

# 莪术醇抗 T47D 乳腺癌细胞增殖的作用机制研究<sup>Δ</sup>

周璐炜<sup>1\*</sup>, 王娟<sup>1,2</sup>, 陈旭<sup>1#</sup> (1. 桂林医学院药学院生药学重点实验室, 广西桂林 541100; 2. 桂林医学院基础医学院, 广西桂林 541100)

中图分类号 R73-3;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0548-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.07



**摘要** 目的 研究莪术醇抗 T47D 乳腺癌细胞增殖的作用机制。方法 采用 MTT 法检测不同剂量莪术醇(0、6.25、12.5、25、50、100 μg/mL)对 T47D 乳腺癌细胞增殖的抑制作用。以莪术醇(12.5、25、50、100 μg/mL)干预 T47D 乳腺癌细胞后,采用倒置相差显微镜观察细胞形态;采用流式细胞仪检测细胞周期及活性氧(ROS)水平;采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期调控因子 p21 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)的 mRNA 表达水平;采用 Western blot 法检测 CDK2、CDK6、细胞周期蛋白 D(Cyclin D)、PCNA、核转录因子 E2-相关因子(Nrf2)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)的蛋白表达水平。另将细胞分为 2 组,其中一组加入不同剂量莪术醇,另外一组加入 33 μg/mL 莪术醇干预 6、12、24、48 h,根据以上 2 组结果确定最佳氧化时间和给药浓度后,另设空白对照组、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(单用 ROS 抗氧化剂 NAC)、莪术醇组(单用莪术醇)、莪术醇联合 NAC 组(采用 ROS 抗氧化剂 NAC 预处理,再加入莪术醇),检测细胞周期及 ROS 荧光强度。结果 莪术醇能使 T47D 乳腺癌细胞增殖抑制率显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),并呈一定的剂量和时间依赖趋势。莪术醇能将 T47D 乳腺癌细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期,并使 ROS 水平显著增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );ROS 抗氧化剂 NAC 能够逆转莪术醇的上述诱导作用( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 结果显示,莪术醇能下调 PCNA 和 CDK2 mRNA 的表达,并上调 p21 mRNA 的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示,莪术醇能显著下调 Keap1、Nrf2、CDK2、CDK6 和 Cyclin D 的蛋白表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );ROS 抗氧化剂 NAC 能够逆转莪术醇对上述蛋白表达的下调作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 莪术醇可能通过诱导氧化应激和细胞周期阻滞,发挥抑制 T47D 乳腺癌细胞增殖的作用。

**关键词** 莪术醇;T47D 乳腺癌细胞;细胞周期阻滞;细胞增殖;氧化应激;作用机制

## Study on the mechanism of curcumol inhibiting the proliferation of breast cancer cells T47D

ZHOU Luwei<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1,2</sup>, CHEN Xu<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541100, China; 2. School of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541100, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the mechanism of curcumol inhibiting the proliferation of breast cancer cells T47D. **METHODS** MTT assay was used to detect the inhibitory effects of different doses of curcumol (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL) on the proliferation of T47D cells. After treated with curcumol (12.5, 25, 50, 100 μg/mL), the morphology of T47D cells was observed by inverted phase contrast microscope. The cell cycle and the levels of reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cell cycle regular p21 and cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) mRNA. Western blot assay was used to detect the protein expression of CDK2, CDK6, Cyclin D, PCNA, nuclear transcription factor E2-related factor (Nrf2) and Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1). Breast cancer cells T47D were divided into 2 groups, one group was given different doses of curcumol, and another group was given curcumol 33 μg/mL for 6, 12, 24, 48 h. After the optimal oxidation time and administration concentration were determined according to the results of the above two groups, the blank control group, N-acetylcysteine (NAC) group (ROS antioxidant NAC alone), curcumol group (curcumol alone), curcumol combined with NAC group (pretreatment with ROS antioxidant NAC, and then adding into curcumol). Cell cycle and fluorescence intensity of ROS were detected. **RESULTS** Curcumol could significantly increase the inhibitory rate of the proliferation of T47D cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and showed a

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82002822, No.81760663);第四批八桂学者 2017 年专项经费(No.桂财教函[2017]143 号);广西科技计划项目(No.桂科 ZD20302006);桂林医学院硕士研究生科研项目(No.GYYK2021006)

\* 硕士研究生。研究方向:生药学。E-mail:zhouluwei0810@163.com

# 通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:天然药物的靶标筛选及分子药理学。电话:0773-5898018。E-mail:chenxu@glmc.edu.cn

certain dose and time dependent trend. Curcumol blocked the cycle in the G<sub>1</sub> phase and significantly increased the level of ROS ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); ROS antioxidant NAC could significantly reverse above inductive effect of curcumol ( $P < 0.01$ ). qRT-PCR showed that curcumol down-regulated the expression of PCNA and CDK2 mRNA and up-regulated the expression of p21 mRNA ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Western blot assay showed that curcumol significantly down-regulated the protein expression of Keap1, Nrf2, CDK2, CDK6 and Cyclin

D ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); ROS antioxidant NAC could reverse the down-regulation effects of curcumol on the expression of these proteins ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** Curcumol may induce oxidative stress and cell arrest in G<sub>1</sub> phase to inhibit the proliferation of T47D cells.

