

纳米雄黄对MCF-7乳腺癌干细胞的体外抑制作用

邬俊^{1,2*}, 王贵², 陈毅², 王唯婷², 姜爽^{1#a}, 王晓波^{1#b} (1. 解放军联勤保障部队第967医院药剂科, 辽宁大连 116021; 2. 大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R285.5; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)04-0473-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.04.15



摘要 目的 研究纳米雄黄对乳腺癌干细胞的体外抑制作用。方法 以人乳腺癌MCF-7亲本细胞为对象, 采用无血清培养法培养获得乳腺癌干细胞。以阿霉素(1 mg/L)为阳性对照, 以相同质量浓度的水飞雄黄为参照, 采用CCK-8法检测纳米雄黄对MCF-7亲本细胞及干细胞增殖的影响; 借助悬浮球形成及分化实验、划痕实验、Transwell侵袭实验及流式细胞仪检测纳米雄黄对乳腺癌干细胞悬浮球形成及分化能力、迁移及侵袭能力、CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例的影响; 采用Western blot法检测乳腺癌干细胞上皮间质转化通路相关蛋白(上皮钙黏着蛋白、波形蛋白)的表达水平。结果 水飞雄黄、纳米雄黄1、5、10、40、60、80 mg/L组MCF-7亲本细胞及其干细胞(两者1 mg/mL组乳腺癌干细胞除外)的存活率均显著低于空白对照组($P < 0.01$); 水飞雄黄、纳米雄黄1、2.5、5、10 mg/L组的多细胞悬浮球(>20个细胞)数量均显著少于空白对照组($P < 0.01$), 且悬浮球体积有所缩小, 分化的贴壁细胞有所减少, 其划痕愈合率、相对侵袭率(水飞雄黄1 mg/L组除外)、CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例均显著低于空白对照组($P < 0.01$); 水飞雄黄、纳米雄黄2.5、10 mg/L组细胞中上皮钙黏着蛋白的表达水平均显著高于空白对照组, 波形蛋白的表达水平均显著低于空白对照组($P < 0.01$)。纳米雄黄的上述作用普遍优于相同质量浓度的水飞雄黄($P < 0.01$)。结论 与相同质量浓度的水飞雄黄比较, 纳米雄黄可更明显地抑制乳腺癌干细胞的增殖、悬浮球的形成及分化能力, 并可降低CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例。这种作用可能与纳米雄黄通过抑制上皮间质转化通路相关蛋白的表达而抑制乳腺癌干细胞的迁移和侵袭有关。

关键词 雄黄; 纳米雄黄; 水飞雄黄; 乳腺癌干细胞; 人乳腺癌MCF-7亲本细胞; 侵袭; 转移

In vitro inhibitory effects of realgar nanoparticles on MCF-7 breast cancer stem cells

WU Jun^{1,2}, WANG Gui², CHEN Yi², WANG Weiting², JIANG Shuang¹, WANG Xiaobo¹ (1. Dept. of Pharmacy, No. 967 Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Liaoning Dalian 116021, China; 2. School of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study *in vitro* inhibitory effects of realgar nanoparticles on breast cancer stem cells. **METHODS** Human breast cancer MCF-7 parent cells were selected as subjects and cultured by serum-free culture to obtain breast cancer stem cells. Using adriamycin (1 mg/L) as positive control, same concentration of water-processed realgar as reference, the effects of realgar nanoparticles on the proliferation of MCF-7 parent cells and stem cells were detected by CCK-8 method. The effects of realgar nanoparticles on the formation of mammosphere, the ability of differentiation, migration and invasion, the proportion of CD44⁺/CD24⁻ subgroup in breast cancer stem cells were detected by mammosphere formation and differentiation experiment, scratch experiment, Transwell invasion experiment and flow cytometry. Western blot assay was used to detect the expression of proteins related to epithelial mesenchymal transformation pathway (E-cadherin and vimentin) in breast cancer stem cells. **RESULTS** The survival rates of MCF-7 parent cells and stem cells (except for breast cancer stem cells in both 1 mg/mL groups) in 1, 5, 10, 40, 60, 80 mg/L groups of water-processed realgar and realgar nanoparticles were significantly lower than blank control group ($P < 0.01$). The number of mammosphere (>20 stem cells) in 1, 2.5, 5, 10 mg/L groups of water-processed realgar and realgar nanoparticles was significantly lower than blank control group ($P < 0.01$); the volume of mammosphere decreased and the differentiated adherent cells decreased; the healing rate of wound, relative invasion rate (except for water-processed realgar 1 mg/L group) and the proportion of CD44⁺/CD24⁻ subgroup were significantly lower than blank control group ($P < 0.01$). The expressions of E-cadherin in 2.5, 10 mg/L groups of water-processed realgar and realgar nanoparticles was significantly higher than blank control group, and the expressions of vimentin was significantly lower than those in blank control group ($P < 0.01$). The above effects of realgar nanoparticles were generally better than those of water-processed realgar with the same mass concentration ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS** Compared with water-processed realgar with the same mass concentration, realgar nanoparticles can

* 硕士研究生。研究方向: 纳米药物抗肿瘤干细胞作用。E-mail: wujun121619@163.com

#a 通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 抗肿瘤纳米制剂。电话: 0411-39847132。E-mail: jshcrystal@qq.com

#b 通信作者: 主任药师, 博士生导师, 博士。研究方向: 抗肿瘤中药制剂。电话: 0411-39847000。E-mail: wxbbenson0653@sina.com

significantly inhibit the proliferation of breast cancer stem cells, the formulation and differential ability of mammosphere, and reduce the proportion of CD44⁺/CD24⁻ subgroup. The effect may be associated with the inhibition of migration and invasion of breast cancer stem cells by inhibiting the expression of proteins related to epithelial mesenchymal

transformation pathway.

