

氧化苦参碱干预 MCF-7 细胞系肿瘤干细胞样细胞生物学行为的实验研究

张 英 祁 鑫 朱小云 许炜茹 裴迎霞 林洪生

摘要 **目的** 研究中药单体氧化苦参碱(oxymatrine, OM)对人乳腺癌细胞系 MCF-7 肿瘤干细胞样细胞生物学行为的干预作用及分子水平作用机制。**方法** 以 MCF-7 为研究对象,采用侧群分选法(side population, SP)分离富集 MCF-7 细胞系肿瘤干细胞样细胞(SP 细胞);MTT 技术检测 SP 细胞和非肿瘤干细胞样细胞(non-side population cells, non-SP 细胞)的增殖特性;以及不同浓度顺铂(cisplatin, DDP)和 OM 对于不同细胞亚群的增殖干预作用;利用流式细胞技术、细胞免疫荧光技术检测细胞中 β -catenin 基因、蛋白表达水平。**结果** (1)不同浓度 OM 对 MCF-7 细胞的不同亚群细胞增殖抑制作用不同,其中对 non-SP 细胞的增殖抑制作用最弱,未分选的细胞次之,对 SP 抑制作用最强;不同浓度 DDP 对 non-SP 的增殖抑制作用最强,未分选的细胞次之,对 SP 细胞抑制作用最弱;(2)浓度为 0.25、0.50、1.00 mg/mL 的 OM 作用 SP 细胞后,其在细胞总数中所占比例分别为 3.1%、1.7%、0.2%;经过 OM 处理过的 SP 细胞磷酸化 β -catenin 表达率为 $(42.62 \pm 2.62)\%$,与未经 OM 处理过 SP 细胞的表达率 $[(22.81 \pm 1.66)\%]$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);(3)与未经 OM 处理过的 SP 细胞比较,经过 OM 处理过的 SP 细胞中 β -catenin 的表达明显减少,而且特异性地分布在细胞膜下,核转位现象明显减少。**结论** OM 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的活性来干预人乳腺癌 MCF-7 细胞系中肿瘤干细胞样细胞的生物学行为。

关键词 肿瘤干细胞样细胞;氧化苦参碱;MCF-7;生物学行为;Wnt/ β -catenin

Oxymatrine Diminished the Side Population and Inhibited Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells ZHANG Ying, QI Xin, ZHU Xiao-yun, XU Wei-ru, PEI Ying-xia, and LIN Hong-sheng Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of oxymatrine (OM) in inhibiting the proliferation and percentage of cancer stem cell like cell of human breast cancer MCF-7 cells, and to study its molecular mechanism. **Methods** MCF-7 cells were taken as subject. Side population cells (SP) of cancer stem cell like cells rich in MCF-7 cells were isolated using side population (SP) method. The proliferation properties of SP cells and non-side population (non-SP) cells were detected by MTT assay. The proliferation and intervention of cisplatin (DDP) and OM at various concentrations were detected as well. The expression levels of β -catenin gene and protein were detected using flow cytometry and immunofluorescence technique. **Results** (1) OM in different concentrations had various inhibitions to the proliferation of subpopulations of MCF-7 cells. Of them, it had weakest inhibition on non-SP cells, weaker inhibition on unsorted cells, and strongest inhibition on SP cells. DDP in different concentrations had strongest inhibition on non-SP cells, weaker inhibition on unsorted cells, and weakest inhibition on SP cells. (2) SP cells accounted for 3.1%, 1.7%, and 0.2% of the total cells after OM acted at 0.25, 0.50, 1.00 mg/mL, respectively. The expression rate of phosphorylated β -catenin was $42.62\% \pm 2.62\%$ after SP cells were acted by OM, with statistical difference as compared with the blank control group $[(22.8\% \pm 1.66\%)]$, $P <$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81473467, No. 81102718);科技部国际合作项目(No. 2013DFA32540)

作者单位:中国中医科学院广安门医院肿瘤科(北京 100053)

