

引用本文:柴效科,周聪,宋爱琳.双硫仑螯合铜对耐紫杉醇乳腺癌细胞增殖、迁移、凋亡及自噬的影响[J].安徽医药,2022,26(12):2383-2389.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.011.



◇ 药学研究 ◇

双硫仑螯合铜对耐紫杉醇乳腺癌细胞增殖、迁移、凋亡及自噬的影响

柴效科,周聪,宋爱琳

作者单位:兰州大学第二医院普外科5病区,甘肃 兰州 730000

通信作者:宋爱琳,女,主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向为甲状腺乳腺癌,Email:songail@lzu.edu.cn

摘要: **目的** 探讨双硫仑螯合铜(DSF-Cu)对耐紫杉醇乳腺癌细胞增殖、迁移、凋亡及自噬的影响。**方法** 2018年1月至2019年10月,培养MCF-7人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞,用定量紫杉醇持续诱导MCF-7/紫杉醇细胞维持耐药性。通过CCK-8法检测MCF-7/紫杉醇细胞耐药指数;通过CCK-8法检测MCF-7/紫杉醇细胞在不同浓度DSF-Cu(5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$)干预不同时间(24 h和48 h)后的抑制率,并分析细胞抑制率与DSF-Cu浓度和作用时间的关系;通过划痕实验检测DSF-Cu对MCF-7/紫杉醇细胞迁移能力的影响;通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹法检测MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和自噬效应蛋白Beclin-1基因和蛋白的表达,并在紫杉醇和DSF-Cu单药及联合干预MCF-7/紫杉醇细胞中后,检测Bcl-2、Bax和Beclin-1蛋白的表达;通过流式细胞计数技术检测不同浓度DSF-Cu(5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)干预MCF-7/紫杉醇细胞不同时间(12 h、24 h和48 h)后细胞凋亡情况。**结果** MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇干预24 h后 IC_{50} 值分别为1 394.79 $\mu\text{mol/L}$ 和321.42 $\mu\text{mol/L}$,MCF-7/紫杉醇细胞耐药指数为4.34;在不同浓度DSF-Cu(5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$)DSF-Cu干预MCF-7/紫杉醇细胞24 h后细胞抑制率分别为(27.42 \pm 3.38)%、(42.71 \pm 0.77)%、(57.52 \pm 7.10)%、(73.83 \pm 1.76)%、(85.55 \pm 2.25)%、48 h后细胞抑制率分别为(51.27 \pm 4.59)%、(57.34 \pm 5.94)%、(71.50 \pm 1.80)%、(81.54 \pm 4.36)%、(90.96 \pm 2.13)%、DSF-Cu以浓度与时间依赖性抑制乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞增殖($P<0.05$);划痕实验证实DSF-Cu能抑制乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞迁移;qRT-PCR结果显示,与MCF-7细胞相比,MCF-7/紫杉醇细胞中Bcl-2和Beclin-1基因表达升高,Bax基因表达降低($P<0.05$);蛋白质印迹法结果显示,与MCF-7细胞比较,MCF-7/紫杉醇细胞中Bcl-2和Beclin-1蛋白表达升高,Bax蛋白表达降低($P<0.05$)。MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇和DSF-Cu单药及联合干预后Bcl-2表达分别为1.81 \pm 0.28、1.25 \pm 0.09、0.87 \pm 0.10,Bax表达分别为0.65 \pm 0.15、1.07 \pm 0.15、1.34 \pm 0.04,Beclin-1表达分别为1.53 \pm 0.22、0.85 \pm 0.18、0.53 \pm 0.08,MCF-7/紫杉醇细胞在DSF-Cu干预后Bax蛋白表达升高,Bcl-2和Beclin-1蛋白表达降低($P<0.05$);流式结果显示不同浓度DSF-Cu(0、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)干预MCF-7/紫杉醇细胞24 h后,细胞凋亡率分别为(5.50 \pm 1.01)%、(11.03 \pm 1.04)%、(55.12 \pm 5.06)%、(68.86 \pm 3.36)%、(80.07 \pm 4.30)%、在 IC_{50} 浓度的DSF-Cu干预MCF-7/紫杉醇细胞不同时间(0 h、12 h、24 h、48 h)后,细胞凋亡率分别为(4.47 \pm 0.57)%、(15.92 \pm 2.63)%、(34.85 \pm 2.70)%、(74.94 \pm 1.13)%、MCF-7/紫杉醇在DSF-Cu干预后细胞凋亡情况与DSF-Cu呈浓度和时间依赖性($P<0.05$)。**结论** DSF-Cu可通过诱导凋亡、抑制自噬来抑制乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞增殖和迁移,逆转乳腺癌MCF-7细胞对紫杉醇耐药性。

关键词: 乳腺肿瘤; 双硫仑; 紫杉醇; 抗药性,肿瘤; bcl-2相关X蛋白质; 自噬相关蛋白质类

Effect of DSF-Cu on the proliferation, migration, apoptosis and autophagy of paclitaxel-resistant breast cancer cells

