

本文引用:黄秉一,徐朝军,宋 岚.原花青素促进三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的作用机制研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1196-1199.

## 原花青素促进三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞 凋亡的作用机制研究

黄秉一<sup>1</sup>,徐朝军<sup>2</sup>,宋 岚<sup>3\*</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院普外科,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学第一附属医院胸心外科,湖南 长沙 410007;  
3.湖南中医药大学医学院生物化学与分子生物学教研室,湖南 长沙 410208)

**〔摘要〕**目的 研究原花青素(Procyanidins, PC)对三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞株增殖及细胞凋亡的作用及其机制。方法 常规培养细胞,24 h后随机分为阳性对照组、对照组和PC10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。MTT法检测细胞生长抑制率;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot法检测FoxA1蛋白及抗凋亡蛋白bcl2、UCP2表达。结果 PC各剂量组均可显著抑制MDA-MB-231细胞增殖( $P<0.05$ );PC(10-160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )剂量依赖性抑制MDA-MB-231细胞增殖( $P<0.05$ ),PC(40-320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )可以时间依赖性抑制细胞增殖( $P<0.05$ );PC320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组各时间点细胞抑制率与PC160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异无显著性( $P>0.05$ );160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PC可以时间依赖性促进MDA-MB-231细胞凋亡( $P<0.05$ );160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PC作用24 h后,FoxA1蛋白表达显著上升( $P<0.05$ ),同时bcl2及UCP2表达降低( $P<0.05$ )。结论 PC抑制MDA-MB-231细胞,促进MDA-MB-231细胞凋亡,升高其FoxA1表达,同时降低bcl2及UCP2表达,表明PC可能通过促进FoxA1表达发挥促进MDA-MB-231细胞凋亡的作用。

**〔关键词〕**原花青素;MDA-MB-231细胞;三阴乳腺癌;FoxA1细胞凋亡

**〔中图分类号〕**R286

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.11.007

### Effect of Procyanidin in Promoting Apoptosis of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines

HUANG Bingyi<sup>1</sup>, XU Zhaojun<sup>2</sup>, SONG Lan<sup>3\*</sup>

(1. General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;  
2. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha,  
Hunan 410007, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hunan University of Chinese Medicine,  
Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕** Objective To study the effect and mechanism of procyanidins (PC) on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell line. Methods The cells were randomly divided into positive control group, control group and PC (10, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) groups. Growth inhibiting rate of MDA-MB-231 cell was detected by MTT assay. Apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of FoxA1 protein and anti apoptotic protein (UCP2 and bcl2) were detected by Western blot. Results Different doses of PC could significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells ( $P<0.05$ ). The inhibition rate of cell growth in the range of 10-160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was dose-dependent ( $P<0.05$ ), and the inhibition rate of cell growth in

**〔收稿日期〕**2016-12-11

**〔基金项目〕**湖南省教育厅课题(13C691)。

**〔作者简介〕**黄秉一,男,副主任医师,主要从事乳腺及腹部外科疾病研究。

**〔通讯作者〕**\*宋 岚,女,副教授,硕士研究生导师,E-mail:344069980@qq.com。

the range of 40–320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was time-dependent ( $P<0.05$ ). However, there was no significant between 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group and 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group in the inhibition rate of cell growth ( $P>0.05$ ). 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PC could promote the apoptosis of MDA-MB-231 cells in the time-dependent ( $P<0.05$ ). The expression of FoxA1 protein significantly increased after 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PC for 24 h ( $P<0.05$ ), while the expression of UCP2 and bcl2 decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PC could promote the apoptosis of MDA-MB-231 cells and decrease the expression of bcl2 and UCP2, which may through promoting the expression of FoxA1.

