

白皮杉醇对三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468抗肿瘤作用及机制

王凤仙¹, 叶诗华², 赵卓佳², 解伟^{2*}, 王进^{2*}

(1. 上海中医药大学研究生院, 上海 201203; 2. 上海健康医学院药学院, 上海 201318)

[摘要] 目的: 考察白皮杉醇(PIC)对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-468增殖、凋亡及细胞周期的作用, 并对其作用机制进行探讨。方法: 采用噻唑蓝(MTT)比色法考察PIC(0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞成活率的影响, 并计算半抑制率(IC_{50}); 采用碘化丙啶(PI)染色观察PIC(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对MDA-MB-468细胞周期的影响; 采用细胞凋亡检测(Annexin V-FITC/PI)双染法观察PIC(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞的诱导凋亡作用; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)观察不同浓度PIC(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对MDA-MB-468细胞增殖、凋亡蛋白的影响, 并用Western blot对分泌型糖蛋白Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路相关蛋白进行检测。结果: MTT比色法结果显示, 与空白组比较, PIC(5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可呈浓度依赖性地抑制MDA-MB-468细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$), IC_{50} 为(39.4 \pm 4.6) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 作用48 h, PIC(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)呈浓度依赖性地升高MDA-MB-468细胞处于细胞周期 G_0/G_1 期细胞($P<0.01$); 呈浓度依赖性地诱导MDA-MB-468细胞凋亡($P<0.01$), 其中, PIC(20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导细胞凋亡率为49.87%; PIC(10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可明显降低MDA-MB-468细胞中 β -catenin及原癌基因(C-myc), 黏附因子(CD44)蛋白的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$); PIC(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可显著抑制蛋白激酶B(Akt)磷酸化, p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)蛋白的磷酸化, B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的蛋白表达水平($P<0.01$); 增强半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), Bcl-2相关X蛋白(Bax)和磷酸化 β -catenin的蛋白表达($P<0.01$)。结论: PIC可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路抑制MDA-MB-468细胞增殖, 并将细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, 从而诱导其凋亡。

[关键词] 白皮杉醇; 三阴性乳腺癌; 分泌型糖蛋白Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路; MDA-MB-468细胞; 凋亡

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)07-0042-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202422

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200924.1051.003.html>

[网络出版日期] 2020-9-24 11:19

Anti-tumor Effect of Picetannol on Triple Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-468 and Its Mechanism

WANG Feng-xian¹, YE Shi-hua², ZHAO Zhuo-jia², XIE Wei^{2*}, WANG Jin^{2*}

(1. Graduate School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. School of Pharmacy, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of picetannol (PIC) on the proliferation, apoptosis and cell cycle of MDA-MB-468 triple negative breast cancer cells and its mechanism. **Method:** The methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) colorimetry method was used to investigate the effect of different concentrations of PIC (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the cell viabilities of

[收稿日期] 20200803(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NSFC81703401)

[第一作者] 王凤仙, 在读硕士, 从事抗肿瘤药物作用及机制研究, E-mail: 15837460845@163.com

[通信作者] *解伟, 博士, 讲师, 从事基因工程抗体与肿瘤免疫治疗研究, E-mail: xiew@sumhs.edu.cn;

