

蒲公英萜醇通过 mTOR 信号通路诱导乳腺癌细胞自噬

朱坤, 丁米娜, 李月, 朴英实, 陈丽艳*

(延边大学, 吉林省妇科肿瘤生物信息学重点实验室, 吉林 延吉 133000)

[摘要] 目的: 体外研究蒲公英萜醇对乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的影响, 并探讨相关作用机制。方法: 体外培养乳腺癌 MCF-7 细胞, 通过噻唑蓝 (MTT) 比色法检测蒲公英萜醇 (12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 MCF-7 细胞增殖的影响; 采用吖啶橙 (AO), 免疫荧光染色和透射电镜观察蒲公英萜醇对乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的影响; 应用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蒲公英萜醇用药后细胞自噬相关蛋白表达以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的变化情况。结果: MTT 比色法结果显示, 蒲公英萜醇组可抑制 MCF-7 细胞的增殖能力; 吖啶橙染色结果显示, 与空白组比较, 蒲公英萜醇组 MCF-7 细胞内酸性溶酶体增加; 透射电镜观察到用药组细胞内出现明显的自噬体结构; 蒲公英萜醇用药后, 荧光显微镜下可见 MCF-7 细胞中出现较多的微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 绿色荧光分布; Western blot 结果显示, 与空白组比较, 蒲公英萜醇可上调 LC3-II 和酵母 Atg6 同系物 (Beclin-1) 蛋白表达水平, LC3-II/LC3-I 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 加入自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 后与蒲公英萜醇组比较, 3-MA + 蒲公英萜醇组 LC3-II/LC3-I 降低 ($P < 0.05$)。蒲公英萜醇用药后可显著下调细胞内 p-mTOR 和磷酸化的真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 (p-4EBP1) 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 蒲公英萜醇能够诱导 MCF-7 细胞发生自噬, 其机制可能与抑制 mTOR 信号通路有关。

[关键词] 蒲公英萜醇; 乳腺癌; 自噬; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0032-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191421

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190403.1429.004.html>

[网络出版时间] 2019-04-09 9:20

Effect of Taraxerol in Inducing Autophagy in Breast Cancer Cells via mTOR Signaling Pathway

ZHU Kun, DING Mi-na, LI Yue, PIAO Ying-shi, CHEN Li-yan*

(Jilin Province Key Laboratory of Gynecological Tumor Bioinformatics, Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of taraxerol on autophagy of breast cancer MCF-7 cells *in vitro*, and explore the related mechanisms. **Method:** The effect of various doses of taraxerol (12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on proliferation of MCF-7 cells was detected by methylenetetrazolium (MTT) assay. The autophagy-inducing effect of taraxerol was observed by acridine orange staining, transmission electron microscope (TEM) and immunofluorescence. The expressions of autophagy-related proteins and the changes of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway were determined by Western blot analysis. **Result:** The viability of MCF-7 cells was significantly inhibited by taraxerol. Acridine orange staining indicated that the acidic lysosomes increased significantly after treatment with taraxerol in MCF-7 cells. The autophagic structure in the treated group was observed by TEM. Immunofluorescence showed that the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in the cells of the drug group was increased. Western blot demonstrated that the protein expressions of LC3-II and Beclin-1 were increased in taraxerol-treated MCF-7 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), respectively.

[收稿日期] 20181031(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81460399)

[第一作者] 朱坤, 博士, 从事分子病理生物学研究, E-mail: 578765686@qq.com

[通信作者] * 陈丽艳, 博士, 副教授, 从事肿瘤分子生物学研究, E-mail: lychen@ybu.edu.cn

Compared with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ taraxerol group, combination group (taraxerol + 3-methyladenine, 3-MA) showed the down-regulation of LC3-II in the MCF-7 cells ($P < 0.05$). And expressions of phosphorylated mammal target of rapamycin (p-mTOR) and phosphorylated eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (p-4EBP1) were decreased in MCF-7 cells after treatment with taraxerol ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Taraxerol can induce autophagy in MCF-7 cells, which may be related to the inhibition of mTOR signaling pathway.

