

基于 Hedgehog 通路探究防己诺林碱对三阴性乳腺癌抗肿瘤机制的实验研究

张艳辉¹, 王炳高², 邢志博², 王凤梅², 侯红²

(1.青岛大学, 山东 青岛 266042; 2.青岛市中心医院, 山东 青岛 266042)

摘要: [目的] 探究防己诺林碱对三阴性乳腺癌抗肿瘤机制。[方法] MTT 法检测防己诺林碱对三阴性乳腺癌细胞的抑制率, 计算 IC_{50} ; 细胞流式实验观察防己诺林碱对三阴性乳腺癌细胞的凋亡影响; Western blot 法探究防己诺林碱对 Smo 及 Gli1 蛋白表达的影响。[结果] 防己诺林碱对三阴性乳腺癌细胞 BT549 的活力有影响, IC_{50} 值为 $8.99\mu\text{mol/L}$ 。随着防己诺林碱浓度升高细胞死亡率增加, 三阴性乳腺癌细胞 BT549 通路 Hedgehog 中的 Smo、Gli1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。FAN 可以抑制肿瘤的生长。[结论] 防己诺林碱可通过下调细胞凋亡相关信号通路 Hedgehog 来影响三阴性乳腺癌细胞凋亡, 同时影响三阴性乳腺癌肿瘤的生长。**关键词:** 防己诺林碱; 三阴性乳腺癌; 凋亡; Hedgehog 信号通路; 肿瘤
中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)05-0401-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.05.B008

Anti-tumor Mechanism of Fangchinoline in Triple Negative Breast Cancer Based on Hedgehog Signaling Pathway

ZHANG Yan-hui¹, WANG Bing-gao², XING Zhi-bo², et al.

(1. Qingdao University Medical College, Qingdao 266042, China; 2. Qingdao Central Hospital, Qingdao 266042, China)

Abstract: [Objective] To explore the anti-tumor mechanism of Fangchinoline in triple negative breast cancer based on hedgehog signaling pathway. [Methods] Three negative breast cancer (TNBC) BT549 cells were treated with fangchinoline. The inhibition rate of BT549 cells was detected by MTT and IC_{50} was calculated; the cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of Smo and Gli1 protein was detected by Western blot. [Results] Fangchinoline inhibited the proliferation of BT549 cells with a IC_{50} of $8.99\mu\text{mol/L}$. Flow cytometry showed that Fangchinoline induced the apoptosis of BT549 cells in a dose-dependent manner. The expression of Smo and Gli1 in the BT549 cells was declined with the increasing Fangchinoline concentration. Fangchinoline also inhibited the growth of BT549 breast cancer grafts in tumor-bearing nude mice. [Conclusion] Fangchinoline inhibits cell growth and enhances cell apoptosis of TNBC cells in vitro and in vivo, which may be associated with the regulation by hedgehog signaling pathway.
Subject words: Fangchinoline; triple negative breast cancer; cell apoptosis; hedgehog signaling pathways; tumor

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阴性、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 阴性、人类表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2) 低表达的乳腺癌, 占乳腺癌的 15%~20%, 并且 TNBC 类型发病年龄较其他类型更年轻, 一般低于 50 岁, 目前治疗手段相对匮乏, 且总生存率较低、

复发率较高^[1]。由于 TNBC 细胞具有高增殖特性, 因而抑制增殖信号通路可能会对这类乳腺癌有效。Hedgehog (Hh) 信号通路在多种肿瘤组织与细胞系中异常激活, 并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭转移等密切相关, 阻断肿瘤细胞中 Hh 信号传导通路将为人类肿瘤的治疗提供一个新的有效手段。防己诺林碱 (fangchinoline, FAN) 是从中药防己中提取的一种单体, 近年来研究显示主要有抗肿瘤、抗肿瘤细胞多药耐药、抗病原微生物、抗神经毒性等作用^[2], 但其作用机制尚不十分清楚。本实验旨

通讯作者: 王炳高, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 硕士; 青岛市中心医院乳腺诊疗中心, 青岛市四方区四流南路 127 号 (266042); E-mail: wbgqd1965@163.com
收稿日期: 2016-09-20; **修回日期:** 2017-01-09

