

· 辣椒碱抗肿瘤研究专题 ·

[编者按] 辣椒碱是辣椒中的主要生物活性成分。辣椒碱的药理作用十分广泛,不仅具有抗氧化、预防心血管疾病、保护胃肠黏膜、镇痛、抗炎和止痒等多种功效,而且具有很强的抗肿瘤作用。辣椒碱在非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤中都显示了较强的抗肿瘤作用,但辣椒碱具体的抗肿瘤机制尚未阐明。因此,促进开发辣椒碱成为临床可应用的抗肿瘤药物就必须开展其基础研究。本课题组以乳腺癌和肝癌为研究对象,研究辣椒碱抑制这两种肿瘤生长,迁移和侵袭的作用,并选择与参与肿瘤发生发展密切相关的分子如高迁移率族蛋白 B1(HMGB1),人类免疫缺陷病毒短转录诱导物连接因子-1(FBI-1)和沉默信息调节因子 1(SIRT1)等进行深入研究辣椒碱抗肿瘤的可能分子机制。同时通过检索近年来与辣椒碱相关的国内外文献,并对其进行分析,归纳和总结辣椒碱抗肿瘤的分子机制及靶点,为今后进一步研究及合理开发利用辣椒碱提供科学依据和理论基础。

辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠 移植瘤生长的抑制作用

陈茂剑, 蒋玮, 毛岸云, 覃庆洪, 谭启杏, 肖潺潺, 梁至洁, 杨伟萍, 韦长元*
(广西医科大学 附属肿瘤医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的:观察辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用及其机制。方法:通过皮下注射 MDA-MB-231 细胞的方法建立乳腺癌裸鼠移植瘤模型,待肿瘤体积达到约 100 mm³,将裸鼠随机分为模型组和辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组,每组 5 只。辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组裸鼠分别腹腔注射相应剂量的辣椒碱,模型组注射等体积的磷酸缓冲盐溶液(PBS)溶剂,3 d/次,连续给药 8 次。每次给药前先检测裸鼠体重和肿瘤体积,末次给药 24 h 后处死各组裸鼠,计算肿瘤体积,称肿瘤质量,并计算抑瘤率。应用免疫组化法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测辣椒碱治疗后各组肿瘤组织中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和 Toll 样受体 4(TLR4)蛋白表达水平。结果:与模型组比较,辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组裸鼠体质量无明显变化,但肿瘤体积显著缩小($P < 0.01$),肿瘤质量显著减小($P < 0.01$),抑瘤率显著增大($P < 0.01$),且呈剂量依赖性;与模型组比较,辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组肿瘤组织 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达明显降低,且呈剂量依赖性。结论:辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤生长具有明显的抑制作用,其机制可能与下调 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达有关。

[关键词] 辣椒碱; 乳腺癌; 裸鼠移植瘤; 高迁移率族蛋白 B1(HMGB1); Toll 样受体 4(TLR4)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)07-0082-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190723

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181218.1704.006.html>

[网络出版时间] 2018-12-20 17:14

Inhibitory Effect of Capsaicin on Growth of Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Transplanted Tumor in Nude Mice

CHEN Mao-jian, JIANG Wei, MAO An-yun, QIN Qing-hong, TAN Qi-xing, XIAO Chan-chan,
LIANG Zhi-jie, YANG Wei-ping, WEI Chang-yuan*
(Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[收稿日期] 20181011(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360396,81860341);广西科技基础条件平台建设项目(15-235-05);广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139204);广西研究生教育创新计划项目(YCSW2017108,YCBZ2018041)

