

丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移的抑制作用及其作用机制研究

吕金锋¹, 裴继花², 王晓明¹

1. 焦作煤业(集团)中央医院 普外科, 河南 焦作 454001
2. 焦作煤业(集团)中央医院 耳鼻喉科, 河南 焦作 454001

摘要: 目的 研究丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移的抑制作用, 并探讨其作用机制。方法 CCK-8 法检测不同浓度(10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$)的丹蒾醌作用 24、48 h 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力的影响; Transwell 实验考察丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭转移能力的影响。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 c-Myc、Cyclin D1 mRNA 的表达水平; Western blotting 法检测 p-AMPK α 、ACC、c-Myc、Cyclin D1 蛋白的表达水平。结果 不同浓度的丹蒾醌作用不同时间对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖均具有抑制作用; 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的丹蒾醌能够明显的抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的侵袭转移, 同时能够激活 p-AMPK α 的表达, 抑制 ACC、c-Myc、Cyclin D1 等基因的表达, 从而抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖。结论 丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移具有抑制作用, 其作用机制可能与激活 AMPK 信号通路抑制 c-Myc、Cyclin D1 等增殖相关基因表达有关。

关键词: 丹蒾醌; 乳腺癌; MCF-7; 侵袭转移; 增殖

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)10-1950-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.006

Inhibitory effect of dantron on proliferation and invasion and metastasis of breast cancer cells MCF-7 and its mechanism

LV Jinfeng¹, PEI Jihua², WANG Xiaoming¹

1. Department of General Surgery, Central Hospital of Jiaozuo Coal (Group), Jiaozuo 454001, China
2. Department of ENT, Central Hospital of Jiaozuo Coal (Group), Jiaozuo 454001, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of dantron on MCF-7 proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells, and to explore its mechanism. **Methods** CCK-8 assay was used to detect the effect of dantron at different concentrations (10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$) on MCF-7 proliferation of breast cancer cells for 24 and 48 h. Transwell assay investigated the effect of dantron on the invasion and metastasis of MCF-7 in breast cancer cells. Real-time fluorescence equivalent PCR (RT-qPCR) used to detect the expression levels of c-Myc、Cyclin D1 mRNA, and Western blotting were used to detect the protein expression levels of p-AMPK α , ACC, c-Myc and Cyclin D1. **Results** Different concentrations of dantron inhibited the proliferation of MCF-7 in breast cancer cells at different time, and 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ dantron can significantly inhibited the invasion and metastasis of MCF-7 in breast cancer cells, activate the expression of p-AMPK α , inhibited the expression of ACC, c-Myc, Cyclin D1 genes, and thereby inhibit the proliferation of MCF-7 in breast cancer cells. **Conclusion** Dantron can inhibit the proliferation, invasion and metastasis of MCF-7 in breast cancer cells, and its mechanism may be related to the activation of AMPK signaling pathway to inhibit the expression of c-Myc, Cyclin D1 proliferation-related genes.

Key words: dantron; breast cancer; MCF-7; invasion and metastasis; proliferation

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。流行病学研究表明,全球每年新增乳腺癌病例115万,占全部女性肿瘤的23%,死亡病例41万,占全部女性肿瘤的14%^[3],严重威胁女性生命健康。乳腺癌

收稿日期: 2019-04-10

基金项目: 河南省科技发展计划(142102310459)

第一作者: 吕金锋(1984—),男,本科,主治医师,研究方向为甲状腺、乳腺外科。Tel: 13598532806 E-mail: 3168917155@qq.com

的发病机制目前仍未清楚,主要与遗传因素、环境因素、基因突变等有关^[4-5]。目前临床上手术治疗仍是乳腺癌患者的主要治疗手段之一^[6],但易对患者生理及心理产生巨大痛苦,因此探寻有效的药物防治乳腺癌是一个亟待解决的问题。

丹蒽醌(dantron, Da)是大黄中的一种重要蒽醌类化合物,具有显著的抗氧化作用^[7]。近年来研究报道,丹蒽醌对肝癌、胃癌等^[8-9]多种恶性肿瘤均具有抑制作用,但对于丹蒽醌防治乳腺癌的作用研究报道较少。近年来,调节肿瘤细胞能量代谢抑制肿瘤细胞增殖的方法在肿瘤防治领域备受关注。磷酸腺苷蛋白激酶(AMPK)是生物体能量调节的重要分子,对于维持肿瘤细胞能量代谢具有重要作用^[10]。Zhong等^[11]研究表明,在乳腺癌细胞MCF-7中,p-AMPK α 被抑制,因此激活p-AMPK α ,调节乳腺癌细胞能量代谢成为了防治乳腺癌细胞的潜在靶点。有研究报道,丹蒽醌是AMPK的激动剂^[12-13],能够激活AMPK调节糖脂代谢进而影响肿瘤细胞增殖。因此,本研究考察丹蒽醌对乳腺癌细胞MCF-7增殖的抑制作用并探讨其作用机制,为丹蒽醌防治乳腺癌提供临床前研究。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞MCF-7株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2 药品与试剂

