

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.002

文章编号: 1005-8982(2017)10-0006-08

黄芩素联合 U0126 诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的分子机制研究*

安宏元¹, 向川南¹, 喻小兰², 唐利³, 李燕³, 唐小平³, 张宇骄⁴, 夏纪毅⁵

(1. 四川省泸州市人民医院 乳腺外科, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院 妇产科, 四川 泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院 医学实验中心, 四川 泸州 646000; 4. 西南医科大学附属中医医院 妇产科, 四川 泸州 646000; 5. 西南医科大学 医学信息与工程学院, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨黄芩素和 U0126 诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的分子机制。 **方法** 单独及联合使用 20 μ mol 黄芩素、10 μ mol U0126 处理 MCF-7 细胞 24 h; 光学显微镜观察细胞数量变化, 流式细胞术检测 MCF-7 细胞周期变化, CCK8 法检测细胞增殖变化, TUNEL 法和流式细胞术检测细胞凋亡, 实时聚合酶链反应 (Real Time PCR) 和 Western blot 检测凋亡相关因子 mRNA 和蛋白的表达水平。 **结果** 与黄芩素单独刺激 MCF-7 细胞相比, 黄芩素联合 U0126 刺激 MCF-7 细胞时, S 期细胞比例降低更明显; MCF-7 细胞经不同浓度黄芩素或 U0126 处理后, 增殖抑制, 且具有浓度依赖性 ($P < 0.05$); 与黄芩素单独处理 MCF-7 细胞相比, 黄芩素与 U0126 联合处理时, 细胞凋亡更加显著 ($P < 0.05$), 早期凋亡和晚期凋亡均增多 ($P < 0.05$); 与黄芩素或 U0126 单独处理 MCF-7 细胞相比, 黄芩素和 U0126 联合处理 MCF-7 细胞时, 凋亡抑制因子 Bcl-2 的 mRNA 水平降低 ($P < 0.05$), 凋亡促进因子 Bax 的 mRNA 水平增高 ($P < 0.05$), ERK1/2、GSK-3 β 和 P38 的磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 凋亡促进因子 Bax 表达量增高 ($P < 0.05$), 凋亡抑制因子 Bcl-2 表达量降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 黄芩素或 U0126 通过调控 Bcl-2/Bax 的表达水平以及 ERK1/2、GSK-3 β 和 P38 的磷酸化水平抑制 MCF-7 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 且具有协同效应。因此, 黄芩素和 U0126 可联合用于临床治疗乳腺癌, 具有重要临床意义。

关键词: 黄芩素; U0126; 人乳腺癌细胞株 MCF-7; 凋亡; 分子机制

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Mechanisms of apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7 induced by baicalein and U0126*

Hong-yuan An¹, Chuan-nan Xiang¹, Xiao-lan Yu², Li Tang³, Yan Li³,

Xiao-ping Tang³, Yu-jiao Zhang⁴, Ji-yi Xia⁵

(1. Department of Breast Surgery, Luzhou People's Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated TCM Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Experimental Medicine Center, 4. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 5. School of Medical Information and Engineering, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanisms of apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7 induced by baicalein and U0126. **Methods** The human breast cancer cell line MCF-7 cells were treated by 20 μ M baicalein, 10 μ M U0126, and 20 μ M baicalein combined with 10 μ M U0126 respectively. Flow cytometry

收稿日期: 2016-10-23

* 基金项目: 四川省科技厅项目 (14JC01353-LH67); 四川省泸州市科技局项目 (2014-S-44)

[通信作者] 夏纪毅, E-mail: xiajiyi@swmu.edu.cn; Tel: 15283011120

was used to test the changes of MCF-7 cell cycle. CCK8 assay was applied to measure proliferation of MCF-7 cells. The number of cells was observed under light microscope. Flow cytometry and TUNEL were used to evaluate the apoptosis of MCF-7 cells. RT-PCR and Western blot were adopted to detect the mRNA and protein levels of apoptosis-related proteins. **Results** Compared to the MCF-7 cells stimulated with 20 μ M baicalein alone, the ratio of S phase MCF-7 cells decreased after treatment by baicalein combined with U0126 ($P < 0.05$). When the MCF-7 cells were treated by different concentrations of baicalein or U0126, the proliferation was inhibited dramatically in a dose-dependent way ($P < 0.05$). Compared to the MCF-7 cells treated with baicalein alone, the early and late apoptotic cells were augmented dramatically when they were treated by both baicalein and U0126 ($P < 0.05$). When the MCF-7 cells were treated by baicalein combined with U0126, the level of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$), the level of Bax greatly increased ($P < 0.05$), and the phosphorylation levels of ERK1/2, GSK-3 β and P38 obviously reduced ($P < 0.05$) compared with the cells with single treatment of baicalein or U0126. **Conclusions** Baicalein and U0126 can dramatically inhibit the proliferation and increase the apoptosis of MCF-7 cells through decreasing the level of Bcl-2, reducing the phosphorylation levels of ERK1/2, GSK-3 β and P38, and increasing the level of Bax. Hence, baicalein and U0126 can be used to treat breast cancer, both are very important in clinic.

