

黄连素联合他莫昔芬对耐药乳腺癌细胞 T-47D 生物学行为的影响

史梦婕¹, 任章朋¹, 张子京¹, 林碧霞², 林碧云^{3*} (1. 河南省新乡市中心医院, 河南新乡 4530002; 2. 联勤保障部队第九〇〇医院, 福建福州 350001; 3. 广东医科大学附属第一医院, 广东湛江 524000)

摘要: **目的** 观察黄连素(BBR)联合他莫昔芬(TAM)对耐药性乳腺癌细胞生物学行为的影响。**方法** 乳腺癌耐药细胞株 T-47D 分为对照组、TAM 组、BBR 组、TAM+BBR 组, 采用 CCK-8、划痕实验、流式细胞术、Western blot 分别检测细胞增殖、迁移、细胞周期及 p-AKT、p-AMPK 表达。**结果** 与对照组比较, TAM 组、BBR 组与 TAM+BBR 组细胞增殖率明显降低, 而细胞迁移抑制率、细胞周期阻滞率及 p-AKT/AKT、p-AMPK/AMPK 表达均明显增高 ($P < 0.01$ 或 0.05), 以 TAM+BBR 组最为显著 ($P < 0.01$)。**结论** BBR 联合 TAM 可能通过激活 PI3K/AKT 和 MAPK 通路, 抑制 T-47D 细胞增殖、迁移, 阻滞细胞周期在 G1 期。

关键词: 耐药性乳腺癌细胞; 黄连素; 他莫昔芬; 细胞周期

中图分类号: R 737.3

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)05-0545-05

Effect of berberine and tamoxifen on biological behavior of drug-resistant breast cancer T-47D cells

SHI Meng-jie¹, REN Zhang-peng¹, ZHANG Zi-jing¹, LIN Bi-xia², LIN Bi-yun^{3*} (1. Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 4530002, China; 2. No. 900 Hospital of Joint Logistic Support Forces, Fuzhou 350001, China; 3. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of berberine (BBR) and tamoxifen (TAM) on biological behavior of drug-resistant breast cancer cells. **Methods** Drug-resistant breast cancer T-47D cells were divided into control, TAM, BBR, and TAM+BBR groups. Cell proliferation, migration, cell cycle, and expression of p-AKT and p-AMPK were respectively detected by CCK-8, scratch test, flow cytometry, and Western blot. **Results** Compared with control group, cell proliferation decreased, while cell migration inhibition, cell cycle arrest, and expression of p-AKT/AKT and p-AMPK/AMPK increased in TAM, BBR and TAM+BBR groups ($P < 0.01$ or 0.05), especially in TAM+BBR group ($P < 0.01$). **Conclusion** Combined BBR and TAM might inhibit cell proliferation and migration and block cell cycle in G1 phase via activating PI3K/AKT and AMPK pathways.

Key words: drug-resistant breast cancer cells; berberine; tamoxifen; cell cycle

乳腺癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 发病率稳居高位, 严重威胁女性的生命健康。在我国乳腺癌的发病率和死亡率逐年上升, 且更加年轻化。60%~70%的乳腺癌属于雌激素受体阳性(ER+)和孕激素受体阳性(PR+)的激素依赖型恶性肿瘤。近十几年来以内分泌治疗药物他莫昔芬(TAM)为代表的治疗方案已经明显降低乳腺癌发病率, 提高患者生存率, 但在接受内分泌治疗的患者中, 30%~40%患者出现耐药并复发转移。目前的研究表明乳腺癌的耐药与雌激素

受体的缺失或突变、多种生长因子接到的信号转导通路异常活跃密切相关, 但详细的分子机制尚未阐明。本研究以乳腺癌耐药细胞株 T-47D 为研究对象, 采用 CCK-8、流式细胞术等实验方法分析黄连素(BBR)联合 TAM 对细胞的增殖迁移能力的影响及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂

细胞培养箱(日本 Espec), q-PCR 仪(roche light-cycle480), 流式细胞仪。耐药性乳腺癌细胞株 T-47D (购自 ATCC); 抗体(cst); CCK-8(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 分组 根据不同药物干预将乳腺癌细胞株 T-

