

补骨脂酚诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞 S 期周期阻滞及机制研究

张哲楠^{1,2}, 邱琬婷³, 曹世杰^{1*}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

3. 南开中学, 天津 300100

摘要: 目的 研究补骨脂酚对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长抑制作用及其机制。方法 采用噻唑蓝法 (MTT 法) 考察补骨脂酚对 MCF-7 细胞生长的影响; 采用流式细胞术检测补骨脂酚处理后细胞周期分布情况及活性氧 (ROS) 的产生; 利用荧光显微镜观察补骨脂酚对 MCF-7 细胞核的影响; 采用蛋白免疫印迹法检测补骨脂酚作用下 MCF-7 细胞凋亡、周期相关蛋白和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族蛋白的表达; 引入 ROS 清除剂及 MAPK 家族蛋白抑制剂考察其在补骨脂酚作用下对 MCF-7 细胞生长抑制率和细胞周期相关蛋白表达的影响。结果 补骨脂酚可以呈时间、剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞生长, 其抑制作用明显强于阳性药 5-氟尿嘧啶。补骨脂酚可诱导 MCF-7 细胞产生 ROS, 同时上调 p-p53 及 p21 蛋白表达水平, 下调细胞周期相关蛋白 CDK2 和 CyclinA2 表达水平, 进而引起细胞发生 S 期阻滞。而上述影响可被 ROS 清除剂 Tiron 逆转, 表明 ROS 参与补骨脂酚诱导的 S 期阻滞。加入 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后, 细胞产生的 ROS 水平降低, 表明 ROS 的产生依赖于 p38MAPK 途径。结论 补骨脂酚抑制 MCF-7 细胞增殖的作用与其引起细胞发生 S 期阻滞有关, ROS 参与 S 期阻滞过程。

关键词: 补骨脂酚; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; S 期阻滞; 丝裂原活化蛋白激酶; 活性氧

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0702-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.021

Effects and mechanism of bakuchiol-induced S-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells

ZHANG Zhe-nan^{1,2}, QIU Wan-ting³, CAO Shi-jie¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Faculty of Life Sciences and Biological Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. Nankai High School, Tianjin 300100, China

Abstract: Objective To investigate the cell growth inhibitory effect and molecular mechanism of bakuchiol against human breast cancer MCF-7 cells. **Methods** The growth inhibitory effect of bakuchiol on MCF-7 cells was tested by MTT assay. Flow cytometry was used to investigate the distribution of cell cycle and ROS generation. Fluorescence microscope was used to observe the change of cell nucleus. Western blotting was used to detect the expression of the protein related to cell cycle and MAPK family. The ROS scavenger and inhibitors of MAPK family were introduced to investigate the effect on the growth inhibitory rate and the levels of cell cycle related protein by bakuchiol. **Results** Bakuchiol inhibited the cell growth on the MCF-7 cells in dose- and time-dependent manner, which showed stronger effect than that of 5-fluorouracil. Furthermore, bakuchiol induced S-phase arrest in MCF-7 cells via ROS generation. The production of ROS up-regulated p-p53 and p21 expression, and then decreased CDK2 and CyclinA2. The changes of bakuchiol on these proteins could be reversed by the ROS scavenger Trion, indicating that ROS was associated with bakuchiol-induced S-phase arrest. In addition, pretreatment with p38MAPK inhibitor SB203580 decreased bakuchiol-caused ROS generation, suggesting that the production of ROS was dependent on p38MAPK pathway. **Conclusion** The proliferation inhibitory effect of bakuchiol on MCF-7 cells is related with S-phase cell cycle arrest, and ROS plays a role in the bakuchiol-induced S-phase arrest.

Key words: bakuchiol; human breast cancer MCF-7 cells; S-phase arrest; MAPK; ROS

收稿日期: 2019-09-04

作者简介: 张哲楠 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为中药活性成分抗肿瘤。E-mail: zhangzhenan@3sbio.com

*通信作者 曹世杰, 女, 博士, 助理研究员。E-mail: caoshijie@tjutc.edu.cn

乳腺癌是女性最为常见的恶性肿瘤，是全球女性癌症死亡的主要原因之一，其发病率占所有癌症病例的 23%，死亡率达 14%^[1]。近年来我国乳腺癌发病率及死亡率呈明显上升趋势，在女性生殖系统恶性肿瘤死因中，乳腺癌已从第 2 位升至第 1 位^[2]。

恶性肿瘤的发生发展变化十分复杂，但正气虚弱是恶性肿瘤发生发展的主要病因病机已被广泛认可。《诸病源候论》记载：“积聚者，由阴阳不和，脏腑虚弱，受于风邪，搏于脏腑之气所为也”。《医宗必读》云：“积之成也，正气不足而后邪气踞之”。《外证汇编》云：“正气虚则成岩”。可见，正气虚弱是肿瘤发生的根本原因之一^[3]，故扶正固本是恶性肿瘤的基本治则，扶正类中药常被用来改善患者体质，达到“扶正即祛邪”的效果，起到抗肿瘤作用^[4]。

