

尿石素A对乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡的影响及其机制研究

刘国军¹, 黄绪群^{2*}

1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院) 肿瘤外科, 湖北 黄石 435000

2. 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院) 肿瘤内科, 湖北 黄石 435000

摘要: 目的 研究尿石素A对乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡的影响并探讨其作用机制。方法 CCK-8法考察不同浓度尿石素A作用12、24、36、48 h对MCF-7细胞增殖能力的影响; 细胞凋亡染色法考察20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的尿石素A对MCF-7细胞凋亡的影响; 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax mRNA的表达水平; Western blotting法检测c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax蛋白的表达水平。结果 尿石素A对MCF-7细胞增殖具有抑制作用且呈时间浓度相关性; 细胞凋亡染色显示, 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药后均能够诱导MCF-7细胞凋亡; RT-qPCR及Western blotting结果显示, 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A能够显著降低MCF-7细胞中c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2 mRNA及蛋白的表达水平($P < 0.05$ 、 0.01), 升高Bax mRNA及蛋白的表达水平($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 尿石素A具有抑制MCF-7细胞增殖并诱导其凋亡的作用, 其作用机制可能与抑制c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2表达, 升高Bax表达水平有关。

关键词: 尿石素A; 乳腺癌; MCF-7; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)02-0221-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.008

Effect of urolith A on proliferation and apoptosis of MCF-7 cells in breast cancer and its mechanism

Liu Guojun, Huang Xuqun

Department of Surgical Oncology, Edong Medical Group Huangshi Central Hospital (Affiliated Hospital of Hubei Polytechnic University), Huangshi 435000, China

Abstract: Objective To study the effect of urolith A on the proliferation and apoptosis of MCF-7 in breast cancer cells and to explore its mechanism. **Methods** The CCK-8 cell viability assay was used to investigate the effect of different concentrations of urolith A on MCF-7 proliferation of breast cancer cells after 12, 24, 36 and 48 h. Apoptosis staining was used to investigate the effect of urolith A at 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ on the apoptosis of MCF-7 in adenocarcinoma cells. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of c-myc, Cyclin D1, bcl-2 and Bax mRNA. Western blotting was used to detect the expression levels of c-myc, Cyclin D1, bcl-2, Bax and other proteins. **Results** The different concentrations of urolith A inhibited the proliferation of MCF-7 in breast cancer cells in a time-concentration dependent manner. 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ Urolith A can induce the apoptosis of MCF-7 in adenocarcinoma cells. RT-qPCR and Western blotting results showed that urolith A at 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ could reduce the expression level of c-myc, Cyclin D1, Bcl-2 gene protein and mRNA in MCF-7 cells ($P < 0.05$ and 0.01), and increase the expression level of Bax gene protein and mRNA ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Urolith A can inhibit the proliferation of MCF-7 in breast cancer cells and induce its apoptosis, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of c-myc, Cyclin D1, Bcl-2 and other genes, and the increase of the expression level of Bax gene.

Key words: urolith A; breast cancer; MCF-7; proliferation; apoptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1]。2017年在美国和欧盟的女性中乳腺癌的病死率位居前两位,死亡人数将分别达到40 610例和92 600例,严重威胁女性生命健康^[2-3]。目前,临床上乳腺癌的

治疗主要以手术及化疗为主,因此,寻找防治乳腺癌的有效药物对于乳腺癌的临床综合治疗具有重要意义^[4-6]。近年来,中药在乳腺癌治疗中的作用研究受到了广泛的关注,显示了巨大的潜力。有研究

收稿日期: 2019-05-09

第一作者: 刘国军(1975—),男,湖北浠水人,副主任医师,研究方向为肿瘤外科。Tel: 13872114661 E-mail: 2994719709@qq.com

*通信作者: 黄绪群(1974—),男,湖北大冶人,硕士,副主任医师,研究方向为肿瘤外科。Tel: 18934663612 E-mail: 2994719709@qq.com

