

去甲泽拉木醛对 MDA-MB-435 细胞增殖和凋亡的影响

沈政洁^{1,2,3}, 徐长亮³, 钱和亚^{1,2}, 左 云^{1,2}, 程海波³, 陈亚楠^{1,2*}
(1. 苏州大学附属张家港医院, 江苏 张家港 215600; 2. 张家港市第一人民医院肿瘤科, 江苏 张家港 215600; 3. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 探究去甲泽拉木醛对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛作用 MDA-MB-435 细胞 24 h 后, 在倒置显微镜下观察形态, MTT 法检测细胞增殖情况, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, 通过 Hoechst 单染于荧光显微镜观察细胞凋亡形态, Western blot 法检测 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 蛋白表达。**结果** 2、4、8、12 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 MDA-MB-435 细胞 24、48 h 后, 可呈浓度依赖性地抑制乳腺癌细胞增殖 ($P<0.05$)。2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛作用乳腺癌细胞 24 h 后, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达下调 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达上调 ($P<0.05$)。**结论** 去甲泽拉木醛可能通过下调 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达, 上调 Bax 蛋白表达来诱导 MDA-MB-435 细胞凋亡并抑制增殖。

关键词: 去甲泽拉木醛; 人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0255-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.048

去甲泽拉木醛是从雷公藤根皮中分离出的酚性去甲基三萜单体, 具有强烈的免疫抑制作用, 可通过抑制 T 细胞转化和白介素 (IL) -2 活性等减轻肾移植动物模型的免疫排斥反应^[1]。近年来体外研究发现, 去甲泽拉木醛具有抗肿瘤活性, 对膀胱癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、胶质瘤等肿瘤均有杀伤作用, 其作用机制涉及阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和自噬等^[2-9], 但目前对该成分抑制乳腺癌的研究较少。本实验旨在研究去甲泽拉木醛对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞增殖的影响, 并初步探讨其诱导乳腺癌细胞凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 试剂与药物 去甲泽拉木醛 (黄色粉末, 99.90% 分析纯, 批号 HY-N0587, 美国 MCE 公司); 胎牛血清 (FBS, 批号 16000044, 美国 Gibco 公司); 改良易格培养基 (DMEM, 批号 E40401)、青霉素-链霉素双抗 (批号 L110KJ)、胰蛋白酶溶液 (批号 S330JV) (上海源培生物科技股份有限公司); 噻唑蓝 (MTT, 批号 SP1080)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号 SHBH2446V) (美国 Sigma 公司); 细胞裂解液 (批号 6503595, 北京兰杰柯科技有限公司); Hoechst33258 染色液 (批号 C1018)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1062M) (上海碧云天生物技术有限公司); Bcl-2 (批号 ab182858)、Bcl-xL (批号

ab32370)、Bax (批号 ab32503)、GAPDH 抗体 (批号 ab8245) (英国 Abcam 公司)。

1.2 细胞株 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养 MDA-MB-435 细胞采用 DMEM 培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素-链霉素双抗), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养, 细胞贴壁生长至融合度 80%~90% 时胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期者用于实验。

2.2 药液制备 准确称取去甲泽拉木醛粉末适量, DMSO 稀释至 100 mmol/L, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存备用。后续根据实验要求加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 稀释成终浓度为 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 细胞形态学观察 取对数生长期 MDA-MB-435 细胞, 制成单细胞悬液, 按 $1.0\times 10^6/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板中培养 24 h, 吸弃上清, 加入含 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛的 10% FBS 培养基干预, 设 10% FBS 培养基为对照组, 孵育 24 h, 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

2.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期 MDA-MB-435 细胞, 制成密度为 $1.0\times 10^4/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 培养 24 h, 细胞贴壁后分别加入 1、

收稿日期: 2020-12-22

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20190236); 张家港市卫健委青年科技项目 (ZJGQNKJ201902)

作者简介: 沈政洁 (1989—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医药抗肿瘤研究。Tel: (0512) 56919353, E-mail: szjtem@126.com

* **通信作者:** 陈亚楠 (1971—), 女, 硕士, 主任医师, 从事肿瘤临床与机制研究。Tel: (0512) 56919351, E-mail: chenyanan99@126.com

网络出版日期: 2022-01-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220119.1643.004.html>

