

葫芦素 B 对人 MCF-7 细胞生物学行为的影响

黄擎擎¹ 王丹凤¹ 马毅¹ 田力平^{2△}

(¹ 江苏省原子医学研究所附属江原医院, 无锡 214063; ² 苏州大学附属第一医院, 苏州 215006)

摘要 目的 探讨葫芦素 B 对激素受体阳性的人 MCF-7 乳腺癌细胞生物学行为的影响及其机制。方法 培养人 MCF-7 细胞, 随机分为对照组和 20 μM、50 μM、100 μM 葫芦素 B 组。SRB 法观测葫芦素 B 对人 MCF-7 细胞增殖活性的影响, Hoechst 33258 凋亡实验观察葫芦素 B 对人 MCF-7 细胞凋亡的影响, Western Blotting 检测自噬相关蛋白。结果 与对照组相比, 葫芦素 B 各浓度组能显著抑制人 MCF-7 细胞增殖, 增强其细胞凋亡, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 葫芦素 B 各浓度组 LC3-II 表达水平显著升高, LC3-I、P62 表达水平显著下降 (均 $P < 0.05$)。结论 葫芦素 B 可诱导人 MCF-7 细胞自噬和凋亡, 抑制细胞增殖。

关键词 人 MCF-7 细胞; 葫芦素 B; 细胞增殖; 自噬

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2021)02-010-04

The effect of cucurbitacin B on the biological behavior of MCF-7 cells

HUANG Qingqing¹, WANG Danfeng¹, MA Yi¹, TIAN Liping^{2△}

(¹ JiangYuan Hospital Affiliated to Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

² The First Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cucurbitacin B on the biological behavior of hormone receptor positive human MCF-7 breast cancer cells and its mechanism. **Methods** Human MCF-7 cells were cultured and randomly divided into control group and cucurbitacin B groups (20 μM, 50 μM, 100 μM). The effect of cucurbitacin B on the proliferation of MCF-7 cells was observed by SRB method, the effect of cucurbitacin B on the apoptosis of MCF-7 cells was observed by Hoechst 33258 apoptosis assay, and autophagy related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, cucurbitacin B could significantly inhibit the proliferation rate of human MCF-7 cells and enhance their apoptosis (all $P < 0.05$); the expression levels of LC3-II in cucurbitacin B groups were significantly increased, while the expression levels of LC3-I and P62 were significantly decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Cucurbitacin B can inhibit the proliferation of MCF-7 cells and induce autophagy and apoptosis.

Keywords: MCF-7 cells; Cucurbitacin B; Cell proliferation; Autophagy

葫芦素 B (Cucurbitacin B) 是从葫芦科植物中提取的四环三萜类化合物, 是葫芦素家族中含量最丰富的成员, 具有广泛的药理活性, 如抗炎、保肝、提高机体免疫力等作用^[1-2]。葫芦素 B 在体内实验均被证实可发挥有效抗肿瘤活性, 且无明显毒副作用。本文将探讨葫芦素 B 对激素受体阳性的人 MCF-7 乳腺癌细胞生物学行为的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人 MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库。纯化葫芦素 B 购自中国舜博生物工程科技公司, 溶剂为二甲基亚砜 (DMSO), 本实验所有抗体购自 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DMEM 培养基 (美国纽约格兰德岛 Gibco 公司, 其中含链霉素 100U/ml、青霉素 100 μg/ml 以抑制杂菌生长, 外加 10% 胎牛血清适量) 培养细胞, 保持温度 37℃, CO₂ 体积分数 5%。当细胞处于对数生长期时胰酶消化、备用。

△[通信作者] 田力平, E-mail: stephine01@163.com

1.2.2 SRB 实验 备用细胞制成单细胞悬液。96 孔培养板上各滴加 100 μ l 细胞悬液,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂, 培养 24h。去上清液,实验组分别加入 20 μ M、50 μ M、100 μ M 葫芦素 B,对照组加入等体积的 DM-SO。每个药物浓度组做 5 个平行孔,经 48h 充分反应后三氯醋酸(中国舜博生物工程科技公司)固定。去离子水洗涤,干燥后加入 0.4% SRB(中国舜博生物工程科技公司)充分反应。10mmol/L 的 Tris 溶液(中国舜博生物工程科技公司)加入经醋酸洗涤的溶液中,以获取结合型 SRB。空白孔吸光度(OD)值设为零,利用酶标仪(Amersham 公司)在 490nm 波长下测量各组标本 OD 值并计算抑制率。抑制率(%)=1-[(药物组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%]

