

茶氨酸衍生物 TCIC 脂质体对雌激素受体阳性的 乳腺癌细胞生长和迁移的抑制作用

杨美玲¹, 刘真真¹, 刘辉², 朱荣芹¹, 李箐¹, 闫春燕¹,
盖静¹, 郑晓慧¹, 孙考祥¹, 吴犇昊³, 张国营^{1*}

1. 烟台大学药学院分子药理学实验室, 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学), 烟台 264005;
2. 烟台市毓璜顶医院药学部, 烟台 264001; 3. 山东营东颖昊生物科技有限公司, 烟台 264670)

摘要: 为研发抗癌新药, 使用茶氨酸衍生物茶氯香酰胺 TCIC 制备纳米脂质体 (TCIC-L), 研究 TCIC-L 对雌激素受体阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞生长和迁移的抑制作用, 并深入探究可能的作用机制。分别采用 MTT 和 Transwell chamber 实验方法探究各浓度 TCIC-L 对 MCF-7 细胞的生长和迁移的抑制作用; 使用流式细胞术 (FCM) 检测 TCIC-L 对 MCF-7 细胞凋亡的影响; 应用 Western blotting 检测 MCF-7 细胞生长和迁移有关蛋白和酶的表达。实验结果显示, TCIC-L 对 MCF-7 细胞生长和迁移有显著的抑制、对癌细胞的凋亡表现促进作用; TCIC-L 明显下调受体蛋白 p-VEGFR2、Met 和 ER- α 、抗凋亡蛋白 Bcl-2、Cyclin D1、Akt 和 NF- κ B 的表达, 上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、p53 和 p21 的表达。TCIC-L 作用的分子机制可能与抑制 VEGFR/Met/ER- α -Akt/NF- κ B 信号传导通路有关。本研究显示了 TCIC-L 有潜在的治疗雌激素受体阳性乳腺癌的作用。

关键词: 茶氯香酰胺脂质体; 雌激素受体阳性的人乳腺癌; 生长和迁移; 细胞凋亡; 抑制作用机制

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)01-0006-09

Inhibitory effects of theanine derivative TCIC liposome on the growth and migrations of ER- α -positive human breast cancer cells

YANG Meiling¹, LIU Zhenzhen¹, LIU Hui², ZHU Rongqin¹, LI Zheng¹, YAN Chunyan¹,
GE Jing¹, ZHENG Xiaohui¹, SUN Kaoliang¹, WU Benhao³, ZHANG Guoying¹

1. Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Yantai University, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Yantai University, Yantai 264005; 2. Department of Pharmacy, Yuhuangding Hospital of Yantai, Yantai 264001; 3. Shandong Yingdong Yinghao Biotechnology Inc, Yantai 264670)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the inhibitory effects of a theanine derivative TCIC-prepared liposome (TCIC-L) on the growth and migrations of human breast cancer MCF-7 cells and its potential mechanism. The assays of MTT and transwell chamber were used to explore the effects of TCIC-L on the MCF-7 cell grown and migration, respectively. The flow cytometry (FCM) and Western blot were applied to analyzing the effects of TCIC-L on the apoptosis and related protein expressions in MCF-7 cells, respectively. The experimental results indicated that TCIC-L inhibited the cell growth and migration and promoted the apoptosis of human breast cancer cells. TCIC-L significantly down-regulated the protein expression and/or phosphorylation of Bcl-2, p-VEGFR2, Met, ER- α , Cyclin D1, Akt and NF- κ B, while it up-regulated the protein expression of Bax, caspase-3, p53, and p21 in MCF-7 cells. The possible molecular mechanism of the TCIC-L action against MCF-7 cells might be connected with the suppression of the signal pathway of VEGFR/Met/ER- α -Akt/NF- κ B. TCIC-L

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 国家科技部十二五“863”项目(2012AA020206), 十三五国家重点研发计划项目(2017YFB0702600)和山东省自然科学基金项目(ZR2015HM004)共同资助。

共同第一作者简介: 杨美玲, 硕士研究生。E-mail: meilingytdx@163.com; 刘真真, 硕士研究生。E-mail: jhyfttdtr@qq.com

* 通信作者: 张国营, 博士, 教授。E-mail: zhang_zhang6173@aliyun.com

has a broad application prospect in treating estrogen receptor-positive human breast cancer.

Key words: TCIC-L; estrogen receptor-positive breast cancer; growth and migration; apoptosis; mechanisms of inhibition

在女性群体中, 乳腺癌是常见肿瘤, 且存在发病人数逐年增加、人群呈年轻化趋势。现如今在对乳腺癌高发病的病因学方面的研究并不十分透彻, 但从多项研究来看, 人体自身情况和外部环境影响其发病。乳腺癌有雌激素受体阴性和阳性的乳腺癌类型, 它们的发病机制和治疗药物大不相同^[1], 针对两种不同癌症需求给以相应临床治疗的方法和药物。然而, 现阶段上市药物仍缺少疗效优、副作用低的靶向药物。

