

# 羽扇豆醇通过MAPKs信号通路对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的抑制作用研究<sup>△</sup>

江兴菊<sup>1\*</sup>, 潘年松<sup>2</sup>, 田晓云<sup>1</sup>, 黄梅<sup>1</sup>, 罗俊<sup>1#</sup>(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 遵义医药高等专科学校药学院, 贵州遵义 563006)

中图分类号 R966; R737.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1925-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.11

**摘要** 目的: 探讨羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的抑制作用及可能机制。方法: 以MCF-7细胞为对象, 采用MTT法检测不同剂量羽扇豆醇(7.5、15、30、60、90 mg/L)作用24 h后的细胞增殖情况, 并计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>); 采用倒置显微镜和细胞克隆试验分别观察和检测不同剂量羽扇豆醇(15、30、60 mg/L)作用24 h后的细胞形态学特征以及克隆集落形成情况, 并计算克隆形成率; 分别采用MTT法和Western blotting法检测加用丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路相关调控蛋白抑制剂(PD98059、SP600125、SB203580)后细胞的增殖情况和相关调控蛋白[细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化JNK(p-JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)]的表达情况。结果: 经15、30、60、90 mg/L羽扇豆醇作用后, 细胞的存活率均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 该化合物的IC<sub>50</sub>值为52.94 mg/L。经15、30、60 mg/L羽扇豆醇作用后, 各组细胞形态均有所改变, 并可见细胞脱落、漂浮、固缩、变圆、体积变小、坏死等现象, 其克隆集落形成均有所减少, 克隆形成率均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。单用羽扇豆醇时, 细胞的存活率(60 mg/L羽扇豆醇)均较对照组显著降低, p-ERK1/2(15、30、60 mg/L羽扇豆醇)、p-JNK(30、60 mg/L羽扇豆醇)、p-p38 MAPK(30、60 mg/L羽扇豆醇)的相对表达量均较对照组显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 加用相应抑制剂后, 联用组细胞的存活率均较60 mg/L羽扇豆醇组显著升高, p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量均较60 mg/L羽扇豆醇组显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞的增殖具有明显的抑制作用, 其机制可能与促进MAPKs信号通路相关调控蛋白的磷酸化有关。**关键词** 羽扇豆醇; 乳腺癌; MCF-7细胞; 增殖; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路; 调控蛋白; 磷酸化

## Study on the Inhibitory Effects of Lupeol on the Proliferation of Human Breast Cancer MCF-7 Cells by MAPKs Signaling Pathway

JIANG Xingju<sup>1</sup>, PAN Niansong<sup>2</sup>, TIAN Xiaoyun<sup>1</sup>, HUANG Mei<sup>1</sup>, LUO Jun<sup>1</sup>(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Pharmaceutical College, Guizhou Zunyi 563006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate inhibitory effects of lupeol on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and its possible mechanism. METHODS: Taking MCF-7 cells as research object, MTT assay was used to detect the proliferation of MCF-7 cells after treated with different doses of lupeol (7.5, 15, 30, 60, 90 mg/L) for 24 h. Survival rate and IC<sub>50</sub> of MCF-7 cells were calculated. The inverted microscope and cell cloning experiment were used to observe and detect the morphological characteristics of MCF-7 cells and clonal colony formation after treated with different doses of lupeol (15, 30, 60 mg/L) for 24 h. The rate of clonal colony formation was calculated. MTT method and Western blotting assay were used to detect the proliferation of MCF-7 cells and the expression of related regulatory proteins (ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38 MAPK, p-p38 MAPK) after additionally treated with MAPKs signaling pathway-related regulation protein inhibitors PD98059, SP600125 and SB203580. RESULTS: After treated with 15, 30, 60, 90 mg/L lupeol, survival rates of MCF-7 cells were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). IC<sub>50</sub> value of the compound was 52.94 mg/L. After treated with 15, 30, 60 mg/L lupeol, the morphological characteristics of cells in each group changed, and the phenomena of cell exfoliation, floating, solid shrinkage, roundness, volume reduction and necrosis were observed. The formation of clonal colony decreased and the rate of clonal colony formation decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). When lupeol used alone, compared with control group, survival rate (60 mg/L lupeol) of MCF-7 cells was decreased significantly; the expression of p-ERK1/2 (15, 30, 60 mg/L lupeol), p-JNK (30, 60 mg/L lupeol) and p-p38 MAPK (30, 60 mg/L lupeol) were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After additional use of relevant inhibitors, compared with 60 mg/L lupeol group, survival rates of MCF-7 cells in combination groups

