

白藜芦醇苷对人类乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响及其机制

覃庆洪¹, 黄敏², 谭启杏¹, 练斌¹, 韦长元^{1*}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**研究白藜芦醇苷(polydatin)在体外对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用,进一步探索其潜在的机制。**方法:**设定空白组及白藜芦醇苷(0.2,0.4,1.2,2.0,2.8 mg·L⁻¹)组,5-氟尿嘧啶组,采用噻唑蓝(MTT)比色法测定不同质量浓度白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞的生长抑制率;应用细胞克隆集落形成实验验证白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用;通过实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 5-氟尿嘧啶(1.0 μg·L⁻¹)和白藜芦醇苷(0.2,0.4,1.2 mg·L⁻¹)对 DNA 聚合酶 δ 催化亚基 P125(P125),P125 编码基因(POLD1),p53 基因(p53),细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 p21 mRNA 表达水平的影响;应用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测白藜芦醇苷(0.2,0.4,1.2 mg·L⁻¹)对 P125,p53,p21 蛋白表达水平的影响。**结果:**与空白组比较,白藜芦醇苷(0.2,0.4,1.2,2.0,2.8 mg·L⁻¹)在体外对 MCF-7 细胞具有明显的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$),并且这种抑制作用呈浓度依赖性。与空白组比较,白藜芦醇苷(0.2,0.4,1.2 mg·L⁻¹)均能明显抑制细胞集落的形成($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,5-氟尿嘧啶组和白藜芦醇苷(0.4,1.2 mg·L⁻¹)能够显著抑制 POLD1 mRNA 表达水平,同时显著抑制 P125 mRNA 和蛋白表达水平,明显升高 p53,p21 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05, P < 0.01$)。与 5-氟尿嘧啶组比较,白藜芦醇苷(1.2 mg·L⁻¹)对 POLD1,P125,p53,p21 mRNA 和蛋白表达水平影响均无显著差异。**结论:**白藜芦醇苷在体外能够显著抑制 MCF-7 细胞的增殖,其潜在机制可能与提高 p53 表达水平,抑制 POLD1 表达,促进 p21 表达有关。

[关键词] 白藜芦醇苷; 乳腺癌细胞; 增殖; DNA 聚合酶 δ 催化亚基 P125 编码基因(POLD1); DNA 聚合酶 δ 催化亚基 P125(P125); p53 基因(p53); 细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 p21(p21)

[中图分类号] R737.9;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0143-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018040143

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1455.016.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 14:55

Effect of Polydatin on MCF-7 Cells Proliferation and Its Underlying Mechanism

QIN Qing-hong¹, HUANG Min², TAN Qi-xing¹, LIAN Bin¹, WEI Chang-yuan^{1*}

(1. *Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;*

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of polydatin on the proliferation of MCF-7 cells, in order to further explore its underlying mechanism. **Method:** MCF-7 cells were treated with polydatin at different doses (0, 0.2, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8 mg·L⁻¹). The inhibitory rate of the cells was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay after treatment for 48 h. To further verify the inhibitory effect of polydatin on the proliferation of MCF-7 cells, the cell colonies were detected by the colony formation assay after treatment with polydatin (0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹) for 10 days. After treatment with polydatin for 48 h, the effect of polydatin (0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹) on mRNA expressions of DNA polymerase δ catalytic subunit gene POLD1, P125, p53 and p21 were detected by Real-time PCR. Protein expressions of P125, p53 and p21 were detected by Western

[收稿日期] 20170820(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360396);广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题项目(Z2015613);广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201405)

[第一作者] 覃庆洪,在读博士,副主任医师,从事乳腺癌的生物学特性及临床研究,Tel:0771-5308593,E-mail:qqh200150982@163.com

[通信作者] *韦长元,博士,教授,主任医师,从事乳腺癌的生物学特性及临床研究,Tel:0771-5332606,E-mail:weicy63@aliyun.com

blot. **Result:** Polydatin at different doses (0.2, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8 mg·L⁻¹) showed an inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After administration for 10 days, polydatin (0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹) significantly inhibited the formation of cell colonies, compared with control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After treatment for 48 h, mRNA expressions of POLD1 and P125 were significantly lower in polydatin (0.4, 1.2 mg·L⁻¹) groups and 5-FU group than control group, while mRNA expressions of p53 and p21 were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After treatment for 48 h, protein expression of P125 was obviously lower in polydatin (0.4, 1.2 mg·L⁻¹) groups and 5-FU group than control group, while protein expressions of p53 and p21 were increased significantly. The effect of polydatin on mRNA and protein expressions of POLD1, P125, p53 and p21 in polydatin (1.2 mg·L⁻¹) group had no difference with 5-FU group. **Conclusion:** Polydatin shows a significantly inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells. Its underlying mechanisms may be associated with the up-regulation of p53, the inhibition of expression of POLD1 and the promotion of p21.