[**Keywords**] procyanidin; MDA-MB-231 cell; breast cancer; FoxA1; apoptosis

原花青素(procyanidin, PC)是自然界来源丰富的多酚类黄酮植物化合物,由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成。目前在葡萄籽、荔枝壳等多种植物中含量丰富。研究发现,原花青素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、心血管保护等多种功能<sup>[1-5]</sup>。在抗肿瘤方面,近年研究显示,PC可以抑制包括前列腺癌、肺癌在内的多种癌细胞增殖,尤其对化疗药物耐受的一些肿瘤细胞株也有较好的生长抑制效应<sup>[5-7]</sup>。

FoxA1 是翼状螺旋转录因子家族成员之一,在胚胎形成、细胞分化等方面具有重要的功能。研究显示 FoxA1 在乳腺癌的发生发展中也具有重要作用,在不同种类的乳腺癌细胞中,FoxA1 表达程度不一,对导致不同种类乳腺癌细胞对雌激素敏感性以及对现在标准的激素治疗的效果及预后不同<sup>[8-10]</sup>。本实验组前期研究显示原花青素可以调节包括乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株在内的多种细胞 FoxA1 表达。本研究旨在本课题组前期实验基础上观察 PC 对雌激素不敏感型三阴乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响,并初步探讨其是否通过 FoxA1 发挥作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自 ATCC; 胎牛血清购自杭州四季青生物材料公司; RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司; 顺铂(DDP) 购自江苏豪森药业股份有限公司; 胰蛋白酶和 MTT 试剂购自 Sigma 公司; 兔抗人 FoxA1 抗体购自 Abcam 公司; 鼠抗人 B 淋巴细胞瘤-2(bcl2)和解偶联蛋白 2(UCP2)抗体购自 Abcam 公司; GAPDH 及相应二抗抗体、BCA 试剂盒均购自武汉博士德公司。

### 1.2 实验分组

常规培养人三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,取对数生长期细胞,随机分为对照组、阳性对照组(顺铂组)和 PC 组(10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 1.3 MTT 法检测 PC 对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用

对数生长期细胞常规消化洗涤后,以  $1\times 10^5$ /孔接种于 96 孔培养板,置于 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 二氧化碳培养箱培养 24 h 后,按实验分组分别加入生理盐水、顺铂、不同浓度 PC。继续培养,分别于 24 h、48 h、72 h 后收集细胞,按照常规进行 MTT 实验,加入 MTT 后继续培养 4 h,酶标仪测定各孔 570 nm 吸光度值(A570)。计算细胞抑制率,细胞抑制率=[(1-实验组 A570)/对照组 A570]×100%。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

### 1.4 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞凋亡

取对数生长期细胞,按密度  $1\times 10^6$ /瓶接种于 25 mL 细胞培养瓶,置于二氧化碳培养箱 24 h 后加入 PC,使其终浓度分别为 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。并按前述实验分组设置阳性对照组(顺铂组)和对照组。继续培养 48 h 后弃去培养液, pH7.4 PBS 漂洗细胞, 70%酒精固定, -20°C 孵育 2 h 以上, 250 g 离心 5 min 收集细胞。细胞重悬于 1 mL PBS 中,室温放置 10 min, 250g 离心 5 min 后细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  PBS (含 0.2% RNase A), 37 °C 孵育 30 min。4 °C 20 g/L 碘化丙啶染色 30 min, 上机检测细胞凋亡率。

### 1.5 Western-blot 检测相关蛋白表达

取对数生长期细胞,按密度  $1\times 10^6$ /瓶接种于 25 mL 细胞培养瓶,置于二氧化碳培养箱 24 h 后加入 PC,使其终浓度分别为 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。于预设时间点收集细胞,加入细胞裂解液,离心后收集上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白质与上样缓冲液混合后煮沸 10 min。20  $\mu\text{g}$ /孔上样, 12%SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,转膜后 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入相应一抗,室温孵育 4 h 后洗涤 3 次,加入相应二抗室温孵育 30 min 后 DAB 显色。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据经正态性检验后和方差齐性检验后,采

用单因素方差分析,两两比较采用LSD法或Tamhane's法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 PC对MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用

实验结果显示,PC不同实验浓度组与对照组比较,MDA-MB-231细胞抑制率明显提高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );PC10、20、40、80、160  $\mu\text{g/mL}$ 组同一时间点不同剂量的PC作用于细胞后,随PC浓度增高,细胞生长抑制率与前一较低浓度比较亦明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );PC40、80、160、320  $\mu\text{g/mL}$ 组对细胞增殖的抑制作用随着时间增长而升高,具有时间依赖性( $P<0.05$ );但是320  $\mu\text{g/mL}$ 的PC作用于细胞后细胞各时间点细胞抑制率与160  $\mu\text{g/mL}$ 组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。故后续实验PC浓度采用160  $\mu\text{g/mL}$ 展开。见表1。