补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 作为传统中药，最早记载于《开宝本草》，属扶正类中药，具有温肾助阳、固精缩尿、温脾止泻、纳气平喘之功效，临床应用广泛。现代研究证实，补骨脂具有抗肿瘤、抗菌、抗疟疾、抗抑郁及增强免疫力等多种活性^[5]。补骨脂酚 (bakuchiol, BAK) 是从补骨脂种子中分离得到的一种异戊二烯酚萜类化合物。据报道，BAK 在体内、外对于肺癌、前列腺癌、口腔癌等肿瘤细胞均具有明显的生长抑制作用^[6-8]。陈红莉等^[9]研究发现 BAK 可以明显抑制人乳腺癌 T-47D 及 MDA-MB-231 细胞增殖，但机制不明确。目前对于 BAK 抗乳腺癌的作用机制研究较少。本研究通过考察 BAK 对于人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响，初步揭示 BAK 在体外抗乳腺癌作用相关机制，为其进一步的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

MCF-7 细胞来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

BAK 由天津中医药大学高秀梅教授惠赠，经 HPLC 测定质量分数 >99.5%。BAK 无菌条件下溶解于二甲基亚砷 (DMSO) 中，-20 °C 冻存。药品使用时，用 DMEM 培养液稀释至所需浓度 (DMSO ≤ 0.05%)。

DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); TBD 胎牛血清 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 噻唑蓝 (MTT)、吖啶橙 (AO)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针、PD98059、SB203580、

SP600125、4,5-二羟基-1,3-苯二磺酸二钠盐 (Tiron, 美国 Sigma 公司); Caspase-3、p53、p-p53 (Ser15)、cdc2、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、Cyclin B1、Cyclin A2、周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、CDK4、JNK、p-JNK1/2/3 (Thr183/Thr185)、p38、p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、β-actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 5-氟尿嘧啶 (5-FU, 批号 100187-201203, 质量分数 ≥99.6%), 中国食品药品检定研究院。

1.3 仪器

CO₂ 恒温培养箱 (上海 Thermo 公司); 超净工作台 (苏州苏净集团安泰公司); 超纯水仪 (四川成都优普公司); 倒置显微镜 (Motic 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 电泳槽 (北京六一仪器厂); 转移槽、垂直电泳槽 (北京百晶生物技术有限公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 高速冷冻离心机 (上海 Heal Force 公司); 摇床 (金坛市新航仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 MCF-7 细胞接种在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 (含 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素)，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待贴壁细胞生长成致密单层时，进行传代培养。

2.2 MTT 实验

取处于对数生长期的 MCF-7 细胞，以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μL。于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h，分别加入 BAK 或 5-FU 10.7、16.0、24.0、36.0、54.0 μmol/L，或分别提前 1 h 加入不同的抑制剂，培养 12、24、36、48 h 后，弃去孔内培养液，每孔加入 100 μL 5 mg/mL MTT，继续孵育 2.5~3.0 h，弃去孔内液体，每孔加入 150 μL DMSO，酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (A) 值，并计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 AO 染色检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24 h 后，加入 30 μmol/L BAK，继续培养 48 h 后，细胞用 10 μg/mL AO 染色 30 min，荧光显微镜下观察细胞核的形态。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 25 mL 培

养瓶中, 密度为 5×10^5 个/mL。培养 24 h 后, 加入终浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 BAK 或提前 1 h 加入 $100 \mu\text{mol/L}$ Tiron, 分别作用 12、24、36、48 h。将药物处理后的细胞用 PBS 洗 1 次, 胰酶消化后, 合并 PBS 和消化液于离心管中, 离心弃尽上清, 加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 混悬细胞, 预冷的 70% 乙醇 -20°C 固定过夜, 1200 r/min 离心 10 min, 弃尽上清, 每份样品加入含 RNase 的 $50 \mu\text{L}$ 碘化丙啶 (PI, 1 mg/mL), 避光、冰浴 30 min 后, 用流式细胞仪检测, 每个样品计数 1×10^4 个细胞。

2.5 流式细胞仪检测活性氧 (ROS) 水平

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 将细胞密度调整至 3×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入终浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 BAK 分别作用 12、24、36、48 h, 或提前 1 h 加入 Tiron、SP600125 和 SB203580 作用 48 h。将药物处理后的细胞用 PBS 洗 1 次, 每孔加入 1 mL 用 DMEM 稀释的 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, 37°C 避光孵育 45 min, 收集细胞, 用 PBS 洗, 胰酶消化, 合并 PBS 与消化液于离心管, 离心弃尽上清后, 每个样品加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪检测, 每个样品计数 1×10^4 个细胞。

2.6 Western blotting 法检测蛋白表达

取对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 75 mL 培养瓶中, 培养 24 h 后, 换成新鲜的 DMEM 培养液, 同时加入 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 BAK 或提前 1 h 加入 Tiron, 继续培养 12、24、36、48 h。收集细胞, 冰浴裂解, 离心后取上清, 得细胞总蛋白, 加入 $5 \times$ 上样缓冲液, 混匀后沸水浴使蛋白变性。采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 上样, SDS-PAGE 电泳后, 100 V 恒压湿转 $2 \sim 3 \text{ h}$, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 2 h , 加入一抗 $\beta\text{-actin}$ ($1:3000$)、Caspase-3 ($1:200$)、p53 ($1:500$)、p-p53 ($1:500$)、p21 ($1:500$)、Cyclin A2 ($1:500$)、Cyclin B1 ($1:500$)、Cyclin D1 ($1:500$)、CDK2 ($1:500$)、CDK4 ($1:100$)、cdc2 ($1:500$)、JNK ($1:500$)、p-JNK ($1:200$)、p38 ($1:500$)、p-p38MAPK ($1:500$), 4°C 孵育过夜。PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 用 Tris-NaCl 洗 1 次, 10 min, 根据一抗的来源选择合适的辣根过氧化物酶标记的二抗 ($1:5000$), 室温孵育 2.5 h 。Tris-NaCl 洗 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光显色, X 射线胶片曝光。