CHAI Xiaoke,ZHOU Cong,SONG Ailin

Author Affiliation:The Fifth Ward of General Surgery Department, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of disulfiram chelated with Cu^{2+} (DSF-Cu) on the proliferation, migration, apoptosis and autophagy of paclitaxel-resistant breast cancer cells.**Methods** From January 2018 to October 2019, MCF-7 human breast cancer cells and paclitaxel-resistant breast cancer MCF-7/paclitaxel cells were cultured, and MCF-7/paclitaxel cells were continuously induced to maintain drug resistance with quantitative paclitaxel. The drug resistance index of MCF-7/paclitaxel cells was detected by CCK-8 assay; the inhibition rate of MCF-7/paclitaxel cells after different concentrations of DSF-Cu (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$) interventions for different times (24 h and 48 h) was detected by CCK-8 assay, and the relationship between cell inhibition rate and DSF-Cu concentration and duration of action was analyzed; the inhibition rate of DSF-Cu on the migration ability of MCF-7/paclitaxel cells was examined by scratch assay. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the

expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and Beclin gene and protein in MCF-7 and MCF-7/paclitaxel cells after combined intervention in MCF-7/paclitaxel, and Bcl-2, Bax and Beclin-1 protein expression in MCF-7/paclitaxel cells after single and combined intervention with paclitaxel and DSF-Cu. Apoptosis was detected by flow cytometry after different concentrations of DSF-Cu (5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$) interventions on MCF-7/paclitaxel cells at different times (12 h, 24 h and 48 h). **Results** The IC_{50} values of MCF-7 and MCF-7/paclitaxel cells were 1 394.79 $\mu\text{mol/L}$ and 321.42 $\mu\text{mol/L}$, respectively. After 24 h of paclitaxel intervention, the MCF-7/paclitaxel cell resistance index was 4.34. The inhibition rates of MCF-7/paclitaxel cells were (27.42 \pm 3.38)%, (42.71 \pm 0.77)%, (57.52 \pm 7.10)%, (73.83 \pm 1.76)%, and (85.55 \pm 2.25)% after 24 h of intervention with different concentrations of DSF-Cu (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$), and were (51.27 \pm 4.59)%, (57.34 \pm 5.94)%, (71.50 \pm 1.80)%, (81.54 \pm 4.36)%, and (90.96 \pm 2.13)% after 48 h. DSF-Cu inhibited the proliferation of breast cancer MCF-7/paclitaxel cells in a concentration- and time-dependent manner ($P<0.05$). Scratch assays confirmed that DSF-Cu inhibited breast cancer MCF-7/paclitaxel cell migration; qRT-PCR results showed that Bcl-2 and Beclin-1 gene expression was elevated and Bax gene expression was decreased in MCF-7/paclitaxel cells compared with MCF-7 cells ($P<0.05$). The Western blotting results showed elevated Bcl-2 and Beclin-1 protein expression and decreased Bax protein expression in MCF-7/paclitaxel cells compared with MCF-7 cells ($P<0.05$). In MCF-7/paclitaxel cells, after DSF-Cu and Taxol single drug and combined intervention, the expression of Bcl-2 was 07 \pm 0.15 and 1.34 \pm 0.04, and the expression of Beclin-1 was 1.53 \pm 0.22, 0.85 \pm 0.18, and 0.53 \pm 0.08 after paclitaxel and DSF-Cu single and combined interventions, respectively. MCF-7/paclitaxel cells showed elevated Bax protein expression and decreased Bcl-2 and Beclin-1 protein expression after DSF-Cu intervention ($P<0.05$). Flow cytometry showed that after 24 h of intervention with different concentrations of DSF-Cu (0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) in MCF-7/paclitaxel cells, the apoptosis rates were (5.50 \pm 1.01)%, (11.03 \pm 1.04)%, (55.12 \pm 5.06)%, (68.86 \pm 3.36)%, and (80.07 \pm 4.30)%, respectively. The apoptosis rates were (4.47 \pm 0.57)%, (15.92 \pm 2.63)%, (34.85 \pm 2.70)% and (74.94 \pm 1.13)%, respectively, after DSF-Cu intervention of MCF-7/paclitaxel cells at different times (0 h, 12 h, 24 h, 48 h) at the IC_{50} concentration. The apoptosis of MCF-7/paclitaxel cells after DSF-Cu intervention was concentration- and time-dependent with DSF-Cu ($P<0.05$). **Conclusion** DSF-Cu can inhibit the proliferation and migration of breast cancer MCF-7/paclitaxel cells by inducing apoptosis and inhibiting autophagy and can reverse paclitaxel resistance in breast cancer MCF-7 cells

Key words: Breast neoplasms; Disulfiram; Paclitaxel; Drug resistance, neoplasm; Bcl-2-associated X protein; Autophagy-related protein

乳腺癌是全球女性发病率和死亡率较高的恶性肿瘤^[1],化疗是其有效的治疗手段之一^[2]。紫杉醇是乳腺癌一线化疗药,由于病人长期服药而导致对药物耐药,使其临床应用受限^[3-4]。因此,有必要探索乳腺癌细胞对紫杉醇耐药的分子机制,并寻找克服这一局限性的新策略,以获得更好的治疗效果。双硫仑(DSF)作为一种乙醛脱氢酶(ALDH)能以自身的巯基自发地与金属元素铜螯合形成双硫仑螯合铜(DSF-Cu),该螯合物不仅对乳腺癌细胞具有抑制作用,还能与化疗药物联用增强细胞毒性^[5]。前期研究报道紫杉醇与DSF-Cu联合能提高化疗的细胞毒性^[6],逆转三阴性乳腺癌(TNBC)细胞对紫杉醇耐药性^[7]。本研究于2018年1月至2019年10月在既往研究的基础上,进一步探究DSF-Cu对耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞增殖、迁移、凋亡及自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 MCF-7人乳腺癌细胞株(齐氏生物科技公司);MCF-7/紫杉醇细胞株(上海奥陆科技公司);RPMI-1640培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(美国GIBCO公司);紫杉醇5 g/L(百灵威公司);双硫仑10 mol/mL(selleck公司);氯化铜(百灵威);兔抗人B