KEYWORDS realgar; realgar nanoparticles; water-processed realgar; breast cancerstem cell; human breast cancer MCF-7 parent cell; invasion; metastasis

2003年, Al-hajj等^[1]从乳腺肿块中分离出少量抗原表型为CD44⁺/CD24⁻的乳腺癌干细胞,首次证实乳腺癌组织中也存在干细胞。随后的研究表明,乳腺癌干细胞具有对化疗、放疗及缺氧环境的抵抗性和高致瘤性、高侵袭转移性等特征,在乳腺癌的发生、发展、复发、转移中发挥重要作用^[2-3]。如何在乳腺癌的治疗中根除干细胞,进而防止其复发和转移是学界目前亟待解决的科学问题^[4-5]。

雄黄,其主要成分为二硫化二砷。研究表明,雄黄在造血系统肿瘤特别是急性早幼粒细胞白血病中具有巨大的治疗潜力^[6-7]。笔者所在医院研制的复方黄黛片(由青黛、雄黄、太子参及丹参组方而成)用于治疗急性早幼粒细胞白血病的缓解率高、不良反应少且无骨髓抑制性,在临床上应用广泛^[8-9]。近年来,有研究发现,将水飞雄黄纳米化(以下简称“纳米雄黄”)是提高雄黄溶解度和生物利用度的有效途径,也是增强其对肺癌、肝癌、乳腺癌等多种实体瘤细胞抑制活性的重要手段^[10-11]。目前,纳米雄黄对白血病干细胞、肺癌干细胞的增殖抑制、诱导分化作用已有报道^[12-13],但其对乳腺癌干细胞是否有抑制作用尚不清楚。因此,本研究在分析纳米雄黄抑制人乳腺癌MCF-7亲本细胞的基础上,进一步探索其对无血清培养乳腺癌干细胞增殖、悬浮球形成及分化能力、迁移及侵袭能力、CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例、上皮间质转化通路相关蛋白表达等的影响,以探讨其可能的作用机制,为乳腺癌复发、转移及有效治疗提供新的理论与实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括:BNP-150CDF1型CO₂细胞培养箱(苏州贝因医疗器械有限公司),IX73型倒置显微镜(日本Olympus公司),Anthos 2010型全自动酶标仪(英国Biochrom公司),C6型流式细胞仪(美国BD公司),PAC300型电泳仪(美国Bio-Rad公司),TS 2000A型脱色摇床(海门市分析仪器厂),Amersham Imager 600型凝胶成像系统(美国General Electric公司),TGL-16M型高速台式冰冻离心机(湘潭湘仪仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

药用雄黄(批号140408,主要成分为二硫化二砷,约200目,粒径小于76 μm,纯度98%,产自湖南常德)购自长沙医药公司,经解放军联勤保障部队第967医院药剂科主任药师王晓波鉴定为真品;阿霉素对照品(批号2468183,纯度99%)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;RPMI 1640培养基、DMEM-F12培养基、胎牛血

清、B27添加剂、BCA试剂盒均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;人碱性成纤维细胞生长因子、人表皮生长因子购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;人工基底膜(matrigel)、脱脂奶粉均购自美国BD公司;青霉素和链霉素、结晶紫、吐温20(Tween 20)乳化剂、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, pH7.4)、磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffer saline with Tween 20, PBST)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶和浓缩胶缓冲液均购自北京索莱宝科技有限公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的人抗小鼠CD44单克隆抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的人抗小鼠CD24单克隆抗体均购自Biolegend(北京)生物科技有限公司;兔源上皮钙黏着蛋白单克隆抗体、兔源波形蛋白单克隆抗体和兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体均购自美国Cell Signaling公司;聚偏氟乙烯膜购自美国Bio-Rad公司;CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗及ECL化学发光底物试剂盒均购自合肥志宏生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7亲本细胞株购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 纳米雄黄、水飞雄黄及其混悬液的制备

参考文献[10],制备纳米雄黄和水飞雄黄,并按如下方法制备混悬液:称取已灭菌的纳米雄黄和水飞雄黄5 mg于离心管中,加入已灭菌的PBS 5 mL,超声振荡30 min使混匀,配制成质量浓度均为1 000 mg/L的混悬液;取上述混悬液,用PBS分别稀释至不同质量浓度(800、600、400、100、50、25、10 mg/L,以二硫化二砷计,下同)^[9],于4 °C下保存,备用。

2.2 细胞培养及观察

MCF-7亲本细胞血清培养:采用血清培养法,将MCF-7亲本细胞按密度 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于含10%胎牛血清、1%青链霉素的RPMI 1640培养基(以下简称“SSM”)中,置于37 °C、5%CO₂、100%相对湿度的细胞培养箱中培养(培养条件下同),使用倒置显微镜观察其形态,每3天传代1次,取对数生长期的MCF-7亲本细胞用于后续实验。MCF-7亲本细胞无血清培养:采用无血清培养法,将上述对数生长期的MCF-7亲本细胞按密度 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于含20 ng/mL人碱性成纤维细胞生长因子、20 ng/mL人表皮生长因子、2% B27、1%青链霉素

的DMEM-F12培养基(以下简称“SFM”)中,置于37℃、5%CO₂、100%相对湿度的细胞培养箱中培养(培养条件下同),使用倒置显微镜观察其形态,每3天进行半量换液,待细胞增殖成致密的悬浮球时,机械吹打制成单细胞悬液,每7天传代1次,取第5代对数生长期的悬浮球细胞作为乳腺癌干细胞进行后续实验。

2.3 细胞增殖检测

采用CCK-8法进行检测。取“2.2”项下对数生长期的MCF-7亲本细胞及干细胞,分别用SSM和SFM重悬并制成密度均为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔90 μL 接种于96孔板中,培养12 h后,将细胞分为空白对照组和纳米雄黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为1、5、10、40、60、80 mg/L)、阿霉素1 mg/L组(阳性对照),给药浓度参考文献[10]及前期预实验;同时,设置含相应质量浓度药液和相应培养基、不含细胞的药物空白组以及不含药物和细胞的空白培养基组,每组设置3个复孔。空白对照组加入PBS 10 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液10 μL 。继续培养24 h后,每孔加入CCK-8试剂10 μL ,继续培养3 h,用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的光密度(optical density, OD)值并计算细胞存活率:细胞存活率(%)=[给药组OD_{450 nm}-药物空白组OD_{450 nm}]/[空白对照组OD_{450 nm}-空白培养基组OD_{450 nm}] $\times 100\%$ 。实验重复3次。

2.4 细胞悬浮球形成及分化能力检测

采用悬浮球形成及分化实验。取“2.2”项下第5代对数生长期的乳腺癌干细胞,用SFM重悬并制成密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔1 800 μL 接种于6孔板中,培养12 h后,将细胞分为空白对照组、阿霉素1 mg/L组(阳性对照)和纳米雄黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为1、2.5、5、10 mg/L,给药浓度参考“2.3”项下结果并排除高质量浓度致细胞毒性的影响),每组设置3个复孔。空白对照组加入PBS 200 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液200 μL 。继续培养48 h后,于倒置显微镜下观察各组细胞形成悬浮球的体积并统计多细胞悬浮球(>20个细胞)的数量。收集各组悬浮球细胞,以3 000 r/min离心5 min,用SSM重悬并制成密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔1 000 μL 接种于6孔板中,于倒置显微镜下观察细胞形态。3 d后,收集贴壁细胞,用SFM重悬并制成密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔1 000 μL 接种于6孔板中,对各组细胞形态进行观察并拍照,以考察干细胞的分化能力。实验重复3次。

