



## 五味子乙素通过ROS介导内质网应激诱导人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的研究

王玮婷, 殷雪琴, 夏金娥, 张夏炎

### Schisandrin B induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through ROS mediated endoplasmic reticulum stress

WANG Weiting, YIN Xueqin, XIA Jine, ZHANG Xiayan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202106123>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 泽漆抑制三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞及其凋亡机制研究

Inhibitory effect of *Euphorbia helioscopia* on human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its possible mechanism of apoptosis

药 学 实 践 杂 志. 2017, 35(4): 337-340,358 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.012

#### 海绵来源的smenospongine诱导乳腺癌MCF7细胞凋亡机制研究

Effect of marine sponge-derived smenospongine on apoptosis in breast cancer MCF7 cells

药 学 实 践 杂 志. 2018, 36(5): 399-402,421 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.004

#### 月腺大戟的化学成分及其乳腺癌细胞毒活性研究

Chemical constituents and cytotoxic activities in breast cancer of *Euphorbia ebracteolata*

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(4): 309-313,317 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.005

#### 月腺大戟素A通过干扰PKD1介导的MEK/ERK和PI3K/AKT信号通路抑制乳腺癌细胞增殖的研究

Inhibition of ebracteolatin A in the proliferation of breast cancer cells by interfering with PKD1-mediated MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways

药 学 实 践 杂 志. 2020, 38(3): 241-244, 276 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201912008

#### 阿瑞匹坦对乳腺癌AC方案化疗后中重度呕吐患者的二级预防

The secondary prevention of aprepitant in moderate-severe vomiting caused by AC chemotherapy on breast cancer

药 学 实 践 杂 志. 2017, 35(2): 158-160,181 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.015

#### AB-8大孔树脂纯化五味子木脂素工艺研究

Study on the technology for extracting lignans in *schisandra chinensis* (Turcz) Baill by AB-8 macroporous resin

药 学 实 践 杂 志. 2017, 35(6): 520-525 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.010



关注微信公众号，获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 五味子乙素通过 ROS 介导内质网应激诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的研究

王玮婷, 殷雪琴, 夏金城, 张夏炎 (海军军医大学附属长海医院药剂科 上海 200433)

**[摘要]** 目的 研究五味子乙素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 用细胞计数试剂 (CCK-8) 检测不同浓度五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响; 五味子乙素 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 MDA-MB-231 细胞 24 h, 分别用 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡情况; 用 DCFA-DA 荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS) 水平; 用 Western blot 法检测细胞凋亡及内质网应激相关蛋白 (Bcl-2、Bax、CHOP、GPR78、PERK、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、eIF2) 的表达。结果 与空白组比较, 随着五味子乙素浓度增大, 细胞存活率明显降低, 其  $\text{IC}_{50}$  为 19.16  $\mu\text{mol/L}$ ; 与对照组比较, 五味子乙素 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 均能抑制细胞克隆形成 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖; 五味子乙素 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 均可诱导细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 使抗凋亡蛋白 BCL-2 的表达显著降低, 促凋亡蛋白 Bax 的表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 五味子乙素 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 显著升高细胞内 ROS 水平 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖; 五味子乙素 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 能够激发内质网应激, 使内质网应激相关蛋白 CHOP、GPR78、p-eIF2 $\alpha$  表达增多 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖。结论 五味子乙素可能通过 ROS 介导内质网应激诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。

**[关键词]** 五味子乙素; 乳腺癌; 活性氧; 内质网应激; 凋亡

**[中图分类号]** R285

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2021)06-0499-05

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.202106123

## Schisandrin B induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through ROS mediated endoplasmic reticulum stress