<sup>△</sup> 基金项目: 贵州省科技计划项目(No. 黔科合基础[2019]1355号); 贵州省科技合作计划项目(No. 黔科合 LH字[2015]7580号); 遵义医药高等专科学校博士科研启动经费项目(No. 遵医专科合BS2016002)

\* 硕士研究生。研究方向: 肿瘤药理学。E-mail: 1023479120@qq.com

# 通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 肿瘤药理学。E-mail: 724730885@qq.com

were increased significantly, while relative expression of p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 MAPK were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Lupeol can inhibit the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells, the mechanism of which may be related to the phosphorylation of MAPKs signaling pathway-related regulatory proteins.

**KEYWORDS** Lupeol; Breast cancer; MCF-7 cells; Proliferation; MAPKs signaling pathway; Regulatory protein; Phosphorylation

羽扇豆醇别名蛇麻醇酯,是一种五环三萜类化合物,广泛存在于多种水果(芒果、橄榄等)、蔬菜(卷心菜、青椒、西红柿等)及药用植物(芦荟)中<sup>[1]</sup>。该化合物具有较强的抗氧化和抗炎作用,可用于病原菌感染、肿瘤及糖尿病等症的治疗<sup>[2-5]</sup>。近年来研究发现,羽扇豆醇能显著抑制肝癌、直肠癌、结肠癌等肿瘤细胞的生长<sup>[6-8]</sup>。同时有研究指出,该化合物可明显抑制人乳腺癌MCF-7细胞的增殖,并诱导其凋亡,但作用机制尚未完全阐明<sup>[9]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)是细胞内广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可参与多种细胞反应的调节,如细胞增殖、分化、凋亡等<sup>[10]</sup>。研究显示,MAPKs在乳腺癌的发生和发展中具有重要作用,可参与介导乳腺癌细胞的增殖与凋亡<sup>[11]</sup>。然而,羽扇豆醇是否可通过MAPKs信号通路来抑制MCF-7细胞的增殖尚未见相关报道。为此,本研究以人乳腺癌MCF-7细胞为对象,考察羽扇豆醇对细胞增殖的影响,并从调控MAPKs信号通路的角度出发初步探讨其可能机制,以期为羽扇豆醇用于乳腺癌的临床治疗提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2001HY-6003型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);011007型超净工作台(苏州净化设备有限公司);ELx800-MV型酶标仪(美国BioTek公司);MDF-328E型超低温冰箱(日本Sanyo公司);DYY-7C型蛋白质电泳仪(北京市六一仪器厂);Universal Hood II型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);VORTEX-5型涡旋混合器(北京贝登医疗设备有限公司);Centrifuge 5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

### 1.2 药品与试剂

羽扇豆醇对照品(上海澄绍生物科技有限公司,批号:CS1809DK01,纯度: $>98\%$ );PD98059、SP600125、SB203580对照品(均为MAPKs信号通路抑制剂;美国Abcam公司,批号分别为ab120234、ab120065、ab120162,纯度均大于99%);胎牛血清(FBS)、DMEM培养基(美国Hyclone公司,批号分别为DZK0493、AD17218273);青链霉素混合液、胰蛋白酶、结晶紫染色液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒、RIPA组织/细胞裂解液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液(北京索莱宝