*王进, 博士, 副教授, 从事抗肿瘤药物筛选及作用机制研究, E-mail: wangj@sumhs.edu.cn

triple negative breast cancer MDA-MB-468 cells and calculate the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value, the effect of different concentrations of PIC (5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the cell cycle of MDA-MB-468 were investigated by flow cytometry with propidium iodide (PI) staining. The apoptotic effect of PIC (5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on MDA-MB-468 cells in triple negative breast cancer was investigated by flow cytometry with cell apoptosis detection Annexin V-FITC and PI double staining. Western blot was used to investigate the effect of different concentrations of PIC (5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-468 cells and detect the expressions of secreted glycoprotein Wnt/ β -catenin pathway related proteins. **Result:** MTT results showed that compared with the blank group, PIC could inhibit the proliferation of MDA-MB-468 cells in a concentration-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$), with IC_{50} at (39.4 \pm 4.6) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the blank group, PIC could increase the percentage of MDA-MB-468 cells in G_0/G_1 phase about cell cycle in a concentration-dependent manner ($P<0.01$). Compared with the blank group, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PIC could induce apoptosis of MDA-MB-468 cells for 48 h ($P<0.01$), and the apoptosis rate of MDA-MB-468 cells reached 49.87% when treated with 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h. Compared with the blank group, PIC could significantly reduce the expressions of β -catenin, proto-oncogene (C-myc) and adhesion factor (CD44) proteins in MDA-MB-468 cells, significantly inhibit the phosphorylation of protein kinase B (Akt) and p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) proteins and the protein expression of B lymphocyte tumor-2 (Bcl-2), and enhance cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3), Bcl-2 related X protein (Bax) and phosphorylated β -catenin protein expression ($P<0.01$). **Conclusion:** PIC may inhibit the proliferation of MDA-MB-468 cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway, block the cell cycle in G_0/G_1 phase, and induce its apoptosis.

[Key words] piceatannol; triple negative breast cancer; Wnt/ β -catenin signaling pathway; MDA-MB-468 cells; apoptosis

三阴性乳腺癌(TNBC)约占所有乳腺癌的15%~20%^[1],是女性最常见的一种恶性肿瘤。免疫组织化学检测或荧光原位杂交技术(FISH)显示雌激素受体(ER),孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(HER-2)表达均为阴性,由于TNBC缺乏激素受体和HER-2等治疗靶点,临床上常用的内分泌治疗和抗HER-2靶向治疗方法等均不适用于TNBC^[2],目前治疗的主要手段仍为手术、化疗及放疗。TNBC具有独特的临床生物学行为,如发生年龄较小、侵蚀性强、局部及远处复发早,5年生存率低等,故其预后较差、死亡率高^[3]。随着对TNBC分子分型的深入探索,靶向治疗的研究逐渐成为研究的热点。近些年,多种靶向药物进入临床试验,取得一定疗效,不良反应相对较轻,部分药物已批准上市,例如多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)抑制剂奥拉帕尼(Olaparib)和他拉唑帕尼(Talazoparib)^[4]。Wnt信号通路是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路,在动物胚胎的早期发育、器官形成和肿瘤的发生发展中发挥至关重要的作用^[5-6]。Wnt信号通路在TNBC中处于较高表达水平^[7],通过靶向Wnt信号通路治疗TNBC可能会

成为一种治疗TNBC的新途径,因此,寻找相关药物将逐渐成为关注的热点。

白皮杉醇是一种化学结构类似于白藜芦醇的多酚类化合物,见图1。广泛存在于葡萄、甘蔗、百香果、越橘属浆果等水果,大黄、桂皮、白茶树和大戟属等植物中^[8],具有抗氧化、抗炎、抗衰老、抗细胞增殖、提高免疫调节能力、心血管保护、防癌和抗癌等生物活性^[9-11],已有报道指出白皮杉醇对前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、白血病等多种肿瘤细胞均有显著的抑制作用,可通过抑制白细胞介素-6/信号传导子及转录激活子3(IL-6/STAT3)信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路、分泌型糖蛋白Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路的表达发挥抗肿瘤作用^[12-15]。但对TNBC活性及作用机制研究甚少,本实验拟观察白皮杉醇对TNBC细胞MDA-MB-468增殖和凋亡能力的影响,并进一步考察其对Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白的影响,以明确白皮杉醇对TNBC细胞的抗癌作用机制,为其在临床应用方面提供实验依据和理论基础。

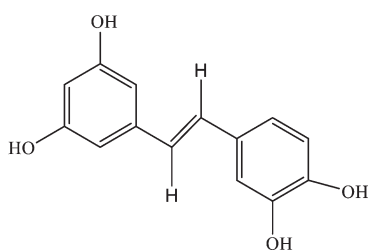


图1 白皮杉醇的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of piccatannol

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 购买于美国模式培养物集存库(ATCC),编号 HTB-132,传至第10代。