2.7 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 进行统

计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 BAK 对 MCF-7 细胞增殖的影响

结果如图 1 所示, BAK 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用具有时间和剂量依赖性, 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 $30 \mu\text{mol/L}$ 。与 5-FU 相比, BAK 对 MCF-7 细胞具有更明显的增殖抑制作用。

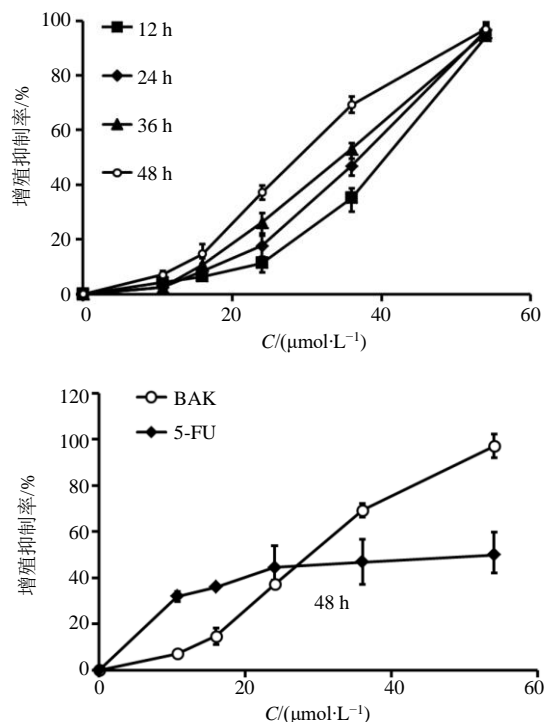


图 1 BAK 对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of BAK on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 BAK 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

为了证实 BAK 是否以诱导细胞凋亡的方式引起 MCF-7 细胞的增殖抑制, 采用 AO 荧光染色观察细胞核的形态变化。如图 2 所示, 未经过 BAK 处理的细胞核染色均匀, 细胞壁完整。BAK 处理后, 细胞核并没有发生凋亡应有的形态学特征, 如染色致密、形成凋亡小体等。

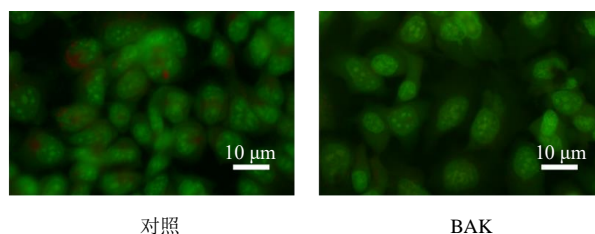


图 2 BAK 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of BAK on apoptosis of MCF-7 cells

3.3 BAK 对 MCF-7 细胞周期的影响

采用 PI 荧光染色结合流式细胞术, 分析 BAK 对 MCF-7 细胞周期的影响。如图 3 所示, 对照组 S 期细胞比例为 9.28%, 30 $\mu\text{mol/L}$ BAK 作用 12、24、36、48 h 后 S 期细胞比例分别升高至 10.84%、18.30%、19.30%、28.00%。当 100 $\mu\text{mol/L}$ ROS 清除剂 Tiron 预处理 1 h, BAK 作用 48 h 后, S 期细胞比例则降为 9.59%。以上结果表明, BAK 诱导的 MCF-7 细胞增殖抑制主要表现为 S 期阻滞, 且 ROS 在此过程中发挥促进作用。

3.4 BAK 对 MCF-7 细胞 ROS 产生的影响

为了研究 BAK 是否能诱导 MCF-7 细胞产生

ROS, 利用 DCFH-DA 荧光染色法测定细胞内 ROS 的生成量。如图 4-A 所示, BAK 作用细胞 0、12、24、36、48 h 后, 其 ROS 的生成量分别为 3.36%、46.20%、49.73%、56.67%、66.67%。特别是 BAK 作用细胞 12 h 时, ROS 的生成量明显升高, 且随着作用时间的延长逐渐增加。而 ROS 清除剂 Tiron 预处理 1 h 后, ROS 的生成量降低至 33.55%, 与 BAK 48 h 组比较显著降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明 BAK 可时间依赖性地诱导 MCF-7 细胞产生 ROS。

为了确定 ROS 在 BAK 诱导的 MCF-7 细胞增殖抑制中的作用, 引入了 ROS 的清除剂 Tiron 考察 BAK 对细胞增殖的影响。结果显示 (图 4-B), 单