细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、自噬效应蛋白Beclin-1抗体(proteintech公司);鼠抗人 β -actin一抗(中衫金桥公司);兔抗人二抗(中衫金桥公司);鼠抗人二抗(中衫金桥公司);PCR试剂盒(takara公司);凋亡试剂盒(美国BD公司);电化学发光法(ECL)显影液(biosharp公司);Bcl-2、Bax、Beclin-1基因引物(北京六合华大基因科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7细胞培养于RPMI-1640完全培养基(10%灭活胎牛血清,100 U/mL的青霉素和链霉素1 mL),MCF-7/紫杉醇细胞培养于RPMI-1640含药培养基(10%灭活胎牛血清,100 U/mL的青霉素和链霉素1 mL和500 $\mu\text{g/L}$ 紫杉醇),于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳培养箱中培养,待细胞汇合度达80%~100%时用0.25%胰蛋白酶消化细胞,并进行传代培养,将细胞状态调至对数期后进行后续实验研究。

1.2.2 CCK-8法检测MCF-7/紫杉醇细胞耐药性取1 mmol/L的DSF与1 mmol/L的氯化铜按照1:1配比充分混匀后配制成1 mmol/L DSF-Cu母液。将对数期生长的MCF-7细胞和MCF-7/紫杉醇细胞分别按 4×10^3 个/孔接种于96孔板中的3 \times 5个孔中(5个浓度梯度,每个浓度设置3个复孔),每孔加100 μL 细

胞悬液,培养24 h后,依次加入完全培养液和不同浓度紫杉醇使其终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、600 $\mu\text{mol/L}$ 、800 $\mu\text{mol/L}$ 和1 000 $\mu\text{mol/L}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下培养24 h,弃去培养基;加入(20:1)人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)溶液100 μL 继续培养1~2 h,使用酶标仪检测450 nm波长吸光度。代入以下公式计算DSF-Cu对两种细胞的50%抑制浓度(IC_{50})值并计算耐药指数(RI):肿瘤细胞生长抑制率($\%$)=(A_s-A_b)/(A_c-A_b) $\times 100\%$ (A_s :实验组吸光度; A_c :不含药组吸光度; A_b :空白组吸光度); $\text{RI}=\text{耐药细胞IC}_{50}/\text{敏感细胞IC}_{50}$ 。

1.2.3 CCK-8法检测药物对细胞生长抑制率 取对数生长期的MCF-7/紫杉醇细胞,按 4×10^3 个/孔接种于96孔板中 6×3 个孔中(6个实验浓度,每个浓度3个复孔)。实验组加入完全培养液和不同浓度DSF-Cu,使终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 和25 $\mu\text{mol/L}$,阴性对照组加入完全培养液,空白对照组加入10%磷酸缓冲盐溶液(PBS),置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下分别培养24 h、48 h后弃去培养基,每孔加入约100 μL (20:1)CCK-8溶液,继续培养1~2 h,使用酶标仪于450 nm波长检测吸光度,计算肿瘤细胞生长抑制率,绘制DSF-Cu对MCF-7/紫杉醇细胞浓度和时间依赖性生长抑制曲线。

1.2.4 划痕实验检测MCF-7/紫杉醇细胞迁移力 将对数期生长的MCF-7/紫杉醇细胞接种于6孔板中,设置实验组与对照组,实验组给予 IC_{50} 的DSF-Cu和500 $\mu\text{g/L}$ 紫杉醇,对照组给予500 $\mu\text{g/L}$ 紫杉醇,培养细胞至80%~90%密度后,用1 mL灭菌枪头在各孔中划1条直线,用PBS洗去脱离的细胞及碎片,更换新鲜培养基培养。分别于0 h、24 h、48 h时在标记区域进行拍照记录;实验重复3次,利用Image J图像分析软件对划痕区域面积进行测量和统计,以此计算细胞迁移率,24/48 h细胞迁移率=(0 h划痕宽度-24/48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞中Bax、Bcl-2、Beclin-1基因表达 Trizol法提取MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞中的总RNA,检测其浓度和纯度。经逆转录得到互补DNA(cDNA),根据实时荧光定量PCR试剂盒说明书进行qRT-PCR检测。Bax正反向引物为5'-TCCACCAAGAAGCTGAGCGAGT-3',5'-TGTCCACGGCGCAATCATCC-3';Bcl-2正反向引物为5'-GACTTCTCCCGCCGCTACCG-3',5'-5ACACACATGACCCACCGAAC-3';Beclin-1正反向引物为5'-CAGAGATACCGACTTGTTCCT-3',5'-CCCAGAACAGTATAACGGCAG-3';18srRNA正

反向引物为5'-TATGCAGAATCCACGCCAGT-3',5'-CGAATCTTCTTCAGTCGCTCC-3'。PCR反应体系为20 μL ,其中SYBER GREEN染料10 μL 、正反向引物各0.8 μL 、cDNA 2 μL 、ROX- II 0.4 μL 、无酶水6 μL 。PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火34 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30~34 s共40个循环。每组设3个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析法计算目的基因表达水平。