2.5 细胞迁移能力检测

采用划痕实验进行检测。取“2.2”项下第5代对数生长期的乳腺癌干细胞,用SFM重悬并制成密度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔1 000 μL 接种于背面划有2条横线的24孔板中,待细胞铺满孔底后,用10 μL 的枪头在24孔板底垂直于横线划痕,PBS清洗后,将细胞分为空白对照组、阿霉素1 mg/L组(阳性对照)和纳米雄

黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为1、2.5、5、10 mg/L,浓度设置依据同“2.4”项),每组设置3个复孔。各组均加入无血清的RPMI 1640培养基900 μL ,随后空白对照组加入PBS 100 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液100 μL ,混匀。分别培养0、24 h后,于倒置显微镜下观察划痕愈合情况并拍照,计算划痕愈合率:划痕愈合率(%)=(1-划痕宽度_{24h}/划痕宽度_{0h}) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

2.6 细胞侵袭能力检测

采用Transwell侵袭实验进行检测。将matrigel与预冷的DMEM-F12培养基(两者体积比1:8)混匀后,取50 μL 均匀包被Transwell小室上膜,放入培养箱中孵育4 h。取“2.2”项下第5代对数生长期的乳腺癌干细胞,用SFM重悬,以3 000 r/min离心5 min,用PBS清洗2次,随后将细胞用无血清的RPMI 1640培养基重悬并制成密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔90 μL 加入小室内,小室外加入SSM 700 μL 。培养4 h后,将细胞分为空白对照组、阿霉素1 mg/L组(阳性对照)和纳米雄黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为1、2.5、5、10 mg/L,浓度设置依据同“2.4”项),每组设置3个复孔。空白对照组加入PBS 10 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液10 μL 。培养24 h后,取出小室,弃上层液体,用3.7%甲醛溶液固定5 min,PBS清洗;用甲醇固定20 min,PBS清洗;最后用0.1%结晶紫乙醇溶液染色15 min,PBS清洗,用棉棒轻轻擦去小室内未穿过小室膜的细胞,晾干,于倒置显微镜下观察小室膜外层细胞并拍照,随后将小室放入含33%乙酸溶液400 μL 的24孔板中,使细胞中的结晶紫全部溶解于乙酸中。将含有结晶紫的乙酸溶液移入96孔板中,用酶标仪在570 nm波长处检测各孔的OD值并计算相对侵袭率:相对侵袭率(%)=(给药组OD_{570 nm}/空白对照组OD_{570 nm}) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

2.7 细胞中CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例检测

采用流式细胞仪进行检测。取“2.2”项下第5代对数生长期的乳腺癌干细胞,用SFM重悬并制成密度为 $6 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔1 800 μL 接种于6孔板中。培养12 h后,将细胞分为空白对照组、阿霉素1 mg/L组(阳性对照)和纳米雄黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为1、2.5、5、10 mg/L,剂量设置依据同“2.4”项),每组设置3个复孔。空白对照组加入PBS 200 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液200 μL 。继续培养48 h后,收集各组乳腺癌干细胞,用PBS 1 mL清洗1次,并用PBS 100 μL 重悬,加入FITC标记的CD44单克隆抗体5 μL 、PE标记的CD24单克隆抗体5 μL ,混匀,4℃避光孵育30 min,用PBS清洗3次,再用PBS 200 μL 重悬,并于1 h内使用流式细胞仪检测各组CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例。实验重复3次。

2.8 细胞上皮间质转化通路相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下第5代

对数生长期的乳腺癌干细胞,用SFM重悬并制成密度为 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按每孔 $1\ 800\ \mu\text{L}$ 接种于6孔板中。培养12 h后,将细胞分为空白对照组和纳米雄黄、水飞雄黄不同质量浓度组(均为2.5、10 mg/L,浓度设置参考前期Western blot预实验结果),每组设置3个复孔。空白对照组加入PBS 200 μL ,各给药组加入相应质量浓度的药液200 μL 。培养24 h后,收集并裂解细胞,提取总蛋白。采用BCA法检测蛋白浓度,加入上样缓冲液并煮沸使蛋白变性。根据蛋白浓度,计算电泳上样量。使用5%的浓缩胶和10%的分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上。用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入上皮钙黏着蛋白、波形蛋白、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用PBST洗膜3次,每次10 min,随后加入相应二抗(稀释比例为1:3 000),孵育2 h;再用PBST洗膜3次,每次10 min,最后加入ECL化学发光液反应5 min,使用凝胶成像系统进行显影。采用Image J 1.8.0软件,以目标蛋白与内参GAPDH的灰度比值表示目标蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.9 统计学分析

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,采用Graphpad Prism 8.0软件作图。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞形态及生长方式观察结果

当使用SSM培养,MCF-7亲本细胞呈类似多边形单层贴壁生长。而使用SFM培养,部分MCF-7亲本细胞可于培养1~3 d后形成若干体积、形态不等的细胞悬浮球,且培养液呈悬浮状态,细胞间连接较松散;培养5~7 d后悬浮球体积逐渐增大,数量增多,球内细胞结合紧密,折光性强。当7 d后进行传代,细胞可继续呈悬浮球状生长,表明在连续的无血清培养条件下,部分MCF-7亲本细胞仍能存活并增殖形成具有自我更新能力的肿瘤干细胞悬浮球。结果见图1。

3.2 纳米雄黄对MCF-7亲本细胞及其干细胞增殖的影响

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组MCF-7亲本细胞及其干细胞(两者1 mg/L组乳腺癌干细胞除外)的存活率均显著降低($P<0.01$),且有随药物质量浓度增加而降低的趋势;与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄5~80 mg/L组MCF-7亲本细胞及其干细胞的存活率更低($P<0.01$)。结果见表1。

3.3 纳米雄黄对乳腺癌干细胞悬浮球形成及分化能力的影响

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组形成的多细胞悬浮球数量均显著减少($P<0.01$),且悬