[**Key words**] breast cancer; taraxerol; autophagy; mammalian target of rapamycin (mTOR)

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,在全球范围内发病率呈上升趋势,是女性癌症死亡的主要原因^[1]。目前乳腺癌的治疗主要以手术和放化疗为主,大量研究显示中药治疗乳腺癌具有较好的疗效^[2],是近年来研究的热点。蒲公英萜醇是从蒲公英中提取的三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病等药理作用,广泛分布于蒲公英、杜香、蔓荆、紫菀、翻白叶树等多种植物中^[3-4]。研究表明,蒲公英萜醇对肿瘤细胞具有良好的抑制作用,如胃癌、肺癌、宫颈癌等,且对肿瘤细胞凋亡、糖酵解和氧化应激反应具有一定的影响^[5-7]。自噬是细胞内重要的降解系统,通过降解蛋白质和胞内细胞器从而实现细胞自我消化、维持内环境稳定等。目前研究认为,大多数肿瘤中自噬具有保护或杀死癌细胞的双重作用,一方面,自噬能够为癌细胞提供营养物质维持其存活;另一方面,自噬的过度激活可导致癌细胞发生自噬性死亡,从而为肿瘤治疗提供新的途径^[8-9]。本课题组前期研究显示,蒲公英萜醇可抑制乳腺癌细胞增殖^[10],但其对肿瘤细胞自噬的作用尚不明确。因此,本研究通过观察蒲公英萜醇对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和自噬的影响,对其可能的分子机制进行探讨,进一步为蒲公英萜醇的抗肿瘤应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞 MCF-7 由延边大学肿瘤研究中心提供。

1.2 药品与试剂 蒲公英萜醇(西安昊轩生物科技有限公司,批号 P-010-160113,含量为 98.29%);胎牛血清,DMEM 培养液,胰酶细胞消化液(美国 Gibco 公司,批号分别为 10099141, 12100046, 25200072);吡啶橙(索莱宝生物科技有限公司,批号 17504100);蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液,噻唑蓝(MTT)(碧云天生物技术公司,批号分别为 P1005, P1045, C1005, ST316);高灵敏度化学发光检测试剂盒, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW0049S, CW0096M);微管相关

蛋白 1 轻链 3(LC3B),酵母 Atg6 同系物(Beclin-1),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),磷酸化 mTOR(p-mTOR),真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白(4EBP1)和磷酸化 4EBP1(p-4EBP1)抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3868, 3495, 2983, 2971, 9452, 9459);二抗兔抗及鼠抗(碧云天生物技术公司,批号分别为 A0208, A0216)。

1.3 仪器 DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽, DYCZ-40D 型迷你转膜仪(北京六一生物技术有限公司);ChemiDoc XRS + 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);SP5 II 型激光共聚焦显微镜(德国徕卡显微系统);CKX31 型光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司);JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 复苏乳腺癌细胞 MCF-7 使用 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清,100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素),于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养。待细胞长至 70% ~ 80% 对数生长期时,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 4 min 进行消化传代。

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖 取传代 MCF-7 细胞制成单细胞悬液,接种于 96 孔板中(每孔 2×10^3 个细胞),常规培养 24 h。弃旧培养基,加入蒲公英萜醇(12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),空白组加入正常培养液,每组设 6 个复孔。置培养箱分别培养 24, 48, 72 h 后弃去上清液,每孔加入配制好的 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 10 μL 孵育 4 h,吸尽孔内液体,加入 DMSO 100 μL 震荡 10 min,全波长酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 A ,并按公式计算细胞活力。细胞生存率 = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.3 吡啶橙(AO)染色 取消毒过的盖玻片,放入 6 孔板中进行爬片;取消化后的细胞接种至 6 孔板中,细胞密度约为 2.5×10^5 个/mL,置于恒温培养箱中培养;次日给予蒲公英萜醇(50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理,培养 48 h;将细胞从培养箱拿出,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次;预冷 95% 乙醇固定 10 min, PBS 洗 3 次;加入配制好的 AO 染色液染色