**KEYWORDS** curcumol; breast cancer cells T47D; cell cycle arrest; cell proliferation; oxidative stress; mechanism

乳腺癌是最常见的恶性妇科肿瘤,且患病呈年轻化趋势,严重影响女性健康<sup>[1-2]</sup>。乳腺组织形成恶性细胞是乳腺癌的特征,遗传基因突变、药物使用、饮食习惯及环境因素均可诱发或加剧乳腺癌<sup>[1]</sup>。乳腺癌分子分型包括 luminal A 型、luminal B 型、Her-2 阳性、基底细胞样 4 种亚型,主要采取化疗、放疗、内分泌治疗及靶向治疗等策略,其中化疗和靶向治疗是晚期乳腺癌的主要治疗方法,但药物产生的不良反应和耐药性严重影响治疗效果和患者的生存质量<sup>[1]</sup>。中药因其低毒性、多靶点的特性,被广泛用作抗肿瘤增敏剂及耐药逆转剂<sup>[3-4]</sup>。很多从天然植物中分离得到的提取物具有明显抑制肿瘤细胞增殖的作用,为临床防治肿瘤提供了新的选择,也为天然产物开发及道地药材现代化提供了新的思路<sup>[5]</sup>。

莪术 *Curcuma zedoaria* Rosc. 是常用的中药,具有行气解郁、破瘀、止痛的功效,常用于治疗血气心痛、食积胀痛、瘀血经闭<sup>[6]</sup>。莪术醇是从莪术挥发油中提取的倍半萜类化合物,具有良好的抗肿瘤活性。笔者团队前期研究表明,莪术醇对肺癌、鼻咽癌、乳腺癌、肝癌等恶性肿瘤细胞均有良好的抑制效果<sup>[7-10]</sup>,但其抗乳腺癌机制尚未阐明。因此,本研究以人 T47D 乳腺癌细胞为研究对象,探讨莪术醇影响 T47D 乳腺癌细胞增殖的作用机制,为莪术醇的临床应用提供一定的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Infinite M200 PRO 型酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; CKX 31 型倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司; Class II BSC 型生物安全柜购自新加坡 Esco 科技有限公司; Accuri™ C6 Plus 型流式细胞仪购自美国 BD 公司; CFX Manager 3.0 软件、Power Pac™ Basic 型蛋白电泳系统、Western blot 系统、Chemi Doc™ XRS+ 化学发光凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; Biofuge Stratos 型低温高速离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 药物与试剂

莪术醇(纯度>99%,批号 C100409)购自贵州迪大科技有限责任公司;无水乙醇(货号 64-17-5)购自成都市科隆化工试剂厂;DMEM 高糖培养基(批号 8115027)购自美国 Gibco 公司;小牛血清(货号 FB15015)购自美国 Clark Cooper 公司;青链霉素混合液(货号 P1400)、制胶剂(货号 A1010)、胰蛋白酶(批号 510T0414)和磷酸盐缓冲液(PBS,批号 20200604)购自北京索莱宝科技有限公司;乙二胺四乙酸二钠(货号 6381-92-6)、异丙醇(批号 1912191)购自汕头市西陇化工股份有限公司;MTT 试剂

(货号 298-93-1)购自美国 Amresco 公司;二甲基亚砜(批号 50116)购自天津百伦斯生物技术有限公司;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)引物[包括细胞周期调控因子 p21(货号 HS150827022)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 货号 HS150827022)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2(cyclin dependent kinase 2, CDK2, 货号 HS151104006)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, 货号 HXP08271730609)]购自美国 Invitrogen 公司;BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号 080919191105)、抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC, 批号 111015160224)购自上海碧云天生物科技有限公司;ECL 发光试剂盒(批号 1824c03)购自美国 Affinity 公司;吐温 20(批号 20200820)购自天津市致远化学试剂有限公司;核转录因子 E2-相关因子(nuclear transcription factor E2-related factor, Nrf2, 批号 333778)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Kelch-like ECH associated protein 1, Keap1, 批号 333865)购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;细胞周期抗体 CDK6、CDK2、细胞周期蛋白 D(Cyclin D)(批号 GR3317473-1)购自英国 Abcam 公司; $\beta$ -actin 抗体(批号 17AVO412)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PCNA 抗体(批号 AF0239)购自美国 Affinity 公司;核糖核酸酶 A(RNase A, 货号 ZS103-L)购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 试剂盒(批号 9057689)购自美国 BD 公司;DCFH-DA 探针(货号 38483-26-0)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;Trizol 试剂(批号 W9208)购自北京天根生化科技有限公司;三氯甲烷(货号 67-66-3)购自成都市科隆化学有限公司;丙烯酰胺(批号 691259610)购自合肥白鲨生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 EM35110-01)购自北京依玛博科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号 A27036)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 细胞株

本研究所用人 T47D 乳腺癌细胞株购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养与传代

T47D 乳腺癌细胞培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的 DMEM 高糖培养基(含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 g/L)中。在细胞融合度为 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶和 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸的混合液消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

## 2.2 细胞增殖抑制率的检测

采用MTT法检测。T47D乳腺癌细胞消化传代后,接种于96孔板中,使每个孔中细胞量为 $5 \times 10^3$ 个,每孔体积为100  $\mu\text{L}$ 。待细胞贴壁后加入不同剂量的莪术醇[终质量浓度分别为0(空白对照)、6.25、12.5、25、50、100、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,剂量参照文献[8]设定],每个剂量设置3个复孔。于给药24、48、72 h后加入20  $\mu\text{L}$  5 g/L的MTT溶液,间隔4 h后加入150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,待甲瓚晶体溶解后使用酶标仪在490 nm波长处检测吸光度(A)值,计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) =  $(1 - A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

