

石蒜碱通过激活 *STMN1* 阻滞人乳腺癌 MCF-7 细胞周期分子机制研究

冯 洁¹, 綦 峥^{1,3,4#}, 薛沁冰¹, 李超宇¹, 赵梓桐⁵, 王 昊¹, 刘 婷¹, 付叶珊¹, 王 冰^{2*},
于 淼^{1,3,4*}

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. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076
3. 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
4. 黑龙江省肿瘤预防与抗肿瘤药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076
5. 西交利物浦大学慧湖药学院, 江苏 苏州 215123

摘要: 目的 探讨石蒜碱通过激活微管相关基因 *STMN1* 阻滞人乳腺癌 MCF-7 细胞周期相关分子机制。方法 MCF-7 细胞给予石蒜碱干预后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率; 流式细胞术检测 G₂/M 期细胞比例、磷酸化组蛋白 H3 (phosphorylated histone H3, p-H3) 表达; 荧光显微镜观察石蒜碱对 MCF-7 细胞微管形态的影响; qRT-PCR 检测 MCF-7 细胞周期、骨架及微管相关基因的表达; Western blotting 检测 MCF-7 细胞内 5 个周期阻滞相关蛋白的表达。结果 石蒜碱对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 为 13.98 μmol/L。石蒜碱呈剂量相关性地将 MCF-7 细胞阻滞于 G₂/M 期 ($P<0.01$), 并增加 p-H3 表达 ($P<0.05$ 、 0.01)。当石蒜碱浓度为 28 μmol/L 时, 细胞微管形态接近于阳性对照药物长春新碱。石蒜碱可下调 5 个信号传导相关基因, 上调 2 个微管相关基因, 下调 2 个 M 期相关基因, 进而下调 5 个周期阻滞相关蛋白。相关性分析表明石蒜碱通过激活微管相关基因 *STMN1*, 导致微管动态平衡被破坏, 最终导致 M 期阻滞。抑制 *STMN1* 基因后, 石蒜碱无法将 MCF-7 细胞周期阻滞在 M 期。结论 石蒜碱抑制 MCF-7 细胞增殖并通过促进微管解聚将其阻滞于 M 期, 且阻滞 M 期的关键位点是基因 *STMN1*, 为未来药物设计和癌症治疗策略的探索提供了有价值的信息。

关键词: 石蒜碱; MCF-7 细胞; 乳腺癌; M 期阻滞; *STMN1*; 微管蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5125-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.012

Mechanism of lycorine on inhibiting MCF-7 cell cycle by activating *STMN1*

FENG Jie¹, QI Zheng^{1,3,4}, XUE Qining¹, LI Chaoyu¹, ZHAO Zitong⁵, WANG Hao¹, LIU Ting¹, FU Yeshan¹,
WANG Bing², YU Miao^{1,3,4}

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
3. Engineering Research Center of Natural Antitumor Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China
4. Heilongjiang Key Laboratory of Cancer Prophylaxis and Anticancer Drugs Research, Harbin 150076, China
5. Wisdom Lake Academy of Pharmacy, Xi'an Jiaotong Liverpool University, Suzhou 215123, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of lycorine blocking MCF-7 cell cycle through activating microtubule-associated gene *STMN1*. **Methods** After intervention with lycorine on MCF-7 cells, cell proliferation inhibition rate was measured by CCK-8 assay; The proportion of cells in G₂/M phase and phosphorylated histone H3 (p-H3) expression were detected by flow cytometry; The effect of lycorine on microtubule morphology of MCF-7 cells was observed by fluorescence microscopy; The

收稿日期: 2024-01-08

基金项目: 黑龙江省重点研发项目 (2022ZX02C07); 黑龙江省普通高等学校青年创新人才培养计划项目 (UNPYSCT-2020218); 哈尔滨商业大学 2023 年研究生创新科研基金项目 (YJSCX2023-785HSD); 2023 年度哈尔滨商业大学镜湖学者支持计划项目 (JHQNRC06); 哈尔滨商业大学博士科研支持计划项目 (24BQ31)

作者简介: 冯 洁, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 13628675784 E-mail: 413265026@qq.com

#共同第一作者: 綦 峥, 研究员, 博士生导师, 从事中药安全性评价。Tel: 18645039597 E-mail: 18645039597@163.com

*通信作者: 王 冰, 高级工程师, 硕士生导师, 从事药食同源产品开发。Tel: 13945005736 E-mail: iceking85@163.com

于 淼, 研究员, 博士生导师, 从事抗肿瘤药物研究。Tel: 1395005136 E-mail: yumiao913@163.com

expressions of MCF-7 cell cycle, skeleton and microtubule related genes were detected by qRT-PCR; Western blotting was employed to detect the expressions of five cycle arrest related proteins in MCF-7 cells. **Results** The half inhibitory concentration (IC_{50}) of lycorine in MCF-7 cells was 13.98 $\mu\text{mol/L}$. Lycorine inhibited MCF-7 cells in G_2/M phase ($P < 0.01$) and increased p-H3 expression ($P < 0.05, 0.01$) in a dose-dependent manner. When the concentration of lycorine was 28 $\mu\text{mol/L}$, the microtubule morphology of cells was similar to that of the positive control drug vincristine. Lycorine down-regulated five signal transduction-related genes, up-regulated two microtubule-related genes, down-regulated two M phase-related genes, and subsequently down-regulated five cell cycle arrest-related proteins. Correlation analysis indicated that lycorine could disrupt microtubule homeostasis by activating microtubule related gene *STMN1*, and eventually lead to M-phase arrest. After inhibiting *STMN1* gene, lycorine could not block MCF-7 cell cycle in M phase. **Conclusion** Lycorine effectively inhibits the proliferation of MCF-7 cells and induces M-phase arrest by promoting microtubule depolymerization, with the *STMN1* gene being key point of M-phase blockade. This study provides valuable basic information for future drug design and exploration of cancer treatment strategies.