通讯作者:张 英, Tel:13311027150, E-mail: zylzy501@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.12.1504

0.01]。(3) Compared with SP cells without OM treatment, the expression of β -catenin in OM treated SP cells was obviously reduced. Besides, they were specifically distributed under the cytomembrane, with nuclear translocation obviously reduced. Conclusion OM could intervene biological behaviors of cancer stem cell like cell of MCF-7 cells possibly through Inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS cancer stem cell like cell; oxymarine; MCF-7; biological behavior; Wnt/ β -catenin

从白血病到实体瘤越来越多的证据表明肿瘤可能是一种干细胞疾病^[1]。肿瘤干细胞概念对传统治疗提出了挑战,既往的治疗只注重减少肿瘤细胞的数量却不能杀灭肿瘤干细胞,从而导致复发转移的发生,这一概念将引导人们从不同的角度去设计抗肿瘤药物,以肿瘤干细胞为靶点,有可能使肿瘤的治疗产生革命性的改变。本课题前期的研究结果发现氧化苦参碱(Oxymatine, OM)对体外培养的人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的生长有明显的抑制作用,可以诱导该细胞的凋亡,而且能下调 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin、cyclinD1、c-myc 等信号分子的表达^[2]。说明 Wnt/ β -catenin 信号通路与肿瘤干细胞样细胞有密不可分的关系^[3],本实验在此基础上续研究 OM 对肿瘤干细胞样细胞的生物学行为的调控作用及在此过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的变化情况。

材料与方法

1 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株(中国医学科学院肿瘤医院免疫实验室钟勇博士馈赠)。

2 试剂及仪器 主要试剂:RPMI-1640 培养粉、DMEM 培养粉(美国 GIBCO 公司);Hoechst33342、碘化丙啶(PI)、维拉帕米(美国 Sigma 公司);alexa 647 耦合的抗磷酸化 β -catenin 抗体(BD™ Phos-flow);TRITC 耦合的兔抗鼠 IgG1、鼠抗人纯化 β -catenin (BD™-610154a)。mRNA 引物由北京赛百盛生物技术公司合成。蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。OM(中国药品生物制品检定所,批号:110780-200004)。主要仪器:多功能酶标仪(SIAFRT SYNERGYHT,美国 BIO-TEK);流式细胞仪(FACS Aria Flow Cytometer System,美国 BD);荧光定量 PCR 仪(ABI 7500,美国 ABI);全自动电泳系统(Agilent 2100,美国 Agilent);Chemi-Doc XRS 凝胶分析系统(美国 Bio-Rad);荧光倒置显微镜(TE2000-u,日本,尼康公司)。

3 方法

3.1 细胞染色和侧群细胞分析 利用流式细胞仪技术进行侧群细胞分析,即分选得到侧群细胞(side

population cells, SP)亚群细胞、非侧群细胞(non-side population cells, non-SP)。首先 RPMI1640 培养液 37℃,5%CO₂条件下培养人乳腺癌 MCF-7 细胞至对数生长期,收集细胞,用含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液重悬至 10⁶/mL,分为两组:一组加 5 μ g/mL Hoechst 33342;另一组先加入 50 μ mol/L 维拉帕米后再加入同浓度的 Hoechst 33342,37℃水浴 90 min,冰浴冷却,4℃离心,弃上清,重悬于 HBSS 中,分别加入 PI 至终浓度 1 μ g/mL,立即流式细胞仪(BDAria)分析,将其分选为 SP 细胞和 non-SP 细胞。

3.2 OM 对 MCF-7 细胞系不同亚群细胞增殖影响 将新分选的 SP 亚群细胞、non-SP 细胞和对数生长期未分选的细胞消化后用完全培养液制成单细胞悬液,调整活细胞浓度为 1 $\times$ 10⁴ 个/mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,于培养箱内常规培养 24 h 后每孔加入 100 μ L 含有不同浓度 OM(0.25、0.5、1 mg/mL)的完全培养基,空白对照组不加药物;阳性对照组加不同浓度(0.6、1.2、2.4 μ g/mL)顺铂(cisplatin, DDP)。48 h 后用酶标仪检测每孔 OD 值,计算肿瘤细胞生长抑制率:肿瘤细胞抑制率(%)=[1-(加药组平均值/阴性对照组平均值 $\times$ 100)]%。