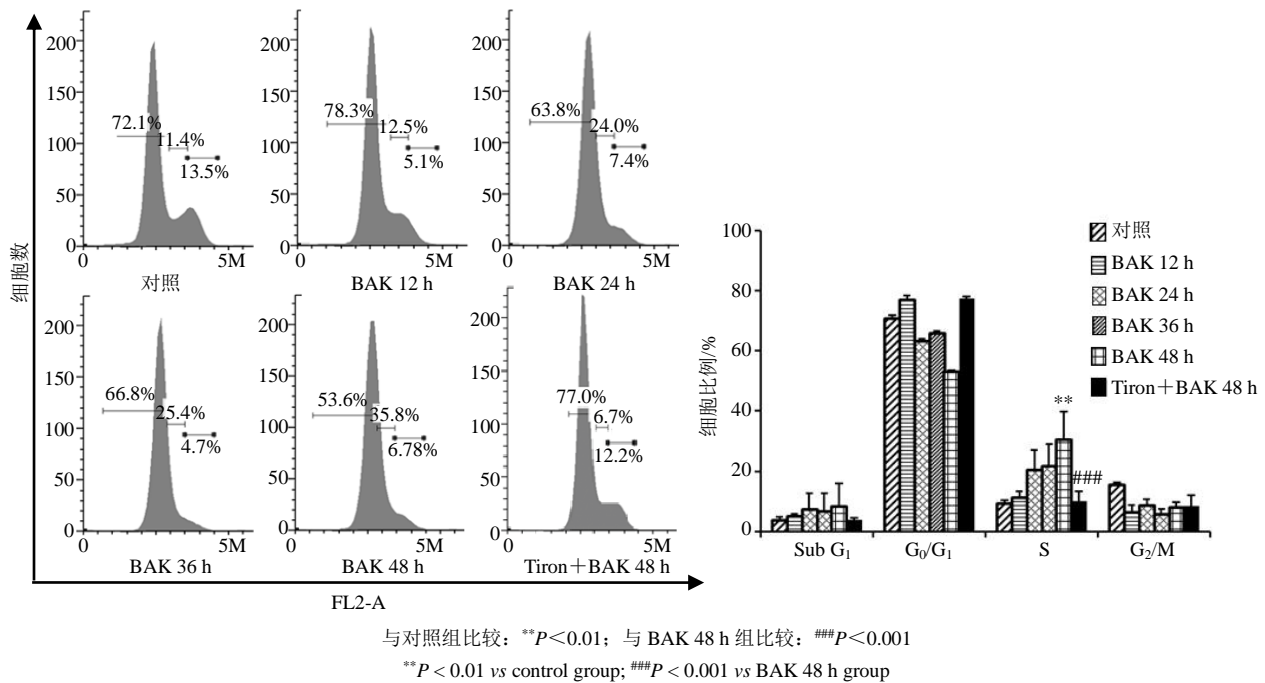
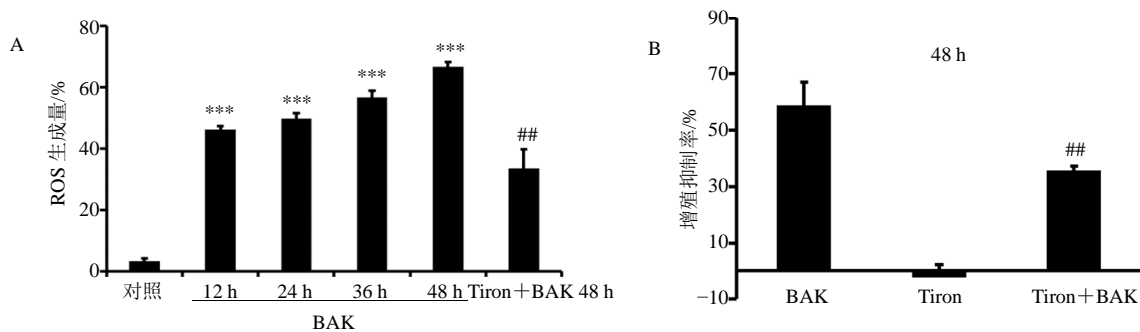


图 3 BAK 对 MCF-7 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of BAK on cell cycle distribution in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-流式细胞术检测 ROS 生成 B-MTT 法检测细胞增殖抑制率, 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 BAK 48 h 组比较: ## $P < 0.01$

A-ROS production detected by flow cytometry B-cell proliferation inhibition rate detected by MTT method, *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs BAK 48 h group

图 4 BAK 对 MCF-7 细胞 ROS 产生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of BAK on generation of ROS in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

独加入 30 $\mu\text{mol/L}$ BAK 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞增殖抑制率为 58.95%, 而提前加入 100 $\mu\text{mol/L}$ Tiron 作用 1 h, 再加入 30 $\mu\text{mol/L}$ BAK 共孵育 48 h, 增殖抑制率则降为 35.62% ($P < 0.01$)。综合上述实验结果表明 ROS 在 BAK 诱导的 MCF-7 细胞增殖抑制中发挥促进作用。