1.2.3 Hoechst 33258 凋亡实验 取备用细胞以 4×10⁴ 个/孔的密度接种于覆灭菌盖玻片的 6 孔培养板内过夜。设对照组和 20 μ M、50 μ M、100 μ M 葫芦素 B 组,48h 后去培养液,固定,漂洗。移液枪移取 0.5ml 稀释的 Hoechst 33258 溶液(上海碧云天生物科技有限公司)加入上标本,反应后洗涤、封片,在倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司)下详细观察记录细胞核染色情况。

凋亡率(%)=凋亡小体个数/整张片子细胞数量×100%

1.2.4 Western blotting 收集培养 12、24h 的实验组和对照组细胞于 EP 管中,2500rpm 离心 5min,弃上清,收集细胞,PBS 洗涤。加入含 PMSF 的细胞裂解液(上海碧云天生物科技有限公司),轻轻吹打充分反应后置于冰浴中 30min。再次离心,上清液-20 $^{\circ}$ C 保存。BCA 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司)检测总蛋白浓度,调节所用标本至相同浓度。加上样缓冲液,按照 SDS-PAGE 电泳操作流程逐步进行电泳、分离蛋白、转膜、封闭。稀释 LC3-I、LC3-II、P62 等一抗,4 $^{\circ}$ C 在摇床上孵育过夜,之后 TBST 洗膜。同样方法孵育已做好标记的二抗,充分反应 1h,洗膜,借助 Cline science instruments co 进行发光显影,利用 Image J Program 软件进行图像分析。GAPDH 为内参。

1.3 统计学方法

所有实验均重复 3 次。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SRB 实验及凋亡实验资料为多组重复测量资料,通过 SPSS23.0 软件进行多因素重复测量方差分析,两两比较用 t 检验。自噬相关蛋白表达分析采用

单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 葫芦素 B 对 MCF-7 细胞增殖活性的影响

与对照组相比,葫芦素 B 各浓度组能显著抑制人 MCF-7 细胞增殖,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且随着药物浓度的增加及作用时间的延长,对人 MCF-7 细胞增殖抑制作用增强。见图 1、表 1。

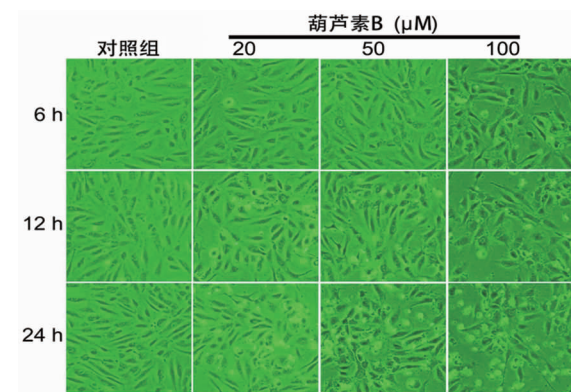


图 1 葫芦素 B 抑制 MCF-7 增殖活性

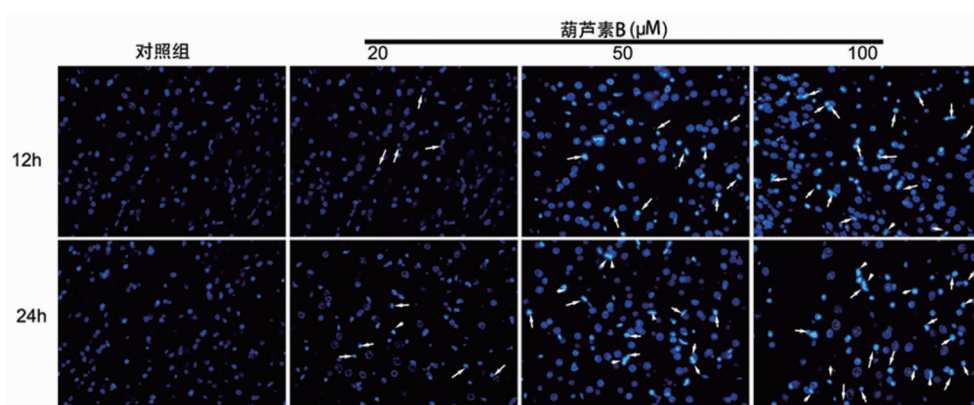
表 1 各组葫芦素 B 不同时间点
对 MCF-7 抑制率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率		
	6h	12h	24h
对照组	1.331±0.582	3.672±0.586	6.332±0.588
20 μ M 葫芦素 B 组	2.003±1.002	9.005±1.004 *	13.004±1.003 *
50 μ M 葫芦素 B 组	1.678±0.581	13.337±0.581 *	21.001±2.002 *
100 μ M 葫芦素 B 组	1.673±1.156	20.334±1.538 *	24.005±1.004 *
$F_{组别}$	139.586		
P	<0.001		
$F_{时间}$	758.157		
P	<0.001		
$F_{交互}$	67.189		
P	<0.001		