2、4、8、12 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛，设空白组、阳性对照组（10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂），每组 5 个复孔，孵育 24、48 h 后，每孔加入 5 mg/mL MTT 液 20 μL ，孵育 4 h 后吸弃上清，每孔加入 150 μL DMSO，轻微振荡 10 min 使沉淀完全溶解，在 490 nm 波长处检测光密度（OD）值，计算增殖率。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 MDA-MB-435 细胞接种于 6 孔板，2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 24 h，依次加入 5 μL Annexin V-FITC、10 μL PI，混匀后室温避光孵育 15 min，上机检测细胞凋亡率。

2.6 Hoechst 染色法观察细胞凋亡 按“2.4”项下方法分组给药，干预 24 h 后吸弃培养基，洗涤，加入固定液，20 min 后磷酸缓冲盐溶液（PBS）洗涤 2 次，每孔加入 Hoechst 33258 染色液，避光孵育 30 min，吸弃染色液，PBS 洗涤 3 次，在荧光倒置显微镜下观察拍照。

2.7 Western blot 法检测 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 蛋白表达 刮取经 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 24 h 后的 MDA-MB-435 细胞，裂解，离心收集上清，测定蛋白浓度，变性后取等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），转膜封闭后，加入相应一抗，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜，洗膜 3 次后在室温下孵育二抗 1 h，洗膜后凝胶成像系统化学发光成像。采用 Image J 软件检测条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 去甲泽拉木醛对 MDA-MB-435 细胞形态的影响 对照组 MDA-MB-435 细胞贴壁生长，细胞形态饱满，呈多角形细条状，分布均匀，细胞间连接紧密；随着去甲泽拉木醛浓度增加，存活细胞数量明显下降，细胞体积变小、皱缩，细胞间距增大，失去贴壁特性，悬浮死亡细胞数量逐渐增多，见图 1。

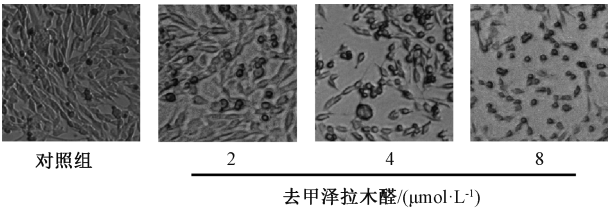
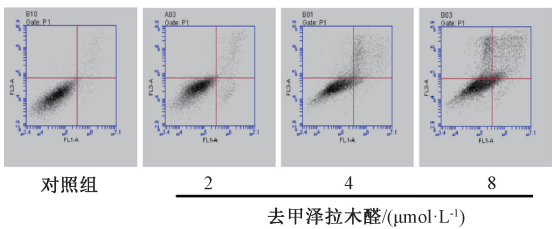


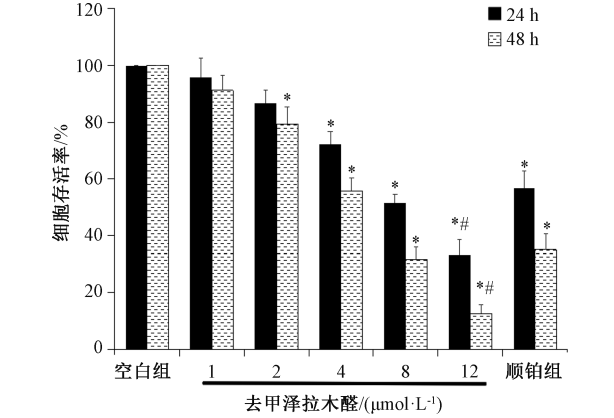
图 1 各组 MDA-MB-435 细胞形态（ $\times 40$ ）



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 4 各组 MDA-MB-435 细胞凋亡率（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

3.2 去甲泽拉木醛对 MDA-MB-435 细胞增殖的影响 1、2、4、8、12 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 MDA-MB-435 细胞 24、48 h 后均能抑制细胞增殖，并呈浓度依赖性；与空白组比较，2 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 48 h 后及 4、8、12 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理 24 h 后细胞增殖率均降低（ $P<0.05$ ），并且高浓度效果优于顺铂组（ $P<0.05$ ），见图 2。



注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与顺铂组比较，# $P<0.05$ 。
图 2 各组 MDA-MB-435 细胞增殖率（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=5$ ）

3.3 去甲泽拉木醛对 MDA-MB-435 细胞凋亡的影响 对照组 MDA-MB-435 细胞染色均匀，细胞核普遍淡染；随着去甲泽拉木醛浓度的增加，细胞核固缩，致密染染的亮蓝色细胞增多，呈典型的凋亡形态学表现，见图 3。