1.2.6 蛋白质印迹法检测MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞中Bax、Bcl-2、Beclin-1蛋白表达 分别将MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞接种于100 cm^2 皿弃培养皿中的培养液,用预冷的PBS洗2遍,各加入400 μL 放射免疫沉淀法(RIPA)混合裂解液(苯甲基磺酰氟:RIPA=1:100),将皿水平放置并于冰上裂解30 min;裂解完成后于4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 r/min离心30 min,加入 $5\times$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,蛋白金属浴100 $^{\circ}\text{C}$,5 min变性后即可采用蛋白质印迹法测MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞中Bcl-2、Bax和Beclin-1蛋白的表达。重复实验3次,用Image J软件读取各条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量,用GraphPad Prism 7.0软件作图。

1.2.7 通过蛋白质印迹法测MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇和DSF-Cu单药及联合干预下Bcl-2、Bax、Beclin-1表达 将对数期生长的MCF-7/紫杉醇细胞接种于100 cm^2 培养皿中并设置 IC_{50} 紫杉醇组、 IC_{50} DSF-Cu组、 IC_{50} DSF-Cu+ IC_{50} 紫杉醇组3个实验组,将培养皿放置于培养箱中,使细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳和95%湿度下培养条件下培养;倒置显微镜下观察细胞培养至密度为80%~90%时,在超净工作台中,用装有无菌枪头的微量移液器吸弃废液,更换新鲜完全培养液,各组分别加入 IC_{50} 紫杉醇、 IC_{50} DSF-Cu、 IC_{50} DSF-Cu+ IC_{50} 紫杉醇,将三组细胞继续培养24 h,提取三组细胞蛋白,通过蛋白质印迹法测三组蛋白中Bcl-2、Bax和Beclin-1表达。重复实验3次,用Image J软件读取各条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

1.2.8 流式细胞技术检测DSF-Cu干预后MCF-7/紫杉醇细胞凋亡情况 将对数期生长的MCF-7/紫杉醇细胞接种于2个6孔板中,第1个6孔板设置A~E 5个实验组,第2个6孔板设置F~I 4个实验组,将6孔板放置于培养箱中,使细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳和95%湿度条件下培养;倒置显微镜下观察细胞密度为80%~90%时,在超净工作台中用装有无菌枪头的移液枪吸弃各个实验孔中的废液,用预冷的10%PBS轻轻清洗MCF-7/紫杉醇细胞2~3次,用

0.25%胰蛋白酶消化F组MCF-7/紫杉醇细胞并收集于流式管中,其余各组细胞更换新鲜完全培养液,A组加入500 μg/L紫杉醇,B~E组分别加入500 μg/L紫杉醇和不同浓度DSF-Cu,使终浓度为5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L和20 μmol/L,G~I组加入IC₅₀的DSF-Cu和500 μg/L紫杉醇;将6孔板放置在培养箱中,使细胞在37 °C、5%二氧化碳和95%湿度条件下继续培养,G组细胞继续培养12 h,B~E和H组细胞继续培养24 h,I组细胞继续培养48 h;用10%PBS清洗各组MCF-7/紫杉醇细胞2~3次,并用0.25%胰蛋白酶消化细胞收集于流式管中;将流式管中收集的各组MCF-7/紫杉醇细胞以1 000 r/min离心5 min,用装有无菌枪头移液枪吸弃上清液,向各流式管中加入300 μL结合缓冲液稀释液,轻柔吹打管底细胞沉淀使之充分混匀,然后将各个流式管中的细胞悬液等比例分装到3个新流式管中并标为空白对照组、单染组和双染组;在单染组和双染组管中加入0.4 μL膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)标记,避光孵育15 min;上机前5 min在双染组管中加入0.5 μL碘化丙啶(PI)染色,将染色好的细胞用流式细胞仪进行检测;重复实验3次后计算各组凋亡率。

1.3 统计学方法 采用SPSS 25.0软件对所有计量数据进行正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间总体比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态观察 将细胞培养至对数期后在倒置显微镜下观察(分别放大100和400倍)MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞形态。MCF-7细胞呈梭形,贴壁生长;MCF-7/紫杉醇细胞呈椭圆形,贴壁生长,且MCF-

7/紫杉醇细胞增长速度较MCF-7细胞慢。见图1。

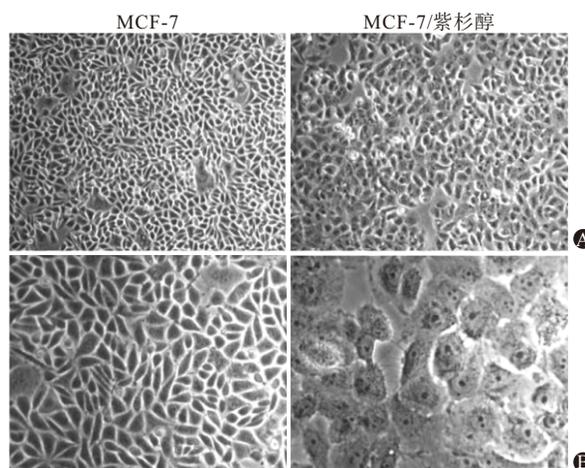


图1 倒置显微镜下MCF-7人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞形态:A为放大100倍;B为放大400倍