5 min, 封片并干燥后, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 透射电子显微镜观察自噬体结构 将细胞进行铺板, 蒲公英萜醇 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药 48 h, 离心并收集细胞团, 加入戊二醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h, 吸去戊二醛, PBS 洗涤 3 次, 加入 2% 锇酸固定 2 h, 进行 PBS 洗涤, 梯度乙醇脱水, 纯包埋剂渗透, 硅胶定向包埋板包埋, 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中聚合过夜。次日超薄切片机进行超薄切片, 用乙酸铀-柠檬酸铅双染色, 最后将超薄切片采用透射电镜观察并拍照获取图片。

2.5 免疫荧光染色检测细胞内酸性溶酶体 细胞爬片、铺板、给药同 2.3 项; 细胞培养 48 h 后吸去培养液, 使用预冷 PBS 于摇床上冲洗 3 次, 每次 5 min, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 5% Triton X-100 透化 10 min, 经 PBS 洗涤后 3% BSA 室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗 (1:200) 孵育过夜; 次日预冷 PBS 清洗玻片, 荧光二抗 (1:400) 孵育 1 h, 使用含有 DAPI 的封片剂封片并干燥, 激光共聚焦显微镜下观察、拍照。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 取生长良好的细胞进行铺板、给药, 48 h 后收集细胞。使用预冷 PBS 清洗 3 次, 加入 RIPA 裂解液提取各组蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液。通过 Bradford 法测定每组蛋白浓度, 蛋白变性后取蛋白 30 μg 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日洗涤缓冲液 (TBST) 洗膜, 加入相应二抗 (1:3 000) 于室温孵育 2 h, 洗膜后经 ECL 试剂盒显色, 于凝胶成像系统成像并拍照。用 Image J 软件采集条带灰度值, β -actin 蛋白作为内参, 并计算目标蛋白条带灰度值/内参条带灰度值。

2.7 统计学处理 实验结果使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2 个独立样本间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8 进行统计学作图。

3 结果

3.1 蒲公英萜醇对乳腺癌细胞 MCF-7 活力的影响 与空白组比较, MCF-7 细胞经蒲公英萜醇 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 24 h, 细胞存活率无明显改变; MCF-7 细胞经蒲公英萜醇 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48, 72 h, 在同一时点不同浓度蒲公英萜醇组细胞的存活率明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性, 说明蒲公英萜醇对乳腺癌

细胞 MCF-7 的增殖具有抑制作用, 见表 1。当蒲公英萜醇 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 用药时间为 48 h, 细胞的增殖抑制率为 49%, 接近半数抑制率。故选取蒲公英萜醇用药时间为 48 h, 蒲公英萜醇浓度为 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续实验。

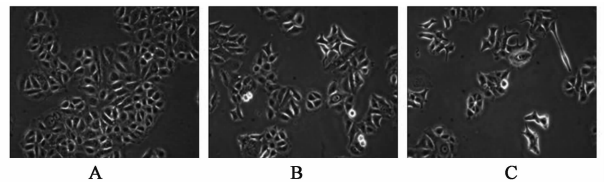
表 1 蒲公英萜醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of taraxerol on viability of MCF-7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100	100	100
蒲公英萜醇	12.5	99.09 \pm 1.13	96.11 \pm 0.76	85.68 \pm 1.64 ¹⁾
	25	96.31 \pm 2.24	85.53 \pm 2.54 ¹⁾	77.59 \pm 2.67 ¹⁾
	50	96.14 \pm 1.27	69.12 \pm 1.68 ¹⁾	58.24 \pm 2.41 ¹⁾
	100	93.07 \pm 0.89	51.04 \pm 3.01 ²⁾	45.90 \pm 3.65 ²⁾
	200	91.73 \pm 2.32	45.37 \pm 2.85 ²⁾	36.09 \pm 2.91 ²⁾

注: 与空白组同时时间点比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 4 同)。

3.2 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞形态的影响 蒲公英萜醇 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 MCF-7 细胞 48 h, 倒置显微镜观察发现, 与空白组比较, 蒲公英萜醇组细胞的数量减少, 连接分散, 形态不规则, 贴壁能力降低, 见图 1。



A. 空白组; B. 蒲公英萜醇 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 蒲公英萜醇 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 2~6 同)

图 1 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞形态变化的影响 (倒置显微镜, $\times 200$)