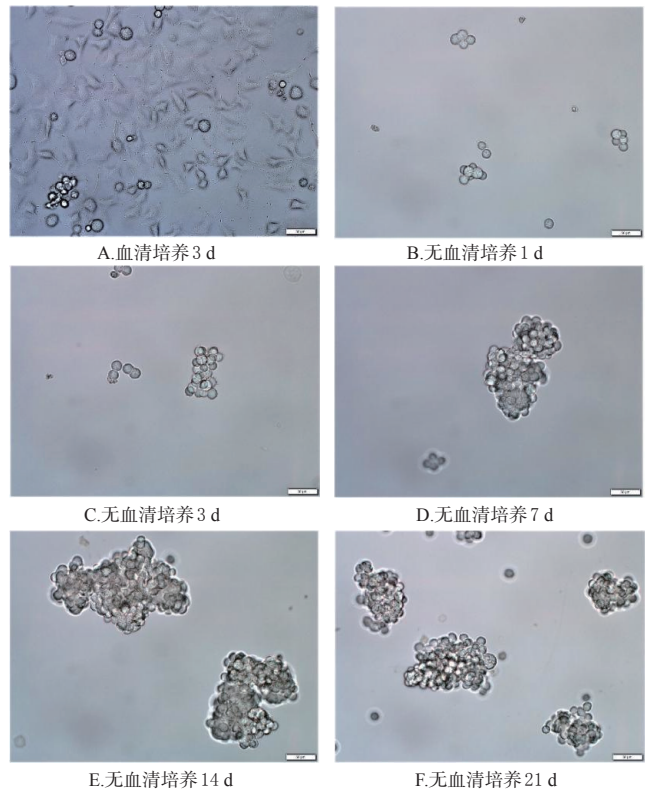


图1 MCF-7亲本细胞及其干细胞形态观察的显微图($\times 200$)

表1 各组MCF-7亲本细胞及其干细胞存活率比较($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	MCF-7亲本细胞	乳腺癌干细胞	组别	MCF-7亲本细胞	乳腺癌干细胞
空白对照组	99.10 \pm 3.61	98.97 \pm 2.13	阿霉素1 mg/L组	61.83 \pm 2.82 ^a	69.43 \pm 2.79 ^a
水飞雄黄1 mg/L组	85.77 \pm 2.80 ^a	93.60 \pm 1.20	纳米雄黄1 mg/L组	80.40 \pm 3.13 ^{ab}	91.40 \pm 2.00
水飞雄黄5 mg/L组	73.77 \pm 1.70 ^a	80.60 \pm 1.82 ^a	纳米雄黄5 mg/L组	65.73 \pm 2.25 ^{ab}	74.67 \pm 1.49 ^{ab}
水飞雄黄10 mg/L组	65.20 \pm 3.53 ^a	72.67 \pm 1.76 ^a	纳米雄黄10 mg/L组	59.93 \pm 3.12 ^{ab}	65.23 \pm 1.31 ^{ab}
水飞雄黄40 mg/L组	48.23 \pm 4.10 ^a	54.37 \pm 1.83 ^a	纳米雄黄40 mg/L组	41.63 \pm 3.24 ^{ab}	47.30 \pm 1.07 ^{ab}
水飞雄黄60 mg/L组	31.13 \pm 1.54 ^a	42.87 \pm 1.84 ^a	纳米雄黄60 mg/L组	27.70 \pm 1.56 ^{ab}	37.80 \pm 1.53 ^{ab}
水飞雄黄80 mg/L组	23.80 \pm 2.37 ^a	33.37 \pm 2.45 ^a	纳米雄黄80 mg/L组	15.63 \pm 1.51 ^{ab}	24.30 \pm 2.51 ^{ab}

a:与空白对照组比较, $P<0.01$;b:与相同质量浓度的水飞雄黄组比较, $P<0.01$

浮球体积缩小;与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄组对细胞悬浮球形成能力的抑制作用更强($P<0.01$)。结果见表2、图2。

表2 各组乳腺癌干细胞形成的多细胞悬浮球数量比较($\bar{x} \pm s, n=3, \text{个}$)

组别	多细胞悬浮球数量	组别	多细胞悬浮球数量
空白对照组	182.75 \pm 3.27	阿霉素1 mg/L组	30.25 \pm 1.92 ^a
水飞雄黄1 mg/L组	121.75 \pm 2.86 ^a	纳米雄黄1 mg/L组	91.75 \pm 2.38 ^{ab}
水飞雄黄2.5 mg/L组	96.25 \pm 2.38 ^a	纳米雄黄2.5 mg/L组	79.52 \pm 2.96 ^{ab}
水飞雄黄5 mg/L组	44.51 \pm 2.92 ^a	纳米雄黄5 mg/L组	17.54 \pm 1.86 ^{ab}
水飞雄黄10 mg/L组	16.51 \pm 1.12 ^a	纳米雄黄10 mg/L组	7.25 \pm 2.83 ^{ab}

a:与空白对照组比较, $P<0.01$;b:与相同质量浓度的水飞雄黄组比较, $P<0.01$

对各组悬浮球细胞进行诱导分化,培养24 h后,可见细胞开始贴壁,形态呈类似多边形,与SSM条件下培

养的MCF-7亲本细胞(图1A)形态无明显差异;与空白对照组比较,各给药组贴壁细胞数量明显减少;与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄组贴壁细胞更少(图3)。收集各组分化的贴壁细胞,重悬于SFM中,48 h后细胞可继续呈悬浮球状生长,但经过高浓度药物处理后所形成的悬浮球体积明显小于空白对照组(图4)。

3.4 纳米雄黄对乳腺癌干细胞迁移及侵袭能力的影响

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组乳腺癌干细胞的划痕愈合率均显著降低($P < 0.01$),且有随药物质量浓度增加而降低的趋势;与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄组乳腺癌干细胞的划痕愈合率(纳米雄黄10 mg/L组除外)更低($P < 0.01$)。结果

