

小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用及其分子机制研究

钱洁^{1,2}, 谭佳妮^{1,3}, 程海波^{1,3}, 沈卫星¹, 徐长亮¹, 刘陶世^{2*}, 孙东东^{1,3*}

¹南京中医药大学转化医学研究中心 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点研究室 江苏省抗肿瘤验方研究与产业化工程实验室; ²南京中医药大学药学院; ³江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023

摘要: 本研究的目的是为了探索小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响以及阐明小檗碱促乳腺癌细胞凋亡的分子机制。在实验过程中, 我们通过 MTT 检测小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用, 采用 Annexin-V/PI 染色定量考察小檗碱对肿瘤细胞凋亡的影响, 运用 Western Blot 实验检测肿瘤相关通路蛋白表达来进行研究。实验表明小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖具有抑制作用, 使细胞中自噬因子 Beclin 1 表达增加, 诱导细胞自噬泡的形成, 导致肿瘤细胞发生凋亡。综上所述小檗碱是通过抑制 AKT-mTOR 通路, 诱导 MDA-MB-231 细胞的自噬以及凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 小檗碱; 乳腺癌; 抗肿瘤; 细胞自噬; AKT-mTOR 通路

中图分类号: R966; R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0422-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.008

Effect of berberine on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells and its molecular mechanism

QIAN Jie^{1,2}, TAN Jia-ni^{1,3}, CHENG Hai-bo^{1,3}, SHEN Wei-xing¹,
XU Chang-liang¹, LIU Tao-shi^{2*}, SUN Dong-dong^{1,3*}

¹Translational Medicine Center of Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Provincial Lab of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization;

²College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine; ³Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China

Abstract: This study aims to explore the effect of berberine on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells and to explain the molecular mechanism of berberine promoting apoptosis in breast cancer cells. During the experiment, MTT was used to detect the inhibitory effect of berberine on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells. Then, Annexin-V/PI staining was used to quantitatively investigate the effect of berberine on tumor cell apoptosis. Finally, Western Blot assay was used to detect tumor-associated pathway protein expression for study. The results showed that berberine inhibited the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells, which increased the expression of autophagy factor Beclin 1 in the cells. Further, the formation of autophagic vacuoles was induced, resulting in apoptosis of tumor cells. In summary, berberine exerted anti-tumor effects by inhibiting autophagy and apoptosis of MDA-MB-231 cells by inhibiting the AKT-mTOR pathway.

Key words: berberine; breast cancer; antitumor; autophagy; AKT-mTOR pathway

收稿日期: 2018-08-27 接受日期: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(81673559, 81573910, 81373511); 国家自然科学基金青年(81403079); 江苏省自然科学基金(BK20161045); 江苏省高校自然基金面上项目(16KJB360001)

* 通信作者 Tel: 86-25-85811071; E-mail: sun_21373@163.com, tsiur4111@sina.com

小檗碱(Berberine)是一种临床上广泛使用的天然药物,属于季铵型异喹啉类生物碱,其存在于很多中药中^[1-3],常用于治疗由细菌感染引起的胃肠道疾病。近年报道发现,小檗碱在体外具有抗肿瘤活性,其机制主要集中在抑制肿瘤细胞增殖和扩散、干预细胞生长周期、影响细胞能量代谢以及诱导肿瘤细

胞凋亡等^[4]。乳腺癌作为主要在女性中发病的恶性肿瘤,小檗碱针对其显示较好的药效活性,但是小檗碱与乳腺癌治疗相关的具体作用机制尚不清晰,亟需补充完善^[5]。本研究采用分子生物学技术研究小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用,考察小檗碱对肿瘤细胞凋亡的影响,同时检测肿瘤相关通路蛋白表达,为进一步阐明小檗碱抗肿瘤机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

小檗碱购自美国 sigma 公司(货号 B3240),纯度为 99%。3-MA 购自 MedChemExpress 公司(货号 HY-19312)。精密称取 10 mg 小檗碱粉末溶于二甲基亚砜(DMSO)中,超声助溶,配制成母液,-20 ℃低温储存,临用前再以培养基配成实验所需浓度试液,用 0.22 μm 的过滤器除菌,根据需求进行浓度梯度稀释。

