

## 石蒜碱调控线粒体氧化损伤介导人乳腺癌细胞自噬及凋亡作用机制

辛国松<sup>1,2</sup>, 侯妍秀<sup>1</sup>, 王毛毛<sup>1</sup>, 于淼<sup>1,2</sup>, 季宇彬<sup>1,2</sup>, 李文兰<sup>1,2</sup>, 李海茹<sup>3\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

**摘要:** 目的 研究石蒜碱介导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞自噬及凋亡的作用机制。方法 采用 CCK-8 法检测石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响; 倒置显微镜、荧光显微镜和激光共聚焦扫描显微镜 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 观察细胞形态; 细胞集落实验检测细胞克隆形成能力; 划痕实验检测细胞迁移能力; 流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、线粒体膜电位; LSCM 检测线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放情况; Western blotting 检测线粒体自噬相关蛋白 [线粒体内膜转位酶 (translocase of inner membrane, TIM)、线粒体外膜转位酶 (translocase of outer membrane, TOM)、E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin protein ligase, PARKIN)、PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3-B)、p62] 和凋亡相关蛋白 [半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、细胞色素 C (cytochrome-C, Cyt-C)] 的表达。结果 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞具有生长抑制作用, 其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 值为 6.21 μmol/L; 石蒜碱能够改变细胞形态, 部分细胞出现凋亡迹象; 石蒜碱能够显著抑制细胞的增殖和迁移能力 ( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, 随着石蒜碱给药浓度的增加, 细胞凋亡率随之升高 ( $P < 0.01$ ), ROS 水平升高 ( $P < 0.01$ ), 线粒体膜电位下降 ( $P < 0.01$ ), MPTP 开放 ( $P < 0.01$ ); 石蒜碱给药 48 h 后, 细胞内 TIM、TOM、p62 和 Bcl-2 蛋白表达量下调 ( $P < 0.01$ ), PARKIN、PINK1、LC3-B、Caspase-3、Bax 和 Cyt-C 蛋白表达量上调 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度相关性。结论 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞具有生长抑制作用, 并可通过调控线粒体氧化损伤介导 MDA-MB-231 细胞的自噬及凋亡。

**关键词:** 石蒜碱; 乳腺癌; 线粒体氧化损伤; 细胞自噬; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)12-4056-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.013

## Mechanism of lycorine on autophagy and apoptosis in human breast cancer cell through mitochondrial oxidative damage

XIN Guosong<sup>1,2</sup>, HOU Yanxiu<sup>1</sup>, WANG Maomao<sup>1</sup>, YU Miao<sup>1,2</sup>, JI Yubin<sup>1,2</sup>, LI Wenlan<sup>1,2</sup>, LI Hairu<sup>3</sup>

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. National Ministry of Education Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Harbin 150076, China

3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of lycorine on autophagy and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cell. **Methods** The effect of lycorine on MDA-MB-231 cell proliferation was detected by CCK-8; Cell morphology was observed by inversion microscopy, fluorescence microscopy and laser scanning confocal microscopy (LSCM); The cell clone formation ability was detected by cell colony assay; The cell migration ability was examined by scratch assay; The apoptosis rate, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential were determined by flow cytometry; The opening of mitochondrial

收稿日期: 2024-01-19

**基金项目:** 中国博士后面上项目 (2021MD703828); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2022H002); 哈尔滨商业大学产业化项目支持计划项目 (XL0086); 2023 年度哈尔滨商业大学镜湖学者支持计划项目 (JHQNRC01); 哈尔滨市科技局项目 (2023ZCZJCG038); 哈尔滨商业大学成果转化项目 (2023-KYYWF-1034)

**作者简介:** 辛国松 (1984—), 男, 研究员, 博士 (博士后), 硕士生导师, 研究方向为抗肿瘤中药药理学研究。E-mail: 13766801150@163.com

**\*通信作者:** 李海茹 (1988—), 女, 副教授, 博士 (博士后), 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: lihairu0419@126.com

membrane permeability transition pore (MPTP) was detected by LSCM; The expressions of mitochondrial autophagy-related proteins [translocase of inner membrane (TIM), translocase of outer membrane (TOM), E3 ubiquitin protein ligase (PARKIN), PTEN induced putative kinase 1 (PINK1), microtubule-associated protein light chain 3 (LC3-B), p62], and apoptosis-related proteins [cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cytochrome-C (Cyt-C)] were detected by Western blotting. **Results** Lycorine had a proliferative inhibitory effect on MDA-MB-231 cells, with a half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) value of 6.21  $\mu\text{mol/L}$ ; Lycorine could change cell morphology, and some cells showed signs of apoptosis; Lycorine could significantly inhibit the proliferation and migration capacity of MDA-MB-231 cells ( $P < 0.01$ ); Compared with control group, with the increase of lycorine administration concentration, cell apoptosis rate was increased ( $P < 0.01$ ), ROS level was increased ( $P < 0.01$ ), mitochondrial membrane potential was decreased ( $P < 0.01$ ), and MPTP was open ( $P < 0.01$ ). After 48 h treatment of lycorine, the expressions of TIM, TOM, p62 and Bcl-2 protein were down-regulated ( $P < 0.01$ ), and the expressions of PARKIN, PINK1, LC3-B, Caspase-3, Bax and Cyt-C were up-regulated ( $P < 0.01$ ) in a concentration-dependent manner. **Conclusion** Lycorine has growth inhibition effect on MDA-MB-231 cells, and induces autophagy and apoptosis of MDA-MB-231 cells through the regulation of mitochondrial oxidative damage.