Key words: lycorine; MCF-7 cells; breast cancer; M-phase arrest; *STMN1*; tubulin

乳腺癌已成为女性发病率最高的癌症, 2022 年中国女性乳腺癌新发病例占其总数的 19.6%^[1]。目前放、化疗等治疗方法对人体产生诸多不良反应, 如骨髓抑制、肝、肾毒性等^[2-4], 而化疗药物的耐药性会降低治疗效果。石蒜碱是从天然药物石蒜属植物鳞茎中分离得到的一种异喹啉生物碱^[5], 具有抗炎镇痛、抗肿瘤等广泛的药理活性^[6-7]。研究表明, 石蒜碱可通过非依赖 p53 途径将人乳腺癌 MCF-7 细胞阻滞于 G_2/M 期^[8]。细胞分裂周期因子 25C (cell division cycle 25C, CDC25C) 是 G_2/M 期 DNA 损伤检查位点主要效应子, 石蒜碱下调 CDC25C 的表达使肿瘤细胞阻滞于 G_2/M 期^[8]。故阻滞细胞周期可能是石蒜碱发挥抗肿瘤作用途径之一。然而, 其确切的机制尚未完全阐明。

微管是细胞骨架聚合物, 能够维持细胞形态, 参与纺锤体的形成^[9]。在细胞分裂期, 微管始终处于胞质微管和纺锤体微管互相转化的状态, 这种动态循环使有丝分裂顺利推进^[10-11]。因此, 微管的动态平衡对于有丝分裂的进程至关重要, 而微管平衡的破坏则可导致有丝分裂阻滞。在调控微管解聚的关键蛋白中, 微管不稳定蛋白基因 *Stathmin1* (*STMN1*) 扮演了至关重要的作用。作为一种促进微管解聚的蛋白, *STMN1* 通过加速微管的解聚, 提高微管崩塌的可能性, 从而破坏微管动态平衡^[12]。研究表明, *STMN1* 的过表达会破坏微管稳定性, 导致纺锤体组装失败, 影响细胞周期进程^[13]。*STMN1* 在调控细胞周期特定阶段的微管稳定性中具有重要作用。尤其是在有丝分裂中期至末期, 微管的快速重组对于染色体的正确分离和细胞的正确分裂至关重要。*STMN1* 通过调节微管的动态性, 影响染色体的移动和分离机制, 从而在分裂期间对细胞的分裂精

度产生重大影响^[14]。此外, *STMN1* 的活性受到多种细胞内信号途径的调控, 这些信号途径响应细胞内的环境变化, 如应激和细胞周期信号^[15]。当 *STMN1* 与微管的结合能力降低时, 能减少其解聚活性, 并支持微管的稳定化和纺锤体的正确形成^[16]。因此, *STMN1* 的正确调控是保证细胞能够有效进入和完成有丝分裂的关键。

本研究旨在探讨 MCF-7 细胞内基因与蛋白的相对表达机制, 通过观察微管形态变化证实石蒜碱对乳腺癌的细胞周期阻滞作用, 并进一步确定石蒜碱阻滞 MCF-7 细胞周期的时间点和关键位点。

1 材料

1.1 细胞

MCF-7 细胞株由哈尔滨商业大学药学院药物工程技术研究中心提供。

1.2 药物与试剂

石蒜碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 L413074) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 长春新碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 B20160) 购自上海源叶生物科技有限公司; *STMN1* 抑制剂 GDP366 (质量分数 $\geq 98.78\%$, 批号 501698-03-9) 购自美国 TargetMol 公司; 胎牛血清 (批号 20160402a) 购自杭州四季青生物工程公司; RPMI 1640 培养基 (批号 2038853) 购自美国 Gibco 公司; 细胞周期检测试剂盒 (批号 C1025)、CCK-8 试剂盒 (批号 60118180930)、FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 AG11091289) 均购自江苏碧云天生物科技有限责任公司; 无水乙醇 (批号 20160309) 购自山东银州化工有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 EZ3412D310) 购自德国 BIOFROX 公司; 磷酸化组蛋白 H3 (phosphorylated histone H3, p-H3) 抗体 (批号 AG03233497)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4

(calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV, CAMK4) 兔抗 (批号 AD06175689)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 兔抗 (批号 AH12132188)、信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 兔抗 (批号 AL04042043) 均购自北京博奥森生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔抗 (批号 I03151547)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2) 兔抗 (批号 G09272195)、p21 蛋白激活激酶 1 (p21 protein activated kinase 1, PAK1) 兔抗 (批号 YE1010W) 均购自万类生物科技有限公司; α -Tubulin 抗体 (批号 RH233965) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 抗荧光淬灭封片剂 (批号 111318190306) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 多聚甲醛 (批号 1219A18) 购自北京雷根生物技术有限公司。

1.3 仪器

CKX-41-32 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); TDL-80-2C 型低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); AR1140 型分析天平 (美国 Adventurer 公司); EPICS-XL 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); EPED-E2-30TJ 型实验室级超纯水器 (南京易普易达科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 以 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔。设置对照组、长春新碱 (0.625 μ mol/L) 组和石蒜碱 (1、2、4、8、16、32 μ mol/L) 组, 每组 5 个复孔, 待细胞贴壁后, 各给药组加入不同浓度的药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h, 另设置不接种细胞不含药物的空白孔。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂培养 2 h, 于 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算各给药组的细胞抑制率和石蒜碱的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 流式细胞仪检测细胞周期分布

将生长状态良好的 MCF-7 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组、长春新碱 (0.625 μ mol/L) 组和石蒜碱低、中、高剂量 (7、14、28 μ mol/L) 组, 每组 5 个复孔。细胞贴壁后加入不同浓度的药物处理 48 h, 对照组加入不含药物的培养基。

收集细胞制成细胞悬液后, 转移至离心管, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每管加入 0.25 μ L PBS 和 0.75 μ L 预冷无水乙醇固定 24 h。避光加入 450 μ L 碘化丙啶 (propidium, PI)、180 μ L 核糖核酸酶 A (ribonuclease A, RNaseA) 和 9 mL 染色缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 上机检测。

2.3 流式细胞仪检测 p-H3 蛋白表达

按“2.2”项下方法进行分组和给药, 将贴壁细胞制成细胞悬液, 转移至离心管中, 1 300 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 每个样品加入 500 μ L 4%多聚甲醛, 室温固定 10 min; 离心清洗后, 加入 500 μ L 0.1% Triton X-100 室温透化 5 min; 加入 500 μ L p-H3 抗体 (1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 离心, PBS 清洗后吹匀, 避光检测。

2.4 荧光显微镜检测石蒜碱对 MCF-7 细胞微管蛋白表达的影响

按“2.2”项下方法分组和给药, 收集细胞, 加入 1 mL 0.1% Triton X-100 室温透化 5 min, 加入 5%牛血清白蛋白阻断缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 加入 500 μ L α -Tubulin 抗体 (1:500) 于爬片上, PBS 溶液洗涤细胞 2 次, 滴加二抗 (1:3 000), 室温避光孵育 1 h, 加入抗荧光淬灭封片剂, 于荧光显微镜下观察微管蛋白 FITC 染色情况并拍照。

