

汉防己碱衍生物诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡*

黄晏军^{1,2**}, 汤长宁^{1,2}, 杨 爽^{1,2}, 潘卫东³, 刘杰麟^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 组织工程与干细胞中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州省天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨汉防己碱衍生物 YZ-18 对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长、集落形成能力以及凋亡的影响, 并分析可能的药物干预机制。方法: 采用不同浓度汉防己碱衍生物 YZ-18 干预人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后, 通过 MTT 法检测细胞的增殖抑制率, 集落形成实验检测细胞克隆形成能力, FCM 法检测细胞凋亡率, 蛋白印迹法检测细胞中 BLM 及乳腺癌易感基因 1 (BRCA1) 蛋白表达水平。结果: 不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 处理细胞后, 细胞增殖生长明显受到抑制 ($P < 0.05$), 细胞克隆能力明显减弱 ($P < 0.001$), 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$), BLM 蛋白表达上调, BRCA1 蛋白表达下调, 且具有浓度依赖性。结论: 汉防己碱衍生物 YZ-18 可抑制人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与 BLM 蛋白表达上调, BRCA1 蛋白表达下调有关。

[关键词] 汉防己碱; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; BLM 蛋白质; BRCA1 蛋白质

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0125-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.002

Tetrandrine Derivatives Induces the Apoptosis of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

HUANG Yanjun^{1,2}, TANG Changning^{1,2}, YANG Shuang^{1,2}, PAN Weidong³, LIU Jielin^{1,2}

(1. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of tetrandrine derivatives YZ-18 on proliferation, colony formation and apoptosis of human triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231, and to analyze the possible mechanism of drug intervention. **Methods:** The triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell were treated with different concentrations of tetrandrine derivatives YZ-18, the cell proliferation was measured by MTT assay, the colony forming ability was detected by colony forming assay, flow cytometry assay was adopted to analyze the cell apoptosis rate, the cell protein expression levels of BLM and BRCA1 were detected by Western blotting assay. **Results:** After the triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell were treated with various concentration of tetrandrine derivatives YZ-18, the cell proliferation was obviously suppressed ($P < 0.05$), cell colony forming ability was inhibited ($P < 0.001$), the cell apoptosis rate was increased ($P < 0.01$), and the expression levels of BLM proteins were up regulated, and that of BRCA1 was down regulated, concentration dependency was discovered. **Conclusion:** Tetrandrine derivatives YZ-18 can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell. The mechanism may be connected with up-regulating BLM proteins and down regulating BRCA1 proteins.

[Key words] tetrandrine; breast neoplasms; cell proliferation; apoptosis; BLM protein; BRCA1 protein

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360349); 贵州省应用基础研究计划重大专项子课题[黔科合 J 重大字(2015)2003]; 贵州省普通高等学校创新人才团队建设项目[黔教合人才团队字(2015)]

