

黄癸素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用及对 NF- κ B、P65、P53 蛋白表达的影响

陈湖海¹, 黄涛²

1. 广州军区武汉总医院药剂科, 湖北 武汉 430070; 2. 广州军区武汉总医院乳腺科, 湖北 武汉 430070

摘要: **目的** 探讨黄癸素(α -羟基- δ -癸酰乙基磺酸小檗碱)对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用及对核转录因子(NF)- κ B、P65、P53 蛋白表达的影响。**方法** 体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,分别加入不同终浓度黄癸素(0.4 mg/L、0.8 mg/L、1.6 mg/L、3.2 mg/L、6.4 mg/L)处理作为实验组,未用黄癸素处理的细胞作为对照组。采用噻唑蓝(MTT)比色法、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色法、碘化丙啶(PI)单染流式细胞术、AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术、Western bolt 法,分别检测黄癸素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用、细胞凋亡形态、细胞周期各时相细胞比例、细胞凋亡水平和 NF- κ B、P65、P53 蛋白表达水平的影响。**结果** 经黄癸素处理后,5 个浓度实验组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率随黄癸素浓度的增加而递增($P < 0.01$),呈药物剂量依赖性;不同浓度实验组培养 48 h 的细胞增殖抑制率明显高于培养 24 h(P 均 < 0.01);培养 24 h 的半抑制浓度(IC_{50}) = 3.03 mg/L,培养 48 h 的 IC_{50} = 2.00 mg/L。1.6 mg/L 和 3.2 mg/L 两个实验组作用 48 h 后,随黄癸素浓度的增加(0 \rightarrow 1.6 mg/L \rightarrow 3.2 mg/L),MDA-MB-231 细胞 G0/G1 期百分数递增($P < 0.01$),G2/M 期百分数基本不变($P > 0.05$),S 期细胞百分数则递减($P < 0.01$);细胞凋亡率递增($P < 0.01$);NF- κ B 表达水平递减, P53、P65 蛋白表达水平递升;均呈剂量依赖性。**结论** 黄癸素具有明显抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的作用,且呈药物-剂量依赖性,其可能通过下调 NF- κ B,上调 P65、P53 蛋白表达诱导细胞凋亡。

关键词: 黄癸素; 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞; 增殖抑制; 核转录因子- κ B; P65 蛋白; P53 蛋白

中图分类号: R-33 R 737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)07-0884-04

Inhibiting effect of HB on cell proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells and its impact on expressions of NF- κ B, P65 and P53 proteins

CHEN Hu-hai*, HUANG Tao

*Department of pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract: Objective To investigate the inhibiting effect of berberine α -hydroxy δ -decanoylethyl sulfonate (HB) on cell proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells and the impacts on the expressions of nuclear transcription factor (NF- κ B), P65 and P53 proteins. **Methods** The human breast cancer MDA-MB-231 cells were cultured in vitro. Different final concentrations of HB (0.4 mg/L, 0.8 mg/L, 1.6 mg/L, 3.2 mg/L, 6.4 mg/L) were added into the cell culture liquid (experiment groups), and the cells that were not treated with HB were served as control group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method, 4',6- two -2- guanyl phenylindole (DAPI) staining method, propidium iodide (PI) staining and flow cytometry, AnnexinV-FITC/PI double staining flow cytometry, Western bolt method were used to respectively detect the effects of HB on inhibiting proliferation of MDA-MB-231 cells, the morphology of apoptosis, the proportion of cells in different cycle phase, the level of apoptosis, the expression levels of NF- κ B, P65 and P53 proteins. **Results** After being treated by HB, the proliferation inhibiting rates of MDA-MB-231 cells in experiment groups increased in proportion to the increase of HB concentration ($P < 0.01$) with drug dose-dependent manner. The cell proliferation inhibiting rates 48 hours after culture in experiment groups were all significantly higher than those at 24-hour after culture (all $P < 0.01$). The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was 3.03 mg/L at 24-hour after culture and was 2.00 mg/L at 48-hour after culture. In experiment groups with 1.6 mg/L and 3.2 mg/L of HB, with increase of HB concentration (0 \rightarrow 1.6 mg/L \rightarrow 3.2 mg/L) 48 hours after treatment, the percentage of MDA-MB-231 cells in G0/G1 periods increased ($P < 0.01$); the per-

centage in G2/M period basically unchanged ($P > 0.05$); the percentage in S period decreased ($P < 0.01$); the cell apoptosis rate increased ($P < 0.01$); the expression level of NF- κ B decreased, and the expression levels of P53 and P65 proteins increased all with dose-dependent manner. **Conclusions** HB has a significant inhibition effect on the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells with drug-dose dependent manner, and the mechanism may be cell apoptosis induced by down-regulation of NF- κ B and up-regulation of P65 and P53 proteins expressions.