1.2 细胞

MDA-MB-231 乳腺癌细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,培养于含 10% FBS,100 U/mL 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中,置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱内,倒置显微镜观察生长情况。细胞融合度约 90% 时用胰蛋白酶消化传代或种板,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清(Capricorn scientific 公司,批号:1705124);DMEM 高糖培养基,胰蛋白酶溶液,青霉素-链霉素溶液(上海源培生物技术有限公司,批号:F40403,K40410,E40401);MTT,DMSO(Sigma 公司,批号:SP1080,SHBH2446V);细胞裂解液(Bio-sharp 公司,批号:6503595);Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,批号:556547);MDC 法细胞自噬染色检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20180109);LC3A/B、Beclin 1、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR、Bax、BCL-2 及 β-actin 抗体(CST 公司,批号:12741T、3495T、2920S、2938T、13038T、5536T、4970T)CPA225D 万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);Pall 超纯水系统(美国 Pall 公司);SL16 型低速离心机、FC 型酶标仪、HER Acell 150i 型二氧化碳培箱(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Tanon-5500 型化学发光凝胶成像仪器(中国天能科

技有限公司);PowerPacTM Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 检测细胞增殖抑制率

采用 MTT 法,取对数生长期的细胞,PBS 漂洗,胰蛋白酶消化后终止消化并离心,培养基重悬,细胞计数后以 1 × 10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL,设 5 复孔。24 h 细胞贴壁后,分别加入不同浓度的小檗碱(0、10、20、40、80、100 μM),孵育 24、48、72 h 后,各孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,孵育箱孵育 4 h 后弃去上清,每孔加 DMSO 150 μL,避光震荡 10 min 充分溶解沉淀后,酶标仪 560 nm 处检测吸光度。

公式如下:细胞增殖抑制率(%) = $\left[\frac{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{给药组}}}{OD_{\text{对照组}}} \right] \times 100\%$ 。

1.5 观察细胞形态

取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,制成单细胞悬液,接种于 6 孔板中,调整浓度为 1.0 × 10⁶ cell/孔,培养箱中 37 ℃,5% CO₂ 环境下培养 24 h,吸取上清,每孔加入 2 mL 含不同浓度小檗碱的培养基(3% 血清,1% 双抗),对照组加含 3% 胎牛血清的培养基,孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.6 检测肿瘤细胞凋亡率

分别用 25、50、100 μM 浓度的小檗碱处理 MDA-MB-231 细胞 24 h,同时设定空白对照组(DMSO,终浓度 < 0.05% (v/v)),每组设三个复孔,胰酶消化后,收集细胞。用缓冲液调整细胞浓度为 1.0 × 10⁶ 个/mL,吸取 100 μL 的细胞至试管中,加入 Annexin V 试剂和 PI 各 5 μL,避光孵育 15 min 后,于流式细胞仪检测。

1.7 干预细胞自噬实验

取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板中,调整浓度为 1.0 × 10⁶ cell/孔,37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后弃上清,分别给予 25、50、100 μM 浓度的小檗碱刺激 24 h。吸弃含药上清,用 Wash Buffer 洗两次,加入 MDC 染色工作液室温避光孵育 15 ~ 45 min 后,荧光显微镜观察并拍照。

1.8 细胞自噬相关蛋白表达

分别用 25、50、100 μM 小檗碱处理 MDA-MB-231 细胞 24 h,同时设定空白对照组。用 Western 及 IP 裂解液裂解细胞,BCA 试剂盒测定样品蛋白含量,并变性。应用 8% ~ 12% SDS-PAGE 电泳后,采用湿转膜方法,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱

脂奶粉封闭后,加入相应的一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜。次日,用PBST洗膜3次,再加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h。ECL发光显影、凝胶成像系统拍照成像。利用应用Gel Analysis软件分析蛋白条带光密度,并通过与相应内参 β -actin条带的密度做比较,测定样品中目的蛋白的相对含量。

1.9 调节细胞自噬相关通路蛋白表达

AKT-mTOR 通路与细胞自噬密切相关,采用Western blot方法检测小檗碱作用于MDA-MB-231细胞24 h后对AKT及mTOR蛋白磷酸化的影响。

1.10 自噬与AKT-mTOR通路相关机制的验证

在乳腺癌MDA-MB-231细胞中,加入3 mM PI3K-AKT信号通路抑制剂3-Methyladenine (3-MA)后,再加入50 μ M小檗碱,孵育24 h后,MTT法检测