本实验室前期以增强茶氨酸的脂溶性为目的, 进行化学结构修饰, 获得了它的衍生物 TCIC, 且证实它具有抗癌的药理活性^[2-3]。但是, TCIC 抑制 MCF-7 人乳腺癌细胞的生长和迁移及其分子机制还不清楚。为了探究其针对该类型癌症作用的潜力、研发抗癌药物新型制剂, 本研究进一步将 TCIC 原料药以薄膜分散法制备成纳米脂质体 TCIC-L, 在此基础上探索它对 MCF-7 细胞生长和迁移的抑制作用与其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基和 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的链霉素均购自美国 Hyclone 公司; 紫杉醇脂质体 (P-L) 购自烟台毓璜顶医院; NF- κ B 抑制剂 Bay、PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002 (Ly)、BCA 工作液、台盼兰染色液、MTT (四甲基偶氮唑盐)、Propidium Iodide (PI) 和 Annexin V-FITC (购自碧云天); Met (肝细胞生长因子受体)、VEGFR2 (血管内皮细胞生长因子受体 2)、Akt (蛋白激酶 B)、NF- κ B (核转录因子)、Bax (B 淋巴细胞瘤-2 基因)、Bcl-2 (促凋亡蛋白)、GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、ER- α (雌激素受体) 抗体、Caspase-3 (半胱氨酸蛋白酶-3)、Cyclin D1 (细胞周期蛋白)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠/兔、ECL plus 发光试剂盒购自美国 Cell Signaling Technology Inc. 公司; 所用试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 3111 型二氧化碳培养箱 (Thermo 公司); TE2000-U 倒置荧光显微镜 (Nikon 公司); 小型垂直电泳槽、电转移槽 (BIO-RAD 公司); SynergyHT Bio-tek 多功能酶标仪 (BIO-RAD 公司); 离心机 (Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7 (购自中科院北京肿瘤研究所) 置于培养液 (DMEM:FBS:青霉素链霉素=100:10:1) 中, 常规 (37°C 、5% CO_2 饱和湿度) 培养下细胞贴壁, 到对数生长期时用于实验。

1.2.2 TCIC-L 的制备处方优化 采用薄膜分散法制备^[4-5]。称取卵磷脂、胆固醇、茶氯香酰胺 (化学结构式如图 1 所示) 原料药适量放入旋蒸瓶, 加入适量氯仿, 减压蒸发, 有机试剂旋蒸结束后得均匀薄膜层。低温放置一段时间后, 加入一定量生理盐水在磁力搅拌下水化, 水化后超声得到乳白色脂质体混悬液。其优化的处方如表 1、2、3 和 4 所示 (单因素考察)。以最佳优化处方配制 TCIC-L 溶液用于实验。

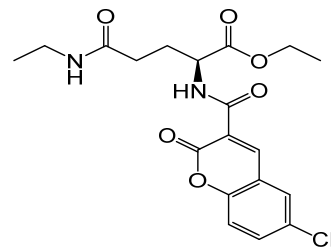


图 1 茶氯香酰胺的化学结构式
Figure 1 Chemical structure of TCIC

1.2.3 MTT 法检测 TCIC-L 对 MCF-7 细胞体外生长的抑制作用 参考已报道的方法^[6-7], 取处于对数生长期的 MCF-7 细胞, 将其制备成浓度为 2×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液并接种于 96 孔板上, $100 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 。实验分为 7 组, 每组设平行 3 孔, 分别为空白对照 (溶媒) 组、TCIC-L ($16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、TCIC-L ($64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、TCIC-L ($125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、TCIC-L ($250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、P-L 组 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 次日按组给药。在常规 CO_2 培养箱培养 48 h 和 72 h 后, 加入 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT, 继续培养 4 h 后轻轻弃去上清液。每孔加 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 摇床上震荡 15 min 后, 用酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度 (参考波长 630 nm), 细胞相对生长率 = 药物组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell chamber 法检测 TCIC-L 对 MCF-7 细胞迁移的抑制作用 将 Transwell 小室置于 24 孔板内, 按 $50 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 将 Fibronectin 均匀地铺在小室底部 (不要有气泡), 37°C 条件下孵育 2 h 后于超净

工作台中风干。将已饥饿培养 24 h 的细胞收集起来, 上室加入 200 μL ($5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$) 细胞悬浮液同时加入浓度为 16、250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 和 75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ly、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bay, 下室加入 660 μL 含有 10% FBS 的 DMEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h。弃去培养液后洗涤, 加入 70% 冷甲醇, 固定风干。PI 染色 1 h, 去除上室没有迁移的细胞, 在显微镜 ($\times 200$) 下均匀选取 5 个视野计算迁移的细胞数目, 求算平均值, 每组设 3 孔。细胞迁移率 (%) = 用药组迁移细胞数/对照组迁移细胞数 $\times 100\%$

1.2.5 FCM 检测 TCIC-L 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 细胞接种于 6 孔板中。常规培养 24 h 后加药。分为对照组 (溶媒组), 16、250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 组及 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 P-L 组。继续培养 48 h 后, 用 0.25% 不含 EDTA 胰酶消化并收集细胞, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 除去上清液, 用预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5~10 min, 加入 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞。然后加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀, 避光, 室温孵育 15 min; 上机前 5 min 加入 5 μL 的 PI 染液进行染色, 再补加 200 μL 的 PBS。

1.2.6 蛋白印迹法检测 TCIC-L 对 MCF-7 细胞中相关蛋白表达影响 参考已经报道的方法^[6-7], 收集经 16、250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 TCIC-L、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bay 和 75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ly 处理了 48 h 的 MCF-7 细胞, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min 后, 弃去上清, 根据细胞数量加入适量含有 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PMSF 的 RIPA 裂解液, 裂解完成后低温下超声破碎, 用 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件

下的离心机离心 6 min, 取上清液用 BCA 法检测每组细胞浓度。根据所测浓度每组取 50 μg 蛋白, 经处理后用以上样, 采用 15% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离不同分子量的蛋白, 电泳结束后将胶上蛋白转印至 PVDF 膜, 膜与 7% 脱脂奶粉在摇床上共封 2 h, TBST 洗涤 3 次, 室温条件下与 1:1 000 稀释的一抗共孵 1 h, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日取出膜洗涤 3 次, 与二抗共孵 1 h, 继续洗涤 3 次。ECL Plus 显色, 再依次将膜置于显影液和定影液, 灰度扫描, 使用 Quantity One 分析软件测定平均吸光度。

1.3 统计学处理

以上所述各项实验均重复 3 次以上, 采用 SPSS 16.0 统计学软件对所有实验结果进行分析, 计算数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 ANOVA 和 Bonferroni test 检验, 以 $P < 0.5$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 TCIC-L 制备处方的单因素考察