1.2 药品与试剂 白皮杉醇(成都德思特生物技术有限公司,批号 DST190523-051);L-15培养基(美国 Gibco 公司,批号 2085192);胎牛血清,0.25%EDTA 胰蛋白酶(北京全式金生物有限公司,批号分别为 K20107, N40524);100×青霉素/链霉素,噻唑蓝(MTT),细胞凋亡检测(AnnexinV-FITC/PI)双染凋亡试剂盒,山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为 E607011-0100, E606334-0500, E607212-0001, D110058];碘化丙啶(PI,美国 BD 公司,批号 550825);蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫沉淀(IP)细胞裂解液(江苏凯基生物技术有限公司,批号 20180928);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010); β -肌动蛋白(β -actin),蛋白激酶 B(Akt),磷酸化 Akt(p-Akt),p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax),Bcl-2,原癌基因(C-myc),黏附因子(CD44), β -catenin,磷酸化 β -catenin(p- β -catenin)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号分别为 4967S, 4691S, 2965S, 8690S, 4631S, 9665S, 4223T, 5023T, 9402S, 3578S, 8480S, 4176S);ECL 化学发光超敏显色试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号 36208ES76)。

1.3 仪器 Countess™ II 型细胞计数仪(美国 Thermo 公司);BPN-80CW 型 CO₂ 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);facscalibur™ 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);Mini-PROTEAN® Tetra 型蛋白电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);C300 型化学发光成像系统(美国 Azure

Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 将 MDA-MB-468 细胞加入含有 10% 胎牛血清,1% 青霉素与链霉素的 L-15 培养液中,置于 37 °C 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,2~3 d 更换培养基 1 次。实验取对数生长期细胞。细胞传代,待细胞融合至 80%~90%,用 0.25%EDTA 胰蛋白酶消化,待细胞从培养瓶壁上脱落,加入含有 10% 胎牛血清,1% 青霉素与链霉素的 L-15 培养基,吹打成细胞悬液,1 400 r·min⁻¹ 离心 4 min,离心半径 14.5 cm,弃去上清,用新的培养基重悬,置于恒温培养箱中培养。

2.2 MTT 比色法检测 MDA-MB-468 细胞活性 取对数生长期的细胞悬液按每孔 2×10³ 个接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,分别加入白皮杉醇使最终浓度为 0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,继续培养 48 h,弃去上清液,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL ,在 5%CO₂ 37 °C 恒温培养箱中培养 4 h,用酶标仪于 570 nm 处测量吸光度 A。利用公式求得细胞的抑制率,抑制率=(1-A_{给药组}/A_{空白组})×100%。

2.3 分组 空白组,白皮杉醇组,MDA-MB-468 细胞分别加入 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白皮杉醇;各组进行相应处理后继续培养 48 h 进行后续实验。

2.4 细胞 PI 染色检测 MDA-MB-468 细胞周期 取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞(2×10⁵ 个/mL),接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL 培养基培养。待细胞汇合度达到 80%~90% 时,经白皮杉醇(5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 48 h,收集 1×10⁶ 个细胞,经预冷 70% 乙醇固定过夜。收集样品,加入 PI/RNase staining buffer 500 μL ,常温下,避光孵育染色 15 min。利用流式细胞仪对样品 DNA 含量进行检测。

2.5 Annexin V-FITC/PI 双染检测 MDA-MB-468 细胞凋亡 细胞加药及培养同 2.4 项,收集细胞。用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞并洗涤 2 次,用 1×binding buffer 重悬细胞,调整细胞密度为 1×10⁶ 个/mL。按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明,每组取细胞悬液 100 μL ,然后加入 AnnexinV-FITC 5 μL 和 PI 5 μL ,避光室温孵育 15 min,再加入缓冲液 400 μL 混匀,1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.6 Western blot 检测蛋白表达水平 细胞加药及培养同 2.4 项,收集各组细胞,用细胞裂解液裂解,提取总蛋白后采用 BCA 法定量,调整蛋白浓度。取

适量裂解产物,上样后进行SDS-PAGE电泳转至硝酸纤维素膜,加入5%脱脂奶粉封闭液室温封闭2 h,孵育相应一抗 β -actin, Akt, p-Akt, p38 MAPK, p-p38 MAPK, Caspase-3, Bax, Bcl-2, C-myc, CD44, β -catenin, p- β -catenin(1:1 000), 4 °C孵育过夜,洗膜后,室温孵育相应二抗1 h,洗膜,使用ECL化学发光超敏显色试剂盒对聚偏二氟乙烯膜(PVDF)进行曝光显影,成像扫描分析系统测定目的和内参照条带。