Keywords: baicalein; U0126; human breast cancer cell line MCF-7; apoptosis; molecular mechanism

乳腺癌是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,其发生、发展和转移是多种信号通路参与的复杂过程,如 ERK、GSK-3 β 和 P38 等,这些信号通路的关键分子可作为治疗乳腺癌的靶点,ERK 通路有 3 个关键的靶分子即小 G 蛋白 Ras 及其下游的 Raf 激酶、MEK1/2 和 ERK1/2,阻断 ERK 信号通路可抑制乳腺癌细胞的恶性增殖,干预癌症的发生发展;GSK-3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可调控癌细胞的增殖、分化和凋亡等,也可用于预测癌症预后,它可磷酸化 β -catenin 的丝氨酸/苏氨酸残基,并导致其降解;P38 通路异常活化可导致肿瘤细胞恶性转化^[1]。黄芩素是从中药黄芩根部提取的活性成分,临床上用于治疗脑血管病后瘫痪,具有降低脑血管阻力,改善脑血管循环、增加脑血管流量及抗血小板凝集的作用,同时,黄芩素具有抗炎作用^[2]。已有少数研究报道,它可用于治疗癌症,但它在治疗乳腺癌中的作用却鲜有人知^[3]。U0126 是 MAPK 信号通路的特异性抑制剂,可有效抑制多种癌症的增殖和转移^[4]。联合使用黄芩素和 U0126 可提高治疗癌症的疗效,但两者在诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的分子机制还有待进一步研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中国科学院上海生物研究所细胞库。细胞复苏后,在 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳 CO₂、含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.1.2 药物和试剂 黄芩素购于美国 Sigma 公司,

纯度为 99%,充分溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,储存液浓度为 5 000 μ g/L (DMSO 的终浓度 $\leq 0.2\%$),4 $^{\circ}$ C 避光保存,使用前用细胞培养基稀释成实验所需的浓度。U0126 购于美国 Alexis 公司,Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,细胞周期试剂盒购于南京凯基生物发展有限公司,逆转录试剂盒购于加拿大 Fermentas 公司。二抗由辣根过氧化物酶标记,从西化仪北京科技有限公司购买。CCK8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)购于拓然生物科技公司。鼠抗人 P-P38 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司,鼠抗人 P-ERK1/2 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人单克隆抗体 Bax 购自美国 BD 公司,鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体购自德国 Calbiochem 公司,鼠抗人 P-GSK-3 β 单克隆抗体购自德国 Cell Signaling 公司,鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自上海申能博彩公司。Annexin V/PI 试剂盒购于百浩天生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪购于美国 BD 公司,显微镜购于美国 Leica 公司,电泳仪和凝胶成像分析系统购于美国 Bio-Rad 公司,CCK8 检测仪购于美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测细胞周期 乳腺癌细胞株 MCF-7 接种于 12 孔板,处理后,收集细胞,室温 PBS 洗涤 2 次,加入 1 ml 70%预冷乙醇固定过夜,第 2 天离心去除乙醇,PBS 重悬,加入 RNase 至终浓度为 100 mg/L,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,加入 PI 染色液至终浓度为 50 mg/L,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,用激发波长为 488 nm 的红色荧光检测细胞周期。结果采用细胞

周期拟合软件进行分析,记录亚二倍体峰,即凋亡细胞峰 sub-G₁ 期、G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期细胞比例,实验重复 3 次。

1.2.2 CCK8 检测细胞增殖 ①制备细胞悬液,计数细胞;②将细胞悬液接种至 96 孔板中,每孔 100 μ l,加入黄芩素或 U0126,每个样本 3 个重复;③37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 4 h;④加入 10 μ l CCK8,混匀;⑤培养 4 h,生成 Formazan;⑥测定 450 nm 吸光度:采用双波长进行测定,检测波长 450 ~ 490 nm,参比波长 600 ~ 650 nm。设定空白对照 1:在不含细胞的培养基中加入 CCK8,测定 450 nm 的吸光度作为空白对照 1;空白对照 2:在不含细胞加入黄芩素或 U0126 的培养基中加入 CCK8,测定 450 nm 的吸光度作为空白对照 2。一般 OD 值在 0.1 ~ 2.0 之间,在 1.0 左右较好。若吸光值太高,说明细胞数量过多或 CCK8 试剂的孵育时间过长,应该适当减少细胞数量或缩短孵育时间。细胞增殖越快,则颜色越深,细胞毒性越大,则颜色越浅。对于同样的细胞,颜色的深浅和细胞数量呈线性关系。

1.2.3 细胞显微摄影检测细胞数量变化 采用 2、5、10 和 20 μ mol 黄芩素处理人乳腺癌细胞株 MCF-7,24 h 后,低倍镜下观察细胞数量变化。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 细胞经处理后,移去培养基,PBS 洗 2 遍,4% PFA 室温固定 10 min,3%过氧化氢浸泡 10 min,抑制内源性过氧化氢酶,蛋白酶室温孵育 30 min,PBS 洗 2 遍,滴加 50 μ l TUNEL 反应液,室温湿盒中孵育 60 min,PBS 洗 3 遍,显微镜下分析结果。