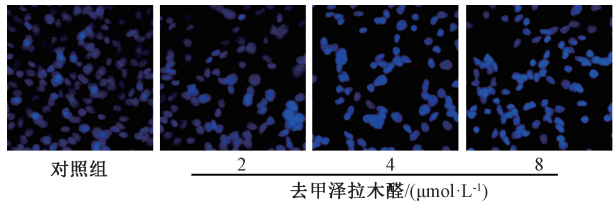
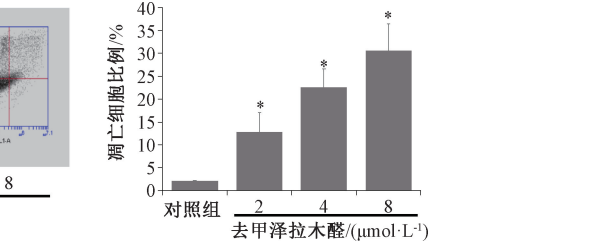


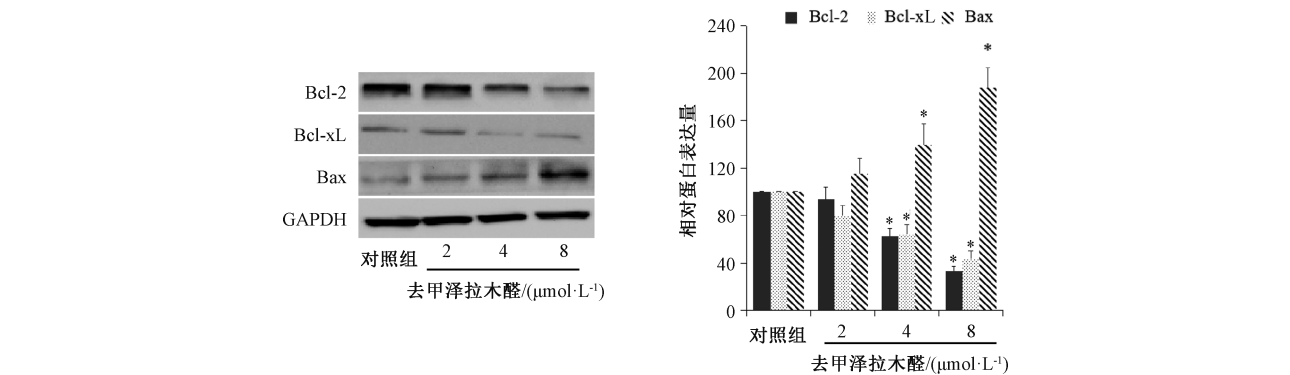
图 3 各组 MDA-MB-435 细胞凋亡情况（ $\times 40$ ）

不同浓度去甲泽拉木醛作用于乳腺癌细胞 24 h 后，细胞发生凋亡，并且凋亡率呈剂量依赖性；与对照组比较，2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛细胞凋亡率升高（ $P<0.05$ ），见图 4。

3.4 去甲泽拉木醛对 MDA-MB-435 细胞 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 蛋白表达的影响 与对照组比较，4、8 $\mu\text{mol/L}$ 去甲泽拉木醛处理后 MDA-MB-435 细胞 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达下调（ $P<0.05$ ），Bax 蛋白表达上调（ $P<0.05$ ），并呈剂量依赖性，见图 5。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 5 各组 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

乳腺癌已成为我国女性中最常见的恶性肿瘤^[10-11]，手术、化疗、放疗、靶向治疗是目前乳腺癌的主要治疗手段。中医药在乳腺癌治疗的增效减毒、减轻相关症状方面具有一定疗效^[12]。中医学对乳腺癌的认识属于“乳岩”“乳石痈”“石奶”“奶岩”等范畴，国医大师周仲瑛教授认为“癌毒”是乳腺癌发生发展的关键因素，肝郁气滞、癌毒内聚为基本病机，治疗上多采用疏肝理气、解毒化瘀散结为主^[13-14]。中药雷公藤，又名莽草、断肠草、南蛇根，始载于《神农本草经》，苦辛凉，有大毒，祛风除湿，利水消肿，杀虫解毒，主治头风、痈肿、乳肿、疔瘕。雷公藤提取物雷公藤内脂醇、雷公藤红素、雷公藤甲素、去甲泽拉木醛均具有抗肿瘤作用^[15-18]。去甲泽拉木醛是 20 世纪 90 年代从雷公藤根皮中分离的有效成分，其毒性小于其他雷公藤中的单体，作用靶点亦有别于其他雷公藤提取物。去甲泽拉木醛能够强烈抑制脾细胞母细胞化，抑制移植肾脏的排斥作用，并且效果优于雷公藤多苷^[19]；其抗肿瘤效应逐渐被国内外研究关注，现有文献报道去甲泽拉木醛可通过诱导细胞凋亡、自噬等途径抑制胰腺癌、结肠癌增殖并增强化疗疗效^[6-7]。