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;6h 时,葫芦素 B 各浓度组 $F = 0.301$, $P = 0.833$ 。

2.2 葫芦素 B 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

因 6h 时各浓度组增殖抑制率均无明显变化,Hoechst 33258 染色实验仅进行 12h、24h 时的检测。与对照组相比,葫芦素 B 各浓度组能显著增强人 MCF-7 细胞凋亡,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),且随着药物浓度的增加,作用时间的延长,凋亡小体明显增多。见图 2、表 2。



注:白色箭头为凋亡小体。

图 2 葫芦素 B 对人 MCF-7 细胞凋亡的影响

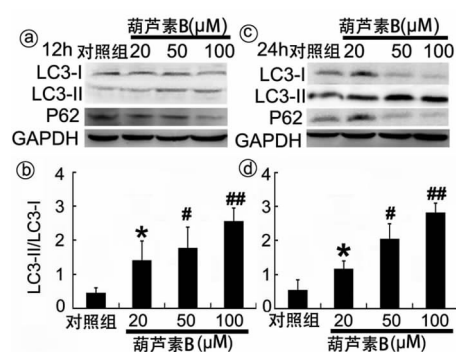
表 2 各组不同时间细胞凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率	
	12h	24h
对照组	0.331±0.181	0.671±0.582
20μM 葫芦素 B 组	3.332±0.585 *	6.004±1.008 *
50μM 葫芦素 B 组	7.003±1.002 *	11.003±2.002 *
100μM 葫芦素 B 组	13.005±1.007 *	13.004±2.651 *
$F_{\text{组别}}$		57.547
P		<0.001
$F_{\text{时间}}$		25.936
P		<0.001
$F_{\text{交互}}$		7.746
P		<0.001

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

2.3 葫芦素 B 对 MCF-7 细胞自噬的影响

与对照组相比,葫芦素 B 各浓度组 LC3-II 表达水平显著升高,LC3-I、P62 表达水平显著下降(均 $P < 0.05$)。见图 3。



注:a,c 为葫芦素 B 作用 12h,24h 自噬相关蛋白的表达,b 为 a 中 LC3-II/LC3-I 对应柱状图,d 为 c 中 LC3-II/LC3-I 对应柱状图。*表示 20μM 组与对照组相比 $P < 0.05$,#表示 50μM 组与 20μM 组相比 $P < 0.05$,##表示 100μM 组与 50μM 组比较 $P < 0.05$ 。

图 3 葫芦素 B 可激活 MCF-7 细胞自噬

3 讨论

乳腺癌是严重威胁女性生命健康的疾病,目前发病率已居女性恶性肿瘤第一位^[3-4]。化疗、内分泌治疗、放疗以及靶向治疗可改善部分患者预后。其中 Luminal 亚型的乳腺癌约占乳腺癌患者 70%,因激素受体表达阳性,此分子分型的患者可通过内分泌治疗药物如三苯氧胺获益^[5]。但同其他治疗方法一样,原发性或继发性耐药对部分患者而言不可避免。中药提取物葫芦素 B 可逆转乳腺癌细胞对多柔比星的耐药,还可抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭、诱导三阴性乳腺癌细胞的凋亡^[6-7]。

乳腺癌 Luminal 亚型常用的细胞株为 MCF-7 细胞株,此类细胞虽因表达雌激素受体和/或孕激素受体而预后稍好,但同样具有癌细胞的特点:通过一系列分子机制改变细胞生物学行为,增强增殖活性,抑制凋亡、自噬。葫芦素 B 是从葫芦科植物中提取的四环三萜类化合物,Sinha 等报道葫芦素 B 可通过调控 VEGF 参与的 FAK/MMP-9 信号轴抑制血管的生成,从而抑制癌细胞增殖和转移^[8]。本实验中,我们发现升高葫芦素 B 的浓度或延长作用时间,可明显抑制 MCF-7 细胞的增殖活性。结肠癌中研究显示葫芦素 B 10μM 作用 24h 可使细胞增殖活性下降 30%^[9],本结果显示葫芦素 B 100μM 作用 24h 对肿瘤细胞增殖活性抑制率仅 24%左右,可能与细胞株分化程度、对药物的敏感性、所用药物纯度不同有关。本实验观察到葫芦素 B 抗癌效果具有时间和浓度依赖性,该特征在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株中也得到证实^[10]。另有文献报道,葫芦素 B 可通过调控 AKT 和 CDK2 抑制