1.2.5 流式细胞术检测早期和晚期凋亡 采用 20 μ mol 黄芩素单独处理,20 μ mol 黄芩素和 10 μ mol U0126 联合处理人乳腺癌细胞株,24 h 后,Annexin V/PI 试剂盒染色,流式细胞仪检测早期凋亡和晚期凋亡。实验操作按照试剂盒说明书严格执行,即细胞处理后,收集悬浮细胞,PBS 洗 2 次,加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer 重悬细胞,接着加入 5 μ l Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育 15 min 加入 10 μ l PI 染色液至终浓度为 50 μ g/ml,混匀,避光孵育 5 min,流式细胞仪检测早期凋亡和晚期凋亡。检测结果采用 CellQuest 软件进行分析。实验重复 3 次。

1.2.6 实时聚合酶链反应检测凋亡相关蛋白的表达水平 人乳腺癌细胞株 MCF-7 处理后,去掉培养

基,PBS 洗 2 遍,用 Trizol 提取总 RNA,采用 Thermo Fermentas 公司生产的逆转录试剂盒 K1622 逆转录成 cDNA 第一链,采用实时聚合酶链反应检测凋亡相关基因的表达水平。引物序列如下:ERK1/2,正向:AATCACACGGTAGACACTGAAATGCC,反向:CATCATCCCATCTAAAATGTCCCCTG;Bax,正向:CATATAACCCCGTCAACGCAG,反向:GCAGCCGCCACAAACATAC;Bcl-2,正向:GTCTTCGCTGCGGAGATCAT,反向:CATTCCGATATACGCTGGGAC;GSK-3 β ,正向:GGCAGCATGAAAGTTAGCAGA,反向:GGCGACCAGTTCTCCTGAATC;P38,正向:AACATCCTGTCGTGCCTTAC,反向:ACGTGCGTGACCTTAAAGTAGA;GAPDH,正向:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC,反向:TGGTGAAGACGCCAGTGA。

1.2.7 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达水平 处理 MCF-7 细胞后,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次,加入含 5%蛋白酶抑制剂的裂解液(RIPA 强),全程冰上操作,转移蛋白液至已标记的 Eppendorf 管中,超声破碎后,10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,收集细胞总蛋白,变性,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。取 5 μ l 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,转膜到 0.2 μ mol PVDF 膜上,5%脱脂奶粉的 1 \times TBST 封闭 2 h,去除封闭液,PBS 漂洗 2 次,5 min/次。一抗(ERK1/2 稀释比例为 1 : 1 500,P-ERK1/2 稀释比例为 1 : 1 000,GSK-3 β 稀释比例为 1 : 1 000,Bax 稀释比例为 1 : 800,Bcl-2 稀释比例为 1 : 500,P38 稀释比例为 1 : 1 000,P-P38 稀释比例为 1 : 1 000,GAPDH 稀释比例为 1 : 2 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。1 \times TBST 漂洗 2 次,20 min/次,HRP 羊抗小鼠 IgG (H+L)及 HRP 羊抗兔 IgG (H+L)(二抗稀释比例均为 1 : 2 000)室温孵育 1 h,1 \times TBST 漂洗 2 次,5 min/次,BIO-RAD 凝胶成像仪成像后,Quantity one 软件进行平均光密度值(mean optical density, MOD)分析,通过 GAPDH 平均光密度调整基本一致,计算相关因子蛋白水平表达,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,所有数据采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MCF-7细胞的周期变化

与空白对照组和 DMSO 对照组比较,用20 μmol 黄芩素处理人乳腺癌细胞株 MCF-7,24 h 后,G₀~G₁ 期细胞比例明显增多,S 期细胞比例明显下降(P<0.05),G₂/M 期细胞无明显变化,与空白对照组和 DMSO 对照组比较,采用 20 μmol 黄芩素与 10 μmol U0126 联合处理 MCF-7 细胞,24 h 后,G₀~G₁ 期细胞比例明显增多(P<0.05),S 期细胞比例明显下降,但和黄芩素组比较,无明显变化,而 S 期细胞比例降低(P<0.05),G₂/M 期细胞差异无统计学意义(P>0.05)。此研究结果表明,黄芩素可增加人乳腺癌细胞株 MCF-7 G₁ 期细胞比例,U0126 可明显降低 S 期细胞比例。见表 1、图 1。

2.2 MCF-7 细胞的增殖

MCF-7 细胞经不同浓度的黄芩素处理(1、2、5、10、20、50、100、200 和 300 μmol)24 h 后,采用 CCK8 检测黄芩素对细胞增殖的影响,实验结果表明,黄芩素可明显抑制 MCF-7 细胞增殖且具有浓度依赖性。MCF-7 细胞经不同浓度的 U0126 处理(1、2、5、10、20 和 30 μmol),24 h 后,采用 CCK8 检测 U0126 对细胞增殖的影响,实验结果表明,U0126 可明显抑制 MCF-7 细胞增殖且具有浓度依赖性。见图 2。