[**Key words**] polydatin; MCF-7; proliferation; DNA polymerase δ catalytic subunit gene 1 (POLD1); DNA polymerase δ catalytic subunit 125 (P125); gene p53 (p53); cyclin dependent kinase inhibitor p21 (p21)

目前乳腺癌仍高居女性恶性肿瘤发病率第 1 位,并且发病率正呈逐年上升趋势,严重威胁女性健康^[1]。研究表明,肿瘤的发生与细胞周期调控异常有关^[2-3]。当细胞增殖调控基因异常以及变异的信号最终作用于细胞周期调控系统,激活细胞进行不正常的 DNA 复制,引起细胞恶性增殖时,可导致癌症的发生。因此,探索肿瘤细胞增殖机制并寻找有效抑制肿瘤细胞增殖方法一直是乳腺癌研究的重点领域之一。

DNA 复制调控系统为细胞正常增殖所需,参与 DNA 复制调控蛋白的异常,常会导致 DNA 异常复制,与肿瘤细胞的异常增殖关系密切。DNA 聚合酶 δ 是真核生物 DNA 复制的最主要复制酶,哺乳动物细胞 DNA 聚合酶 δ 由 4 个亚基(p125, p66, p50 及 p12)构成^[4],是参与真核生物细胞 DNA 复制的重要作用酶之一,其主要活性是催化 DNA 合成^[5]。前期研究发现,乳腺癌组织和癌旁组织中高表达 DNA 聚合酶 δ 催化亚基 P125 编码基因(POLD1),并且其表达水平与临床分期关系密切^[6]。P125 亚基表达水平或活性的升高, DNA 聚合酶 δ 的合成增加,导致肿瘤细胞大量增殖,促进了肿瘤的发生发展^[7]。白藜芦醇苷是多种天然植物中的功效成分,研究表明白藜芦醇苷能够通过抗氧化、抗血栓形成等机制,具有保护肝脏、降血脂、增强心肌功能等作用^[8-10]。在对肿瘤作用的研究中发现,白藜芦醇苷能够通过抑制长链非编码 RNA 肝癌高表达转录本(HULC)^[11],微小 mRNA-21(microRNA-21)^[12]等表达抑制肝癌细胞增殖和侵袭,并且能够抑制乳腺癌细胞的转移^[13],但白藜芦醇苷影响乳腺癌细胞增殖

的具体机制未进行进一步探索。本研究拟观察白藜芦醇苷对乳腺癌细胞恶性增殖的影响,并进一步以 POLD1 基因为目标探索白藜芦醇苷对细胞增殖影响的机制。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自中国科学院上海细胞库,编号 CBD10763。

1.2 试剂 白藜芦醇苷单体(大连美仑生物技术有限公司,批号 160702),纯度 >98%,避光保存。5-氟尿嘧啶(上海旭东海普药业有限公司,批号 FA161016);细胞培养液 DMEM,胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号分别为 752391, 140714);噻唑蓝(MTT,美国 Amersco 公司,批号 298931);cDNA 逆转录试剂盒, DNA 快速纯化回收试剂盒,荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Green qPCR 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为 KR104-01, 24050T, FP203-02]。POLD1, p53, p21 及内参 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, P125(112 bp): 上游 5'-AGGACCAGGGTTCGTAGAAGA-3', 下游 5'-CACAGGCAGAGTCACTCAAAA-3'; POLD1(109 bp): 上游 5'-GCTCCGCTCCTACACGCTCAA-3', 下游 5'-GGTCTGGTTCGTTCCATTCTGC-3'; p53(156 bp): 上游 5'-GGCCCACTTACCGTACTAA-3', 下游 5'-GTGGTTTCAAGGCCAGATGT-3'; p21(145 bp): 上游 5'-GCTCCGCTCCTACACGCTCAA-3', 下游 5'-CGTGGGAAGGTAGAGCTTGG-3'; β -actin(203 bp): 上游 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3', 下游 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'。羊抗 P125, 鼠抗

p53, 鼠抗 p21 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 E030170, SC-47698, SC-166630); 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(上海康成公司, 批号 KC120210); 兔抗山羊二抗, 鼠抗山羊二抗(美国 KPL 公司, 批号分别为 E031310, 474-1806)。