在基于 Hedgehog 信号通路在细胞中的作用,进一步阐明 FAN 对 TNBC 的治疗作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物与试剂

人乳腺癌细胞株 BT549 购自中科院上海细胞库;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶购自美国 Gibco 公司;FAN、盐酸表柔比星购自阿拉丁;兔抗 Smo、Gli1 一抗购自 Abcam 公司;兔二抗、GAPDH 购于博士德生物工程有限公司;二甲基亚砜购于 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液购于吉诺生物医药技术有限公司。SPF 级裸鼠 *nunu* 购于北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(京)2012-0001),裸鼠周龄 4~6 周,体重 18~20g,30 只、饲料(经 Co60 照射)、垫料购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞 BT549 培养于 10% RPMI 1640 (RPMI 1640+10% FBS+0.5% Enrofloxacin),5% CO₂、37℃ 无菌培养箱。

细胞生长至培养皿底约 80%~90% 时进行细胞传代;吸弃培养基,0.25%胰酶消化 2min 后,加含 10% RPMI 1640 终止消化;吹打细胞吸至 15ml 离心管,离心 1500rpm×3min;吸弃上清,加 10% RPMI 1640 重悬后转移至培养皿培养,传至 3 代后,进行实验。

1.3 细胞活力检测

MTT 法检测 FAN 对细胞活力的影响。取对数生长期 BT549 细胞,细胞浓度 10⁶/ml,按 200μl/孔、4000 个/孔接种于 96 孔平底培养板,边缘设为调零孔(加 200μl PBS),置无菌培养箱培养 24h 后,加不同浓度(0、5、10、20、40、80μmol/L)的 FAN 2μl,每组设 5 个复孔。继续培养 12h 后,加 20μl MTT 溶液(5mg/ml,5% MTT)。继续培养 24h,酶标仪检测 490nm 荧光度值,计算 IC₅₀ 值。

1.4 细胞凋亡检测

取对数生长期 BT549 细胞,培养于 10cm 培养皿中,处理细胞前 12h 加不同浓度 FAN(0、5、10、20μmol/L)100μl,分别设空白组(不加 FITC、PI 抗体)、单阳性对照组(分别加入 FITC、PI 抗体)、实验组(同时加入 FITC 和 PI 抗体)。消化离心(1200rpm×

10min)、吸弃培养基,500μl 1×PBS 冲洗细胞移至 EP 管,4℃ 离心(12000rpm×10min)。100μl 1×Binding Buffer 重悬细胞,加 FITC 抗体 5μl,避光孵育 15min。4℃ 离心(12000rpm×10min),弃上清。再用 200μl 1×Binding Buffer 重悬细胞,加 PI 抗体 5μl 抗体,避光孵育 10min。4℃ 离心(12000rpm×10min),弃上清。500μl 1×Binding Buffer 重悬上机检测。

1.5 蛋白表达检测

取对数生长期 BT549 细胞,胰酶消化,制成单细胞悬液,在 10cm 培养皿中继续培养,待细胞铺满低 90% 时,加 0、5、10、20μmol/L 浓度的 FAN 100μl,继续培养 12h,吸弃培养基,用预冷 PBS 冲洗 3 次,加细胞裂解液 500μl (RIPA:PMSF=100:1),4℃ 孵育 30min,用刮刮均匀涂刮细胞,吸至 EP 管。4℃ 离心(12000rpm×10min),吸取上清移至另一 EP 管中。然后,加 Loading buffer,100℃ 水浴 10min。−20℃ 冰箱保存备用。

取蛋白样品 10μl,经 SDS-PAGE 电泳(BIO-RAD Mini-PROTEAM Tetra system,80V,20min;120V,60min)分离后,干转转移至 PVDF 膜上(Jim-Xscientific Instruments,转膜 1h),加 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2h;分别加兔抗 Smo(1:1000)、Gli1(1:1000)抗体,4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 10min×3 次。加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000),室温下孵育 2h;TBST 洗涤 10min×3 次。ECL 底物化学发光显色后曝光显影(FXT,VILBER LOURMAT,France),显影后洗去一抗二抗,孵育 GAPDH(1:5000)抗体,显影。通过 Image Pro 软件进行灰度值分析。以目的蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值比值作为蛋白表达强度。

