

纳米雄黄抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质转化的机制探讨

李秀荣¹ 李慧杰¹ 许艳艳²

(1 山东中医药大学附属医院, 济南, 250014; 2 山东中医药大学, 济南, 250014)

摘要 目的:观察纳米雄黄对乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质转化的影响,并探讨其相关机制。方法:体外培养乳腺癌 MCF-7 细胞,不同浓度纳米雄黄溶液干预,并设立对照组,免疫组化实验检测各组细胞 E-cad、HIF-1 α 表达情况,RT-PCR 检测 Snail mRNA 表达情况。结果:各纳米雄黄组 E-cad 表达阳性率均明显高于对照组($P < 0.01$),而 HIF-1 α 表达阳性率均低于对照组($P < 0.01$);对照组、纳米雄黄低、中、高剂量组、阿霉素组的 Snail mRNA 相对表达量依次为(52.16 ± 3.87)、(30.10 ± 2.48)、(47.08 ± 3.45)、(41.42 ± 4.35)、(36.07 ± 2.45)。结论:纳米雄黄可通过上调 E-cad 表达、下调 HIF-1 α 及 Snail mRNA 表达逆转乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质转化发挥抗肿瘤转移作用。

关键词 纳米雄黄;乳腺癌;上皮间质转化;肿瘤转移

The Mechanism of Nanometer Realgar to Inhibit the Epithelial Mesenchymal Transition of Breast Cancer MCF-7 cells

Li Xiurong¹, Li Huijie¹, Xu Yanyan²

(1 The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

2 Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract Objective: To explore the effect of nanometer realgar affecting epithelial mesenchymal transition of the breast cancer MCF-7 cells and its possible mechanism. **Methods:** Breast cancer MCF-7 cells were cultured in vitro and use different doses of nanometer realgar to intervene. A control group was made. To test the expression of E-cad and HIF-1 α , RT-PCR to detected the expression of Snail mRNA. **Results:** Compared with the control group, the E-cad positive rates of the nanometer realgar group were higher than the control group($P < 0.01$); the HIF-1 α positive rates of the nanometer realgar group were less than the control group($P < 0.01$); the control group, nanometer realgar low, medium and high dose groups, doxorubicin group of Snail mRNA relative expression levels were (52.16 ± 3.87), (30.10 ± 2.48), (47.08 ± 3.45), (41.42 ± 4.35), (36.07 ± 2.45) respectively.

Conclusion: Nanometer realgar can inhibit the migration and invasion of breast cancer MCF-7 cells, and it has anti-tumor metastasis. Nanometer realgar can resist tumor through reversing EMT by raising the level of E-cad and reducing the level of HIF-1 α and Snail mRNA.

Key Words Nanometer realgar; Breast cancer; EMT; Metastasis

中图分类号:R273 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.033

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤,在世界范围内其发病率约占新发病例的 23%,死亡率高达 14%,侵袭转移是其预后不良的主要原因之一,尽管乳腺癌综合治疗疗效不断改进,但抗侵袭转移方面仍不尽人意^[1]。上皮-间质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT),是指上皮细胞在特殊的生理和病理情况下向间质细胞转分化的现象,在肿瘤的扩散转移及多种慢性疾病的发生进展中起到重要作用^[2]。前期研究发现,纳米雄黄可有效抑制肿瘤细胞侵袭转移,为此,我们研究观察了纳米雄黄对乳腺癌细胞上皮间质转化的影响,进而探讨其对乳腺

癌转移的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株 乳腺癌 MCF-7 细胞,山东中医药大学附属医院中心实验室惠赠。

1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶、兔抗人 E-cad 多克隆抗体、兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体、免疫组化 DAB 显色试剂盒、浓缩型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程材料有限公司),Tritonx-100、总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(北京 Solarbio 科技生物公司),Snail

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(编号:ZR2010HL050)

通信作者:李秀荣(1963.01—),女,医学博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中西医结合肿瘤防治研究, E-mail:2008lihuijie@163.com

基因引物、β-actin 内参引物(上海生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱、超纯水系统(Heraeus 公司),超净工作台(Thermo Forma 公司),倒置相差显微镜(Olympus 公司),细胞培养瓶、细胞培养板、无菌过滤器、凝胶成像分析系统(美国 Alpha 公司)、Spectrophotometer(上海元析仪器有限公司)、PCR 仪(英国 Thermo Hybaid 公司)、梯度 PCR 仪(德国 Biometro 公司)。

1.4 纳米雄黄及溶液制备 雄黄购于陕西康惠制药有限公司,后由山东龙脉科技发展有限公司龙脉精研机研磨纳米化,再由济南微纳颗粒仪器股份有限公司光子相关纳米激光粒度分析仪检测鉴定。实验时用 10% KCl 饱和硝酸溶液溶解,NaOH 调 pH 至 7.0,PBS 定容,配制成浓度为 600 μg/mL 的纳米雄黄溶液,过滤除菌,4 ℃ 保存备用。

