

蓝萼甲素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及细胞周期的影响

鲍 刚, 吴沁航*, 高芙蓉, 潘 扬, 王小龙*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘 要:目的 研究蓝萼甲素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及细胞周期的影响及其作用机制。方法 采用 MTT 法检测蓝萼甲素对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测细胞周期; Western blotting 法检测细胞中 cyclin B1、cyclin D1、细胞周期素依赖激酶 2 (CDK2)、CDK4、p53、p21、p27、组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (LSD1)、组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸二甲基化 (H3K4me2)、组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸二甲基化 (H3K9me2) 蛋白表达水平。结果 蓝萼甲素能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 呈剂量和时间依赖性; 提高 G₂/M 期细胞比例; 上调 p53、p21、p27、H3K4me2、H3K9me2 蛋白表达水平, 下调 cyclin B1、cyclin D1、CDK2、CDK4、LSD1 蛋白表达水平。结论 蓝萼甲素抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 阻滞 MDA-MB-231 细胞周期于 G₂/M 期, 其机制可能与激活 p53 的表达及调控组蛋白的甲基化作用有关。

关键词: 蓝萼甲素; 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 细胞周期; p53; 组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)06-1419-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.024

Effect of glaucocalyxin A on proliferation and cell cycle of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells

BAO Gang, WU Qin-hang, GAO Fu-rong, PAN Yang, WANG Xiao-long

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of glaucocalyxin A on proliferation and cell cycle of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods** The proliferation inhibition rates of MDA-MB-231 cells were measured by MTT assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry, and the expression of the protein cyclin B1, cyclin D1, CDK2, CDK4, p53, p21, p27, LSD1, H3K4me2, and H3K9me2 was detected by Western blotting. **Results** Growth of MDA-MB-231 cells was significantly inhibited by glaucocalyxin A in a dose-dependent and time-dependent manner. Flow cytometric analysis indicated that the percentage of MDA-MB-231 cells at G₂/M phase was increased significantly. As the results of Western blotting, the protein expression levels of p53, p21, p27, H3K4me2, and H3K9me2 in MDA-MB-231 cells were increased, while that of cyclin B1, cyclin D1, CDK2, CDK4, and LSD1 were decreased after treated with glaucocalyxin A. **Conclusion** Glaucocalyxin A could inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells and induce cell cycle arrest at the G₂/M phase, and the mechanism may be related to the activation of p53 protein expression and the regulation of histone methylation.

Key words: glaucocalyxin A; triple-negative breast cancer; MDA-MB-231 cells; cell cycle; p53; LSD1

乳腺癌的发病率居我国城市女性恶性肿瘤第 1 位, 是一种严重威胁妇女身心健康的疾病^[1]。三阴性乳腺癌是乳腺癌的一种特殊亚型, 是指雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor-2, Her-2) 表达均为

阴性的乳腺癌^[2-3]。三阴性乳腺癌具有侵袭早、易转移和预后差等特点, 由于其异质性强, 有效作用靶点不明确, 是乳腺癌中死亡率最高的一种亚型, 因此探索其发生的分子机制、寻找新的治疗药物具有重要的意义^[4-5]。蓝萼甲素 (glaucocalyxin A, GLA) 是蓝萼香菜二萜类化合物的主要活性成分, 具有抗

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省高校自然科学面上项目 (16KJB150033)

作者简介: 鲍 刚 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物化学研究。E-mail: baogang04080233@aliyun.com

*通信作者 吴沁航 (1981—), 女, 博士, 讲师, 从事中药抗肿瘤研究。E-mail: wuqinhang@163.com

王小龙 (1977—), 男, 博士, 教授, 从事药物化学研究。E-mail: x.greg.wang@gmail.com

凝血、抑菌和抗肿瘤活性^[6]。本实验以三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为模型,考察蓝萼甲素对细胞增殖和细胞周期的影响,探讨其抗乳腺癌的作用机制,为蓝萼甲素的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

MDA-MB-231 细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC),由实验室冻存保藏。

1.2 药物及试剂

蓝萼甲素(质量分数 98.58%,批号 DST180702-075,成都德思特生物技术有限公司);DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶溶液、青霉素-链霉素溶液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(FBS, Capricorn Scientific 公司);MTT 试剂盒(美国 Sigma 公司);细胞裂解液(Bio-sharp 公司);细胞周期检测试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司);GAPDH、Cyclin B1、Cyclin D1、细胞周期素依赖激酶 2(CDK2)、CDK4 抗体(美国 CST 公司);组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸二甲基化(H3K4me2),组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸二甲基化(H3K9me2),组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶(1LSD1),p21、p27、p53 抗体(英国 Abcam 公司);蛋白预染 Marker、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 检测试剂盒(美国 Thermo 公司)。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Spectra MAX190 型酶标仪(美国 MD 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Cellometer Auto T4 型细胞计数仪(美国 Nexcelom 公司);HERAcell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);PowerPacTM Basic 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);NIM2045 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);Direct-Q 超纯水系统(美国 MilliPORE 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-231 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 高糖培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞的增殖活性