科技有限公司,批号分别为20180212、20180125、20180411、20170815、20170830、20170913、20170425);MTT[北京博奥拓科技有限公司,批号:298-93-1;临用前用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)稀释,使其最终质量浓度为5 mg/mL];兔源细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化JNK(p-JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)多克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为#4695、#4370、#8690、#4511、#9252、#4668);兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)多克隆抗体(内参,武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10494-1-AP);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:126526);ECL超敏发光液(美国Millipore公司,批号:WBKLS0100);二甲基亚砜(DMSO)、乙醇等试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7细胞由中国典型培养物保藏中心提供。

## 2 方法

### 2.1 药液配制

取羽扇豆醇对照品12 mg,用DMSO-乙醇溶液(1:1, V/V)1 mL溶解,得质量浓度为12 mg/mL的贮备液,于4℃保存,备用。临用时,以DMEM培养基将上述贮备液稀释至所需质量浓度。

### 2.2 细胞培养

取人乳腺癌MCF-7细胞适量,用含10%FBS、1%青链霉素混合液的DMEM培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱(下同)中进行常规培养。待细胞融合至70%~80%后,以0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行后续试验。

### 2.3 羽扇豆醇对细胞增殖的影响

采用MTT法检测。取对数生长期的乳腺癌MCF-7细胞按8 000个/孔接种于96孔板上,培养,待细胞贴壁24 h后,将其随机分为对照组和给药组(羽扇豆醇最终质量浓度分别为7.5、15、30、60、90 mg/L,剂量设置参考文献[12]),每组设置6个复孔。吸弃上清液,对照组细胞加入DMEM培养基100 μL,给药组细胞加入含相应药物的DMEM培养基100 μL,继续培养24 h后,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,孵育3~4 h,吸弃上

清液,每孔加入DMSO 150  $\mu$ L,涡旋振荡 10 min,使用酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔的光密度(OD<sub>490 nm</sub>)值,计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(试验组细胞平均 OD<sub>490 nm</sub> 值/对照组细胞平均 OD<sub>490 nm</sub> 值) $\times$ 100%]和半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。上述试验重复 3 次。

#### 2.4 羽扇豆醇对细胞形态学特征的影响

取对数期生长的人乳腺癌 MCF-7 细胞按  $2\times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,培养,待细胞贴壁 24 h 后,将其随机分为对照组和给药组(羽扇豆醇最终质量浓度为 15、30、60 mg/L,剂量设置参考“2.3”项下的 IC<sub>50</sub> 值),每组设置 3 个复孔。吸弃上清液,对照组细胞加入 DMEM 培养基 2 mL,给药组细胞加入含相应药物的 DMEM 培养基 2 mL,继续培养 24 h,用 PBS 清洗 3 次后,使用倒置显微镜观察各组细胞的形态学特征并拍照。

#### 2.5 羽扇豆醇对细胞克隆形成能力的影响

采用细胞克隆形成试验检测。取对数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞按 500 个/孔接种于 6 孔板中,培养,待细胞贴壁 24 h 后,按“2.4”项下方法分组,每组设置 3 个复孔。吸弃上清液,对照组细胞加入 DMEM 培养基 2 mL,给药组细胞加入含相应药物的 DMEM 培养基 2 mL,继续培养 24 h;弃去培养基,用 PBS 清洗,加入含 10% FBS、1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养基适量,培养 14 d;弃去培养基,用 PBS 清洗 1~2 次,将细胞置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 15 min,以结晶紫染色 20 min,用水冲洗,常温晾干,使用倒置显微镜观察细胞克隆集落形成情况并拍照,同时计算克隆形成率[克隆形成率(%)=(克隆集落形成数/接种细胞总数) $\times$ 100%]。上述试验重复 3 次。

#### 2.6 羽扇豆醇和 MAPKs 信号通路抑制剂对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测。取对数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞按 8 000 个/孔接种于 96 孔板中,培养,待细胞贴壁 24 h 后,将其随机分为对照组和给药组(羽扇豆醇最终质量浓度为 60 mg/mL,剂量设置参考“2.3”项下的 IC<sub>50</sub> 值;PD98059、SP600125、SB203580 最终浓度均为 10  $\mu$ mol/L,剂量设置参考文献[13];PD98059、SP600125、SB203580+羽扇豆醇联用组的剂量同单药组),每组设置 6 个复孔。吸弃上清液,对照组细胞加入 DMEM 培养基 100  $\mu$ L,各给药组加入含相应药物的 DMEM 培养基 100  $\mu$ L,继续培养 24 h 后,按“2.3”项下方法操作并计算细胞存活率。上述试验重复 3 次。