Key words: Berberine α -hydroxy δ -decanylethyl sulfonate; Human breast cancer MDA-MB-231 cells; Proliferation inhibition; Nuclear transcription factors- κ B; P65 protein; P53 protein

乳腺癌是常见的一种女性恶性肿瘤,该病发生于乳腺小叶或导管上皮,其发病率占各种恶性肿瘤的 7%~10%^[1]。近年来,流行病学调查发现乳腺癌发病率呈不断上升趋势^[2]。黄葵素是新鱼腥草素钠和盐酸小檗碱经离子配对形成的一种化合物^[3]。近年研究发现,黄葵素具有良好的抗肿瘤作用,对肿瘤细胞具有一定抑制作用,且还可明显抑制肿瘤转移和诱导细胞凋亡^[4-5]。本研究分析黄葵素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用及对核转录因子(NF)- κ B、P65、P53 蛋白表达的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购于武汉博士德生物工程有限公司,黄葵素购于湖南省中医药研究所。

1.2 主要仪器和试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),0.25% 胰酶(美国 Hyclone),二甲基亚砜(DMSO,天津科密欧化学试剂有限公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物生产)。酶标仪(美国 Thermo 公司),FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 分为正常对照组和实验组 5 个组(根据黄葵素终浓度不同分为:0.4 mg/L、0.8 mg/L、1.6 mg/L、3.2 mg/L、6.4 mg/L 组),共 6 组。

1.3.2 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,接种至培养瓶,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,每日换 1 次培养液,每 2 天至 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.3 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞抑制作用 取上述对数生长期 MDA-MB-231 细胞,采用胰酶给予消化,将其稀释为单细胞悬液,计数,根据 1×10^4 个/孔细胞数接种于 96 孔细胞培养板中,放置于 37 °C、5% CO₂ 恒温孵育箱中培养,培养 24 h 后取出 96 孔培养板,将旧培养基吸去,实验组加入含不同浓度黄葵素的新培养基,每孔终体积为 200 μ l,每个剂量组

设复孔 4 个,分别培养 24、48 h,将 96 孔培养板中旧培养基弃去,于每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,以 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 4 h 后,弃去上清液,再加入 DMSO 150 μ l/孔,震荡 10 min,进行检测,波长为 570 nm。抑制率(%) = (OD570 对照孔-OD570 加药孔)/OD570 对照孔,根据抑制率计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.3.2 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色法观察细胞凋亡形态 取对数期 MDA-MB-231 细胞悬液,以 1×10^4 个/孔于 24 孔板中放入已灭菌的细胞爬片,盖好,孵育过夜,加入浓度为 1.6、3.2 mg/L 黄葵素,终体积为 2 ml/孔。培养 48 h,取出 24 孔培养板,弃去废液,4 °C 预冷,再使用 PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,加入 2 ml 的 1 μ g/ml DAPI 染色液染色 15 min,取出爬片,自然风干,封片液封片,荧光显微镜观察,激发波长 350 nm,发射波长 460 nm。