指出^[7],在中医辨证治疗理论指导下,合理运用中医不仅能发挥良好的抗肿瘤作用,还能联合化疗药物起到减毒增效的作用。尿石素类物质作为一种鞣花酸代谢产物,可在哺乳动物体内被代谢转化成具有生物活性的物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理学作用^[8-9]。其中,尿石素A是尿石素类物质中主要的活性物质^[10-11],有研究指出^[12],尿石素A可提高氟尿嘧啶在结直肠癌中的疗效。但目前关于尿石素A抑制乳腺癌的作用研究报道较少,因此,本实验研究尿石素A对乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡的影响并探讨其作用机制,为尿石素A防治乳腺癌提供临床前研究依据。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞MCF-7株,购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 药品与主要试剂

尿石素A(批号1143-70-0,质量分数>98%),购自北京杰辉生物科技发展有限公司;胎牛血清、DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、青-链霉素,购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所;c-Myc、G1/S-特异性周期蛋白-D1(Cyclin D1)、Bcl-2、Bax、 β -actin mRNA上下游引物和探针,由InvitrogenTM公司设计并合成;荧光定量PCR试剂购于DBI公司;兔抗人c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2和Bax多克隆抗体(货号分别为94025、29225、42235和27745),辣根过氧化物酶-山羊抗兔IgG二抗(货号14708S),均购自美国CST公司;BCA蛋白定量试剂盒、ECL超敏化学发光液、细胞蛋白提取试剂、RNA提取试剂,购自美国Thermo Fisher Scientific公司;PAGE-SDS凝胶快速制备试剂盒,购自美国EpiZyme Scientific公司;其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 主要仪器

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),购自美国伯乐公司;离心机(CTK120R,湖南湘仪离心机仪器有限公司);分析天平(MS-TS,梅特勒-托利多公司);化学成像分析系统(G:BOX,英国Syngene公司);倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);恒温水浴锅(HH-S4,武汉格莱莫检测设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞复苏和培养

乳腺癌MCF-7细胞取自液氮,采用“慢冻速溶”

的方法,利用预热的DMEM培养基进行培养。置入CO₂培养箱中,每3天换液一次。

2.2 CCK-8试剂盒检测细胞成活率^[13]

取对数生长期细胞,经胰酶消化后制成细胞悬液并用细胞计数器计数,以5 000个/孔,每孔体积100 μ L,铺于96孔板中,设置空白组、对照组及尿石素A(10、20、40、60、80 μ mol/L)组,每组设置6个复孔,空白组及对照组给予同体积的培养基,空白组不接种细胞。给药12、24、36、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)值,计算细胞存活率。重复3次实验。

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

2.3 分组及给药

取对数生长期细胞,接种于100 mm培养皿中,设对照组和尿石素A(20、40 μ mol/L)组,不同剂量的尿石素A给药作用24 h后,收集细胞用于检测分析,重复实验3次。

2.4 尿石素A诱导MCF-7细胞凋亡的作用研究

MCF-7细胞按“2.3”项方法进行分组给药,采用细胞凋亡染色试剂盒进行染色,荧光显微镜下观察尿石素A诱导MCF-7细胞凋亡的作用。

2.5 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax mRNA表达的影响^[14]

MCF-7细胞按“2.3”项中方法进行分组给药,加入1 mL Trizol试剂,充分混合后,提取细胞总RNA,室温条件下根据逆转录试剂盒说明书,配置20 μ L的逆转录体系,加入总RNA,37 $^{\circ}$ C水浴箱孵育30 min,将总RNA逆转录为cDNA。根据荧光定量PCR试剂盒说明书,配置50 μ L的荧光定量PCR反应体系,加入cDNA和引物(引物序列见表1)模板,置于Applied Biosystems PCR仪进行反应,设置条件按照说明书。统计并记录个样本C_t值,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

表1 引物序列

Table 1 primer sequences

基因	引物序列
β -actin	正向: 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'
	反向: 5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'
c-Myc	正向: 5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'
	反向: 5'-GTGTGTTTCGCCTCTTGACATT-3'
Cyclin D1	正向: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
	反向: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
Bcl-2	正向: 5'-GTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3'
	反向: 5'-AGAAATCAAACAGAGGCCGCA-3'
Bax	正向: 5'-AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAG-3'
	反向: 5'-CAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'