细胞活力。提取细胞蛋白,观察加入3-MA后,小檗碱对细胞自噬及凋亡相关蛋白的影响。

1.11 统计学分析

所得实验数据均采用SPSS 12.0软件进行单因素方差分析,实验数据均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗碱对MDA-MB-231细胞增殖抑制率的影响

MTT结果表明,MDA-MB-231细胞的增殖受到不同程度的抑制,并与小檗碱的给药剂量及时间成正相关。小檗碱对乳腺癌细胞在24、48、72 h的IC₅₀值分别为:52.15 \pm 3.87、49.28 \pm 4.19和44.63 \pm 3.26(见表1)。

表1 小檗碱对MDA-MB-231细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of berberine on proliferation inhibition of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

小檗碱浓度 Berberine concentration	OD ₅₆₀ 值 OD ₅₆₀	抑制率 Inhibition rate (%)	OD ₅₆₀ 值 OD ₅₆₀	抑制率 Inhibition rate (%)	OD ₅₆₀ 值 OD ₅₆₀	抑制率 Inhibition rate (%)
0 μ M	1.23 \pm 0.37	0	1.59 \pm 0.23	0	2.01 \pm 0.15	0
10 μ M	1.10 \pm 0.04	10.21 \pm 1.34	1.39 \pm 0.18	12.45 \pm 1.02	1.74 \pm 0.09	12.99 \pm 1.03
20 μ M	0.93 \pm 0.03	24.13 \pm 1.93	1.17 \pm 0.09	25.98 \pm 1.31	1.39 \pm 0.05	30.82 \pm 1.58
40 μ M	0.63 \pm 0.05	48.16 \pm 2.76	0.77 \pm 0.06	51.2 \pm 3.56	0.68 \pm 0.04	65.9 \pm 3.59
80 μ M	0.38 \pm 0.03	69.09 \pm 4.21	0.43 \pm 0.03	70.24 \pm 4.75	0.55 \pm 0.07	72.19 \pm 5.21
100 μ M	0.09 \pm 0.01	92.10 \pm 5.86	0.08 \pm 0.01	94.42 \pm 6.07	0.15 \pm 0.03	92.12 \pm 6.54

2.2 小檗碱对MDA-MB-231细胞形态的影响

观察结果显示,正常的MDA-MB-231细胞呈梭形,伸展,贴壁。而小檗碱给药组细胞呈现出不规则

的形态,细胞膜明显皱缩,细胞质高度浓缩,细胞外出现类似碎片,细胞间距变大。随着小檗碱给药浓度的增加,细胞的贴壁能力明显下降(见图1)。

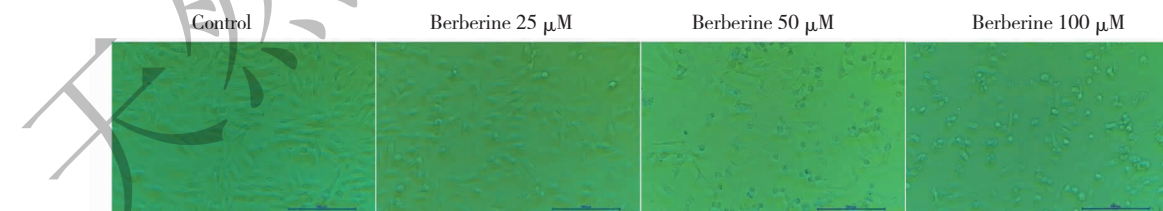


图1 小檗碱对MDA-MB-231细胞形态的影响(20 \times)

Fig. 1 Effect of berberine on the morphology of MDA-MB-231 cells (20 \times)

2.3 小檗碱对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

流式细胞实验结果表明,小檗碱给药24 h后细胞的总凋亡率分别为21.4% \pm 3.43% (25 μ M)、31.2% \pm 5.22% (50 μ M)和80.6% \pm 6.45%

(100 μ M),与空白对照组(0.1% \pm 0.1%)相比较,有显著性差异($P < 0.05$),提示小檗碱具有明显的诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞发生凋亡的作用(见图2)。

