

莪术二酮对MDA-MB-231细胞周期和凋亡的影响

张凯媛, 吕玲玲, 陈敬贤, 徐佳悦, 李琼, 武渊, 郑岚*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025)

[摘要] 目的:探讨莪术二酮对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、凋亡和细胞周期的作用。方法:体外培养MDA-MB-231细胞,以卡培他滨作为阳性对照,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度的莪术二酮(125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用细胞24, 48 h后对细胞活力的影响;选取3个有效抑制增殖的莪术二酮浓度(250, 500, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行后续实验。流式细胞术结合碘化丙啶(PI)染色法检测莪术二酮对细胞周期的影响;增设高浓度组(2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),用JC-1法检测莪术二酮对细胞线粒体膜电位的影响,并采用流式细胞术结合Annexin V-FITC/PI双染色法检测细胞凋亡的情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测莪术二酮作用后细胞中周期调控和凋亡相关蛋白表达的变化。结果:与空白组比较,250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮对细胞增殖有显著抑制作用($P<0.01$),效果呈浓度和时间依赖性,24 h和48 h的半抑制浓度(IC_{50})分别为1 607, 1 401 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;250, 500, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮可将细胞阻滞在 G_1 期;250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮对细胞线粒体膜电位无影响,500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮可使细胞线粒体膜电位明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);250, 500, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮可使凋亡细胞比例明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);各浓度莪术二酮可使B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)/B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)蛋白表达量无明显变化,而Caspase-9, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3, p53和p21蛋白表达量均有所增加($P<0.05$)。结论:一定浓度的莪术二酮能抑制MDA-MB-231细胞的增殖,可能与其阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 莪术二酮; 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231细胞; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0074-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211298

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210422.1027.001.html>

[网络出版日期] 2021-4-22 13:27

Effect of Curdione on MDA-MB-231 Cell Cycle and Apoptosis

ZHANG Kai-yuan, LYU Ling-ling, CHEN Jing-xian, XU Jia-yue, LI Qiong, WU Yuan, ZHENG Lan*
(Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of curdione on the proliferation, apoptosis and cell cycle of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. **Method:** MDA-MB-231 cells were cultured *in vitro* with capecitabine (positive control) and curdione at different concentrations (125, 250, 500, 1 000, and 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), respectively, for detecting their viability using the cell counting kit-8 (CCK-8) at 24 and 48 h. Three effective inhibitory concentrations (250, 500, and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) against cell proliferation were selected for subsequent experiments. The effect of curdione on cell cycle was determined by flow cytometry combined with propidium iodide (PI) staining. After the set-up of high-concentration (2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, the effect of curdione on cell mitochondrial membrane potential was measured by JC-1(5, 5, 6, 6-tetrachloro-1, 1, 3, 3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) staining, followed by the detection of cell apoptosis by flow

[收稿日期] 20210209(009)

[基金项目] 上海市科学基金委员会基金项目(19401932400)

[第一作者] 张凯媛,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail:kaikai_zhang0628@163.com

[通信作者] * 郑岚, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤临床及研究, Tel: 021-64370045-680502, E-mail: windy9453@126.Com

cytometry combined with Annexin V-FITC/PI double staining. The changes in cell cycle status and apoptosis-related protein expression following curdione intervention were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the blank control, curdione at 250, 500, 1 000, and 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells ($P<0.01$), exhibiting a concentration- and time-response relationship. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values at 24 and 48 h were 1 607 and 1 401 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Curdione at 250, 500, and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ arrested cells in G_1 phase. Curdione at 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ had no effect on cell mitochondrial membrane potential, which, however, declined significantly in the 500, 1 000, and 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Curdione at 250, 500, and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ obviously increased the proportion of apoptotic cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Curdione at each concentration elevated the Bcl-2-associated X protein (Bax)/B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ratio ($P<0.05$, $P<0.01$), but did not change the cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) expression. The protein expression levels of Caspase-9, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3, p53, and p21 were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** A certain concentration of curdione inhibits the proliferation of MDA-MB-231 cells, which may be related to its efficacy in arresting cell cycle and inducing apoptosis.