2.5 qRT-PCR 检测周期相关基因表达

按“2.2”项下方法分组和给药, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。选择表达变化较高的微管相关基因 [STMN1、有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白 (mitotic centromere-associated kinesin, KIF2C)、剪切蛋白催化亚基 A1 (katanin catalytic subunit A1, KATNAL1)、间期中心体相互作用蛋白 (interphase centrosome interacting protein, ICIS)、微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2)、微管相关蛋白 Tau (microtubule-associated protein Tau, MAPT)], 信号传导相关基因 [STAT3、PAK1、ERK、PKA、CAMK4] 以及 M 期相关基因 [细胞周期蛋白 2 (Cyclin B2, CCNB2)、CDC25C、细胞周期蛋白 F (Cyclin F, CCNF)、细胞分裂周期蛋白 6 (cell division cycle 6, CDC6)、细胞分裂周期蛋白 20 (cell division cycle 20, CDC20)、胞极光激酶 B (aurora kinase B, AURKB)、细胞分裂周期蛋白 2 (cell division cycle 2, CDC2)], 共检测 24 个周期基因表达。引物由上海启因公司提供, 引物序列见表 1。以 GAPDH 作

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物	反向引物
<i>CCNB2</i>	5'-TGCTCTGCAAAATCGAGGACA-3'	5'-GCCAATCCACTAGGATGGCA-3'
<i>CCNF</i>	5'-CACAAAGCATCCATATTGCACTG-3'	5'-TGGTCAGACATCCCTGATGAG-3'
<i>CDC25C</i>	5'-TCTACGGAACCTTTCTCATCCAC-3'	5'-TCCAGGAGCAGGTTTAACATTTT-3'
<i>CDC6</i>	5'-TGTTCTCCTCGTGTAAGGCC-3'	5'-GGGGAGTGTTGCATAGGTTGT-3'
<i>CDC20</i>	5'-GCTTTGAACCTGAACGGTTTTG-3'	5'-TCTGGCGCATTTTGTGGTTTT-3'
<i>MRE11A</i>	5'-ATCGGCCTGTCCAGTTTGAAA-3'	5'-TGCCATCTTGATAGTTCACCCAT-3'
<i>RAD51</i>	5'-CAGAGTCTGCATTTAGTGCTGA-3'	5'-ACAGGTGAGTTCCTGATAAAGAT-3'
<i>KIF2C</i>	5'-CTGTTTCCCGGTCTCGCTATC-3'	5'-AGAAGCTGTAAGAGTTCTGGGT-3'
<i>STMN1</i>	5'-TCAGCCCTCGGTCAAAAGAAT-3'	5'-TTCTCGTGCTCTCGTTTCTCA-3'
<i>KATNA1</i>	5'-AGCACTCCCTTGAAAGCGG-3'	5'-GCGTTTTCTAGTCTGGTGA-3'
<i>MAP2</i>	5'-CTCAGCACCGCTAACAGAGG-3'	5'-CATTGGCGCTTCGGACAAG-3'
<i>MAPT</i>	5'-CCAAGTGTGGCTCATTAGGCA-3'	5'-CCAATCTTCGACTGGACTCTGT-3'
<i>RhoA</i>	5'-GGAAAGCAGGTAGAGTTGGCT-3'	5'-GGCTGTCGATGGAAAAACACAT-3'
<i>Rac1</i>	5'-GTGCAGACACTTGCTCTCCT-3'	5'-AATGGCAACGCTTCATTCCG-3'
<i>Diaph1</i>	5'-CTTGCGGGATATGCCTCTG-3'	5'-AATGTTTGCACCCAAGTACA-3'
<i>CDC42</i>	5'-AACTGTGCGTCTCCTGCG-3'	5'-TCTCCACCGGGCGTT-3'
<i>STAT3</i>	5'-CAGCAGCTTGACACACGGTA-3'	5'-AAACACCAAAAGTGGCATGTGA-3'
<i>PAK1</i>	5'-AGGGGAGTTTACGGGAATGC-3'	5'-TCTTCTGCTCCGACTTAGTGATA-3'
<i>PKA</i>	5'-AGCCCACTTGGATCAGTTTGA-3'	5'-GTTCCCGGTCTCCTTGTGT-3'
<i>CAMK4</i>	5'-GCCTCGTCCCGGATTACTG-3'	5'-TCCCCTTCTGTTTGCATCTGT-3'
<i>ERK</i>	5'-TCACACAGGGTTCCTGACAGA-3'	5'-ATGCAGCCTACAGACCAAAATATC-3'
<i>Aurkb</i>	5'-CGCAGAGAGATCGAAATCCAG-3'	5'-AGATCCTCCTCCGGTCATAAAA-3'
<i>CDC2</i>	5'-GGATGTGCTTATGCAGGATTCC-3'	5'-CATGTACTGACCAGGAGGGATAG-3'
<i>ICIS</i>	5'-CCGGGGAGAGCTAGTCACT-3'	5'-CTGCTGGACGAATGCTTCA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算周期阻滞基因的相对表达量,并在微生信平台进行聚类分析。

2.6 Western blotting 检测 STAT3、PAK1、ERK1/2、PKA、CAMK4 蛋白表达

取生长状态良好的 MCF-7 细胞以 4×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,培养 24 h,按“2.2”项下方法分组和给药,培养 48 h 后,收集细胞。加入裂解液,于冰上裂解,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,沸水浴 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭 2 h,分别加入一抗 GAPDH (1:1 000)、STAT3 (1:500)、PAK1 (1:100)、ERK1/2 (1:500)、PKA (1:100)、CAMK4 (1:500),4 °C 孵育过夜;次日,洗膜后加入二抗 (1:3 000),室温孵育 1 h,化学发光显色,用 Image J 软件分析条带灰度值,Origin 进行相关性分析。

2.7 流式细胞仪检测 STMN1 抑制剂 GDP366 联合石蒜碱对细胞周期阻滞的逆转性

将生长状态良好的 MCF-7 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,设置对照组、GDP366 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 组和 GDP366 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) + 石蒜碱 (7、14、28 $\mu\text{mol/L}$) 组。细胞贴壁后,各给药组加入 GDP366 或不同浓度的石蒜碱处理 48 h^[17],对照组加入不含药物的培养基。收集细胞,制成悬液后转移至离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,用 0.25 μL

PBS 和 0.75 μL 预冷无水乙醇固定 24 h。避光加入细胞周期检测试剂,常温孵育 30 min,上机检测。结果用 FlowJo 10.8.1 软件分析。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析,采用 Cytoscape 3.9.1、Graphpad Prism 7.0 和 Origin 2021 软件绘图。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。