[第一作者] 陈茂剑,在读博士,住院医师,从事乳腺癌的生物学特性与临床研究,E-mail: chenmj91@foxmail.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与临床研究,E-mail: weicy63@aliyun.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of capsaicin on the growth of breast cancer MDA-MB-231 cells transplanted tumour in nude mice and its possible molecular mechanism. **Method:** Transplanted tumor model of breast cancer MDA-MB-231 cells in nude mice were established. Then the tumor-bearing mice were randomly divided into 4 groups: model group, and low, medium and high-dose capsaicin groups (5, 10, 20 mg·kg⁻¹). Mice of low, medium and high-dose capsaicin groups (5, 10, 20 mg·kg⁻¹) were intraperitoneally injected with the corresponding dose of capsaicin, and the model group was injected with the same volume of phosphate buffer saline (PBS), once every 3 days, for a total of 8 times in succession. Body weight of mice and transplantation tumor volume were measured before each injection of capsaicin. Mice of each group were put to death 24 h after the last administration, and then the tumor volume, mass and the tumor inhibitory rate were calculated. The protein expression levels of high mobility group box 1 (HMGB1) and Toll-like receptors 4 (TLR4) were measured by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** No significant difference was observed between each group in body weight. However, compared with the model group, capsaicin (5, 10, 20 mg·kg⁻¹) remarkably inhibited the tumor volume and mass ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased the tumor inhibitory rate ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner. Capsaicin (5, 10, 20 mg·kg⁻¹) also markedly inhibited the protein expression levels of HMGB1 and TLR4 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Capsaicin remarkably inhibits the growth of breast cancer MDA-MB-231 cells transplanted tumour in nude mice, and the possible mechanism may be related to the down-regulation of HMGB1 and TLR4 at the protein level.

[Key words] capsaicin; breast cancer; transplanted tumor in nude mice; high mobility group box 1 (HMGB1); Toll-like receptor 4 (TLR4)

我国乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第 1 位,已成为威胁女性身心健康最常见的恶性肿瘤,并且发病率仍在逐年上升并趋于年轻化^[1]。目前,治疗乳腺癌仍主要采用手术和传统的化疗手段,其中化疗药物的毒副作用及多药耐药问题在很大程度上制约了化疗效果,同时严重影响患者的生活质量和治疗信心。因此,寻找高效低毒的新型化疗药物显得尤为重要。辣椒碱又称辣椒素,结构式为(反式)8-甲基-N-香草基-6-壬烯酰胺,是从辣椒属植物中得到的红辣椒的主要活性成分^[2]。近年来多项表明,辣椒碱具有镇痛、止痒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等功效^[3]。随着对辣椒碱研究的深入,发现辣椒碱可抑制前列腺癌、宫颈癌、鼻咽癌、肝癌和黑色素瘤等多种肿瘤细胞的增殖与存活^[4-5]。本研究组前期研究显示辣椒碱在体外对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖具有抑制作用,并且潜在机制可能与其上调细胞中细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 p21(p21) mRNA 和蛋白的表达水平,下调细胞中人类免疫缺陷病毒短转录诱导物连接因子-1(FBI-1) mRNA 和蛋白的表达水平有关^[6]。另有研究显示,辣椒碱在体外对恶性程度更高,侵袭能力更强的三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞也具有抑制作用,辣椒碱可通过抑制非受体酪氨酸激酶(c-Src)/黏着斑激酶(FAK)/桩蛋白(Paxillin)通路以及基质金属蛋白酶

(MMP)-2 和 MMP-9 mRNA 和蛋白表达从而抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭^[5]。由于乳腺癌的发生和发展受到体内环境的综合影响,通过动物体内实验验证辣椒碱对乳腺癌的抑制作用并进一步探讨其机制,对于开发辣椒碱作为防治乳腺癌的潜力药物具有重要的现实意义。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一种与染色体结合的非组蛋白,在核内具有调节 DNA 复制、转录调控、损伤修复、重组等多种重要的生物学功能^[7]。近年来研究发现肿瘤的发生和发展与 HMGB1 的表达异常密切相关^[8-9]。有报道显示,在乳腺癌患者的血清和癌组织中, HMGB1 呈异常高表达,并且与预后不良有密切关系^[10]。而沉默 HMGB1 则可以破坏乳腺癌细胞端粒动态平衡,抑制癌细胞 DNA 损伤的修复,从而发挥抑制乳腺癌作用,提示通过抑制 HMGB1 表达可能成为治疗乳腺癌的新策略^[11]。然而辣椒碱在体内对乳腺癌的抑制作用及对 HMGB1 表达的影响尚不明确。因此,本研究通过建立乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤模型,并从腹腔注射不同剂量的辣椒碱进行治疗干预,然后检测裸鼠体质量、肿瘤体积、肿瘤质量,检测肿瘤组织中 HMGB1 及其受体 Toll 样受体 4(TLR4)的蛋白表达水平,从而观察辣椒碱在体内对乳腺癌的抑制作用,并进一步探究其分子生物学机制,以期开发辣椒碱作为防治乳腺