[Key words] curdione; triple negative breast cancer; MDA-MB-231 cells; cell cycle; apoptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,也是全球女性肿瘤死亡的主要原因^[1]。在中国,女性乳腺癌发病越来越年轻化,确诊年龄远低于西方女性^[2]。根据临床肿瘤亚型的不同,乳腺癌目前的治疗方法主要有内分泌治疗、抗人类表皮生长因子受体-2 (HER-2) 靶向治疗和化疗^[3]。三阴性乳腺癌 (TNBC) 是乳腺癌5种亚型中的一种,由于缺乏雌激素受体(ER),孕激素受体(PR)和HER-2表达,不能进行内分泌治疗或针对HER-2的靶向治疗,预后相对较差^[4]。

传统医学在肿瘤的预防和治疗中发挥着不可替代的作用。莪术作为活血化瘀药的典型代表,在临床上广泛用于TNBC的治疗。一项运用数据挖掘联合网络药理学探索中医药治疗TNBC用药规律的研究表明,莪术位列处方高频药物排名的第12位,有超过1/4的TNBC处方用到了莪术^[5]。莪术二酮是HIKINO等于1967年首次从莪术挥发油中分离的一种半萜类化合物,已被证实具有抗炎、抗血小板聚集和改善脑缺血再灌注后神经损伤的作用^[6-8]。过量生产的前列腺素被认为是致癌过程的中介,莪术二酮通过抑制环氧合酶-2(COX-2)基因的表达,减少前列腺素 E_2 (PGE_2)的产生,从而发挥抗癌的生物活性^[9]。然而,不同于莪术的另一种提取物莪术醇,目前莪术二酮在抗肿瘤方面的研究并不多,主要涉及乳腺癌^[10-11]、肾癌^[12]和肝癌^[13]。研究表明,莪术二酮能诱导MCF-7细胞凋亡,在体内抑制裸鼠乳腺癌移植瘤模型的生长^[10];还能抑制TNBC HCC1937细胞的迁移和侵袭,其作用机制可能与下

调有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶B (Akt)信号通路中关键蛋白的磷酸化水平有关^[11]。对于肾癌ACHN细胞,莪术二酮通过磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/Akt信号通路诱导细胞凋亡^[12]。此外,研究人员还发现了莪术二酮对肝癌HT-29细胞的体外抗增殖作用^[13]。除了抗肿瘤作用外,莪术二酮还能缓解阿霉素的心脏毒性^[14]及博来霉素引起的肺纤维化^[15],在缓解化疗药物不良反应方面显示出优势。目前有关莪术二酮抗癌作用的报道以乳腺癌居多,但尚未有针对TNBC MDA-MB-231细胞的研究,也未曾有涉及到细胞周期的报道。

本实验选取常见的人源TNBC细胞株MDA-MB-231进行体外研究,通过检测莪术二酮作用后细胞的增殖、凋亡、细胞周期分布情况及相关蛋白的表达水平,发现一定浓度的莪术二酮能抑制MDA-MB-231细胞的增殖,将细胞阻滞在 G_1 期,并诱导细胞凋亡,为未来莪术二酮在临床上的应用提供更多的理论支持。

1 材料

1.1 细胞 细胞株MDA-MB-231,购自中科院上海细胞库,目录号SCSP-5043,购入时传代至41代。

1.2 药物 莪术二酮对照品(大连美仑生物科技有限公司,批号MB6624,纯度 $\geq 98\%$);卡培他滨[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号abs813303]。

1.3 试剂 二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D2650);DMEM高糖培养基(美国Corning公司,批号10-013-CV);L-15培养基(武汉博士德生物工程有限公司,批号PYG0038);胎牛血清,青霉素-

链霉素溶液(100×), 0.25%胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA), 磷酸盐缓冲液(PBS, 10×)(美国Gibco公司, 批号分别为10270106, 10378-016, 25200-056, 70011-044); 细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒, JC-1线粒体膜电位检测试剂盒, Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒, 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为40203, 40706, 40302, 40301); RIPA裂解液(10×), 0.45 μm PVDF膜(美国Millipore公司, 批号分别为20-188, IEVH00005); 蛋白酶抑制剂Cocktail, 磷酸酶抑制剂Cocktail(美国Bimake生物科技有限公司, 批号分别为B14001, B15001); 三色预染蛋白Marker, BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo公司, 批号分别为26617, 23227); 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液(5×, 还原型)(北京康为世纪生物科技有限公司, 批号CW0027S); PAGE凝胶快速制备试剂盒(10%, 15%), Tris-甘氨酸-SDS电泳缓冲液(10×), 转膜缓冲液(10×), 通用型抗体稀释液(上海雅酶生物科技有限公司, 批号分别为PG112, PG114, PS105, PS109, PS119); TBST漂洗液(10×), 脱脂奶粉[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号分别为C520009-0500, A600669-0250]; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax), Bcl-2, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9), Caspase-3, p53, p21, β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国CST公司, 批号分别为5174S, 5023T, 4223T, 9502T, 14220T, 2527T, 2947T, 4970T); 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(Proteintech中国公司, 批号SA00001-2); 高敏型增强化学发光法(ECL)化学发光液(上海天能科技有限公司, 批号分别为180-5001B, 180-5001W)。