1.3 仪器 Model-450 型酶联免疫检测仪, MULTISKAN MK3 型酶标仪(法国 Thermo 公司); GelDoc2000 型凝胶电泳成像分析系统, Power/Pac300 型稳压稳流电泳仪, Trans-Blot SD 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 5810R 型高速冷冻多用途离心机(德国 Eppendorf 公司); 7500 型 iCycleriQ 型实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 MCF-7 细胞接种于培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 培养液中加入青霉素(100 U·mL⁻¹)和链霉素(100 U·mL⁻¹)。细胞置于 37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养, 隔天换液, 培养至细胞铺满培养瓶 80% ~ 90% 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞生长抑制率测定 采用 MTT 比色法, 取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 6 × 10³ 个/孔, 接种于 96 孔板, 培养过夜贴壁后, 加入白藜芦醇苷(0, 0.2, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8 mg·L⁻¹), 每个质量浓度设 3 个平行孔。培养 44 h 后, 加入 5 g·L⁻¹ MTT 10 μL 显色, 继续培养 4 h, 吸取培养基后, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO), 酶标仪测定吸光度 A, 抑制率 = (1 - A_{药物组} / A_{空白组}) × 100%。

2.3 细胞克隆集落形成能力测定 取对数生长期细胞, 调整细胞密度至 500 个/mL, 取 4 mL 接种于 6 孔板。培养过夜贴壁后, 分别加入 0, 0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹ 白藜芦醇苷, 每个质量浓度设 3 个复孔。继续培养 10 d, 使用吉姆萨染液染色, 倒置显微镜下观察并拍照, 按集落形成率 = 每组细胞集落数/接种细胞数 × 100%, 计数克隆细胞集落(细胞数 > 50 个)及集落形成率。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 POLD1, P125, p53, p21 mRNA 表达水平 实验方法参考文献[14], 将对数生长期细胞, 经胰酶消化后制成单细胞悬液, 按 1 × 10⁵ 个/孔的细胞数接种于 6 孔板中。分别设白藜芦醇苷组(0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹), 5-氟尿嘧啶组(1.0 μg·L⁻¹)和空白组, 培养 48 h 后, 收集细胞, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 通过特异性引物 POLD1, P125, p53, p21 及内参基因 β-actin 进行

扩增, 反应条件为 95 ℃ 4 min, 95 ℃ 20 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。分析溶解曲线, 确认扩增产物的特异性, 测定循环阈值(C_t), 计算 ΔC_t, mRNA 相对表达量根据 2^{-ΔΔC_t} 法计算。

2.5 蛋白质免疫印迹法检测 P125, p53, p21 蛋白表达水平 细胞培养及分组同 2.4 项, 收集白藜芦醇苷(0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹)组, 5-氟尿嘧啶组和空白组培养 48 h 后的细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液, 提取总蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 分别孵育一抗(1:1 000), 二抗(1:5 000), 洗膜后进行 ECL 发光液化学发光, 显影, 通过凝胶成像系统扫描分析定影后, 测定各条带灰度值。并采用 GraphPad Prism5.0 软件分析计算每个蛋白条带灰度值与内参照 GAPDH 的灰度值比值, 以蛋白相对表达量进行校对表示。

2.6 统计学处理 以 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析, 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白藜芦醇苷对细胞增殖的影响 白藜芦醇苷处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 与空白组比较, 白藜芦醇苷 0.2, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8 mg·L⁻¹ 对 MCF-7 细胞增殖抑制率升高(P < 0.05, P < 0.01), 并且白藜芦醇苷对细胞增殖的抑制呈浓度依赖性。选取 0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹ 白藜芦醇苷进行后续实验。见表 1。

表 1 白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibitory effect of polydatin on MCF-7 cells proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	100.00 ± 0.00
白藜芦醇苷	0.2	93.17 ± 3.36 ¹⁾
	0.4	81.58 ± 2.00 ¹⁾
	1.2	70.93 ± 1.46 ²⁾
	2.0	35.12 ± 3.42 ²⁾
	2.8	23.52 ± 1.92 ²⁾