本研究 MTT 结果表明去甲泽拉木醛能抑制乳腺癌细胞增殖，通过形态学观察发现肿瘤细胞呈细胞间接触消失、细胞核固缩、细胞膜仍完整等早期凋亡表现。流式细胞仪检测证实去甲泽拉木醛能诱导乳腺癌细胞凋亡，Western blot 实验发现去甲泽拉木醛能抑制 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达，促进 Bax 蛋白表达，并且该效应呈剂量依赖性。Bcl-2、Bcl-xL、Bax 均属于 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白家族，其中 Bcl-2、Bcl-xL 属于抗凋亡蛋白，Bax 属于促凋亡蛋白。Bcl-2 被证实是最重要的抗凋亡蛋白，其作用于线粒体、内质网、核膜，能阻滞线粒体细胞色素 C 释放发挥抗凋亡作用；Bcl-xL 结构域与 Bcl-2 类似，是线粒体凋亡途径的关键抗凋亡调节剂之一，并与肿瘤细胞耐药相关；Bax 是 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白，在细胞死亡信号传递时，Bax 快速转移到线粒体，构成跨线粒体外膜的孔，引起膜电位降低和细胞色素 C、凋亡诱导因子的外流，导致凋亡^[20-21]。据此，综合本研究结果，推测去甲泽拉木醛可能通过上调促凋亡蛋白

Bax 表达，抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 表达来诱导人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞凋亡。

综上所述，去甲泽拉木醛是雷公藤根皮中含量较高的三萜单体，具有抑制免疫、抗肿瘤效应，存在一定的药物开发利用价值。本研究证实去甲泽拉木醛能通过影响 Bcl-2 家族抗凋亡、促凋亡蛋白表达的变化来诱导乳腺癌细胞凋亡，但其具体作用机制仍未明确，需进一步深入研究揭示其确切作用靶点。

参考文献：

[1] 张建平. 去甲泽拉木醛在大鼠肾移植模型中免疫抑制作用的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.

[2] 王 峰, 田孝东, 张正奎, 等. 去甲泽拉木醛 (ZST93) 诱导人胰腺癌细胞自噬的分子机制[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(4): 606-608.

[3] 杨 杨, 崔忆旋, 胡 婷, 等. 去甲泽拉木醛对胃癌 AGS 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(5): 357-363.

[4] Yang Y, Zhao M L, Hu T, et al. Identification of an antitumor effect of demethylzeylasteral on human gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 49.

[5] An H M, Zhu Y, Xu W P, et al. Evaluation of immunosuppressive activity of demethylzeylasteral in a beagle dog kidney transplantation model[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(3): 673-679.

[6] Yang Y, Han J, Ma Y L, et al. Demethylzeylasteral inhibits cell proliferation and enhances cell chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells[J]. *J Cancer*, 2020, 11(20): 6059-6069.

[7] Wang F, Tian X D, Zhang Z K, et al. Demethylzeylasteral (ZST93) inhibits cell growth and enhances cell chemosensitivity to gemcitabine in human pancreatic cancer cells via apoptotic and autophagic pathways[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(9): 1938-1951.

[8] Zhang K, Fu G, Pan G Z, et al. Demethylzeylasteral inhibits glioma growth by regulating the miR-30e-5p/MYBL2 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1035.

[9] Zhao Y Z, He J, Li J, et al. Demethylzeylasteral inhibits cell

proliferation and induces apoptosis through suppressing MCL1 in melanoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3133.

[10] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[11] 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(1): 1-11.

[12] 王鹏波, 代云云, 董 涵, 等. 中医药干预乳腺癌治疗的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 235-243.

[13] 谷 雨, 吴勉华. 国医大师周仲瑛辨治乳腺癌临证经验[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10): 4975-4978.

[14] 曾 赟, 顾文哲, 沈政洁, 等. 运用癌毒病机理论辨治乳腺癌之探析[J]. *江苏中医药*, 2017, 49(10): 27-29.