1.4 仪器 Heracell 150i型CO₂细胞培养箱, Varioskan LUX型多功能酶标仪(美国Thermo公司); 5810R型台式离心机(德国Eppendorf公司); Microfuge 20R型冷冻离心机, CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司); Axio Imager M2型正置显微镜(德国Zeiss公司); PowerPac™型基础电泳仪电源, Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽, 小型Trans-Blot转印槽(美国Bio-Rad公司); AI600型化学发光成像仪(美国GE公司)。

2 方法

2.1 细胞驯化、培养与传代 从中科院取回已复苏

的MDA-MB-231细胞后, 用L-15培养基(含10%胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素)在带不透气盖的培养瓶中, 置于37℃ 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养, 每次传代第2天替换1/5的培养基为DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素), 并逐渐拧松瓶盖, 直至全部替换完成, 且细胞恢复到原来的形态。

驯化后的细胞用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素)置于37℃ 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养, 隔天换液, 2~3 d传代1次, 传代比例为1:3~1:2。

2.2 药物配制 将莪术二酮(对照品)和卡培他滨溶解在DMSO中, 分别配成200 mmol·L⁻¹和100 mmol·L⁻¹的母液, 避光存放于-20℃。实验时将母液用DMSO倍比稀释为100, 50, 25, 12.5 mmol·L⁻¹的莪术二酮工作液和50, 25, 12.5, 6.25 mmol·L⁻¹的卡培他滨工作液, 莪术二酮工作液以1:100的体积加入培养基中, 卡培他滨工作液以1:50的体积加入培养基中, 空白组加入等体积的DMSO。

2.3 CCK-8法检测细胞活力 消化对数期生长的MDA-MB-231细胞, 制成单细胞悬液, 均匀接种在96孔板中, 每孔1×10⁴个细胞。待细胞过夜贴壁后, 弃去旧培养基, 每孔加入100 μL含2 000, 1 000, 500, 250, 125, 0 μmol·L⁻¹莪术二酮或卡培他滨的新培养基, 每个浓度设4个复孔, 另外设4个空白调零孔。继续培养24, 48 h后, 每孔加入CCK-8溶液10 μL, 置于37℃培养箱内孵育2 h, 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A, 计算细胞活力=(A_{加药}-A_{空白})/(A_{0加药}-A_{空白})×100%。

2.4 细胞周期检测 消化对数期生长的MDA-MB-231细胞, 制成单细胞悬液, 均匀接种在12孔板中, 每孔1×10⁵个细胞。待细胞过夜贴壁后, 无血清培养基饥饿培养24 h, 然后加入1 mL含1 000, 500, 250, 0 μmol·L⁻¹莪术二酮的完全培养基, 每个浓度设3个复孔。继续培养24, 48 h后, 消化收集细胞, 4℃, 1 000 ×g离心5 min, 用1 mL预冷的PBS洗涤1次, 离心收集细胞。细胞沉淀用1 mL预冷的70%乙醇重悬, 4℃固定过夜。第2天4℃, 1 000 ×g离心5 min弃去70%乙醇后, 用1 mL预冷的PBS洗涤1次, 离心收集细胞。按试剂盒说明书配制PI染色液, 每个样本加入500 μL, 轻轻混匀, 37℃避光孵育30 min后, 400目筛网过滤细胞, 用流式细胞仪检

测,用ModFit LT 5.0软件分析细胞周期。

2.5 JC-1检测线粒体膜电位 在48孔板中放入相应大小的爬片,消化对数期生长的MDA-MB-231细胞,制成单细胞悬液,均匀接种在爬片上,每孔 3×10^4 个细胞。待细胞过夜贴壁后,弃去旧培养基,每孔加入含2 000,1 000,500,250,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮的新培养基200 μL ,每个浓度设3个复孔,另外设1个阳性对照孔,继续培养24,48 h。染色前在阳性对照孔中加入100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 羰基氰化物间氯苯胺(CCCP)处理细胞40 min。按照试剂盒说明书配制JC-1染色工作液和缓冲液,弃去旧培养基,用PBS洗涤细胞1次,每孔加入100 μL 无血清培养基和100 μL JC-1染色工作液,充分混匀,于培养箱中孵育20 min。孵育结束后吸去上清,用JC-1染色缓冲液洗涤2次,加入无血清培养基200 μL ,置于冰上。将爬片捞出倒扣在载玻片上,置于荧光显微镜下用20倍物镜观察,红色荧光使用Cy3通道,绿色荧光使用FITC通道。将观察到阳性对照细胞的绿色荧光清晰而红色荧光几乎不可见时的曝光时间设为固定曝光时间,每张爬片选取6个不同的视野拍照。用Image J软件统计每张照片的红色荧光和绿色荧光强度,并计算两者的比值。