3.5 BAK 对 MCF-7 细胞 MAPKs 通路相关蛋白表达的影响

为了探究 BAK 是否通过 MAPKs 通路发挥其对 MCF-7 细胞生长抑制作用, 采用 MTT 法考察 MAPKs 通路抑制剂对 BAK 引起的 MCF-7 细胞生长抑制作用的影响。结果如图 5 所示, 单独加入 BAK 时, 细胞生长抑制率为 69.83%, 而分别加入 JNK 抑制剂 SP600125 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、p38 抑制剂 SB203580 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 ERK 抑制剂 PD98059 2 $\mu\text{mol/L}$ 共同作用细胞 48 h 后, 细胞生长抑制率分别为 50.66%、55.55%、67.95%。表明 SP600125 和 SB203580 可以显著逆转 BAK 诱导的 MCF-7 细胞增殖抑制, 而 PD98059 无影响, 提示 JNK 和 p38 参与 BAK 诱导

的 MCF-7 细胞增殖抑制过程。

同时, 采用 Western blotting 法检测了 p38、p-p38、JNK 和 p-JNK 蛋白表达情况。结果如图 6 所示, 随着 BAK 作用时间的增加, p38、JNK 蛋白

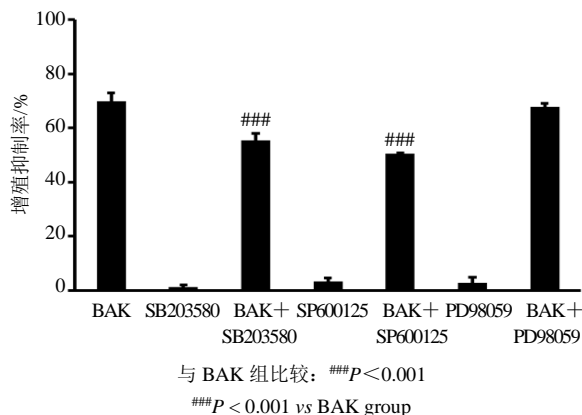
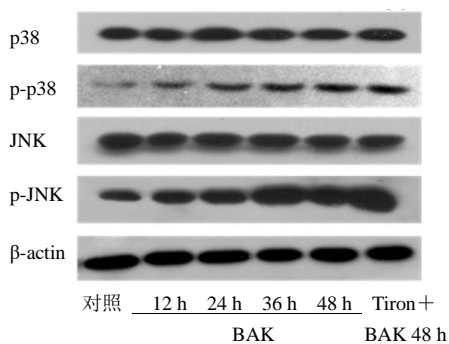


图 5 MAPKs 通路抑制剂对 BAK 引起的 MCF-7 细胞增殖抑制作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of MAPK pathway inhibitor on proliferation inhibition of MCF-7 cells induced by BAK ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

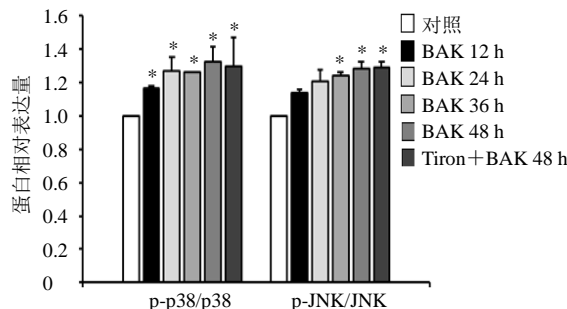
图 6 BAK 对 MCF-7 细胞 JNK、p38 MAPK 途径相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of BAK on expression of protein related with p38 MAPK and JNK pathways in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达水平没有明显变化, 活性形式的 p-JNK 和 p-p38 的表达水平逐渐升高, 且具有显著的时间依赖性, 而加入 ROS 清除剂 Tiron 后, p-JNK 和 p-p38 蛋白表达水平并没有下降。表明 BAK 通过 JNK 及 p38 途径发挥 MCF-7 细胞增殖抑制作用, 但 ROS 不参与 BAK 对 JNK 和 p38 的活化。

3.6 BAK 通过 p38 MAPK 通路对 MCF-7 细胞 ROS 产生的影响

为了研究 p38 MAPK 通路与 BAK 诱导的 MCF-7 细胞 ROS 产生之间的关系, 30 $\mu\text{mol/L}$



BAK 作用于 MCF-7 细胞 48 h, 或提前加入 0.25 $\mu\text{mol/L}$ SP600125、0.5 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 作用 1 h 后, 再加入 30 $\mu\text{mol/L}$ BAK 共孵育 48 h, 采用 DCFH-DA 荧光染色法检测细胞内 ROS 的生成量。如图 7 所示, 单加 BAK 时, ROS 的生成量为 44.93%, 而提前 1 h 加入 SB203580 时, ROS 生成量降为 35.97%, 差异显著 ($P < 0.05$)。而与 SP600125 共孵育时, ROS 生成量没有明显变化, 说明 BAK 通过 p38 MAPK 途径而非 JNK 途径诱导 MCF-7 细胞产生 ROS。