**Key words:** lycorine; breast cancer; mitochondrial oxidative damage; autophagy; apoptosis

乳腺癌是世界范围内女性最常见的致死性恶性肿瘤, 据统计, 2020 年女性乳腺癌已超越肺癌成为全球癌症发病率最高的癌种<sup>[1-2]</sup>。其中三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 均呈阴性表达的乳腺癌亚型, 占有所有乳腺癌的 15%~20%<sup>[3]</sup>, 具有侵袭力强、转移率高、术后复发率高、预后差的特点<sup>[4]</sup>。由于 TNBC 内分泌治疗的不确定性及靶向治疗的不应答性, 导致临床上的治疗效果不理想<sup>[5-6]</sup>。因此, 寻找有效抑制 TNBC 增殖转移的药物、降低患者的病死率一直是乳腺癌基础研究的一个重要方向<sup>[7-8]</sup>。

石蒜碱是石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.、文殊兰 *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum* (Roxb. et Herb.) Baker、朱顶红 *Hippeastrum rutilum* (Ker.-Gawl.) Herb. 等石蒜属植物鳞茎中含量较高的异喹啉类生物碱, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎镇痛、保肝等药理活性<sup>[9-10]</sup>, 近年来石蒜碱的抗肿瘤作用受到众多研究者的关注。有文献报道石蒜碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞<sup>[11]</sup>、人宫颈癌 Hela 细胞<sup>[12-13]</sup>、人肝癌 HepG-2 细胞<sup>[13-16]</sup>、人胃癌 SGC-7901 细胞<sup>[17]</sup>、人结肠腺癌 LoVo 细胞<sup>[18-19]</sup>具有显著的抑制作用, 但对其作用机制的研究仍然处于初始阶段。本研究以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象, 主要通过体外实验从细胞水平和分子水平探讨石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞的体外抑制活性及其通过线粒体氧化损伤诱导肿瘤细胞自噬及凋亡的机制, 为今

后石蒜碱抗肿瘤新药的深入研发和临床实践提供理论基础和实验参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

MDA-MB-231 细胞由国家教育部抗肿瘤天然药物工程技术研究中心提供。

### 1.2 药品与试剂

石蒜碱 (批号 34296, 质量分数 98%) 购自阿拉丁试剂有限公司; 胎牛血清 (批号 0201021) 购自浙江杭天生物科技有限公司; RPMI 1640 细胞培养基 (批号 AD123707271) 购自美国 HyClone 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 20200901) 购自天津中和盛泰化工有限公司; Hoechst 33258 染液 (批号 C1011)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0015)、吉姆萨染液 (批号 C0131)、CCK-8 试剂盒 (批号 C0043)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 S0033S)、PMSF (批号 ST505)、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗 (批号 A0192)、Western blotting 及 IP 细胞裂解液 (批号 072318180723)、30% Acr-Bis (批号 093018181017) 购自碧云天生物技术有限公司; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液 (批号 R20285)、Rhodamine 123 (批号 R8004) 购自美国 Sigma 公司; 台盼蓝 (批号 72-52-1) 购自美国默克公司; Reagent A 染液 (批号 5000113) 购自北京诺博莱德科技有限公司; 聚山梨酯 20 (批号 20190207) 购自美国 Biotopped 公司; Tris (批号 181127) 购自美国 Amresco 公司; 兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 WL02512)、兔

抗 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 WL01506)、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 WL02385)、兔抗细胞色素 C (cytochrome-C, Cyt-C) 抗体 (批号 WL04963)、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 WL01114) 购自沈阳万类生物科技有限公司; 兔抗线粒体内膜转位酶 (translocase of inner membrane, TIM) 抗体 (批号 PSI-RF16109)、兔抗线粒体外膜转位酶 (translocase of outer membrane, TOM) 抗体 (批号 PSI57577)、兔抗 E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin protein ligase, PARKIN) 抗体 (批号 PSI50248)、兔抗 PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 抗体 (批号 PSI7859)、兔抗微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3-B) 抗体 (批号 BS79705)、兔抗 p62 抗体 (批号 p196-269) 购自艾美捷科技有限公司。

### 1.3 仪器

ECO-170P-230 型细胞培养箱、Model 680 型酶标仪 (美国 NBS 公司); Adventurer 型万分之一电子天平 (美国 OHAUS 公司); EPICS-XL 型流式细胞仪、Allegra™ 64R 型低温高速离心机 (美国 Beckman-Coulter 公司); CKX-41-32 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 荧光显微镜、TCS-SP2 激光共聚焦扫描显微镜 (德国 Leica 公司); 680 型全自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); P 型微量移液器 (芬兰百得公司); 标准型 PB-10 pH 计 (德国 Sartorius 公司); GIS-2019 型 Tannon 凝胶成像系统 (天能科技有限公司); DYY-7C 型电泳仪、M344039 型垂直电泳转印槽 (北京六一仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

MDA-MB-231 细胞复苏后接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中培养, 待细胞长势良好时进行传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