Fig.1 Effect of taraxerol on morphological changes of MCF-7 cells (inverted microscope, $\times 200$)

3.3 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞内生成酸性溶酶体的影响 与空白组细胞比较, 蒲公英萜醇给药 48 h, 蒲公英萜醇组细胞橙红色荧光比例明显升高, 即细胞内的酸性溶酶体增加, 表明蒲公英萜醇诱导乳腺癌细胞发生自噬, 见图 2。

3.4 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞超微结构变化的影响 透射电镜观察细胞超微结构发现, 与空白组比较, 蒲公英萜醇干预 MCF-7 细胞后, 可见明显的自噬小体双层膜结构, 从形态学角度证实蒲公英萜醇可以

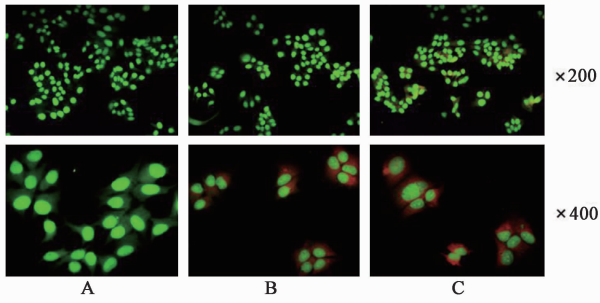
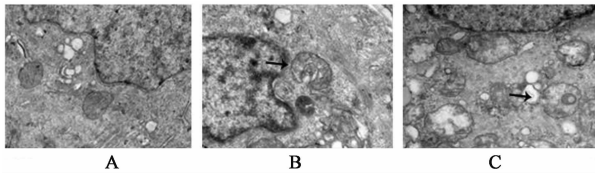


图 2 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞自噬的影响(AO 染色)
Fig. 2 Effect of taraxerol on autophagy in MCF-7 cells(AO staining)

诱导 MCF-7 细胞自噬的产生,见图 3。



箭头. 自噬小体
图 3 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞超微结构的影响(透射电镜, $\times 7\ 000$)
Fig. 3 Effect of taraxerol on ultrastructure of MCF-7 cells (TEM, $\times 7\ 000$)

3.5 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞自噬相关蛋白表达的影响 与空白组比较,蒲公英萜醇组 Beclin-1, LC3-I, LC3-II 蛋白表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且

表 2 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞 Beclin-1, LC3-II 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of taraxerol on expressions of Beclin-1, LC3-II and LC3-II/LC3-I in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Beclin-1/ β -actin	LC3-II/LC3-I	LC3-I/ β -actin	LC3-II/ β -actin
空白	-	1.62 \pm 0.09	0.98 \pm 0.05	0.68 \pm 0.07	0.67 \pm 0.08
蒲公英萜醇	50	1.91 \pm 0.07 ¹⁾	1.06 \pm 0.09 ¹⁾	1.38 \pm 0.13 ²⁾	1.47 \pm 0.13 ²⁾
	100	2.64 \pm 0.12 ²⁾	1.34 \pm 0.10 ²⁾	1.62 \pm 0.16 ²⁾	2.17 \pm 0.11 ²⁾

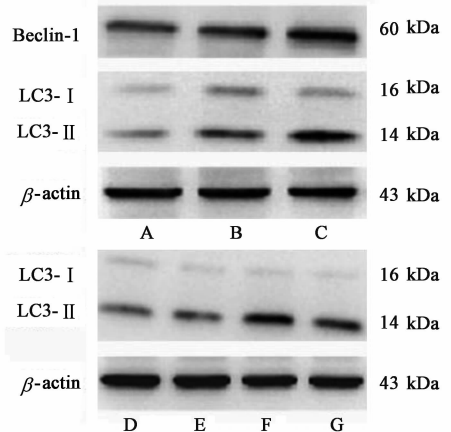
表 3 蒲公英萜醇和 3-MA 对 MCF-7 细胞 LC3-II/LC3-I, LC3-II 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of taraxerol and 3-MA on expressions of LC3-II/LC3-I, LC3-II in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3-II/LC3-I	LC3-I/ β -actin	LC3-II/ β -actin
空白	-	0.96 \pm 0.06	0.55	0.53 \pm 0.12
3-MA	10	1.13 \pm 0.09	0.50 \pm 0.13	0.57 \pm 0.07
蒲公英萜醇	0.1	1.84 \pm 0.13	0.61 \pm 0.11	1.12 \pm 0.08
3-MA + 蒲公英萜醇	10 + 0.1	1.37 \pm 0.07 ¹⁾	0.58 \pm 0.14	0.80 \pm 0.15 ¹⁾