1.6 动物实验

BT549 细胞培养收集,细胞浓度为 10⁸ 个/ml,裸鼠 *nunu* 在 SPF 级动物房饲养,适应环境 5d,第 6d 在裸鼠左前腋下进行细胞移植 200μl/只,3~5d 裸鼠左前腋下成瘤,开始给予药物干预。

分组:对照组(DMSO,60mg/kg 200μl 腹腔注射隔天一次(intraperitoneal,ip.qod))、实验组(FAN,90mg/kg,200μl,ip.qod)、阳性对照组(ADR,10mg/kg,200μl,ip.qod),每组 8 只。裸鼠成瘤后每 4d 用游标卡尺测量肿瘤大小,并开始给予药物干预,连续干预 7 次,计算肿瘤体积^[3]($V=1/2 \times a \times b^2$,a 为长径,b 为短径)。21d 后处死裸鼠。

1.7 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件数据分析。定量数据组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测防己诺林碱对细胞活力的影响

经过不同浓度防己诺林碱处理 24h 后测荧光度值,计算出 IC_{50} 为 $8.99\mu\text{mol/L}$ (Figure 1)。

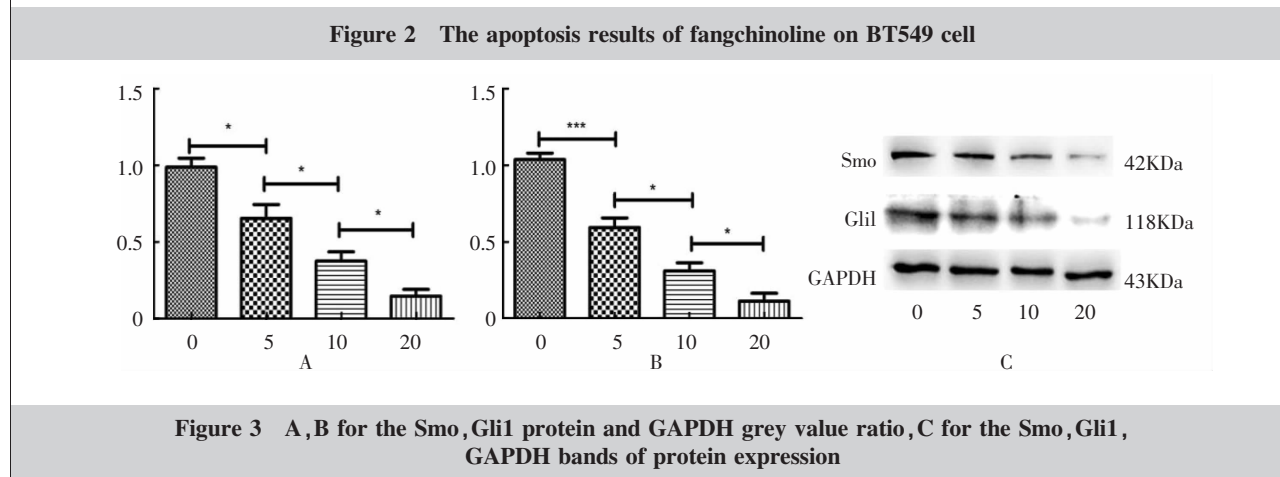
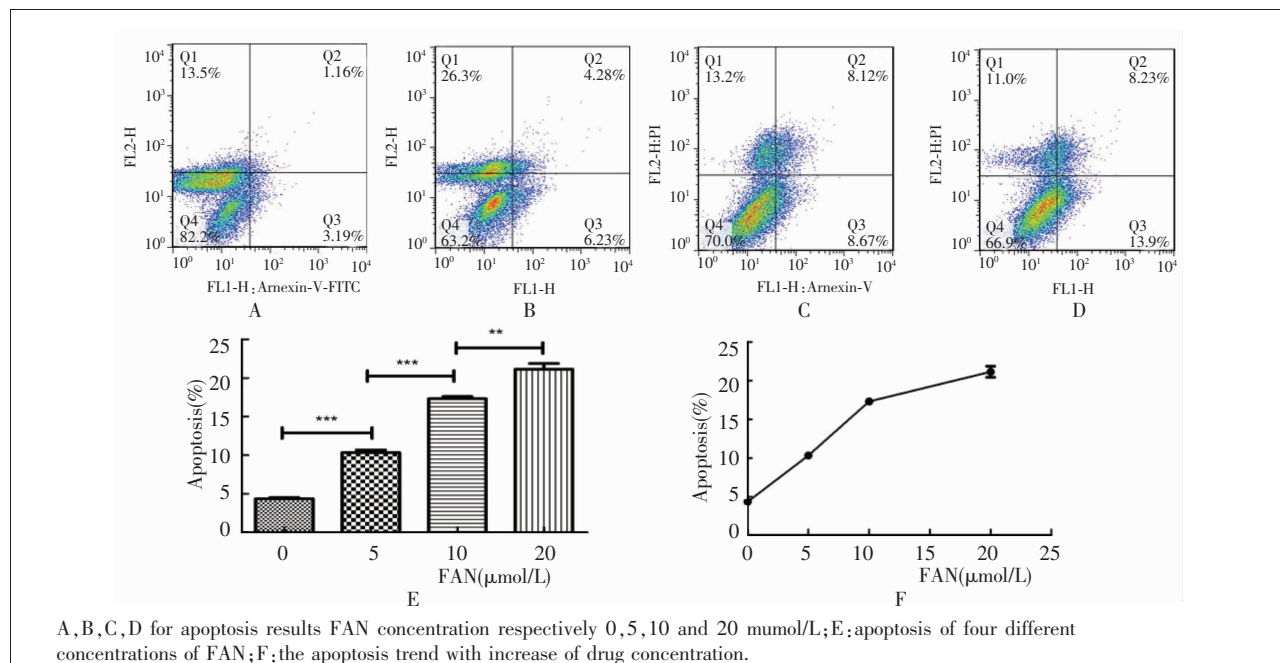
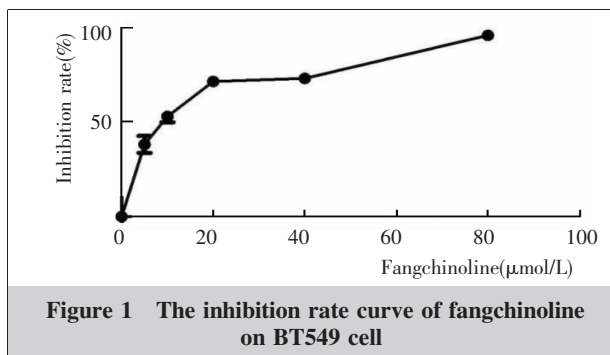
2.2 防己诺林碱对细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染后经流式细胞仪检测结果显示:随防己诺林碱浓度提高,细胞凋亡率逐渐升高。防己诺林碱为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡率分别

为 $4.357\% \pm 0.24\%$ 、 $10.33\% \pm 0.51\%$ 、 $17.33\% \pm 0.39\%$ 和 $21.26\% \pm 1.02\%$ ($F = 294.0$, $P < 0.001$) (Figure 2)。

2.3 蛋白表达检测

Western blot 结果示 (Figure 3): BT549 细胞经防己诺林碱处理后 Hh 通路中 Smo、Gli1 蛋白表达量



随浓度升高而降低,经灰度值分析后,各浓度组之间结果差异有统计学意义。

2.4 动物成瘤实验

实验组裸鼠肿瘤体积小于对照组裸鼠肿瘤,但是仍比阳性对照组肿瘤大(Table 1)。

Table 1 Comparison of tumour volume between experimental group and control group

Group	Beginning volume (mm ³)	Final volume (mm ³)
Positive control group	47.84±4.78	87.59±11.19
Experimenal group	45.66±5.58	181.72±17.14
Control group	45.72±4.05	390.52±34.97
F _t	0.2624	307.40
P	>0.05	<0.001