2.2 MCF-7/紫杉醇细胞耐药性 CCK-8法表明,在相同时间内,随着紫杉醇浓度增加,MCF-7细胞和MCF-7/紫杉醇细胞增殖抑制率逐渐增高($P<0.05$);在相同浓度下紫杉醇对MCF-7细胞的抑制作用比MCF-7/紫杉醇强($P<0.05$)。见表1。通过SPSS 25.0软件计算出MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇干预24 h后IC₅₀值分别为1 394.79 μmol/L和321.42 μmol/L,MCF-7/紫杉醇细胞耐药指数为4.34。

2.3 24 h与48 h不同浓度DSF-Cu对耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞抑制率比较 CCK-8法结果显示,DSF-Cu以浓度与时间依赖性抑制乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞增殖($P<0.05$),见表2。

2.4 DSF-Cu对MCF-7/紫杉醇细胞迁移能力的影响 划痕实验结果显示,在24 h和48 h时,实验组(IC₅₀ DSF-Cu+500 μg/L紫杉醇)细胞迁移率均低于对照组(500 μg/L紫杉醇)(均 $P<0.05$),说明DSF-Cu能抑制MCF-7/紫杉醇细胞的迁移能力。见表3。

表1 MCF-7人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞不同浓度紫杉醇干预后细胞抑制率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 重复次数 | 紫杉醇浓度 | | | | | F值,P值 |
|-----------|------|------------|------------|------------|------------|--------------|---------------|
| | | 200 μmol/L | 400 μmol/L | 600 μmol/L | 800 μmol/L | 1 000 μmol/L | |
| MCF-7/紫杉醇 | 3 | 11.49±1.15 | 18.88±3.98 | 26.16±5.51 | 31.80±5.96 | 44.86±2.24 | 27.61, <0.001 |
| MCF-7 | 3 | 23.70±1.06 | 64.26±9.73 | 80.97±4.63 | 88.97±5.26 | 96.04±4.21 | 76.51, <0.001 |
| t 值 | | 13.51 | 7.48 | 13.18 | 12.46 | 18.59 | |
| P 值 | | <0.001 | 0.002 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | |

表2 24 h与48 h不同浓度双硫仑螯合铜(DSF-Cu)对耐紫杉醇乳腺癌MCF-7/紫杉醇细胞抑制率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 重复次数 | DSF-Cu浓度 | | | | | F值,P值 |
|-------|------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|
| | | 5 μmol/L | 10 μmol/L | 15 μmol/L | 20 μmol/L | 25 μmol/L | |
| 24 h | 3 | 27.42±3.38 | 42.71±0.77 | 57.52±7.10 | 73.83±1.76 | 85.55±2.25 | 105.55, <0.001 |
| 48 h | 3 | 51.27±4.59 | 57.34±5.94 | 71.50±1.80 | 81.54±4.36 | 90.96±2.13 | 40.60, <0.001 |
| t 值 | | 7.24 | 4.24 | 3.31 | 2.79 | 3.02 | |
| P 值 | | 0.002 | 0.013 | 0.030 | 0.049 | 0.039 | |

表3 两组耐紫杉醇乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞迁移率比较
(%, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 重复次数 | 24 h | 48 h | <i>t</i> 值, <i>P</i> 值 |
|------------|------|------------|------------|------------------------|
| 对照组 | 3 | 50.98±3.31 | 69.67±1.37 | 9.03, 0.001 |
| 实验组 | 3 | 29.06±3.13 | 34.63±3.26 | 2.14, 0.099 |
| <i>t</i> 值 | | 8.34 | 17.18 | |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | |

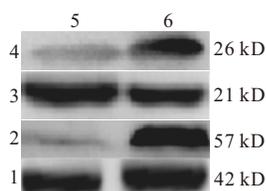
2.5 MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞 Bcl-2、Bax 和 Beclin-1 基因表达比较 qRT-PCR 结果显示,与 MCF-7 细胞相比, MCF-7/紫杉醇细胞中 Bcl-2 和 Beclin-1 基因表达升高, Bax 基因表达降低 ($P<0.05$), 见表 4。

表4 MCF-7人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、自噬效应蛋白 Beclin-1 基因表达比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 重复次数 | Bcl-2 | Bax | Beclin-1 |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|
| MCF-7 | 3 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| MCF-7/紫杉醇 | 3 | 1.52±0.30 | 0.57±0.16 | 1.85±0.46 |
| <i>t</i> 值 | | 3.03 | 4.66 | 3.20 |
| <i>P</i> 值 | | 0.039 | 0.010 | 0.033 |

2.6 MCF-7和MCF-7/紫杉醇细胞 Bcl-2、Bax 和 Beclin-1 蛋白表达比较及 MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇、DSF-Cu 干预后各蛋白变化情况 蛋白质印迹法结果显示, MCF-7/紫杉醇细胞较 MCF-7 细胞 Bcl-2 和 Beclin-1 蛋白表达升高, Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 2, 表 5。

MCF-7/紫杉醇细胞在 DSF-Cu 干预后 Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 和 Beclin-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见表 6。



注: 1— β 肌动蛋白(β -actin); 2—自噬效应蛋白 Beclin-1; 3—Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax); 4—B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); 5—MCF-7 组; 6—MCF-7/紫杉醇组。