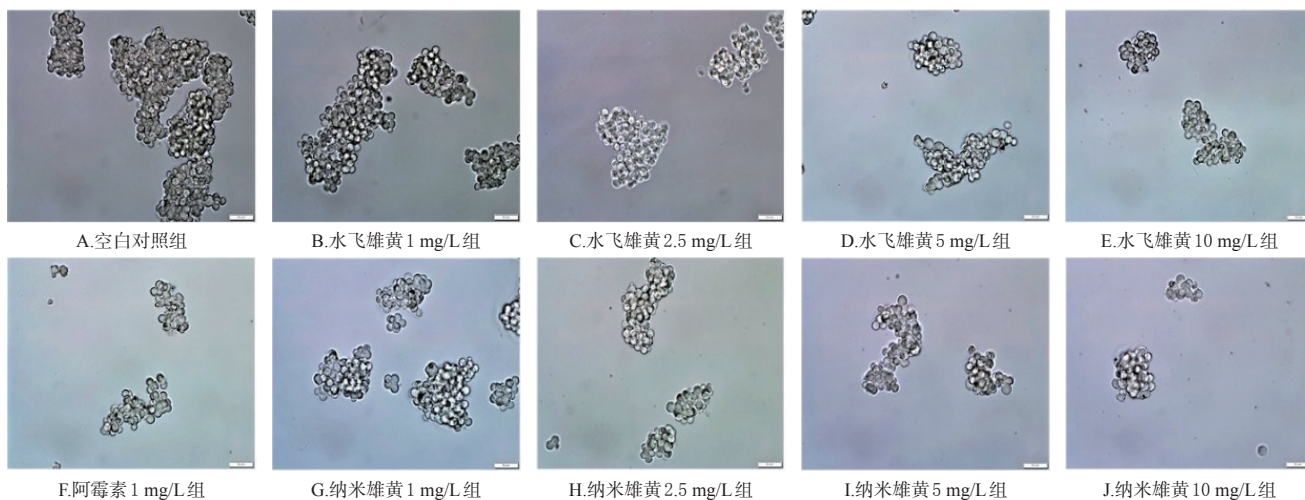


图2 各组乳腺癌干细胞悬浮球形成能力的显微图($\times 200$)

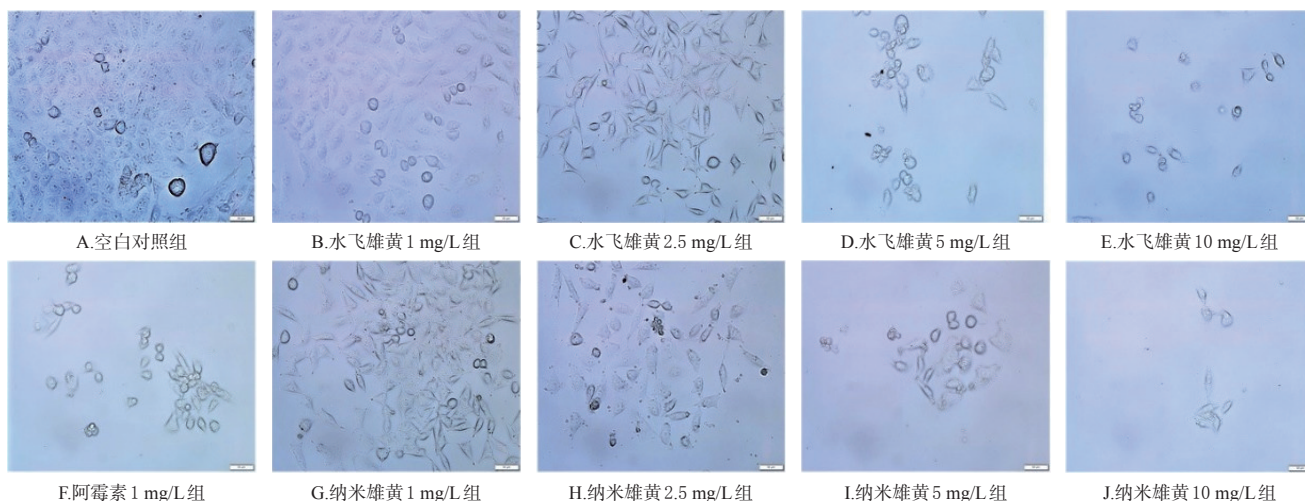


图3 各组乳腺癌干细胞悬浮球分化能力的显微图($\times 200$)

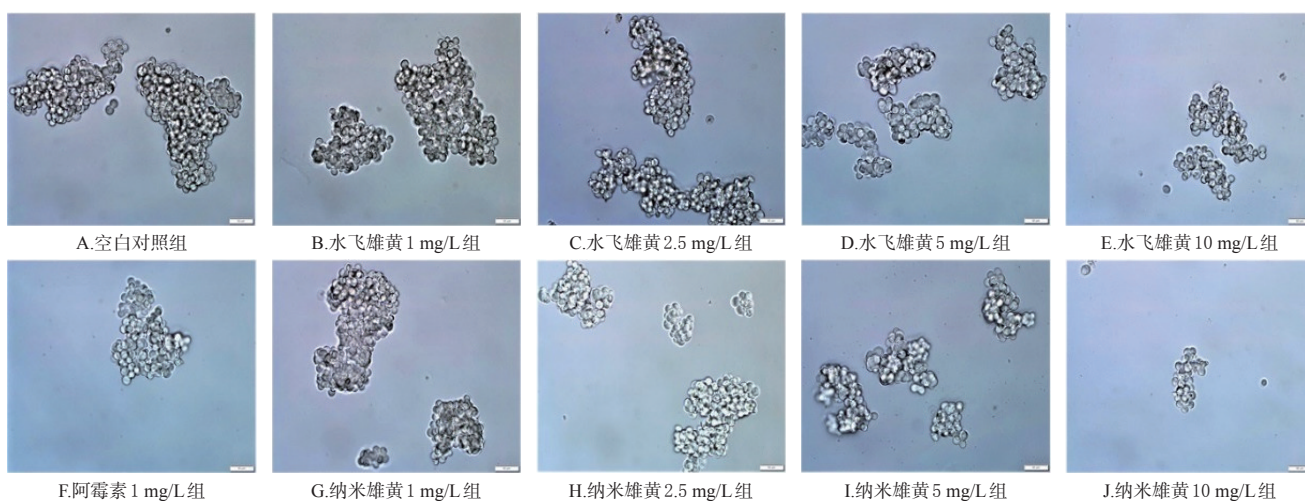


图4 纳米雄黄和水飞雄黄对分化后细胞悬浮球形成能力影响的显微图($\times 200$)