3 结果

3.1 石蒜碱对 MCF-7 细胞增殖的影响

如表 2 所示,石蒜碱对 MCF-7 细胞的增殖有显著的抑制作用 ($P < 0.01$),并呈剂量相关性。当石蒜碱浓度达到 16 $\mu\text{mol/L}$,其抑制率接近于阳性对照

表 2 石蒜碱对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effect of lycorine on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	细胞抑制率/%
对照	—	1.36 $\pm$ 0.07	—
长春新碱	0.625	0.89 $\pm$ 0.05**	52.7
石蒜碱	1	1.19 $\pm$ 0.13**	14.9
	2	1.08 $\pm$ 0.09**	24.8
	4	0.97 $\pm$ 0.16**	33.7
	8	0.93 $\pm$ 0.05**	37.7
	16	0.78 $\pm$ 0.04**	51.2
	32	0.63 $\pm$ 0.03**	64.1

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 表 3 同。

** $P < 0.01$ vs control group, same as Table 3.

药物长春新碱,表明石蒜碱对 MCF-7 细胞有显著的增殖抑制作用, IC_{50} 为 $13.98 \mu\text{mol/L}$, 并确定后续实验的剂量为 7、14、28 $\mu\text{mol/L}$ [18]。

3.2 石蒜碱对 MCF-7 细胞周期的影响

3.2.1 石蒜碱将 MCF-7 细胞阻滞于 G₂/M 期 为了

判断石蒜碱是否通过诱导细胞周期阻滞抑制细胞增殖, 分析了石蒜碱处理 MCF-7 细胞后周期各阶段占比。如图 1 和表 3 所示, 石蒜碱呈剂量相关性地诱导 G₂/M 期细胞周期阻滞 ($P < 0.01$)。表明石蒜碱诱导 MCF-7 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。

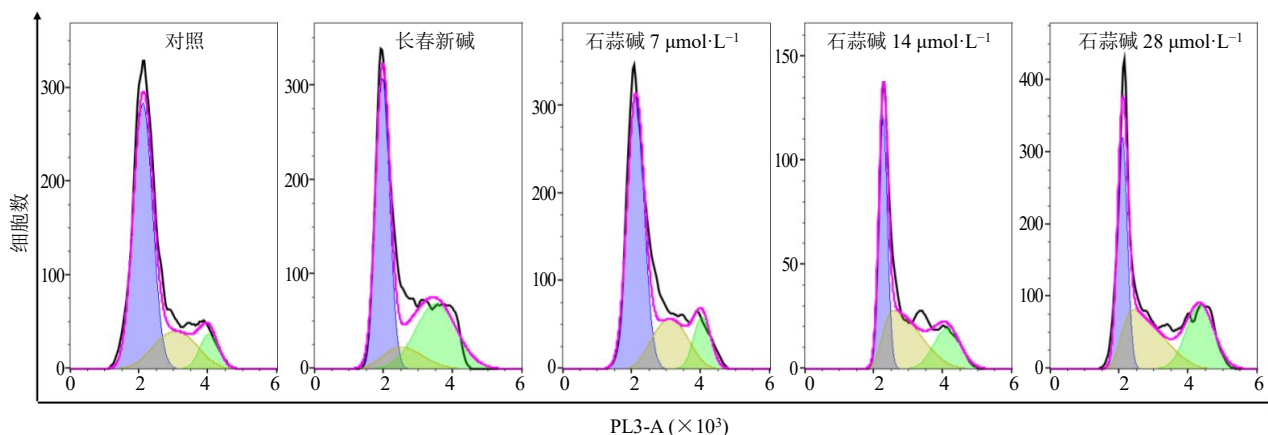


图 1 石蒜碱对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig. 1 Effect of lycorine on cell cycle of MCF-7 cells

表 3 石蒜碱对 MCF-7 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of lycorine on cell cycle distribution of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞比例/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	—	55.545 ± 0.929	35.216 ± 5.742	9.528 ± 0.136
长春新碱	0.625	53.122 ± 1.012	11.643 ± 4.284	$35.667 \pm 0.585^{**}$
石蒜碱	7	49.826 ± 1.321	34.696 ± 0.561	$11.138 \pm 0.884^{**}$
	14	42.851 ± 1.099	41.614 ± 1.716	$15.472 \pm 0.169^{**}$
	28	38.656 ± 1.425	40.386 ± 0.897	$21.154 \pm 0.360^{**}$

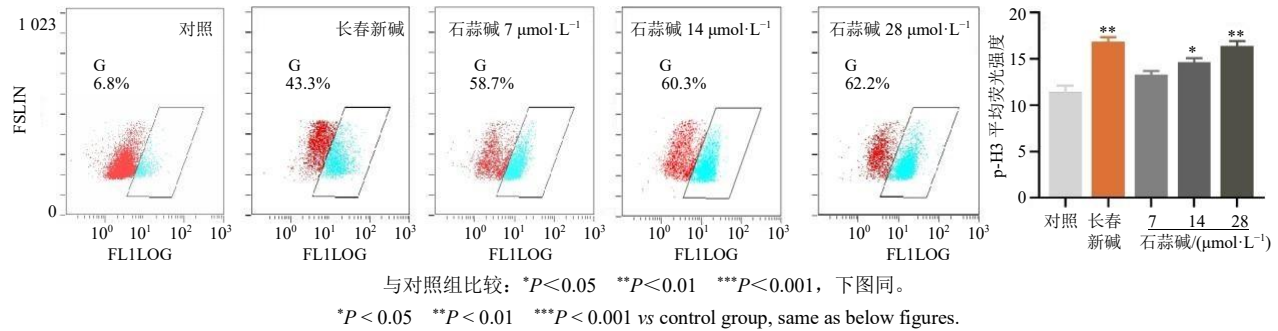
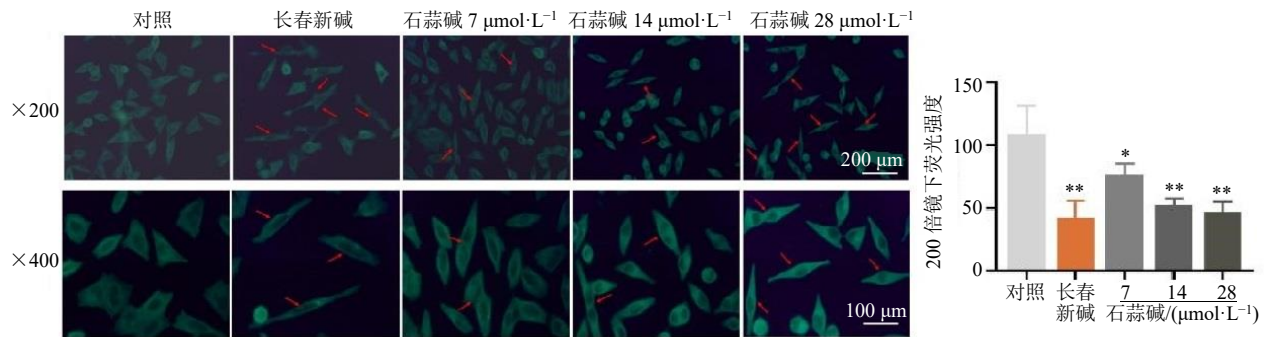
3.2.2 石蒜碱对周期标志蛋白 p-H3 表达的影响 H3 在有丝分裂期开始时在丝氨酸位点发生磷酸化, 当细胞处于 M 期时, p-H3 的表达量会显著增加。因此, p-H3 的存在和水平变化常被用来监测细胞是否处于 M 期。为了确定石蒜碱将细胞阻滞在 G₂ 期还是 M 期, 采用流式细胞术检测了 MCF-7 细胞中 p-H3 的表达。如图 2 所示, 与对照组比较, 石蒜碱 (14、28 $\mu\text{mol/L}$) 组 p-H3 的平均荧光强度明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂量相关性。M 期细胞占比从 6.8% 增加到 62.2%, 表明石蒜碱可明显增加 MCF-7 细胞内 p-H3 的表达, 进而说明石蒜碱可将 MCF-7 细胞阻滞于 M 期。