2.1.1 磷脂与胆固醇的质量比对 TCIC-L 包封率的影响 处方中其他因素不变, 磷脂与胆固醇质量比分别为 8:1、10:1、12:1 制备脂质体。结果表明 (表 1), 当磷脂与胆固醇质量比增加时, 药物包封率先增加后减少, 同时考虑到载药量的因素, 所以磷脂与胆固醇的质量比选 10:1。

2.1.2 脂药比对 TCIC-L 包封率的影响 处方中其他因素不变, 当 TCIC 投入量增大时, 药物包封率和载药量先增加后减少, 所以 TCIC 用量为 20 mg (见表 2)。

表 1 磷脂与胆固醇质量比对 TCIC-L 包封率及粒径的影响

Table 1 Entrapment and particle size of TCIC-L by different amounts of phospholipids and cholesterol

磷脂:胆固醇 Phospholipid cholesterol	粒径/nm Particle size	包封率/% Entrapment efficiency	载药量/% Drug-loading rate
8:1	206.3 \pm 3.50	54.34 \pm 1.35	2.63 \pm 0.75
10:1	153.1 \pm 3.32	78.57 \pm 0.72	5.75 \pm 0.24
12:1	145.7 \pm 2.36	65.64 \pm 0.69	2.48 \pm 0.19

表 2 脂药比对 TCIC-L 包封率及粒径的影响

Table 2 Entrapment efficiency and particle size of TCIC-L by different amounts of TCIC-L

磷脂/mg Phospholipid	TCIC/mg	粒径/nm Particle size	包封率/% Entrapment efficiency	载药量/% Drug-loading rate
100	15	202.1 \pm 8.90	64.17 \pm 1.93	2.75 \pm 0.13
100	20	396.5 \pm 7.66	76.08 \pm 2.36	3.92 \pm 0.06
100	25	569.3 \pm 8.71	64.91 \pm 5.98	2.74 \pm 0.08

2.1.3 有机相用量对 TCIC-L 包封率的影响 固定处方中其他因素不变, 所得脂质体的包封率和载药量随有机量增加而减小, 同时要考虑到粒径因素,

所以有机用量选择 10 mL (见表 3)。

2.1.4 水相用量对 TCIC-L 包封率的影响 处方中其他因素不变, 水相用量分别为 10、15 和 20 mL,

测定 TCIC-L 的包封率。结果表明 (见表 4), 水相体积增大时, TCIC-L 的包封率和载药量先增加后减

少, 同时考虑到粒径和载药量的因素, 所以水相用量选择 15 mL。

表 3 有机相用量对 TCIC-L 包封率及粒径的影响

Table 3 Entrapment efficiency and particle size of TCIC-L by different amounts of organic solvent

氯仿用量/mL Amount of chloroform	粒径/nm Particle size	包封率/% Entrapment efficiency	载药量/% Drug-loading rate
10	194.3±3.50	66.26±1.97	3.93±0.05
15	182.6±6.50	49.75±1.16	1.89±0.13
20	190.1±7.93	44.18±1.29	1.36±0.10

表 4 水相用量对 TCIC-L 包封率及粒径的影响

Table 4 Entrapment efficiency and particle size of TCIC-L by different amounts of water

水相用量/mL Amount of water	粒径/nm Particle size	包封率/% Entrapment efficiency	载药量/% Drug-loading rate
10	190.2±6.8	56.12±2.9	3.11±0.10
15	134.9±8.7	72.48±1.7	5.01±0.16
20	136.8±4.3	58.62±0.9	2.42±0.34

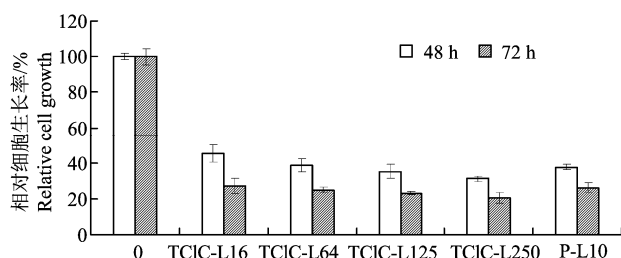


图 2 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响 (* $P<0.05$)
Figure 2 Effects of TCIC-L on the growth of MCF-7 cells (* $P<0.05$)

由上述单因素考察结果可得, 制备 TCIC-L 的最佳配方为: 磷脂、胆固醇、磷脂、磷脂和生理盐水的用量分别为 100 g、10 g、20 g、10 mL 和 15 mL。

2.2 TCIC-L 对乳腺癌 MCF-7 细胞生长抑制作用

MTT 结果显示 (图 2): TCIC-L 表现出抑制 MCF-7 细胞生长的作用, 细胞相对生长率随着 TCIC-L 浓度的增加而减少。16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 在 48 h 和 72 h 对 MCF-7 细胞的抑制率就分别达到了 54% 和 73%, 与阳性药 P-L 的抑制作用相近。

2.3 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移的影响

如图 3 和图 4 所示, TCIC-L 对 MCF-7 细胞的迁移与阴性对照有显著性抑制作用 (** $P<0.01$)。高低浓度 TCIC-L 的迁移抑制率分别是 75% 和 40%, Bay 和 Ly 的抑制率分别是 59% 和 50%。