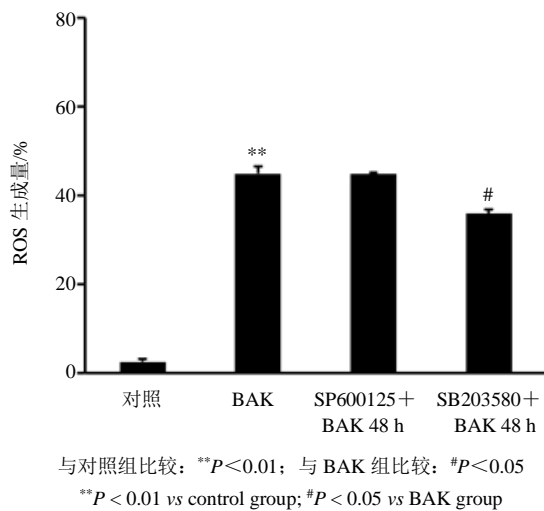


图 7 BAK 通过 p38 MAPK 通路对 MCF-7 细胞 ROS 产生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of BAK on MCF-7 cell ROS production through p38 MAPK pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 BAK 通过诱导 ROS 产生对 MCF-7 细胞周期蛋白表达的影响

如图 8 所示,随着 BAK 作用时间的延长,p-p53 及 p21 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$ 、 0.01),且呈时间依赖性,而加入 ROS 清除剂 Tiron 后表达水平降低 ($P < 0.01$)。结果表明,BAK 诱导细胞产生 ROS,进而上调 p53 蛋白表达量并使其活化,激活其下游靶蛋白 p21,使其表达水平升高。

进一步检测 S 期主要调节蛋白 CyclinA2 和 CDK2 的表达量及 G₀/G₁ 和 G₂/M 期相关蛋白表达水平。结果如图 8 所示,随着 BAK 作用时间的增加,CyclinA2 和 CDK2 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),且呈时间依赖性,而加入 ROS 清除剂 Tiron 后,CyclinA2 和 CDK2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。而 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期相关蛋白表达量均没有明显变化。结果表明,BAK 可通过诱导 ROS 的产生下调 S 期相关调节蛋白 CyclinA2 和 CDK2 表达水平。

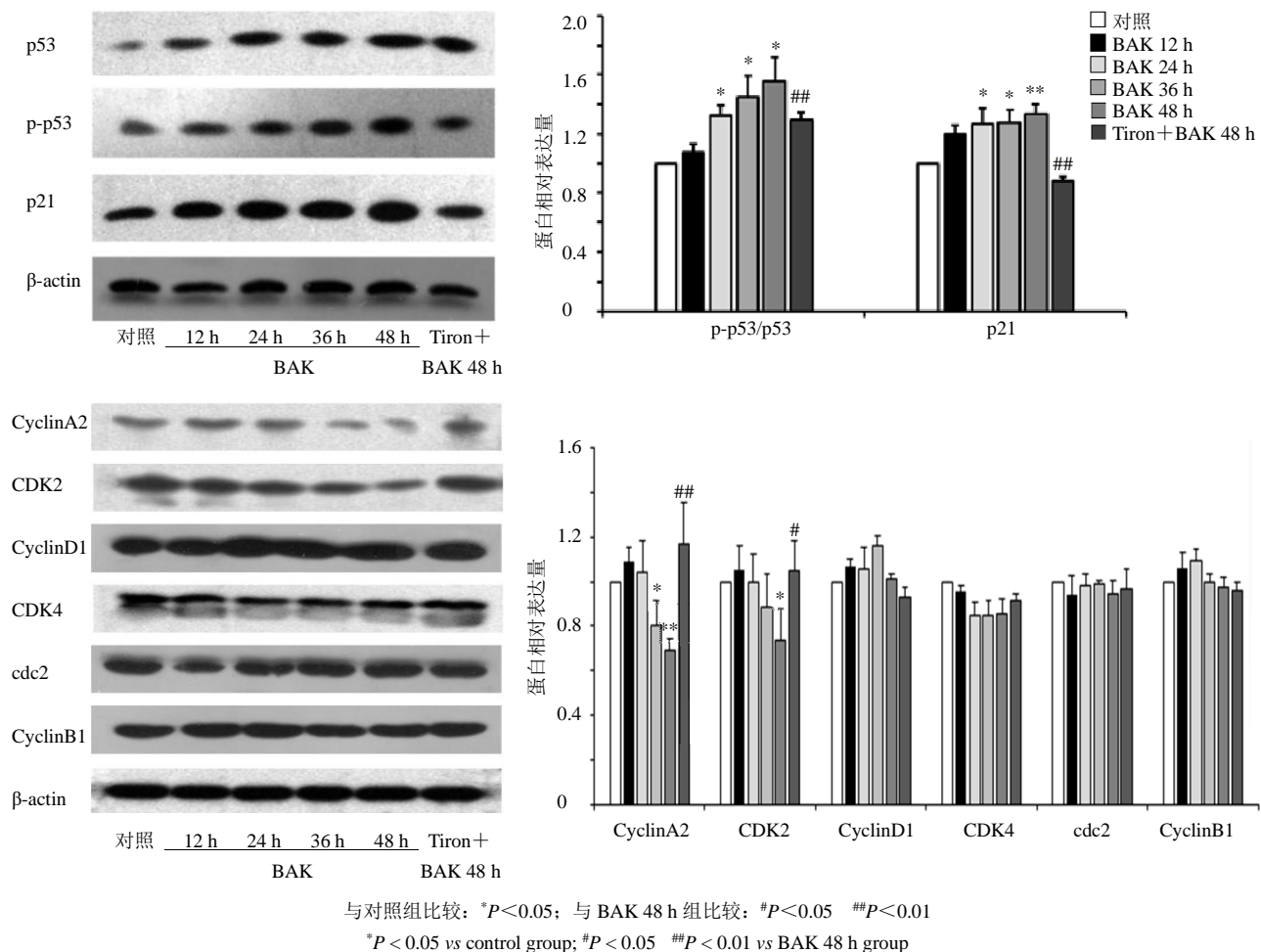


图 8 BAK 通过诱导 ROS 产生对 MCF-7 细胞周期蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of BAK on protein expression in MCF-7 cells by inducing ROS production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