MDA-MB-231 细胞以 3×10^5 个/mL 接种 96 孔板,每孔 100 μ L,细胞贴壁后,吸去培养液,分别

加入 0、1、2、4、8、16 μ mol/L 的 GLA 作用细胞 24、48、72 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,37 °C 孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μ L 二甲亚砜,振荡 15 min,酶标仪 570 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。每个浓度设 5 个复孔,实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 流式细胞仪检测细胞周期

MDA-MB-231 细胞经胰酶消化后,以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板,设对照组和 GLA 各浓度组,细胞贴壁后分别加入 0、2、4、8 μ mol/L 的 GLA 作用细胞 48 h,1 000 r/min 离心 5 min,4 °C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞,加入预冷的无水乙醇轻轻混匀细胞,4 °C 固定过夜,预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞,离心后加入 0.5 mL 含 RNase A 的 PI 染色液重悬细胞,37 °C 避光温浴 30 min,流式细胞仪检测。

2.4 Western blotting 检测细胞相关蛋白表达

MDA-MB-231 细胞以 4×10^6 个/孔接种于 6 孔板,设对照组和 GLA 各浓度组,分别加入 0、2、4、8 μ mol/L 的 GLA 处理细胞 48 h,离心收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质质量浓度。蛋白样品经 12% SDS-PAGE 电泳,湿法转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,封闭液稀释一抗(1:1 000),4 °C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,封闭液稀释二抗(1:5 000),室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次,ECL 发光试剂盒显色,Image J 分析蛋白条带。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析,两组间分析使用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析。

3 结果

3.1 GLA 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

不同浓度的 GLA (1、2、4、8、16 μ mol/L) 作用于 MDA-MB-231 细胞,检测 24、48、72 h 的细胞增殖抑制率,MTT 结果显示,随着 GLA 浓度的升高和时间的延长,细胞增殖抑制率逐渐上升,24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 8.014、5.481、4.603 μ mol/L,见图 1。

3.2 GLA 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,不同浓度的 GLA (2、4、8 μ mol/L) 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可导致细胞周期异常。与对照组比较,GLA 各浓度

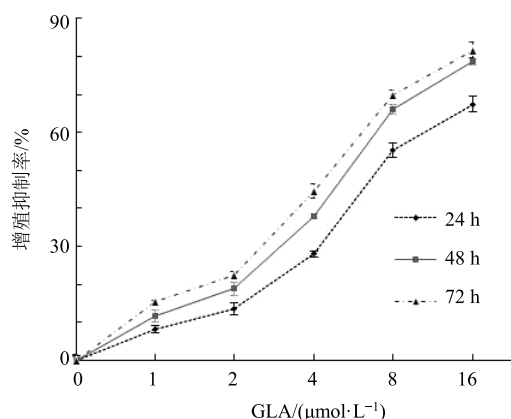


图 1 蓝萼甲素对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibitory effect of GLA on proliferation of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