3.3 OM 对 MCF-7 细胞系中 SP 细胞(干细胞池)数量的影响 采用流式细胞法检测。取对数生长期 MCF-7 细胞消化后用完全培养液制成单细胞悬液的,用台盘兰染色计数活细胞数目,调整活细胞浓度为 1 $\times$ 10⁴ 个/mL,将细胞以 1 $\times$ 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中。常规培养 24 h 后,细胞换液,分别加入不同浓度(0.25、0.5、1 mg/mL)OM 的完全培养液,空白对照组不加药物;阳性对照组加不同浓度(0.6、1.2、2.4 μ g/mL)DDP。作用 48 h 后,各组细胞按 3.1 方法分析 SP 细胞的百分比。

3.4 细胞内磷酸化 β -catenin 表达水平检测 采用流式细胞法检测 SP 细胞和 non-SP 细胞内磷酸化 β -catenin 表达。分别用 0.5 mg/mL OM 和 1.2 μ g/mL DDP 处理分选所得的 SP 细胞 48 h,其后进行流式细胞仪分析磷酸化 β -catenin 的表达情

况。具体方法:细胞调整浓度至 1×10^6 个/mL,经固定、破膜后重悬细胞,加入 alexa 647 - 耦合的抗人磷酸化 β -catenin 抗体孵育染色,30 min 后流式细胞仪分析。

3.5 细胞内总 β -catenin 表达水平检测 采用细胞免疫荧光检测方法分析 OM 处理后细胞内 β -catenin 的表达情况及核转位情况。具体方法如下: MCF-7 不同亚群细胞,破膜 10 min 后加纯化的鼠抗人 β -catenin,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入 TRITC-Conjugated anti-mouse IgG1 二抗孵育 1 h,用荧光倒置显微镜观察,拍照。

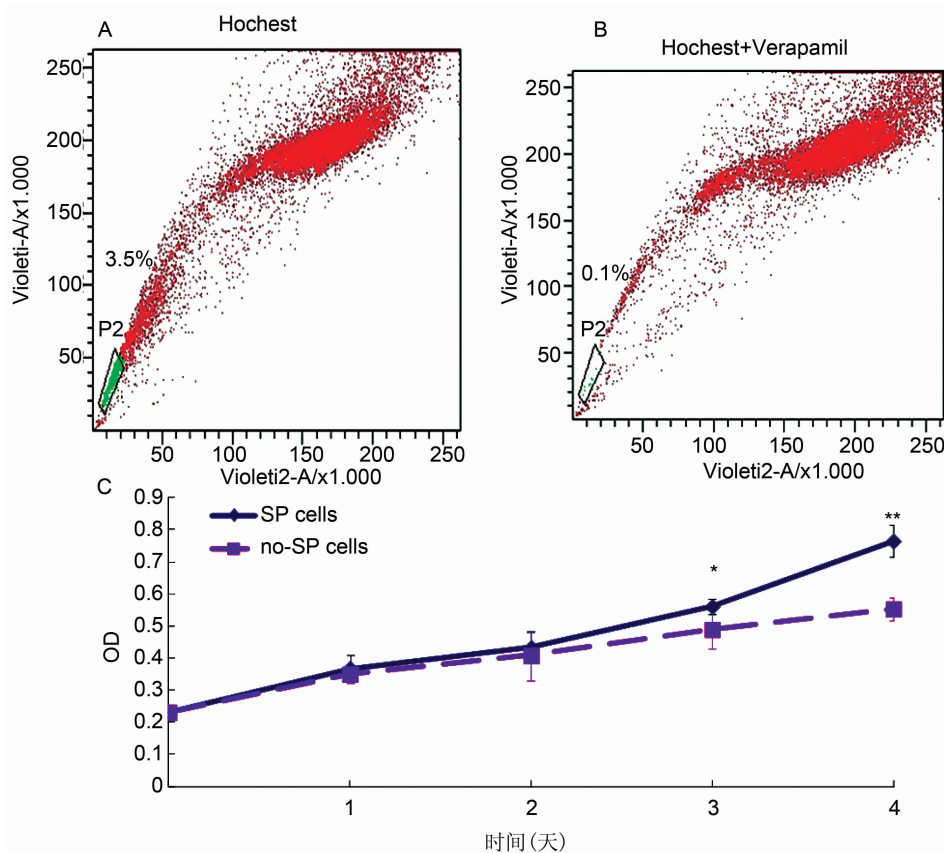
3.6 统计学方法 数据由 SPSS 10.0 统计软件包完成,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 人乳腺癌 MCF-7 细胞系 SP 亚群分析及不同