图2 蛋白质印迹法检测 MCF-7 人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞 Bcl-2、Bax 和 Beclin-1 蛋白表达情况**表5** MCF-7人乳腺癌细胞和耐紫杉醇乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、自噬效应蛋白 Beclin-1 蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 重复次数 | Bcl-2 | Bax | Beclin-1 |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|
| MCF-7 | 3 | 0.50±0.06 | 1.91±0.48 | 0.32±0.11 |
| MCF-7/紫杉醇 | 3 | 2.20±0.42 | 1.08±0.15 | 1.90±0.09 |
| <i>t</i> 值 | | 6.96 | 2.86 | 19.07 |
| <i>P</i> 值 | | 0.002 | 0.046 | <0.001 |

表6 耐紫杉醇乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞在紫杉醇、双硫仑螯合铜(DSF-Cu)干预后 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、自噬效应蛋白 Beclin-1 蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 重复次数 | Bcl-2 | Bax | Beclin-1 |
|--|------|------------------------|------------------------|------------------------|
| IC ₅₀ 紫杉醇 | 3 | 1.81±0.28 | 0.65±0.15 | 1.53±0.22 |
| IC ₅₀ DSF-Cu | 3 | 1.25±0.09 ^① | 1.07±0.15 ^① | 0.85±0.18 ^① |
| IC ₅₀ 紫杉醇+IC ₅₀ DSF-Cu | 3 | 0.87±0.10 ^② | 1.34±0.04 ^② | 0.53±0.08 ^② |
| <i>F</i> 值 | | 21.18 | 22.94 | 27.58 |
| <i>P</i> 值 | | 0.002 | 0.002 | 0.001 |

注: ①与 IC₅₀紫杉醇组比较, $P<0.05$ 。②与 IC₅₀ DSF-Cu 组比较, $P<0.05$ 。

2.7 MCF-7/紫杉醇细胞凋亡率与双硫仑螯合铜浓度和时间的关系 流式结果显示, 不同浓度 DSF-Cu (0、5、10、15、20 μ mol/L) 干预 MCF-7/紫杉醇细胞 24 h 后, 细胞凋亡率分别为 (5.50±1.01)%、(11.03±1.04)%、(55.12±5.06)%、(68.86±3.36)%、(80.07±4.30)% ($F=300.89$, $P<0.001$); 在 IC₅₀ 值浓度的 DSF-Cu 干预 MCF-7/紫杉醇细胞不同时间 (0 h、12 h、24 h、48 h) 后, 细胞凋亡率分别为 (4.47±0.57)%、(15.92±2.63)%、(34.85±2.70)%、(74.94±1.13)% ($F=726.65$, $P<0.001$)。MCF-7/紫杉醇在 DSF-Cu 干预后细胞凋亡情况与 DSF-Cu 呈浓度和时间依赖性。

3 讨论

近年来, 由于化疗药物的耐药性、毒性以及昂贵的经济成本限制了乳腺癌治疗的疗效, 因此寻找既能增强化疗药物毒性又对机体安全且低廉的化疗制剂成为研究热点。DSF 是一种廉价的抗酗酒药, 与铜螯合形成的化合物能有效抑制肿瘤细胞, 并且与化疗药物联用, 能增强传统化疗药物毒性^[8]。本研究结果显示, 随着浓度增大与干预时间延长, DSF-Cu 对 MCF-7/紫杉醇细胞抑制作用增强。此外, 通过划痕实验证明 DSF-Cu 能够抑制 MCF-7/紫杉醇细胞迁移。

紫杉醇主要通过靶向作用于细胞内的微管蛋白, 阻滞细胞周期发挥抗肿瘤作用。研究发现紫杉醇耐药性与细胞凋亡和自噬密切相关^[9]。本研究结果从基因与分子水平证实, 紫杉醇在 MCF-7 乳腺癌细胞中, 通过抑制凋亡, 诱导自噬, 进而增强了肿瘤细胞对药物损伤的抵抗作用。

近年来, 研究发现 DSF-Cu 能通过多种途径诱导乳腺癌细胞凋亡, 逆转化疗药物耐药性。国外研究发现 DSF-Cu 通过激活末端激酶 c-Jun 抑制活性氧-核因子- κ B(NF- κ B)通路促进乳腺癌细胞凋亡^[10]。Ji 等^[11]进一步研究发现在 TNBC 中 DSF-Cu 能够通过下调 Bcl-2, 激活胱天蛋白酶(caspase)-3 和 caspase-8, 增加 DNA 修复酶 PARP 降解, 从而增强细胞早期

和晚期的凋亡。而在 MCF-7 细胞中 DSF-Cu 能诱导产生活性氧,增加细胞内钙离子浓度,降低线粒体膜电位,从而产生线粒体依赖性凋亡途径^[12]。Sonawane 等^[13]在乳腺癌 MCF-7 细胞系中研究发现 DSF-Cu 能够抑制 NF- κ B 和转录因子 Nrf2,逆转阿霉素耐药性。Tyler 等^[14]在 TNBC 中研究发现 DSF-Cu 与多西他赛协同抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡;大多数吉西他滨耐药细胞系表现出较高的 NF- κ B 活性。Guo 等^[15]研究发现 DSF-Cu 通过抑制 NF- κ 显著增强吉西他滨的细胞毒性,使细胞吉西他滨耐药性完全逆转。Yip 等^[16]研究发现 DSF-Cu 能通过刺激细胞内活性氧-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的产生,抑制 NF- κ B 信号通路,促进乳腺癌细胞凋亡,提高乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性。Liu 等^[7]研究发现 DSF-Cu 联合紫杉醇和顺铂能增强对耐药 MDA-MB-231PAC10 的细胞毒性,完全逆转细胞系 MDA-MB-231PAC10 对紫杉醇和顺铂的耐药性。