#### 2.7 羽扇豆醇对 MARKs 信号通路相关调控蛋白表达的影响

采用 Western blotting 法检测。取对数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞按  $2\times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,培养,待细胞贴壁 24 h 后,将其随机分为对照组和给药组(羽

扇豆醇最终质量浓度为 15、30、60 mg/L,剂量设置参考“2.3”项下的 IC<sub>50</sub> 值;PD98059、SP600125、SB203580 最终浓度均为 10  $\mu$ mol/L,剂量设置参考文献[13];PD98059、SP600125、SB203580+羽扇豆醇联用组的剂量同单药组),每组设置 3 个复孔。吸弃上清液,对照组细胞加入 DMEM 培养基 2 mL,各给药组细胞加入含相应药物的 DMEM 培养基 2 mL,培养 24 h。使用 RIPA 组织/细胞裂解液提取各组细胞蛋白,以 BCA 法进行蛋白定量。行 SDS-PAGE 后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 ERK1/2(1:1 000)、p-ERK1/2(1:1 000)、JNK(1:1 000)、p-JNK(1:1 000)、p-38 MAPK(1:1 000)、p-p38 MAPK(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min;加入相应二抗(1:5 000),室温孵育 40 min,用 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min;以 ECL 显色后,采用凝胶成像系统成像并使用 ImageJ v1.8.0 软件分析,以目的蛋白与内参(GADPH)的条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。上述试验重复 3 次。

#### 2.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。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,两组间比较用 *t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 羽扇豆醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖影响的检测结果

与对照组比较,15、30、60、90 mg/L 羽扇豆醇组细胞的存活率均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),详见表 1。羽扇豆醇的 IC<sub>50</sub> 值为 52.94 mg/L,故本研究选择 15、30、60 mg/L 进行后续试验。

表 1 羽扇豆醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab 1 Effects of lupeol on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
对照组	100	30 mg/L 羽扇豆醇组	61.98 $\pm$ 1.88*
7.5 mg/L 羽扇豆醇组	90.78 $\pm$ 3.95	60 mg/L 羽扇豆醇组	44.96 $\pm$ 1.10**
15 mg/L 羽扇豆醇组	81.87 $\pm$ 3.70*	90 mg/L 羽扇豆醇组	36.12 $\pm$ 2.70**

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. control group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

#### 3.2 羽扇豆醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞形态学特征影响的观察结果

对照组细胞生长情况良好,细胞边缘及胞核清晰。与对照组比较,经不同剂量羽扇豆醇作用 24 h 后,细胞形态发生改变,其中 15 mg/L 羽扇豆醇组有少数细胞脱落漂浮,细胞数量开始减少,部分细胞固缩、变圆,体积变小;30、60 mg/L 羽扇豆醇组的大部分细胞固缩、变圆,并可见大量的死细胞和细胞碎片,详见图 1。

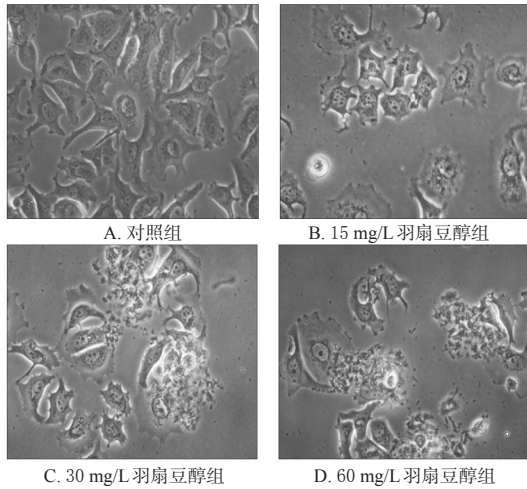


图1 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞形态学特征影响的显微图( $\times 100$ )