的方法计算目的基因的相对表达量。

2.6 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

MCF-7细胞按“2.3”项方法进行分组给药,加入1 mL RIPA细胞裂解液,各组细胞在冰上裂解30 min,收集入1.5 mL的离心管中,在预冷4 °C的离心机中5 000 r/min离心5 min后提取上清,经95 °C煮沸后,收集蛋白备用。按照说明书制备浓缩胶10 mL,分离胶20 mL。上样后电泳分离,转膜后加入c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax等一抗在4 °C条件下孵育过夜,次日用PBST稀释液洗膜,重复3次,加用山羊抗小鼠IgG二抗,用PBST稀释液洗膜,重复3次,而后用DAB显影液处理样本。Image J软件分

析蛋白条带灰度值。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0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 尿石素A给药浓度筛选

结果如图1所示,随着尿石素A给药浓度增大,作用时间增长,MCF-7细胞存活率依次降低,当尿石素A浓度为60 $\mu\text{mol/L}$,作用24、36、48 h,MCF-7细胞存活率均低于80%,表明尿石素A对MCF-7细胞增殖具有抑制作用。综上所述,选择20、40 $\mu\text{mol/L}$,作用24 h作为尿石素A的给药条件,对MCF-7细胞无显著毒性。

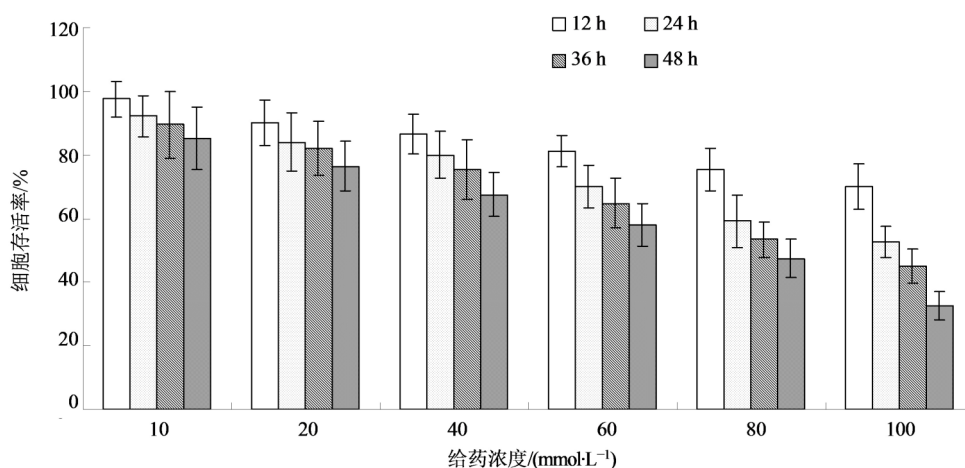


图1 尿石素A对SGC-7901细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of urostonin a on survival rate of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 尿石素A诱导MCF-7细胞凋亡的作用研究

MCF-7细胞经过20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用24 h后,采用细胞凋亡染色试剂盒进行染色,荧光显微镜下观察尿石素A诱导MCF-7细胞凋亡的作用,结果如图2所示,与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用24 h后,MCF-7细胞大量出现凋亡,表明尿石素A具有诱导MCF-7细胞凋亡的作用。

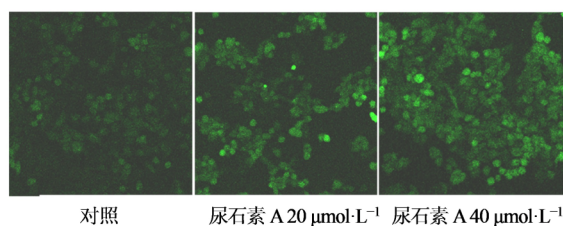


图2 尿石素A诱导MCF-7细胞凋亡

Fig. 2 Apoptosis of MCF-7 cells induced by urostonin A

3.3 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax mRNA表达的影响

MCF-7细胞经20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用24 h后提取RNA,检测c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax mRNA的表达水平,结果如表2所示。与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用后均能够显著降低c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2 mRNA的表达水平($P < 0.05, 0.01$),显著升高Bax mRNA表达水平($P < 0.01$)。