## 2.3 细胞形态的观察

将对数生长期的T47D乳腺癌细胞接种于6孔板,加入不同剂量的莪术醇[终质量浓度分别为0(空白对照)、12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,剂量参照文献[9]设定],每个剂量设置3个复孔。给药48 h后于倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照。

## 2.4 细胞周期的检测

采用流式细胞仪检测。将T47D乳腺癌细胞接种于70 mm培养皿中,调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ 个/皿,待细胞贴壁后加入不同剂量的莪术醇(终质量浓度同“2.3”项下)。给药48 h后用75%冰乙醇固定细胞,混匀后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存;隔天离心弃上清液,以冰PBS洗涤2次,加入500  $\mu\text{L}$ 的RNase A(100 mg/mL), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴30 min;加入25  $\mu\text{L}$  PI避光室温染色30 min,300目筛网过滤,上机分析细胞周期分布。利用Flow Jo软件分析 $G_1$ 、 $S$ 、 $G_2$ 期细胞占比。

## 2.5 细胞周期相关基因mRNA表达水平的检测

采用qRT-PCR法检测。将T47D乳腺癌细胞接种于培养皿中,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/皿,待细胞贴壁后加入不同剂量的莪术醇(终质量浓度同“2.3”项下)。给药48 h后收集细胞,依次加入Trizol试剂、三氯甲烷、异丙醇、乙醇提取总RNA,检测RNA纯度及浓度后,按照试剂盒说明书进行qRT-PCR反应,PCR引物序列及产物长度见表1。采用Bio-Rad CFX Manager 3.0上机,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示细胞周期相关基因的mRNA表达水平。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
PCNA	上游:5'-GGCGTGAACCTCACCAGTAT-3'	126
	下游:5'-CTTCGTGGTTTGGTCCTCTT-3'	
p21	上游:5'-TGTCGGTCAGAACCCATGC-3'	139
	下游:5'-AAAGTCGAAGTTCATCGCTC-3'	
CDK2	上游:5'-CTGCACTACGACCCCTAACAG-3'	143
	下游:5'-TGGAGGAGAGGGTGAGATTAG-3'	
$\beta$ -actin	上游:5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3'	219
	下游:5'-GTCATACTCCTGCTGCTGAT-3'	

## 2.6 细胞周期相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测。将T47D乳腺癌细胞接种于培养皿中,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/皿,待细胞贴壁后加入不同剂量的莪术醇(终质量浓度同“2.3”项下)。

收集给药48 h后的细胞,加入300  $\mu\text{L}$  RIPA裂解液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰上裂解30 min,以12 000 r/min离心20 min取上清液。蛋白经定量、煮沸处理后,采用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,加入对应的CDK2、Cyclin D、PCNA、CDK6、 $\beta$ -actin抗体(稀释度分别为1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:2 000、1:8 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜;次日用PBST(PBS+吐温20)洗膜3次,每次10 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG或山羊抗兔IgG作为二抗(稀释度分别为1:4 000、1:10 000),室温孵育1 h;用PBST(PBS+吐温20)洗膜3次后,加入ECL显色剂,使用化学发光凝胶成像系统检测目的蛋白。利用Image J软件分析,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值表示上述细胞周期相关蛋白的表达水平。

## 2.7 细胞中ROS的检测

当T47D乳腺癌细胞培养皿中的细胞生长到融合度为80%~90%时,重悬并接种细胞至6孔板中,使每个孔中细胞量为 $4 \times 10^5$ 个,待其贴壁后分为2组:其中一组加入不同剂量莪术醇[终质量浓度同“2.3”项下,另依据MTT结果添加半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量组];另外一组加入33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莪术醇干预6、12、24、48 h。将两组细胞收集至15 mL离心管中,PBS洗涤3次后,用500  $\mu\text{L}$  PBS悬浮细胞,每个样品加入ROS探针DCFH-DA,避光室温染色30 min;染色完毕,PBS洗涤3次,500  $\mu\text{L}$  PBS重悬细胞,300目筛网过滤后上机检测ROS水平。根据结果确定最佳氧化时间为24 h、最佳给药浓度为33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

另取细胞分为空白对照组、NAC组(单用1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的ROS抗氧化剂NAC)、莪术醇组(单用33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莪术醇)、莪术醇联合NAC组(采用1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的ROS抗氧化剂NAC预处理细胞30 min,再加入33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莪术醇),给药48 h后于倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照,每个浓度设置3个复孔。采用流式细胞仪检测其ROS表达水平及周期分布。利用Flow Jo软件分析 $G_1$ 、 $S$ 、 $G_2$ 期细胞占比,DCFH-DA探针检测ROS的荧光强度(结果解析:平均荧光强度值越大,细胞中产生的ROS越多),同“2.6”项下方法检测ROS相关蛋白Nrf2和Keap1(抗体稀释度分别为1:2 000、1:4 000)的表达水平。

## 2.8 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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;不同时间点的比较采用重复测量方差分析。采用Graphpad Prism 8.0作图工具作图。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 莪术醇对T47D乳腺癌细胞增殖的影响