注:与蒲公英萜醇 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.6 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞自噬体标记蛋白的表达水平的影响 与空白组比较, MCF-7 细胞经蒲公英萜醇处理 48 h, LC3 绿色荧光表达水平显著升高, 说明蒲公英萜醇明显增加 MCF-7 细胞自噬体标记蛋白 LC3 的表达水平。证实蒲公英萜醇可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生自噬, 见图 5。

呈剂量依赖性, LC3-II/LC3-I 升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。3-甲基腺嘌呤(3-MA)是一种选择性 PI3K 抑制剂, 可阻断自噬体的形成。与蒲公英萜醇组比较, 3-MA + 蒲公英萜醇组 LC3-II 蛋白表达水平降低, LC3-II/LC3-I 降低 ($P < 0.05$)。说明 3-MA 可以逆转蒲公英萜醇诱导的 MCF-7 细胞发生的自噬, 进一步明确蒲公英萜醇对乳腺癌细胞自噬的诱导作用。见图 4, 表 2, 3。



D. 空白组; E. 3-MA 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. 蒲公英萜醇 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; G. 3-MA 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蒲公英萜醇 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组
图 4 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞自噬相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of taraxerol on expressions of autophagy-related proteins in MCF-7 cells

3.7 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞 mTOR 信号通路的影响 与空白组比较, 蒲公英萜醇处理后细胞内 p-mTOR 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 4EBP1, p-4EBP1, p-4EBP1/4EBP1, 表达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明蒲公英萜醇能通过抑制 mTOR 和其下游的 4EBP1 信号, 促进 MCF-7 细胞

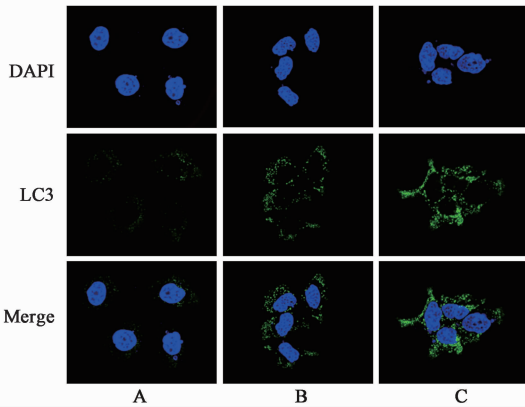


图 5 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞 LC3 表达水平的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 5 Effect of taraxerol on LC3 expression in MCF-7 cells (immunofluorescence staining, ×400)

自噬的发生,见图 6,表 4。

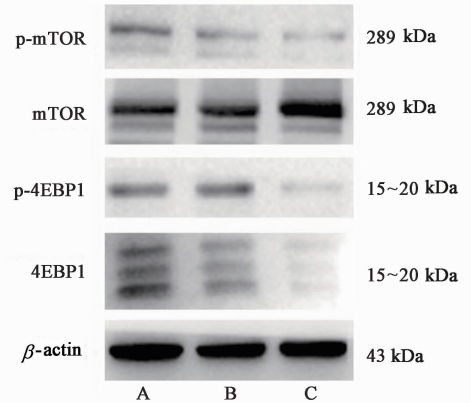


图 6 蒲公英萜醇对 mTOR 信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of taraxerol on expressions of mTOR signaling pathway-related proteins in MCF-7 cells