### 2.2 CCK-8 法检测细胞增殖活性

MDA-MB-231 细胞以  $2 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 给药组每孔加入不同浓度 (2、4、8、16、32  $\mu\text{mol/L}$ ) 的石蒜碱 100  $\mu\text{L}$ , 对照组加入 100  $\mu\text{L}$  细胞培养基, 每组均设置 6 个平行孔, 处理 48 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 继

续培养 4 h。采用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算各组细胞的增殖抑制率与石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 倒置显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜观察细胞形态变化

MDA-MB-231 细胞以  $3 \times 10^3$  个/孔分别接种于 2 块 6 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 根据石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞的 IC<sub>50</sub> 设定 3 个给药剂量, 分别以 3、6、12  $\mu\text{mol/L}$  的给药浓度每孔加入石蒜碱 1 mL, 对照组加入 1 mL 细胞培养基, 继续处理 48 h。取 1 块板用倒置显微镜观察并拍照后, 每孔加入 1 mL 多聚甲醛固定 1 h, 冲洗后加入 200  $\mu\text{L}$  Hoechst 33258 染液, 37 °C 孵育 30 min 后, 用荧光显微镜观察并拍照; 取另 1 块板收集各组细胞, 用预冷的 PBS 重悬细胞并弃去上清液, 加入 Annexin V-FITC 于 37 °C 避光孵育 15 min, 冲洗后加入 PI 染液于 4 °C 避光孵育 15 min 后, 用激光共聚焦扫描显微镜观察并拍照。

### 2.4 集落实验检测细胞克隆能力

MDA-MB-231 细胞以  $1 \times 10^3$  个/孔接种于 6 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 连续培养 7 d 后弃去培养基。PBS 洗涤后用甲醇固定 10 min, 冲洗后加入吉姆萨染液染色后, 用倒置显微镜观察细胞集落形成率并拍照。

### 2.5 划痕实验检测细胞迁移能力

MDA-MB-231 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 细胞培养 24 h, 细胞融合至 70%~80% 后, 用 200  $\mu\text{L}$  移液器倚靠直尺, 枪头垂直于每孔底部垂直划痕。PBS 冲洗后, 按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h 后, 用倒置显微镜观察细胞的迁移情况并拍照记录, 比较各组间的划痕宽度, 使用 Image J 软件测量并计算划痕愈合率。

### 2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h 后, 收集各组细胞, 加入 70% 冷乙醇 2 mL 于 4 °C 固定 24 h 后离心。弃去上清液, PBS 冲洗后, 加入 800  $\mu\text{L}$  PI 染液, 4 °C 避光孵育 30 min, 经尼龙网滤过后, 采用流式细胞仪进行检测, 激发波长为 488 nm。

### 2.7 流式细胞仪检测 ROS 水平

按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h, 收集各组细胞, PBS 洗涤后加入 5  $\mu\text{mol/L}$

DCFH-DA 染液 0.2 mL, 37 °C 避光孵育 20 min, 经尼龙网滤过后, 采用流式细胞仪进行检测。

## 2.8 流式细胞仪检测线粒体膜电位

按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h 后, 收集各组细胞, PBS 洗涤后, 避光加入 Rhodamine 123 染料, 避光孵育 30 min 后离心弃去上清液, 用 PBS 洗涤并混匀细胞, 经尼龙网滤过后, 采用流式细胞仪进行检测。

## 2.9 激光共聚焦扫描显微镜检测线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 活性

按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h 后, 收集各组细胞, 加入 37 °C 预热的 Reagent A 染液 500  $\mu$ L, 离心后弃去上清液。37 °C 避光加入染色工作液, 混匀后孵育 20 min, 离心去除上清液, 将细胞吹打混匀后, 经尼龙网滤过, 采用激光扫描共聚焦显微镜检测并进行拍照。

## 2.10 Western blotting 检测线粒体自噬相关蛋白 TIM、TOM、PARKIN、PINK1、LC3-B、p62 和凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2、Cyt-C 表达

按“2.3”项下方法对细胞进行分组和给药, 培养 48 h 后, 收集各组细胞, 加入含 PMSF 的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min 后将细胞加入 EP 管中, 离心 15 min。取上清液, 煮沸使蛋白变性, 采用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗, 37 °C 孵育 2 h, 洗膜后加入化学发光试剂, 采用凝胶成像系统拍照并进行分析。

## 2.11 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析, 通过 Graphpad Prism 8 软件绘图。

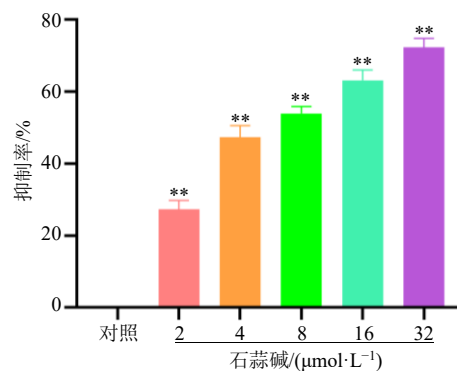
## 3 结果

### 3.1 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞具有显著的增殖抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度相关性。石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞的  $IC_{50}$  为 6.21  $\mu$ mol/L, 并参考  $IC_{50}$  值设定后续石蒜碱给药浓度分别为 3、6、12  $\mu$ mol/L。

### 3.2 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

采用倒置显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞形态的影响,



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ , 下图同。

\*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below figures.