线粒体通路作为诱导细胞凋亡的重要途径已得到广泛认可^[17],其中 Bcl-2 是一种凋亡抑制基因,而 Bax 是促凋亡基因,Bcl-2/Bax 比值是决定肿瘤细胞是增殖还是凋亡的重要环节。在乳腺癌中,抑制 Bcl-2 和促进 Bax 可以诱导细胞凋亡,Bcl-2/Bax 可调控细胞凋亡并在乳腺癌治疗中发挥重要作用^[18]。本研究结果显示 DSF-Cu 能通过抑制 Bcl-2,促进 Bax,诱导 MCF-7/紫杉醇细胞凋亡,逆转乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇耐药性,并且其凋亡过程与 DSF-Cu 呈浓度与时间依赖性。

细胞自噬过程复杂涉及多种蛋白及细胞因子^[19],其中 Beclin-1 是启动自噬的关键调控分之一,与肿瘤细胞化疗相关性细胞自噬密切相关。研究发现乳腺癌病人在化疗后血清中 Beclin-1 水平显著升高^[20],通过干扰 Beclin-1 可增强乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性,提高化疗药物的抗癌功效^[21]。例如国内研究发现通过沉默 Beclin-1 抑制自噬可增加 MDA-MB-231/ADR 细胞对阿霉素的敏感性^[22]。既往研究表明 Beclin-1 与乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性密切相关^[23]。石瑛等^[24]报道抑制自噬可增强 MCF-7 细胞对紫杉醇的敏感性。目前,关于 DSF-Cu 与肿瘤细胞自噬的关系之间的研究不多。Wu 等^[25]在非小细胞肺癌中研究发现,DSF-Cu 能诱导肿瘤细胞自噬和凋亡,并且通过抑制自噬,可增强肿瘤细胞凋亡。Zhang 等^[26]研究发现 DSF-Cu 能诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡,并且自噬与凋亡具有依赖性。本研究结果显示 DSF-Cu 可以通过抑制 Beclin-1,抑制 MCF-7/紫杉醇细胞自噬,逆转乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇耐药性。

本研究显示 DSF 与 Cu 螯合形成 DSF-Cu 能通过诱导细胞凋亡和抑制自噬来抑制乳腺癌 MCF-7/紫杉醇细胞增殖,其抑制作用呈浓度和时间依赖性。此外 DSF-Cu 能抑制 MCF-7/紫杉醇细胞迁移,然而关于其具体的作用机制有待进一步研究。结合既往研究报道和本研究结果可进一步证实 DSF-Cu 与紫杉醇联合应用,能通过抑制自噬和诱导凋亡,逆转乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇耐药性。然而本实验研究由于缺少更详细的信号机制通路以及动物模型体内实验研究,故仍需进一步实验探究。

参考文献

- [1] XU K, SHI Y, WANG X, et al. A novel BRCA1 germline mutation promotes triple-negative breast cancer cells progression and enhances sensitivity to DNA damage agents [J]. *Cancer Genet*, 2019, 239:26-32.
- [2] YANG CQ, LIU J A, ZHAO SQ, et al. Recent treatment progress of triple negative breast cancer [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2020, 151:40-53.
- [3] UENO NT, MAMOUNAS EP. Neoadjuvant nab-paclitaxel in the treatment of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 156 (3):427-440.
- [4] WANG WR, ZHANG LY, WANG YY, et al. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (10) : e3071. DOI: 10.1038/eddis.2017.460.
- [5] YANG Z, GUO F, ALBERS AE, et al. Disulfiram modulates ROS accumulation and overcomes synergistically cisplatin resistance in breast cancer cell lines [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108727. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108727.
- [6] VIOLA-RHENALS M, PATELKR, JAIME-SANTAMARIA L, et al. Recent advances in antitubercular (disulfiram): the importance of its metal-binding ability to its anticancer activity [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(4):506-524.
- [7] LIU P, KUMAR IS, BROWN S, et al. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109 (7): 1876-1885.
- [8] SCHMIDTOVA S, KALAVSKA K, GERCAKOVA K, et al. Disulfiram overcomes cisplatin resistance in human embryonal carcinoma cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9):1224.
- [9] WANG H, LI D, LI X, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis via the induction of autophagy [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):5029-5035.
- [10] HASINOFF BB, PATEL D. Disulfiram is a slow-binding partial noncompetitive inhibitor of 20S proteasome activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 633:23-28.
- [11] KIM JY, LEE N, KIM YJ, et al. Disulfiram induces anoikis and suppresses lung colonization in triple negative breast cancer via calpain activation [J]. *Cancer Lett*, 2017, 386:151-160.
- [12] YANG YP, ZHANG KF, WANG YW, et al. Disulfiram chelated with copper promotes apoptosis in human breast cancer cells by