2.3 MCF-7细胞的数量变化

与空白对照组和 DMSO 对照组比较,2、5、10 和 20 μmol 黄芩素处理 MCF-7 细胞,24 h 后,细胞凋亡现象有统计学意义(P<0.05)。此研究结果表明,黄芩素可诱导 MCF-7 细胞凋亡且具有浓度依赖性。见表 2、图 3。

2.4 MCF-7细胞的凋亡

与空白对照组和 DMSO 对照组比较,20 μmol 黄芩素单独处理人乳腺癌细胞株 MCF-7,细胞凋亡现象有统计学意义(P=0.039),20 μmol 黄芩素和 10 μmol U0126 联合处理 MCF-7,细胞凋亡现象有统计学意义(P=0.013)。此研究结果表明,黄芩素和 U0126 可增加 MCF-7 细胞凋亡且两者具有协同效应。见表 3、图 4。

2.5 MCF-7细胞的早期和晚期凋亡情况

与空白对照组和 DMSO 对照组比较,20 μmol 黄芩素单独处理 MCF-7 细胞,24 h 后,早期凋亡和晚期凋亡均增多(P<0.05),采用 20 μmol 黄芩素与 10 μmol U0126 同时处理 MCF-7 细胞,早期凋

亡和晚期凋亡均增多(P<0.05)。此研究结果表明,黄芩素和 U0126 均可诱导 MCF-7 细胞早期凋亡和晚期凋亡,且两者具有协同效应。见表 4、图 5。

表 1 黄芩素与 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞周期的影响 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	55.0 ± 2.5	30.1 ± 3.4	14.2 ± 0.8
DMSO 对照组	56.3 ± 4.1	30.5 ± 3.8	13.1 ± 1.4
黄芩素组	91.7 ± 1.9	8.6 ± 0.9	8.1 ± 0.7
黄芩素 +U0126 组	91.2 ± 1.3	4.2 ± 0.6	6.7 ± 0.9
F 值	9.491	7.583	3.729
P 值	0.016	0.042	0.071

表 2 黄芩素对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞数量的影响 × 10³

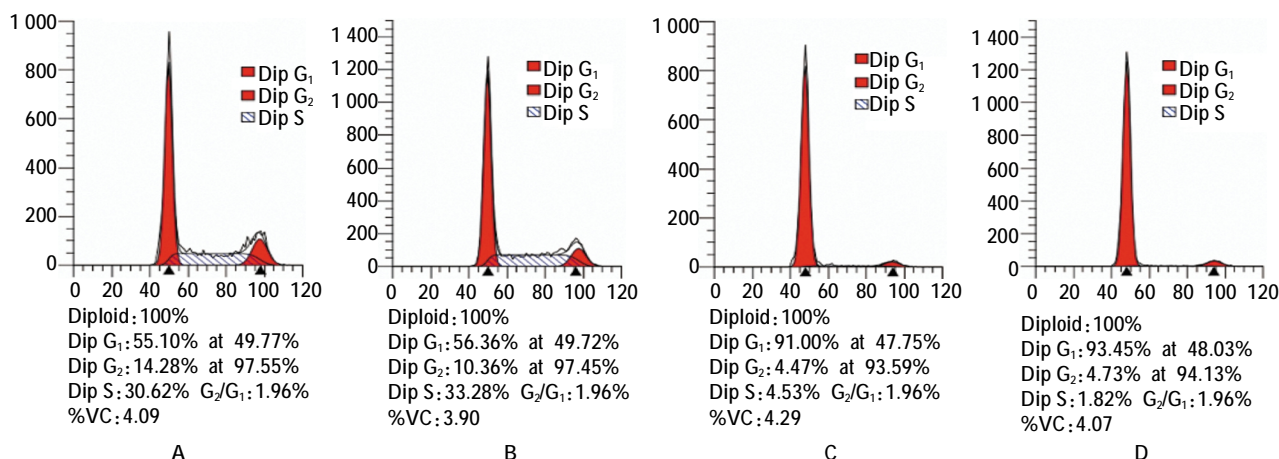
组别	细胞数量
空白对照组	3.5 ± 0.5
DMSO 对照组	3.2 ± 0.4
2 μmol 黄芩素组	2.3 ± 0.8
5 μmol 黄芩素组	1.2 ± 0.6
10 μmol 黄芩素组	0.8 ± 0.2
20 μmol 黄芩素组	0.6 ± 0.1
F 值	15.787
P 值	0.001

表 3 黄芩素与 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞凋亡指数的影响 AI%

组别	凋亡指数
空白对照组	1.3 ± 0.2
DMSO 对照组	1.6 ± 0.4
黄芩素组	67.3 ± 5.9
黄芩素 +U0126 组	82.2 ± 5.7
F 值	22.321
P 值	0.001