亚群生长特性分析(图 1) non-SP 细胞亚群主要分布于散点中部,发出一定强度的蓝光和红光,SP 细胞亚群分布在左下角可见一群细胞两种荧光强度均很弱,比例为 $(4.01 \pm 1.08)\%$ (图 1A),经维拉帕米阻断作用后,SP 细胞比例明显减少,比例为 $(1.77 \pm 0.12)\%$ (图 1B),两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SP 和 non-SP 细胞的生长特性显示(图 1C):与 non-SP 组比较,第 1、2 天差异无统计学意义($P > 0.05$),第 3、4 天 SP 细胞增殖速度增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 不同干预条件对乳腺癌 MCF-7 不同亚群增殖的抑制率比较 (表 1、2) DDP 各个浓度组对 non-SP 细胞的增殖抑制作用最强,未分选的细胞次之,对 SP 细胞抑制作用最弱,同浓度不同细胞亚群之间差异有统计学意义($P < 0.05$);OM 各个浓度组对 non-SP 细胞的增殖抑制作用最弱,未分选的细胞组次之,对 SP 细胞抑制作用最强,同浓度不同细胞亚群之间比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为单纯 Hoechst33342 染色的流式图;B 为经维拉帕米阻断作用后,Hoechst33342 染色的流式图;C 为人乳腺癌 MCF-7 细胞系分选后的 SP 细胞和 non-SP 细胞的生长曲线;与 non-SP 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 1. 乳腺癌 MCF-7 细胞 SP 亚群分析及 SP 和 non-SP 细胞的生长特性

表 1 不同浓度 DDP 对 MCF-7 细胞不同亚群增殖的抑制率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	non-SP	SP	未分选
空白对照	8	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
DDP 0.6 μ g/mL	8	50.26 $\pm$ 5.89 *	37.22 $\pm$ 7.31 *	35.62 $\pm$ 14.79 *
DDP 1.2 μ g/mL	8	70.21 $\pm$ 3.75 *	56.16 $\pm$ 3.61 *	63.17 $\pm$ 13.06 *
DDP 2.4 μ g/mL	8	93.89 $\pm$ 1.54 *	70.93 $\pm$ 4.69 *	85.81 $\pm$ 11.43 *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 不同浓度 OM 对 MCF-7 细胞不同亚群增殖的抑制率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	non-SP	SP	未分选
空白对照	8	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
OM 0.25 mg/mL	8	21.01 $\pm$ 14.11 *	42.51 $\pm$ 5.37 *	39.42 $\pm$ 2.79 *
OM 0.5 mg/mL	8	43.04 $\pm$ 9.86 *	61.76 $\pm$ 3.04 *	54.67 $\pm$ 4.98 *
OM 1 mg/mL	8	54.55 $\pm$ 11.02 *	97.31 $\pm$ 2.46 *	72.14 $\pm$ 3.35 *