见表3、图5。

表3 各组乳腺癌干细胞的划痕愈合率和相对侵袭率比较($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	划痕愈合率	相对侵袭率	组别	划痕愈合率	相对侵袭率
空白对照组	48.25 ± 1.89	100.40 ± 1.69	阿霉素 1 mg/L组	26.89 ± 0.93 ^a	63.67 ± 2.47 ^a
水飞雄黄 1 mg/L组	41.69 ± 2.68 ^a	93.20 ± 1.89	纳米雄黄 1 mg/L组	32.18 ± 1.77 ^{ab}	88.40 ± 1.55 ^a
水飞雄黄 2.5 mg/L组	33.08 ± 3.70 ^a	83.00 ± 1.96 ^a	纳米雄黄 2.5 mg/L组	19.26 ± 1.94 ^{ab}	70.13 ± 2.57 ^{ab}
水飞雄黄 5 mg/L组	18.08 ± 1.90 ^a	52.50 ± 1.71 ^a	纳米雄黄 5 mg/L组	10.92 ± 1.02 ^{ab}	41.75 ± 2.37 ^{ab}
水飞雄黄 10 mg/L组	11.81 ± 1.63 ^a	39.30 ± 2.04 ^a	纳米雄黄 10 mg/L组	8.21 ± 0.78 ^a	26.22 ± 2.55 ^{ab}

a:与空白对照组比较, $P < 0.01$; b:与相同质量浓度的水飞雄黄组比较, $P < 0.01$

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组均可呈剂量依赖趋势地减少乳腺癌干细胞进入小室下

膜的数量,其相对侵袭率(水飞雄黄 1 mg/L组除外)均显著降低($P < 0.01$),且有随药物质量浓度增加而降低的趋势;与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄组的相对侵袭率(纳米雄黄 1 mg/L组除外)更低($P < 0.01$)。结果见表3、图6。

3.5 纳米雄黄对CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例的影响

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组干细胞悬浮球的CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例均显著降低($P < 0.01$);与相同质量浓度的水飞雄黄组比较,纳米雄黄组的CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例更低($P < 0.01$)。结果见图7、表4。

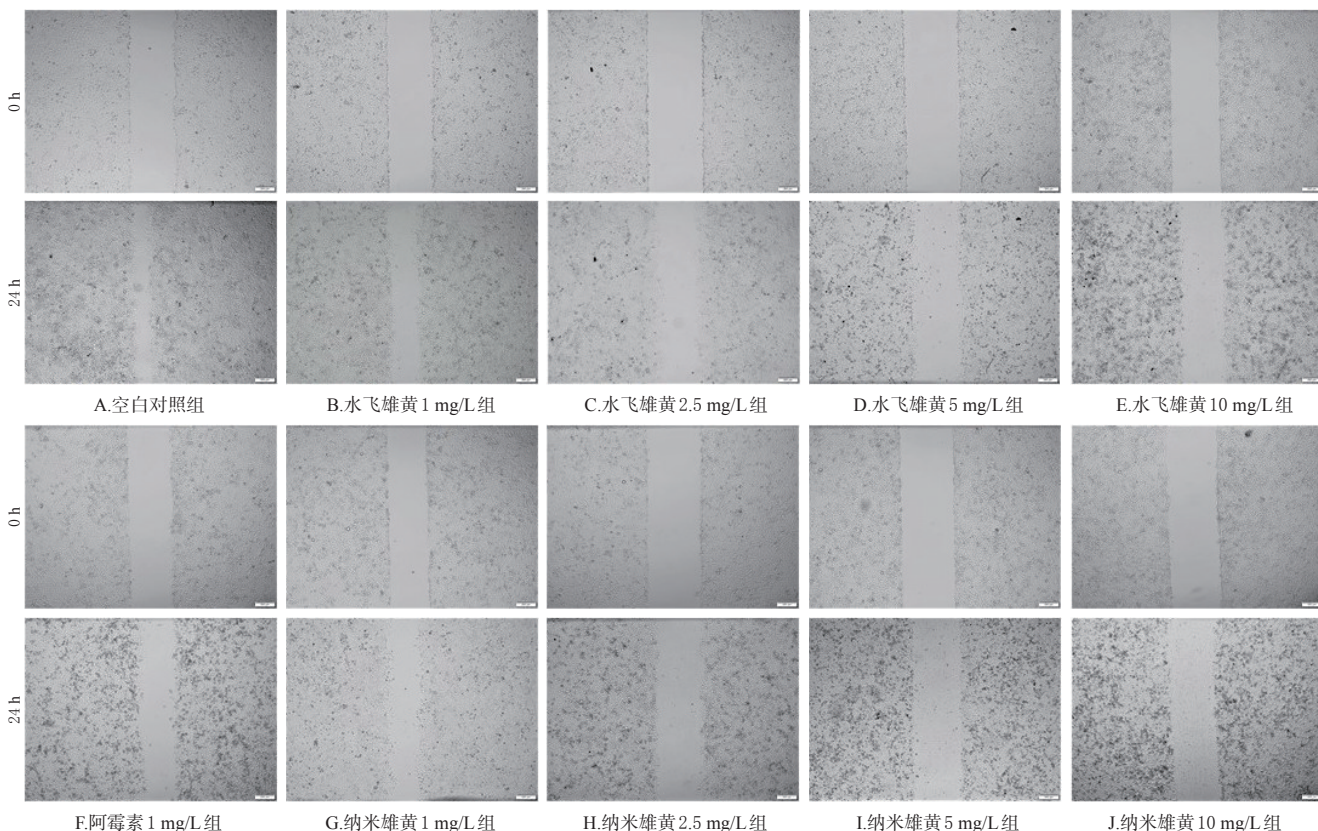


图5 各组乳腺癌干细胞迁移能力的显微图($\times 40$)