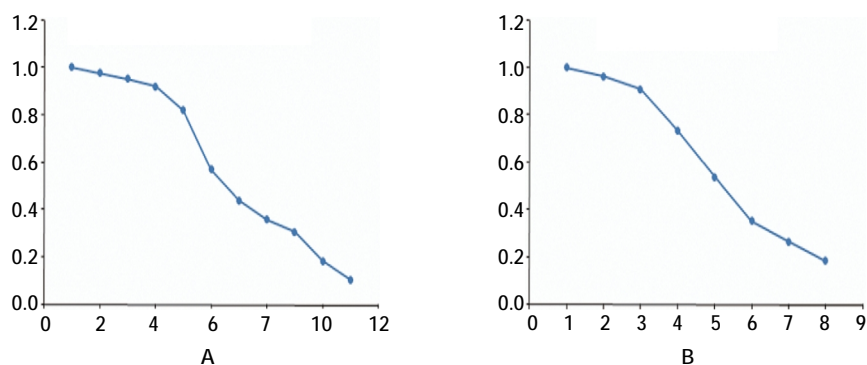
表 4 黄芩素与 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞早期和晚期凋亡的影响 %

组别	早期凋亡	晚期凋亡
空白对照组	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.5
DMSO 对照组	0.5 ± 0.4	6.3 ± 0.9
黄芩素组	12.5 ± 5.9	22.7 ± 2.3
黄芩素 +U0126 组	22.6 ± 5.7	33.5 ± 3.1
F 值	8.763	14.234
P 值	0.035	0.004



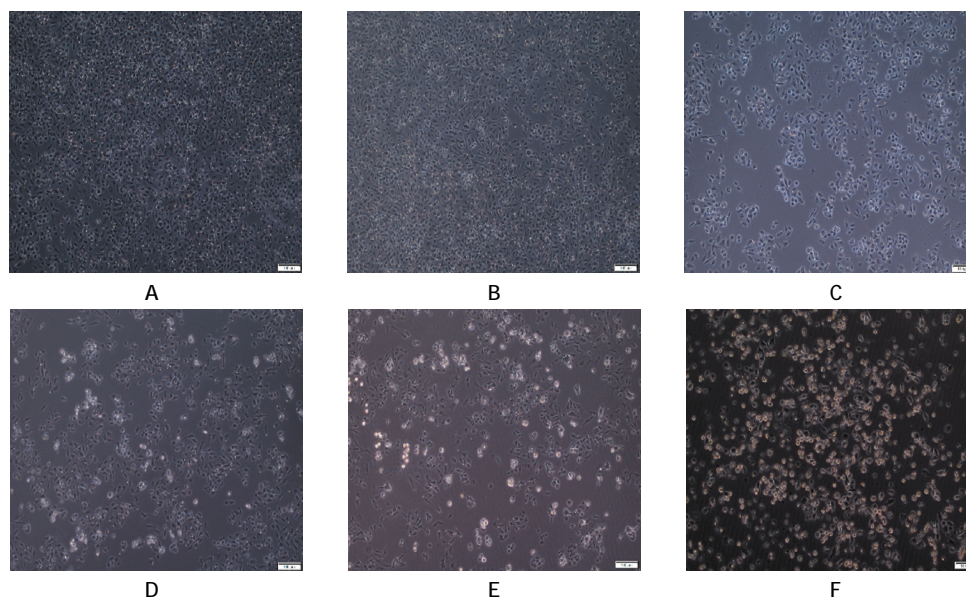
A: 空白对照组, 流式细胞术检测各细胞周期所占比例; B: DMSO 对照组, 流式细胞术检测各细胞周期所占比例; C: 20 μ mol 黄芩素处理组, 流式细胞术检测各细胞周期所占比例; D: 20 μ mol 黄芩素与 10 μ mol U0126 联合处理组, 流式细胞术检测各细胞周期所占比例

图 1 黄芩素和 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞周期的影响



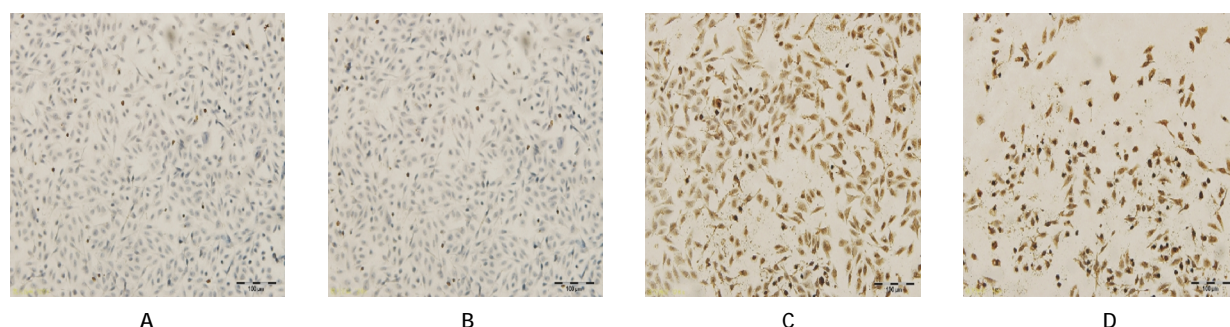
A: 不同浓度黄芩素处理 24 h 对 MCF-7 增殖影响结果; B: 不同浓度 U0126 处理 24 h 对 MCF-7 增殖影响结果