癌的潜力药物提供更科学的依据。

1 材料

1.1 细胞株和动物 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 编号 TCHu227。SPF 级 BALB/c 裸鼠, 雌性, 5 周龄, 体重 14 ~ 16 g, 由广西医科大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(桂) 2014-0002。本研究所有动物实验均符合中国伦理委员会的相关要求。

1.2 药品及试剂 辣椒碱(美国 MCE 公司, 批号 HY-10448, 纯度 $\geq 98\%$); 胎牛血清(FBS), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司, 批号分别为 10099-141, C11995500BT); 青霉素-链霉素溶液, 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司, 批号分别为 SV30010, J140028); 通用型免疫组化 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 SP-9000); HMGB1, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 单克隆抗体(美国 CST 公司, 批号分别为 6893S, 5174T); TLR4 多克隆抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 19811-1-AP); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 EarthOx 公司, 批号 E030120-01); RIPA 裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 R0010, PC0020)。

1.3 仪器 BB15 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司); CKX41 型倒置显微镜, BX50 型正置显微镜(日本 Olympus 公司); Power/Pac300 型稳压稳流电泳仪, Trans-Blot SD 型转膜仪, CelDoc2000 型凝胶电泳成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞用含 10% FBS, 100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

2.2 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤模型的建立、分组与给药 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 用 PBS 制成单细胞悬液, 并调整细胞密度至 5×10^7 个/mL, 在无菌条件下用 1 mL 注射器在裸鼠的右侧前腿外侧以每只裸鼠 200 μ L 进行皮下接种^[12], 待肿瘤体积达到 100 mm³ 时, 将符合要求的移植瘤裸鼠 20 只, 随机分为模型组和辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹) 组^[13], 每组 5 只。辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹) 组裸鼠分别腹腔注射相应剂量的辣椒碱, 模型组注射等体积的 PBS 溶剂, 3 d/次, 连续给药 8 次。实验期间裸鼠自由饮食饮水, 并观察裸鼠的一般生存状况, 末次给药

24 h 后处死各组裸鼠。

2.3 裸鼠体质量和移植瘤体积的测量 每次给药前先对裸鼠进行体质量称量, 并用游标卡尺测量肿瘤体长径(a , mm) 和短径(b , mm)。肿瘤体积计算公式为 $V = (a \times b^2) / 2$ 。

2.4 肿瘤质量的测量和抑瘤率 末次给药 24 h 后处死各组裸鼠, 剥取肿瘤组织, 称肿瘤质量, 并计算抑瘤率。抑瘤率 = $(1 - \text{辣椒碱组平均肿瘤质量} / \text{模型组平均肿瘤质量}) \times 100\%$ 。

2.5 免疫组化法检测肿瘤组织中 HMGB1, TLR4 蛋白的表达 取各组肿瘤组织, 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 严格按照试剂盒说明书操作, 石蜡包埋, 脱蜡, 水化, H₂O₂ 处理, 高压抗原修复, 血清封闭, 加入一抗 HMGB1(1:400) 和 TLR4(1:200), 4 °C 孵育过夜, 二抗采用辣根过氧化物酶标记, 然后加新鲜配制的 DAB 溶液进行显色, 切片脱水、透明, 封片。棕褐色或棕黄色为蛋白染色阳性表达, HMGB1 主要位于细胞核和细胞质, TLR4 主要位于细胞膜和细胞质。在光学显微镜下观察蛋白在肿瘤组织中的表达情况。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织中 HMGB1, TLR4 蛋白的表达 取新鲜肿瘤组织, 每 20 mg 加入 RIPA 裂解液 150 μ L, 临用前加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), 提取总蛋白。总蛋白样品用 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品 25 μ g, 经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜, 用封闭液(5% BSA/TBST) 封闭 1 h, 加入一抗 HMGB1, TLR4, GAPDH(均 1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗(1:1 万) 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 系统显影。以 GAPDH 作为内参, Image J 软件采集条带灰度值, 取目的条带灰度值与内参条带灰度值比值作为相对表达量。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 各项检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 数据间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠一般状况和体质量的影响 各组裸鼠精神状态均良好, 食欲正常, 活动正常, 反应灵敏, 皮肤颜色如常, 大小便正常。与模型组比较, 辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹) 组裸鼠体质量无明显变化, 差异无统计学意义, 见表 1。