WANG Weiting, YIN Xueqin, XIA Jine, ZHANG Xiayan (Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of schisandrin B (Sch B) on the apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods** Cell counting reagent (CCK-8) was used to detect the effect of Sch B on the survival rate of MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated with Sch B (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours. The cell death was detected by Annexin V-FITC/PI. The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by DCFA-DA fluorescent probe. Apoptosis and the expression of endoplasmic reticulum stress related proteins (Bcl-2, Bax, CHOP, GPR78, PERK, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , eIF2) were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the cell survival rate decreased significantly ( $P < 0.01$ ) with the increase of Sch B concentration, and its  $\text{IC}_{50}$  was 19.16  $\mu\text{mol/L}$ . Compared with the control group, Sch B groups (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) inhibited cell clone formation in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Sch B groups (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) induced apoptosis ( $P < 0.05$ ), significantly reduced the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and significantly increased the expression of pro-apoptotic protein Bax ( $P < 0.05$ ). Sch B groups (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly increased the level of intracellular ROS in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Sch B groups (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulated endoplasmic reticulum stress and increased the expressions of endoplasmic reticulum stress-related proteins CHOP, GPR78 and p-eIF2 $\alpha$  in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sch B induces apoptosis of MDA-MB-231 cells through ROS mediated endoplasmic reticulum stress.

**[Key words]** schisandrin B; breast cancer; reactive oxygen species; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

在全球范围内, 乳腺癌是女性癌症死亡的主要

原因, 2018 年约有 210 万女性疑似患有乳腺癌, 占女性癌症的 25%<sup>[1]</sup>。在我国, 乳腺癌在女性肿瘤中发病率居首位, 死亡率居第 5 位, 近几十年来乳腺癌负担迅速增长<sup>[2]</sup>。目前, 雌激素敏感的乳腺癌患者主要以内分泌治疗为主, 然而, 缺乏激素受体的乳腺癌细胞通常使用化疗药物, 如紫杉醇和阿霉素<sup>[3]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81703882)

**[作者简介]** 王玮婷, 中药师, 研究方向: 医院药学, Tel:15601812257, Email: dicy\_lala@126.com

**[通信作者]** 张夏炎, 主管药师, 研究方向: 医院药学, Tel: 13482638082, Email:617880699@qq.com

但是,化疗药物对肿瘤细胞和正常细胞均表现出毒性反应,这限制了其临床应用。此外,细胞毒等抗肿瘤药物表现出的细胞耐药性进一步限制其应用。因此,迫切需要寻找毒性较小、效果较好的治疗药物。

五味子乙素(schisandrin B, Sch B)是从五味子中提取的主要活性成分<sup>[4]</sup>。据报道<sup>[5]</sup>,Sch B可通过抑制NF- $\kappa$ B激活及MAPK/Erk/p38/c-Jnk信号通路激活而有效减轻炎症反应,NASSER等<sup>[6]</sup>发现,Sch B可通过抑制PI3K/AKT和STA3/JAK2信号通路磷酸化,从而降低细胞内ROS的产生发挥抗前列腺癌作用,Wang等<sup>[7]</sup>发现,Sch B可通过TGF- $\beta$ 信号通路靶向miR-101-5p抑制大鼠肝纤维化。Dai等<sup>[8]</sup>发现,Sch B可通过STAT3的磷酸化和核转位发挥抗乳腺癌活性,但是Sch B如何影响乳腺癌细胞增殖凋亡能力及具体机制尚不清楚。本研究以Sch B为研究对象,探讨其对人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231(中科院细胞库,目录号:SCSP-5043);甘草查尔酮A(纯度 $\geq 98\%$ ,批号76296-75-6,上海麦克林生化科技有限公司);CCK-8试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、JC-1荧光探针、DCFH-DA荧光探针、Hoechst 33342染色剂、PBS(大连美仑生物);1640培养基、胎牛血清(FBS)(美国HyClone公司);ECL发光液、BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司);Bcl-2、Bax、CHOP、GPR78、ATF4、PERK、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、eIF2 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin、二抗(美国Cell Signaling Technology公司)。