图 1 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

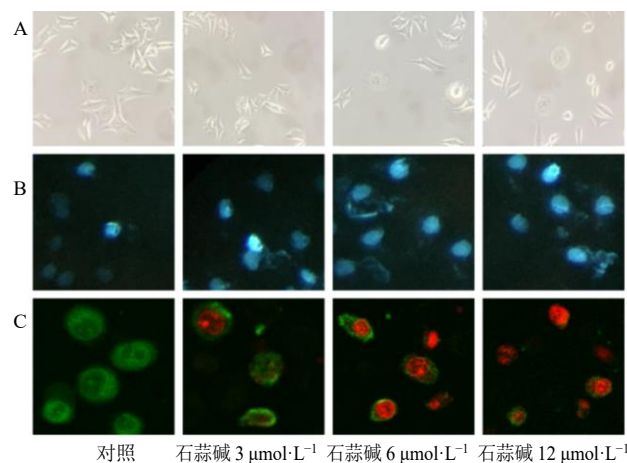
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of lycorine on proliferation of MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

如图 2 所示, 与对照组比较, 石蒜碱给药后, 随着给药浓度增加, 细胞生长逐渐变稀疏, 细胞膜破裂现象更加明显, 细胞间轮廓更加模糊, 细胞核固缩形成凋亡小体, 发出较强荧光。

### 3.3 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞克隆、迁移的影响

集落实验结果表明, 石蒜碱可以抑制 MDA-MB-231 细胞的克隆能力 (图 3-A), 且随着浓度的

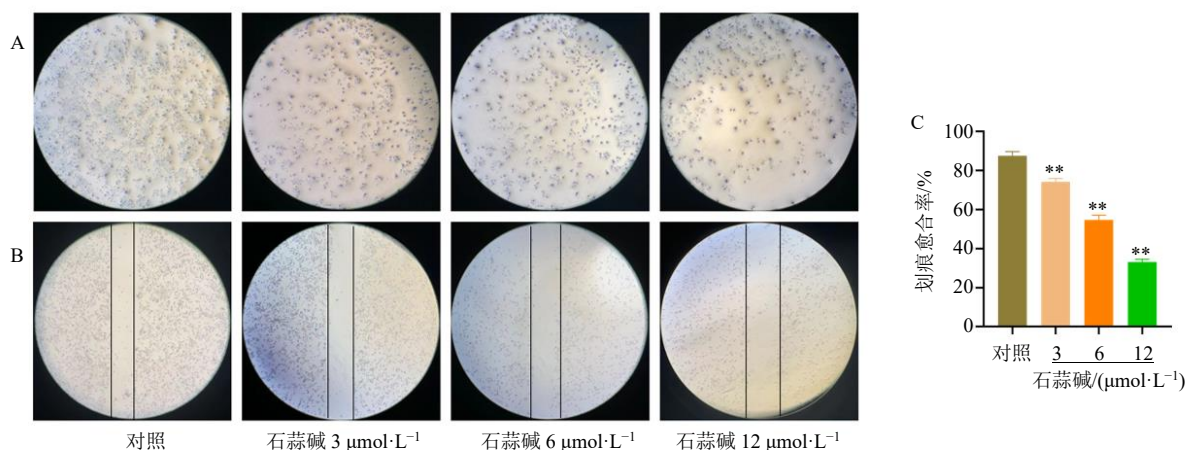


A-倒置显微镜下细胞形态 ( $\times 400$ ); B-荧光显微镜下细胞形态 ( $\times 400$ ), 蓝色荧光为 DNA 染色; C-激光扫描共聚焦显微镜下细胞形态 ( $\times 400$ ), 绿色荧光为细胞膜染色, 红色荧光为细胞核染色。

A-cell morphology under inversion microscopy ( $\times 400$ ); B-cell morphology under fluorescence microscopy ( $\times 400$ ), blue fluorescence is DNA staining; C-cell morphology under laser scanning confocal microscopy ( $\times 400$ ), green fluorescence is cell membrane staining, and red fluorescence is nucleus staining.

图 2 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of lycorine on morphology of MDA-MB-231 cells



A-集落实验检测细胞克隆; B、C-划痕实验检测细胞迁移。

A-cell cloning detected by colony assay; B, C-cell migration detected by scratch assay.

图 3 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞克隆、迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of lycorine on cloning and migration ability of MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

增加细胞集落数量逐渐减少, 且呈浓度相关性。划痕实验结果显示, 石蒜碱可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力 ( $P < 0.01$ , 图 3-B、C), 呈剂量相关性。