表 1 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of capsaicin on body weight of nude mice bearing MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	首次给药 当天	首次给药 3 d 后	首次给药 6 d 后	首次给药 9 d 后	首次给药 12 d 后	首次给药 15 d 后	首次给药 18 d 后	首次给药 21 d 后
模型	-	15.91 ± 0.42	15.97 ± 0.46	16.35 ± 0.76	17.06 ± 0.56	17.96 ± 0.76	18.36 ± 0.99	18.96 ± 0.87	19.91 ± 0.68
辣椒碱	5	15.34 ± 0.36	15.39 ± 0.40	16.56 ± 0.58	16.93 ± 0.78	17.13 ± 0.87	17.73 ± 0.82	17.98 ± 0.43	18.41 ± 0.69
	10	15.85 ± 0.59	15.95 ± 0.52	16.28 ± 0.99	16.58 ± 1.03	17.02 ± 0.81	17.41 ± 0.92	17.92 ± 0.56	18.35 ± 0.41
	20	15.74 ± 0.85	15.67 ± 0.90	16.08 ± 0.73	16.47 ± 0.93	17.05 ± 0.65	17.39 ± 0.81	17.95 ± 0.72	18.28 ± 0.35

3.2 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤体积的影响 首次给药 6 d 后,与模型组比较,辣椒碱高剂量(20 mg·kg⁻¹)组肿瘤体积明显降低($P < 0.05$);首

次给药 9 d 后,辣椒碱低、中、高剂量(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组肿瘤体积均显著降低,呈剂量依赖效应,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

表 2 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of capsaicin on volume of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	首次给药 当天	首次给药 3 d 后	首次给药 6 d 后	首次给药 9 d 后	首次给药 12 d 后	首次给药 15 d 后	首次给药 18 d 后	首次给药 21 d 后
模型	-	99.45 ± 7.45	158.97 ± 7.11	242.09 ± 9.12	378.06 ± 10.39	589.96 ± 11.08	815.36 ± 15.90	1 114.96 ± 18.87	1 501.91 ± 25.59
辣椒碱	5	103.00 ± 8.63	154.39 ± 7.87	237.62 ± 9.73	309.93 ± 9.75 ¹⁾	387.13 ± 10.05 ²⁾	507.73 ± 12.79 ²⁾	673.98 ± 14.33 ²⁾	934.41 ± 17.41 ²⁾
	10	98.06 ± 9.65	157.95 ± 8.42	227.71 ± 7.61	281.58 ± 9.98 ²⁾	331.02 ± 9.52 ²⁾	391.41 ± 7.67 ²⁾	492.92 ± 10.81 ²⁾	629.35 ± 13.45 ²⁾
	20	101.79 ± 7.21	152.67 ± 8.32	198.78 ± 6.57 ¹⁾	231.76 ± 8.23 ²⁾	265.05 ± 9.19 ²⁾	295.39 ± 9.24 ²⁾	349.95 ± 11.92 ²⁾	397.28 ± 10.95 ²⁾

注:与模型组同时时间点比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤质量的影响 与模型组比较,辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组肿瘤质量均显著降低,呈剂量依赖效应($P < 0.01$),见表 3。

表 3 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤质量的影响

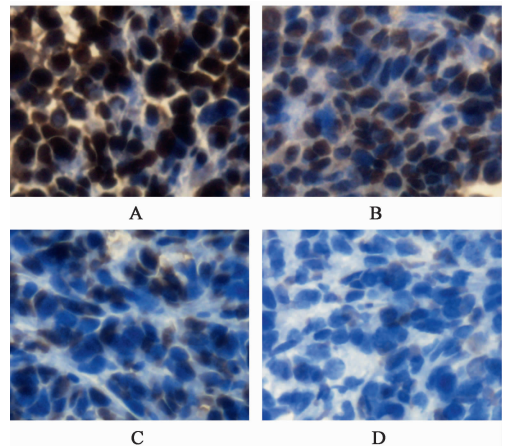
Table 3 Effect of capsaicin on weight of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肿瘤质量($\bar{x} \pm s, n = 5$)/g	抑瘤率/%
模型	-	1.39 ± 0.21	-
辣椒碱	5	1.04 ± 0.41 ¹⁾	25.18
	10	0.75 ± 0.78 ¹⁾	46.04
	20	0.47 ± 0.65 ¹⁾	66.19