** 贵州医科大学 2015 级硕士研究生, 现工作单位为南充市中心医院

*** 通信作者 E-mail: 779713773@qq.com

网络出版时间: 2019-02-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.002.html>

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,占女性恶性肿瘤发病率的 29%,其中三阴性乳腺癌是不表达雌激素受体、人表皮生长因子受体-2 (HER2) 和孕激素受体的恶性肿瘤,该类乳腺癌治疗预后差、复发转移率高、死亡率较高,已成为近年来科研学者研究的焦点。由于三阴性乳腺癌患者缺少相应受体的表达,因此患者无法从针对乳腺癌的靶向治疗中获益。化疗是目前较常用的治疗方法,许多新型的化疗药物也正在研究之中^[1-2]。汉防己碱又名汉防己甲素,属于双苄基易啉类生物碱,是一种由粉防己的根部提取的中药成分,早期的研究表明汉防己碱具有抗感染、镇痛等多种临床功效,临床用于治疗心血管疾病、矽肺和免疫性疾病等^[3]。除此之外,汉防己碱衍生物的功效也在研发探索过程中,部分衍生物在抑制肿瘤细胞生长方面有良好的效果。BLM 解旋酶参与了 DNA 复制、重组、损伤修复等一系列过程^[4]。乳腺癌易感基因 1 (BRCA1) 主要参与了 DNA 损伤修复信号通路的调节^[5]。课题组前期研究发现汉防己碱衍生物能够调节 DNA 损伤修复信号通路,抑制乳腺癌细胞的生长,如汉防己碱衍生物 P-42、汉防己碱衍生物 HL-42 和汉防己碱衍生物 HL-49 均能诱导人乳腺癌细胞凋亡,其机制可能与 DNA 损伤修复相关蛋白表达有关^[6-7]。本文将探讨汉防己碱衍生物 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞增殖和诱导的影响,并探讨其诱导凋亡的机制,以寻找药物治疗三阴性乳腺癌的新途径,为新型抗肿瘤药物的研制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

汉防己碱衍生物 YZ-18 由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供。DMEM 高糖培养液购自 HyClone 公司,细胞培养用的胎牛血清购自天杭生物科技有限公司,MTT 试剂购自索莱宝科技公司,细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI 双染) 购自天根生化科技公司,一抗 (兔抗人 β -actin 单克隆抗体、BLM 多克隆抗体、BRCA1 多克隆抗体) 以及二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体) 购自博奥森生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 TNBC MDA-MB-231 细胞保存在贵州医科大学组织工程与干细胞研究中心,使用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和

100 mg/L 链霉素) 的高糖 DMEM 培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。

1.2.2 MDA-MB-231 细胞增殖检测 采用 MTT 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖情况。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板 (按照每孔 2.5×10^4 个细胞),待细胞贴壁生长后,分别加入不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用细胞 (药物终浓度为 0、0.5、1.2、4.8、16 $\mu\text{mol/L}$)。分别培养 1、2 和 3 d 后,每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL ,于培养箱中孵育 4 h,弃上清液后,每孔加入 DMSO 150 μL 溶解结晶,采用酶标仪测定各药物处理组吸光度 (OD 值),每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次,并计算各药物处理组细胞的增殖抑制率 [细胞增殖抑制率 = (对照组 OD - 实验组 OD) / 对照组 OD] $\times 100\%$],并计算不同浓度汉防己碱衍生物 YZ-18 作用不同时间的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

1.2.3 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力检测 集落形成实验检测 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板 (按照每孔 3×10^2 个细胞),待细胞贴壁生长后,分别加入不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用细胞 (终浓度为 0、0.25、0.5、1.25、5 $\mu\text{mol/L}$)。药物作用 2 d 后换为正常培养液继续培养。7 d 后终止培养,弃上清液后,甲醇溶液固定细胞,行 Giemsa 染色,倒置显微镜下观察集落生长情况,每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次,并计算各药物处理组细胞集落形成数目。

1.2.4 MDA-MB-231 细胞的凋亡检测 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞的凋亡情况。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板 (按照每孔 2×10^5 个细胞),待细胞贴壁生长后,分别加入不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用细胞 (终浓度为 0、1、8 $\mu\text{mol/L}$)。药物作用 2 d 后,收集各药物处理组细胞,先加入 Annexin V-FITC 染色液避光染色后,再加入 PI 染色液避光染色,染色后立即用流式细胞仪检测各组的凋亡率,每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.5 MDA-MB-231 细胞中 BLM、BRCA1 蛋白表达水平检测 Western blot 法检测 MDA-MB-231 细胞 BLM、BRCA1 蛋白表达水平。汉防己碱衍生物 YZ-18 作用后取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板 (按照每孔 2×10^5 个细胞),待细胞贴壁生长后,分别加入不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用细胞 (终浓度为 0、1、8 $\mu\text{mol/L}$)。作用