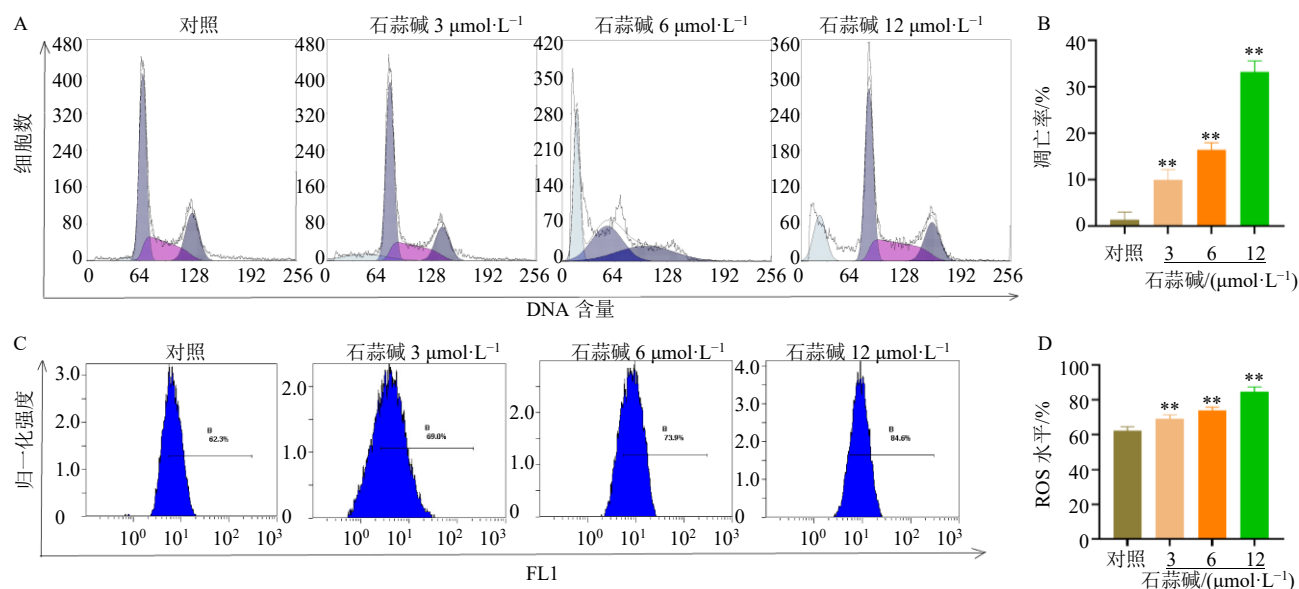
### 3.4 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡率、ROS 水平的影响

如图 4-A、B 所示, 经流式细胞仪 PI 单染法检测出现明显的凋亡峰, 表明 DNA 的合成受到抑制, 且随着给药浓度增加, 凋亡峰越明显, 凋亡率也呈上升趋势, 与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),

且呈浓度相关性。如图 4-C、D 所示, 随着给药浓度增加, 细胞内 ROS 水平逐渐升高, 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度相关性。

### 3.5 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位和 MPTP 的影响

如图 5-A、B 所示, 经流式细胞仪检测, 随着石蒜碱给药浓度增加, 细胞内线粒体膜阳性表达率逐渐降低, 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度相关性。如图 5-C、D 所示, 应用激光扫描共聚焦显微镜结合 AM 染色技术对不同浓度的石蒜碱作用

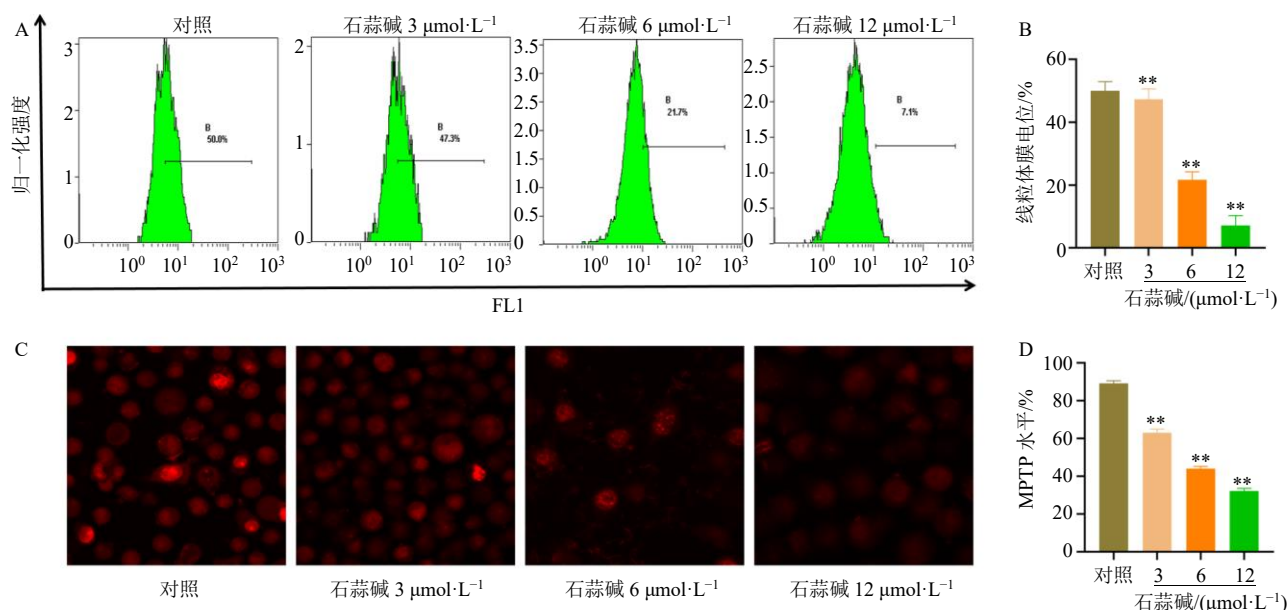


A、B-流式细胞仪检测细胞凋亡率; C、D-流式细胞仪检测细胞 ROS 水平。

A, B-apoptosis rate detected by flow cytometry; C, D-ROS level detected by flow cytometry.