3.2.3 石蒜碱对 MCF-7 细胞内微管蛋白表达的影响 进一步采用免疫荧光分析观察 MCF-7 细胞的形态学变化, 如图 3 所示, 对照组微丝、微管呈束状, 细胞形态正常。随着石蒜碱浓度增加, 微管蛋

白束状纤维变长, 细胞骨架拉长, 当剂量达到 28 $\mu\text{mol/L}$ 时, 微管形态与长春新碱组相似。表明石蒜碱在细胞和分子水平上诱导微管蛋白聚合, 石蒜碱在 MCF-7 细胞中具有微管蛋白靶向功能。

3.3 石蒜碱对 MCF-7 细胞内周期相关基因表达的影响

采用 qRT-PCR 检测 24 个细胞周期相关基因, 如图 4 所示, MCF-7 细胞给予石蒜碱干预后, 5 个信号传导相关基因 (*STAT3*、*PAK1*、*ERK*、*PKA*、*CAMK4*) 下调, 微管中 2 个基因 (*MAPT*、*MAP2*) 下调、4 个基因 (*STMN1*、*KIF2C*、*KATNAL1*、*ICIS*) 上调, 4 个骨架相关基因 (*RhoA*、*Diaph1*、*Rac1*、*CDC42*) 均下调, 2 个 DNA 修复相关基因 (*RAD51*、*MRE11A*) 均下调, 7 个 M 期相关基因 (*CCNB2*、*CDC6*、*CCNF*、*CDC25C*、*Aurkb*、*CDC20*、*CDC2*) 均下调, 且呈剂量相关性 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

图 2 石蒜碱对 MCF-7 细胞内 p-H3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effect of lycorine on intracellular p-H3 protein expression in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)红色箭头表示 α -微管蛋白形态异常。Red arrows indicate abnormal α -tubulin morphology.图 3 石蒜碱对 MCF-7 细胞内微管蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of lycorine on microtubulin expression in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

为探究石蒜碱调控周期相关基因的表达对 MCF-7 细胞的影响, 深入分析了这 24 个基因之间的相互作用关系, 并对这些基因和各给药组进行聚类分析。24 个基因分为 3 类, 即 *Aurkb*、*CCNB2*、*Diaph1*、*CCNF*、*PAK1*、*MRE11A*、*PKA*、*STAT3*、*RAC1*、*CDC25C*、*CDC6*、*MAP2*、*CDC20*、*CDC42*、*RAD51* 相似; *MAPT*、*RhoA*、*CDC2*、*CAMK4*、*ERK* 相似; *KATNA1*、*ICIS*、*KIF2C* 和 *STMN1* 相似。5 个实验组分为 2 类, 对照组和石蒜碱低剂量 ($7 \mu\text{mol/L}$) 组为一类, 长春新碱组和石蒜碱中、高剂量 (14 、 $28 \mu\text{mol/L}$) 组为一类。结果表明, 石蒜碱可能通过下调信号传导相关基因阻滞 MCF-7 细胞周期推进, 这可能与促微管解聚基因的聚集有关。

3.4 石蒜碱对 MCF-7 细胞周期阻滞相关蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测了 5 个蛋白在 M 期的表达, 如图 5 所示, 与对照组比较, 石蒜碱显著抑制 *STAT3*、*PAK1*、*CAMK4*、*PKA* 和 *ERK1/2* 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 呈剂量相关性。