莪术醇能使T47D乳腺癌细胞增殖抑制率显著升高

( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并呈一定的剂量和时间依赖趋势, 其中  $150 \mu\text{g/mL}$  莜术醇处理 72 h 后细胞增殖抑制率在 80% 左右。结果见表 2。

表 2 不同剂量莜术醇干预 T47D 乳腺癌细胞不同时间后的细胞增殖抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
莜术醇 $6.25 \mu\text{g/mL}$ 组	$16.5 \pm 6.5^a$	$20.3 \pm 1.5^b$	$23.5 \pm 3.5^b$
莜术醇 $12.5 \mu\text{g/mL}$ 组	$20.7 \pm 5.7^a$	$37.3 \pm 2.4^b$	$45.8 \pm 2.7^b$
莜术醇 $25 \mu\text{g/mL}$ 组	$34.4 \pm 5.3^b$	$56.5 \pm 1.1^b$	$62.5 \pm 1.2^b$
莜术醇 $50 \mu\text{g/mL}$ 组	$42.1 \pm 4.7^b$	$57.5 \pm 1.1^b$	$73.5 \pm 2.3^b$
莜术醇 $100 \mu\text{g/mL}$ 组	$45.6 \pm 5.1^b$	$64.2 \pm 0.9^b$	$77.1 \pm 2.3^b$
莜术醇 $150 \mu\text{g/mL}$ 组	$48.1 \pm 5.4^b$	$65.1 \pm 0.8^b$	$79.6 \pm 2.5^b$

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$

### 3.2 莜术醇对 T47D 乳腺癌细胞形态的影响

倒置相差显微镜下可见, 空白对照组 T47D 乳腺癌细胞形态正常; 给予  $12.5$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$  莜术醇干预 48 h 后, 细胞逐渐皱缩, 类圆球形细胞增多, 正常形态细胞减少。结果见图 1。

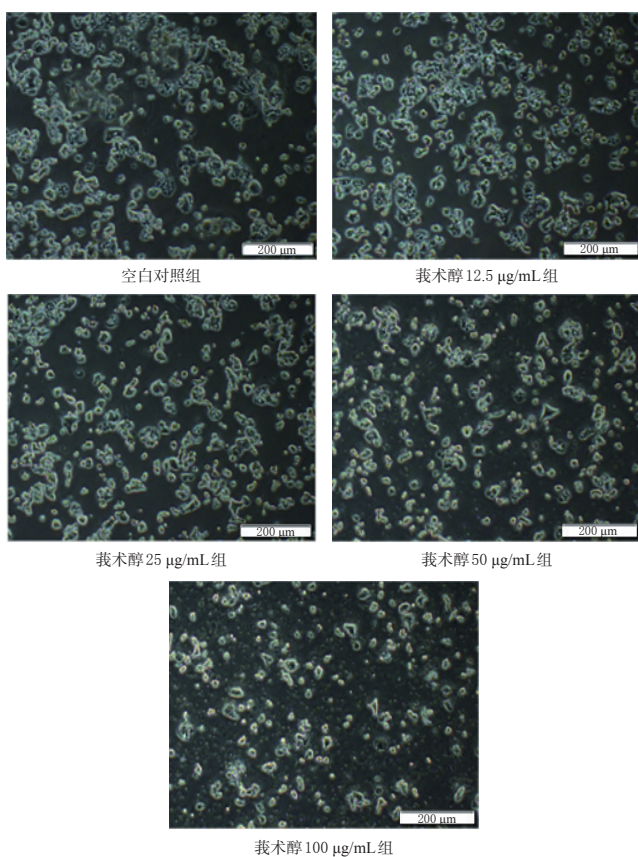
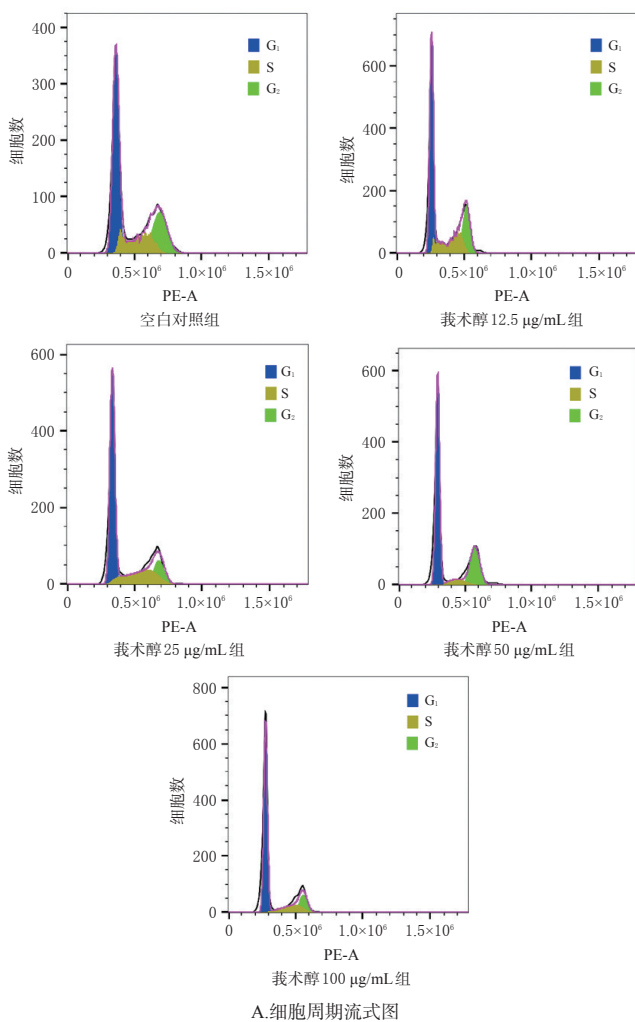