2 d 后,收集各药物处理组细胞,裂解液冰上裂解细胞,提取总蛋白,并测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳后湿法转膜,与兔抗人 β -actin、BLM、BRCA1 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,与二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,加入 ECL 化学发光试剂后立即使用化学发光仪检测蛋白条带,每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

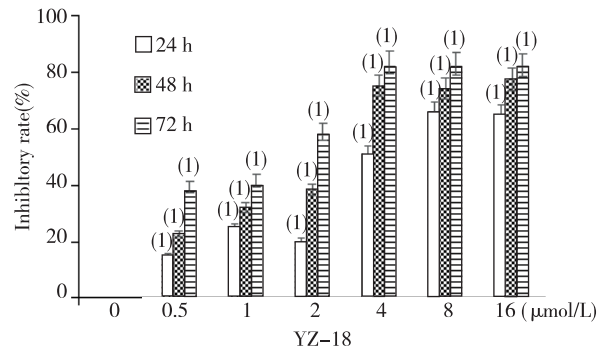
以上实验均独立重复 3 次。应用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计分析,计量资料多组间比较采用方差分析,组内比较采用 *LSD-t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉防己碱衍生物 YZ-18 可抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖活性

分别用不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用 MDA-MB-231 细胞 1、2 和 3 d 后,通过 MTT 法检测细胞的增殖活性。结果显示,与对照组相比,用不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18(药物终浓度为 0.5、1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$)作用 MDA-MB-231 细胞 1、2 和 3 d 后均能抑制细胞的增殖($P < 0.05$),且呈现药物浓度和处理时间依赖性,见图 1。YZ-18 作用 MDA-MB-231 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为

(3.89 \pm 0.27)、(2.97 \pm 0.34)、(1.59 \pm 0.13) $\mu\text{mol/L}$ 。



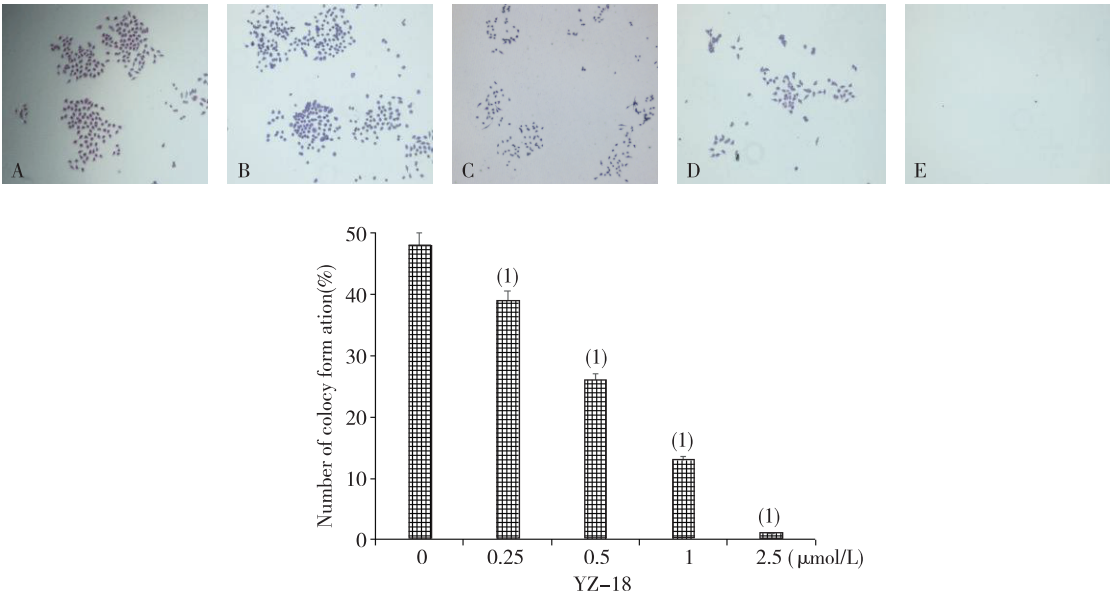
(¹)与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$