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

3.2 白藜芦醇苷对细胞集落形成能力的影响 与空白组比较, 白藜芦醇苷(0.2, 0.4, 1.2 mg·L⁻¹)处理细胞 10 d 后, 细胞集落形成率降低, 并且细胞克隆大小及集落形成率呈浓度依赖性, 随着质量浓度增大, 集落形成率减少(P < 0.05, P < 0.01)。表明

白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞增殖有明显抑制作用。见表 2。

表 2 白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of polydatin on colony formation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	集落形成率/%
空白	-	193.01 \pm 4.19
白藜芦醇苷	0.2	120.05 \pm 16.25 ¹⁾
	0.4	56.77 \pm 8.24 ²⁾
	1.2	25.45 \pm 4.29 ²⁾

3.3 白藜芦醇苷对 POLD1, P125 mRNA 表达的影响 与空白组比较,白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组和 5-氟尿嘧啶组 POLD1, P125 mRNA 水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 POLD1, P125 mRNA 水平有下降趋势,但无统计学意义。与 5-氟尿嘧啶组比较,白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 POLD1, P125 mRNA 水平明显升高($P < 0.05$);白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 POLD1, P125 mRNA 水平无明显变化。见表 3。

表 3 白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞 POLD1, P125 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of polydatin on mRNA expressions of POLD1 and P125 in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	POLD1	P125
空白	-	110.33 \pm 6.66	111.67 \pm 12.06
白藜芦醇苷	0.2	92.33 \pm 5.03 ³⁾	90.67 \pm 6.66 ³⁾
	0.4	70.00 \pm 2.65 ¹⁾	63.00 \pm 3.61 ¹⁾
	1.2	51.67 \pm 2.52 ²⁾	51.33 \pm 3.51 ²⁾
5-氟尿嘧啶	0.001	46.33 \pm 4.16 ¹⁾	49.00 \pm 3.00 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 5-氟尿嘧啶组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4, 5 同)。

3.4 白藜芦醇苷对 p53, p21 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组和 5-氟尿嘧啶组 p53, p21 mRNA 水平显著升高($P < 0.01$);白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 p53, p21 mRNA 水平无明显变化。与 5-氟尿嘧啶组比较,白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 p53, p21 mRNA 水平明显降低($P < 0.05$);白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 p53, p21 mRNA 水平无明显变化。见表 4。

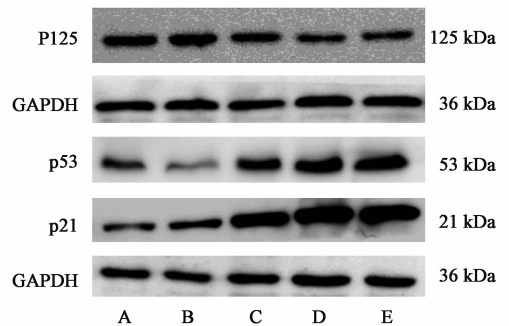
3.5 白藜芦醇苷对 P125, p53, p21 蛋白表达水平的影响 与空白组比较,白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组和 5-氟尿嘧啶组 P125 蛋白表达水平降低,而 p53, p21 蛋白表达水平升高($P < 0.05$,

表 4 白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞 p53, p21 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of polydatin on mRNA expressions of p53 and p21 in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p53	p21
空白	-	109.34 \pm 6.58	110.37 \pm 10.03
白藜芦醇苷	0.2	99.67 \pm 6.43 ³⁾	100.67 \pm 6.66 ³⁾
	0.4	255.00 \pm 7.94 ²⁾	251.33 \pm 3.51 ²⁾
	1.2	319.67 \pm 20.43 ²⁾	349.00 \pm 3.00 ²⁾
5-氟尿嘧啶	0.001	337.33 \pm 16.26 ²⁾	352.33 \pm 11.50 ²⁾

$P < 0.01$);白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 P125, p53, p21 蛋白表达水平均无明显变化。与 5-氟尿嘧啶组比较,白藜芦醇苷(0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 P125 蛋白表达水平升高, p53, p21 的蛋白表达水平均降低($P < 0.05$);白藜芦醇苷(0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 P125, p53, p21 的蛋白表达水平均降低,但无统计学差异。见图 1, 表 5。



A. 空白组; B ~ D. 白藜芦醇苷(0.2, 0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组; E. 5-氟尿嘧啶(1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组