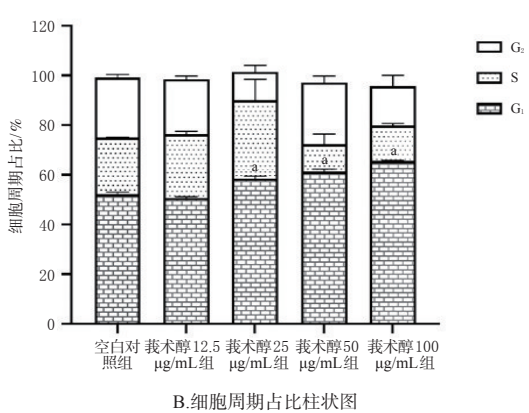
图 1 不同剂量莜术醇干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后的细胞形态学显微图

### 3.3 莜术醇对 T47D 乳腺癌细胞周期的影响

流式细胞检测结果显示, 与空白对照组比较, 莜术醇  $25 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  组干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后,  $G_1$  期细胞占比显著升高 ( $P < 0.01$ ); 且随着莜术醇给药剂量的增加,  $G_1$  期细胞占比呈递增趋势, 其中莜术醇  $100 \mu\text{g/mL}$  组  $G_1$  期细胞占比达  $(65.53 \pm 0.25)\%$ 。结果见图 2。



A. 细胞周期流式图



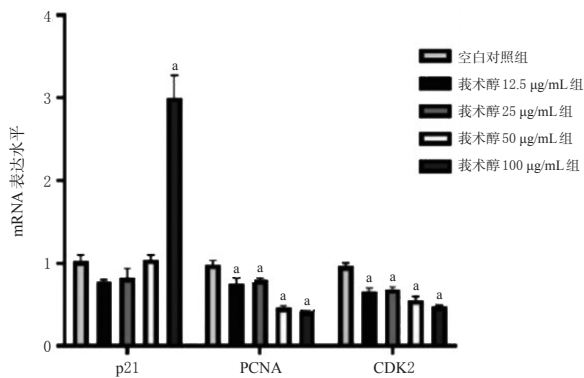
B. 细胞周期占比柱状图

a: 与空白对照组  $G_1$  期比较,  $P < 0.05$

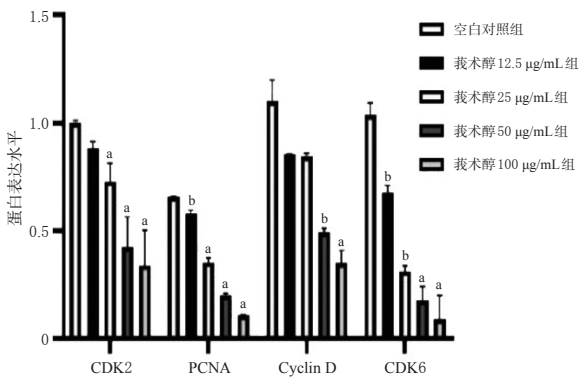
图 2 不同剂量莜术醇干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.4 莜术醇对 T47D 乳腺癌细胞周期相关基因 mRNA 表达水平的影响

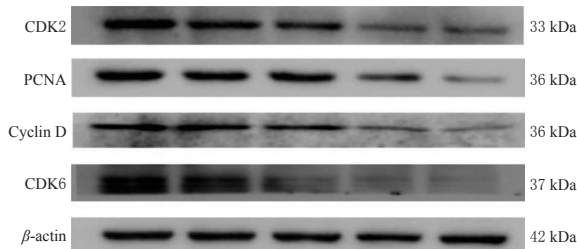
qRT-PCR 检测结果显示, 与空白对照组比较, 不同剂量莜术醇干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后, 细胞中 PCNA 和 CDK2 的 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 莜术醇  $100 \mu\text{g/mL}$  组 p21 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。结果见图 3A。



A. p21、PCNA、CDK2 mRNA 表达水平柱状图



B. CDK2、PCNA、Cyclin D、CDK6 蛋白表达水平柱状图



C. CDK2、PCNA、Cyclin D、CDK6 蛋白表达电泳图

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$

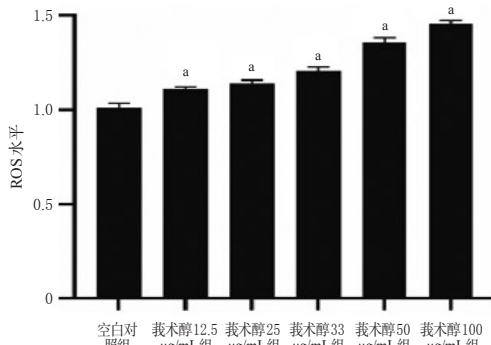
图3 不同剂量莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后对细胞周期相关基因 mRNA 及蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.5 莪术醇对 T47D 乳腺癌细胞周期相关蛋白表达水平的影响