Fig 1 Micrographs of the effects of lupeol on the morphological characteristics of human breast cancer MCF-7 cells( $\times 100$ )

### 3.3 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞克隆形成影响的检测结果

与对照组比较,经15、30、60 mg/L羽扇豆醇作用后,细胞克隆集落形成有随剂量增加而逐渐减少的趋势,各给药组细胞的克隆形成率均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见图2、表2。

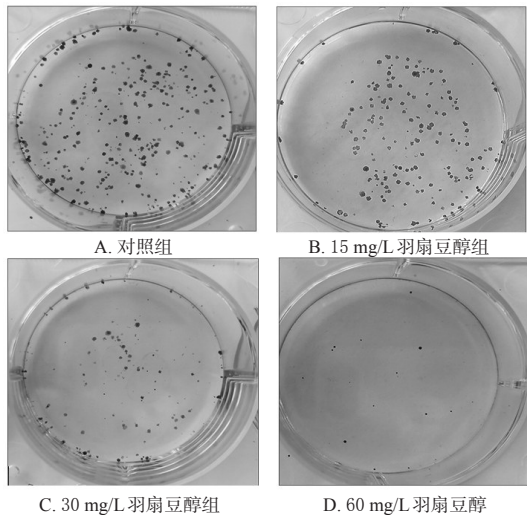


图2 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞克隆形成的影响

Fig 2 Effects of lupeol on the clone formation of human breast cancer MCF-7 cells

### 3.4 羽扇豆醇和MAPKs信号通路抑制剂对人乳腺癌MCF-7细胞增殖影响的检测结果

与对照组比较,60 mg/L羽扇豆醇组细胞的存活率显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );而10  $\mu\text{mol/L}$  PD98059、SP600125、SB203580组细胞的存活率与对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与60 mg/L羽

扇豆醇组比较,各抑制剂与羽扇豆醇联用组细胞的存活率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见表3。

表2 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞克隆形成率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Effects of lupeol on the clone formation rate of human breast cancer MCF-7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	克隆形成率, %	组别	克隆形成率, %
对照组	56.32 $\pm$ 3.51	30 mg/L羽扇豆醇组	15.25 $\pm$ 2.50**
15 mg/L羽扇豆醇组	32.24 $\pm$ 1.23*	60 mg/L羽扇豆醇组	3.61 $\pm$ 2.42**

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表3 羽扇豆醇和MAPKs信号通路抑制剂对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Effects of lupeol and MAPKs signaling pathway inhibitors on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	细胞存活率, %
对照组	100
60 mg/L羽扇豆醇组	48.6 $\pm$ 2.05**
10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059组	108.11 $\pm$ 1.30
10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059+60 mg/L羽扇豆醇组	66.31 $\pm$ 3.61#
10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125组	92.23 $\pm$ 2.89
10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125+60 mg/L羽扇豆醇组	75.75 $\pm$ 1.37###
10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580组	92.72 $\pm$ 2.31
10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580+60 mg/L羽扇豆醇组	64.08 $\pm$ 0.63#

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与60 mg/L羽扇豆醇组比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$

Note: vs. control group,\*\* $P < 0.01$ ; vs. 60 mg/L lupeol group,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$

### 3.5 羽扇豆醇对MARKs信号通路相关调控蛋白表达影响的检测结果

与对照组比较,羽扇豆醇各剂量组细胞p-ERK1/2以及30、60 mg/L羽扇豆醇组细胞p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );而羽扇豆醇各剂量组细胞ERK1/2、JNK、p38 MAPK的相对表达量,15 mg/L羽扇豆醇组p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量以及10  $\mu\text{mol/L}$  PD98059、SP600125、SB203580组细胞ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK的相对表达量与对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与60 mg/L羽扇豆醇组比较,各抑制剂与羽扇豆醇联用组细胞p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );而各联用组细胞ERK1/2、JNK、p38 MAPK的相对表达量与60 mg/L羽扇豆醇组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。详见图3、表4(表中,“-”表示该抑制剂并非为某蛋白对应的抑制剂,故无需检测,无相应结果)。