2.6 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡 消化对数期生长的MDA-MB-231细胞,制成单细胞悬液,均匀接种在6孔板中,每孔 3×10^5 个细胞。待细胞过夜贴壁后,弃去旧培养基,每孔加入含1 000,500,250,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮的新培养基2 mL,每个浓度设3个复孔。继续培养24,48 h后,收集细胞上清并消化收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,300 \times g离心5 min,用预冷的PBS洗涤2次,离心收集细胞。细胞沉淀用100 μL Binding Buffer重悬,加入Annexin V-FITC 5 μL 和PI染色液10 μL ,轻轻吹打混匀,室温、避光反应15 min后,加入Binding Buffer 400 μL ,混匀后置于冰上,用流式细胞仪检测。以FITC为横坐标,PI为纵坐标绘制双色散点图,统计3个亚群细胞(活细胞为Annexin V/PI⁻,早期凋亡细胞为Annexin V⁺/PI⁻,晚期凋亡和坏死细胞为Annexin V⁺/PI⁺)占细胞总数的比例。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞蛋白表达 按2.6项方法进行细胞铺板及加药,继续培养24 h后,弃去培养基,用PBS洗涤2次并吸净,使用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,并用BCA法测定蛋白浓度。加入1/4体积的5 \times SDS-PAGE上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴10 min,冰浴5 min。按每孔20 μg

蛋白的上样量在SDS-PAGE体系电泳,转膜到PVDF膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h。加入GAPDH, β -actin, Bax, Bcl-2, p53, p21, Caspase-9, Caspase-3抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜4次,每次5 min;加入HRP标记的二抗(1:4 000)室温孵育2 h, TBST洗膜4次,每次5 min。1:1配制ECL化学发光液,均匀铺在膜上,置于化学发光成像系统进行拍照。用Image J软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析 使用GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Dunnett法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 莪术二酮对MDA-MB-231细胞增殖的影响 以卡培他滨作为阳性药。CCK-8实验结果显示,与空白组比较,125,250,500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡培他滨处理24 h后,细胞活力无明显变化,当浓度上升到1 000,2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞活力显著下降($P < 0.01$)。125,250,500,1 000,2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡培他滨处理48 h后,细胞活力均显著下降($P < 0.01$),计算得到24 h和48 h的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为5 817 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和3 210 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。卡培他滨对MDA-MB-231细胞增殖具有抑制作用,且表现出明显的浓度和时间依赖性。见表1。

与空白组比较,125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理24,48 h后,细胞活力无明显变化;250,500,1 000,2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理24,48 h后,细胞活力显著下降($P < 0.01$),且效果呈浓度和时间依赖性,计算得到24 h和48 h的IC₅₀分别为1 607 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和1 401 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。莪术二酮对MDA-MB-231细胞增殖具有与卡培他滨相似的抑制作用。见表1。

3.2 莪术二酮对MDA-MB-231细胞周期的影响

流式细胞术检测70%乙醇固定后PI单染的细胞,结果显示,与空白组比较,250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理细胞24 h后,各期细胞比例无明显变化,当浓度上升到500,1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,G₁期细胞比例明显增加,而G₂期细胞比例相应地减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),浓度为1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,S期细胞显著减少($P < 0.01$)。250,500,1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理细胞48 h均可使G₁期细胞比例显著增加($P < 0.01$),500,1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时G₂期细胞比例显著减少($P < 0.01$),1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时S期细胞显著减少($P < 0.01$),且作用效果呈现出浓度依赖性。莪术二酮可将MDA-MB-231细胞阻滞在G₁期。见表2。

表 1 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of curdione on proliferation of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白		100.00 \pm 1.45	100.00 \pm 0.75
卡培他滨	125	98.81 \pm 1.55	93.73 \pm 0.39 ²⁾
	250	96.78 \pm 0.64	89.75 \pm 0.88 ²⁾
	500	94.29 \pm 3.02	83.82 \pm 0.56 ²⁾
	1 000	86.73 \pm 4.19 ²⁾	73.10 \pm 0.84 ²⁾
	2 000	76.47 \pm 4.39 ²⁾	59.56 \pm 2.36 ²⁾
莪术二酮	125	97.28 \pm 1.72	97.23 \pm 0.51
	250	91.22 \pm 2.33 ²⁾	87.83 \pm 3.77 ²⁾
	500	86.58 \pm 2.94 ²⁾	83.95 \pm 0.25 ²⁾
	1 000	77.33 \pm 2.61 ²⁾	78.39 \pm 0.71 ²⁾
	2 000	35.71 \pm 7.47 ²⁾	23.81 \pm 3.55 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2-5 同)。