注:与空白对照组比较, $P < 0.05$

3 不同条件干预下乳腺癌 MCF-7 细胞系中 SP 细胞含量比较(图 2) 不同浓度的 OM 可呈剂量依赖性地减少 MCF-7 细胞 SP 细胞的百分比,浓度为 0.25、0.5、1 mg/mL 的 OM 作用后,SP 细胞在细胞总数中所占比例分别为 3.1%、1.7%、0.2%(图 2B);对照组 0.6、1.2、2.4 μ g/mL 的 DDP 各组 SP 细胞在细胞总数中所占比例分别为 3.6%、3.8%、3.8%(图 2C)。

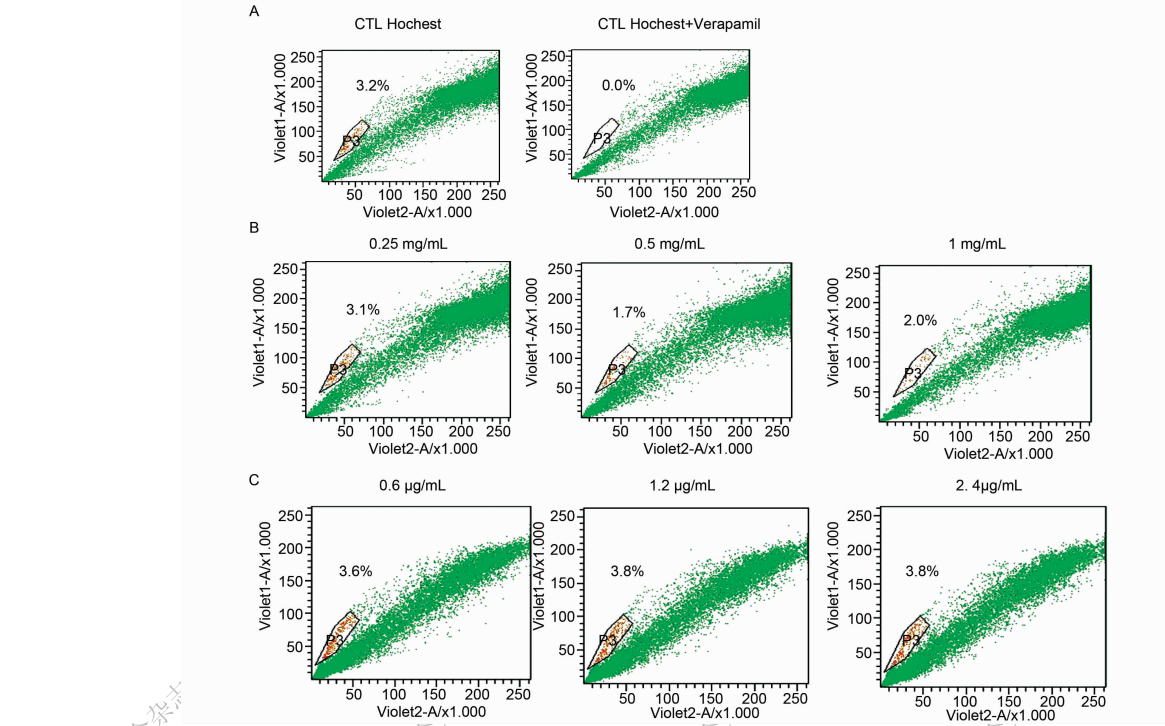
4 OM 作用后 MCF-7 细胞不同亚群磷酸化 β -catenin 表达变化(图 3,表 3) SP 细胞中磷酸化 β -catenin 的含量低于 non-SP 细胞。而经过 OM 和 DDP 处理过的 SP 细胞中磷酸化 β -catenin 较空白对照组均有升高。与空白对照组比较,OM 作用后 SP 细胞组磷酸化 β -catenin 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),DDP 作用后 SP 细胞组磷酸化 β -catenin 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 OM 作用后 MCF-7 细胞不同亚群 β -catenin 的表达水平比较(表 4) SP 细胞相较于 non-SP 细胞核内有更明显的 β -catenin 表达,且大部分发生了核转位(图 4A);而经 OM 作用后的总的 MCF-7 细胞(图 4B)和再培养的 SP 细胞(图 4C),细胞质中 β -catenin 表达明显减少,且大多聚集在细胞膜下(图 4B,C),核转位情况明显减少,是成熟细胞中 β -catenin 的分布表达现象。