基金项目: 广东医科大学科研基金项目(No.2XK16036)

收稿日期: 2020-12-30; 修订日期: 2021-03-17

作者简介: 史梦婕(1987-), 女, 硕士, 住院医师

通信作者: 林碧云(1989-), 女, 硕士, 助理研究员

47D分为4组,即阴性对照(NC)组,他莫昔芬5 $\mu\text{mol/L}$ (TAM)组,黄连素50 $\mu\text{mol/L}$ (BBR)组,他莫昔芬5 $\mu\text{mol/L}$ +黄连素50 $\mu\text{mol/L}$ 联合(TAM+BBR)组。

1.2.2 细胞培养 将人乳腺癌细胞株 T-47D 细胞的冻存管从液氮罐里取出,迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,快速摇动促使溶液融化。待溶液完全融化后从水浴中取出冻存管,用酒精消毒冻存管表面后在净工作台打开冻存管,将含有细胞的冻存液转移至 5 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min(最大转速不超过 1 500 r/min,以防损伤细胞),去除含有 DMSO 的上清液,用含有 10% 胎牛血清、100 mg/L 链霉素和 100 U/mL 青霉素的完全培养基轻轻吹打混匀后用移液枪转移至 T25 培养瓶中。最后把接种到培养瓶中的细胞用 8 mL DMEM 完全培养基稀释,轻轻吹打均匀后,37 $^{\circ}\text{C}$,含 5% CO_2 温箱中培养。

1.2.3 CCK-8 实验 取对数生长期的 T-47D 细胞,以每孔种 5 000 个细胞种于 96 孔板中放入培养箱内;待细胞贴壁后加入药物作用,每组设置 5 个复孔;48 h 后去除药物后,加入 CCK-8 工作液(现配现用),放入培养箱孵育 2~3 h;450 nm 波长测量吸光值;计算细胞的增殖能力。3 次单独重复试验的检测结果显示的抑制率的计算公式为:抑制率 = $[(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{对照组}}) / \text{OD}_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

1.2.4 划痕实验 取对数生长期的 T-47D 细胞,以 8×10^5 个接种于 6 孔板中,待贴壁后用 10 μL 的 tip 沿标记好的方向用力均匀地划出相应的划痕,加入相应药物作用,48 h 拍照保留数据进行分析。四次单独重复试验的检测结果显示,迁移抑制率的计算公式为:迁移抑制率 = $[(\text{面积}_{\text{实验组}} - \text{面积}_{\text{对照组}}) / \text{面积}_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

1.2.5 平板单克隆形成实验 取对数生长期的 T-47D 细胞,以每孔 100 个细胞种于 6 孔板中,加培养液至 3 mL,放入培养箱;待细胞贴壁后加入药物作用,3 d 换一次液;培养 14~17 d 后取出 6 孔板,加细胞固定液 2 mL 固定细胞 20 min;三蒸水冲洗,加结晶紫染色 15 min;三蒸水洗干净,晾干;计数肉眼可见紫色染色点。

1.2.6 流式细胞周期实验 取对数生长期的 T-47D 细胞,以 10^6 个细胞接种于 60 mm 的培养皿,待细胞贴壁后加入药物作用,48 h 后收集细胞,用 70% 的酒精固定,PI 染色后上机检测。

1.2.7 Western blot 实验 取对数生长期的 T-47D 细胞,以 10^6 个细胞接种于 60 mm 的培养皿,待细胞贴壁后加入药物作用,48 h 后收集细胞提取蛋白,加

入 loading buffer 变性并配平浓度,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,5% 浓缩胶,10% 分离胶,用 80 V 电泳 30 min 后转成 120 V 继续电泳 60 min,然后取出以 300 mA,2 h 进行转膜;完成后进行 5% 脱脂奶粉封闭,一抗孵育 2 h、TBST 洗涤,二抗孵育 1 h、TBST 洗涤,进行曝光。