图 4 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡率、ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effect of lycorine on apoptosis rate and ROS level of MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



A、B-流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位；C、D-激光共聚焦显微镜检测细胞 MPTP 水平 (×400)。

A, B-mitochondrial membrane potential detected by flow cytometry; C, D-MPTP level detected by laser scanning confocal microscopy (×400).

图 5 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位、MPTP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 Effect of lycorine on mitochondrial membrane potential and MPTP in MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

48 h 后的 MDA-MB-23 细胞进行检测，激光扫描共聚焦显微镜扫描得到的荧光象素强度反映出细胞膜通透性的改变，随着给药浓度增加，细胞内线粒体膜通透性逐渐升高，具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )，且呈浓度相关性。

### 3.6 石蒜碱对 MDA-MB-231 线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的影响

应用凝胶成像系统分析 MDA-MB-231 细胞中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的情况。如图 6 所示，随着石蒜碱浓度增加，细胞自噬相关蛋白 TIM、

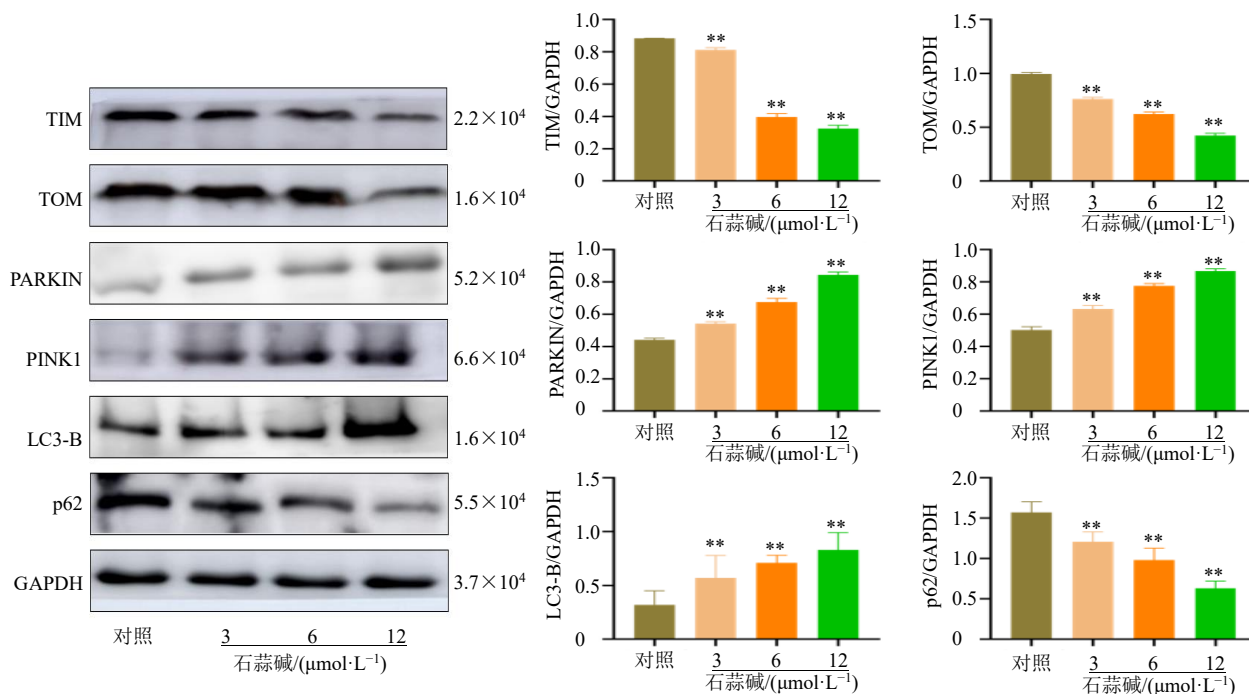


图 6 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Effect of lycorine on expressions of autophagy-related proteins in MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

TOM 和 p62 蛋白表达量逐渐降低, PARKIN、PINK1 和 LC3-B 蛋白表达量逐渐升高, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。如图 7 所示, 随着石蒜碱浓度增加, 细

胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白表达量逐渐降低, Bax、Caspase-3 和 Cyt-C 蛋白表达量逐渐升高, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