丹蒽醌(批号B21740,质量分数>98%)购自上海源叶生物科技有限公司;胎牛血清(FBS,批号10099-141)、DMEM高糖培养基(批号12491-015)、胰蛋白酶、青-链霉素(批号15070063)等购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(购自日本同仁化学研究所,批号CK04);原癌基因c-Myc、G₁/S-特异性周期蛋白-D1(Cyclin D1)等基因mRNA、 β -actin上下游引物和探针由湖北百奥斯生物科技有限公司设计并合成;荧光定量PCR试剂购于DBI公司;phospho-AMPK α 兔单克隆抗体(批号2535)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC, acetyl CoA carboxylase)兔单克隆抗体(批号3676)、Cyclin D1兔单克隆抗体(批号2978)、 β -actin兔单克隆抗体(批号4970)、辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG二抗(批号7074)等购自美国CST公司;c-Myc兔多克隆抗体(批号10828-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号23227)、ECL超敏化学发光液(批号34580)、细胞蛋白提取试剂(批号78501)、RNA提取

试剂购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Tris-HCl凝胶试剂盒(批号345-9951)购自美国伯乐公司;其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 仪器

CO₂培养箱(MCO-15AC,日本三洋);酶标仪(xMark)、电泳仪、全能蛋白转膜仪、细胞计数器(TC20)、实时定量PCR仪(CFX96)等购自美国伯乐公司;离心机(TD5.5,上海卢湘仪离心机仪器有限公司);分析天平(ML-T,瑞士梅特勒-托利多公司);凝胶成像系统(GelDoc EZ,美国伯乐公司);倒置显微镜(CKX31,日本奥林巴斯公司);涡旋仪(Vortex Mixer)。

2 方法

2.1 细胞培养

乳腺癌细胞MCF-7用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基(以下简称“培养基”),在37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度为5%的培养箱中培养,观察并记录细胞的生长状态。

2.2 丹蒽醌溶液配制

精密称取丹蒽醌对照品24.0 mg溶于1 mL二甲亚砜(DMSO)中,配成浓度为100 mmol/L的丹蒽醌对照品母液,-20 $^{\circ}$ C保存,用时取适量丹蒽醌对照品母液加培养基稀释至浓度为10 mmol/L的丹蒽醌对照品工作液,过0.22 μ m微孔滤膜即可。

2.3 丹蒽醌对乳腺癌细胞MCF-7增殖能力的影响

取对数生长期MCF-7细胞,经胰酶消化后制成细胞悬液用细胞计数器计数,以5 000个/孔,每孔体积100 μ L,铺于96孔板中,设置对照组及不同浓度药物组,每组设置6个复孔。药物组分别给予含有丹蒽醌10、20、40、60、80、100 mol/L的含药培养基,对照组给予同体积的培养基,另设不含细胞只含培养基的空白组。不同浓度丹蒽醌给药24、48 h后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂后继续培养2 h。酶标仪450 nm波长处测定吸光度(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

2.4 Transwell实验

将MCF-7细胞运用DMEM培养基培养,使MCF-7细胞处于饥饿状态。设对照组及丹蒽醌给药组(20、40 μ mol/L),不同剂量的丹蒽醌给药作用24 h后,MCF-7细胞用胰酶消化后用DMEM培养基制备细胞悬液,计数,按 1×10^5 个细胞/孔,体积200 μ L,加入到Transwell小室中,小室下层加入800 μ L MCF-7细胞培养基(含10%胎牛血清),培养24 h后,取出小室,用棉签擦去小室内侧底部的细胞,并

放置于多聚甲醛中固定,运用结晶紫染色,显微镜下观察,小室外侧细胞即为迁移的细胞。

2.5 RT-qPCR检测相关基因mRNA的表达水平

乳腺癌细胞MCF-7按2.4中方法分组后,运用20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的丹蒾醌给药作用后收集细胞。运用RNA提取试剂盒提取MCF-7细胞中的RNA,逆转