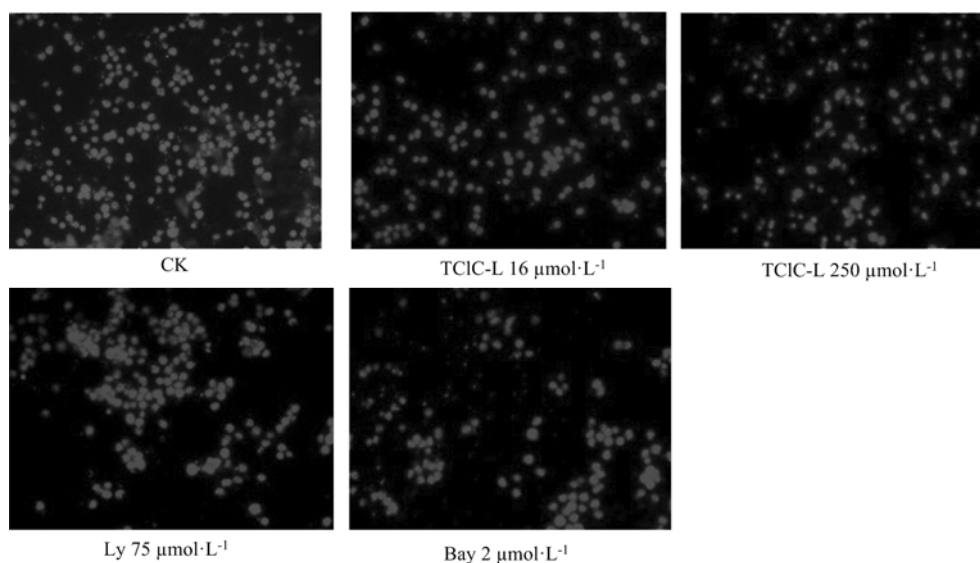
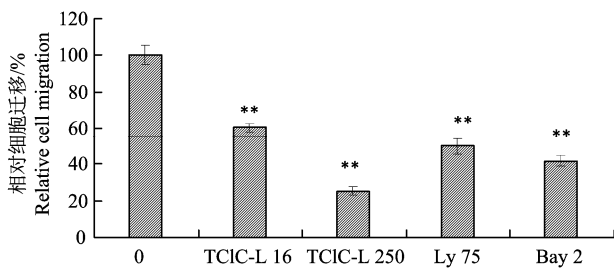


图 3 TCIC-L 对 MCF-7 细胞迁移的影响 ($\times 200$)

Figure 3 Effects of TCIC-L on migration of human breast cancer MCF-7 cells ($\times 200$)



($\bar{x} \pm SD, n=3$, 与对照组相比: $**P < 0.01$,)
 ($\bar{X} \pm SD, n=3, **P < 0.01$, vs. control group)

图 4 TCIC-L 对 MCF-7 细胞迁移的影响

Figure 4 Effects of TCIC-L on migration of MCF-7 cells

2.4 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响

本实验采用 FCM 检测并分析了 TCIC-L 对 MCF-7 细胞凋亡的影响及凋亡百分数(图 5 和图 6)。早期凋亡细胞(右下)和晚期凋亡细胞(右上)是主要的实验考察对象。结果表明, 给以 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 P-L 和 $16、250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCIC-L 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 均出现了细胞凋亡, 且 TCIC-L250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果更加显著。由图 6 可以看出, $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCIC-L 能使 65% 的细胞发生凋亡, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 P-L 作用后的细胞凋亡比例为 60%。

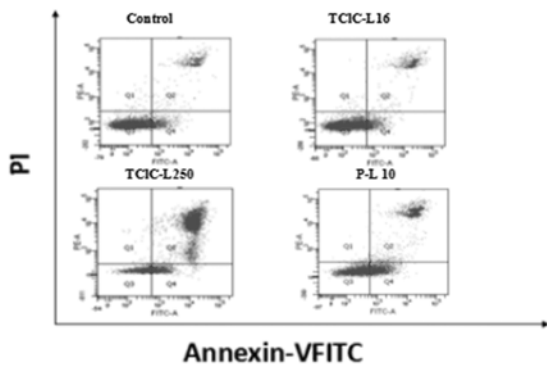
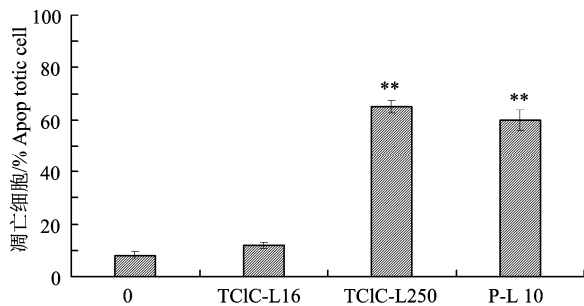


图 5 TCIC-L 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Figure 5 Effects of TCIC-L on cell apoptosis of MCF-7 cells



$\bar{x} \pm SD, n=3$, 与对照组相比: $**P < 0.01$
 $\bar{x} \pm SD, n=3, **P < 0.01$ vs. control group

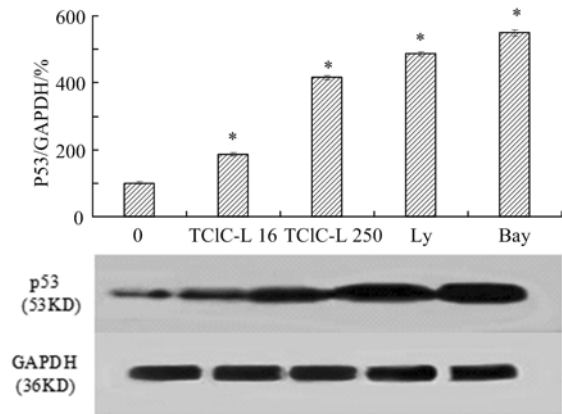
图 6 TCIC-L 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响

Figure 6 Effects of TCIC-L on apoptotic rate in MCF-7 cells

2.5 TCIC-L 对 MCF-7 细胞系中生长和凋亡相关蛋白表达的影响

2.5.1 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 p53 蛋白表达的影响

TCIC-L 作用细胞 48 h 后可使 p53 蛋白表达量增加, $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 分别上调了 4.1 和 1.8 倍。Ly、Bay 对 p53 蛋白表达增加了 4.8 和 5.5 倍(见图 7)。