2.7 统计学方法 采用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐性检验后,采用单因素方差分析对实验数据进行统计学分析,均数间多重比较采用最小显著性差异法检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞成活率的影响

与空白组比较,白皮杉醇5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有显著抑制细胞增殖的作用,抑制率显著升高($P<0.01$),其半抑制浓度(IC_{50})为(39.4 \pm 4.6) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表1。

表2 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of piceatannol on MDA-MB-468 cell cycle ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1 期	S期	G_2/M 期	%
空白		36.73 \pm 2.80	33.20 \pm 3.03	19.67 \pm 6.75	
白皮杉醇	5.0	43.97 \pm 1.00 ²⁾	26.63 \pm 2.42	26.63 \pm 1.71	
	10.0	50.30 \pm 1.32 ²⁾	24.70 \pm 5.56 ¹⁾	23.87 \pm 2.31	
	20.0	56.87 \pm 2.02 ²⁾	14.37 \pm 2.56 ²⁾	26.00 \pm 2.75	

3.3 白皮杉醇对细胞MDA-MB-468凋亡能力的影响

与空白组比较,白皮杉醇5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。见表3。

表3 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of piceatannol on apoptosis of MDA-MB-468 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白		9.34 \pm 1.07
白皮杉醇	5.0	27.19 \pm 2.64 ²⁾
	10.0	38.30 \pm 2.35 ²⁾
	20.0	49.87 \pm 1.50 ²⁾

3.4 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞增殖、凋亡蛋白的影响

与空白组比较,白皮杉醇5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能够显著降低MDA-MB-468细胞

表1 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 1 Effect of piceatannol on proliferation MDA-MB-468 cells ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白		1.330 \pm 0.111	-
白皮杉醇	2.5	1.279 \pm 0.097	3.84 \pm 2.84
	5.0	1.102 \pm 0.113 ²⁾	17.20 \pm 8.21 ²⁾
	10.0	1.000 \pm 0.532 ²⁾	24.87 \pm 4.54 ²⁾
	20.0	0.908 \pm 0.063 ²⁾	31.80 \pm 4.32 ²⁾
	40.0	0.611 \pm 0.096 ²⁾	53.92 \pm 7.62 ²⁾
	80.0	0.326 \pm 0.054 ²⁾	75.46 \pm 3.96 ²⁾
	160.0	0.364 \pm 0.066 ²⁾	72.53 \pm 4.67 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2~6同)。

3.2 白皮杉醇对细胞MDA-MB-468周期的影响

与空白组比较,白皮杉醇5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 G_0/G_1 期细胞显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),白皮杉醇10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组S期细胞明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见表2。

中Bcl-2, p-Akt, p-p38 MAPK蛋白表达($P<0.01$),升高Caspase-3, Bax蛋白表达($P<0.01$)。见表4,图2。

3.5 白皮杉醇对MDA-MB-468细胞Wnt/ β -catenin信号通路的影响

与空白组比较,白皮杉醇10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 β -catenin蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), p- β -catenin, p- β -catenin/ β -catenin蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);白皮杉醇10.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组C-myc, CD44蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图3,表5。

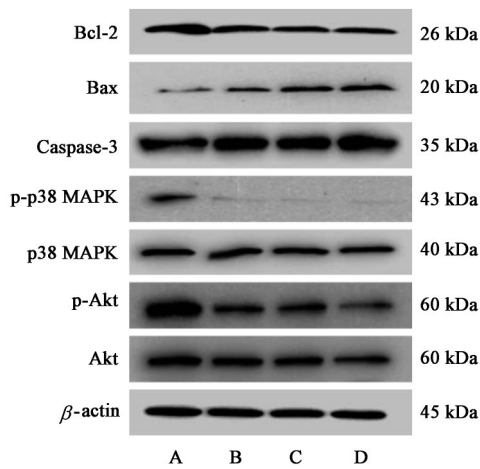
4 讨论

乳腺癌是引起妇女死亡最常见的恶性肿瘤,占所有恶性肿瘤的23%,全世界每年有130万人被诊断为乳腺癌,约有40万人死于乳腺癌^[16]。与其他大多数国家一样,乳腺癌现在是中国女性最常见的恶性肿瘤,中国的乳腺癌病例占有新诊断乳腺癌病