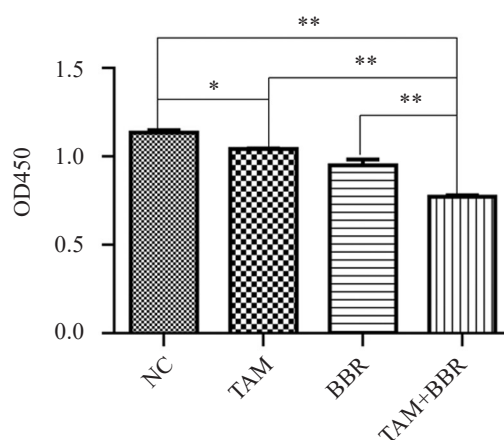
1.3 统计学处理

使用统计软件 SPSS 22.0 进行分析,3 次独立实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组检验用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 实验结果

与 NC 组比较,TAM 组、BBR 组与 TAM+BBR 组对乳腺癌细胞 T-47D 细胞增殖率均明显降低($P < 0.01$),以 TAM+BBR 组最为显著($P < 0.01$),见图 1。



与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 各组对乳腺癌 T-47D 细胞增殖率的影响

2.2 划痕实验结果

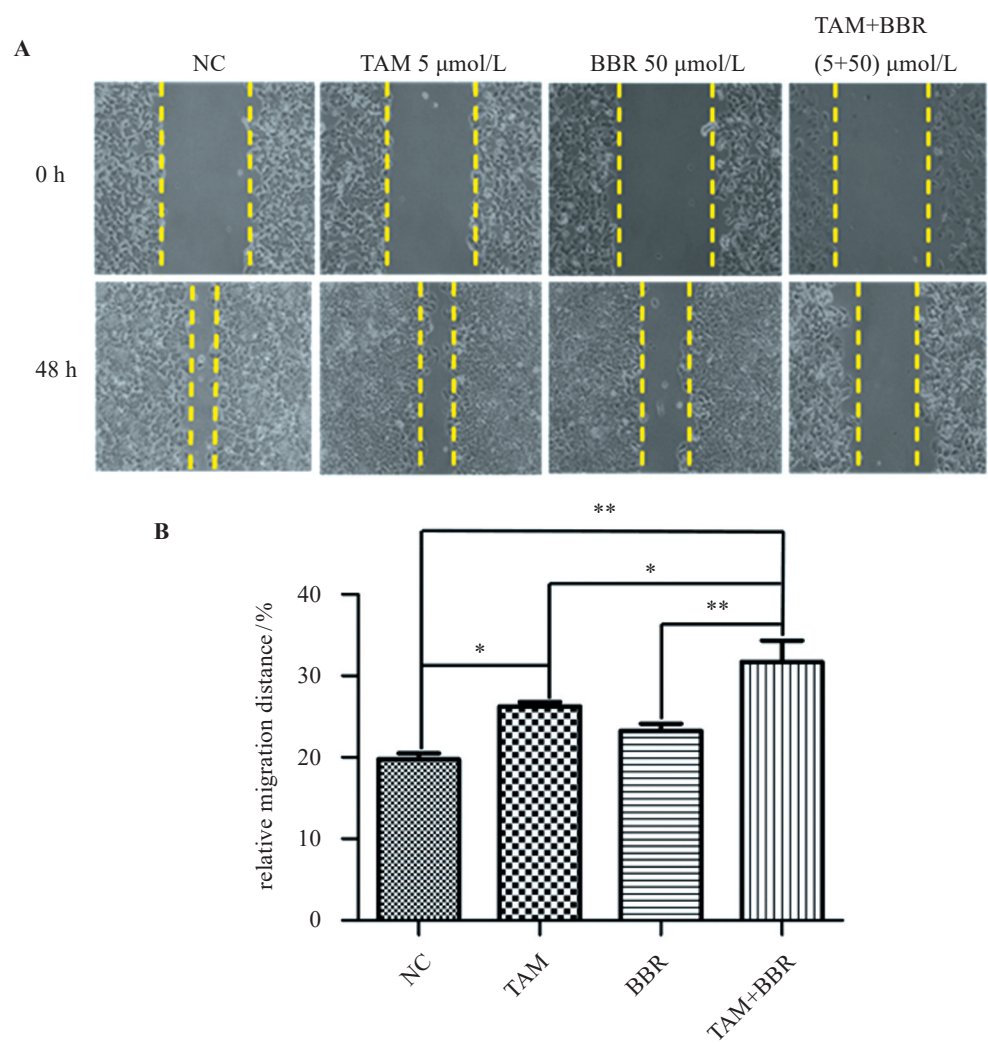
与 NC 组比较,TAM 组、BBR 组与 TAM+BBR 组对乳腺癌细胞 T-47D 细胞迁移的抑制率均明显增高($P < 0.01$),以 TAM+BBR 组最为显著($P < 0.01$),见图 2。