乳腺癌是一种女性最常见的恶性肿瘤^[10]。近年来,中药来源的活性化合物已逐渐成为新型抗乳腺癌药物的重要来源。本研究发现中药补骨脂主要成分 BAK 呈时间、剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞增殖,且其抑制作用明显强于临床常用抗肿瘤药物 5-FU。进一步研究发现,BAK 并未引起 MCF-7 细胞发生细胞核固缩或碎裂等凋亡现象,且 BAK 处理后 G₁ 期细胞比例较低,说明 BAK 不能诱导 MCF-7 细胞发生凋亡。然而,BAK 可以呈时间依赖性地上调 S 期细胞比例,提示 BAK 通过诱导 MCF-7 细胞发生 S 期阻滞,进而抑制细胞增殖。

细胞周期阻滞是一种有利于机体的保护机制,当细胞受到外界环境刺激发生 DNA 损伤时,可通过几个细胞周期监测点的调节来启动细胞周期延迟或阻滞,以便于 DNA 修复。细胞周期主要分为 G₀/G₁、S 和 G₂/M 期,在细胞受到生长因子或其他因子刺激时,细胞从 G₀ 期(静止期)退出,进入 G₁ 期(活跃期),然后再进入 S 期,在 S 期时,DNA 的合成发生。S 期阻滞在大多数癌症发病机制中起了重要的作用^[11]。在 S 期阻滞过程中,一些相关的信号通路被激活,从而引发细胞死亡级联反应和增殖抑制^[12]。Yang 等^[13]证实赭曲毒素 A 通过下调 CyclinA2、CDK2 的表达,进而诱导人胚胎肾细胞发生 S 期阻滞。Tu 等^[14]也发现辛伐他汀通过 Chk1-cdc25A-cyclinA/CDK2 途径诱导多发性骨髓瘤细胞发生 S 期阻滞。本研究发现,BAK 也可以通过下调 CyclinA2 和 CDK2 的表达进而诱导 MCF-7 细胞发生 S 期阻滞。

MAPKs 是在响应胞外刺激时的一个重要的信号通路,主要包含 3 个主要家族:ERK、JNK 和 p38MAPK。研究表明,MAPKs 信号通路能够调控细胞周期^[15]。在乳腺癌中,p38 MAPK 作为一个中心激酶在乳腺癌侵袭和转移中也起到至关重要的作用^[16]。本研究发现,加入 JNK 抑制剂 SP600125 及 p38MAPK 抑制剂 SB203580 时,BAK 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用减弱,而加入 ERK 抑制剂 PD98059 时,BAK 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用无任何影响,说明 BAK 是通过 JNK 和 p38MAPK 途径诱导 MCF-7 细胞发生增殖抑制(图 9)。

ROS 主要以超氧离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(•OH)等形式存在,在应对各种的胞内和胞外刺激时,ROS 被认为是重要的可以决定细胞

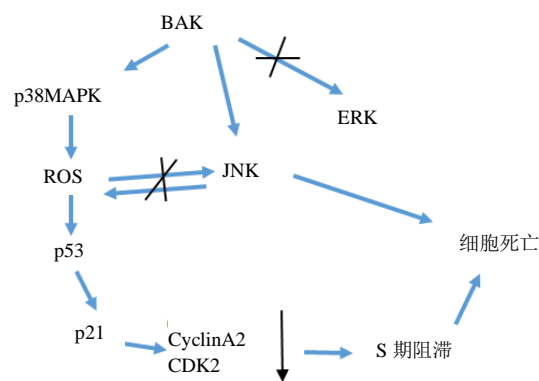


图 9 BAK 引起 MCF-7 细胞死亡的机制

Fig. 9 Mechanism of BAK-induced cell death in MCF-7 cells

命运分子之一^[17]。大量研究表明,细胞内 ROS 过量生成可造成细胞增殖抑制。在本研究中,BAK 可诱导 MCF-7 细胞产生 ROS,并引起 S 期阻滞,当加入 ROS 清除剂 Tiron 后,ROS 生成量降低,且 S 期阻滞现象被逆转。当加入 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后,ROS 生成量降低,且 Western blotting 分析也显示加入 ROS 清除剂 Tiron 后,不能逆转 p38MAPK 的表达,以上结果表明,p38MAPK 在 ROS 的上游,即 BAK 先激活 p38MAPK,进而引起 ROS 的生成,从而使 MCF-7 细胞阻滞于 S 期。本研究中,JNK 可以诱导 MCF-7 发生增殖抑制,但当加入 JNK 抑制剂 SP600125 后,ROS 生成量没有逆转,说明 JNK 没有通过 ROS 的产生发挥增殖抑制作用,具体机制有待进一步研究。