3.4 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

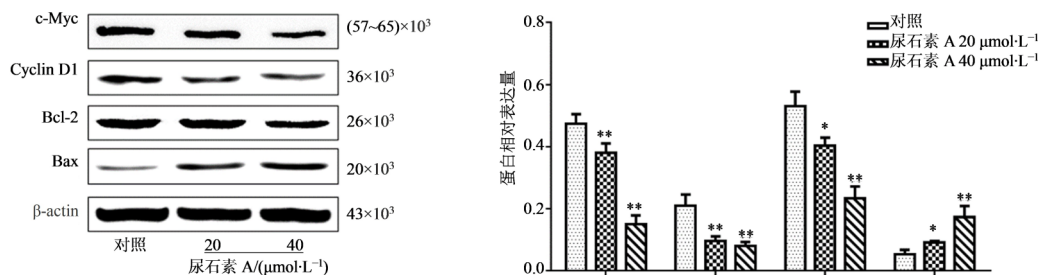
如图3所示,与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用后均能够显著降低c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2蛋白的表达水平($P < 0.01$),升高Bax的蛋白表达水平($P < 0.01$)。结果表明,尿石素A能够通过抑制c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2蛋白表达,升高Bax蛋

表2 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Effect of urostonin A on mRNA expression of c-myc, cyclin D1, Bcl-2 and Bax ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	c-Myc/ β -actin	Cyclin D1/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
对照	—	5.5 $\pm$ 0.75	8.3 $\pm$ 1.64	12.6 $\pm$ 1.89	1.5 $\pm$ 0.05
尿石素A	20	4.2 $\pm$ 0.82*	5.2 $\pm$ 1.02**	8.4 $\pm$ 2.61*	3.2 $\pm$ 0.92**
	40	2.4 $\pm$ 0.57**	3.0 $\pm$ 0.67**	6.0 $\pm$ 1.24**	4.0 $\pm$ 0.61**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图3 尿石素A对c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of urostonin a on the expression of c-myc, cyclin D1, Bcl-2 and Bax ($\bar{x} \pm s, n=3$)

白表达,抑制MCF-7细胞增殖并诱导其凋亡。

4 讨论

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤,发病率为41.64/10万,严重威胁人类健康^[15-17]。现有常规乳腺癌化疗药物选择性差、毒副作用明显,因此寻找新的抗乳腺癌药物仍是乳腺癌防治研究的重要方向。近年来随着分子生物学技术的发展,研究调节肿瘤凋亡及增殖相关靶点成为了预防和治疗恶性肿瘤的新思路。越来越多的研究证实,原癌基因c-Myc及Cyclin D1经常在乳腺癌中过表达或激活,对于乳腺癌增殖具有重要促进作用^[18-20]。c-Myc及Cyclin D1等增殖相关蛋白在多种恶性肿瘤的发生发展中发挥着重要的生物学功能,参与细胞分化、增殖、代谢、凋亡、信号传导、免疫等重要功能^[21-22]。Bcl-2是细胞凋亡中最重要的癌基因之一,具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用^[23-24]。Bax是人体最重要的凋亡基因,是Bcl-2基因家族中细胞凋亡促进基因,Bax的过度表达可拮抗Bcl-2的保护效应而使细胞趋于死亡^[25]。

尿石素A是富含鞣花鞣质的植物经哺乳动物胃肠道菌群的作用代谢生成的一种代谢产物,属于香豆素类物质。研究表明,尿石素A具有显著的抗肿瘤活性,对肝癌、结肠癌、胃癌等多种恶性肿瘤均具有抑制作用。本实验在体外以乳腺癌细胞MCF-7作为研究对象,考察尿石素A抑制MCF-7细胞增

殖并诱导其凋亡的作用。研究结果表明,不同浓度尿石素A对MCF-7细胞增殖均具有一定的抑制作用且呈剂量时间相关性;20、40 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A给药作用后能够显著诱导MCF-7细胞凋亡,降低c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2蛋白及mRNA的表达水平,升高Bax蛋白及mRNA的表达水平。