表 4 白皮杉醇对 MDA-MB-468 细胞中 Akt, p-Akt, p38 MAPK, p-p38 MAPK, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of piceatannol on expressions of Akt, p-Akt, p38 MAPK, p-p38 MAPK, Caspase-3, Bax, Bcl-2 proteins in MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	p38 MAPK/ β -actin	p-p38 MAPK/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
空白		0.710±0.068	1.338±0.648	0.828±0.034	0.484±0.026	1.532±0.028	1.084±0.091	0.211±0.076
白皮杉醇	5.0	0.733±0.012	0.768±0.116 ²⁾	0.885±0.019	0.080±0.009 ²⁾	1.759±0.068 ²⁾	0.731±0.031 ²⁾	0.422±0.065 ²⁾
	10.0	0.768±0.021	0.762±0.021 ²⁾	0.968±0.026	0.061±0.009 ²⁾	1.851±0.085 ²⁾	0.656±0.234 ²⁾	0.734±0.051 ²⁾
	20.0	0.734±0.022	0.575±0.045 ²⁾	0.897±0.020	0.067±0.003 ²⁾	2.097±0.101 ²⁾	0.653±0.050 ²⁾	0.795±0.042 ²⁾



A. 空白组; B~D. 白皮杉醇低、中、高剂量组(图 3 同)

图 2 白皮杉醇作用 MDA-MB-468 细胞 Akt, p-Akt, p38 MAPK, p-p38 MAPK, Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of piceatannol on expressions of Akt, p-Akt, p38 MAPK, p-p38 MAPK, Caspase-3, Bax, Bcl-2 proteins in MDA-MB-468 cells

例的 12.2%, 占全球乳腺癌死亡病例的 9.6%^[17]。TNBC 发病率占全部乳腺癌的 15%~25%, 在我国的

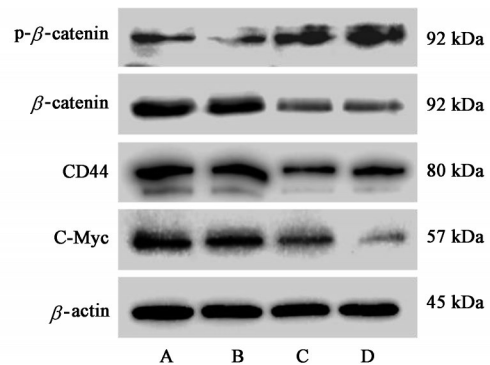


图 3 白皮杉醇作用 MDA-MB-468 细胞 C-myc, CD44, β-catenin 和 p-β-catenin 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of piceatannol on expressions of C-myc, CD44, β-catenin, p-β-catenin proteins in MDA-MB-468 cells

发病率约为 23.8%^[18]。TNBC 与其他亚型比较, 转移生存期较短, 治疗选择较少, 反应缺乏持久性。TNBC 患者的标准治疗方法以前仅限于化疗和/或放疗手术, 明显缺乏有效靶向治疗, 随着最近批准使用聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)抑制剂治疗乳腺癌 1 号/2 号基因(BRCA1/2)突变患者, 以及对

表 5 白皮杉醇对 MDA-MB-468 细胞中 C-myc, CD44, β-catenin, p-β-catenin 和 p-β-catenin/β-catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of piceatannol on expressions of C-myc, CD44, β-catenin, p-β-catenin, p-β-catenin/β-catenin proteins in MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	C-myc/ β -actin	CD44/ β -actin	β-catenin/ β -actin	p-β-catenin/ β -actin	p-β-catenin/β-catenin
空白		1.167±0.069	1.260±0.066	1.074±0.071	0.557±0.051	0.518±0.015
白皮杉醇	5.0	1.118±0.110	1.190±0.027	1.010±0.045	0.365±0.054 ²⁾	0.360±0.038 ¹⁾
	10.0	0.927±0.041 ²⁾	0.967±0.117 ¹⁾	0.546±0.040 ²⁾	1.029±0.441 ²⁾	1.888±0.059 ²⁾
	20.0	0.442±0.060 ²⁾	0.984±0.128 ¹⁾	0.533±0.025 ²⁾	1.279±0.108 ²⁾	2.396±0.094 ²⁾