表 3 不同药物作用后 SP 细胞中磷酸化 β -catenin 阳性表达水平比较 (%)

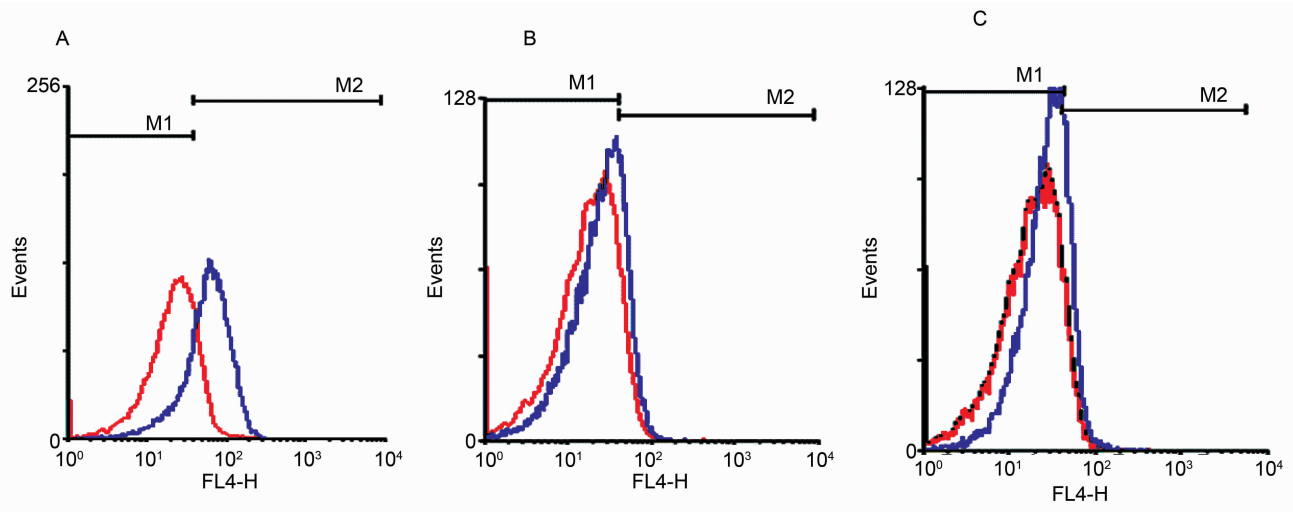
组别	n	磷酸化 β -catenin 表达
空白对照	3	22.81 $\pm$ 1.66
OM 0.5 mg/mL	3	42.62 $\pm$ 2.62 *
DDP 1.2 μ g/mL	3	25.70 $\pm$ 2.49