$\bar{X} \pm SD, n=3; (*P < 0.05)$ 。下同
 $\bar{X} \pm SD, n=3; (*P < 0.05)$. The same below

图 7 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 p53 蛋白表达影响
 Figure 7 Effects of TCIC-L on the p53 protein expression in MCF-7 cells

2.5.2 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 p21 蛋白表达的影响

TCIC-L 可增加 p21 蛋白表达, 高低浓度分别上调了 2.7 和 1.8 倍。2 和 $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bay 和 Ly 也增加 p21 蛋白表达量, 分别上调了 3.5 和 3 倍(见图 8)。

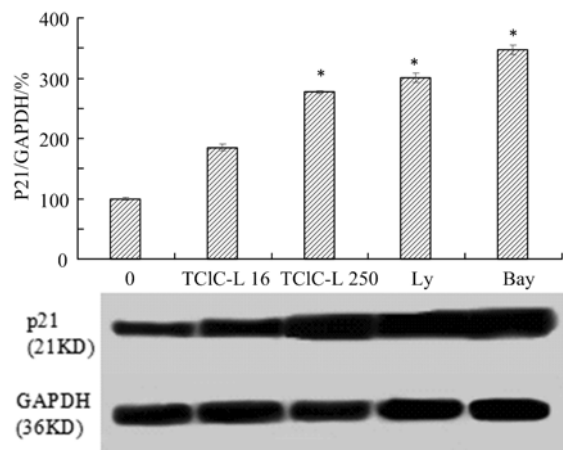


图 8 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 p21 蛋白表达影响
 Figure 8 Effects of TCIC-L on the p21 protein expression in MCF-7 cells

2.5.3 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响

TCIC-L 作用细胞 48 h 后可显著下调 Cyclin

D1 蛋白的表达, 高低剂量抑制率分别为 58% 和 28% (见图 9)。阳性药 Bay 和 Ly 对 Cyclin D1 蛋白表达的抑制率分别是 82% 和 77%。

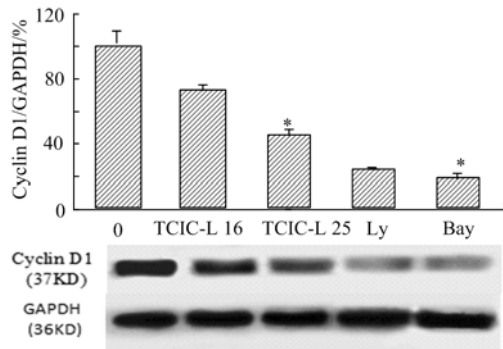


图 9 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响

Figure 9 Effects of TCIC-L on Cyclin D1 protein expression in MCF-7 cells

2.5.4 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 由图 10 可知, TCIC-L 作用 MCF-7 细胞 48 h 后 Bcl-2 的表达量减少、Bax 的表达量增加, 导致 Bcl-2 与 Bax 的比值下降。高低剂量 TCIC-L 的 Bcl-2/Bax 下调率分别为 80% 和 66%。阳性药物 Bay 和 Ly 的下调率分别为 77% 和 76%。

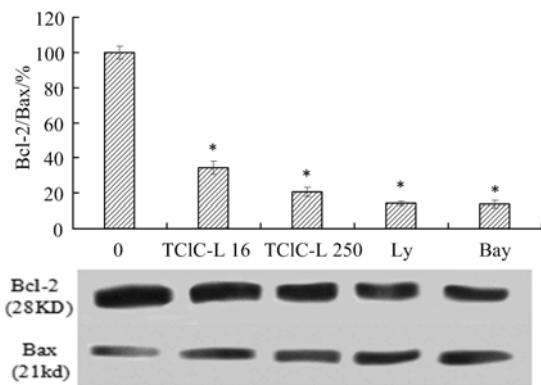


图 10 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

Figure 10 Effects of TCIC-L on the Bcl-2 and Bax protein expression in MCF-7 cells

2.5.5 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 如图 11 所示, 高低浓度 TCIC-L 作用细胞 48 h 后可显著上调 Caspase-3 蛋白的表达, 分别上调了 3.7 和 1.6 倍。阳性对照药物 Bay 和 Ly 对 Caspase-3 蛋白表达量也表现为上调作用, 两者均上调了 6 倍以上。

2.5.6 TCIC-L 对 MCF-7 细胞受体 VEGFR2 蛋白表达的影响 由图 12 可知, TCIC-L 作用 MCF-7 细胞

48 h 后可下调 VEGFR2 受体磷酸化 p-VEGFR2 蛋白的表达水平, 高低浓度抑制率分别为 52% 和 30%。阳性药物 Bay 和 Ly 的抑制率分别为 39% 和 75%。

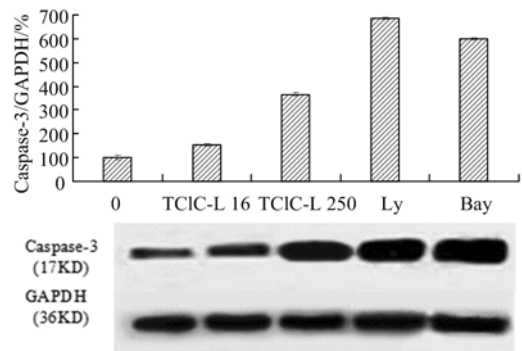


图 11 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3 酶蛋白表达的影响

Figure 11 Effects of TCIC-L on the Caspase-3 protein expression in MCF-7 cells

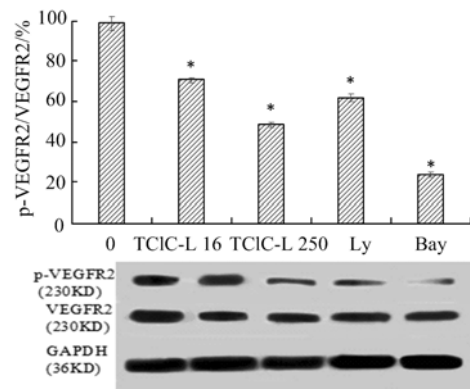


图 12 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞受体 VEGFR2 蛋白磷酸化 (p-VEGFR2) 的影响