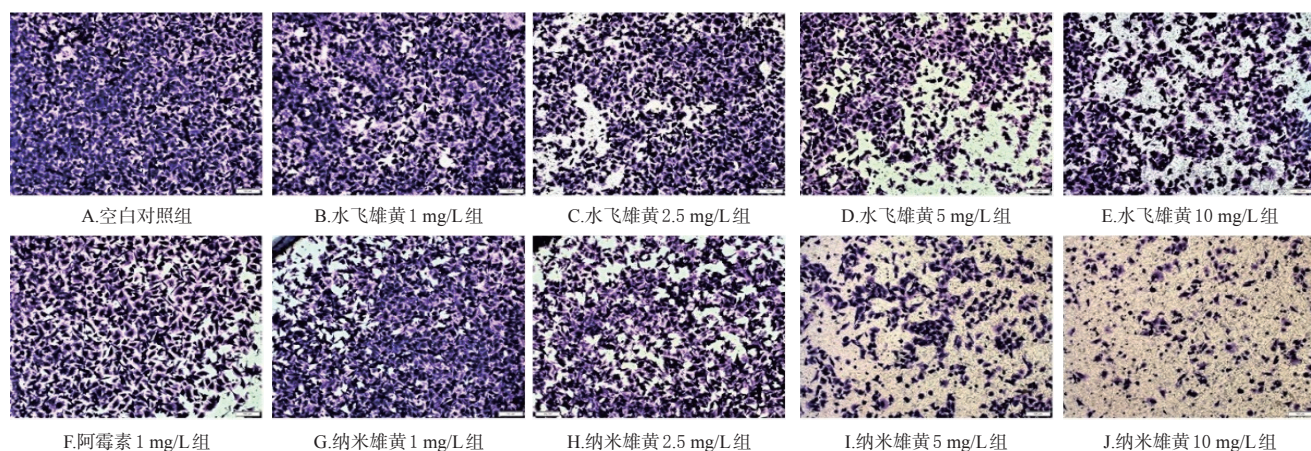


图6 各组乳腺癌干细胞侵袭能力的显微图($\times 100$)

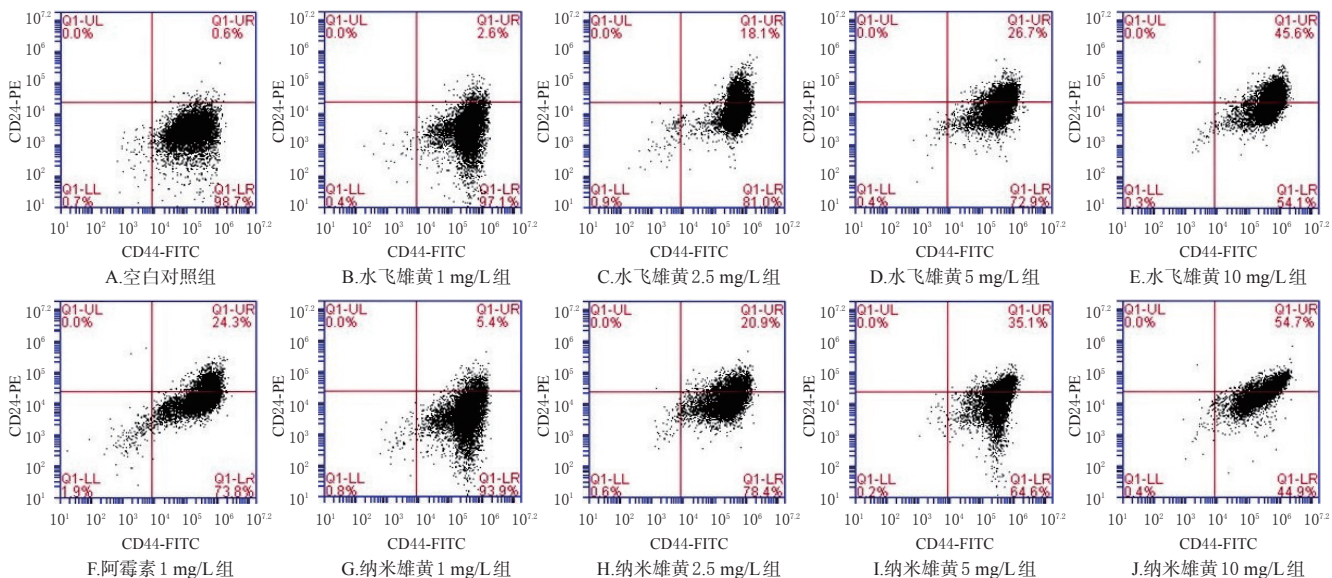


图7 各组乳腺癌干细胞CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例的流式图

表4 各组乳腺癌干细胞CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例比较($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ 细胞亚群比例	组别	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ 细胞亚群比例
空白对照组	96.57 ± 1.81	阿霉素 1 mg/L	73.37 ± 2.27 ^a
水飞雄黄 1 mg/L	94.23 ± 2.33 ^a	纳米雄黄 1 mg/L	90.27 ± 2.74 ^{ab}
水飞雄黄 2.5 mg/L	80.41 ± 2.71 ^a	纳米雄黄 2.5 mg/L	75.92 ± 1.93 ^{ab}
水飞雄黄 5 mg/L	72.47 ± 2.35 ^a	纳米雄黄 5 mg/L	62.73 ± 1.59 ^{ab}
水飞雄黄 10 mg/L	53.73 ± 2.22 ^a	纳米雄黄 10 mg/L	43.43 ± 1.37 ^{ab}

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与相同质量浓度的水飞雄黄组比较, $P < 0.01$

3.6 纳米雄黄对乳腺癌干细胞上皮间质转化通路相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,水飞雄黄、纳米雄黄各给药组乳腺癌干细胞中上皮钙黏着蛋白的表达水平均显著升高,波形蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.01$),且有随着药物质量浓度增加而升高或降低的趋势;与相同质量浓度的水飞雄黄比较,纳米雄黄下调波形蛋白表达及上调上皮钙黏着蛋白表达的作用更强($P < 0.01$)。结果见表5、图8。

表5 各组乳腺癌干细胞上皮间质转化通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	上皮钙黏着蛋白	波形蛋白
空白对照组	0.25 ± 0.01	1.05 ± 0.05
水飞雄黄 2.5 mg/L 组	0.49 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.04 ^a
水飞雄黄 10 mg/L 组	0.82 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.02 ^a
纳米雄黄 2.5 mg/L 组	0.74 ± 0.05 ^{ab}	0.66 ± 0.04 ^{ab}
纳米雄黄 10 mg/L 组	1.21 ± 0.07 ^{ab}	0.16 ± 0.01 ^{ab}