细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6(CDK4/6)抑制剂和免疫疗法的研究, 治疗途径正在演变^[19]。有效靶向药物治疗途径和有效靶点的确定有待成为治疗和改善 TNBC 患者生活质量的有效途径。

白皮杉醇是天然化学预防剂白藜芦醇的衍生物, 由细胞色素 p450 酶 CYP1B1 生成, 白藜芦醇是红酒中一种众所周知的活性酚类化合物, 可抗多种

类型的癌症^[20-21]。通过查阅文献发现白皮杉醇具有与白藜芦醇相似的生物活性, 其抗氧化活性强于白藜芦醇, 而且白皮杉醇具有相对较低的毒副作用, 不易对机体产生副作用^[22]。有研究表明, 白皮杉醇对由原癌基因(H-Ras)诱导的乳腺癌 MCF-10A 细胞的侵袭和迁移能力强于白藜芦醇^[23]。体外研究结果表明, 白皮杉醇能够抑制前列腺癌、肺癌、结直

肠癌、白血病等细胞的增殖和凋亡作用^[8]。

有研究表明在TNBC中Wnt信号通路处于较高表达水平^[7],Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活增强了C-myc和细胞周期蛋白D₁(cyclinD₁)的转录^[24]。Wnt/ β -catenin信号通路主要通过Wnt因子与细胞表面的受体结合,如卷曲蛋白(Frizzled)和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP),激活靶蛋白(APC)和轴蛋白(Axin),使糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)的去磷酸化和散乱蛋白的增加,引起 β -catenin蛋白在胞浆内的不断积累,当 β -catenin蛋白在胞浆内积累到一定程度的时候转入细胞核中,与T细胞因子(TCF)和淋巴增强因子(LEF)结合形成复合物,促进下游靶基因的转录,从而影响细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和干细胞的分化能力^[25-27]。

本研究结果显示,随着白皮杉醇处理浓度的增加,MDA-MB-468细胞活力显著下降;用流式细胞术实验检测细胞周期和细胞凋亡,发现经过白皮杉醇处理后的MDA-MB-468细胞随着药物作用浓度的增加,G₀/G₁期细胞逐渐增加,细胞凋亡数逐渐增加;以上实验结果说明白皮杉醇能够抑制MDA-MB-468细胞的增殖和诱导凋亡能力,并且将大部分细胞阻滞在G₀/G₁期。进一步实验发现,白皮杉醇能够显著升高MDA-MB-468细胞中Caspase-3,Bax的蛋白表达水平,抑制Bcl-2蛋白的表达,同时能够抑制增殖相关蛋白Akt,p-p38 MAPK蛋白。随后本研究观察了白皮杉醇对MDA-MB-468细胞中Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达的影响,发现白皮杉醇作用后能够显著升高磷酸化 β -catenin的蛋白水平,并降低游离 β -catenin的蛋白表达水平,显著升高p- β -catenin/ β -catenin。这表明白皮杉醇作用后,游离 β -catenin在MDA-MB-468细胞中的蓄积明显降低。经白皮杉醇作用后Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白C-myc,CD44的蛋白表达水平也有所下降,因此本研究推测白皮杉醇通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的激活,诱导TNBC MDA-MB-468细胞的凋亡。

综上所述,白皮杉醇能够抑制TNBC MDA-MB-468细胞活力;通过阻滞细胞在G₀/G₁期影响细胞的增殖能力;可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路中 β -catenin蛋白表达,影响相关下游基因转录,诱导肿瘤细胞凋亡。本实验从Wnt/ β -catenin信号通路阐述了白皮杉醇治疗TNBC的分子生物学机制,为开展临床试验提供了一定的实验依据和理论支持。但是,乳腺癌的发病机制非常复杂,可能

涉及多条通路和靶点的共同作用,需要本研究在未来的实验中进一步的探索和研究,尽可能地完善其生物学机制。

[参考文献]