图 2 CCK8 检测黄芩素和 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞增殖的影响



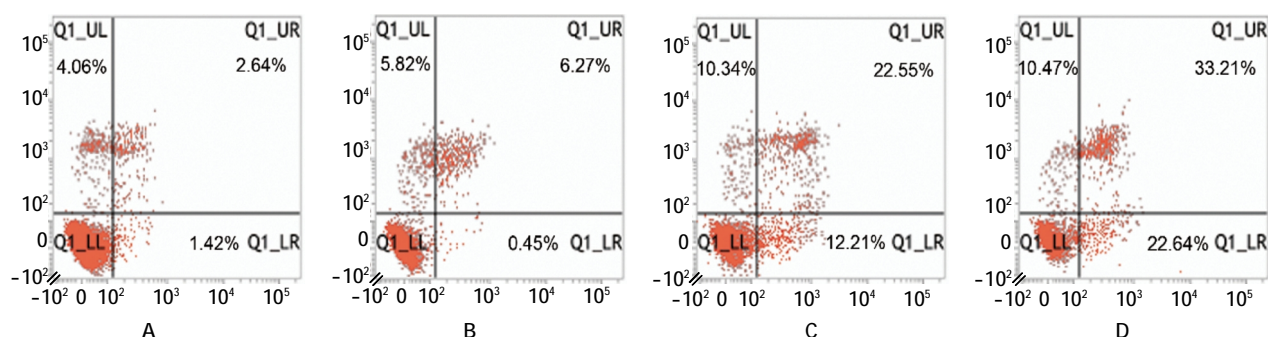
A: 黄芩素 0 μ mol-24 h, B: 黄芩素 0 μ mol-DMSO-24 h, C: 黄芩素 2 μ mol-24 h, D: 黄芩素 5 μ mol-24 h, E: 黄芩素 10 μ mol-24 h, F: 黄芩素 20 μ mol-24 h

图 3 黄芩素对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞形态影响



A: 空白对照组细胞凋亡情况;B:DMSO 对照组细胞凋亡情况;C:20 μmol 黄芩素处理组细胞凋亡情况;D:20 μmol 黄芩素与 10 μmol U0126 联合处理组细胞凋亡情况

图 4 黄芩素或 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞凋亡的影响



A: 空白对照组细胞早期和晚期凋亡情况;B:DMSO 对照组细胞早期和晚期凋亡情况;C:20 μmol 黄芩素处理组细胞早期和晚期凋亡情况;D:20 μmol 黄芩素与 10 μmol U0126 联合处理组细胞早期和晚期凋亡情况

图 5 黄芩素和 U0126 对 MCF-7 细胞早期和晚期凋亡的影响

2.6 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达

采用 20 μmol 黄芩素或 10 μmol U0126 单独处理 MCF-7 细胞 24 h 后,Bcl-2 的 mRNA 水平表达降低($P < 0.05$),凋亡促进因子 Bax 的 mRNA 水平表达增高($P < 0.05$)。此研究结果表明,黄芩素和 U0126 均可诱导 MCF-7 细胞凋亡。见表 5。

2.7 凋亡相关蛋白的表达水平

与空白对照组和 DMSO 组比较,采用 20 μmol

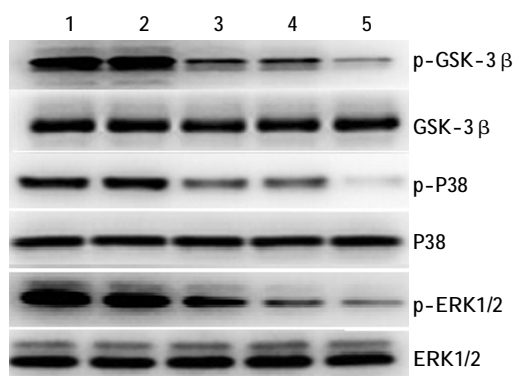
黄芩素或 10 μmol U0126 单独处理 MCF-7 细胞,24 h 后,ERK1/2、GSK-3β 和 P38 的磷酸化水平降低($P < 0.05$),与单独处理组比较,采用 20 μmol 黄芩素和 10 μmol U0126 联合处理 MCF-7 细胞,这些凋亡相关蛋白的变化有统计学意义 ($P < 0.05$)。此研究结果表明,黄芩素和 U0126 均可诱导 MCF-7 细胞凋亡,且两者联合使用具有协同效应。见表 6、图 6。

表 5 黄芩素与 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
空白对照组	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.09
DMSO 对照组	0.81 ± 0.08	1.11 ± 0.10
黄芩素组	0.41 ± 0.05	2.67 ± 0.22
U0126 组	0.35 ± 0.07	3.13 ± 0.31
黄芩素 +U0126 组	0.17 ± 0.05	6.12 ± 0.21
F 值	18.476	9.628
P 值	0.000	0.014