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$



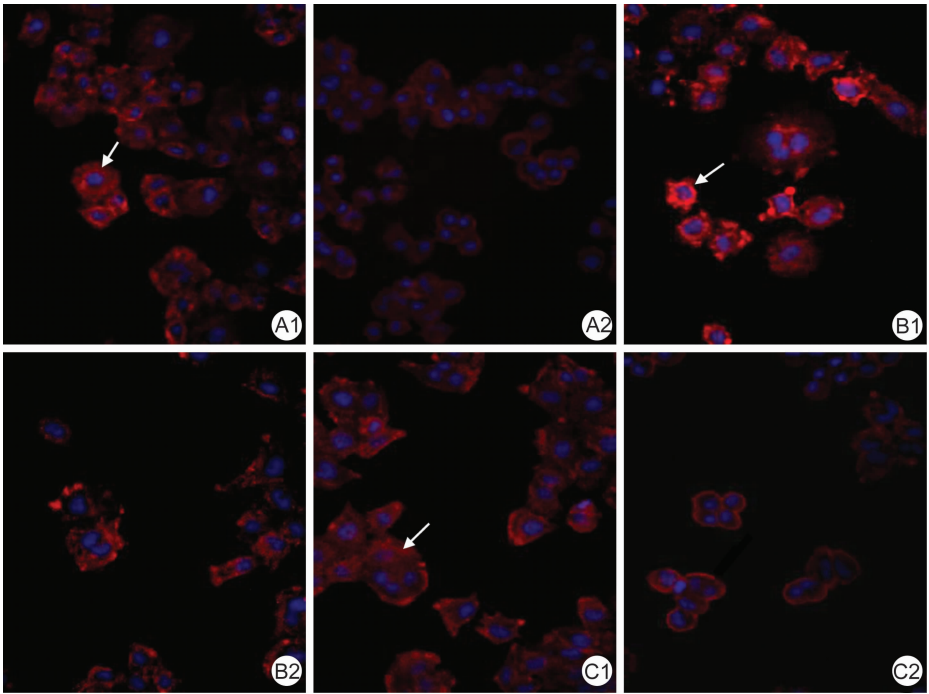
注:A 为未处理 MCF-7 细胞中 SP 细胞亚群的含量;B 为不同浓度 OM 处理后 MCF-7 细胞中 SP 细胞亚群的含量;C 为不同浓度 DDP 处理后 MCF-7 细胞中 SP 细胞亚群的含量

图 2 不同条件干预下 MCF-F 细胞系中 SP 细胞含量比较



注:A 为 SP 细胞(红色)与 non-SP 细胞(蓝色)磷酸化 β -catenin 表达的流式细胞仪重叠图像;B 为 1.2 $\mu\text{g/mL}$ DDP(蓝色)与空白对照组(红色)的磷酸化 β -catenin 表达的流式细胞仪重叠图像;C 为 0.5 mg/mL OM(蓝色)与空白对照组(红色)的磷酸化 β -catenin 表达的流式细胞仪重叠图像

图 3 OM 对 MCF 细胞内磷酸化 β -catenin 表达的干预作用



注:红色是胞内 β -catenin 的荧光图象,蓝色为细胞核的荧光图象;A 为 SP(A1) 细胞和 non-SP(A2) 细胞中 β -catenin 的表达情况;B 为 OM 处理后的细胞中 β -catenin 的表达情况(B1 为空白对照组,B2 为 OM 组);C 为 OM 处理后的 SP 亚群细胞中 β -catenin 的表达情况(C1 为空白对照组,C2 为 OM 组);图中显示:OM 处理后的细胞中 β -catenin 表达强度弱,而且 β -catenin 有明显的分布在细胞膜下(箭头所示为核转位)

图 4 OM 对 MCF 细胞内总 β -catenin 表达的干预作用

讨 论

肿瘤干细胞理论的提出使肿瘤的治疗理念发生了巨大变化。因为肿瘤干细胞对常规的治疗抵抗,所以新的治疗必须既对增殖的肿瘤细胞有治疗作用,同时还必须能够针对肿瘤干细胞有疗效。然而,一般情况

下,由于针对肿瘤干细胞有效的药物因不能有效而明显的使肿瘤体积缩小而在肿瘤药物筛选时被排除,所以必须依赖新的有利于能判定针对肿瘤干细胞有效的药物筛选方法。例如,DNA 和组织的微阵列分析法已经用于利用肿瘤干细胞来提高肿瘤的诊断率和预测化疗的有效性的研究;体外的无血清球体生成实验、在体的异种移植、以及连续移植等方法也将成为鉴定药物是否对肿瘤干细胞有效的手段。