图 1 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effect of YZ-18 on the proliferation of MDA-MB-231 cells by MTT assay

2.2 汉防己碱衍生物 YZ-18 可抑制 MDA-MB-231 细胞的克隆形成能力

分别用不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用细胞 2 d,继续培养 1 周后,通过平板集落形成实验检测各药物浓度组 MDA-MB-231 细胞的集落形成数量。结果显示,与对照组相比,不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18(药物终浓度为 0.25、0.5、1、2.5 $\mu\text{mol/L}$)干预 MDA-MB-231 细胞后,各药物作用组集落数量均明显减少($P < 0.001$),且呈现出药物浓度依赖性。见图 2。



注:A~E 分别为 0、0.25、0.5、1、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组;(¹)与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$

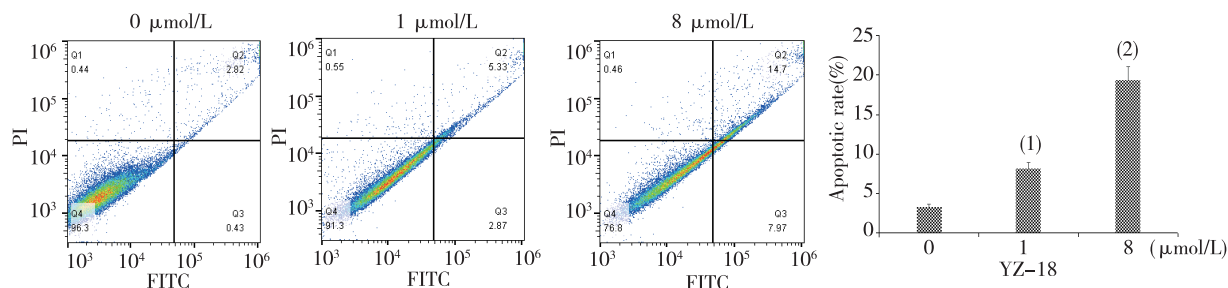
图 2 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响(Giemsa, $\times 400$)

Fig. 2 The effect of YZ-18 on clone formation of MDA-MB-231 cells was detected by plate clone formation assay

2.3 汉防己碱衍生物 YZ-18 可促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡

分别用不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用 MDA-MB-231 细胞 2 d 后,采用流式细胞仪观察各药物浓度组细胞的凋亡情况。结果显示,与对照

组相比,不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 (药物终浓度为 1 和 8 $\mu\text{mol/L}$) 干预 MDA-MB-231 细胞后,各药物浓度处理组 MDA-MB-231 细胞的凋亡率均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。且呈现药物浓度依赖性。见图 3。



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

图 3 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 3 The effect of YZ-18 on apoptosis of MDA-MB-231 cells

2.4 汉防己碱衍生物 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞中 BLM、BRCA1 蛋白表达水平的影响

分别用不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 作用 MDA-MB-231 细胞 2 d 后,采用 Western blot 法检测各药物浓度组 MDA-MB-231 细胞中 BLM、BRCA1 蛋白表达情况。结果显示,与对照组相比,不同浓度的汉防己碱衍生物 YZ-18 (药物终浓度为 1 和 8 $\mu\text{mol/L}$) 干预 MDA-MB-231 细胞后,细胞中 BLM 蛋白表达上调, BRCA1 蛋白表达下调,且呈现药物浓度依赖性。见图 4。