Figure 12 Effects of TCIC-L on the receptor VEGFR2 protein phosphorylation in MCF-7 cells

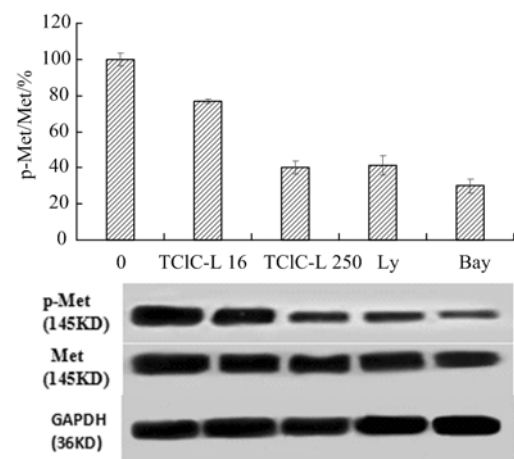


图 13 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞受体 Met 蛋白表达及磷酸化 (p-Met) 的影响

Figure 13 Effects of TCIC-L on the receptor Met protein expression and phosphorylation in MCF-7 cells

2.5.7 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 Met 蛋白表达的影响

由图 13 可知, TCIC-L 作用 MCF-7 细胞 48 h 后可下调 Met 及 p-Met 蛋白表达水平, 高低浓度抑制率分别为 60%和 23%, 阳性药物 Bay 和 Ly 的抑制率分别为 70%和 59%。

2.5.8 TCIC-L 对 MCF-7 细胞受体 ER- α 蛋白表达的影响

如图 14 所示, 不同浓度 TCIC-L 作用细胞 48 h 后可显著下调雌激素受体 ER- α 蛋白的表达, 高低剂量对蛋白表达抑制率分别为 54%和 24%。阳性药物 Bay 和 Ly 对 ER- α 受体蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 其抑制率分别是 85%和 75%。

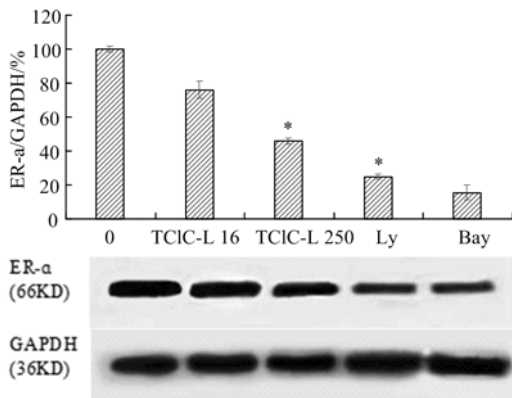


图 14 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞雌激素受体 ER- α 蛋白表达的影响

Figure 14 Effects of TCIC-L on the receptor ER- α protein expression in MCF-7 cells

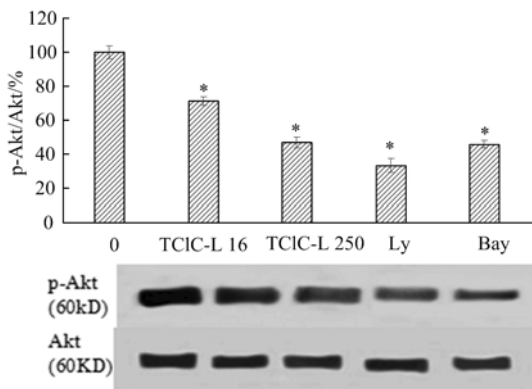


图 15 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Akt 激酶蛋白磷酸化水平 (p-Akt) 的影响

Figure 15 Effects of TCIC-L on the Akt protein phosphorylation in MCF-7 cells

2.5.9 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 Akt 蛋白表达的影响

由图 15 可知, TCIC-L 作用 MCF-7 细胞 48 h 后可下调激酶 Akt 蛋白磷酸化 p-Akt 的表达水平, 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 抑制率分别为 53%和 29%。阳性药物 Bay 和 Ly 的抑制率分别为 54%和 67%。

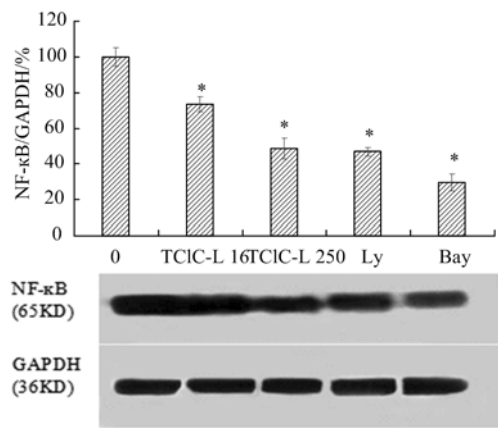


图 16 TCIC-L 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

Figure 16 Effects of TCIC-L on the NF- κ B protein expression in MCF-7 cells

2.5.10 TCIC-L 对 MCF-7 细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 16 所示, 250 和 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 明显抑制核蛋白转录因子 NF- κ B 的表达, 抑制率分别为 51%和 27%。2 和 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Bay 和 Ly 的抑制率分别是 71%和 54%。