### 1.2 细胞培养与药物处理

人乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、100  $\mu$ g/ml链霉素及100 U/ml青霉素的L-15培养基中,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱培养,细胞2~3 d可传代培养。Sch B药物处理时,首先取生长状态良好的对数期细胞进行实验,细胞分为对照组和药物组,根据细胞存活率检测结果计算IC<sub>50</sub>,药物组分为Sch B低剂量组(1/2倍IC<sub>50</sub>),Sch B中剂量组(1倍IC<sub>50</sub>),Sch B高剂量组(2倍IC<sub>50</sub>)。

### 1.3 CCK-8检测细胞存活率

取状态良好的对数期MDA-MB-231细胞,以 $8 \times 10^3/100 \mu$ l细胞密度接种于96孔板,于37  $^{\circ}$ C、

5% CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜。将细胞分为空白组(含培养基,不含细胞)、对照组(含培养基,含细胞,不含药物)和药物处理组,药物处理组分别以终浓度为1.25、2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu$ mol/L的Sch B处理细胞24 h,每组3个复孔。24 h后每孔加入CCK-8溶液(10  $\mu$ l),于培养箱继续培养1 h,用酶标仪在450 nm处测定吸光度(OD)值,计算细胞存活率,并计算药物IC<sub>50</sub>值。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(\text{OD}_{\text{药物}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})} \times 100\%$$

细胞克隆形成分析:取生长良好的对数期MDA-MB-231细胞,消化成单细胞悬液,以每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞接种于6孔板,轻轻摇动使细胞分散均匀,过夜贴壁。分为对照组和药物组,对照组加等体积的培养基,药物组分别加以终浓度为(10、20、40  $\mu$ mol/L)Sch B培养基,置培养箱中培养14 d。然后用PBS清洗2次,室温下用4%多聚甲醛固定15 min,1%结晶紫染色10 min。显微镜观察克隆形成情况,观察3个视野中克隆数量。

### 1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将生长良好的对数期MDA-MB-231细胞,以每孔 $2.5 \times 10^5$ 个/ml细胞密度接种于6孔板,置培养箱过夜培养。待细胞贴壁后,分别将终浓度为10、20、40  $\mu$ mol/L的Sch B处理24 h。用不含EDTA胰酶消化细胞,PBS洗涤2次,结合缓冲液(100  $\mu$ l)重悬细胞,转入流式管,然后再分别加入Annexin V-FITC(5  $\mu$ l)和PI染液(5  $\mu$ l),室温孵育15 min(避光),最后加入结合缓冲液(400  $\mu$ l)混匀,流式仪上机检测,Flow Jo软件处理数据。

### 1.5 DCFH-DA探针检测细胞内活性氧

将生长良好的对数期MDA-MB-231细胞,以 $1 \times 10^5$ 个/ml细胞密度接种于12孔板,置培养箱过夜培养。待细胞贴壁后,分别将终浓度为10、20、40  $\mu$ mol/L的Sch B处理24 h。DCFH-DA染液用PBS 1:1000稀释成工作液,每孔加入200  $\mu$ l工作液,37  $^{\circ}$ C培养箱中避光孵育30 min,PBS洗涤2次,倒置荧光显微镜拍照,Image J软件检测荧光强度。

### 1.6 Wester blot法检测内质网应激及凋亡相关蛋白表达

将生长良好的对数期MDA-MB-231细胞,以 $2.5 \times 10^5$ 个/ml细胞密度接种于6孔板,于培养箱过夜培养。待细胞贴壁后,将细胞依次分为对照组和药物组,对照组细胞加等体积培养基,药物组分别加终浓度为10、20、40  $\mu$ mol/L的Sch B及加或者

不加活性氧 (ROS) 清除剂(NAC)5 mmol/L, 内质网应激抑制剂 4-PBA 2 mmol/L 处理 24 h。用 RIPA (含 PMSF 蛋白酶抑制剂)裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加入 5×上样缓冲液金属浴(100 °C)使蛋白变性。20 μg 蛋白样品经 PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h,孵育一抗(4 °C 冰箱过夜),1×TBST 洗涤 3 次,二抗室温孵育 2 h,采用 ECL 显影液显色,凝胶成像系统拍照,Image J 软件分析。