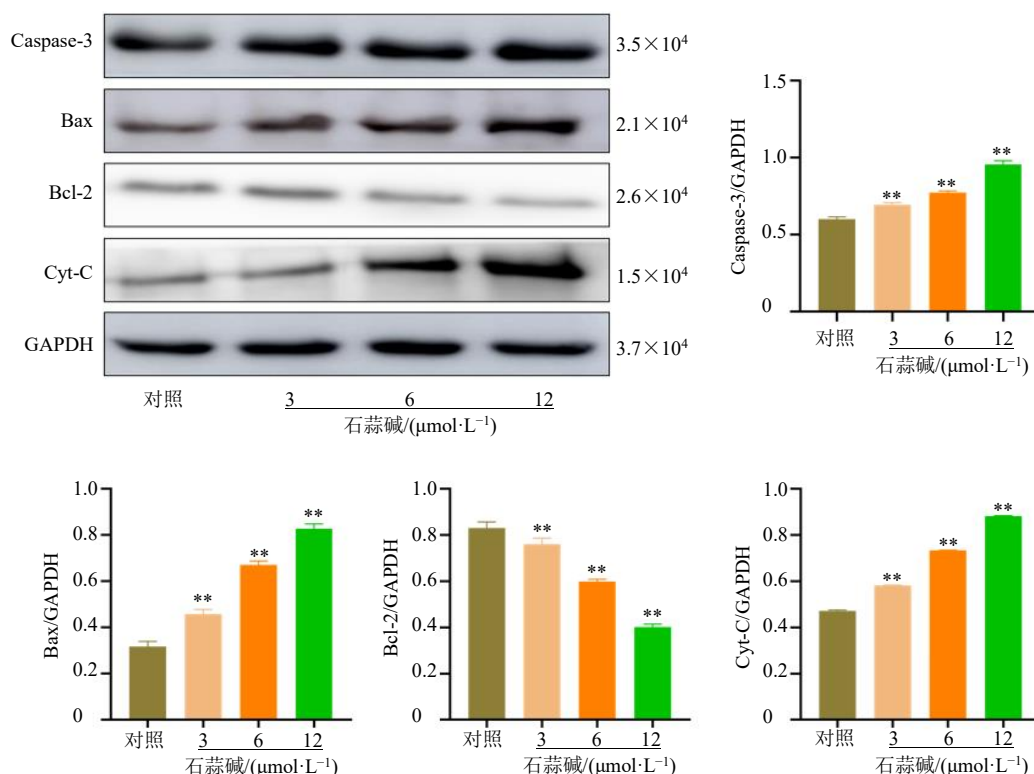


图 7 石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of lycorine on expressions of apoptosis-related proteins in MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 4 讨论

乳腺癌已成为全球最常见的恶性肿瘤, 与乳腺癌的其他分子亚型相比, TNBC 最具侵袭性和高度异质性<sup>[20-22]</sup>, 使其在临床上难以得到有效治疗。因此如何有效抑制 TNBC 侵袭、增殖和转移是目前亟待解决的问题。近年来, 有研究表明中药在抗肿瘤方面具有显著的优势<sup>[23-25]</sup>。石蒜碱是异喹啉类生物碱, 广泛分布于石蒜属植物鳞茎中, 具有较强的抗肿瘤活性<sup>[26-27]</sup>。基于石蒜碱的抗肿瘤作用, 结合课题组前期研究中 TNBC 细胞活性筛选, 发现石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞较为敏感, 故选择 MDA-MB-231 细胞作为研究对象, 本研究结果发现石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖和迁移具有显著抑制作用, 且呈浓度相关性。

ROS 水平升高和线粒体功能障碍是诱导肿瘤细胞自噬和凋亡的重要途径<sup>[28]</sup>。研究发现, 过量 ROS 的产生会诱发肿瘤细胞的损伤、自噬及凋亡并降低细胞的多药耐药性<sup>[29]</sup>。此外, 肿瘤细胞对外源性 ROS 比正常细胞更敏感且 ROS 具有一定的细胞

毒性。因此, 促进 ROS 水平升高的药物可表现出一定的抗癌活性。有研究表明, 线粒体功能障碍与多种恶性肿瘤的发生及 ROS 的过量产生密切相关<sup>[30]</sup>。本研究通过激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测结果表明, 石蒜碱可以显著提高 MDA-MB-231 细胞凋亡率和 ROS 水平, 并使线粒体膜电位下降, MPTP 开放。这表明石蒜碱诱导细胞自噬和凋亡作用可能与线粒体的氧化损伤有关。

TOM 及 TIM 是线粒体膜蛋白, 当线粒体自噬增强时, 其细胞内表达水平下降。研究表明线粒体损伤会使线粒体膜电位降低, 导致 PINK1 在线粒体外膜上表达, 从而使 PINK1-PARKIN 依赖性线粒体自噬反应被激活<sup>[31]</sup>。LC3-B 是自噬体形成的特异性标志物, 其含量与自噬泡数量成正比, 因此被广泛用于监测细胞自噬。p62 作为自噬降解的产物, 自噬增强, p62 水平会下降。p62 还可与自噬体膜上的 LC3-B 蛋白及泛素化的蛋白形成复合物, 在自噬溶酶体内完成降解<sup>[32]</sup>。ROS 的过度累积, 会触发 MPTP 开放, 导致线粒体膜电位下降, 引起 Cyt-C 从线粒

体释放并进入细胞质中,进而激发 Caspase 的级联反应并启动细胞线粒体凋亡<sup>[33]</sup>。Bcl-2 为抗凋亡蛋白, Bax 为促凋亡蛋白,当接收到凋亡刺激信号后可转位至线粒体膜上, Bcl-2 和 Bax 可形成二聚体或多聚体,从而增加细胞线粒体膜的通透性,进一步激活 Caspase 级联反应, Caspase-3 可通过抑制凋亡抑制物,从而破坏细胞结构使蛋白丧失功能<sup>[34]</sup>。本研究通过 Western blotting 检测自噬相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达,结果显示石蒜碱能够上调 PARKIN、PINK1、LC3-B、Caspase-3、Bax 和 Cyt-C 蛋白表达,下调 TIM、TOM、p62 和 Bcl-2 蛋白表达,表明石蒜碱可通过线粒体的氧化损伤介导 MDA-MB-231 细胞的自噬及凋亡。