乳腺癌细胞生长,诱导其凋亡,并使细胞周期阻滞于 G2/M 期^[11]。本研究中,凋亡小体的形成也证实葫芦素 B 具有诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用,100 μ M 组在 12h 和 24h 时凋亡率基本稳定在 13%。此外,数据表明葫芦素 B 可促进 MCF-7 细胞中氧自由基的生成,诱导 DNA 损伤,增强自噬。自噬是细胞自我降解以再次利用细胞内成分的过程,参与癌症的发生和进展。LC3 是一种微管蛋白,自噬信号使其活化成为 LC3- I,后者再通过 Atg5-Atg12-Atg16L 复合物的催化反应形成 LC3- II,LC3- I 与 LC3- II 对自噬活性的参考价值已被普遍接受。P62 是自噬过程中经典的底物蛋白,其通过与 LC3 相互作用使自噬溶酶体降解,P62 水平随 LC3- II 表达的增高而降低。研究显示葫芦素 B 可通过调控 CIP2A/PP2A/mTORC1 信号轴升高自噬相关蛋白 LC3- II 的表达水平^[12]。本文结果显示随药物浓度及作用时间增加,LC3- II 表达水平升高,P62 表达水平下降,100 μ M 组作用 12h 时自噬活性基本稳定。

葫芦素 B 对乳腺癌小鼠肿瘤生长的抑制作用已经体内实验验证,仅有部分病例出现血糖水平降低,对动物组织、器官的相关分析未见明显毒副作用^[3]。相比化疗药物及放疗的毒副作用、靶向治疗费用昂贵等缺点,中药提取物葫芦素 B 抑制人 MCF-7 细胞增殖、诱导凋亡和自噬作用效果温和、费用低廉,将来有望成为乳腺癌的辅助治疗药物。

参考文献:

- [1] Sukant G, Sunil K, Renu W. Cucurbitacin B and cancer intervention: Chemistry, biology and mechanisms (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2017, 52 (1): 19-32. DOI: 10.3892/ijo. 2017. 4203.
- [2] Ren G, Sha T, Guo J, et al. Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Nat Med*, 2015, 69 (4): 522-530. DOI: 10. 1007/s11418-015-0918-4.
- [3] 张淑君, 单梦圆, 翟羽佳, 等. PIWIL1 基因沉默对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响 [J]. *济宁医学院学报*, 2019, 42 (2): 117-121. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2019. 02. 010.
- [4] 肖斌, 温嘉欣, 赵超然, 等. Luminal 亚型乳腺癌细胞与正常乳腺细胞的 circRNA 表达谱差异分析 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38 (8): 1014-1019. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-4254. 2018. 08. 19.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Dym AJ, et al. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2017, 67 (1): 7-30. DOI: 10. 3322/caac. 21387.
- [6] 蔡芬, 段超, 黄秋月, 等. 葫芦素 B 逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/Dox 多柔比星耐药的作用及机制研究 [J]. *湖北医药学院学报*, 2017, 36 (1): 28-35. DOI: 10. 13819/j. issn. 1006-9674. 2017. 01. 007.
- [7] 梁菁. 葫芦素 B 通过改变细胞生物力学性质抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭 [D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [8] Sinha S, Khan S, Shukla S, et al. Cucurbitacin B inhibits breast cancer metastasis and angiogenesis through VEGF-mediated suppression of FAK/MMP-9 signaling axis [J]. *Int J Biochem & Cell Biol*, 2016, 77 (Pt A) 41-56. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2016. 05. 014.
- [9] Dandawate P, Subramaniam D, Panovich P, et al. Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 1290-1305. DOI: 10. 1038/s41598-020-57940-9.
- [10] Luo WW, Zhao WW, Lu JJ, et al. Cucurbitacin B suppresses metastasis mediated by reactive oxygen species (ROS) via focal adhesion kinase (FAK) in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *中国天然药物: 英文版*, 2018, 16 (1): 10-19. DOI: 10. 1016/S1875-5364 (18)30025-6.
- [11] Jin ZQ, Hao J, Yang X, et al. Higenamine enhances the antitumor effects of cucurbitacin B in breast cancer by inhibiting the interaction of AKT and CDK2 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40 (4): 2127-2136. DOI: 10. 3892/or. 2018. 6629.
- [12] Duangmano S, Sae-Lim P, Suksamrarn A, et al. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 185-210. DOI: 10. 1186/1472-6882-12-185.

(收稿日期 2020-05-31)

(本文编辑:石俊强)