### 1.7 统计处理

数据采用 GraphPad 软件进行分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析,

$P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响

图 1 结果显示,与对照组比较,随着药物浓度增大,细胞存活率下降,其  $IC_{50}$  为 19.16 μmol/L,故选择 1/2 倍  $IC_{50}$ (10 μmol/L),1 倍  $IC_{50}$ (20 μmol/L),2 倍  $IC_{50}$ (40 μmol/L)3 个剂量进行后续实验。细胞克隆实验结果显示,随着药物浓度增大,细胞克隆形成显著被抑制,且呈现剂量依赖关系,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

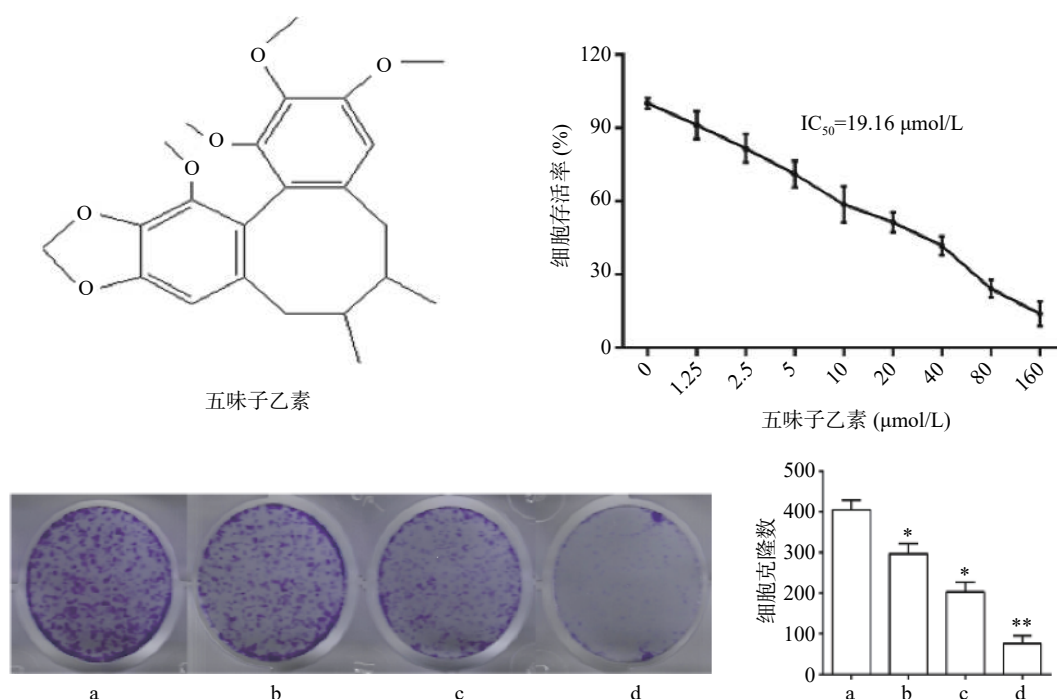


图 1 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞存活增殖的影响

a. 对照组; b. 10 μmol/L Sch B 组; c. 20 μmol/L Sch B 组; d. 40 μmol/L Sch B 组

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

### 2.2 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,Sch B(10、20、40 μmol/L)均可诱导细胞凋亡,且呈剂量依赖,具有统计意义 ( $P < 0.05$ )。Western blot 法检测结果显示,与对照组比较,Sch B(10、20、40 μmol/L)使抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著降低,促凋亡蛋白 Bax 的表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),结果见图 2。

### 2.3 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞内活性氧 (ROS) 水平的影响

DCF-DA 染色结果显示,与对照组比较,Sch B(10、20、40 μmol/L)组绿色荧光逐渐增强,显示细

胞内 ROS 水平增高,且呈剂量依赖,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),活性氧清除剂 NAC(5 mmol/L)预处理 2 h 可显著抑制由 Sch B 导致的细胞内 ROS 增多 ( $P < 0.05$ ),结果见图 3。