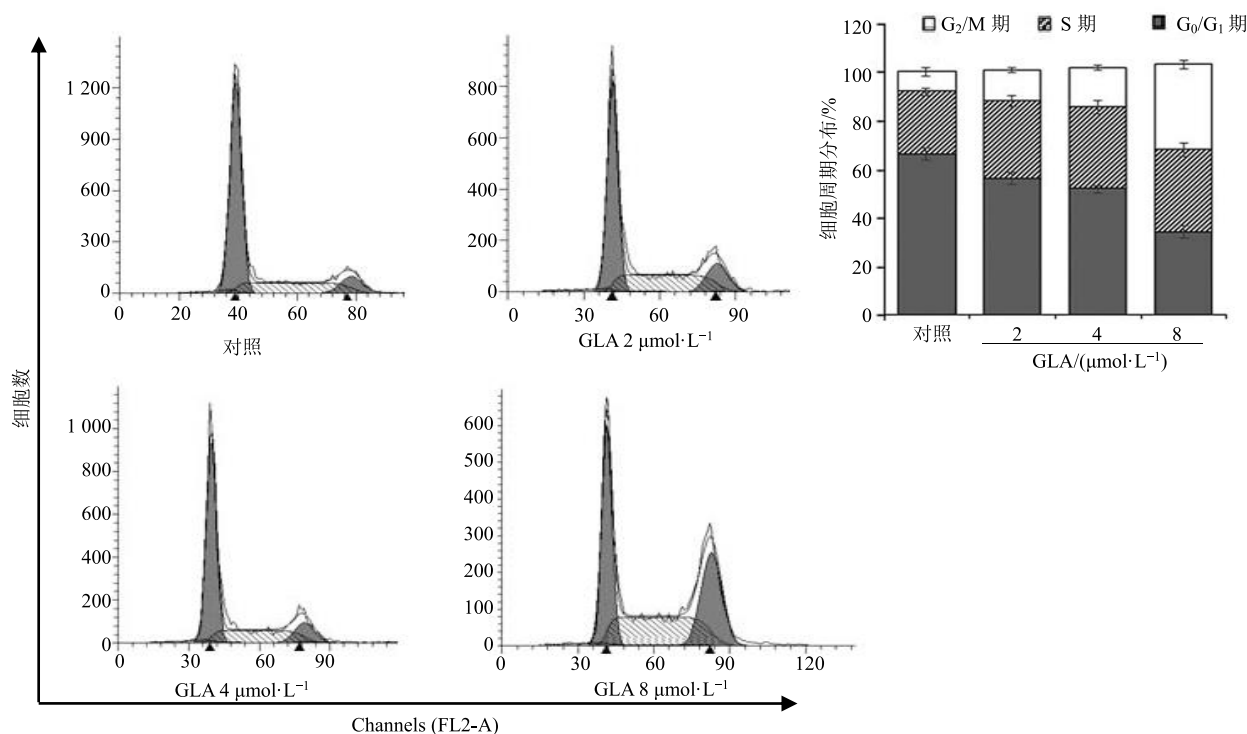


图 2 GLA 对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of GLA on distribution of MDA-MB-231 cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

白表达水平降低, H3K4me2 和 H3K9me2 蛋白表达水平升高, 且呈浓度依赖性, 其中 GLA 4、8 μmol/L 组差异显著 ($P < 0.05$), 见图 4。

4 讨论

细胞周期的顺利进行受到严格的调控, 当其失控就会导致肿瘤的产生和增殖^[7]。本实验结果发现 GLA 作用 MDA-MB-231 细胞后, G₀/G₁ 期细胞比例下降, G₂/M 期细胞比例增加, 细胞不能进入有丝分

裂期, 细胞增殖活力下降。CDK 和 cyclin 通过协同作用调控细胞周期, 而 cyclin-CDK 复合物及其调控因子 p21、p27、p53 与肿瘤的发生发展密切相关^[8-9]。