2.3 流式细胞术检测结果

与 NC 组比较,TAM 组、BBR 组与 TAM+BBR 组对乳腺癌细胞 T-47D 细胞周期阻滞率均明显增高($P < 0.01$),以 TAM+BBR 组最为显著($P < 0.01$),见图 3。

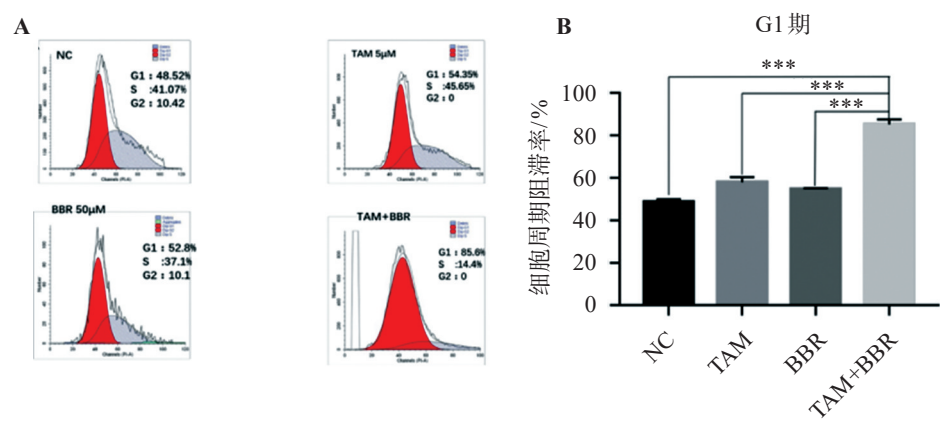
2.4 western blot 的实验结果

与 NC 组比较,TAM 组、BBR 组与 TAM+BBR 组对 p-AKT/AKT、p-AMPK/AMPK 的表达量均明显增高($P < 0.05$ 或 0.01),以 TAM+BBR 组最为显著($P < 0.01$),见图 4。



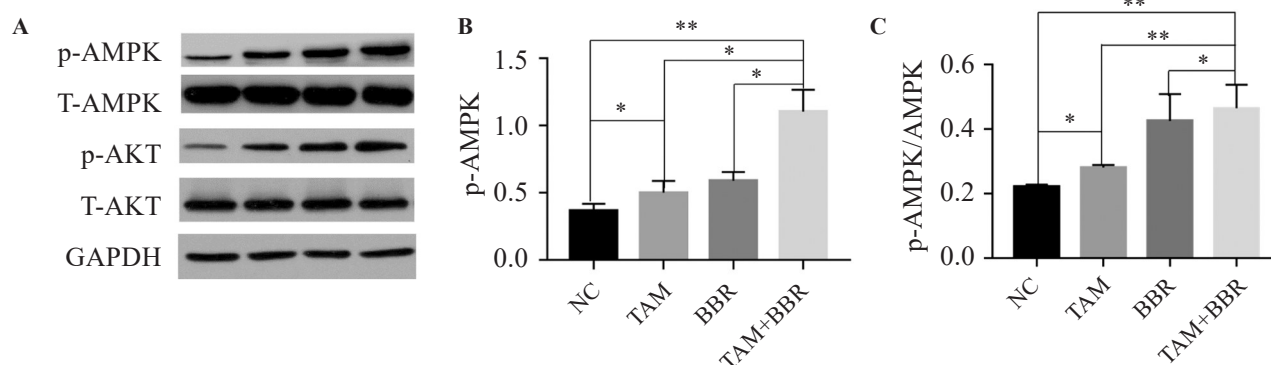
A.4组对乳腺癌T-47D细胞迁徙能力的划痕图;B.4组作用于T-47D细胞48 h细胞迁移抑制率(与AC组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图2 各组对乳腺癌T-47D细胞迁移能力的影响