3 讨论与结论

采用制备脂质体最常用和最基本的方法——薄膜分散法^[8]。本实验室合成的 TCIC-L 放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下外观和包封率均较稳定, 在实验期间没有发生变化, 并且对 MCF-7 乳腺癌细胞生长表现出显著的压制作用, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TCIC-L 在 48 h 和 72 h 的压制率均超过 50%, 72 h 甚至达到了 75%。与阳性对照、临床治疗乳腺癌的 P-L 比较, 显示了类似的抑制乳腺癌细胞生长的作用效果。但紫杉醇在临床治疗显示了一定的毒副作用。

细胞凋亡与细胞增殖、分化处于动态平衡, 此平衡可维持机体稳态, 如果失调可导致肿瘤的发生。本实验采用 FCM 检测细胞的凋亡^[9], 根据荧光双染色凋亡细胞的特点, 用以下方式来判断实验结果: 活细胞为 Annexin V⁻/PI⁻, 早期凋亡细胞为 Annexin V⁺/PI⁻, 而晚期凋亡细胞、坏死细胞均呈现双阳性 (Annexin V⁺/PI⁺)。由实验结果可知: TCIC-L 作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞出现凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。TCIC-L250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抑制作用与阳性对照药 P-L 效果相当。

随着分子生物技术的提高, 许多科研人员不仅证实了肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡能力下降有关, 还发现细胞中蛋白异常表达也起着重要的作用。

p53 是一种重要的凋亡诱导蛋白, 正常情况下可抑制细胞的生长、修复受损 DNA, 调节细胞的分化与衰老^[10], 大量的凋亡因子是依赖 p53 激活调节细胞凋亡的。有研究发现 p53 对 p21 基因的转录和蛋白合成有诱导作用, 而 p21 与肿瘤的分化、浸润程度、增生和转移有关, 其表达量与肿瘤的恶性行为一致^[11]。正常的细胞周期由 G1、S、G2 和 M 期组成。Cyclin D1 是细胞周期重要的调控因子, 与 CDKs 结合后, 细胞由 G1 期进入 S 期, 进入自主分裂程序。当 Cyclin D1 表达量增大时, G1/S 期变短, 细胞出现失控性生长, 细胞癌性转化率增高^[12]。有研究指出, p53 与 Cyclin D1 之间的关系复杂, 一方面, p53 基因可作用 p21 基因而上调 Cyclin D1 表达, 另一方面, Cyclin D1 又可影响 Survivin 的表达而抑制 p53 诱导细胞的凋亡^[13-14]。两者的作用机制还需进一步的了解。本实验所用的 TCIC-L 可上调 p21、p53 蛋白表达, 降低 Cyclin D1 蛋白的表达, 表明药物具有抑制肿瘤发生和恶化的潜力。

Bax 和 Bcl-2 基因分别促进凋亡信号的传导和直接抑制细胞的凋亡而发挥调控作用^[15]。Bax 量的多少影响其结合形式, 当细胞内 Bax 较多时, Bax 自身相结合, 其更容易诱导凋亡的发生; 而 Bax 较少时, Bax 和 Bcl-2 相结合拮抗 Bcl-2 的作用, Bax 促凋亡作用增强^[16]。因此, 在一定程度上两者的比值大小可映射细胞是否发生凋亡以及凋亡程度^[17-18]。在线粒体凋亡途径中, Bax/Bcl-2 比值增大可增大线粒体膜的通透性, 释放的细胞色素 C 先激活 Caspase-9, 最后激活 Caspase-3^[19], Caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族中重要的成员。它被早期凋亡的细胞激活后, 促进生成的凋亡小体又可导致细胞发生凋亡。另有研究证实, caspase-3 蛋白的低表达有助于肿瘤的进一步发生和发展^[20-21]。本实验结果显示: TCIC-L 作用细胞一定时间后可明显增加 Bax/Bcl-2 的比例, 级联激活 Caspase-3 的表达, 经线粒体途径促进肿瘤的凋亡, 这可能是药物发挥作用的靶点之一。

VEGF 可促进新生血管的形成, 增加内皮细胞的通透性, 对肿瘤生长和迁移起到促进作用^[15]。VEGF-VEGFR2 信号转导通路在肿瘤周围血管的生成过程中起主要作用, 阻断该信号通路, 便能在很大程度上抑制肿瘤的生长、迁移和转移^[23]。本实验结果表明: TCIC-L 能抑制 VEGFR2 的表达, 这与之前的研究成果不谋而合, 可能会是抑制肿瘤的生长和迁移的重要机制之一。

乳腺癌属于激素依赖性肿瘤, 体内雌激素水平

增高可促进雌激素受体阳性乳腺癌上皮细胞的增生和分化^[24], 而雌激素受体是雌激素发挥作用的途径。大多数肿瘤患者是雌激素阳性表达, 这类患者病情发展慢, 恶性化低、复发相对较少, 采用内分泌治疗效果较好, 因此, ER- α 被认为是乳腺癌组织中的一个重要的诊断和预测因子^[25]。本实验所用 TCIC-L 显著下调 ER- α 表达, 抑制 MCF-7 细胞的生长, 促进凋亡。

Akt (苏氨酸/丝氨酸激酶) 是 PI3K 下游主要的效应分子之一, 是一类比较重要的中枢效应蛋白, 可维持细胞的正常生理功能, 还参与了细胞的生长、凋亡及迁移过程^[26]。经磷脂酰肌醇-3 活化后, 发挥促进细胞生长增殖、转移, 提高细胞缺氧耐受性的作用。另有研究证明, 活化的 Akt 可通过直接磷酸化 NF- κ B 抑制性辅助因子激酶 IKK α 而激活 NF- κ B, 或者通过磷酸化 p65 的 Ser-529 或 Ser-536 位点而激活 NF- κ B^[27]。在正常情况下 NF- κ B 以同源或异源二聚体形式存在。在静息细胞中, NF- κ B 二聚体通过非共价键的形式与其抑制蛋白 I κ B 结合而分散在细胞质内, 激活后的 NF- κ B 转位至细胞核, 促进肿瘤细胞的生长、抵抗细胞的凋亡^[28-29]。TCIC-L 能抑制 Akt 磷酸化和 NF- κ B 的表达, 提示影响 Akt/NF- κ B 信号通路可能是抑制 MCF-7 细胞生长、迁移的重要分子机制。