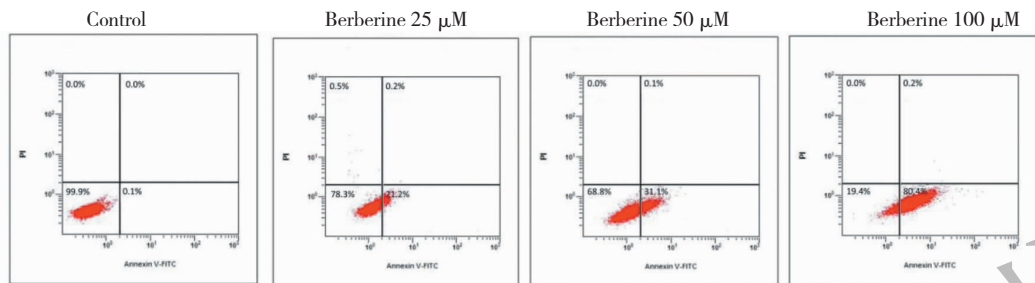


图 2 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of berberine on apoptosis of MDA-MB-231 cells

2.4 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞自噬的影响

MDC 是自噬泡特异性的荧光标记物,结果显示,小檗碱各给药组细胞内 MDC 绿色荧光增强,且

随着处理浓度增加,荧光强度也逐渐增加。提示小檗碱可以诱导 MDA-MB-231 细胞自噬泡的形成(见图 3)。

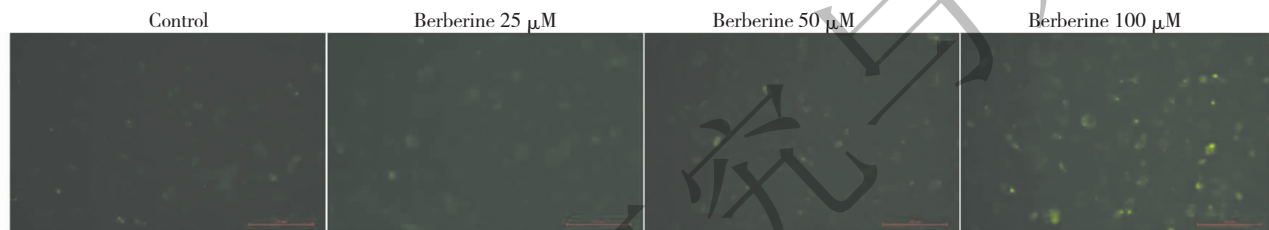


图 3 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞自噬的影响(20 ×)

Fig. 3 Effect of berberine on autophagy of MDA-MB-231 cells (20 ×)

2.5 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞自噬相关蛋白表达的影响

LC3 蛋白存在 LC3A 及 LC3B 两种形式,结果表明,当乳腺癌 MDA-MB-231 细胞给予小檗碱后,

细胞内 LC3A 蛋白表达减少,而 LC3B 蛋白表达增多。随着小檗碱给药浓度的增加,LC3B/LC3A 表达量比也增加。同时自噬正调节因子 Beclin 1 表达也呈现增加的趋势(见图 4)。

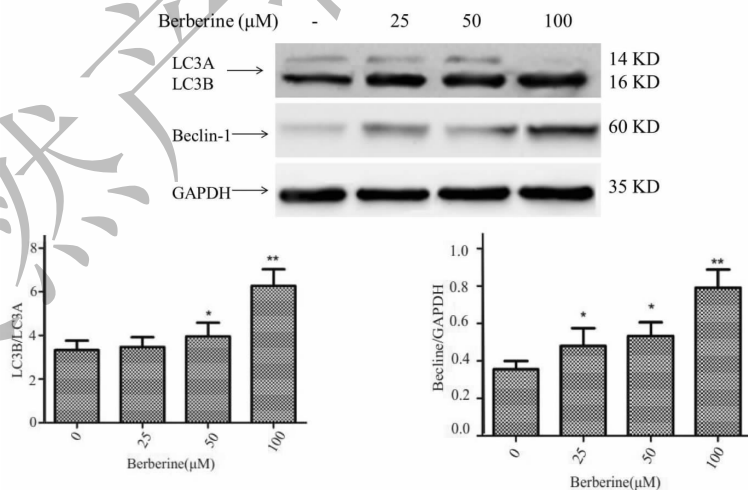


图 4 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of berberine on the expression of autophagy-related proteins in MDA-MB-231 cells

2.6 小檗碱对调节 MDA-MB-231 细胞自噬相关通路蛋白表达的影响

Western blot 结果表明,小檗碱抑制细胞内

AKT 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平,p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值降低(见图 5)。