1.3.3 碘化丙啶(PI)单染流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中,每孔细胞计数为 1×10^4 个,待贴壁后,弃去上清液,加入浓度为 1.6、3.2 mg/L 黄葵素,终体积为 2 ml/孔。孵育 48 h,胰酶消化,收集细胞,用预冷 PBS 洗细胞两次。加入预冷的 70% 乙醇,于 4 °C 固定过夜。离心(1 200 rpm,3 min)收集细胞,用 PBS 洗细胞一次,加入 500 μ l PBS 缓冲液(含 50 μ g/ml PI,100 μ g/ml RNase A,0.2% Triton X-100),4 °C 避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测,结果用细胞周期拟合软件 ModFit 分析。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡 取对数期 MDA-MB-231 细胞以 1×10^4 接种于 6 孔板中,待贴壁后,弃去上清液,加入浓度为 1.6、3.2 mg/L 黄葵素,终体积为 2 ml/孔。孵育 48 h,胰酶消化(胰酶消化时间不易过长,以防引起假阳性),收集细胞,然后使用 pH 值 = 7.4 预冷 PBS 清洗 3 次,用 PBS 重悬细胞,计数,使每管 0.1 ml 含 $(1 \sim 5) \times 10^4$ 细胞;再次离心收集细胞沉淀,用 400 μ l Binding Buffer 悬浮细胞;最后加入 5 μ l Annexin V-FITC,混匀,再加入 5 μ l PI,混匀,室温避光反应 10 min,用流

式细胞仪检测。

1.3.5 Western bolt 检测 NF- κ B、P65、P53 蛋白表达
常规培养细胞,加入浓度为 1.6、3.2 mg/L 黄葵素处理 48 h 的 MDA-MB-231 细胞,胰酶消化,离心。采用 PIRA 裂解液提取细胞总蛋白,应用 BCA 法测定蛋白浓度,10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,然后将其半干转印至 PVDF 膜,再利用 5% 脱脂奶粉中封闭 1.5 h,加一抗在 4 °C 条件下过夜;洗膜后加入二抗稀释液(1:1 000),在室温条件下孵育 60 min。采用 ECL 显色曝光,使用凝胶成像系统扫面分析,同时检测 β -actin 蛋白表达,作为内参照物。

1.4 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多元重复测量方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制作用 不同浓度实验组培养 24 h、48 h 细胞增殖抑制率均随着黄葵素浓度的增加而递增(P 均 < 0.01),呈药物剂量依赖性;两两比较,各浓度实验组分别明显高于正常对照组(P 均 < 0.01)。不同浓度实验组培养 48 h 细胞增殖抑制率明显高于培养 24 h(P 均 < 0.01)。见表 1。培养 24 h 的 $IC_{50} = 3.03$ mg/L,培养 48 h 的 $IC_{50} = 2.00$ mg/L。

2.2 DAPI 染色 对照组细胞完整,未发现任何细胞凋亡;经 1.6、3.2 mg/L 实验组处理,培养 48 h 后细胞均发生生长抑制、体积缩小现象;DAPI 染色后观察,有明显的细胞核固缩和断裂,同时观察到其细胞凋亡现象随着药物浓度增加而明显。见图 1。

2.3 PI 单染流式细胞术细胞周期各时相细胞比例分析 经 1.6 mg/L 和 3.2 mg/L 实验组作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,G0/G1 期百分数随黄葵素浓度增加而递增($P < 0.01$);G2/M 期百分数基本不变($P > 0.05$);而 S 期细胞百分数随黄葵素浓度增加而递减($P < 0.01$)。两两比较,G0/G1 期实验组明显高于正常对照组,S 期实验组明显低于对照组(P 均 < 0.01)。见表 2。

2.4 流式细胞仪 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率 结果显示,细胞凋亡率随黄葵素浓度由 1.6 mg/L 向 3.2 mg/L 增高而递增,且呈剂量依赖性。见图 2。

2.5 Western blot 检测 NF- κ B、P65 和 P53 蛋白表达 经 1.6 mg/L 和 3.2 mg/L 实验组作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h,NF- κ B 表达水平随黄葵素浓度由 0 →

1.6 mg/L → 3.2 mg/L 增高而递减,P53、P65 蛋白表达水平则递增。提示黄葵素可下调 NF- κ B、上调 P53、P65 蛋白表达。见图 3。