## 4 讨论

近年来乳腺癌的发病率不断上升,是女性癌症患者死亡的首要原因,但其发病机制尚未完全阐明<sup>[4]</sup>。目

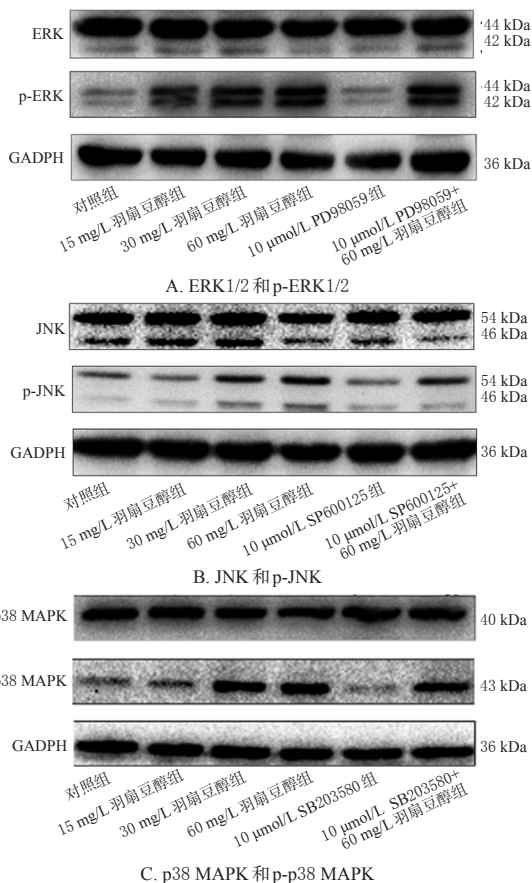


图3 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞MAPKs信号通路相关调控蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoregrams of lupeol on MAPKs signaling pathway-related regulatory proteins of human breast cancer MCF-7 cells

表4 羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞MAPKs信号通路相关调控蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Effects of lupeol on relative expression of MAPKs signaling pathway-related regulatory proteins of human breast cancer MCF-7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ERK1/2	p-ERK1/2	JNK	p-JNK	p-38 MAPK	p-p38 MAPK
对照组	0.93 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.86 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.69 ± 0.12	0.39 ± 0.05
15 mg/L 羽扇豆醇组	0.88 ± 0.06	0.56 ± 0.04*	0.85 ± 0.04	0.33 ± 0.08	0.67 ± 0.04	0.48 ± 0.04
30 mg/L 羽扇豆醇组	0.90 ± 0.02	0.73 ± 0.03*	0.88 ± 0.06	0.50 ± 0.03*	0.58 ± 0.06	0.68 ± 0.05*
60 mg/L 羽扇豆醇组	0.87 ± 0.05	0.80 ± 0.02**	0.86 ± 0.04	0.58 ± 0.02**	0.68 ± 0.04	0.82 ± 0.02**
10 μmol/L PD98059组	0.94 ± 0.03	0.34 ± 0.06	-	-	-	-
10 μmol/L PD98059+60 mg/L 羽扇豆醇组	0.84 ± 0.02	0.60 ± 0.04#	-	-	-	-
10 μmol/L SP600125组	-	-	0.87 ± 0.02	0.26 ± 0.02	-	-
10 μmol/L SP600125+60 mg/L 羽扇豆醇组	-	-	0.89 ± 0.02	0.37 ± 0.03#	-	-
10 μmol/L SB203580组	-	-	-	-	0.66 ± 0.03	0.37 ± 0.06
10 μmol/L SB203580+60 mg/L 羽扇豆醇组	-	-	-	-	0.69 ± 0.10	0.58 ± 0.02#

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与60 mg/L羽扇豆醇组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. 60 mg/L lupeol group, # $P < 0.05$