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.4 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 HMGB1 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示,模型组 HMGB1 呈强阳性表达,辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组 HMGB1 阳性表达则明显降低,呈剂量依赖效应,见图 1。Western blot 结果显示,与模型组比较,辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组 HMGB1 蛋白表达显著降低,呈剂量依赖效应($P < 0.01$),见图 2,

表 4。



A. 模型组; B ~ D. 辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组(图 2, 3 同)

图 1 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 HMGB1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of capsaicin on HMGB1 protein expression of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice(IHC, ×400)

3.5 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 TLR4 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示,模型组 TLR4 呈阳性表达,辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组 TLR4 阳性表达则明显降低,呈剂量依赖效应,

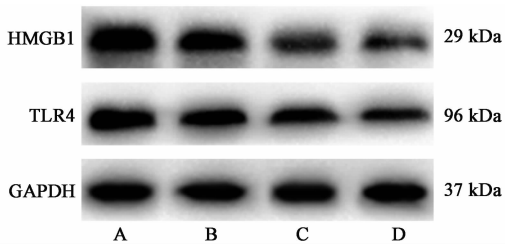


图 2 辣椒碱作用后 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 HMGB1, TLR4 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of capsaicin on HMGB1 and TLR4 protein expressions of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice

见图 3。Western blot 结果显示,与模型组比较,辣椒碱(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)组 TLR4 蛋白表达显著降低,呈剂量依赖效应($P < 0.01$),见图 2,表 4。

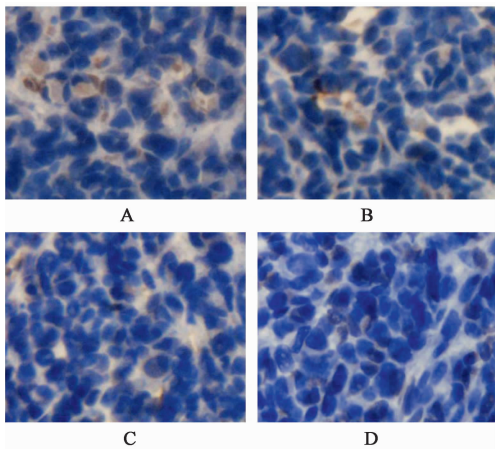


图 3 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 TLR4 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of capsaicin on TLR4 protein expression of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice (IHC, ×400)

表 4 辣椒碱对 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤组织中 HMGB1, TLR4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of capsaicin on HMGB1 and TLR4 protein expressions of MDA-MB-231 cells transplanted tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	HMGB1/GAPDH	TLR4/GAPDH
模型	-	1.68 ± 0.15	1.36 ± 0.17
辣椒碱	5	1.23 ± 0.12 ¹⁾	0.99 ± 0.11 ¹⁾
	10	0.76 ± 0.09 ¹⁾	0.73 ± 0.12 ¹⁾
	20	0.43 ± 0.07 ¹⁾	0.51 ± 0.09 ¹⁾

4 讨论

辣椒碱是辣椒属植物中得到的红辣椒的主要活性成分,具有镇痛、止痒、抗炎、抗氧化和调节血压等多种药理作用^[2]。然而随着研究的不断深入,辣椒碱的抗肿瘤作用引起了广泛关注,并成为研究的热

点^[14]。辣椒碱的抗肿瘤作用可能与阻滞细胞周期、促进凋亡和自噬以及抗氧化活性相关,但具体机制尚不明确,有待于进一步研究^[15-16]。有报道显示辣椒碱在体外可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[5,17]。本课题组前期研究也发现辣椒碱在体外具有抑制 MCF-7 细胞增殖的作用^[6]。而关于辣椒碱在体内抗乳腺癌的作用报道少见,特别在国内尚未见报道。肿瘤的发生和发展以及药效作用的受到体内环境的综合影响,新型药物开发的前提和保障是运用动物模型进行体内抗肿瘤研究^[18]。移植性肿瘤动物模型具有生长速度较为一致、个体差异小、接种成活率高、易于客观判断疗效,实验周期较短,实验条件易于控制等优点,是目前最常用实验动物肿瘤模型^[18-19]。本研究成功建立乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤模型,并通过腹腔注射的给药方式观察辣椒碱在体内抗乳腺癌作用。结果显示,辣椒碱可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤的生长,且给药过程中裸鼠体质量未发生明显变化,未出现动物死亡的情况。与此一致的是,有研究显示通过灌胃的方式给予辣椒碱同样可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤生长,并且没有发现明显的药物副作用^[20]。这些研究共同说明辣椒碱在体内具有显著的抑制乳腺癌生长的作用和低毒的优点。