表 2 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of curdione on cell cycle of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h			48 h		
		G ₁	S	G ₂	G ₁	S	G ₂
空白		59.44 \pm 0.93	26.36 \pm 0.24	14.20 \pm 0.69	62.24 \pm 0.88	25.69 \pm 0.39	12.09 \pm 1.27
莪术二酮	250	61.85 \pm 1.27	25.48 \pm 0.46	12.67 \pm 1.56	65.75 \pm 1.44 ²⁾	24.53 \pm 1.48	9.72 \pm 0.05
	500	66.82 \pm 2.24 ¹⁾	22.54 \pm 1.37	10.65 \pm 0.88 ¹⁾	69.08 \pm 0.23 ²⁾	22.74 \pm 0.72	8.18 \pm 0.91 ²⁾
	1 000	78.02 \pm 3.13 ²⁾	13.28 \pm 3.08 ²⁾	8.70 \pm 0.95 ²⁾	74.72 \pm 0.36 ²⁾	18.41 \pm 1.42 ²⁾	6.87 \pm 1.09 ²⁾

表 3 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of curdione on mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白		100.90 \pm 6.05	100.30 \pm 1.91
莪术二酮	250	99.88 \pm 7.01	100.90 \pm 1.48
	500	83.62 \pm 2.73 ¹⁾	77.87 \pm 4.04 ²⁾
	1 000	74.78 \pm 5.13 ²⁾	65.28 \pm 1.62 ²⁾
	2 000	27.28 \pm 12.9 ²⁾	11.77 \pm 1.31 ²⁾

3.5 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞周期调控和凋亡相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与空白组比较,莪术二酮处理细胞 24 h 后,250,500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的 Bax 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$),而 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的 Bcl-2 蛋白表达量显著减少 ($P < 0.01$),各浓度莪术二酮组的 Bax/Bcl-2 均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。各浓度莪术二酮组的 Caspase-3 蛋白表达量无明显变化,而 500,1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Caspase-9, cleaved Caspase-3, p53 和 p21 蛋白表达量均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),

3.3 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响 JC-1 线粒体膜电位检测实验显示,与空白组比较,250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理细胞 24, 48 h 后,荧光显微镜下观察细胞线粒体的红色荧光和绿色荧光比值无明显变化;500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理细胞 24, 48 h 可使细胞线粒体的红色荧光和绿色荧光比值明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),且效果呈浓度和时间依赖性。一定浓度的莪术二酮可引起 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的下降。见表 3, 图 1。

3.4 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

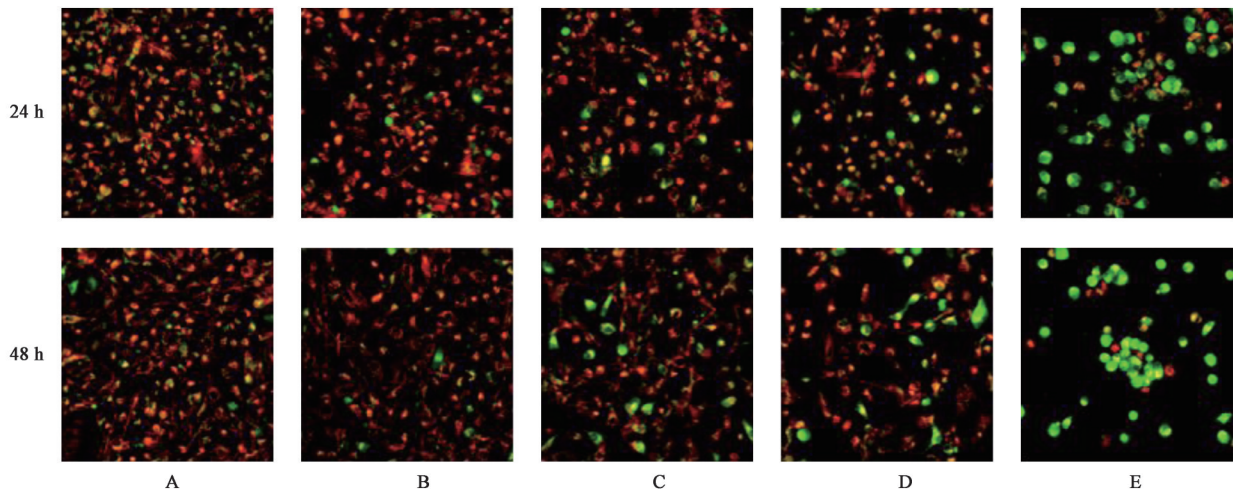
研究结果显示,与空白组比较,莪术二酮处理细胞 24, 48 h 后,早期凋亡、晚期凋亡、总凋亡细胞比例有所增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),呈现一定的时间和浓度依赖性。见表 4。