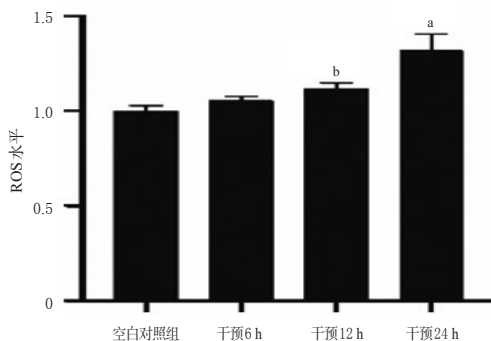
Western blot 检测结果显示,与空白对照组比较,不同剂量莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞 48 h 后,细胞中 CDK2、PCNA、Cyclin D 和 CDK6 的蛋白表达水平随莪术醇剂量的增加而逐渐降低,部分差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果见图 3B、C。

### 3.6 莪术醇对 T47D 乳腺癌细胞内 ROS 产生的影响

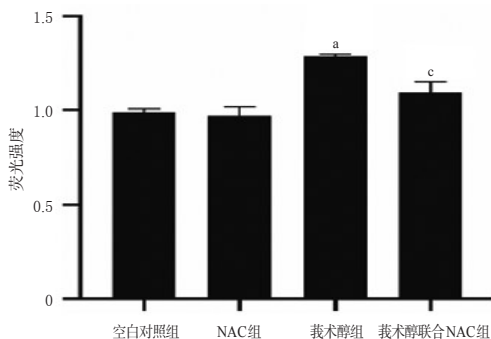
流式细胞术检测结果显示,随着莪术醇剂量增加,细胞内 ROS 水平显著增加 ( $P < 0.01$ ),详见图 4A;给予 33  $\mu\text{g/mL}$  莪术醇干预 6、12、24、48 h 后,细胞内 ROS 水平于 24 h 达最高,详见图 4B。因此选取该干预时间进行后续实验。结果显示,给予 ROS 抗氧化剂 NAC 预处理 T47D 乳腺癌细胞能够显著降低 ROS 水平,详见图 4C。



A. 不同剂量莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞后的 ROS 流式柱状图



B. 莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞不同时间后的 ROS 流式柱状图



C. 莪术醇和 ROS 抗氧化剂 NAC 干预 T47D 乳腺癌细胞后的 ROS 荧光强度柱状图

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与莪术醇组比较,  $P < 0.01$

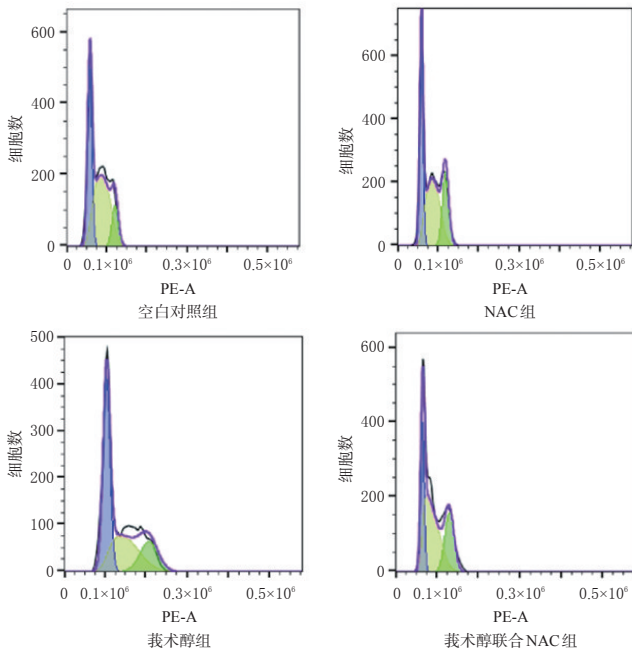
图4 莪术醇诱导 T47D 乳腺癌细胞内 ROS 的产生情况 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.7 ROS 抗氧化剂 NAC 对莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞后细胞周期的影响

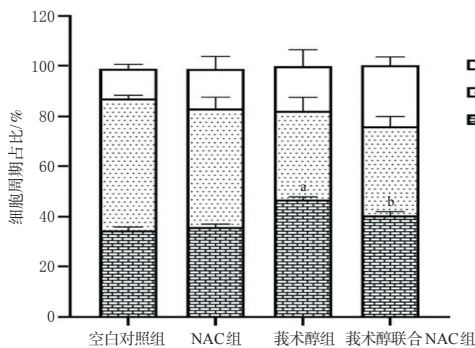
流式细胞术检测结果显示,给予 1  $\mu\text{mol/L}$  的 ROS 抗氧化剂 NAC 预处理能够显著逆转莪术醇对 T47D 乳腺癌细胞的周期阻滞作用,使  $G_1$  期细胞占比显著下降 ( $P < 0.01$ )。结果见图 5。

### 3.8 ROS 抗氧化剂 NAC 对莪术醇干预 T47D 乳腺癌细胞后 Nrf2 和 Keap1 蛋白表达的影响

倒置相差显微镜结果显示,给予 1  $\mu\text{mol/L}$  的 ROS 抗氧化剂 NAC 预处理能够逆转莪术醇对 T47D 乳腺癌细胞的损伤(图 6),并逆转莪术醇诱导的 ROS 相关蛋白 Nrf2、Keap1 表达的下调(图 7)。