### 2.4 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞内质网应激的影响

异常内质网应激可引起细胞凋亡,Western blot 法检测结果显示,与对照组比较,Sch B(10、20、40 μmol/L)分别使内质网应激相关蛋白 CHOP, GPR78, p-eIF2α 表达增多且呈剂量依赖,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),内质网应激抑制剂 4-PBA (2 mmol/L)预处理 2 h,可显著抑制由 Sch B 引起



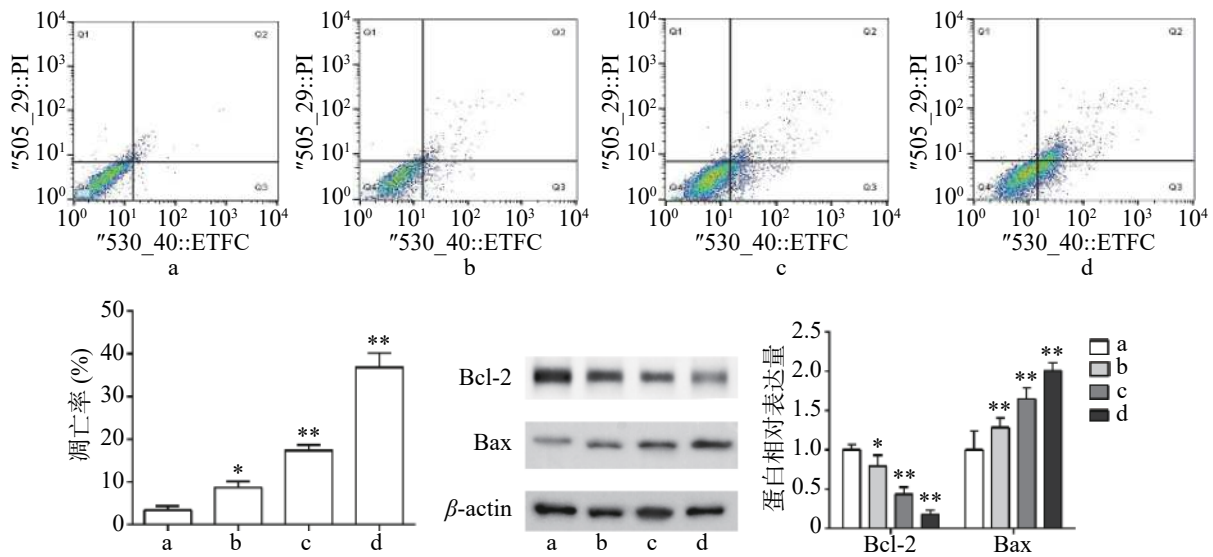


图2 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

a. 对照组; b. 10 μmol/L Sch B 组; c. 20 μmol/L Sch B 组; d. 40 μmol/L Sch B 组

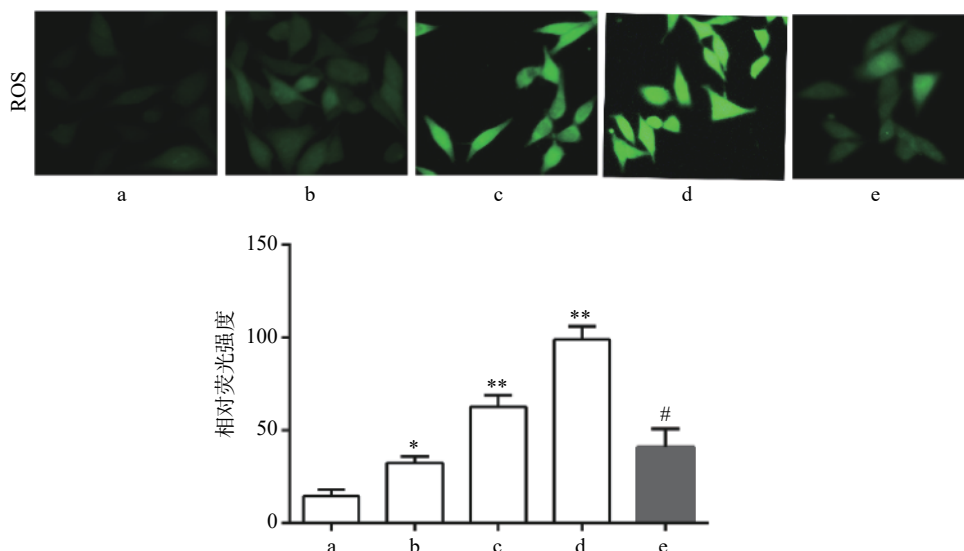
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较