3 讨 论

研究表明 Hedgehog 通路与乳腺癌的发生有关^[3],黄少良等^[4]的研究显示,Hh 信号通路对肿瘤的生长起全面支持作用;此外,Hh 信号通路与许多影响肿瘤关键的信号通路存在相互作用,在此作用下,肿瘤实现多种效应蛋白高表达,提升了对药物的耐受力。王琪琳等^[5]发现,Hh 信号通路在动物正常胚胎发育与器官形成过程中起着重要作用,其通路中成员突变或错误表达会激活该通路,最终导致癌症发生、发展。在 Hh 通路中 Gli1 蛋白是转录因子,可将 Hh 信号传导至核内后对靶基因起转录激活作用^[6]。而 Smo 蛋白是 Hedgehog 信号通路中的信息转换器,它能够把细胞外的 Hedgehog 信号转换成细胞内的 Gli1 信号^[7]。

防己诺林碱是中药粉防己的提取物,可以调控前列腺癌细胞周期,抑制细胞周期蛋白表达,抑制肿瘤的生长;作为一种新型抗肿瘤药,可以抑制肺癌 A549 细胞增殖、抑制肿瘤生长^[8-10]。本实验通过防己诺林碱对人 TNBC BT549 细胞的诱导凋亡、调控相关蛋白表达、抑制肿瘤生长的作用进行了分析,采用 MTT 法检测细胞活力、流式细胞技术检测细胞凋亡、western blot 实验检测相关蛋白表达、裸鼠成瘤实验检测对肿瘤生长的抑制。结果表明,防己诺林碱可以通过调控 Hedgehog 通路来抑制乳腺癌 BT549 细胞的生长、增殖,从而抑制肿瘤的生长。

综上,防己诺林碱作为天然中药提取物,通过调

节凋亡相关蛋白来抑制肿瘤细胞的生长和增殖,从而达到抑制肿瘤的作用。

参考文献:

[1] Hurvitz S,Mead M. Triple-negative breast cancer;advancements in characterization and treatment approach[J]. Curr Opin Obstet Gynecol,2016,28(1):59-69.

[2] Xing ZB,Wang FM,Wang CP,et al.Advance on study of chemical components,pharmacological effect of stephania tetrandra [J].Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2014,20(9):241-246.

[3] Huang JG.Fangchinoline inhibit prostate cancer (PC) - 3 cell proliferation mechanism research [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,2010. [黄建国. 防己诺林碱抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010.]

[4] Huang SL,Zhao L,Guo QL,et al. Hedgehog signaling pathways involved in the latest progress in the study of tumor resistance mechanisms[J]. Journal of China Pharmaceutical University,2016,47(3):259-266.[黄少良,赵丽,郭青龙,等. Hedgehog 信号通路参与肿瘤耐药机制研究的最新进展[J].中国药科大学学报,2016,47(3):259-266.]

[5] Wang QL,Su L,Liu XG.Hedgehog signaling pathways and tumor[J]. Chemistry of Life,2011,31(1):21-26.[王琪琳,苏玲,刘相国. Hedgehog 信号通路与肿瘤[J].生命的化学,2011,31(1):21-26.]

[6] Lei J,Fan L,Wei G,et al. Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer[J]. Tumour Biol,2015,36(4):3119-3126.

[7] ten Haaf A,Bektas N,von Serenyi S,et al.Expression of the glioma-associated oncogene homolog(GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival[J].BMC Cancer,2009,9:298.

[8] Xavier GM,Seppala M,Barrell W,et al. Hedgehog receptor function during craniofacial development[J]. Dev Biol, 2016,415(2):198-215.

[9] Wang D,Huang JG,Gao X,et al. Fangchinoline induced G1/S arrest by modulating expressions of P27,PCNA and cyclin D in human prostate carcinoma cancer PC13 cells and tumor xenograft[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2010, 74(3):488-493.

[10] Guo B,Su J,Zhang T,et al. Fangchinoline as a kinase inhibitor targets FAK and suppresses FAK-mediated signaling pathway in A549[J]. Journal of Drug Targeting,2015, 23(3):266-274.