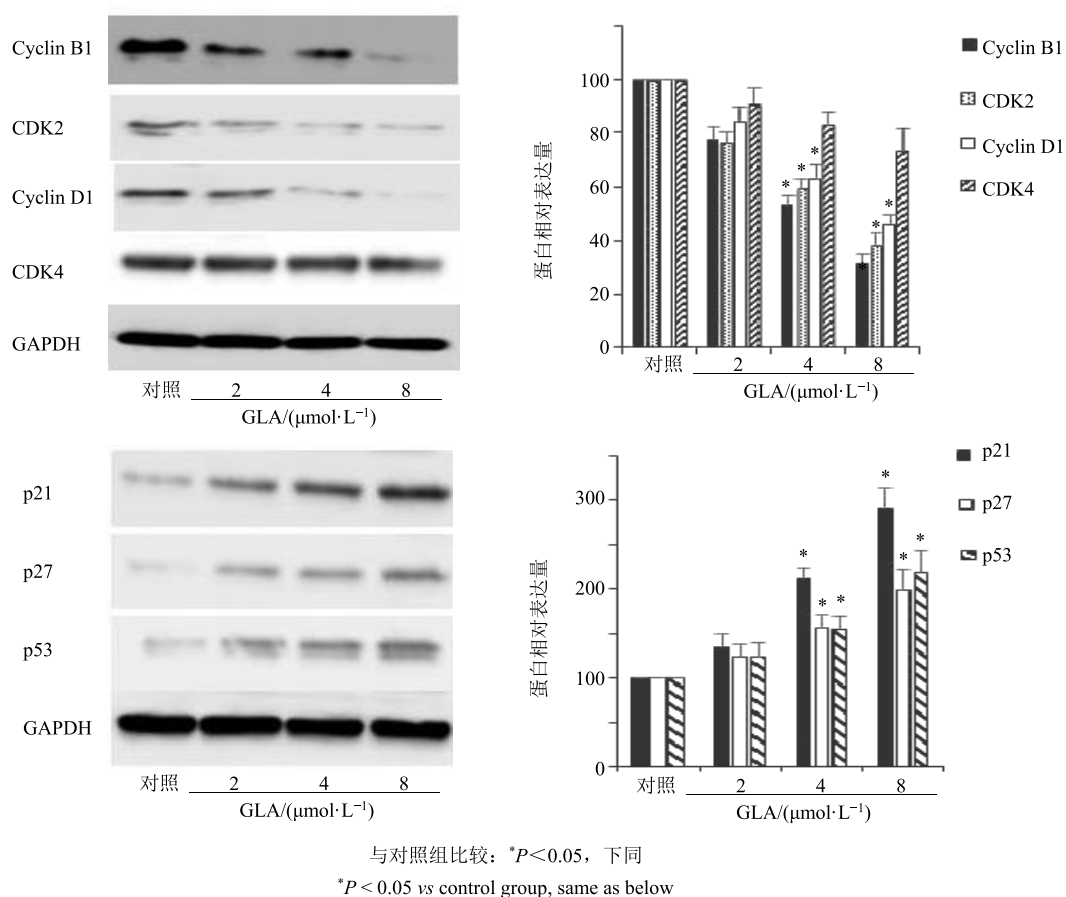
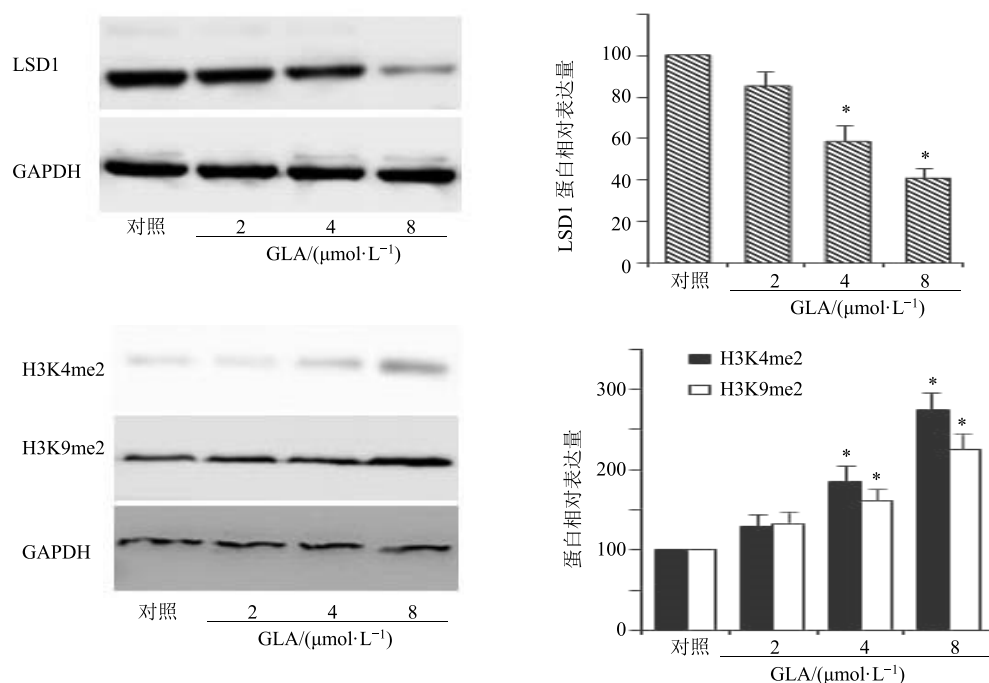
3.3 GLA 对细胞周期蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 随着 GLA 浓度的增加, MDA-MB-231 细胞内 Cyclin B1、Cyclin D1、CDK2、CDK4 蛋白表达水平降低, p21、p27、p53 蛋白表达水平升高, 且呈浓度依赖性。其中 GLA 4、8 μmol/L 组差异显著 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.4 GLA 对 MDA-MB-231 细胞组蛋白甲基化的影响

Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 随着 GLA 浓度增加, MDA-MB-231 细胞中 LSD1 蛋

白表达水平降低, H3K4me2 和 H3K9me2 蛋白表达水平升高, 且呈浓度依赖性, 其中 GLA 4、8 μmol/L 组差异显著 ($P < 0.05$), 见图 4。

图 3 蓝萼甲素对 MDA-MB-231 细胞周期蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of GLA on cyclin proteins expression in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 蓝萼甲素对 MDA-MB-231 细胞组蛋白甲基化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of GLA on histone methylation in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