中医药具备多途径、多靶点的整体治疗优势,因此采用中药干预干细胞功能具有巨大的潜力。研究发现,中药具有不同程度的诱导成体干细胞增殖及分化的作用。HSC 方面,王建伟^[4]发现人参总皂苷具有类似造血生长因子的功效,能直接或间接影响和调控 HSC 的增殖与分化,促进血细胞的生成;赵舒武等^[5]及雷勋明等^[6]研究发现补阳还五汤血清以及三七总皂甙可以促进神经干细胞的生长、存活及分化。李文宝等^[7]通过观察发现 MSCs 受补肾中药可以高效地向成骨细胞分化。中医药可以靶向调控成体干细胞的生物学行为,而中医药对肿瘤干细胞的功能状态有无调节作用,通过何种机制发挥作用目前尚不明确。

本课题前期的实验结果表明,SP 细胞是肿瘤细胞一个具有自我更新,成熟有限的细胞亚群,它具有一些肿瘤干细胞样细胞的特性。所以 SP 细胞被认为是肿瘤细胞的起源细胞(肿瘤干细胞样细胞),也是一个重要的潜在治疗肿瘤的作用靶点^[3]。而且发现除了一些肿瘤干细胞的特色外,SP 细胞与 non-SP 细胞比较,SP 细胞还具有与干细胞一样的调节因子,包括 Wnt/ β -catenin 细胞信号转导通路在内,都呈高表达^[3],与前期文献对肿瘤干细胞的报道一致^[8]。

Wnt/ β -catenin 细胞信号转导通路的关键信号分子 β -catenin 在细胞中有两种形式,一种是非磷酸化,一种是磷酸化。磷酸化形式是其发生降解的一个标志,而非磷酸化是其发生核转位传递转录信号的一种形式^[9,10]。本实验在前期试验的基础上,进一步发现 OM 能剂量依赖地减少 MCF-7 细胞 SP 亚群细胞的数量、抑制 SP 细胞的克隆形成能力。在对细胞信号转导通路的干预方面表现为升高 MCF-7 细胞系 SP 亚群细胞内磷酸化 β -catenin 的表达、使 SP 细胞内总 β -catenin 表达减少并特异性的分布在细胞膜下而不是累积在胞质中或发生核转位等。提示 OM 确实具有干预

调控肿瘤干细胞样细胞生物学行为的作用,而这种作用有可能是通过干预调控肿瘤干细胞 Wnt 信号转导通路活性状态来实现的。为了进一步证实 OM 的上述作用,本实验还用 DDP 做了对照,研究发现,OM 的减少 SP 细胞数量,下调 Wnt 信号转到通路活性等生物效应并无在 DDP 处理过的细胞中观察到。

总之,OM 干预人乳腺癌 MCF-7 细胞后,不仅能抑制其增殖,而且可以减少 SP 细胞的含量,并下调 Wnt 通路活性。在 SP 细胞和 Wnt 通路活性方面的突出作用提示,OM 有可能成为一种新的控制乳腺癌肿瘤干细胞的治疗药物。

参 考 文 献

- [1] Wicha MS, Liu SL, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—A paradigm shift[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 1883–1890.
- [2] 张英, 祁鑫, 朱小云. 氧化苦参碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用及其机制研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(3): 494–497.
- [3] 张英, 林洪生. Wnt 信号转导通路与肿瘤干细胞[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(2): 347–350.
- [4] 王建伟. 人参总皂苷对 CD34⁺造血干/祖细胞体外扩增和分化的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2004.
- [5] 赵舒武, 蔡青, 王晓玲, 等. 补阳还五汤载药血清对缺氧性神经干细胞增殖和分化的影响[J]. *江苏中医药*, 2013, 45(1): 73–75.
- [6] 雷勋明, 陈全景, 张晓芬, 等. 三七总皂甙对缺氧缺血性脑损伤新生鼠内源性神经干细胞增殖分化的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(4): 684–687.
- [7] 李文宝, 李刚. 补肾中药诱导干预骨髓间充质干细胞成骨分化研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2013, 29(4): 324–326.
- [8] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 506–513.
- [9] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of wnt, beta-catenin, and cadherin pathways [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1483–1487.
- [10] Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11(4): 273–282.

(收稿:2014-05-01 修回:2016-08-05)