1.5 实验分组 共分 5 组,对照组(10% 胎牛血清)、阿霉素组(2 μg/mL)、纳米雄黄低剂量组(30 μg/mL)、纳米雄黄中剂量组(60 μg/mL)、纳米雄黄高剂量组(90 μg/mL)。

1.6 免疫组化实验 常规培养细胞,制备细胞悬液,接种于盛有盖玻片的六孔板中,继续培养细胞;待细胞成功爬片后,换液,按实验分组干预,继续培养;24 h 后 PBS 清洗,95% 乙醇固定;0.5% Trion X-100 室温卵育 15 min;3% H₂O₂ 室温卵育 15 min;山羊血清封闭液封闭;一抗稀释液,湿盒 4 度过夜;二抗稀释液,37 ℃ 培养箱湿盒卵育 30 min;SABC 37 ℃

培养箱湿盒卵育;DAB 染色,苏木素轻度复染,盐酸乙醇脱色,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察。观察时选择阳性细胞较集中的区域,采集约 3~5 个光镜视野输入 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行定量分析。

1.7 RT-PCR 实验 常规培养细胞,制备细胞悬液,平均分瓶继续培养,待细胞长满 80% 按实验分组干预,48 h 后按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 纯度及浓度以判定其质量,按试剂盒说明书逐步合成 cDNA、扩增 PCR,制胶、上样,水平电泳,完毕后将胶板至 0.5 μg/mL EB 溶液中室温染色 20 min,Alpha 凝胶成像系统摄取图像,系统分析,计算相对表达量。

1.8 统计学处理 实验所得数据均运用 SPSS 18.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 纳米雄黄对 E-cad、HIF-1α 表达的影响 与对照组相比,各浓度纳米雄黄组、阿霉素组的 E-cad 表达阳性率均明显高于对照组($P < 0.01$),而 HIF-1α 表达阳性率均低于对照组($P < 0.01$)。与阿霉素组相比,各浓度纳米雄黄组的 E-cad 表达阳性率均低于阿霉素组($P < 0.01$),而 HIF-1α 表达阳性率高于阿霉素组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。纳米雄黄组随浓度的增加,E-cad 表达阳性率明显升高、HIF-1α 表达阳性率则逐步降低。结果表明:纳米雄黄可上调 E-cad 表达、降低 HIF-1α 表达,随浓度增加作用增强。

表 1 E-cad、HIF-1α 表达阳性率($\bar{x} \pm s$)

组别	个数	E-cad 阳性率(%)	HIF-1α 阳性率(%)
对照组	6	19.52 ± 1.79	68.25 ± 3.81
纳米雄黄低剂量组	6	28.49 ± 2.55 **△△	62.45 ± 3.56 **△△
纳米雄黄中剂量组	6	41.37 ± 3.11 **△△	56.98 ± 3.46 **△△
纳米雄黄高剂量组	6	46.51 ± 1.71 **△△	48.97 ± 4.06 **△
阿霉素组	6	56.70 ± 3.40 **	43.94 ± 2.68 **
纳米雄黄 + 阿霉素组	6	61.58 ± 4.51 **△△	35.79 ± 2.68 **△△

注:单因素方差分析,与对照组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$,与阿霉素组比较,△ $P < 0.05$ 、△△ $P < 0.01$ 。

2.2 纳米雄黄对 Snail mRNA 表达的影响 与对照组相比,各药组 Snail mRNA 相对表达量均低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与阿霉素组比较,各浓度纳米雄黄组 Snail mRNA 相对表达量均高于阿霉素组($P < 0.01$),且各纳米雄黄组随浓度的升高,Snail mRNA 相对表达量逐渐降低。结果表明:纳米雄黄可抑制 Snail mRNA 在乳腺癌 MCF-7 细胞中的表达,随浓度增加其抑制 Snail mRNA 表达的作用增强。见表 2。

表 2 Snail mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	个数	RATIO(%)
对照组	6	52.16 ± 3.87
阿霉素组	6	30.10 ± 2.48 **
纳米雄黄低剂量组	6	47.08 ± 3.45 **△△
纳米雄黄中剂量组	6	41.42 ± 4.35 **△△
纳米雄黄高剂量组	6	36.07 ± 2.45 **△△

注:单因素方差分析,与对照组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$,与阿霉素组比较,△ $P < 0.05$ 、△△ $P < 0.01$ 。

3 讨论

肿瘤转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程,依赖于肿瘤细胞与促肿瘤细胞生长、侵袭、转移等内环境因素的相互作用,一旦发生转移则会加速肿瘤患者死亡的进程,因此,研究肿瘤转移及其相关机制显得尤为重要^[3]。Theiry 和 Weinberg 早在 2002 年提出了恶性肿瘤细胞转移前会发生 EMT 的观点,认为 EMT 的发生可使肿瘤细胞获得间质细胞所具有的运动和侵袭能力,成为其进入血道、淋巴道进行远处转移的前提^[4]。在 EMT 过程中伴有多个细胞分子标志改变,其中 E-cadherin 的减少或丢失不仅是 EMT 最重要的标志性变化,也是促进肿瘤转移的重要表现^[5]。缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF1) 是缺氧条件下传递缺氧信号、介导缺氧效应的关键转录因子,通过结合缺氧反应元件激活下游众多靶基因参与肿瘤侵袭、转移^[6]。Snail 是一类重要的转录因子,依赖 C-末端的锌指结构域和 N-末端的 SNAG (Snail/Gfi) 结构域调控靶基因的表达,其异常表达与侵袭型肿瘤密切相关^[7]。越来越多的证据表明, HIF 介导的低氧信号传导途径及微环境中氧分水平变化是诱发调节 EMT 的重要机制,且研究发现 Snail、Twist、ZEB 等转录因子可结合到编码 E-cadherin 的启动子上阻滞基因转录,进而下调 E-cadherin 表达,是肿瘤 EMT 分子调控机制网络的关键枢纽^[8-9]。研究 E-cadherin、HIF、Snail 等分子标志对研究 EMT 机制具有重要意义。

