231 的细胞毒作用(图 5)。

2.5 泽漆提取物诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡后的 DNA 碎片 采用 TUNEL 法检测泽漆提取物诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡后的 DNA 碎片。结果显示,经泽漆提取物处理后,DNA 碎片明显增多,而提前加入 ROS 抑制剂 NAC 和 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 能够使泽漆提取物诱导凋亡的 DNA 碎片明显减少(图 6)。

3 讨论

三阴乳腺癌因其耐药性强、恶性高和预后差,给临床治疗带来很大难度。诱导肿瘤细胞凋亡,抑制

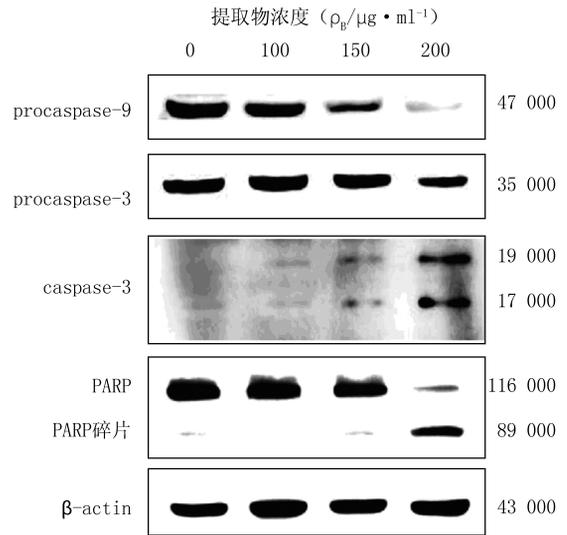


图 4 不同浓度泽漆提取物处理前后线粒体凋亡途径相关蛋白表达变化

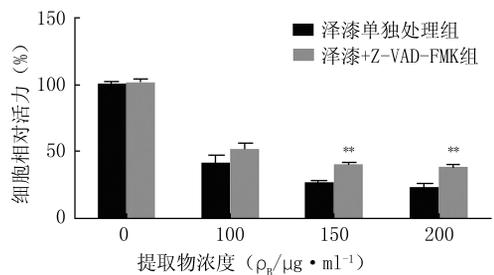


图 5 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 对泽漆对 MDA-MB-231 细胞毒作用的影响

** P<0.01,与泽漆单独处理组比较

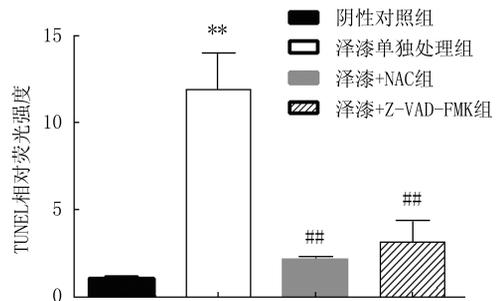


图 6 泽漆提取物单独处理与加入 NAC 或 Z-VAD-FMK 对细胞凋亡率的影响

** P<0.01,与阴性对照组比较;

P<0.01,与泽漆单独处理组比较

其生长或保持其静止状态能有效控制癌症的发展^[5]。本研究发现泽漆提取物能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的生长。大量研究发现 ROS 的过量生成能损伤线粒体,从而引起细胞凋亡^[9]。Elumalai 等^[10]研究发现印楝内酯诱导的线粒体膜电位去

益视明目颗粒对改善视疲劳具有良好的临床基础,使用人群广泛。作为院内制剂,其质量控制方法已落后于市场同类产品,应及时更新其检测标准。本实验进一步完善了益视明目颗粒的质量控制方法,以使其更安全、有效地为患者使用。

【参考文献】

[1] 汪建龙.枸杞多糖药理作用的研究进展[J].时珍国医国药,

2005,16(10):1032-1033.

[2] 郑汉成,蔡少青.药用植物学与生药学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2004:393.
 [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:76-77.
 [4] 闫根全.丹参素钠的提取及注射用丹参素钠的研制[D].成都:四川大学,2007:6-123.

[收稿日期] 2016-10-16 [修回日期] 2017-01-06

[本文编辑] 李睿旻

(上接第340页)

极化能引起细胞凋亡因子的释放,最终导致细胞死亡。Hseu等^[11]研究发现,线粒体损伤与初期ROS的水平升高有关,随之引起细胞色素c释放进入细胞质和caspases激活,从而导致细胞凋亡。

本研究结果发现,用泽漆提取物处理MDA-MB-231细胞,可引起ROS的大量释放。PI染色法试验表明,泽漆提取物最终导致MDA-MB-231细胞的凋亡。而提前加入ROS抑制剂NAC,显著抑制了细胞凋亡,进一步证明泽漆提取物诱导的细胞凋亡是由其引起的ROS大量释放导致的。线粒体途径的细胞凋亡可由细胞支架破裂、DNA损伤和ROS蓄积引起^[12]。Caspase-9是线粒体途径的启动因子,可由细胞色素c的释放或与Apaf-1结合而激活。激活后的caspase-9随之募集和激活执行caspase,主要为caspase-3。Caspase-3由procaspase-3裂解为激活形式,可剪切PARP,从而导致细胞最终死亡^[7]。研究发现,PARP是一种DNA修复酶,其碎片可作为线粒体途径细胞凋亡的标志性产物^[10]。细胞凋亡过程中,发现procaspase-9发生裂解,而caspase-3则是引起细胞凋亡的执行因子^[12]。Western blot试验结果显示,泽漆提取物处理后的细胞procaspase-9、procaspase-3和PARP水平明显降低,caspase-3及PARP水平明显升高,且呈剂量依赖性,表明泽漆提取物很可能通过线粒体途径引起MDA-MB-231细胞凋亡。而提前加入ROS抑制剂NAC和caspase抑制剂Z-VAD-FMK能使泽漆提取物诱导凋亡的DNA碎片明显减少,进一步证明了上述推断。综上所述,泽漆提取物可有效抑制MDA-MB-231细胞的生长,诱导其凋亡,其作用机制可能与ROS生成过量所致的线粒体损伤途径有关。

【参考文献】

[1] Campbell RA, Bhat-nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance

[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 9817-9824.

[2] Hseu YC, Lee CC, Chen YC, et al. Antrodia salmonea in submerged culture exhibits antioxidant activities in vitro and protects human erythrocytes and low-density lipoproteins from oxidative modification[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 66(4): 150-157.
 [3] Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers[J]. Nature, 2012, 486(7403): 395-399.
 [4] Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(3): 235-244.
 [5] Wang K, Zhang C, Bao J, et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death[J]. Sci rep, 2016, 6: 26064.
 [6] Jeong HS, Choi HY, Lee ER, et al. Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(1): 80-90.
 [7] Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. Cell, 2000, 102(1): 1-4.
 [8] 杨莉,陈海霞,高文远.泽漆化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2007,38(10):1585-1589.
 [9] D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, et al. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(10): e891.
 [10] Elumalai P, Gunadharini DN, Senthikumar K, et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway[J]. Toxicol Lett, 2012, 215(2): 131-142.
 [11] Hseu YC, Lee CC, Chen YC, et al. The anti-tumor activity of Antrodia salmonea in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells is mediated via the induction of G(1) cell-cycle arrest and apoptosis in vitro or in vivo[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(2): 499-510.
 [12] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(4): a008656.

[收稿日期] 2017-05-27 [修回日期] 2017-07-03

[本文编辑] 李睿旻