录酶将RNA逆转录成cDNA后运用RT-qPCR检测c-Myc、Cyclin D1等增殖相关基因mRNA的表达水平。PCR扩增条件(反应体系为10 μL):95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15 s,共40个循环,以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相关基因mRNA的相对表达量。引物序列如表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	序列长度/bp
β -actin	正向:5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'	190
	反向:5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'	
c-Myc	正向:5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'	133
	反向:5'-GTGTGTTTCGCTCTTGACATT-3'	
Cyclin D1	正向:5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	196
	反向:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	

2.6 Western blot检测相关蛋白的表达水平

乳腺癌细胞MCF-7按2.4中方法分组后,运用20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的丹蒾醌给药作用后收集细胞。运用蛋白提取试剂提取蛋白,BCA试剂盒测定蛋白含量。取40 μg 蛋白样品经过SDS-PAGE电泳分离后,转至PVDF膜(0.45 μm)上,5%脱脂牛奶封闭1 h后,p-AMPK α 、ACC、c-Myc、Cyclin D1等一抗(1:1 000)在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床孵育过夜,TBST清洗3次,每次10 min,二抗(1:10 000)室温孵育1 h,用TBST清洗3次,每次10 min,ECL显色后运用凝胶成像系统获得条带,以 β -actin作为内参。采用Image J图像软件进行灰度值分析。

2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 丹蒾醌对MCF-7细胞增殖能力的影响

运用CCK-8细胞活力检测法检测不同浓度(10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$)的丹蒾醌给药作用24、48 h对乳腺癌细胞MCF-7存活率的影响,筛选丹蒾醌的给药浓度,结果见图1。随着丹蒾醌给药浓度增大,作用时间增长,乳腺癌细胞MCF-7的存活率依次降低,当丹蒾醌浓度为40 $\mu\text{mol/L}$,作用24、48 h,乳腺癌细胞MCF-7的存活率分别为83.5%、74.6%,当丹蒾醌浓度为80 $\mu\text{mol/L}$,作用24、48 h,乳腺癌细胞MCF-7的存活率分别为60.2%、52.6%,表明丹蒾醌对乳腺癌细胞MCF-7增殖具有抑制作用。综合以上结果,选择20、40 $\mu\text{mol/L}$,对乳

腺癌细胞MCF-7无显著性细胞毒性的浓度,作用24 h作为丹蒾醌的给药条件。

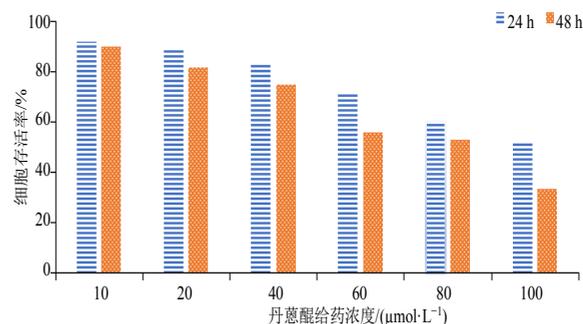


图1 不同浓度的丹蒾醌对MCF-7细胞存活率的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of dantron on the survival rate of MCF-7 cells

3.2 丹蒾醌对MCF-7细胞侵袭转移能力的影响

运用Transwell实验检测不同浓度的丹蒾醌对MCF-7细胞中侵袭转移能力的影响。结果见图2。与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 丹蒾醌给药作用后,小室外细胞数量显著减少,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 丹蒾醌分别与对照组的小室外细胞数量取差值,差值对比显示差异具有统计学意义($P < 0.05$),乳腺癌细胞MCF-7的侵袭转移能力被抑制,表明不同浓度丹蒾醌能够抑制乳腺癌细胞的侵袭转移。

3.3 丹蒾醌对MCF-7细胞中相关基因mRNA表达水平的影响

乳腺癌细胞MCF-7运用20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的丹蒾醌给药作用24 h后提取细胞RNA,检测c-Myc、

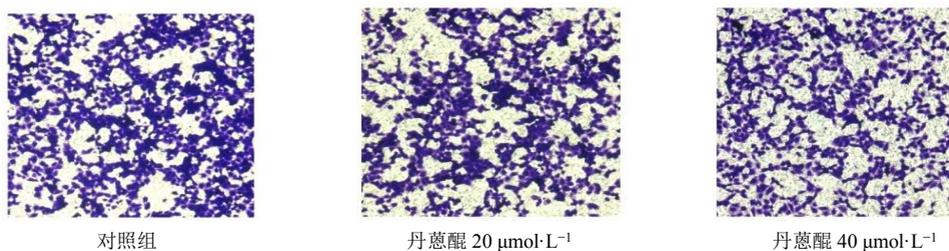


图2 丹蒽醌对MCF-7细胞中侵袭转移能力的影响

Fig. 2 Effect of dantron on invasion and metastasis of MCF-7 cells

Cyclin D1等增殖相关基因mRNA的表达水平,结果见图3。与对照组比,20、40 μmol/L的丹蒽醌给药后,MCF-7细胞中c-Myc、Cyclin D1 mRNA的表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明丹蒽醌能够抑制c-Myc、Cyclin D1等增殖相关基因mRNA的表达水平,抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖。