250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Caspase-9, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3 和 p21 蛋白表达均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5, 6, 图 2, 3。

4 讨论

莪术二酮是从中药莪术中提取的小分子化合物,在抗炎、抗血小板聚集和抗肿瘤各方面展现出了优势。在以往的多项莪术二酮抗乳腺癌研究中,研究对象多为 MCF-7 细胞,或者是选取单一浓度的多个莪术提取物同时研究其对乳腺癌细胞的作用,尚未有针对 TNBC MDA-MB-231 细胞并设置不同药物浓度的研究,也未曾有涉及到细胞周期的报道。

本研究首先通过检测不同浓度的莪术二酮作用于 MDA-MB-231 细胞后细胞的增殖情况,发现莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞增殖具有明显的抑制作用,且抑制效果呈时间和浓度依赖性。课题组在此基础上提出假设,莪术二酮抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的作用可能与其阻滞细胞周期、促进细胞凋亡有关。于是选取 3 个浓度进行了细胞周期的检测,发现一定浓度的莪术二酮 (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能将



A. 空白组; B~E. 莪术二酮 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 2~3 同)

图 1 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响 (JC-1 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of curdione on mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells (JC-1 staining, $\times 200$)

表 4 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of curdione on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h			48 h		
		早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
空白		2.96 \pm 0.39	3.09 \pm 1.13	6.05 \pm 1.31	2.82 \pm 0.86	1.96 \pm 0.29	4.78 \pm 0.98
莪术二酮	250	3.36 \pm 0.47	2.75 \pm 0.41	6.11 \pm 0.73	4.76 \pm 0.75 ¹⁾	2.59 \pm 0.53	7.35 \pm 1.13
	500	4.30 \pm 0.12 ¹⁾	3.50 \pm 0.67	7.80 \pm 0.58	5.79 \pm 0.63 ²⁾	2.84 \pm 0.08 ¹⁾	8.63 \pm 0.62 ²⁾
	1 000	5.47 \pm 0.63 ²⁾	3.98 \pm 0.74	9.45 \pm 0.77 ²⁾	10.89 \pm 0.74 ²⁾	3.98 \pm 0.28 ²⁾	14.86 \pm 0.50 ²⁾

表 5 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞 p53, p21, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of curdione on the p53, p21, Bax, Bcl-2 expression of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p53/GAPDH	p21/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/Bcl-2
空白		0.62 \pm 0.11	0.22 \pm 0.09	0.70 \pm 0.17	0.91 \pm 0.07	0.76 \pm 0.15
莪术二酮	250	1.22 \pm 0.49	0.84 \pm 0.30 ¹⁾	1.37 \pm 0.13 ²⁾	0.89 \pm 0.06	1.55 \pm 0.26 ²⁾
	500	1.84 \pm 0.10 ¹⁾	1.47 \pm 0.12 ²⁾	1.39 \pm 0.17 ²⁾	0.90 \pm 0.01	1.55 \pm 0.17 ²⁾
	1 000	1.78 \pm 0.70 ¹⁾	1.18 \pm 0.23 ²⁾	0.60 \pm 0.05	0.21 \pm 0.09 ²⁾	3.15 \pm 1.09 ¹⁾

表 6 莪术二酮对 MDA-MB-231 细胞 Caspase-9, cleaved Caspase-9, Caspase-3, cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of curdione on the expression of Caspase-9, cleaved Caspase-9, Caspase-3, cleaved Caspase-3 of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-9/ β -actin	cleaved Caspase-9/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin
空白		0.69 \pm 0.11	0.86 \pm 0.14	0.96 \pm 0.16	0.56 \pm 0.14
莪术二酮	250	0.89 \pm 0.04 ¹⁾	0.89 \pm 0.10	0.79 \pm 0.05	0.87 \pm 0.10 ¹⁾
	500	1.09 \pm 0.07 ²⁾	1.11 \pm 0.09 ¹⁾	0.84 \pm 0.11	0.93 \pm 0.13 ¹⁾
	1 000	1.43 \pm 0.17 ²⁾	1.44 \pm 0.13 ²⁾	0.98 \pm 0.12	1.30 \pm 0.62 ¹⁾