表 1 MTT 法检测细胞增殖抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

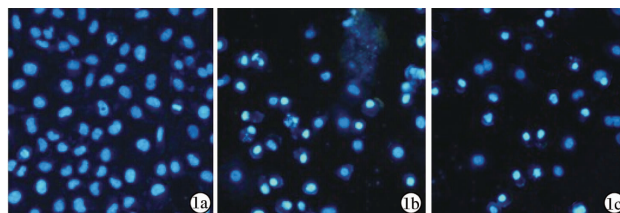
组别	例数	24 h	48 h	P 值
正常对照组	4	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.05	< 0.01
黄葵素实验组				
0.4 mg/L 组	4	8.43 ± 1.32 *	11.21 ± 1.45 *	< 0.01
0.8 mg/L 组	4	21.83 ± 4.25 *	29.81 ± 5.71 *	< 0.01
1.6 mg/L 组	4	35.27 ± 8.32 *	46.12 ± 8.39 *	< 0.01
3.2 mg/L 组	4	54.82 ± 9.38 *	65.13 ± 7.91 *	< 0.01
6.4 mg/L 组	4	65.21 ± 8.47 *	76.29 ± 10.39 *	< 0.01
P 值		< 0.01	< 0.01	

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表 2 PI 单染流式细胞术作用 48 h 各时相细胞比例分析 ($n=4$, % , $\bar{x} \pm s$)

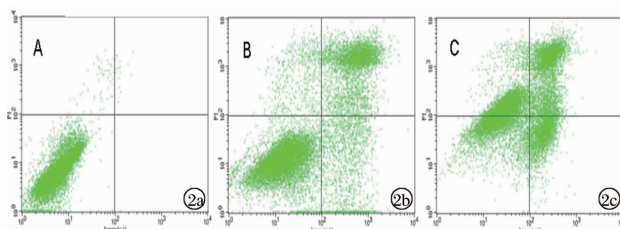
组别	G0/G1	S	G2/M
正常对照组	42.12 ± 2.71	53.92 ± 2.30	2.53 ± 2.51
黄葵素实验组			
1.6 mg/L 组	63.51 ± 2.55 *	35.23 ± 4.61 *	1.16 ± 0.01
3.2 mg/L 组	83.00 ± 2.28 *#	11.29 ± 0.25 *#	2.71 ± 1.19
P 值	< 0.01	< 0.01	> 0.05

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 1.6 mg/L 实验组比较,# $P < 0.01$ 。



注:1a:对照组;1b:1.6 mg/L 实验组;1c:3.2 mg/L 实验组。

图 1 DAPI 染色观察细胞凋亡形态($\times 400$)



注:2a:正常对照组;2b:1.6 mg/L 实验组;2c:3.2 mg/L 实验组。

图 2 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡

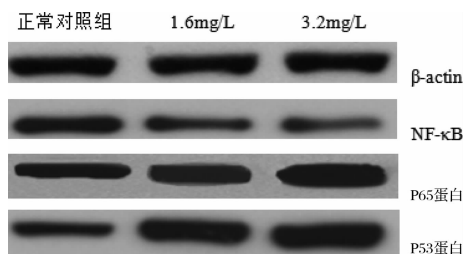


图 3 Western blot 检测 NF- κ B、P65 和 P53 蛋白表达

3 讨论

乳腺癌发生的原因主要是由于乳腺导管上皮细胞或者乳腺上皮细胞的细胞周期失调后致使细胞无限增殖^[6-7],故明确乳腺癌前体与癌细胞细胞周期的调节以及运行的差异对治疗乳腺癌具有重要临床意义。目前治疗癌症主要为抑制细胞增殖促使细胞凋亡,凋亡的调节以及执行异常能够影响肿瘤的发生、发展以及预后等^[8-9]。

黄葵素先导化合物小檗碱体内外实验研究证实具有广泛药理作用,包括抑制肿瘤细胞生长、诱导细胞凋亡以及促进分化等作用^[10-12],但盐酸小檗碱水溶性和脂溶性低,口服血药浓度低,故而难以发挥全身性作用。而作为新型小檗碱衍生物的黄葵素改善了脂溶性,且对多种肿瘤生长具有抑制作用。本研究表明,不同浓度实验组细胞增殖抑制率均明显高于正常对照组,且随着药物浓度的增加抑制率而递增,呈药物剂量依赖性;不同浓度实验组培养 48 h 的细胞增殖抑制率明显高于培养 24 h,提示黄葵素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有明显抑制作用。PI 单染分析黄葵素诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期分布,结果显示,实验组黄葵素作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,G0/G1 期百分数随黄葵素浓度增加(1.6 mg/L→3.2 mg/L)而增加,G2/M 期百分数基本不变,S 期细胞百分数则随黄葵素浓度增加而减少,说明 S 期 DNA 复制之后一些点(a G2 checkpoint)存在异常时,变异的 DNA 可不经凋亡和修复继续分化,所以 S 期降低,S 期的 MDA-MB-231 细胞对黄葵素诱导的细胞凋亡更为敏感;这是黄葵素诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡过程中的重要事件,G0/G1 期上升,而 S 期下降,所以 G2/M 期基本稳定。AnnexinV-FITC/PI 检测黄葵素对 MDA-MB-231 细胞凋亡水平结果显示,随着黄葵素浓度增加,细胞凋亡率逐渐增高,呈药物剂量依赖性。