- impairing the mitochondria functions[J].Scanning, 2016, 38(6): 825-836.
- [13] SONAWANE VK, MAHAJIAN UB, SHINDE SD, et al. A chemosensitizer drug: disulfiram prevents doxorubicin-induced cardiac dysfunction and oxidative stress in rats[J]. Cardiovascular Toxicology, 2018, 18(11): 1-12.
- [14] TYLER R, MELODRY P, JEFF L, et al. High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: interaction with IQ motif-containing factors [J]. Cell Cycle, 2013, 12(18): 3013-3024.
- [15] GUO X, XU B, PANDEY S, et al. Disulfiram/copper complex inhibiting NF- κ B activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines[J]. Cancer Letters, 2010, 290(1): 104-113.
- [16] YIP NC, FOMBON IS, LIU P, et al. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties [J]. Br J Cancer, 2011, 104(10): 1564-74.
- [17] FOO JB, SAIFUL YL, TOR YS, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 166: 270-278.
- [18] YUAN Z, JIANG H, ZHU X, et al. Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of Paclitaxel through inhibiting NF- κ B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 227-232.
- [19] 韩涛, 曹明. 乳腺癌组织 miR-20a 的表达及其对乳腺癌细胞自噬的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(10): 1936-1939.
- [20] ABDEL-MOHSEN MA, AHMED OA, EL-KERM YM, et al. BRCA1 Gene mutations and influence of chemotherapy on autophagy and apoptotic mechanisms in Egyptian breast cancer patients [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(3): 1285-1292.
- [21] ZHANG A, LI JC. Crocetin shifts autophagic cell survival to death of breast cancer cells in chemotherapy [J]. Tumor Biol, 2017, 39(3): 1010428317694536. DOI: 10.1177/1010428317694536.
- [22] 郑家芬, 谭超. 自噬相关基因 Beclin1 沉默对乳腺癌细胞阿霉素敏感性的影响研究[J]. 现代预防医学, 2017, 44(16): 2992-2996.
- [23] WU CL, LIU JF, LIU Y, et al. Beclin1 inhibition enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity in breast cancer in vitro and in vivo [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(4): 1866-1878.
- [24] 石瑛, 路璐, 王云凤, 等. 自噬对 MCF-7 细胞紫杉醇化疗敏感性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(3): 320-323.
- [25] WU X, XUE X, WANG LH, et al. Suppressing autophagy enhances disulfiram/copper-induced apoptosis in non-small cell lung cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 827: 1-12.
- [26] ZHANG X, HU P, DING SY, et al. Induction of autophagy-dependent apoptosis in cancer cells through activation of ER stress: an uncovered anti-cancer mechanism by anti-alcoholism drug disulfiram [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(6): 1266-1281.

(收稿日期: 2019-11-27, 修回日期: 2020-01-05)

引用本文: 刘磊. 白头翁皂苷 B4 调控去乙酰化酶 6 对胃癌细胞转移和放疗敏感性的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(12): 2389-2394. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.012.

◇ 药学研究 ◇



白头翁皂苷 B4 调控去乙酰化酶 6 对胃癌细胞转移和放疗敏感性的影响

刘磊

作者单位: 济南市中西医结合医院脾胃肝胆科, 山东 济南 271100

摘要: **目的** 探讨白头翁皂苷 B4 (AB4) 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及放疗敏感性的影响及其分子机制。**方法** 该研究起止时间为 2018 年 4 月至 2019 年 10 月。体外培养人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 与胃癌细胞 HGC-27, 采用不同浓度 (25、50、100 μ mol/L) 的 AB4 处理 24 h, 通过 MTT 法检测细胞存活率并筛选 AB4 适宜浓度用于后续研究。Transwell 实验检测 HGC-27 细胞迁移及侵袭能力。细胞克隆形成实验检测 AB4 对 HGC-27 细胞放射敏感性的影响; 蛋白质印迹法检测 AB4 对 HGC-27 细胞中去乙酰化酶 6 (SIRT6) 蛋白表达的影响; 干扰 SIRT6 表达联合 AB4 处理后, 采用上述检测方法检测 HGC-27 细胞增殖、迁移、侵袭及放射敏感性; 蛋白质印迹法检测 DNA 激活蛋白激酶催化亚基 (DNA-PKcs)、DNA 双链修复蛋白 Rad51、DNA 修复酶 Ku80、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组相比, AB4 处理后 HGC-27 细胞存活率 [(100.01 \pm 9.57)% 比 (86.57 \pm 6.58)%、(65.45 \pm 8.45)%、(49.58 \pm 7.96)%] 显著降低 ($P < 0.05$), 迁移细胞数 [(98.47 \pm 8.79) 个比 (43.57 \pm 6.53) 个] 与侵袭细胞数 [(88.42 \pm 9.32) 个比 (45.56 \pm 5.13) 个] 显著减少 ($P < 0.05$), MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), SIRT6 蛋白表达水平 (0.42 \pm 0.03 比 1.03 \pm 0.15) 显著升高 ($P < 0.05$); 细胞克隆形成实验显示 AB4 可降低 HGC-27 细胞存活分数 ($P < 0.05$), 增加增敏比, 降低 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 的表达水平 ($P < 0.05$); 干扰 SIRT6 表达联合 AB4 处理后, 迁移细胞数 [(44.25 \pm 5.52) 个比 (86.47 \pm 11.16) 个] 与侵袭细胞数 [(48.56 \pm 6.29) 个比 (90.17 \pm 12.13) 个] 显著增多 ($P < 0.05$), MMP-2、MMP-9