物,汉防己碱能够抑制胃癌、结直肠癌、等多种恶性肿瘤细胞的生长,也陆续报道了在诱导细胞凋亡方面的部分作用机制。有探索发现,汉防己碱能够抑制结肠癌细胞异种移植后的生长^[8],通过激活胞内线粒体中 Caspase 相关蛋白途径来诱导胃癌细胞的凋亡^[9],发现汉防己碱可以作为细胞膜 Ca^{2+} 通道阻断剂和 Ca^{2+} 通道拮抗剂来抑制肿瘤生长^[10]。汉防己碱可诱导成纤维细胞的凋亡,与此同时,在 TGF- β 引导心脏成纤维细胞激活的过程中,它还可以阻断其激活途径^[11]。Tian 等^[12]在研究汉防己碱干预人骨肉瘤细胞的增殖时发现汉防己碱主要是通过上调 PTEN 通路起作用。在研究汉防己碱诱导结肠癌细胞的凋亡时,He 等^[13]发现其机制可能与其调节 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,Chen 等^[14]发现可能与其调节 PI3K/Akt 信号通路转导进而诱导结肠癌细胞凋亡。Zhang 等^[15]发现它在肝细胞癌体内转移方面起着关键的作用,可以干预细胞的转移。

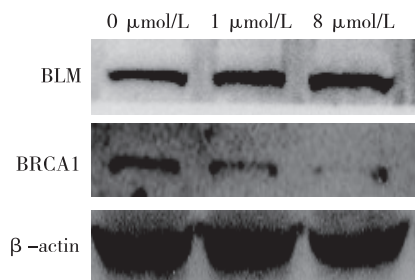


图 4 YZ-18 对 MDA-MB-231 细胞中 BLM、BRCA1 蛋白表达水平的影响

Fig. 4 The effect of YZ-18 on protein expression of BLM, BRCA1 in MDA-MB-231 cells

3 讨论

汉防己碱作为传统的中药成分,目前临床上主要用于抗感染、镇痛、控制血压等^[3],大量研究表明,汉防己碱可以作为肿瘤化学疗法的一个潜在药

本实验通过 MTT 实验检测发现,用 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己碱衍生物 YZ-18 干预 MDA-MB-231 细胞 1、2 和 3 d 后均能抑制细胞的增殖 ($P < 0.05$)。呈现药物浓度和处理时间依赖性。集落形成实验结果表明,汉防己碱衍生物 YZ-18 干预 MDA-MB-231 细胞 2 d 后,继续常规培养时细胞克隆形成能力明显减弱,且抑制效应呈现处理浓度依赖性。通过流式细胞术检测发现,汉防己碱衍生物 YZ-18 干预细胞后,可促进细胞的凋亡,且凋亡效应依赖药物浓度。以上实验结果表明,YZ-18 能够

有效抑制人三阴性乳腺癌细胞的生长,并诱导其凋亡。为了深入探讨 YZ-18 干预抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的可能机制,本实验继续检测了 BLM 蛋白和 BRCA1 蛋白的表达。

DNA 损伤普遍存在于真核细胞中,紫外线照射、电离辐射以及化学制剂等各种因素均能导致 DNA 损伤,其中最严重的是 DNA 双链断裂(DSB)。发生 DSB 后可引起细胞凋亡、细胞周期阻滞,此时胞内 DNA 损伤修复应答开始发挥作用^[16]。人类 RecQ DNA 解旋酶家族中有 RECQ1、BLM、WRN、RECQ4 和 RECQ5 等 5 种 RecQ 解旋酶,主要是维持细胞基因组的稳定^[4]。BLM 蛋白作为细胞内重要的 DNA 损伤修复酶,当基因因外力因素导致 DNA 双链发生损伤时,可以通过代偿性表达 BLM 解旋酶来发挥 DNA 损伤修复功能^[17]。BRCA1 作为 DNA 损伤修复信号通路的重要调节蛋白,能够维持基因组的稳定,主要是通过激活 DNA 损伤修复的调控点起作用^[18]。比如在同源重组修复过程中,主要是通过以 BRCA1 为中心的复合物感知 DNA 损伤,继而引导同源重组修复的关键酶(Rad51)启动同源重组途径,对损伤的 DNA 进行修复^[19]。除此之外,BLM 解旋酶、拓扑异构酶 III α 、RecQ 介导的基因组不稳定蛋白 1(RMI1)和 RecQ 介导的基因组不稳定蛋白 2(RMI2)可以形成 BTR 复合物,该复合物与 Rad51、BRCA1 相互作用进而在同源重组修复过程中分解 dHJ,修复 DNA 双链断裂^[20]。总之,BLM 蛋白和 BRCA1 蛋白均与 DNA 损伤修复有关。本实验发现,YZ-18 干预乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后,细胞中 BLM 蛋白表达量明显高于对照组,BRCA1 蛋白明显低于对照组,表达水平明显依赖药物浓度。据以上实验数据推测,可能是由于汉防己碱衍生物 YZ-18 处理细胞后导致了胞内 DNA 的损伤,进而诱导 DNA 损伤修复应答,BLM 蛋白通过表达上调,BRCA1 蛋白通过表达下调,参与 DNA 损伤修复应答,同时引导相关凋亡信号的激活,引起细胞凋亡,抑制细胞增殖。