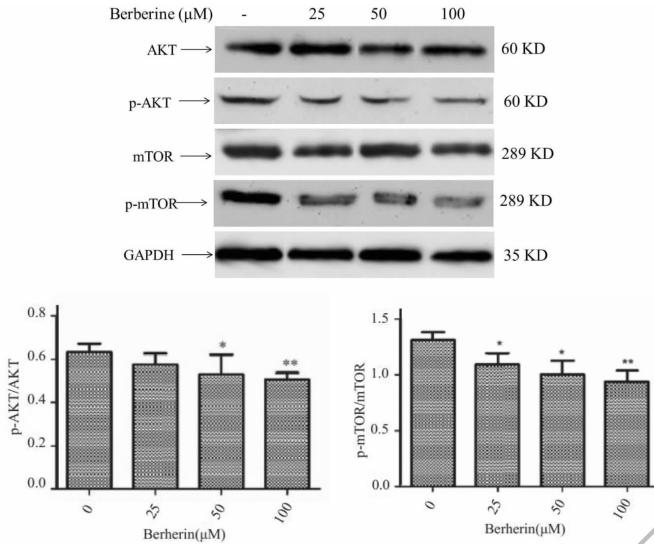


图5 小檗碱对调节细胞自噬相关通路蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of berberine on the regulation of protein expression in autophagy-associated pathway

2.7 3-MA 对细胞增殖、自噬及凋亡相关蛋白表达的影响

MTT 结果表明,3-MA 可抑制小檗碱给药后出现的细胞活力降低的现象(图 6A);Western-blot 结果显示,3-MA 显著抑制了 LC3B/LC3A 比值增大的

趋势(图 6B、C),提示 3-MA 可抑制由小檗碱引起的细胞自噬的产生。此外,3-MA 具有抑制小檗碱引起的凋亡相关蛋白 Bax 的表达增高、抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达降低的现象(图 6D)。说明 AKT 介导的细胞自噬是小檗碱诱导细胞凋亡的原因之一。

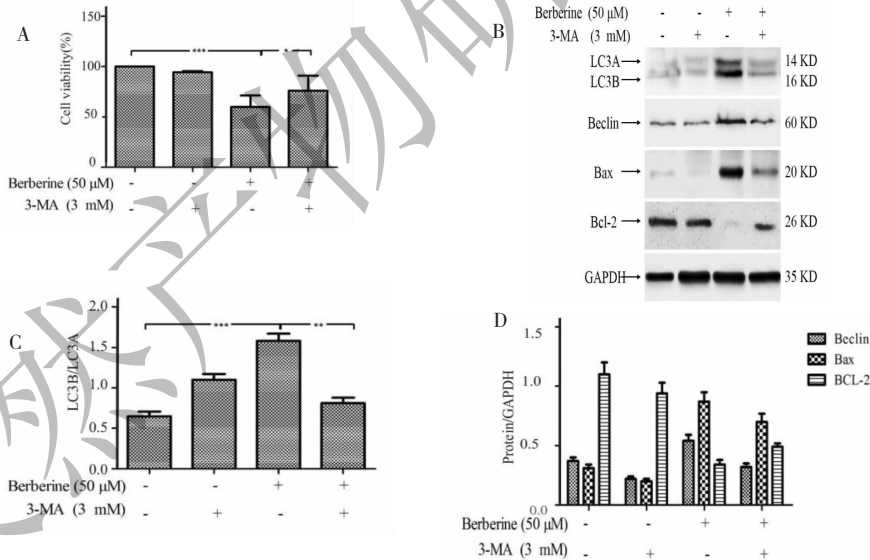


图6 3-MA 对小檗碱引起的细胞自噬及凋亡的影响

Fig. 6 Effect of 3-MA on autophagy and apoptosis induced by berberine

3 讨论

自噬是把双刃剑,其与细胞凋亡在不同的条件下相互协调、相互影响,对肿瘤的发生发展起着重要的调节作用^[6]。在癌症形成的早期阶段,自噬具有抑制肿瘤增殖的作用。但同时,自噬也可使癌细胞

适应不利的代谢应激(如缺氧、低营养状态等)从而使肿瘤细胞存活^[6-8]。因此,在癌症早期,抗肿瘤药通过激活细胞自噬可有效抑制肿瘤的生长,同时介导肿瘤细胞发生自噬性死亡。本实验通过 MDC 染色,荧光显微镜观察发现小檗碱可以诱导 MDA-MB-