“毒聚”贯穿恶性肿瘤发生发展过程的始终,癌毒之邪其性走串,易乘虚鸱张而余薪复燃,四行旁窜,残余毒邪与人体正气相争,正胜邪退,疾病趋于稳定好转;正不抑邪,肿瘤则复发转移;加之六淫、七情内伤、过劳以及治疗时攻伐太过等多种因素影响,可进一步加重正气亏虚,蛰伏之余毒、伏邪乘虚而进,导致肿瘤复发转移^[10]。乳腺癌属本虚标实之证,多因气机失调,日久气血凝滞,经络不通,久则毒聚为瘤,攻毒治法是其主要治法之一。雄黄具有解毒、杀虫、燥湿、祛痰、截疟等作用,是攻毒治法的代表药物之一,现代药理表明其具有活跃的抗肿瘤效用,且随着纳米医药技术的发展,雄黄纳米化后解决了难溶问题,提高了生物利用度与药效,增强了对瘤细胞的靶向性,降低了不良反应^[11-12]。前期研究发现纳米雄黄可有效抑制肺癌 A549 细胞及皮肤磷

癌 A431 细胞发生侵袭转移^[13-14],亦可抑制乳腺癌 MCF-7 的恶性生物学行为,但其机制有待进一步探讨^[15]。而本研究发现,纳米雄黄可通过上调 E-cad 表达、下调 HIF-1 α 表达,抑制 Snail mRNA 表达逆转乳腺癌 MCF-7 细胞发生上皮间质转化,进而发挥抗乳腺癌转移作用,且随浓度增加作用增强。另有文献报道,可见,纳米雄黄是抗肿瘤转移的有效药物之一,攻毒治法可作为防治肿瘤转移的选择。

参考文献

- [1] 于健,张秀秀,于蓝青,等. 葡萄糖调节蛋白 78 通过调节上皮-间叶转化促进乳腺癌 MCF-7 的侵袭转移[J]. 中华临床医师杂志, 2015,9(9):1598-1602.
- [2] 许艳艳,李慧杰,李秀荣. 上皮-间质转化分子机制及中医药干预的研究[J]. 山东中医药大学学报,2014,38(1):76-79.
- [3] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms[J]. Cell,2011,147(2):275-292.
- [4] 任毅毅,王艳霞,吴江. 上皮-间质转化与肿瘤转移的相关进展[J]. 四川解剖学杂志,2012,20(1):27-35.
- [5] 李秀荣,齐元富,李慧杰. 芪连扶正胶囊对 TGF- β 介导 EMT 作用的影响[J]. 世界中医药,2015,10(4):557-559.
- [6] 梁毅,朱琳燕,罗鹏程. 乏氧诱导因子相关研究进展[J]. 实用癌症杂志,2015,30(10):1573-1577.
- [7] 陈晓敏,郭俊明,乐东海,等. 上皮-间质转化:肿瘤转移的重要调控机制[J]. 中国细胞生物学学报,2013,35(9):1367-1375.
- [8] 郭晓川,石燕,陈丽,等. 缺氧诱导因子对肿瘤细胞上皮-间质转化的诱导机制[J]. 解放军医学院学报,2015,36(1):90-93.
- [9] 朱纪云,汪慧访,邱江锋. 上皮-间质转化在肿瘤转移中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(12):1169-1175.
- [10] 李慧杰,齐元富,李秀荣. 中医药维持治疗晚期非小细胞肺癌的可行性探讨[J]. 中国肿瘤,2012,21(11):845-847.
- [11] 国家药典委员会主编. 中华人民共和国药典[S]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:610.
- [12] 齐元富,李慧杰,刘寨东. 纳米雄黄对肺癌 A549 细胞增殖影响及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2013,20(1):27-30.
- [13] 齐元富,李慧杰,于连洋. 纳米雄黄干预肺癌 A549 细胞对血管内皮生长因子及缺氧诱导因子-1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(3):27-30.
- [14] 齐元富,李慧杰,聂奔. 纳米雄黄对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株增殖抑制及诱导凋亡作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):244-248.
- [15] 李秀荣,李慧杰,许艳艳. 纳米雄黄对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移恶性行为的影响[J]. 山东中医药大学学报,2015,39(5):453-455.

(2015-07-01 收稿 责任编辑:王明)