细胞阻滞在 G₁ 期; 进一步检测莪术二酮作用后细胞的线粒体膜电位水平和凋亡情况, 结果发现细胞线粒体膜电位明显下降, 凋亡细胞 (尤其是早期凋亡细胞) 比例明显增加。随后考察了与细胞周期调控和凋亡相关蛋白的表达水平, 发现莪术二酮作用

后, 细胞中与 G₁ 期阻滞相关的 p53, p21 蛋白水平上调, 与凋亡相关的 Bax 蛋白上调, Bcl-2 下调, Caspase-9 及其剪切体和 Caspase-3 的剪切体均上调。

完整的细胞周期包括 G₁ 期 (DNA 合成准备),

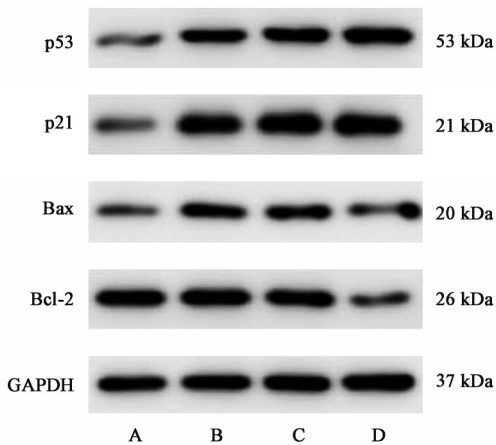


图2 各组MDA-MB-231细胞p53, p21, Bax, Bcl-2蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of curdione on the expression of p53, p21, Bax, Bcl-2 of MDA-MB-231 cells

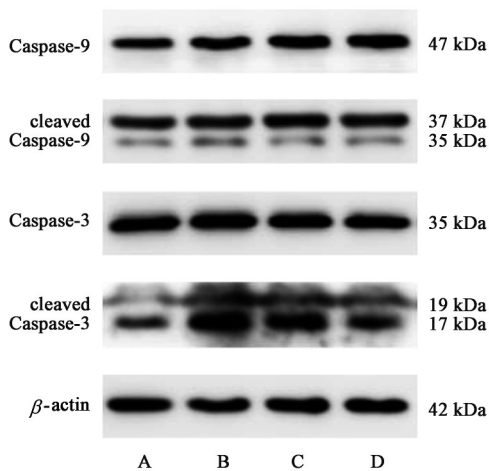


图3 各组MDA-MB-231细胞Caspase-9, cleaved Caspase-9, Caspase-3, cleaved Caspase-3蛋白电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Caspase-9, cleaved Caspase-9, Caspase-3, cleaved Caspase-3 expression of MDA-MB-231 cells

S期(DNA合成),G₂期(有丝分裂准备)和M期(有丝分裂)。此外,还有一部分细胞跳出循环进入G₀期(生长停滞),在特定生长因子的刺激下才会过渡到G₁期并重新进入细胞周期,这是一个由细胞周期蛋白(Cyclin)和相应的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)共同精密调控的循环^[16]。细胞周期G₁期到S期的准确转换是控制真核细胞增殖的关键,其错误调控促进了肿瘤的发生^[17]。目前已有几种针对乳腺癌细胞周期的新型靶向药物正在研发中,或许在将来为乳腺癌的治疗提供更多的选择^[18]。p53蛋白作为一种重要的周期调控蛋白,能识别包括单股DNA,插入/缺失错配和游离DNA末端在内的多种DNA损伤,通过调控下游p21蛋白的转录,抑制G₁期CDK,从而将细胞阻滞在G₁期^[19]。本研究发现一定浓度的莪术二酮作用后,MDA-MB-231细胞