图 1 白藜芦醇苷作用 MCF-7 细胞后 P125, p53, p21 蛋白表达电泳
Fig. 1 Effect of polydatin on protein expressions of P125, p53 and p21 in MCF-7 cells

4 讨论

细胞恶性增殖,进而导致癌症的发生,与参与细胞增殖相关物质水平改变和变异的信号最终作用于细胞周期调控系统,激活细胞进行不正常的 DNA 复制密切相关。POLD1 是 DNA 聚合酶 δ 的催化亚基 P125 的编码基因,有多种转录调控因子的结合位点,调控因子通过对 POLD1 作用,可实现对 DNA 复制的调节,在 DNA 复制中起重要作用。POLD1 被认为是肿瘤相关基因, POLD1 的高表达与多种肿瘤的发生、发展有着密切关系^[15]。研究表明,体外干扰 POLD1 基因能够显著抑制肝癌细胞增殖^[16]。本课题组前期研究中发现,乳腺癌和癌旁组织中高

表 5 白藜芦醇苷对 MCF-7 细胞 P125, p53, p21 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of polydatin on protein expressions of P125, p53 and p21 in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	P125/GAPDH	p53/GAPDH	p21/GAPDH
空白	-	101.33 \pm 8.62	107.00 \pm 4.59	108.33 \pm 5.03
白藜芦醇苷	0.2	99.00 \pm 5.57 ³⁾	94.67 \pm 2.52 ³⁾	104.00 \pm 4.59 ³⁾
	0.4	78.33 \pm 4.04 ¹⁾	178.33 \pm 35.73 ¹⁾	194.67 \pm 39.53 ¹⁾
	1.2	59.33 \pm 3.51 ²⁾	256.33 \pm 43.56 ²⁾	275.67 \pm 31.66 ²⁾
	5-氟尿嘧啶	0.001	68.00 \pm 2.65 ¹⁾	270.67 \pm 46.52 ²⁾

表达 POLD1, 并且与临床分期有着密切关系, 进一步验证了 POLD1 与乳腺癌发生发展的密切关系^[6]。经生物信息学分析, POLD1 启动子上富含 GCp 岛, 重要转录调控因子 p53, 转录因子 E2F, C-myc 的结合位点在 -523 bp/0 bp 区域, p53 参与肿瘤的抑制作用主要是通过调节其靶基因转录活性而实现的, p53 和 Sp1 可能通过竞争 POLD1 启动子上的结合位点而共同调控 POLD1 mRNA 的转录, 这些转录因子对 POLD1 的转录活性调节起决定性作用, 转录因子的调节作用影响 POLD1 转录活性, 进而影响 P125 亚基的表达和活性, 影响 DNA 聚合酶 δ 合成, 出现细胞的异常复制, 导致肿瘤细胞的异常增殖^[16]。此外, 细胞周期调控因子 p21 受到 p53 正向调节, 而 p21 也能够通过抑制 POLD1 启动子活性, 抑制 MCF-7 细胞的生长, 进一步验证了 POLD1 作为肿瘤细胞异常增殖的重要调控因子^[17]。

本研究发现, 白藜芦醇苷 (0.4, 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够抑制 POLD1 mRNA 表达水平, 同时 P125 mRNA 和蛋白表达水平均下降, 表明白藜芦醇苷可能通过对 POLD1 的调节作用, 能够使 P125 的表达受到抑制, 从而实现对调节细胞复制增殖的 DNA 多聚酶 δ 的抑制作用, 进而抑制了细胞的异常增殖。进一步研究发现, 白藜芦醇苷能够显著增加 p53 mRNA 和蛋白表达水平, p53 作为 POLD1 活性的重要调节因子, p53 活性的增加能够抑制 POLD1 的功能^[18], 白藜芦醇苷对 POLD1 的调控作用可能通过对转录因子 p53 的调节而实现。同时, 白藜芦醇苷不仅上调 p53 水平, 也能够增加 p21 mRNA 和蛋白表达水平, 进一步增强了对 POLD1 的抑制作用, 使 MCF-7 细胞增殖受到影响。

5-氟尿嘧啶在抑制多种肿瘤细胞增殖具有显著的优势, 广泛用于多种实体肿瘤的化疗中, 但是具有骨髓抑制和肠道毒性等严重不良反应, 一定程度上限制了其在临床中的使用。参考 5-氟尿嘧啶对细胞增殖的作用^[19], 本研究选取 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 5-氟尿