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与相同质量浓度的水飞雄黄组比较, $P < 0.01$

4 讨论

目前,分离肿瘤干细胞较常用的方法有3种:流式与磁珠细胞分选法、侧群细胞分选法、无血清培养法。前两种方法对分选设备及细胞的要求较高,而无血清培养

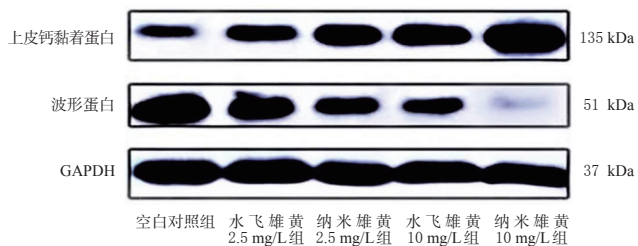


图8 各组乳腺癌干细胞上皮间质转化通路相关蛋白表达的电泳图

法成本相对较低,且可方便快捷地分离富集肿瘤干细胞样细胞^[14]。因此,本研究以人乳腺癌MCF-7亲本细胞为对象,采用无血清培养法培养出了乳腺癌干细胞并对其进行性质鉴定;并以水飞雄黄为参照,初步考察了纳米雄黄对乳腺癌干细胞的抑制作用。在悬浮球培养期间,本研究对悬浮球细胞的自我更新能力进行了考察,发现经SFM培养所得的悬浮球细胞,在SSM培养条件下,可呈单层贴壁生长;将此贴壁细胞重悬于SFM中,细胞可继续呈悬浮球样增殖,说明干细胞悬浮球具有一定的自我更新能力。CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例是公认的乳腺癌干细胞表面标志物^[1]。前期预实验发现,第5代悬浮球细胞CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例为(96.57 ± 1.81)%,所以本研究采用第5代悬浮球细胞作为乳腺癌干细胞进行实验,这也在一定程度上证实了无血清培养法是高度富集肿瘤干细胞的有效途径之一。

近年来研究发现,与水飞雄黄比较,纳米雄黄对多种类型肿瘤细胞的抑制作用更强、生物利用度更高,且纳米雄黄能通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导凋亡等途径对乳腺癌细胞发挥抑制作用,其还能通过抑制基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9、上皮间质转化通路相关蛋白的表达而表现出抗侵袭转移的潜力^[15-18]。本研究以水飞雄黄为参照,通过CCK-8实验、悬浮球形

成及分化实验、划痕实验、Transwell 侵袭实验及流式细胞仪等考察纳米雄黄对无血清培养乳腺癌干细胞的影 响,结果表明纳米雄黄可抑制 MCF-7 亲本细胞及其干 细胞的增殖;且纳米雄黄(1、2.5、5、10 mg/L)可有效抑制乳 腺癌干细胞悬浮球的形成及分化,并可抑制细胞的迁移 及侵袭,降低其 CD44⁺/CD24⁻ 细胞亚群比例;Western blot 实验进一步表明,纳米雄黄可能通过影响乳腺癌干细胞 上皮间质转化通路相关蛋白的表达,从而表现出抗转移 的潜力;同时,上述作用有剂量依赖趋势。此外,本研究 结果还显示,与相同质量浓度的水飞雄黄比较,纳米雄 黄对乳腺癌干细胞的抑制作用更强,具有更好的抗肿瘤 潜能。

综上所述,与相同质量浓度的水飞雄黄比较,纳米 雄黄可更明显地抑制乳腺癌干细胞的增殖、悬浮球的形 成及分化能力,并可降低 CD44⁺/CD24⁻ 细胞亚群比例。 这种作用可能与纳米雄黄通过抑制上皮间质转化通路 相关蛋白的表达而抑制乳腺癌干细胞的迁移和侵袭有 关,提示其可能具有良好的抗乳腺癌干细胞潜能,并可 能在治疗乳腺癌复发、转移方面具有一定的优势。

参考文献

[1] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.

[2] FAHAD ULLAH M. Breast cancer: current perspectives on the disease status[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1152: 51-64.

[3] NASSAR D, BLANPAIN C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications[J]. Annu Rev Pathol, 2016, 11: 47-76.

[4] 陈强,段青.榄香烯乳联合更昔洛韦对 C6 脑肿瘤干细胞侵袭能力及 TIMP-1 mRNA 表达的影响[J].中国药房, 2017, 28(34): 4826-4829.

[5] 陈高,杨晓婷,王曦,等.车前子多糖对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制[J].中国药房, 2021, 32(15): 1848-1853.

[6] 陈思宇,刘陕西,李信民.雄黄对急性早幼粒细胞白血病细胞诱导凋亡和促进分化的双重作用[J].西安交通大学学报(医学版), 2002, 23(4): 401-404.

[7] 张晨,黄世林,向阳,等.雄黄对 T 淋巴细胞白血病细胞系 CEM 的促凋亡作用[J].中西医结合学报, 2003, 1(1):

42-43.

[8] 王晓波,张治然,裘荣刚.雄黄等砷剂治疗白血病的机理及临床应用[J].解放军药理学学报, 2003, 19(2): 129-132.

[9] 向阳,王晓波,孙淑君,等.复方黄黛片诱导治疗急性早幼粒细胞白血病 193 例疗效分析[J].中华血液学杂志, 2009, 30(7): 440-442.

[10] TIAN Y, WANG X B, XI R G, et al. Enhanced antitumor activity of realgar mediated by milling it to nanosize[J]. Int J Nanomed, 2014, 9: 745-757.

[11] 姜爽,王晓波,张治然,等.纳米雄黄抗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞的体外作用研究[J].中国药理学通报, 2017, 33(12): 1721-1729.

[12] HONG Z Y, XIAO M, YANG Y, et al. Arsenic disulfide synergizes with the phosphoinositide 3-kinase inhibitor PI-103 to eradicate acute myeloid leukemia stem cells by inducing differentiation[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(10): 1550-1558.

[13] YANG F R, ZHAO Y F, HU X W, et al. Nano-realgar suppresses lung cancer stem cell growth by repressing metabolic reprogramming[J]. Gene, 2021, 788: 145666.

[14] 张颖,代引海,邱春丽,等.乳腺癌干细胞富集与鉴定的初步研究[J].现代肿瘤医学, 2019, 27(6): 929-934.

[15] WANG X B, GAO H Y, HOU B L, et al. Nanoparticle realgar powders induce apoptosis in U937 cells through caspase MAPK and mitochondrial pathways[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(5): 653-658.

[16] XI X X, SUN J, XID B, et al. Realgar nanoparticles inhibit migration, invasion and metastasis in a mouse model of breast cancer by suppressing matrix metalloproteinases and angiogenesis[J]. Curr Drug Deliv, 2020, 17(2): 148-158.

[17] 李秀荣,李慧杰,许艳艳.纳米雄黄抑制人乳腺癌 MCF-7 亲本细胞上皮间质转化的机制探讨[J].世界中医药, 2016, 11(3): 495-497.

[18] ZHAO Y X, YUAN B, ONDA K, et al. Anticancer efficacies of arsenic disulfide through apoptosis induction, cell cycle arrest, and pro-survival signal inhibition in human breast cancer cells[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(3): 366-386.

(收稿日期:2021-08-23 修回日期:2021-11-19)

(编辑:舒安琴)