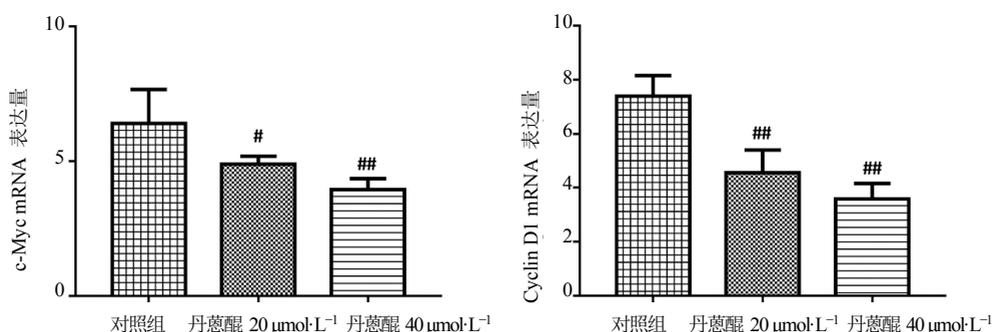
3.4 丹蒽醌对MCF-7细胞中相关基因蛋白表达水平的影响

乳腺癌细胞MCF-7运用20、40 μmol/L的丹蒽醌给药作用24 h后提取细胞蛋白,检测p-AMPKα、

ACC、c-Myc、Cyclin D1等蛋白的表达水平,结果见图4。与对照组比,20、40 μmol/L丹蒽醌给药作用24 h后均能够降低ACC、c-Myc、Cyclin D1等蛋白的表达水平,升高p-AMPKα的表达水平,且结果均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 讨论

乳腺癌作为女性常见的恶性肿瘤,发病率高,严重危害女性生命健康。近年来,随着生活习惯及生活环境的改变,女性乳腺癌的发病率逐年上升,此外,乳腺癌患者预后不良及复发问题给临床乳腺

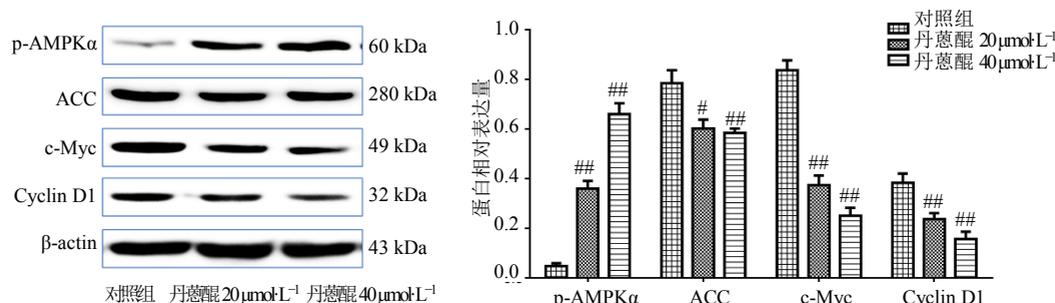


与对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group

图3 丹蒽醌对MCF-7细胞中相关基因mRNA表达水平的影响

Fig. 3 Effect of dantron on mRNA expression of related genes in MCF-7 cells



与对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group

图4 丹蒽醌对MCF-7细胞中相关基因蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effects of dantron on protein expression levels of related genes in MCF-7 cells

癌治疗带来了极大困难^[14-15],因此探寻有效防治乳腺癌的药物具有重要意义。肿瘤细胞过度增殖是肿瘤发生发展的重要特征^[16]。AMPK 信号通路是机体最重要的物质能量代谢信号通路之一。越来越多的研究表明,在乳腺癌等多种肿瘤发生发展过程中,AMPK 信号通路被抑制^[17-18],从而激活体内糖脂代谢相关分子大量合成脂肪酸等,为肿瘤细胞增殖提供必需的脂质及能量。因此,激活 AMPK 信号通路,调节肿瘤细胞物质能量代谢,抑制肿瘤细胞增殖成为了防治肿瘤的新思路。Kim 等^[19]研究表明,在乳腺癌细胞 MCF-7 中,AMPK 被显著抑制,提示 AMPK 可能成为抑制乳腺癌细胞增殖的新靶点。c-Myc、Cyclin D1 是重要的增殖相关蛋白,对于促进肿瘤细胞恶性转化具有重要作用^[20-21]。