A.4组对乳腺癌T-47D细胞阻滞在G1期的流式细胞图;B.4组对乳腺癌细胞T-47D细胞周期阻滞率,与AC组比较: *** $P<0.01$

图3 各组对乳腺癌T-47D细胞周期G1的影响



A.4组对乳腺癌 T-47D 细胞 48 h 的 western blot 图; B.p-AKT/TKT 表达量; C.p-AMPK/AMPK 表达量(与 AC 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图4 各组对乳腺癌 T-47D 细胞中 p-AKT、p-AMPK 蛋白表达量的变化

3 讨论

TAM 是一种选择性雌激素受体调节剂,由于 TAM 效应结构的侧链和 ER 受体的 351 位氨基酸结构相似^[1-3]。因此, TAM 通过竞争结合细胞核内的雌激素受体,引起构象改变,阻碍共活化剂的绑定,进而减少雌激素相关基因的转录^[4-6],抑制肿瘤细胞增殖。临床上约 30%~40% 乳腺癌患者在接受 TAM 治疗后出现耐药、复发和转移,这是临床上治疗乳腺癌遇到的大难题,也大幅度降低了乳腺癌患者的生存周期。在 TAM 耐药乳腺癌中 Hh 通路的异常激活受到 PI3K/AKT 通路的调节,而且在内分泌治疗耐药的乳腺癌中 PI3K/AKT 过度激活^[7]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路是整合细胞外各种信号的共同通路,参与多种细胞生理活动,如细胞代谢、蛋白合成、细胞生存与增殖、血管新生及免疫功能等^[8]。PI3K/AKT 通路是整合细胞外生长因子受体信号的关键调节通路,在细胞代谢、生长和存活以及糖类代谢、胞内物质运输及血管形成的调节中发挥重要作用^[9]。PI3K 催化亚基的突变或者基因的扩增,下游靶点 AKT 的扩增,上游受体 (HER-2) 的增多, PI3K/AKT 通路的负调控因子 PTEN 基因丢失等都是这一通路在癌细胞中异常激活的关键因素,且这些因子的异常表达或激活与乳腺癌发生发展关系密切^[10-12]。

植物中提取的纯天然抗肿瘤化合物是抗癌新药开发的重要手段之一。研究发现中药中许多单体成分具有抗肿瘤活性,如黄连素可以抑制多种肿瘤细胞的增殖迁移等活性。黄连素是一种常见的草本科异喹啉类生物碱,许多研究显示黄连素在抗肿瘤方面有

积极作用,能诱导乳腺癌、肺癌、肠癌、肝癌细胞凋亡,抑制肿瘤增殖,还能和细胞毒性药物如长春新碱、伊立替康联用具有协同作用,且可降低肿瘤的耐药作用^[13-14]。在乳腺癌中黄连素可通过调节 PI3K/AKT 通路抑制肿瘤转移^[15]。黄连素不仅抑制细胞生长的周期蛋白从而促进细胞凋亡,也作用于胞质中相关通路的关键蛋白并发挥抗肿瘤作用,如抑制 Ras、Raf、MER-K 和 PI3K 等关键蛋白活性而降低 PI3K/AKT 和 MAPK 通路信号传导功能。黄连素还能作用于 EGFR、HER-2 等相关受体而抑制细胞的生长,而内分泌耐药的乳腺癌患者与其 EGFR 被异常激活进一步激活 PI3K/AKT 有着潜在的关系^[16]。