G₁期比例增加,同时p53和p21蛋白水平上调,表明莪术二酮可能通过调控p53蛋白,将细胞阻滞在G₁期,从而抑制肿瘤细胞的增殖。

细胞凋亡是一种高度保守的细胞程序性死亡方式,包括内源性和外源性两条途径。凋亡的起始依赖于一系列Caspase的级联激活反应,并且受Bcl-2蛋白家族的调控。其中内源性途径又称线粒体依赖性途径,由Caspase-9作为起始Caspase,通过一系列级联途径促进凋亡小体生成,最终使凋亡执行者Caspase-3发生剪切,引起细胞凋亡,这条凋亡途径的特征是伴随着细胞线粒体膜电位的下降^[20]。本研究观察到莪术二酮作用于MDA-MB-231细胞后,细胞的线粒体膜电位下降,以高浓度时的表现较为明显;早期凋亡细胞比例明显增加,并且Caspase-9及其剪切体cleaved Caspase-9, Caspase-3的剪切体cleaved Caspase-3蛋白表达均发生不同程度的上调,同时Bcl-2蛋白家族中促进凋亡的Bax蛋白表达上调而抑制凋亡的Bcl-2蛋白表达下调,表明莪术二酮可能通过激活内源性凋亡途径,诱导MDA-MB-231细胞的凋亡。一项包括莪术二酮在内的3种莪术提取物对该细胞作用的研究显示^[21],42.9 μmol·L⁻¹的莪术二酮并不能引起细胞线粒体膜电位的下降,也没有观察到Bcl-2和cleaved Caspase-9蛋白表达上调,这可能与莪术二酮的浓度较低有关,与本研究的结果并不矛盾。可见,莪术二酮可能达到一定的浓度才能发挥诱导MDA-MB-231细胞凋亡的作用。值得注意的是,本研究在莪术二酮较低浓度(250 μmol·L⁻¹)时并没有观察到细胞线粒体膜电位的下降,但却有早期凋亡细胞比例增加,说明外源性凋亡途径也可能参与其中。

本研究通过检测不同浓度的莪术二酮作用于MDA-MB-231细胞后细胞增殖、凋亡和周期分布的情况,揭示了该中药单体对TNBC细胞的抗肿瘤作用,但是未对其中的机制(如相关的信号通路)进行深入的研究。一项生物信息学研究表明,Notch信号通路和Wnt信号通路可能参与莪术二酮抗TNBC的调控^[22],或许能为今后的进一步研究提供思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WINTERS S, MARTIN C, MURPHY D, et al. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017, 151: 1-32.
- [2] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast

- cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [3] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134-1150.
- [4] FOULKES W D, SMITH I E, REIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-1948.
- [5] 万宇翔, 刘泽宇, 叶晓嫻, 等. 运用数据挖掘联合网络药理学探索中医治疗三阴性乳腺癌用药规律及机制[J/OL]. *辽宁中医杂志*, 2021: 1-12 [2021-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20210305.1044.004.html>.
- [6] AGGARWAL B B, YUAN W, LI S, et al. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: identification of novel components of turmeric[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(9): 1529-1542.
- [7] FANG H, GAO B, ZHAO Y, et al. Curdione inhibits thrombin-induced platelet aggregation via regulating the AMP-activated protein kinase-vinculin/talin-integrin α II b β 3 sign pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152859.
- [8] 李佳娜, 郭苏兰, 肖水秀. 莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知能力及神经功能的保护作用研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(2): 84-89.
- [9] OH O J, MIN H Y, LEE S K. Inhibition of inducible prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression by curdione from *Curcuma zedoaria* [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(10): 1236-1239.
- [10] LI J, BIAN W, WAN J, et al. Curdione inhibits proliferation of MCF-7 Cells by inducing apoptosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9997-10001.
- [11] 孙学然, 杨克, 吕玲玲, 等. 莪术二酮对乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 66-73.
- [12] 王鹏, 赵文兵, 王毅东. 基于 PI3K/Akt 通路探讨莪术二酮诱导人肾癌 ACHN 细胞凋亡的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2020, 27(2): 196-199.
- [13] WANG X, JIANG Y, HU D. Optimization and *in vitro* antiproliferation of *Curcuma wenyujin's* active extracts by ultrasonication and response surface methodology [J]. *Chem Cent J*, 2016, 10: 32.
- [14] WU Z, ZAI W, CHEN W, et al. Curdione ameliorated doxorubicin-induced cardiotoxicity through suppressing oxidative stress and activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(2): 118-127.
- [15] LIU P, MIAO K, ZHANG L, et al. Curdione ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by repressing TGF- β -induced fibroblast to myofibroblast differentiation [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 58.
- [16] VAN DEN HEUVEL S. Cell-cycle regulation [J]. *WormBook*, 2005, doi: 10.1895/wormbook.1.28.1.
- [17] BERTOLI C, SKOTHEIM J M, De BRUIN R A M. Control of cell cycle transcription during G₁ and S phases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(8): 518-528.
- [18] THU K L, SORIA-BRETONES I, MAK T W, et al. Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(15): 1871-1885.
- [19] SCHAFER K A. The cell cycle: a review [J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 461-478.
- [20] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-592.
- [21] KONG Q, SUN F, CHEN X. Impact of fixed-dose combination of germacrone, curdione, and furanodiene on breast cancer cell proliferation [J]. *Cell J*, 2013, 15(2): 160-165.
- [22] KONG Q, MA Y, YU J, et al. Predicted molecular targets and pathways for germacrone, curdione, and furanodiene in the treatment of breast cancer using a bioinformatics approach [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15543.

[责任编辑 王鑫]