A. 细胞周期流式图



B. 细胞周期占比柱状图

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与莪术醇组比较,  $P < 0.01$

图5 ROS抗氧化剂NAC对T47D乳腺癌细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

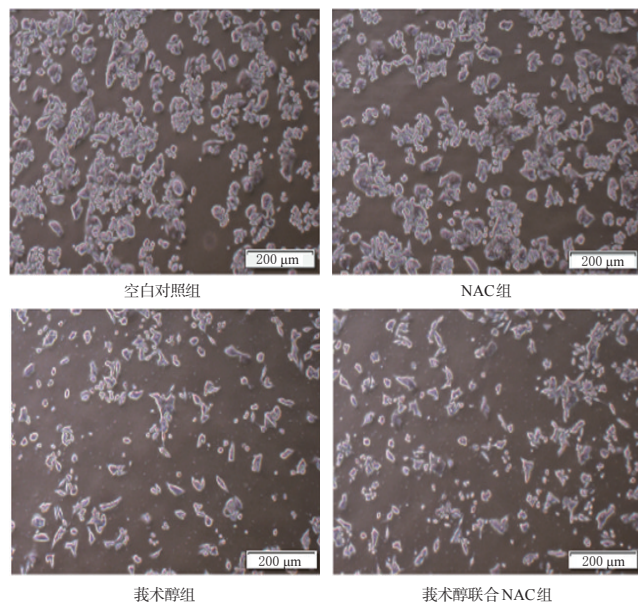
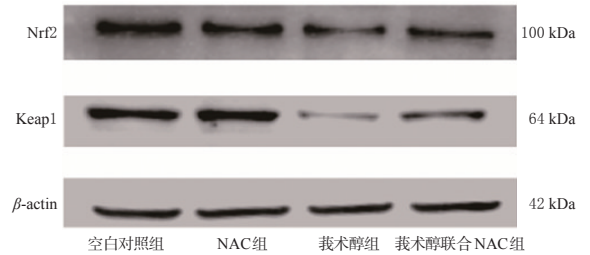
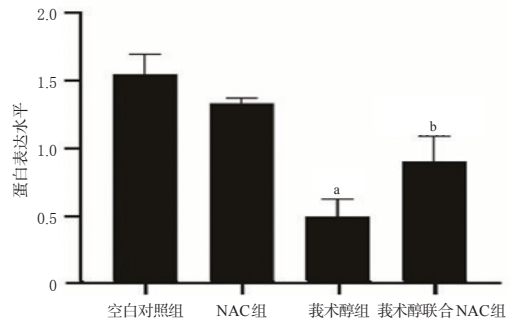


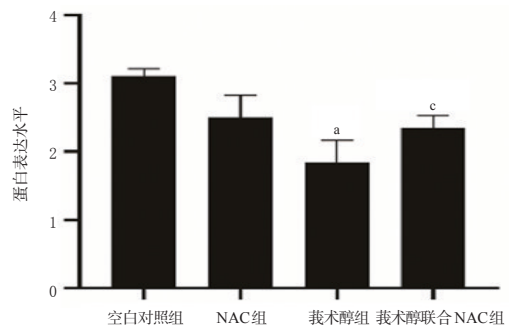
图6 NAC对莪术醇干预T47D乳腺癌细胞后细胞形态影响的显微图



A. Keap1、Nrf2蛋白表达电泳图



B. Keap1蛋白表达水平柱状图



C. Nrf2蛋白表达水平柱状图

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与莪术醇组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与莪术醇组比较,  $P < 0.05$

图7 ROS抗氧化剂NAC对莪术醇干预T47D乳腺癌细胞后Nrf2、Keap1蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 4 讨论

在细胞的正常生长过程中,其增殖受细胞周期的严格调控。细胞周期包括4个连续的阶段:G<sub>1</sub>期(DNA复制前期)、S期(DNA合成期)、G<sub>2</sub>期(DNA合成后期)和M期(分裂期)<sup>[11]</sup>。当细胞周期进程受阻时,细胞的增殖也会被抑制,因此,肿瘤细胞若发生周期阻滞可抑制其增殖。有研究显示,倍半萜类化合物莪术醇可将肿瘤细胞周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,抑制细胞增殖<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,莪术醇能够将T47D乳腺癌细胞阻滞在G<sub>1</sub>期,且呈一定剂量和时间依赖趋势。研究表明,Cyclin与CDK的复合物对细胞周期G<sub>1</sub>期的进程起着非常重要的推动作用<sup>[13]</sup>,而p21则是Cyclin-CDK复合物的抑制剂,能抑制细胞周期G<sub>1</sub>期和S期的进展<sup>[14]</sup>。PCNA是评价细胞增殖的重要指标,也与细胞周期调控密切相关。研究发现,PCNA的表达在G<sub>1</sub>晚期出现,在S期达到峰值,在G<sub>2</sub>期下降<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,莪术醇能将T47D乳腺癌细胞有效阻滞于G<sub>1</sub>期,上调细胞周期进程抑制因子p21的表达,下调细胞周期进程促进因子CDK2、CDK6、Cyclin D