细胞增殖是细胞生命活动的基本特征之一,也是生物有机体的重要特点。在胚胎发育的早期细胞以惊人的速度进行分裂,细胞分裂后紧接着进行 DNA 复制^[18]。在细胞周期分裂增殖的过程中,周期蛋白 Cyclin 和周期蛋白依赖性激酶 CDK 起着重要的调控作用^[19]。CyclinA2/CDK2 复合物在 S 期调控特别是在 DNA 合成过程中起到非常重要的作用^[12]。p53 是一种转录因子,在细胞对外界的应激反应中充当重要角色。p53 基因是一种抑癌基因,可通过调节一些基因的表达引起细胞周期阻断和细胞凋亡,明显抑制肿瘤细胞的生长,p53 可以调控 p21 的表达,p21 能够与 CyclinA2/CDK2 结合从而抑制其活性^[20]。本研究中,Western blotting 结果显示,BAK 可时间依赖性地上调 p-p53、p21 蛋白的表达水平,下调 CyclinA2 和 CDK2 蛋白的表达水平。加入活性氧清除剂 Tiron 之后,其蛋白的表达水平都得到逆转,而 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期的相关蛋白表

达并没有随着 BAK 作用时间的增加而改变。可见, BAK 是通过诱导 ROS 的产生, 进而激活 p53, 然后增加 p21 的表达, 又下调 CyclinA2、CDK2 蛋白的表达, 降低 CyclinA2/CDK2 复合物的表达, 最终造成 MCF-7 细胞发生 S 期阻滞。

综上所述, BAK 可以明显抑制 MCF-7 细胞增殖。其可通过 p38-ROS-p53 途径诱导 MCF-7 细胞发生 S 期阻滞, 此外, BAK 通过 JNK 但不通过 ROS 途径抑制细胞增殖。本研究为 BAK 抗乳腺癌的深入研究及临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 郑莹, 吴春晓, 吴凡. 中国女性乳腺癌死亡现况和发展趋势 [J]. *中华预防医学志*, 2011, 45(2): 150-154.
- [3] 陈英, 吴玥, 宋今春. 补骨脂化学成分及生活活性研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(9): 1184-1188.
- [4] 尤杰, 刘嘉湘. 刘嘉湘扶正治癌学术思想初探 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(8): 1830-1832.
- [5] 屈帅勇, 马纯政. 扶正类中药抗肿瘤作用的机制及研究进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2018, 16(13): 155-157.
- [6] 苗琳, 马尚伟, 樊官伟, 等. 补骨脂酚拮抗 AR 转录活性抑制雄激素诱导的前列腺癌细胞 LNCaP 的增殖 [J]. *天津中医药*, 2013, 30(5): 291-293.
- [7] 王路明, 左艳萍. 补骨脂酚对口腔鳞状细胞癌增殖、迁移和凋亡的影响及其机制 [J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(4): 365-370.
- [8] Chen Z, Jin K, Gao L, *et al.* Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 643(2/3): 170-179.
- [9] 陈红莉, 冯慧瑾, 李援朝. 补骨脂酚的体外抗肿瘤活性及其关键中间体的合成研究 [J]. *药学学报*, 2010, 45(4): 467-470.
- [10] 李佩文. 乳腺癌综合治疗学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999.
- [11] Zhang M, Wang A, Xia T, *et al.* Effects of fluoride on DNA damage, S phase cell-cycle arrest and the expression of NF- κ B in primary cultured rat hippocampal neurons [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 179(1): 1-5.
- [12] Jin X, Tang S, Chen Q, *et al.* Furazolidone induced oxidative DNA damage via up-regulating ROS that caused cell cycle arrest in human hepatoma G2 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 201(3): 205-212.
- [13] Yang Q, He X, Li, X *et al.* DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293) [J]. *Mutat Res*, 2014, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.001.
- [14] Tu Y S, Kang X L, Zhou J G, *et al.* Involvement of Chk1-Cdc25A-cyclin A/CDK2 pathway in simvastatin induced S-phase cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(2/3): 356-364.
- [15] Wilkinson M G, Millar J B. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways [J]. *FASEB*, 2000, 14(14): 2147-2157.
- [16] Slattery M, John E, Torres-Mejia G, *et al.* Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: The breast cancer health disparities study [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 63165.
- [17] Fleury C, Mignotte, B, Vayssiere J L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2/3): 131-141.
- [18] 马晓方, 杜晓光, 辛现良, 等. 肿瘤细胞恶性增殖和细胞周期调控改变的分子机制 [J]. *现在生物医学进展*, 2009, 9(5): 950-953.
- [19] Demiranda D, Barrett K L, Katula K S. CyclinB1 promoter activity and functional CDK1 complex formation in G₁ phase of human breast cancer cells [J]. *Cell Biol Int*, 2002, 26(1): 19-28.
- [20] 宋其蔓, 孙洞箫. 细胞凋亡与 p21 关系的研究紧张 [J]. *医学综述*, 2008, 14(6): 816-818.