表1 PC对MDA-MB231细胞增殖的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞生长抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	1.5±0.09	2.1±0.02	2.4±0.02
PC 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	23.6±1.24*	25.3±1.17*	26.8±1.45*
PC 20 $\mu\text{g/mL}$ 组	30.4±1.72**	32.1±1.41**	35.2±1.27**
PC 40 $\mu\text{g/mL}$ 组	35.3±1.66**	39.6±1.38** $\Delta$	45.3±2.15** $\Delta$
PC 80 $\mu\text{g/mL}$ 组	40.1±2.31**	45.2±2.65** $\Delta$	50.5±1.91** $\Delta$
PC 160 $\mu\text{g/mL}$ 组	44.6±1.87**	50.1±2.50** $\Delta$	54.2±3.16** $\Delta$
PC 320 $\mu\text{g/mL}$ 组	45.1±1.53*	51.4±1.82** $\Delta$	55.0±1.27** $\Delta$
顺铂组	51.2±1.33*	52.9±2.41*	54.8±1.73*

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;同一时间点PC组与前一低浓度比较,# $P<0.05$ ;同一PC组与前一时间点比较, $\Delta P<0.05$ 。

### 2.2 160 $\mu\text{g/mL}$ PC对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

采用160  $\mu\text{g/mL}$ 的PC与MDA-MB-231细胞孵育24 h、48 h和72 h后采用流式细胞术检测细胞凋亡,结果显示:与对照组比较PC160  $\mu\text{g/mL}$ 组和顺铂组细胞凋亡率显著上升,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。随PC作用时间延长,细胞凋亡率亦上升,具有时间依赖性( $P<0.05$ )。见表2。

表2 160  $\mu\text{g/mL}$  PC对MDA-MB231细胞凋亡的影响

组别	(% , $n=3, \bar{x} \pm s$ )		
	24 h	48 h	72 h
对照组	1.46±0.04	1.85±0.03	2.69±0.05
PC160 $\mu\text{g/mL}$ 组	20.32±2.51*	38.01±2.01**	60.57±2.18**
顺铂组	25.17±1.39*	38.95±1.26**	65.16±1.94**

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与同组前一时间点比较,# $P<0.05$ 。

### 2.3 160 $\mu\text{g/mL}$ PC对MDA-MB-231细胞FoxA1、bcl2和ucp2表达的影响

采用western-blot检测MDA-MB-231细胞FoxA1、bcl2和ucp2蛋白表达。结果显示:与0 h比较,160  $\mu\text{g/mL}$ 的PC作用于MDA-MB-231细胞后24、48、72 h,FoxA1表达均显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),并且随PC作用时间延长,FoxA1表达上升具有时间依赖性(每一时间点与前一时间点比较, $P<0.05$ );而bcl2和UCP2表达则明显下降,也具有时间依赖性,差异有显著性(与0 h比较 $P<0.05$ ,每一时间点与前一时间点比较, $P<0.05$ )。见图1和表3。

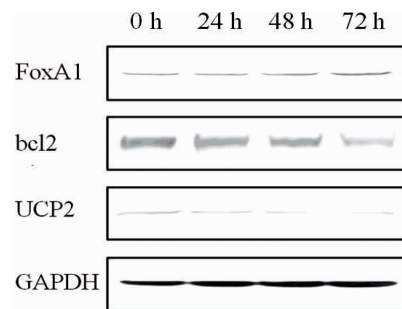


图1 western-blot检测160  $\mu\text{g/mL}$  PC对MDA-MB231细胞FoxA1、bcl2及UCP2蛋白表达的影响

表3 160  $\mu\text{g/mL}$  PC对MDA-MB231细胞FoxA1、bcl2及UCP2蛋白表达的影响(相对灰度值, $n=3, \bar{x} \pm s$ )

	0 h	24 h	48 h	72 h
FoxA1	1.0±0.05	1.34±0.021*	1.87±0.025**	2.31±0.232**
bcl2	1.0±0.03	0.85±0.017*	0.56±0.008**	0.38±0.033**
UCP2	1.0±0.05	0.75±0.092*	0.62±0.073**	0.58±0.054**