[15] 骆永伟, 施 畅, 廖明阳. 雷公藤甲素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(16): 2024-2026.

[16] 王海娟, 张美芝, 刘小菊, 等. 雷公藤内酯醇逆转肿瘤多药耐药研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(10): 229-234.

[17] 宋基正, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 雷公藤甲素抗肿瘤新型给药系统研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1269-1275.

[18] 梁柳春, 杨亚玺, 郭夫江. 雷公藤红素药理作用及结构修饰研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2020, 30(10): 622-635.

[19] 林宗明, 杨春欣, 张永康, 等. 去甲泽拉木醛与雷公藤多甙的免疫抑制作用比较[J]. *中华器官移植杂志*, 2004, 25(1): 41-43.

[20] 李 超, 伏圣博, 刘华玲, 等. 细胞凋亡研究进展[J]. *世界科技研究与发展*, 2007, 29(3): 45-53.

[21] 贾 炜. Bcl-2 家族研究进展[J]. *当代医学*, 2012, 18(3): 26-28.

山楂黄酮通过抑制 ROS/NLRP3 信号通路对辐射损伤小鼠睾丸的保护作用

郭 娜¹, 孙云朝^{2*}, 孙春霞¹, 韩长辉¹

[1. 河北省中医院肿瘤二科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省中医院外二科 (周围血管科), 河北 石家庄 050011]

摘要: **目的** 探索山楂黄酮对辐射损伤小鼠睾丸细胞的保护作用。**方法** 60 只小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药组 (20 mg/kg 绒毛膜促性腺激素) 及山楂黄酮低、中、高剂量 (0.25、0.5、1 g/kg) 组, 每组 10 只, 灌胃给予相应药物, 连续 2 周。实验第 15 天, 除正常组外, 其余组小鼠均采取一次性 X 射线全身均匀照射处理, 照射剂量为 4.0 Gy 致死剂量, 照射 24 h 后脱颈处死小鼠并取睾丸组织。小鼠精母细胞 (GC-2 spd) 分别给予低、中、高剂量 (12.5、25、50 μg/mL) 山楂黄酮和阳性药物干预 72 h 后, 再给予 100 ng/mL LPS 和 2 nmol/L ATP 处理 4 h。ELISA 法检测组织和细胞 ROS、IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-6、IL-18 水平, HE 染色观察睾丸组织病理变化, Western blot 法检测组织和细胞 NLRP3、caspase-1 蛋白表达。**结果** 山楂黄酮能降低睾丸组织和 GC-2 spd 细胞 TNF-α、IL-6、IL-18、IL-1β 水平和 NLRP3、caspase-1 蛋白表达 ($P<0.01$), 升高 IL-10 水平 ($P<0.01$)。山楂黄酮能降低 GC-2 spd 细胞 ROS 水平, 抑制细胞凋亡。**结论** 山楂黄酮对辐射损伤小鼠睾丸具有一定的修复能力, 其作用机理可能与抑制 ROS/NLRP3 信号通路调控睾丸细胞中促炎症细胞因子水平有关。

关键词: 山楂黄酮; 辐射损伤; NLRP3; ROS; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0258-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.049

电离辐射可致机体生成自由基, 并诱导 DNA 损伤, 由此引发突变与致癌^[1]。有研究表明, 睾丸组织是电离辐射最敏感的器官之一, 长期电离辐射会导致生殖系统损伤和精子生成障碍等^[2]。电离辐射通过中性粒细胞浸润、活性氧 (ROS) 积聚、细胞离子稳态的解除、细胞死亡以及随后的

炎症反应对组织造成进一步的损伤^[3]。研究表明睾丸损伤的早期和晚期, 由于腺苷酸环化酶活性和细胞内 cAMP 水平降低, 而产生自由基, 并可能触发细胞死亡的机制^[3-4]。

NLRs 是一个细胞内传感器的大蛋白家族, 其中 NOD 样受体 3 (NLRP3) 炎症小体最具有特征^[5]。体外实验表

收稿日期: 2021-05-18

基金项目: 河北省中医药管理局课题项目 (2016169)

作者简介: 郭 娜 (1983—), 女, 硕士, 从事肿瘤学研究。E-mail: guona9897@sina.com

* 通信作者: 孙云朝 (1981—), 男, 硕士, 从事周围血管病研究。Tel: (0311) 69095114, E-mail: syunchao1981@sina.com