图3 五味子乙素对 MDA-MB-231 细胞内活性氧 (ROS) 水平的影响

a. 对照组; b. 10 μmol/L Sch B 组; c. 20 μmol/L Sch B 组; d. 40 μmol/L Sch B 组; e. 40 μmol/L Sch B + 5 mmol/L NAC 组

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与 40 μmol/L Sch B 组比较

的内质网应激,使内质网应激相关蛋白 CHOP、GPR78、p-eIF2 $\alpha$  表达降低 ( $P < 0.05$ ),结果见图 4。

### 2.5 ROS 对 MDA-MB-231 细胞内质网应激及凋亡的影响

上述结果表明 Sch B 可以使细胞内 ROS 升高, Sch B 也可以使内质网应激诱导细胞凋亡。为了验证 ROS 升高与内质网应激之间的联系,MDA-MB-231 用 ROS 清除剂 NAC (5 mmol/L) 预处理 2 h,结果显示, NAC 可逆转由 Sch B 引起的内质网应激,使内质网应激相关蛋白 CHOP, GPR78, p-eIF2 $\alpha$  显著降低 ( $P < 0.05$ ),进一步实验证明, 5 mmol/L NAC

可逆转由 Sch B 引起的细胞凋亡,使抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著升高,促凋亡蛋白 Bax 的表达显著降低 ( $P < 0.05$ ),结果见图 5。

### 3 讨论

乳腺癌是临床上特别常见的恶性肿瘤,每年的发病率和死亡率都在增加,其发生发展是一个复杂的病理过程,是不受控制的细胞增殖和抵抗凋亡的结果<sup>[9]</sup>。尽管癌症研究领域取得了相当大的进展,但由于对化疗耐药和高复发率,乳腺癌的总体生存率仍然不令人满意,因此,大量的研究都集中在发

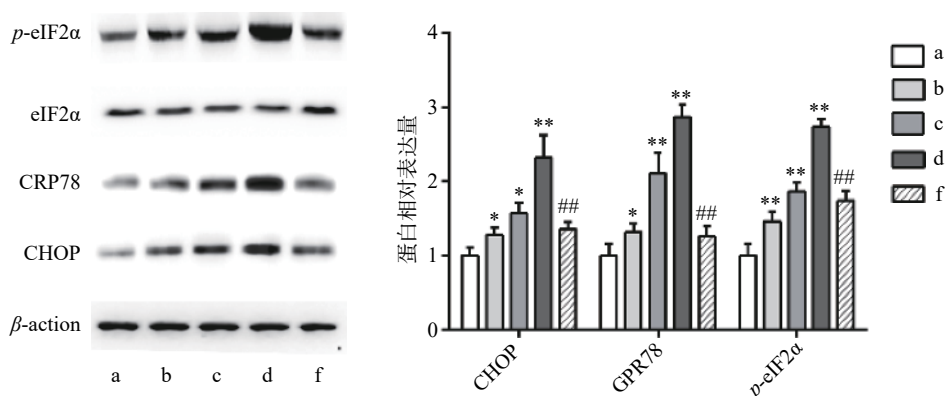


图4 五味子乙素对MDA-MB-231细胞内质网应激的影响

a. 对照组; b. 10 μmol/L Sch B 组; c. 20 μmol/L Sch B 组; d. 40 μmol/L Sch B 组; e. 40 μmol/L Sch B + 2 mmol/L 4-PBA 组  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.01$ , 与 40 μmol/L Sch B 组比较