表 6 黄芩素与 U0126 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞各因子蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-GSK-3β	p-P38	p-ERK1/2
空白对照组	1.06 ± 0.08	0.91 ± 0.08	1.05 ± 0.11
DMSO 对照组	1.01 ± 0.05	0.92 ± 0.07	1.02 ± 0.12
黄芩素组	0.47 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.52 ± 0.06
U0126 组	0.31 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.38 ± 0.05
黄芩素 +U0126 组	0.16 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.18 ± 0.04
F 值	8.892	11.412	16.561
P 值	0.031	0.009	0.001



1: 空白对照组; 2: DMSO 对照组; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素组; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ U0126 组; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素 + 20 $\mu\text{mol/L}$ U0126 组

图 6 各因子蛋白的表达变化

3 讨论

目前, 乳腺癌是威胁女性健康的最常见恶性肿瘤之一, 是女性发病率最高的恶性肿瘤, 发病率约为 30%, 死亡率约为 20%^[9]。随着生活环境和饮食习惯的改变, 乳腺癌的患病率呈逐年上升趋势^[9]。

黄酮类化合物是植物多酚类的代谢物, 主要包括异黄酮、黄酮、黄酮醇、异黄酮醇、黄烷酮、异黄烷酮、啞尔酮等^[7]。这类化合物具有多种生物活性, 包括: 抗炎、抗病毒、抗氧化、抗衰老、免疫调节和抗肿瘤等^[8]。黄芩素是从中药黄芩根部提取的有效成分, 可用于治疗肝癌、前列腺癌、膀胱癌等, 但目前关于黄芩素与乳腺癌的报道却屈指可数, 因此, 深入研究黄芩素的抗乳腺癌分子机制具有深远的临床意义^[9]。

U0126 是 MAPK 激酶 MEK1 和 MEK2 的高效选择性抑制剂, 可同时抑制活化形式和未活化形式的 MEK1/2^[9]。ERK、GSK-3 β 和 P38 3 个信号通路可促进乳腺癌细胞生长和增殖, 增强乳腺癌细胞的抗凋亡和耐药性^[9]。本研究结果表明, 单独使用黄芩素或 U0126 处理人乳腺癌细胞株 MCF-7, 可降低 ERK、GSK-3 β 和 P38 的磷酸化水平, 抑制相关信号通路, 联合使用黄芩素和 U0126 具有协同抑制效应, 可更大限度地抑制乳腺癌细胞的生长。因此, 利用黄芩素和 U0126 靶向阻断细胞生长信号传导通路, 可抑制癌细胞生长, 提高癌细胞对化疗药物的敏感性。另外, 单独使用黄芩素或 U0126, 或联合使用黄芩素和 U0126 处理人乳腺癌细胞株 MCF-7, 可明显增加细胞凋亡, 加强化疗药物杀伤乳腺癌细胞的能力。

诱导乳腺癌细胞凋亡是治疗乳腺癌的常用策略

之一^[11]。Bcl-2 家族通过线粒体途径调控细胞凋亡, Bax 是促凋亡成员, Bcl-2 是抗凋亡成员, 黄芩素或 U0126 刺激乳腺癌细胞 MCF-7 后, Bax 与 Bcl-2 的比例增加, 线粒体的外膜上形成大量孔隙, 释放线粒体凋亡蛋白, 激活 Caspase, 诱导细胞凋亡, 联合使用黄芩素和 U0126, Bax/Bcl-2 的比例更高, 乳腺癌细胞的凋亡越趋严重, 2 种药物具有协同作用, 联合使用效果远大于单独使用效果的简单之和, 这可能取决于药物间的相互作用^[12]。

细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 是丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族的重要成员之一, 是多种生长因子和细胞因子调控细胞增殖、分化和凋亡的重要通路^[13]。ERK 与细胞表面受体结合后, 将信号转导至细胞核内, 促进癌细胞增殖甚至发生恶性转化^[14]。ERK 抑制剂可通过抑制 ERK 而抑制 MEK 激酶活性, 从而抑制 MAPK 级联反应参与细胞周期调控, 尤其是 G₁/S 期调控^[15]。本研究结果表明, 黄芩素、U0126 单独处理, 或黄芩素和 U0126 联合处理人乳腺癌细胞株 MCF-7 后, 可降低 ERK 的磷酸化水平, 从而增加 G₁ 期细胞含量, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。