MAPKs家族主要有3个亚族,即ERK1/2、JNK和p38 MAPK,三者均可通过多个底物(如磷酸化转录因子、与细胞骨架相关的细胞和酶等)来调控细胞的多种生理过程(如细胞凋亡、癌基因转化和细胞增殖、分化等)<sup>[10,18-19]</sup>。为探讨MAPKs信号通路是否参与了羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的抑制过程,本研究选用

前,乳腺癌临床治疗以手术、化疗、放疗及综合治疗等为主,但患者预后不佳,且化疗药物副作用极大,严重影响了患者的治疗效果<sup>[15]</sup>。因此,寻找毒性较低的治疗药物成为乳腺癌临床研究的热点之一。已有研究证实,羽扇豆醇因其较低的毒性和广泛的药理作用引起了学者的普遍关注,是一种极具开发价值的抗肿瘤化合物<sup>[8]</sup>。有研究表明,羽扇豆醇可抑制人乳腺癌MCF-7细胞增殖并诱导其凋亡,其可能机制为该化合物可抑制细胞能量代谢途径中生成琥珀酰辅酶A以及底物磷酸化生成腺苷三磷酸的反应,从而抑制细胞的增殖<sup>[16]</sup>。有文献指出,MAPKs信号通路在乳腺癌的发生和发展中发挥着重要的调节作用<sup>[11,17]</sup>。但羽扇豆醇对MCF-7细胞增殖的抑制作用是否与MAPKs信号通路有关尚未见报道。为此,本研究初步考察了羽扇豆醇对MCF-7细胞增殖的抑制作用以及该作用与MAPKs信号通路的相关性。

本研究结果显示,15、30、60、90 mg/L羽扇豆醇均可显著降低细胞的存活率,提示羽扇豆醇可抑制MCF-7细胞的增殖,与文献报道的结果<sup>[9,16]</sup>基本一致。此外,本研究测得该化合物的 $IC_{50}$ 值为52.94 mg/L,故本研究选择15、30、60 mg/L进行后续试验。形态学观察结果显示,经15、30、60 mg/L羽扇豆醇处理后,MCF-7细胞形态发生了不同程度的改变,且随着羽扇豆醇剂量的增加,细胞的数量有逐渐减少的趋势,且可见细胞固缩、变圆、体积变小、死细胞和细胞碎片产生等现象。细胞克隆形成试验结果显示,15、30、60 mg/L羽扇豆醇均可显著降低细胞的克隆形成率,且细胞克隆集落形成有随剂量增加而逐渐减少的趋势,进一步证实了羽扇豆醇对MCF-7细胞增殖的抑制作用。

ERK1/2抑制剂(PD98059)、JNK抑制剂(SP600125)和p38 MAPK抑制剂(SB203580)作为参照。MTT试验结果显示,60 mg/L羽扇豆醇组细胞的存活率较对照组显著降低,而各抑制剂与羽扇豆醇联用组细胞的存活率均较羽扇豆醇单用组显著增加,表明加用ERK1/2、JNK、p38 MAPK抑制剂可逆转羽扇豆醇对MCF-7细胞增殖

的抑制作用。这提示羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的抑制作用可能与MAPKs信号通路有关。

有研究证实,MAPKs信号通路相关调控蛋白的磷酸化水平对多种肿瘤细胞的增殖、凋亡等均具有重要的调控作用<sup>[20-21]</sup>。Western blotting试验结果显示,羽扇豆醇各剂量组细胞p-ERK1/2以及30、60 mg/L羽扇豆醇组细胞p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量均较对照组显著升高,各抑制剂与羽扇豆醇联用组细胞p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK的相对表达量均较60 mg/L羽扇豆醇组显著降低,表明加用ERK1/2、JNK、p38 MAPK抑制剂可抑制羽扇豆醇对MAPKs信号通路相关调控蛋白的促磷酸化作用。这提示羽扇豆醇对MCF-7细胞增殖的抑制作用可能与诱导ERK1/2、JNK、p38 MAPK磷酸化有关,这与Cao J等<sup>[13]</sup>的研究结果基本一致。

综上所述,羽扇豆醇对人乳腺癌MCF-7细胞的增殖具有明显的抑制作用,其机制可能与促进MAPKs信号通路相关调控蛋白的磷酸化有关,但其具体作用靶点和机制有待后续研究进一步确证。