注:与0 h比较,\* $P<0.05$ ;与前一时间点比较,# $P<0.05$ 。

## 3 讨论

三阴乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是一种特殊的乳腺癌亚型,TNBC系雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor.2, Her.2)表达均阴性的乳腺癌,侵袭性强、预后差,近年来受到广泛关注。我国TNBC发病率约占乳腺癌的1/4<sup>[1]</sup>。TNBC患者的5年无病生存率(disease free survival, DFS)和总生存率(overall survival, OS)均显著低于非TNBC患者<sup>[2]</sup>。TNBC易复发、易转移、生存率低,在临床治疗中有一定的难度。由于缺乏有效的内分泌治疗及靶向治疗,目前以蒽环类为基础的化疗为主,

但疗效欠佳,容易早期局部复发和远处转移,因此寻找有效的药物治疗是目前亟待解决的问题。

研究显示,原花青素可以通过抗氧化和清除自由基、抗炎、调节 NF- $\kappa$ B 及其目标基因、促进肿瘤细胞凋亡、细胞周期阻滞和抑制血管生成等机制起到抗癌作用。而且体内和体外肿瘤模型实验均证明原花青素对各种肿瘤均有抑制作用<sup>[5-7]</sup>。有研究显示,原花青素可以通过 caspase 途径促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡<sup>[13]</sup>。但是目前尚未见其对 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。

本实验结果表明实验用原花青素能显著抑制 MDA-MB231 细胞增殖,并促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。为探讨研究原花青素诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的机制,课题组检测了 FoxA1 蛋白及凋亡相关蛋白的表达,结果显示原花青素作用 24 小时后 FoxA1 蛋白表达显著上升,而抗凋亡基因 bcl2 及 UCP2 表达降低。以前的研究显示 FoxA1 在多种肿瘤细胞中可以抑制 bcl2 和 UCP2 基因的表达<sup>[14-15]</sup>。因此推测,在 MDA-MB-231 细胞中原花青素可能通过升高 FoxA1 表达并进一步抑制 bcl2 和 UCP2 表达,从而抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,促进其凋亡。详细作用机制还需要离体及在体进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Bagchi D, Garg A, Krohn RL, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95(2):179-189.

[2] Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, et al. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. Atherosclerosis, 1999, 142(1):139-149.

[3] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pi-

nus mariti-ma) bark, pycnogenol[J]. Fre Radic Biol Med, 1999, 27(5/6):704-724.

[4] Dongmo AB, KamanyiA, Anchang MS, et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extracts of Erythrophleum suaveolens (Caesalpiniaceae), Guillemin & Perrottet[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 77(2/3):137-141.

[5] Ye X, Krohn RL, Liu W, et al. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 1999, 196(1-2): 99-108.

[6] 张国瑜,张双林.葡萄籽原花青素诱导人肺癌 A549 细胞凋亡的研究[J].医学临床研究,2012,29(1):91-93.

[7] 韩 炯,李 莹,刘新平,等.葡萄籽提取物原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡[J].中草药,2003,34(8):722-725.

[8] Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range. regulation requiring the forkhead protein FoxA1[J]. Cell, 2005, 122(1):33-43.

[9] Laganier J, Deblois G, Lefebvre CAR. et al. From the cover: location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102(33): 11651-11656.

[10] Lan Song, Zhaojun Xu, Caiping Zhang, et al. Up-regulation of the HSP72 by Foxa1 in MCF-7 human breast cancer cell line [J]. Biochem. Biophys. Res Commun, 2009 (386):30-34.

[11] 袁中玉,王树森,朱美琴,等.不同分子亚型乳腺癌的临床特征和预后[J].中华肿瘤杂志,2008,30(6):456-461.

[12] 洪 雷,魏素菊,马 静,等.501 例三阴乳腺癌患者预后生存因素分析[J].中国卫生统计,2015,32(1):66-67.

[13] 韩 瑞,王明仲,洪学军,等.原花青素通过 Caspase 途径诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡[J].实用药物与临床,2013,16(1):15-17.

[14] Song L, Xu Z, Li L, et al. Forkhead box protein A1 inhibits the expression of uncoupling protein 2 in hydrogen peroxide-induced A549 cell line[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(1): 53-60.

[15] Song L, Wei X, Zhang B, et al. Role of Foxa1 in regulation of bcl2 expression during oxidative-stress-induced apoptosis in A549 type II pneumocytes[J]. Cell Stress Chaperones, 2009, 14 (4):417-425.

(本文编辑 匡静之)