表 4 蒲公英萜醇对 MCF-7 细胞 mTOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of taraxerol on expressions of mTOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1 in MCF-7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-mTOR /mTOR	p-4EBP1 /4EBP1	mTOR / β -actin	p-mTOR / β -actin	4EBP1 / β -actin	p-4EBP1 / β -actin
空白	-	1.15 ± 0.04	2.12 ± 0.03	0.73 ± 0.11	0.84 ± 0.05	0.31 ± 0.13	0.66 ± 0.10
蒲公英萜醇	50	0.66 ± 0.07 ¹⁾	2.14 ± 0.04	0.78 ± 0.15	0.52 ± 0.09 ¹⁾	0.30 ± 0.08	0.65 ± 0.12
	100	0.38 ± 0.09 ²⁾	1.66 ± 0.11 ¹⁾	0.96 ± 0.13	0.37 ± 0.11 ¹⁾	0.08 ± 0.15 ¹⁾	0.13 ± 0.13 ²⁾

4 讨论

乳腺癌是一种高度恶性的肿瘤,其发病率在大多数国家呈高发趋势,危害着全世界女性的健康。目前乳腺癌的治疗方法进展显著,但仍存在副作用强和耐药性高等缺陷。在我国,天然产物的使用和发展已有数千年的历史,中草药某些单体成分药理作用广泛,且具有安全、高效、多靶点等特点^[11]。因此,开发治疗乳腺癌新型中草药具有重要意义。

研究报道从天然产物中提取的蒲公英萜醇具有良好的抗肿瘤作用。YAO 等^[6]研究显示蒲公英萜醇可通过线粒体途径诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡,并抑制 PI3K/Akt 信号通路;刘冬等^[7]发现蒲公英萜醇可影响肺癌细胞糖酵解水平,抑制细胞增殖,并调控 Akt 途径。本研究显示蒲公英萜醇可显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,且呈浓度依赖性,用药后细胞形态发生变化,数量减少。

自噬是一种高度保守的多步骤分解代谢途径,在应激条件下,自噬被激活,双膜胞浆小泡包裹部分细胞质、受损的细胞器、长寿蛋白和其他成分形成自噬体,然后外膜与溶酶体膜融合形成自噬溶酶体。细胞内的“垃圾”被自噬酶体中的水解酶降解,以实现细胞代谢需要和一些细胞器,如线粒体、内质网和核糖

体的周转^[12]。本研究首先通过形态学观察蒲公英萜醇对乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的影响。AO 是检测酸性囊泡结构的一种荧光染料,可以将 DNA 和胞质染为亮绿色,并可积聚在酸性部位(如自噬溶酶体)发出红色荧光。红橙色荧光的强度可以反映细胞酸性成分的酸度。AO 染色结果显示蒲公英萜醇处理后的 MCF-7 细胞内橙红色酸性溶酶体增多,表明细胞发生自噬。自噬体是自噬的标志性结构,运用透射电镜观察自噬现象是最为直接和经典的方法,是自噬检测的“金标准”。本研究通过透射电镜观察发现细胞内出现明显的自噬体结构,进一步确定蒲公英萜醇诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生了自噬现象。

在自噬发生的早期,适度的自噬能够起到保护作用,使细胞避免受到外界损伤而持续生存,而当外部环境较差,细胞过度自我吞噬时,就会引起自噬性死亡。细胞自噬过程受细胞内基因的严格调控,其中 Beclin-1 能够在细胞自噬过程中调节吞噬泡的形成,是存在于哺乳动物中调节自噬的特异性基因,通常将 Beclin-1 作为检测自噬的常用指标^[13]。LC3 是酵母的 Atg8 基因的同源物,是另一个参与自噬调节的关键基因,正常情况下动物细胞胞浆中存在可溶性的 LC3-I 蛋白,当自噬形成时,LC3-I 被 Atg-7 激活,然后

通过 Atg-3 与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺脂化转变为 LC3-II,LC-II 的含量与自噬泡的数量成正比。因此,LC3-I/LC3-II 可以评估细胞的自噬水平^[14]。本实验 Western blot 结果表明蒲公英萜醇上调细胞内 Beclin-1 蛋白表达水平,并促进 LC3-I 向 LC3-II 转化,免疫荧光结果也显示,细胞内 LC3 表达量增加,进一步证明蒲公英萜醇可诱导细胞发生自噬。3-MA 是一种使用较为广泛的自噬抑制剂,能特异性的阻断自噬泡与溶酶体融合^[15]。本实验结果表明,与蒲公英萜醇单独处理组比较,蒲公英萜醇和 3-MA 联用组的 LC3-II 蛋白表达水平下调,说明蒲公英萜醇诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生的自噬能够被 3-MA 逆转。证实蒲公英萜醇能够诱导 MCF-7 细胞发生自噬,从而进一步引发自噬性死亡抑制细胞的增殖。