丹蒾醌是一种蒾醌类衍生物,具有显著的抗氧化及抗肿瘤作用,近年来研究表明其是 AMPK 的选择性激动剂,能够选择性激活 AMPK 信号通路,从而发挥多种生物学活性,但对于丹蒾醌防治乳腺癌的研究报道较少。因此本实验考察丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移的影响,为丹蒾醌防治乳腺癌提供临床前研究。研究结果显示,不同浓度的丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖具有一定的抑制作用,当丹蒾醌浓度超过 60 $\mu\text{mol/L}$ 时,对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖具有显著的抑制作用;同时 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的丹蒾醌给药作用 24 h 能够激活 AMPK 信号通路,降低 ACC、c-Myc、Cyclin D1 等蛋白的表达水平,抑制 c-Myc、Cyclin D1 mRNA 的表达水平,对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移具有抑制作用。综上,丹蒾醌对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及侵袭转移具有抑制作用,其作用机制可能与激活 AMPK 信号通路,抑制 c-Myc、Cyclin D1 等增殖相关基因表达有关。

参考文献

- [1] Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, et al. Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 55-60.
- [2] 曹明丽. 基于分子分型的乳腺癌流行病学新认识 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(9): 449-451.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [4] 王肖寒. 乳腺癌的发病机制与治疗 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(63): 195.
- [5] Brisken C, Hess K, Jeitziner R. Progesterone and overlooked endocrine pathways in breast cancer pathogenesis [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(10): 3442-3450.
- [6] 戴琼. 乳腺癌危险因素的 meta 分析、调查及术后生命质量测评估 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
- [7] Guntuku L, Naidu V G M, Ganesh Yerra V. Mitochondrial dysfunction in gliomas: pharmacotherapeutic potential of natural compounds [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(6): 567-583.
- [8] Shang-Ming C O, Chiu C H, Yang S T, et al. Danthron triggers ROS and mitochondria-mediated apoptotic death in C₆ rat glioma cells through caspase cascades, apoptosis-inducing factor and endonuclease g multiple signaling [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(8): 1790-1800.
- [9] Chiang J H, Yang J S, Ma C Y, et al. Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and bax-triggered pathways [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(1): 20-29.
- [10] Faubert B, Vincent E E, Poffenberger M C, et al. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator [J]. *Cancer Letters*, 2015, 356(2): 165-170.
- [11] Zhong Z F, Tan W, Qiang W W, et al. Furanodiene alters mitochondrial function in doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cells in an AMPK-dependent manner [J]. *Mol BioSyst*, 2016, 12(5): 1626-1637.
- [12] Nguyen P H, Choi H S, Ha T K Q, et al. Anthraquinones from *Morinda longissima* and their insulin mimetic activities via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(1): 40-44.
- [13] Zhou R, Wang L, Xu X, et al. Danthron activates AMP-activated protein kinase and regulates lipid and glucose metabolism *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(8): 1061-1069.
- [14] 曾蕾伦, 吕铮, 崔久崑. 乳腺癌免疫治疗研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(1): 96-102.
- [15] 于洪波, 尹青. 乳腺癌基因检测的实践及靶向药物治疗进展 [J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2018(20): 181, 184.
- [16] Nussinov R, Tsai C J, Jang H. A New View of Pathway-Driven Drug Resistance in Tumor Proliferation [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(5): 427-437.
- [17] Li W D, Saud S M, Young M R, et al. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7365-7378.
- [18] Zadra G, Batista J L, Loda M. Dissecting the dual role of AMPK in cancer: from experimental to human studies [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(7): 1059-1072.
- [19] Kim M Y, Bo H H, Choi E O, et al. Induction of apoptosis by *citrus Unshiu* peel in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of ROS-dependent activation of AMPK [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(5): 713-721.
- [20] Xie F, Yuan Y C, Xie L Y, et al. miRNA-320a inhibits tumor proliferation and invasion by targeting c-Myc in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 885-894.
- [21] Haghi M, Taha M F, Javeri A. Suppressive effect of exogenous miR-16 and miR-34a on tumorigenesis of breast cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13342-13353.