糖原合成酶激酶 (GSK-3 β) 是 Wnt 信号通路的关键信号分子, 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶^[16]。GSK-3 β 被激活后, 可活化 Bax、c-jun 和 Caspase 等蛋白, 在癌症组织中诱导早期细胞凋亡^[17]。已有研究报告, GSK-3 β 在氟尿嘧啶的作用下可促进结肠癌细胞株 colo320 凋亡, 其作用机制可能为: 氟尿嘧啶刺激结肠癌细胞株 colo320 后, 促进 GSK-3 β 由胞浆转移至胞核并活化 GSK-3 β , 抑制 NF- κ B 从抑制物 I κ B 解离, 从而降低细胞核内 NF- κ B 的含量, 抑制 NF- κ B 的促生存作用, 为治疗结肠癌提供了新的思路^[18]。但本研究结果表明, 黄芩素、U0126 单独处理或联合处理人乳腺癌细胞株 MCF-7 后, GSK-3 β 的磷酸化水平降低, 从而上调凋亡促进因子 Bax, 下调凋亡抑制因子 Bcl-2, 促进细胞凋亡。

P38/MAPK 是 MAPK 家族的重要成员, 可调控多种癌症的细胞周期、凋亡、EMT 与耐药性如乳腺癌等, 在控制 G₁/S 和 G₂/M 检查点上扮演重要角色, 此信号通路高度活化, 会导致肿瘤细胞恶性增殖。本研究的结果表明, 黄芩素、U0126 单独处理人乳腺癌细胞 MCF-7, 24 h 后, P38 的磷酸化水平急剧降低, 两者联合处理后, P38 的磷酸化水平更低,

P38/MAPK 信号通路活性降低。黄芩素和 U0126 可下调 P38/MAPK 信号通路,抑制乳腺癌细胞转移,促进凋亡。

综上所述,黄芩素联合 U0126 通过下调 ERK、GSK-3 β 和 P38 信号通路,激活线粒体细胞凋亡途径,增加 Bax/Bcl-2 比例,促进乳腺癌细胞凋亡,为乳腺癌临床治疗提供了新的化疗药物和治疗策略。

参 考 文 献:

- [1] WANG H T, WANG C Q. 27-O-(E)-p-coumaric acyl ursolic acid via JNK/SAPK signal pathway regulates apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cell line[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(4): 722-726.
- [2] TSAI M J, WU P C, HUANG Y B, et al. Baicalein loaded in tocol nanostructured lipid carriers (tocol NLCs) for enhanced stability and brain targeting[J]. *Int J Pharm*, 2012, 428(1-2): 188.
- [3] SHANG D, LI Z, ZHU Z, et al. Baicalein suppresses 17 β -estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor 30 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 2077-2085.
- [4] ROSE H M, STUIVER M, THONGWICHIAN R, et al. Quantitative NMR analysis of Erk activity and inhibition by U0126 in a panel of patient-derived colorectal cancer cell lines [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(7): 1396-1401.
- [5] MARCOTTE R, SAYAD A, BROWN K R, et al. Functional genomic landscape of human breast cancer drivers, vulnerabilities, and resistance[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 293-309.
- [6] Breast Cancer Survivorship Guidelines [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 74.
- [7] SMITH M L, MURPHY K, DOUCETTE C D, et al., The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspase-dependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triple-negative breast cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(8): 1913-1925.
- [8] LEE DA H, JUNG JUNG Y, KOH D, et al. A synthetic chalcone, 2'-hydroxy-2,3, 5'-trimethoxychalcone triggers unfolded protein response-mediated apoptosis in breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 372(1): 1-9.
- [9] DATTA A, BHASIN N, KIM H, et al. Selective targeting of FAK-Pyk2 axis by alpha-naphthoflavone abrogates doxorubicin resistance in breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 25-35.
- [10] DING C, LUO J, LI L, et al. Gab2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition via the MEK/ERK/MMP signaling in colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 5
- [11] BISLE S, KLINGENBECK L, BORGES V, et al. The inhibition of the apoptosis pathway by the coxiella burnetii effector protein CaeA requires the EK repetition motif, but is Independent of Survivin[J]. *Virulence*, 2016, 7(4): 400-412.
- [12] MOSLEHI M, MESHKINI A, YAZDANPARAST R. Flavonoid baicalein modulates H2O2-induced mitogen-activated protein kinases activation and cell death in SK-N-MC cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(4): 549-560.
- [13] FENG D, WANG B, MA Y, et al. The Ras/Raf/Erk pathway mediates the subarachnoid hemorrhage-Induced apoptosis of hippocampal neurons through phosphorylation of p53 [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(8): 5737-5748.
- [14] BAVARIA M N, JIN S, RAY R M, et al. The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(3): 467-479.
- [15] PEREIRA R M, FERREIRA-SILVA G Á, PIVATTO M, et al. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression[J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 31: 86-92.
- [16] MAQBOOL M, MOBASHIR M, HODA N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 107: 63-81.
- [17] FUKUSHIMA K, FUKUSHIMA N, EJIMA K, et al. Left atrial appendage flow velocity and time from P-wave onset to tissue doppler-derived A' predict atrial fibrillation recurrence after radiofrequency catheter ablation[J]. *Echocardiography*, 2015, 32(7): 1101-1108.
- [18] DHINDHWAL V, BAER M, SATHYAMURTHY N. Study of topological effects concerning the lowest A'' and the three A' states for the CO Ion[J]. *J Phys Chem A*, 2016, 120(19): 2999-3008.

(张蕾 编辑)