- [1] LIN N U, VANDERPLAS A, HUGHES M E, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the national comprehensive cancer network [J]. *Cancer*, 2012, 118(22):5463-5472.
- [2] BIANCHINI G, BALKO JM, MAYER IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11):674-690.
- [3] 贺春梅, 吴斌. 三阴性乳腺癌靶向治疗的研究进展 [J]. *西南军医*, 2016, 18(6):558-561.
- [4] MCCANN K E, HURVITZ S A, MCANDREW N. Advances in targeted therapies for triple-negative breast cancer [J]. *Drugs*, 2019, 79(11):1217-1230.
- [5] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6):985-999.
- [6] FOULQUIER S, DASKALOPOULOS P E, LLURI G, et al. Wnt signaling in cardiac and vascular disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(1):68-141.
- [7] BILIR B, KUCUK O, MORENO C S. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1):280-292.
- [8] SEYED M A, JANTAN I, BUKHARI S N, et al. A comprehensive review on the chemotherapeutic potential of piceatannol for cancer treatment, with mechanistic insights [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(4):725-737.
- [9] UNNATI S, RIPAL S, SANJEEV A, et al. Novel anticancer agents from plant sources [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(1):16-23.
- [10] RIMANDO A M, KALT W, MAGEE J B, et al. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52(15):4713-4719.
- [11] CAO Y, SMITH W, YAN L, et al. Overview of cellular mechanisms and signaling pathways of piceatannol [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2020, 15(1):4-10.
- [12] SCHMEEL F C, SCHMEEL L C, KIM Y, et al. Piceatannol exhibits selective toxicity to multiple myeloma cells and influences the Wnt/ β -catenin

- pathway[J]. *Hematol Oncol*, 2014, 32(4):197-204.
- [13] KO H S, LEE H J, KIM S H, et al. Piceatannol suppresses breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9: involvement of PI3K/Akt and NF-kappaB pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(16):4083-4089.
- [14] JAYASOORIYA R G, LEE Y G, KANG C H, et al. Piceatannol inhibits MMP-9-dependent invasion of tumor necrosis factor-alpha-stimulated DU145 cells by suppressing the Akt-mediated nuclear factor-kappaB pathway[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1):341-347.
- [15] JAYASOORIYA R G, LEE Y G, KANG C H, et al. Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(3):228-238.
- [16] 范东伟,姚昌洋,姚廷敬. 三阴性乳腺癌的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(1): 71-75.
- [17] FAN L, STRASSER-WEIPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China [J]. *Lancet: Oncol*, 2014, 15(7): e279-289.
- [18] MILIOLI HH, TISHCHENKO I, RIVEROS C, et al. Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes [J]. *BMC Med Genom*, 2017, 10(1):19-36.
- [19] TOVEY H, CHEANG M C U. Identifying biomarkers to pair with targeting treatments within triple negative breast cancer for improved patient stratification [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12):1864-1880.
- [20] ESTROV Z, SHISHODIA S, FADERL S, et al. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells[J]. *Blood*, 2003, 102(3):987-995.
- [21] POTTER G A, PATTERSON L H, WANOGHO E, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1 [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(5):774-778.
- [22] 逯阳. 几种植物多酚捕获体内自由基反应机理的理论研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨理工大学, 2017.
- [23] SONG N R, HWANG M K, HEO Y S, et al. Piceatannol suppresses the metastatic potential of MCF10A human breast epithelial cells harboring mutated H-ras by inhibiting MMP-2 expression [J]. *Inter J Molecul Med*, 2013, 32(4):775-784.
- [24] ZHAO Z, LU P, ZHANG H, et al. Nestin positively regulates the Wnt/ β -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(4): 339-349.
- [25] 黄红颜. Wnt/ β -catenin 信号通路相关的长链非编码 RNA 调控三阴性乳腺癌恶性进程中的分子机制研究 2. B7-H4 在乳腺癌预后的临床意义研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2019.
- [26] 魏业东. 大黄素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制三阴性乳腺癌转移及 EMT 效应的体外研究[D]. 上海:华东理工大学, 2018.
- [27] PERUGORRIA M J, OLAIZOLA P, LABIANO I, et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(2):121-136.

[责任编辑 张丰丰]