G₂/M 期,在多种肿瘤细胞中异常表达,而 Cyclin D1 蛋白与三阴性乳腺癌的临床病理参数、淋巴结转移具有密切的相关性^[12-13]。本实验结果显示, GLA 可剂量依赖性升高 p21、p27、p53 的表达,降低 Cyclin B1、Cyclin D1、CDK2、CDK4 的表达。表明 GLA 可激活 p53,促进 p21、p27 蛋白的表达,抑制细胞周期蛋白复合物 Cyclin B1/CDK2 和 Cyclin D1/CDK4 的形成,使 MDA-MB-231 细胞阻滞于 G₂/M 期。

近年来,表观遗传学与肿瘤的关系越来越受到关注,在细胞周期进程中,组蛋白甲基化异常可使相应染色质结构发生变化,从而影响细胞周期,使细胞增殖失控,导致肿瘤的产生^[14-15]。研究发现, LSD1 在多种肿瘤组织中均有高表达,如肝癌、乳腺癌、前列腺癌等^[16]。LSD1 通过介导组蛋白 H3 第 4 位和第 9 位赖氨酸去甲基化,影响基因的转录调节^[17]。李航等^[18]发现 LSD1 在 ER 阴性乳腺癌组织中的表达高于 ER 阳性乳腺癌和正常乳腺组织,其阳性表达是乳腺癌预后不良的标志之一,有望成为三阴性乳腺癌分子靶向治疗的新靶点。本实验初步研究了 GLA 对 MDA-MB-231 细胞组蛋白甲基化作用的影响,结果显示, GLA 可显著抑制 LSD1 的表达,进而上调组蛋白 H3K4 和 H3K9 的二甲基化水平,其可能通过抑制后期起始复合物(APC)的活化,阻止细胞进入有丝分裂期,导致 G₂/M 期细胞增加,具体分子机制还有待进一步研究。

综上所述, GLA 可有效抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖,并通过 p53 途径及调控组蛋白甲基化作用,阻滞 MDA-MB-231 细胞周期于 G₂/M 期,可多途径、多靶点发挥抗乳腺癌作用,作为抗乳腺癌潜在药物具有独特的优势。

参考文献

- [1] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134-1150.
- [2] Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer-current status and future directions [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(12): 1913-1927.
- [3] 李甜,周钱梅,张卫红. 益气扶正复方联合依维莫司对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 的增殖抑制作用及其对 Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(1): 37-43.
- [4] 李盛建,王莹,王强利. 月腺大戟素 A 抗乳腺癌活性 [J]. *第二军医大学学报*, 2018, 39(7): 765-769.
- [5] O'Reilly E A, Gubbins L, Sharma S, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC) [J]. *BBA Clin*, 2015, doi: 10.1016/j.bbacli.2015.03.003.
- [6] 迟晴晴,王强,钟延强,等. 蓝萼甲素的药理活性及其机制和毒理作用的研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 34(2): 124-128.
- [7] Po L S, Chen Z Y, Tsang D S, et al. Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 187(12): 33-40.
- [8] 李娟,胡永华. 葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1535-1537.
- [9] Liu Z, Liu H, Yuan X, et al. Downregulation of Pim-2 induces cell cycle arrest in the G₀/G₁ phase via the p53-non-dependent p21 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4079-4086.
- [10] Zheng R, Liu Y, Zhang X, et al. miRNA-200C enhances radiosensitivity of esophageal cancer by cell cycle arrest and targeting p21 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.006.
- [11] Luo Y, Chen X, Luo L, et al. [6]-Gingerol enhances the radiosensitivity of gastric cancer via G₂/M phase arrest and apoptosis induction [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2252-2260.
- [12] 赵春玲,宋咏梅,樊飞跃,等. 细胞周期蛋白 cyclin B1 与肿瘤 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(4): 322-326.
- [13] 葛亚楠,朱欢欢,韩涛,等. 细胞周期蛋白在三阴型和激素依赖型乳腺癌中的差异表达及临床意义 [J]. *解放军医药杂志*, 2016, 28(6): 27-32.
- [14] 马英玉. LSD1 及与肿瘤关系研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(9): 599-603.
- [15] Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 436-439.
- [16] Yokoyama A, Igarashi K, Sato T, et al. Identification of myelin transcription factor 1 (MyT1) as a subunit of the neural cell type-specific lysine-specific demethylase 1 (LSD1) complex [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(26): 18152-18162.
- [17] Laurent B, Ruitu L, Murn J, et al. A specific LSD1/KDM1A isoform regulates neuronal differentiation through H3K9 demethylation [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(6): 957-970.
- [18] 李航,张劲帆,陈宇,等. LSD1 在乳腺癌中的表达及意义 [J]. *莆田学院学报*, 2016, 23(5): 27-30.