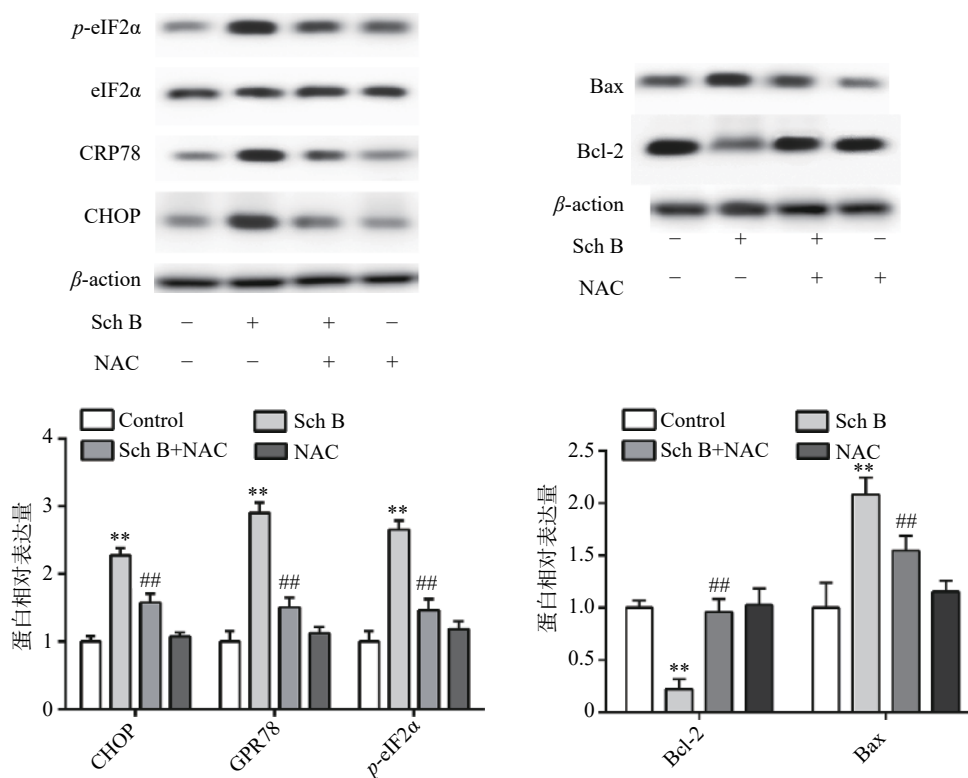


图5 ROS对MDA-MB-231细胞内质网应激及凋亡的影响

\*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.01$ , 与 40 μmol/L Sch B 组比较

现新的有效的治疗乳腺癌的候选药物中<sup>[10]</sup>。从植物中提取的天然化合物具有更有效和更少的副作用被认为是抗癌药物的重要来源。

ROS 在细胞存活和死亡中起着关键作用。在正常生理条件下,适当水平的 ROS 有助于细胞存活。然而,过量的 ROS 会导致细胞损伤和凋亡细胞死亡<sup>[11]</sup>。ROS 作为不良刺激之一,可引起内质网功能障碍,诱导内质网应激,称为 ROS 介导的内质网应激<sup>[12]</sup>。在本研究中,MDA-MB-231 细胞在与 Sch B 孵育前先经 ROS 清除剂 NAC 预处理。凋亡减轻,ROS 生成减少,CHOP, GPR78 和 p-eIF2a 表

达下调,内质网应激减轻。这说明 Sch B 诱导的 MDA-MB-231 细胞内质网应激依赖性凋亡中,ROS 是不可或缺的。

内质网是真核细胞中传导和提供蛋白质折叠环境的细胞器,因为它对刺激的敏感性会导致某种情况发生成为内质网应激,内质网应激被认为是应对内质网稳态失衡的各种细胞生物学生理和病理事件的一种高度保守的细胞防御机制,如抗癌药物诱导的细胞凋亡通路<sup>[13]</sup>。GPR78 是调节内质网应激的关键因子, GPR78 的激活增加了真核启动子

(下转第 533 页)