231 细胞自噬泡的形成。同时,Annexin V-PI 染色结果显示,小檗碱具有明显的诱导 MDA-MB-231 细胞发生凋亡作用,提示小檗碱可能通过诱导肿瘤细胞自噬与细胞凋亡发挥抑制细胞增殖的作用。

LC3 和 Beclin 1 是自噬体经典的标志蛋白。LC3 包括 LC3A 及 LC3B 两种形式,当自噬发生时,细胞质中的 LC3A 会转变成自噬体膜上的 LC3B 蛋白,从引起 LC3B 蛋白表达增加^[9]。而 Beclin 1 是一个重要的抑癌蛋白,Beclin 1 的单等位基因缺失会造成自发性癌症发病率的提升^[10],本实验通过 Western Blot 检测发现,给药后的乳腺癌细胞中 LC3B/LC3A 蛋白表达的比值及自噬正调节因子 Beclin 1 的表达与小檗碱浓度成正相关,表明小檗碱可以诱导乳腺癌细胞自噬的发生。AKT-mTOR (mammalian target of rapamycin) 通路是调节细胞增殖及凋亡的重要通路^[11],研究发现,乳腺癌患者存在 mTOR 蛋白过度激活的现象^[12,13]。此外,mTOR 是细胞自噬在启动过程中的关键靶点通路^[14,15],活化后可发挥抑制细胞自噬的作用。在本实验中,Western Blot 结果显示,MDA-MB-231 细胞在给予不同浓度的小檗碱后,细胞内 AKT 及 mTOR 蛋白的磷酸化水平受到不同程度的抑制,说明小檗碱通过抑制细胞中 AKT-mTOR 通路,从而发挥诱导乳腺癌细胞发生自噬的作用。

课题组长期以来对国医大师周仲瑛临床防治肿瘤的一系列验方消癌解毒方开展研究,其中应用于乳腺癌的方中主要有天葵子、八月札、白毛夏枯草、漏芦、柴胡以及天冬等药味,天葵子作为君药,生物碱是其含有的一类主要成分^[2],且课题组在前期的实验也已从中分离得到小檗碱^[3]。本研究表明,通过抑制 AKT-mTOR 通路,诱导细胞的自噬以及凋亡过程,是小檗碱发挥体外抑制乳腺癌细胞增殖效应的一个重要路径,所以说实验结果为进一步阐释小檗碱的抗肿瘤分子机制提供了重要依据,同时为揭示抗肿瘤中药天葵子的药效物质基础,以及复方抗肿瘤的临床应用与转化提供有效参考。

参考文献

- Xie HQ, Ji KK, He YJ, et al. Simulation continuous counter-current extraction technology of berberine from cortex phellodendri [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 34(1): 73-76.
- Zhang HB, Cheng HB, Sheng WX, et al. Advances in research on chemical constituents of traditional Chinese medi-

- cine *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) Makino [J]. J Nangjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2018, 34: 205-209.
- Yan QY, Cheng HB, Zhang HB, et al. Isolation and analysis of chemical composition of alcohol extracted from Chinese medicine *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) Makino [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2016, 31: 4172-4175.
- Fang HH, Li HJ, He XL, et al. Advances in anti-tumor effects of Berberine and its derivatives [J]. Chin Pharmacol J (中国药学杂志), 2017, 52: 429-433.
- Zhao XF, Mao TT. Advances in research on the mechanism of Berberine against breast cancer [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med (中国中医基础医学杂志), 2015, 21: 114-116.
- Chaabane W, User SD, Elgazzah M, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer [J]. Arch Immunol Ther Ex, 2013, 61(1): 43-58.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. Cell Proliferation, 2012, 45: 487-498.
- Zhang H, Gong Y, Wang Z, et al. Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia [J]. J Cell Mole Med, 2014, 18: 542-553.
- Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17: 893.
- Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(1): 37-45.
- Masahiro M, Simon-Pierre G, Laura H, et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation [J]. Cell Cycle, 2015, 14: 473-480.
- Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40: 862-871.
- Jr PJ, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014, 142: 164-175.
- Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25-32.
- Perluigi M, Di DF, Butterfield D A. MTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy [J]. Neurobiol of Dis, 2015, 84(1): 39-49.