综上所述, TCIC-L 能有效抑制雌激素受体阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞生长、迁移, 同时对细胞的凋亡表现促进作用。其作用机制可能与诱导 MCF-7 细胞凋亡, 影响信号传导通路蛋白表达有关, 这其中涉及到一些重要的酶和蛋白表达如下调 p-VEGFR2、Met 和 ER- α 、Bcl-2、Akt、NF- κ B、Cyclin D1 蛋白表达, 上调 p53、p21、Caspase-3 和 Bax。本研究通过制备纳米脂质体、改变药物剂型增加了药物疗效, 为新型抗肿瘤药物开发提供了有价值的科学依据。

参考文献:

- [1] LUMACHI F, SANTEUFEMIA D A, BASSO S M M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer[J]. World J Biol Chem, 2015, 6(3): 231-239.
- [2] LI M J, YIN Y C, WANG J, et al. Green tea compounds in breast cancer prevention and treatment.[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(3): 520-528.
- [3] 吴菲, 田绘绘, 季德鑫, 等. 茶氨酸和其衍生物茶氨酸氯香酰胺对高转移的乳腺癌细胞生长的抑制作用[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(6): 911-916.
- [4] 陈浩, 戴俊东, 王玉蓉, 等. 薄膜超声法制备槲皮素脂

- 质体研究[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(1): 32-34.
- [5] MOHAMMED A R, WESTON N, COOMBES A G, et al. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability[J]. *Int J Pharm*, 2004, 285(1): 23-34.
- [6] ZHANG G, LI Z, WAN X, et al. Repression of human hepatocellular carcinoma growth by regulating Met/EGFR/VEGFR-Akt/NF- κ B pathways with theanine and its derivative, (*R*)-2-(6,8-Dibromo-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamido)-5-(ethylamino)-5-oxopentanoic ethyl ester (DTBrC) [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(37): 7002-7013
- [7] ZHANG G, YE X, JI D, et al. Inhibition of lung tumor growth by targeting EGFR/VEGFR-Akt/NF- κ B pathways with novel theanine derivatives[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18): 8528.
- [8] 田菊霞, 解宇, 杨艳宏. 薄膜分散-超声法制备 BMPs 磁性脂质体[J]. *健康研究*, 2012, 32(1): 1-3.
- [9] 刘莉, 张军, 方超平, 等. 一种流式细胞仪同时检测多个凋亡参数的方法[J]. *重庆医学*, 2004, 33(10): 1562-1564.
- [10] 蓝婷, 吴燕, 陈永昌. PKG II 对乳腺癌 MCF-7 细胞株中抑癌基因蛋白表达的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2016, 26(3): 212-214.
- [11] PARVATHY M, SREEJA S, KUMAR R, et al. Potential role of p21 Activated Kinase 1 (PAK1) in the invasion and motility of oral cancer cells[J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 293.
- [12] WU W, LIU Q, LIU Y, et al. Dixdc1 targets CyclinD1 and p21 via PI3K pathway activation to promote Schwann cell proliferation after sciatic nerve crush[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2016, 478(2): 956.
- [13] 马晓钰. p53 与 CyclinD1 蛋白表达和食管癌临床特征及预后的关系[D]. 石家庄:河北医科大学, 2013.
- [14] 王玉兰, 杜经丽, 石怀银, 等. cyclin D1, p21^{WAF1}, pS3 及 Ki-67 在肝细胞癌中的表达及与预后的关系[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(1): 20-24.
- [15] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. Bcl-2 /bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(16): 1658-1659.
- [16] CHENG X, HUNG M C. Breast cancer brain metastases[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3/4): 635-43.
- [17] LIN B, LI D, ZHANG L. Oxymatrine mediates Bax and Bcl-2 expression in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *Pharmazie*, 2016, 71(3): 154-157.
- [18] 陈意生, 史景泉. 肿瘤分子细胞生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002:50-79.
- [19] LIANG S, SUN K, YUE W, et al. Role of Cyt-C/caspases-9,3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid[J]. *Chem-Biol Interact*, 2016, 258:40.
- [20] YU J, ZHENG G, LIU C, et al. Dracorhodin perchlorate induced human breast cancer MCF-7 apoptosis through mitochondrial pathways[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(9): 1149.
- [21] PU X, STORR S J, ZHANG Y, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(3): 357-368.
- [22] EHRLICHOVÁ M, KOC M, TRUKSA J, et al. Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4215-4224.
- [23] DE GIORGI F, LARTIGUE L, BAUER M K, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing bax translocation and multimerization[J]. *FASEB J*, 2002, 16(6): 607-609.
- [24] 徐绮赋, 王鸿彪. 激素受体阳性晚期乳腺癌的内分泌治疗进展[J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(10): 808-811.
- [25] 陈丹芝. β -catenin、CDH1、SHH、ER α 和 Her-2 的表达与乳腺癌发生发展相关性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [26] 廖明娟, 陈红凤. PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂在乳腺癌中的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(3): 230-234.
- [27] XIAO X, YANG G, BAI P, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the tumor growth of ovarian cancer cell line derived from a low-grade papillary serous carcinoma in p53-independent pathway[J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 582.
- [28] LIU B, SUN L, LIU Q, et al. A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis[J]. *Cancer cell*, 2015, 27(3): 370-381.
- [29] 邓元, 张学斌, 王鸿雁, 等. 乳腺癌组织中核转录因子 NF- κ B 和抑癌基因 p53 的表达及其意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(5): 342-344.