自噬的发生涉及众多的基因表达和信号转导,其中 mTOR 通路是调控自噬的一个经典通路^[16]。研究表明,mTOR 信号通路的抑制与自噬的诱导具有相关性;同时该通路与乳腺癌的发生发展也密切相关^[17-18]。mTOR 激酶是自噬的负性调控因子,在细胞内营养充足和生长因子存在的情况下,mTOR 可抑制下游信号,进而抑制细胞自噬的发生。相关研究报道天然抗癌药物可通过 mTOR 信号通路诱导肿瘤细胞发生自噬^[19-20]。本实验结果显示,蒲公英萜醇处理后,MCF-7 细胞内 p-mTOR, p-4EBP1 的表达明显下降,说明蒲公英萜醇可通过 mTOR 信号通路诱导细胞发生自噬。

综上所述,蒲公英萜醇作为一种天然存在的化合物可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生自噬,从而抑制细胞增殖,其机制可能与 mTOR 信号通路受到抑制有关。

[参考文献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.

[2] 李云祥,梁引库,高飞雄,等. 中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23):1-9.

[3] Sharma K, Zafar R. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants [J]. Pharmacogn Rev, 2015, 9(17):19-23.

[4] 石妍,李帅,李红玉,崔保松,袁怡. 翻白叶树根化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):1994-1996.

[5] 谭宝,石海莲,季光,等. 蒲公英萜醇和乙酰蒲公英萜醇对胃癌细胞株 AGS 细胞周期和凋亡的影响[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(6):638-642.

[6] YAO X, LU B, Lü C, et al. Taraxerol induces cell apoptosis through a mitochondria-mediated pathway in HeLa cells[J]. Cell J, 2017, 19(3):512-519.

[7] 刘冬,赵鹏,王磊,等. 蒲公英萜醇对肺癌细胞的增殖及糖酵解的影响[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(3):465-471.

[8] SHAO L N, ZHU B S, XING C G, et al. Effects of autophagy regulation of tumor-associated macrophages on radiosensitivity of colorectal cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3):2661-2670.

[9] ZHAO E, TANG C, JIANG X, et al. Inhibition of cell proliferation and induction of autophagy by KDM2B / FBXL 10 knockdown in gastric cancer cells [J]. Cell Signal, 2017, 36(8):222-229.

[10] 朱坤,丁米娜,李月,等. 蒲公英萜醇对乳腺癌细胞增殖及发生氧化应激反应的影响[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(19):10-12.

[11] LU WI, LU D P. Impact of Chinese herbal medicine on American society and health care system; perspective and concern[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, doi:10.1155/2014/251891.

[12] Kon M, Kiffin R, Koga H, et al. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(109):109-117.

[13] TONG Y, ZHANG G, LI Y, et al. Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(8):3795-3807.

[14] GONG C, Bauvy C, Tonelli G, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells [J]. Oncogene, 2013, 32(18):2261-2272.

[15] 杨艳丽,刘玲,王豫,等. 3-甲基腺嘌呤诱发 HeLa 细胞自噬及抑制辐射细胞自噬的双重作用[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(5):30-33.

[16] 李欢,苗明三. 自噬及中医药调控自噬在治疗和防治疾病中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20):200-207.

[17] 郜然然,周慧,吴也可,等. 中医药通过 mTOR 途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3):1-7.

[18] 李甜,周钱梅,张卫红,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在三阴性乳腺癌治疗中的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(1):40-45.

[19] 管福琴,单宇,黄真真,等. 海蓬子皂苷甲通过 mTOR 信号通路诱导 MCF-7 细胞发生自噬[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2):197-201.

[20] 耿骥,郭文洁,刘佳,等. 积雪草酸对结肠癌 HCT116 细胞增殖及自噬水平的影响[J]. 江苏大学学报:医学版, 2015, 25(2):133-136, 141.

[责任编辑 张丰丰]