嘧啶使用质量浓度。经比较不同质量浓度的白藜芦醇苷和 5-氟尿嘧啶对 POLD1 的作用, 发现白藜芦醇苷 (1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组和 5-氟尿嘧啶对 POLD1 的抑制作用相当, 验证了 5-氟尿嘧啶对乳腺癌细胞的抑制作用, 也充分显示了白藜芦醇苷抑制乳腺癌细胞增殖的潜质, 而目前尚未发现白藜芦醇苷的严重不良反应, 体现其作为治疗乳腺癌药物研发的价值。

综上所述, 白藜芦醇苷在体外能够上调转录因子 p53 和细胞周期调控因子 p21 的表达水平, 抑制 POLD1 和 P125 表达, 使 MCF-7 细胞的增殖受到抑制。但肿瘤的发生发展受到体内环境的综合影响, 因此, 本实验作为体外研究具有一定的局限性, 应进一步通过体内实验验证白藜芦醇苷对乳腺癌细胞增殖的抑制作用, 进一步探索白藜芦醇苷在乳腺癌发生发展中的作用, 为白藜芦醇苷作为防治乳腺癌的潜力药物提供更科学的依据。

[参考文献]

[1] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(13): 668-674.

[2] Hirschey M D, DeBerardinis R J, Diehl A M, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35(Suppl): S129-150.

[3] Gérard C, Goldbeter A. Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological and pathological conditions[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(2): 140-156.

[4] 林晓燕, 张叔人, 徐恒, 等. 真核生物 DNA 聚合酶 δ 的研究现状[J]. 自然科学进展, 2005, 15(1): 1-7.

[5] Lee M Y, ZHANG S, LIN S H, et al. Regulation of human DNA polymerase delta in the cellular responses to DNA damage[J]. Environ Mol Mutagen, 2012, 53(9): 683-698.

[5] 李锦源. 乳腺癌组织 POLD1 基因的表达研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.

[6] 廖柳凤, 欧贤红, 刘华钢, 等. 氯化两面针碱对 MCF-7

- 细胞增殖的抑制及对 P125 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 85-89.
- [7] Dalva M, Correia A T, Jatene N F, et al. New contribution to the study of ventricular remodeling and valve rings in dilated cardiomyopathy: anatomical and histological evaluation [J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2014, 29(4): 478-486.
- [8] YE X, JIANG F, LI Y, et al. Glabridin attenuates the migratory and invasive capacity of breast cancer cells by activating microRNA-200c [J]. Cancer Sci, 2015, 105(7): 875-882.
- [9] ZHANG Q, TAN Y, ZHANG N, et al. Polydatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and myocardial superoxide generation [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(10): 1352-1361.
- [10] 孙海榕, 王璐瑜, 王忠鑫. 白藜芦醇苷通过抑制长链非编码 RNA HULC 表达抑制肝癌 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的增殖和侵袭[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(5): 561-568.
- [11] 孙海榕, 王璐瑜, 王忠鑫. 白藜芦醇苷通过抑制 microRNA-21 表达抑制肝癌细胞的增殖和侵袭[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(11): 1220-1226.
- [12] 张玉松, 庄志祥, 焦旸, 等. 白藜芦醇苷对乳腺癌细胞转移潜能影响观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(22): 1788-1793.
- [13] 熊莎, 高建蓉, 胡祖良, 等. 鳖甲提取物对抑制 TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 189-193.
- [14] 廖柳凤, 欧贤红, 刘华钢, 等. POLD1 基因在原发性肝癌中的表达及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(2): 151-155.
- [15] 吴琼, 黄文涛, 黄怡, 等. RNA 干扰技术抑制人肝癌细胞 POLD1 基因表达的研究[J]. 广西医学, 2014, 36(5): 549-551.
- [16] LI B, Lee M Y. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(32): 29729-29739.
- [17] 石磊, 徐恒, 朱晓宇, 等. p21 对 DNA 聚合酶 δ 表达的抑制及其对 MCF7 细胞增殖和恶性表型的影响[J]. 自然科学进展, 2006, 16(6): 672-679.
- [18] 朱晓宇, 徐恒, 李莉, 等. p53 亚细胞定位变化对 POLD1 基因启动子活性的影响[J]. 自然科学进展, 2006, 16(4): 555-562.
- [19] 赵剑平. 5-氟尿嘧啶对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响及其机制探讨[J]. 山东医药, 2013, 53(40): 26-28.

[责任编辑 张丰丰]