和PCNA蛋白的表达,且呈一定剂量依赖趋势。以上结果表明,莪术醇抑制T47D乳腺癌细胞增殖与其阻滞细胞周期进程、调控细胞周期相关因子的表达有关。

肿瘤细胞中ROS水平较高,其可通过上调抗氧化蛋白缓解ROS增多带来的影响、维持氧化还原平衡,进而保持促肿瘤信号传导;而一旦平衡打破致使ROS生成过多,则会促使肿瘤细胞死亡<sup>[16]</sup>。这表明ROS是抗肿瘤治疗的潜在靶点。研究表明,中药提取物及有效单体通过调控ROS的生成,使ROS的生成超过抗氧化系统的还原能力,从而使细胞处于氧化应激状态,最终诱导肿瘤细胞凋亡或细胞周期阻滞<sup>[17-19]</sup>。Nrf2和Keap1作为抗氧化蛋白,是细胞应对氧化应激条件不可或缺的介质,两者结合定位在细胞质中<sup>[20-22]</sup>,其表达升高能够抑制ROS的累积,从而缓解ROS增多对肿瘤细胞的损伤,因此,抑制二者表达能使产生的ROS诱导肿瘤细胞周期阻滞及发生细胞凋亡。本研究结果显示,莪术醇能诱导T47D乳腺癌细胞中ROS生成增多,而ROS抗氧化剂NAC预处理可逆转莪术醇引起的ROS升高,同时逆转莪术醇导致的细胞G<sub>1</sub>期阻滞,以及逆转其对ROS相关蛋白Nrf2和Keap1的抑制,说明莪术醇诱导的细胞周期阻滞与ROS生成增多有关。笔者推测莪术醇干预T47D乳腺癌细胞后,导致肿瘤细胞内的Keap1蛋白构象发生变化,使Nrf2与之解离,从而使Nrf2和Keap1表达减少,而其诱导细胞内增多的ROS因此也无法消除,打破了肿瘤细胞内的氧化还原平衡,进而引起T47D乳腺癌细胞周期阻滞。

综上所述,莪术醇可能通过诱导T47D细胞的氧化应激水平和细胞周期阻滞,抑制细胞的增殖。但本研究仅采用单一细胞系,也未进行体内实验验证,莪术醇抗乳腺癌的具体通路机制仍需进一步研究。

## 参考文献

[1] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. Lancet, 2017, 389(10074):1134-1150.

[2] FERLAY J, SOERJOTMATARAM I, ERVIK M, et al. Latest world cancer statistics: global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012; marked increase in breast cancers must be addressed[EB/OL]. (2013-12-12) [2021-08-11]. <https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=94829eeeb760f2c31779841be6a59650>.

[3] YU J Q, LIU H B, LEI J C, et al. Antitumor activity of chloroform fraction of scutellaria barbata and its active constituents[J]. Phytother Res, 2007, 21(9):817-822.

[4] MCCULLOCH M, SEE C, SHU X J, et al. Astragalus-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(3):419-430.

[5] XIA Q M, MAO W M. Anti-tumor effects of traditional Chinese medicine give a promising perspective[J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10(Suppl 1):1-2.

[6] 肖鸣,赵海,晏子友.中药莪术及其有效成分的药理研究概况[J].中医药信息,2004,21(2):29-30.

[7] 陈旭,王娟,蒋晓山,等.莪术醇对肺癌A549细胞凋亡诱

导因子、聚ADP核糖聚合酶及Caspase-3表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):157-159.

[8] 王娟,陈旭,曾建红.莪术醇对鼻咽癌细胞CEN-2增殖与凋亡的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(7):790-792.

[9] 刁珂,陈旭,王娟,等.莪术醇对乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭能力的影响[J].广东医学,2013,34(12):1804-1808.

[10] 黄岚珍,王娟,卢菲婷,等.莪术醇抑制人肝癌细胞HepG2增殖的机制[J].中国中药杂志,2013,38(11):1812-1815.

[11] SCHWARTZ G K, SHAH M A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(36):9408-9421.

[12] 马春兰,张宝亮,张常虹.莪术醇对乳腺癌细胞增殖凋亡及JAK2/STAT3信号通路的影响[J].肿瘤学杂志,2020,26(7):616-620.

[13] DE GROOT A F, KUIJPERS C J, KROEP J R. CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: a review[J]. Cancer Treat Rev, 2017, 60:130-138.

[14] HARPER J W, ADAMI G R, WEI N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases[J]. Cell, 1993, 75(4):805-816.

[15] 张承玉,富泽龙,郑学芝,等.芦荟大黄素抑制人胃癌细胞株SGC-7901增殖研究[J].中国药师,2008,11(12):1431-1433.

[16] 余祖胤,毛秉智,从玉文.活性氧与细胞周期调控[J].军事医学科学院院刊,2007,31(6):576-578.

[17] KOPUSTINSKIENE D M, JAKSTAS V, SAVICKAS A, et al. Flavonoids as anticancer agents[J]. Nutrients, 2020, 12(2):457.

[18] CHAO C C, HOU S M, HUANG C C, et al. Plumbagin induces apoptosis in human osteosarcoma through ROS generation, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathway[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):5480-5488.

[19] BISHAYEE K, GHOSH S, MUKHERJEE A, et al. Quercetin induces cytochrome-C release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G<sub>2</sub>/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction[J]. Cell Prolif, 2013, 46(2):153-163.

[20] HAYES J D, DINKOVA-KOSTOVA A T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4):199-218.

[21] KORIYAMA Y, CHIBA K, YAMAZAKI M, et al. Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models *in vitro* and *in vivo* through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway[J]. J Neurochem, 2010, 115(1):79-91.

[22] FOURQUET S, GUEROIS R, BIARD D, et al. Activation of Nrf2 by nitrosative agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves Keap1 disulfide formation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(11):8463-8471.

(收稿日期:2021-09-01 修回日期:2021-12-12)

(编辑:舒安琴)