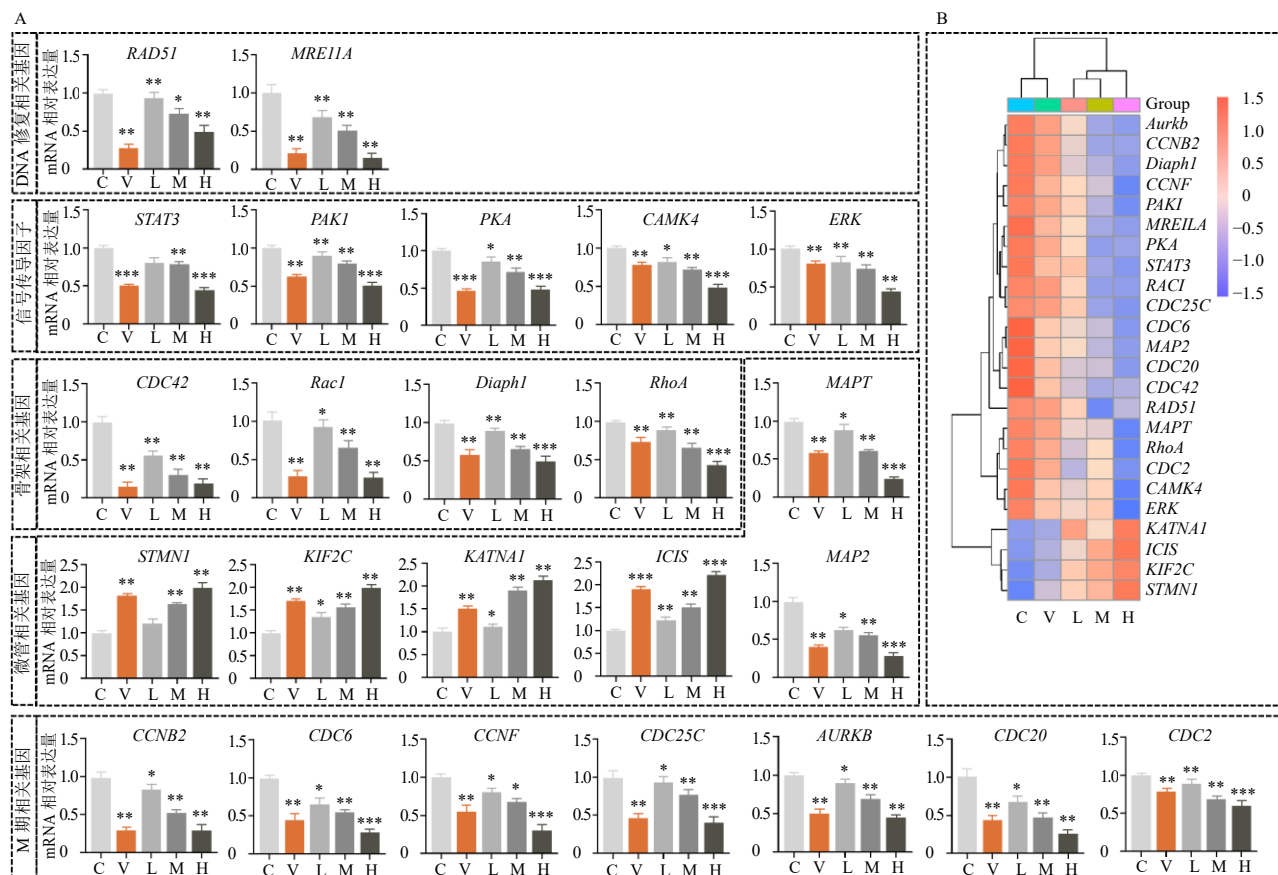
表明石蒜碱可能触发了 MCF-7 细胞的 M 期阻滞。

3.5 MCF-7 细胞周期阻滞相关蛋白与基因的相关性分析

本研究对 7 个蛋白和 24 个基因进行了相关性分析。结果显示, *STMN1* 在微管动态调控和纺锤体组装检查点的启动中起着核心作用。在石蒜碱处理相关基因表达模式中, *STMN1* 与多个关键调控蛋白 *STAT3*、*PAK1*、*PKA*、*CAMK4*、*ERK1*、*ERK2* 显示出高度相关性。颜色越深, 说明基因和蛋白的表达量较高, 线条越粗, 基因与蛋白之间的相关性越强 (图 6-A)。

如图 6-B 所示, *STMN1* 基因和 *PKA*、*ERK1* 蛋白极显著相关 ($P < 0.001$), *STMN1* 基因与 *ERK2*、p-H3 蛋白显著相关 ($P < 0.01$), *STMN1* 基因和 *CAMK4* 蛋白相关性最弱。表明在 *STMN1* 介导的微管动态平衡中 *PKA* 和 *ERK1* 扮演着重要角色。

STMN1 基因与 6 个蛋白 *STAT3*、*PAK1*、*PKA*、*CAMK4*、*ERK1*、*ERK2* 呈负相关, 表明石蒜碱可能通过增强 *STMN1* 的表达来抑制这些蛋白的活性,



C-对照组; V-长春新碱组; L-石蒜碱 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; M-石蒜碱 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; H-石蒜碱 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。

C-control group; V-vincristine group; L-lycorine 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; M-lycorine 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; H-lycorine 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图4 石蒜碱对 MCF-7 细胞内周期相关基因表达的影响 (A) 及聚类分析 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of lycorine on cell cycle-related gene expressions in MCF-7 cells (A) and cluster analysis (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

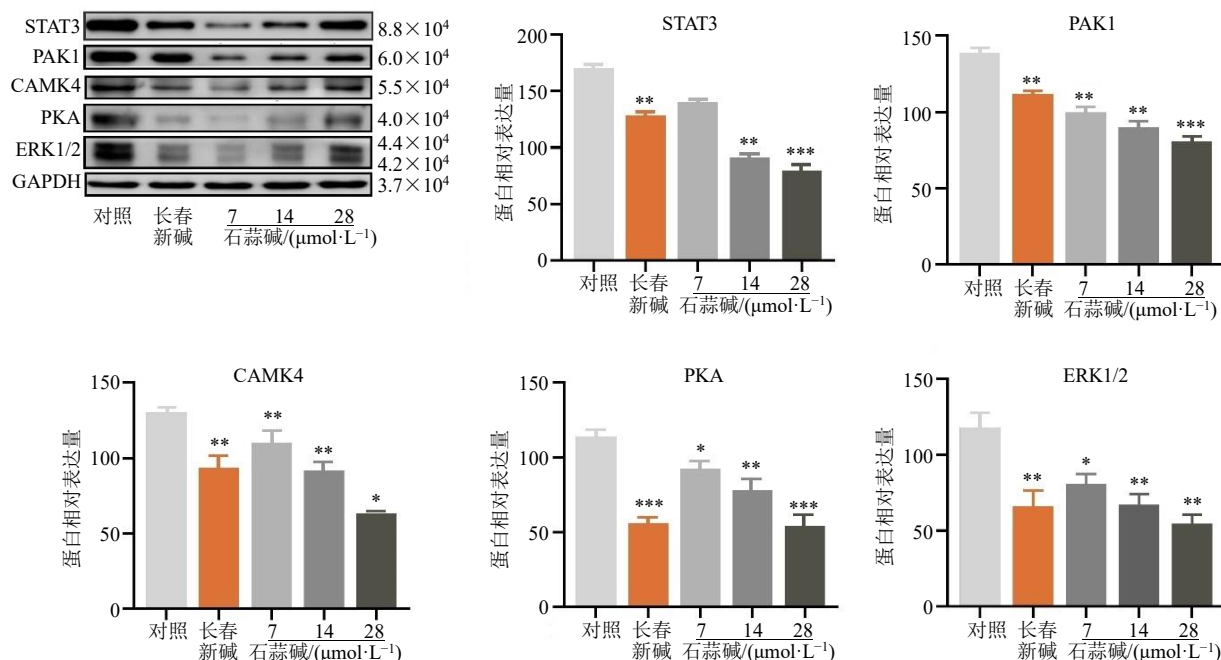
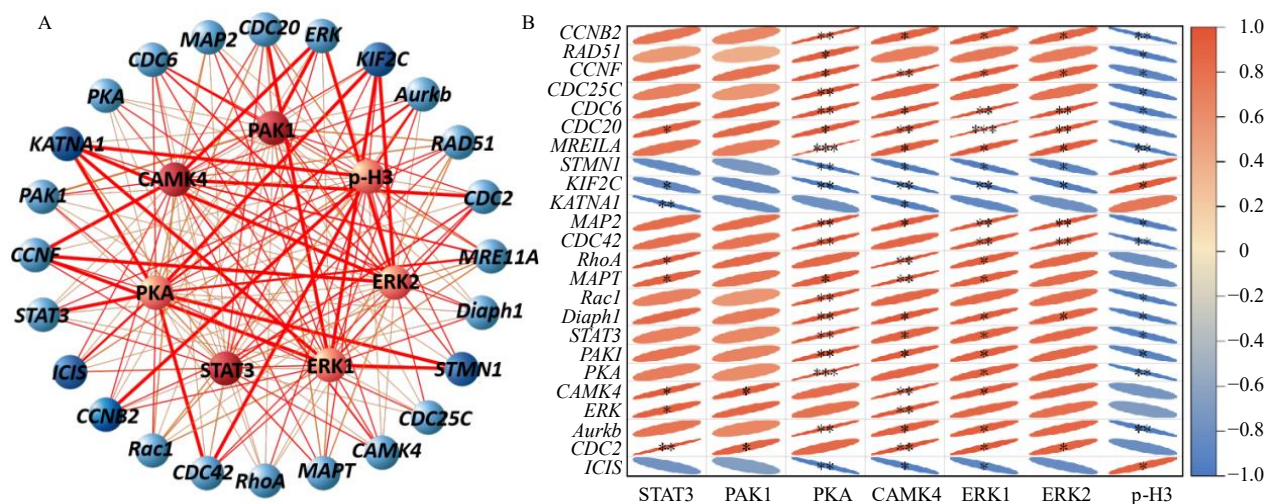