尿石素A具有抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖并诱导其凋亡的作用,其作用机制可能与抑制c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2等基因的表达,升高Bax基因的表达水平有关,对于防治乳腺癌具有一定的药用潜能。

参考文献

- [1] Jung B F, Ahrendt G M, Oaklander A L, et al. Neuropathic pain following breast cancer surgery: proposed classification and research update [J]. Pain, 2003, 104(1/2): 1-13.
- [2] Turner N C, Neven P, Loibl S, et al. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389(10087): 2403-2414.
- [3] 郑曼俐, 马金柱. 乳腺癌靶向药物的研究及临床应用进展 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(3): 325-329.
- [4] 杜华, 潘发明, 丁萍, 等. 乳腺癌术后患者性功能障碍的研究进展 [J]. 护理学杂志, 2019, 34(6): 106-110.
- [5] 师弘, 王伟, 贺新, 等. 多原发乳腺癌的临床流行病学特征——82例患者的回顾性研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(20): 3307-3310.

- [6] 杜沛玲, 方佳英, 贾潇岳, 等. 1994~2013年中国女性乳腺癌流行病学特征 [J]. 汕头大学医学院学报, 2016, 29(2): 124-126.
- [7] 陈玲玲, 韩涛, 刘兆喆, 等. 中药提取物治疗乳腺癌的研究进展 [J]. 中国临床实用医学, 2018, 9(2): 74-77.
- [8] 尹培培, 闫林林, 曹若愚, 等. 鞣花酸代谢产物——尿石素的研究进展 [J]. 食品科学, 2015, 36(7): 256-260.
- [9] Moukayed M, Grant W B. The roles of UVB and vitamin D in reducing risk of cancer incidence and mortality: A review of the epidemiology, clinical trials, and mechanisms [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, 18(2): 167-182.
- [10] Sanchez-Gonzalez C, Ciudad C J, Izquierdo-Pulido M, et al. Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells [J]. Eur J Nutr, 2016, 55(3): 1099-1112.
- [11] González-Sarriás A 1, Tomé-Carneiro J, Bellesia A, et al. The ellagic acid-derived gut microbilta metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells [J]. Food Funct, 2015, 6(5):1460-1469.
- [12] Ryu D, Mouchiroud L, Andreux P A, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents [J]. Nat Med, 2016, 22(8): 879-888.
- [13] 张聪, 盛磊, 杨恬, 等. 尿石素A通过AKT/SREBP-1c/FASN信号通路调节肝癌细胞Huh-7脂代谢的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 891-898.
- [14] 吕金锋, 裴继花, 王晓明, 等. 丹蒽醌对乳腺癌细胞MCF-7增殖及侵袭转移的抑制作用及其作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(10): 1950-1954
- [15] Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(S3): 43-46.
- [16] 马丹丹, 刘坤, 齐晓伟. 2018年全球癌症统计:乳腺癌发病和死亡人数统计 [J]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2018, 12(6): 375.
- [17] Kok J L, Teepen J C, van der Pal H J, et al. Incidence of and risk factors for histologically confirmed solid benign tumors among long-term survivors of childhood cancer [J]. JAMA Oncol, 2019, 5(5): 671-680.
- [18] Camarda R, Zhou A Y, Kohnz R A, et al. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer [J]. Nat Med, 2016, 22(4): 427-432.
- [19] Xu J, Chen Y, Huo D, et al. beta-catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells [J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5): 431-439.
- [20] Burandt E, Grunert M, Lebeau A, et al. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer [J]. Breast Cancer, 2016, 23(1): 111-119.
- [21] Qie S, Diehl J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(12): 1313-1326.
- [22] Zhang E, Li W, Yin D, et al. c-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 4007-4015.
- [23] Delbridge A R, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109.
- [24] Adams J M, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 27-36.
- [25] Liu Z, Ding Y, Ye N, et al. Direct activation of Bax protein for cancer therapy [J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 313-341.