### 参考文献

- [1] 王艺玮,徐盛涛,徐进宜.五环三萜羽扇豆烷型天然产物抗肿瘤活性研究进展[J].药学与临床研究,2017,25(4):336-342.
- [2] PARVEZ MK, ALAM P, ARBAB AH, et al. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis*, leaves extract by validated HPTLC methods[J]. *Saudi Pharm J*, 2018, 26(5): 658-693.
- [3] KANGSAMAKSIN T, CHAITHONGYOT S, WOOTHICHAI-RANGSAN C et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. *PLoS One*, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0189628.
- [4] ADNAN SN, IBRAHIM N, YAACOB WA. Transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in response to stigmasterol and lupeol[J]. *J Glob Antimicrob Resis*, 2017. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.10.006.
- [5] RAMITH RS, SHIRAHATTI P, S NS, et al. Assessment of in vivo antidiabetic properties of umbelliferone and lupeol constituents of banana (*Musa sp. var. Nanjangud rasa bale*) flower in hyperglycaemic rodent model[J]. *PLoS One*, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151135.
- [6] SIVEEN KS, NGUYEN AH, LI F, et al. Negative regulation of signal transducer and activator of transcription-3 signalling cascade by lupeol inhibits growth and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Bri J Cancer*, 2014, 111(7):1327-1337.
- [7] TARAPORE RS, SIDDIQUI IA, ADHAMI VM, et al. The dietary terpene lupeol targets colorectal cancer cells with constitutively active wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(11):1950-1958.
- [8] LIU Y, BI T, SHEN G, et al. Lupeol induces apoptosis and inhibits invasion in gallbladder carcinoma GBC-SD cells by suppression of EGFR/MMP-9 signaling pathway[J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(1):123-133.
- [9] PITCHAI D, ROY A, IGNATIUS C. In vitro evaluation of anticancer potentials of lupeol isolated from *Elephantopus scaber* L. on MCF-7 cell line[J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2014, 5(4): 179-184.
- [10] JOHNSON GL, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [11] 韦立群,徐成飞,李婉婷,等. NF- $\kappa$ B和MAPK信号通路参与金雀异黄酮诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的体外研究[J].中国药理学通报,2018,34(5):690-694.
- [12] 毕亭亭,刘军权,陈复兴,等.羽扇豆醇对人共刺激细胞及结肠癌细胞株SW480的影响[J].医学研究生学报,2014, 27(10):1047-1051.
- [13] CAO J, TONG C, LIU Y, et al. Ginkgetin inhibits growth of breast carcinoma via regulating MAPKs pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.077.
- [14] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [15] KIM MS, BAK Y, PARK YS, et al. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2013, 29(4): 259-272.
- [16] 史栋栋,况媛媛,王桂明,等.细胞代谢组学用于羽扇豆醇干预人乳腺癌细胞MCF-7的机理探究[J].色谱,2014, 32(3):278-283.
- [17] 王肖寒.乳腺癌的发病机制与治疗[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(63):195.
- [18] 包桂兰,王秀枝,梁凤娟,等.蒙药五味沙棘散对吸烟致小鼠肺部炎症的改善作用及机制研究[J].中国药房,2017, 28(31):4411-4414.
- [19] 刘婷婷,张淑萍,覃筱燕,等. MAPK信号转导通路与神经损伤研究进展[J].中国公共卫生,2016, 32(2):248-254.
- [20] SU CC. Tanshinone II<sub>A</sub> inhibits gastric carcinoma AGS cells through increasing p-p38, p-JNK and p53 but reducing p-ERK, CDC2 and cyclin B1 expression[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(12):7097-7110.
- [21] SUN Q, LIANG Y, ZHANG T, et al. ER- $\alpha$ 36 mediates estrogen-stimulated MAPK/ERK activation and regulates migration, invasion, proliferation in cervical cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(3): 625-632.

(收稿日期:2019-01-03 修回日期:2019-04-16)

(编辑:张元媛)