综上,石蒜碱对 MDA-MB-231 细胞具有生长抑制作用,并可通过调控线粒体氧化损伤介导 MDA-MB-231 细胞的自噬及凋亡。本研究为石蒜碱抗肿瘤新药的深入研发和临床实践提供理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Trapani D, Ginsburg O, Fadelu T, *et al.* Global challenges and policy solutions in breast cancer control [J]. *Cancer Treat Rev*, 2022, 104: 102339.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] 蒋飘, 姚伟荣, 沈庆林. 三阴性乳腺癌免疫检查点抑制剂的临床现状与挑战 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2023, 30(17): 1062-1068.
- [4] Park S Y, Choi J H, Nam J S. Targeting cancer stem cells in triple-negative breast cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(7): 965.
- [5] Rigracciolo D C, Nohata N, Lappano R, *et al.* IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP transduction signaling prompts growth effects in triple-negative breast cancer (TNBC) cells [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1010.
- [6] Cantini L, Trapani D, Guidi L, *et al.* Neoadjuvant therapy in hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 123: 102669.
- [7] Liu Y, Hu Y T, Xue J Q, *et al.* Advances in immunotherapy for triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 145.
- [8] Carvalho F M. Triple-negative breast cancer: From none to multiple therapeutic targets in two decades [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1244781.
- [9] 邵莹莹, 尹双双, 刘宏伟, 等. 石蒜碱抗肿瘤的作用机制研究进展 [J]. *中兽药*, 2019, 17(9): 1455-1459.
- [10] 林思, 秦慧真, 张淼, 等. 石蒜碱的抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(11): 183-187.
- [11] Ji Y B, Yu M, Qi Z, *et al.* Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 633-637.
- [12] 徐振宇, 卢林侠, 吉夫次里, 等. 石蒜碱对宫颈癌 HeLa 细胞 PI3K/Akt 信号通路的调控作用研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2023, 46(6): 8-10.
- [13] Li Z Z, Zhou Q, Liu X G, *et al.* Lycorine upregulates the expression of RMB10, promotes apoptosis and inhibits the proliferation and migration of cervical cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 50(6): 145.
- [14] 任丽平, 李先佳, 金少举, 等. 基于 Raf/MEK/ERK 信号通路及 ROS 水平研究石蒜碱调控肝癌 HepG-2 细胞凋亡的机制 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(2): 28-32.
- [15] 抗晶晶, 刘晓宁. 线粒体 ROS 改变参与石蒜碱诱导的 HepG2 细胞凋亡 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2019, 42(4): 91-96.
- [16] 季宇彬, 辛国松, 魏驰, 等. 石蒜碱诱导人肝癌 HepG2 细胞自噬的体外实验研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(6): 1449-1453.
- [17] 张淑静, 马俊英, 杨丹丹. 石蒜碱通过 ERK 信号通路诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及自噬 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(10): 1667-1673.
- [18] 张平, 袁晓慧, 喻婷婷, 等. 石蒜碱通过调控 MAPK/ERK 信号通路抑制人结肠腺癌 LoVo 细胞生长 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(3): 479-486.
- [19] Zhang P, Yuan X H, Yu T T, *et al.* Lycorine inhibits cell proliferation, migration and invasion, and primarily exerts *in vitro* cytostatic effects in human colorectal cancer via activating the ROS/p38 and AKT signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4): 19.
- [20] Tong L, Yu X L, Wang S, *et al.* Research progress on molecular subtyping and modern treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2023, 15: 647-658.
- [21] Asleh K, Riaz N, Nielsen T O. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 265.
- [22] Cho B, Han Y N, Lian M, *et al.* Evaluation of racial/ethnic differences in treatment and mortality among women with triple-negative breast cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7(7): 1016-1023.
- [23] 王成志, 张晓青, 刘一帆, 等. 中药小分子药物在抗肿瘤

- 瘤免疫中的作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(2): 191-196.
- [24] 鲁孟丽, 邱彤, 詹斯文, 等. 中药活性成分单用及联合化疗药物抗肿瘤研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(4): 450-457.
- [25] 韩笑, 王梦斐, 蒲位凌, 等. 中药活性成分通过调节 m6A 甲基化修饰抗肿瘤的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 2123-2130.
- [26] 陈茂杨, 顾志良. 石蒜碱药理作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(4): 469-472.
- [27] 辛国松, 杨燧, 张晶, 等. 基于红细胞免疫功能调节的石蒜碱体内抗肿瘤作用机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 432-440.
- [28] Özkan H G, Thakor V, Xu H G, *et al.* Anticancer aminoferrocene derivatives inducing production of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Chemistry*, 2022, 28(30): e202104420.
- [29] Zhou N N, Chen J, Ling Z, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor sulfenylation promotes glycogenolysis and rescues cancer chemoresistance [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(24): e170753.
- [30] 赵伟, 张华颖, 朱小东. 线粒体功能障碍在恶性肿瘤发生中研究进展 [J]. 医学食疗与健康, 2020, 18(5): 200-201.
- [31] Liu Q Q, Chang C E, Wooldredge A C, *et al.* Tom70-based transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis and aging [J]. *eLife*, 2022, 11: e75658.
- [32] Dankó T, Petővári G, Sztankovics D, *et al.* Rapamycin plus doxycycline combination affects growth arrest and selective autophagy-dependent cell death in breast cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8019.
- [33] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova M K, *et al.* Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [34] Ricci J E, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, *et al.* Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain [J]. *Cell*, 2004, 117(6): 773-786.

[责任编辑 李亚楠]