图5 石蒜碱对 MCF-7 细胞内 *STMN1* 调控蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of lycorine on expressions of *STMN1* regulatory proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-细胞周期阻滞相关蛋白与基因的调控网络图, 红线表示高度显著相关, 黄线表示显著相关; B-细胞周期阻滞相关蛋白与基因的热图分析, 黄色代表正相关, 蓝色代表负相关, *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001。

A-regulatory network map of cell cycle arrest-related proteins and genes, red line presents the highly significant correlation, yellow line presents the significant correlation; B-heatmap analysis of cell-cycle arrest-related proteins versus genes, yellow color represents a positive correlation, blue color represents a negative correlation, *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001.

图 6 石蒜碱诱导细胞周期阻滞的相关机制

Fig. 6 Relevant mechanisms of lycorine-induced cell-cycle arrest

从而进一步影响细胞周期的阻滞。此外, *STMN1* 与 p-H3 蛋白呈正相关, 揭示 *STMN1* 可能通过 p-H3 影响染色质的凝聚状态, 从而参与纺锤体组装和有丝分裂的检查点。结果提示, 石蒜碱通过激活微管相关基因 *STMN1*, 导致微管动态平衡被破坏, 纺锤体组装检查点被启动, 最终诱导 M 期阻滞。

3.6 石蒜碱联合 GDP366 对 MCF-7 细胞周期阻滞的影响

通过相关性分析发现 *STMN1* 可能成为石蒜碱阻滞 MCF-7 细胞周期的关键位点, 为了验证这一发现, 设计了逆转实验, 通过流式细胞术检测 *STMN1* 抑制剂 GDP366 联合石蒜碱处理 MCF-7 细胞的 G₂/M 阶段占比。如图 7 所示, 各组 G₂/M 期细胞比

例无显著性差异。表明抑制 *STMN1* 基因后, 石蒜碱无法将 MCF-7 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。

4 讨论

乳腺癌是全球女性中最普遍的癌症, 每年导致全球约 230 万新发病例和 69 万人死亡^[19], 但是手术或者放化疗等手段会对患者造成不可逆的损伤。细胞周期阻滞可能是癌症治疗的重要策略^[20]。文献报道, H3 的磷酸化是调控细胞周期的关键步骤, 在 DNA 复制和染色体分离的调控中起着关键作用^[21]。在细胞周期中, p-H3 修饰发生在有丝分裂的早期阶段^[22], H3 磷酸化是细胞处于 M 期的标志, 与染色质凝缩和分裂息息相关。本研究通过流式细胞仪检测结果显示, 石蒜碱诱导 MCF-7 细胞周期阻滞在

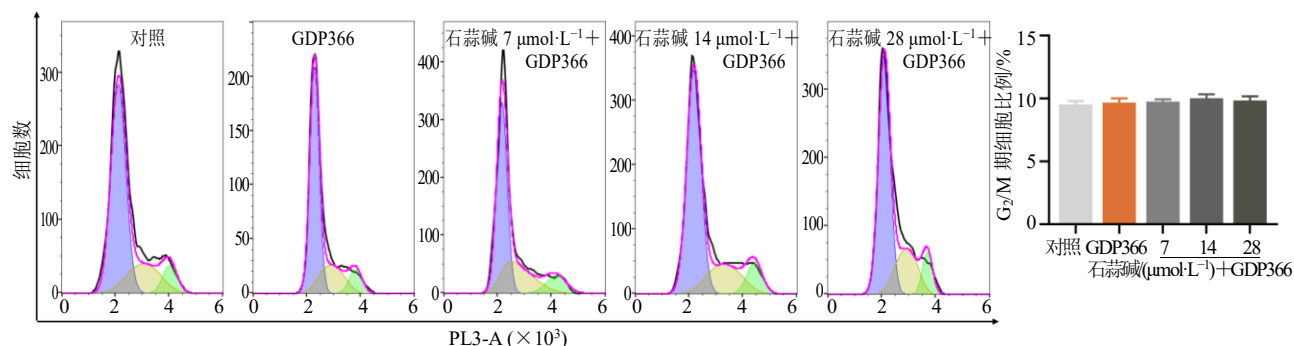


图 7 GDP366 联合石蒜碱对 MCF-7 细胞内 G₂/M 期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of GDP366 combined with lycorine on intracellular G₂/M phase in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

G₂/M 期。此外,对 24 个细胞周期相关基因和 7 个高表达变化的周期阻滞相关蛋白进行了分析。石蒜碱能够显著增强 MCF-7 细胞有丝分裂期标志蛋白 p-H3 的表达,这些结果提示,石蒜碱诱导 MCF-7 细胞的 M 期细胞周期阻滞,而非 G₂ 期。