本课题通过研究黄连素与 TAM 共同作用对 TAM 耐药的乳腺癌细胞株的影响进而阐述其对细胞生物学行为的影响。本研究过程中通过 CCK-8 实验结果发现, TAM 和 BBR 单独作用于 T-47D 细胞时其增殖率明显低于对照组,且以两种药物联合的效果更为显著,说明在药物 TAM 和 BBR 联合作用下可抑制细胞的增殖能力。通过划痕实验结果发现 TAM 和 BBR 单独作用于 T-47D 细胞时其迁移抑制率高于对照组,以联合药物组更为显著,证明了两种药物的联合作用抑制细胞迁移能力强于单独作用时抑制迁移能力。通过流式细胞术的检测分析验证了两种药物单独或联合作用都会将细胞阻滞在 G1 期,其中两种药物联合作用时 G1 期的阻滞效果相对于两种药物单独作用时的更强;通过 western blot 检测了 p-AKT 与 p-AMPK 的表达量时, TAM+BBR 组对 p-AKT/TKT、p-AMPK/AMPK 的表达量均明显增高 ($P<0.05$ 或

0.01),以TAM+BBR组最为显著($P<0.01$),说明两种药物联合作用时上调p-AMPK和p-AKT的表达效果比两种单独药物作用时更有好。

通过以上实验可以发现BBR与TAM具有协同作用。BBR可以提高TAM耐受细胞对TAM的敏感性,进而达到抑制细胞增殖和迁移的作用,将更多的细胞阻滞在G1期,上调p-AMPK和p-AKT的表达。并且BBR作为成熟的中成药用于临床治疗,本研究可为临床TAM耐受型乳腺癌治疗提供新的方案与理论支持。

参考文献:

- [1] JENSEN E V, JORDAN V C. The estrogen receptor: a model for molecular medicine[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6):1980-1989.
- [2] LIU H, LEE E S, DEBLOSREYES A, et al. Silencing and reactivation of the selective estrogen receptor modulator-estrogen receptor alpha complex[J]. Cancer Res, 2001, 61(9):3632-3639.
- [3] SCHAFER J M, LIU H, BENTREM D J, et al. Allosteric silencing of activating function 1 in the 4-hydroxytamoxifen estrogen receptor complex is induced by substituting glycine for aspartate at amino acid 351[J]. Cancer Res, 2000, 60(18):5097-5105.
- [4] KLINGE C M, JERNIGAN S C, SMITH S L, et al. Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 174(1-2):151-166.
- [5] SHIAU A K, BARSTAD D, LORIA P M, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen[J]. Cell, 1998, 95(7):927-937.
- [6] WAKELING A E. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens[J]. Endor Relat Cancer, 2000, 7(1):17-28.
- [7] RAMASWAMY B, LU Y, TENG K Y, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway[J]. Cancer Res, 2012, 72(19):5048-5059.
- [8] LIEHR J G, RICCI M J. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors[J]. Proc Natl Acad of Sci USA, 1996, 93(8):3294-3296.
- [9] NIU J, ANDRES G, KRAMER K, et al. Incidence and clinical significance of ESR1 mutations in heavily pretreated metastatic breast cancer patients[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8:3323-3328.
- [10] ROBINSON D R, WU Y M, VATS P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer[J]. Nat Genet, 2013, 45(12):1446-1451.
- [11] FAN J, YIN W J, LU J S, et al. ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(8):883-890.
- [12] SHI L, DONG B, LI Z, et al. Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(21):3423-3429.
- [13] WANG L, WEI D, HAN X, et al. The combinational effect of vincristine and berberine on growth inhibition and apoptosis induction in hepatoma cells[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(4):721-730.
- [14] YU M, TONG X, QI B, et al. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of NF κ B[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1):249-254.
- [15] KUO H P, CHUANG T C, TSAI S C, et al. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits the metastatic potential of breast cancer cells via Akt pathway modulation[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(38):9649-9658.
- [16] MARTELOTTO L G, NG C K, PISCUOGLIO S, et al. Breast cancer intra-tumor heterogeneity[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3):210.