综上,本次实验发现汉防己碱衍生物 YZ-18 干预后,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和集落形成能力均受到抑制,凋亡率增加。推测可能的机制是,汉防己碱衍生物 YZ-18 可以通过调节 DNA 损伤修复途径进而调控胞内凋亡信号通路的传导。因此本实验为汉防己碱衍生物 YZ-18 作为抗肿瘤新药的研发应用提供了可靠的研究证据。

4 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(1):7-30.
- [2] WAHBA H A, EL-HADAAD H A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer[J]. Cancer Biol Med, 2015,12(2):106-116.
- [3] XU W, DEBEB B G, LACERDA L. Tetrandrine, a compound common in Chinese traditional medicine, preferentially kills breast cancer tumor initiating cells (TICs) in vitro[J]. Cancers (Basel), 2011,3(2):2274-2285.
- [4] 肖芸,张爱华. 人类 RecQ 解旋酶在 DNA 损伤修复通路中的作用[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2010,22(2):157-160.
- [5] OHTA T, SATO K, WU W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair[J]. FEBS Lett, 2011,585(18):2836-2844.
- [6] 晏文涛,潘卫东,刘柏岑,等. 汉防己甲素衍生物 P-42 对人乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响及机制探讨[J]. 山东医药, 2016,56(18):1-4.
- [7] 吴翱兰,张荣红,黄晏军,等. 汉防己甲素衍生物对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及其机制[J]. 肿瘤, 2016,36(18):1320-1329.
- [8] HE B C, GAO J L, ZHANG B Q. Tetrandrine inhibits Wnt/ β -catenin signaling and suppresses tumor growth of human colorectal cancer[J]. Mol Pharmacol, 2011,79(2):211-219.
- [9] QIN R, SHEN H L, CAO Y. Tetrandrine induces mitochondria mediated apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cell[J]. PLo S One, 2013,8(10):1-10.
- [10] LI S, JI Z S, ZOU M J. Preparation, characterization, pharmacokinetics and tissue distribution of solid lipid nanoparticles loaded with tetrandrine[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2011,12(3):1011-1018.
- [11] LI Q, CHANG L, SU D M. Effects of tetrandrine on proliferation and activation of cardiac fibroblasts[J]. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2018,50(2):331-334.
- [12] TIAN D D, ZHANG R X, WU N. Tetrandrine inhibits the proliferation of human osteosarcoma cells by upregulating the PTEN pathway[J]. Oncol Rep, 2017,37(5):2795-2802.
- [13] HE B C, GAO J L, ZHANG B Q. Tetrandrine inhibits Wnt/ β -catenin signaling and suppresses tumor growth of human colorectal cancer[J]. Mol Pharmacol, 2011,79(2):211-219.

(下转第 140 页)