除了细胞周期阻滞外,破坏微管动力平衡是癌症治疗中另一个选择。在癌细胞中,微管动力学的改变可导致细胞分裂的改变,并形成异常细胞^[23]。肿瘤化疗中使用的微管靶向药物通过破坏微管的正常结构和稳定性^[24],导致细胞周期阻滞和细胞凋亡。本研究系统地探讨了石蒜碱对 MCF-7 细胞中 *STMN1* 调控网络的影响,特别是涉及到的关键调控因子 *STAT3*、*PKA*、*PAK1*、*CAMK4*、*ERK*、*Aurkb*、*CDC2*、*ICIS*。*STMN1* 作为一种核心的微管解聚因子,对细胞微管动态平衡具有决定性作用,石蒜碱显著调节了 *STMN1* 相关的多个基因和蛋白的表达,进一步诱导了细胞周期的阻滞。

PKA、*PAK1*、*CAMK4* 和 *ERK* 广泛参与调控细胞信号传递路径和细胞周期进程,*STMN1* 通过下调这些关键因子,进而干预微管的动态平衡和纺锤体的形成。同时,*STMN1* 通过下调 *PKA* 和 *CAMK4* 导致微管稳定性降低。此外,*STAT3* 和 *Aurkb* 的表达在石蒜碱处理后下降,而 *ICIS* 表达则上升。这些变化可能反映了细胞为应对微管动态平衡被干扰而采取的应激反应。*ICIS* 的上升,可能是细胞试图通过其他机制稳定微管结构和维持细胞骨架的完整性。结果提示,石蒜碱可能主要通过激活 *STMN1* 的调控网络,从而影响相关基因和蛋白的表达,导致微管结构的解聚加速,纺锤体无法正常组装,最终导致细胞周期在 M 期的阻滞。

综上,本研究揭示了石蒜碱通过激活 MCF-7 细胞 *STMN1* 基因,进而调控周期相关基因和蛋白,从而通过干扰微管解聚发挥周期阻滞的关键作用,且 *STMN1* 成为阻滞 MCF-7 细胞周期的关键位点。该位点为今后以石蒜碱及其衍生物为主要成分的抗肿瘤新药研发和应用提供数据支撑,为后续的临床研究奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 尹周一,王梦圆,游伟程,等. 2022 美国癌症统计报告解读及中美癌症流行情况对比 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(2): 54-63.
- [2] Denise de Lima Bezerra A, Matias de Sousa I, Silva de

Souza A P, *et al.* Early nutritional intervention does not prevent long-term adverse events in women with breast cancer: A pilot study [J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2023, 53: 268-273.

- [3] 华辞怡,史有阳,谢颖,等. 淫羊藿有效成分治疗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6593-6600.
- [4] 杨紫焰,李倩倩,张翠香,等. 植物多糖抗乳腺癌作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(5): 1343-1347.
- [5] 黄灵芳,张勉. 石蒜碱抗肿瘤作用研究进展 [J]. 心血管外科杂志: 电子版, 2019, 8(2): 215.
- [6] Jin Y H, Min J S, Jeon S, *et al.* Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections [J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153440.
- [7] 辛国松,侯妍秀,王毛毛,等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4056-4064.
- [8] 于淼,付叶珊,王冰,等. 中药有效成分对肿瘤细胞 G₂/M 期调控的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3707-3713.
- [9] 万超超,曹林忠,王多贤,等. 微管调控成骨细胞功能的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(9): 1360-1364.
- [10] Shin S C, Im S K, Jang E H, *et al.* Structural and molecular basis for katanin-mediated severing of glutamylated microtubules [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(5): 1357-1367.
- [11] 李玲璐,李霞. 基于微管靶点的抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 139-143.
- [12] Yoshie M, Ishida A, Ohashi H, *et al.* Stathmin dynamics modulate the activity of eribulin in breast cancer cells [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2021, 9(4): e00786.
- [13] Morone M V, Zannella C, Rinaldi M, *et al.* Comment on: Stathmin1 overexpression associated with polyploidy, tumor-cell invasion, early recurrence, and poor prognosis in human hepatoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(20): 10313-10315.
- [14] Ringhoff D N, Cassimeris L. Stathmin regulates centrosomal nucleation of microtubules and tubulin dimer/polymer partitioning [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(15): 3451-3458.
- [15] 孙涛,余祖启,张劲夫,等. 三氧化二砷对 HepG2 细胞 *STMN1* 表达的影响及沉默 *STMN1* 对 HepG2 细胞凋亡的促进作用 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2023, 37(7): 654-660.
- [16] Zeng L Z, Lyu X, Yuan J Y, *et al.* *STMN1* promotes tumor metastasis in non-small cell lung cancer through

- microtubule-dependent and nonmicrotubule-dependent pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(4): 1509-1527.
- [17] Carlos J A E G, Lima, Costa-Lotufo L V, *et al.* AD80, a multikinase inhibitor, exhibits antineoplastic effects in acute leukemia cellular models targeting the PI3K/STMN1 axis [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(4): 1139-1149.
- [18] Yu L, Han S, Lang L, *et al.* Oxocresbanine: A novel dual topoisomerase inhibitor, suppressed the proliferation of breast cancer cells MCF-7 by inducing DNA damage and mitotic arrest [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153504.
- [19] Jia Z Q, Huang Y S, Liu J Q, *et al.* Single nucleotide polymorphisms associated with female breast cancer susceptibility in Chinese population [J]. *Gene*, 2023, 884: 147676.
- [20] Suski J M, Braun M, Strmiska V, *et al.* Targeting cell-cycle machinery in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(6): 759-778.
- [21] Ren B B, Chen E S. Regulation of centromeric heterochromatin in the cell cycle by phosphorylation of histone H3 tyrosine 41 [J]. *Curr Genet*, 2019, 65(4): 829-836.
- [22] 张冰, 徐茜, 唐存多, 等. 组蛋白 H3 Thr3 磷酸化在 Sf9 细胞有丝分裂中的动态定位 [J]. *昆虫学报*, 2018, 61(11): 1247-1252.
- [23] 季宇彬, 刘家源, 高世勇. 龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响 [J]. *中草药*, 2012, 43(1): 111-114.
- [24] 徐筱雅, 刘尚明, 张爱霞. 微管靶向药物抗肿瘤侵袭转移潜力研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2023, 40(2): 196-200.

[责任编辑 李亚楠]