HMGB1 是存在于真核生物细胞内的一类非组蛋白染色体 DNA 结合蛋白,因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中具有高度的迁移能力而得名^[21]。HMGB1 在核内参与包括 DNA 复制、转录调控、损伤修复、重组等多个关键生命活动过程^[7]。近年来有研究发现, HMGB1 可由活化的免疫细胞(包括单核/巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞等)主动分泌,也可由坏死或受损细胞被动释放至胞外,释放至胞外的 HMGB1 是一种重要的警报素,介导炎症反应,在脓毒症、关节炎、缺血再灌注损伤和肿瘤等的发病机制中发挥着至关重要的作用^[22-23]。研究发现, HMGB1 在结直肠癌、肝癌、肺癌、宫颈癌及白血病等多种肿瘤中表达升高,并与肿瘤的临床分型及肿瘤细胞的生长、侵袭、转移密切相关^[24-25]。有报道显示,乳腺癌组织中 HMGB1 的表达较正常乳腺组织和乳腺增生组织明显增高,且在腋窝淋巴结转移的乳腺癌组织中, HMGB1 表达更高^[10, 26]。HMGB1 促进乳腺癌细胞的增殖,迁移和侵袭,而下调 HMGB1 的表达可以抑制乳腺癌的增殖、迁移、侵袭以及增加放疗敏感性, HMGB1 可能成为乳腺癌治疗的潜在靶

点^[11, 27-28]。与此相似的是,本研究结果显示,经辣椒碱作用后,MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤中 HMGB1 蛋白表达明显下调,提示辣椒碱抑制乳腺癌生长的分子机制可能与下调 HMGB1 的蛋白表达有关。

Toll 样受体 (TLRs) 是生物免疫反应中一个重要的模式识别受体,其中 TLR4 是目前发现与肿瘤发生发展关系最密切的 TLR 家族成员之一^[29]。有报道显示,TLR4 在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织,并与肿瘤进展和预后密切相关^[30-31]。Sootichote 等^[32]研究发现,乳腺癌细胞对紫杉醇的耐药性与 TLR4 的高表达有关,而 Compound A 通过拮抗 TLR4 表达可以增强乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性。TLR4 作为 HMGB1 的主要受体与释放至胞外的 HMGB1 相结合后,可以激活下游如磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt),核转录因子- κ B (NF- κ B) 等信号通路,进而促进各种炎性反应因子如白细胞介素 (IL)-1, IL-2, IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的基因表达上调并大量释放,形成适合肿瘤生长的微环境,从而促进肿瘤的生长、侵袭和转移^[23, 27, 33-34]。本研究结果显示,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤经辣椒碱作用后,TLR4 的蛋白表达显著下调。结合前面所述结果,认为辣椒碱可能通过抑制 HMGB1-TLR4 轴从而发挥抑制乳腺癌生长的作用。

综上所述,本研究结果表明,辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤生长具有明显的抑制作用,其机制可能与下调 HMGB1,TLR4 蛋白表达有关。通过辣椒碱干预 HMGB1,TLR4 的表达可能成为乳腺癌等肿瘤疾病治疗的新策略。

[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] MAO X L, ZHU H Y, LUO D H, et al. Capsaicin inhibits glycolysis in esophageal squamous cell carcinoma by regulating hexokinase 2 expression [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 6116-6121.
[3] Friedman J R, Nolan N A, Miles S L, et al. Anti-cancer activity of natural and synthetic capsaicin analogs [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 364(3):462-473.
[4] Diaz-Laviada I, Rodriguez-Henche N. The potential antitumor effect of capsaicin [J]. Prog Drug Res, 2014, 68: 181-208.
[5] 李伯和,袁磊. 辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞

迁移和侵袭的抑制作用及其机制 [J]. 生理学报, 2017, 69(2): 183-188.
[6] 陈茂剑,杨伟萍,覃庆洪,等. 辣椒碱对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及 p21 和 FBI-1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 102-106.
[7] 王振兴,孙中莉,王明杰,等. 补阳还五汤对肺纤维化中 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 138-144.
[8] Sims G P, Rowe D C, Rietdijk S T, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer [J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 367-388.
[9] YAN W, CHANG Y, LIANG X Y, et al. High-mobility group box 1 activates Caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases [J]. Hepatology, 2012, 55(6): 1863-1875.
[10] SUN S P, ZHANG W, CUI Z Q, et al. High mobility group box-1 and its clinical value in breast cancer [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 413-419.
[11] KE S B, ZHOU F X, YANG H, et al. Downregulation of high mobility group box 1 modulates telomere homeostasis and increases the radiosensitivity of human breast cancer cells [J]. Int J Oncol, 2015, 46(3): 1051-1058.
[12] 陈茂剑,王丽,杨伟萍,等. 沉默 FBI-1 基因对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖和凋亡的影响 [J]. 生理学报, 2018, 70(5): 497-503.
[13] 张鹏程,陈美周,余方流,等. 辣椒素对小鼠 B16F10 黑色素瘤抑制效应研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(14): 1096-1099.
[14] Friedman J R, Nolan N A, Brown K C, et al. Anticancer activity of natural and synthetic capsaicin analogs [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 364(3): 462-473.
[15] Chapa-Oliver A M, Mejia-Teniente L. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent [J]. Molecules, 2016, 21(8): E931.
[16] LIN Y T, WANG H C, Hsu Y C, et al. Capsaicin induces autophagy and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): E1343.
[17] CHANG H C, CHEN S T, Chien S Y, et al. Capsaicin may induce breast cancer cell death through apoptosis-inducing factor involving mitochondrial dysfunction [J]. Hum Exp Toxicol, 2011, 30(10): 1657-1665.
[18] 李日飞,袁娜,冶冬阳,等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 113-118.

- [19] 刘华钢, 刘丽敏, 黄慧学, 等. 抗肿瘤中药动物模型及机制研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1334-1337.
- [20] Thoennissen N H, O'Kelly J, LU D, et al. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway [J]. *Oncogene*, 2009, 29(2): 285-296.
- [21] Goodwin G H, Sanders C, Johns E W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids [J]. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1): 14-19.
- [22] CHEN M J, HUANG W J, WANG C, et al. High-mobility group box 1 exacerbates CCl₄-induced acute liver injury in mice [J]. *Clin Immunol*, 2014, 153(1): 56-63.
- [23] Shimizu S, Kouzaki H, Kato T, et al. HMGB1-TLR4 signaling contributes to the secretion of interleukin 6 and interleukin 8 by nasal epithelial cells [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2016, 30(3): 167-172.
- [24] Kumari T, Kumar B. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) gene polymorphisms and cancer susceptibility: a comprehensive Meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 483: 170-182.
- [25] KANG R, ZHANG Q H, Zeh H J, et al. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(15): 4046-4057.
- [26] WU K L, ZHANG H H, FU Y J, et al. TLR4/MyD88 signaling determines the metastatic potential of breast cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3411-3420.
- [27] LV W, CHEN N, LIN Y L, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes breast cancer metastasis via activation of HMGB1/TLR4/NF kappa B axis [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 245-255.
- [28] HUANG B F, Tzeng H E, CHEN P C, et al. HMGB1 genetic polymorphisms are biomarkers for the development and progression of breast cancer [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(6): 580-586.
- [29] 许政旭, 朱诗国, 潘年松, 等. 黔产莪术油对直肠癌 SW1463 细胞株分泌 Toll 样受体及相关免疫因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 137-141.
- [30] WANG X B, YU X M, WANG Q L, et al. Expression and clinical significance of SATB1 and TLR4 in breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3611-3615.
- [31] 陈茂剑, 蒋玮, 覃庆洪, 等. 辣椒碱抗肿瘤作用分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 95-103.
- [32] Sootichote R, Thuwajit P, Singsuksawat E, et al. Compound A attenuates toll-like receptor 4-mediated paclitaxel resistance in breast cancer and melanoma through suppression of IL-8 [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 231.
- [33] WANG F P, LI L, LI J, et al. High mobility group box-1 promotes the proliferation and migration of hepatic stellate cells via TLR4-dependent signal pathways of PI3K/Akt and JNK [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64373.
- [34] JIANG C X, QU X, KE H H, et al. Association between the HMGB1/TLR4 signaling pathway and the clinicopathological features of ovarian cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3093-3098.

[责任编辑 张丰丰]