NF- κ B 是与肿瘤发生发展重要相关的一种核转录因子,该因子能够通过抑制促凋亡因子与促进抑凋亡基因,从而使细胞免于凋亡^[13]。P65、P53 与调控细胞周期、凋亡、DNA 修复以及有丝分裂关系密切,能够抑制肿瘤细胞生长^[14],致癌信号、纺锤体前体物损伤以及 DNA 损伤等都可能激活 P53 的表达。有报道显示,沉默 P65 及 P53 基因 NF- κ B 表达增加,从而共同促进癌症的发展^[15]。本研究结果表明,经 1.6 mg/L 和 3.2 mg/L 黄葵素作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后实验组与正常对照组相比,NF- κ B 表达水平随黄葵素浓度增加而递减,而 P53、P65 表达水

平则递升,故而提示黄葵素可通过上调 P53、P65 表达、下调 NF- κ B 表达诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。

综上所述,黄葵素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有明显的抑制作用,阻滞细胞于 S 期,通过下调 NF- κ B、上调 P65、P53 表达诱导细胞凋亡。笔者还需在后续中做多种不同系统的肿瘤细胞以及多种途径诱导肿瘤凋亡的研究,探讨其更多不同途径的作用机制,为临床诊断治疗提供可靠的参考价值。

参考文献

- [1] Matsunuma R, Oguchi M, Fujikane T, et al. Influence of lymphatic invasion on locoregional recurrence following mastectomy: Indication for postmastectomy radiotherapy for breast cancer patients with one to three positive nodes[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(3): 845-852.
- [2] Baars JE, Bleiker EMA, Riel EV, et al. Active approach for breast cancer genetic counseling during radiotherapy: long-term psychosocial and medical impact[J]. *Clinical Genetics*, 2014, 85(6): 524.
- [3] 唐建武, 林菁. 黄葵素诱导三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的研究[J]. *药学报*, 2014, 49(1): 131-135.
- [4] 林菁, 唐建武, 祁蕙. 黄葵素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体内外抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(2): 253.
- [5] 郑春艳. 黄葵素对人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭的作用机制分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(5): 546-548.
- [6] Cuzick J, Sestak I, Cawthorn S, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial[J]. *Lancet Oncology*, 2015, 16(1): 67-75.
- [7] 史建红, 刘彩云, 张安易, 等. KLF5 在 TNF α 诱导的 SK-BR-3 乳腺癌细胞凋亡中的作用[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(26): 2004.
- [8] Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, et al. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(3): 717-730.
- [9] 马燕飞, 卢冠铭, 陈永诚, 等. 三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌临床特征及预后的比较分析[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(15): 3529-3530.
- [10] 祁蕙, 林菁. 黄葵素对 ECV304 细胞的增殖、迁移和小管形成的影响[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(5): 41-44.
- [11] 林菁, 彭华毅. 黄葵素诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞凋亡的研究[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(12): 1630-1634.
- [12] 林菁, 彭华毅, 王希, 等. 黄葵素对肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(1): 20-23.
- [13] 薛芳沁, 杨国华, 林孟波, 等. PS-341 对人大肠癌细胞 LoVo, SW480 中 NF- κ B、uPA 表达的影响及其与侵袭力的关系[J]. *福建医科大学学报*, 2011, 45(6): 409-413.
- [14] 孟召伟, 谭建. ¹³¹I 对分化型甲状腺癌细胞核因子 κ B 表达和功能的影响[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2012, 32(1): 54.
- [15] 季玉莲, 赵树立, 赵光峰, 等. pokemon 通过抑制 p53 和上调白细胞介素 6 抑制胃肿瘤细胞 BGC823 凋亡[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(11): 1155-1159.