

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.007.html

LukS-PV 对乳腺癌细胞 MAD-MB-231 增殖、 凋亡及细胞周期的影响

于文伟, 许良飞, 汪自然, 强雅雯, 马筱玲

摘要 目的 在体外研究金黄色葡萄球菌杀白细胞素 S 组分(LukS-PV)对三阴乳腺癌(TNBC)细胞(MAD-MB-231)形态、增殖、周期和凋亡的影响。方法 0.25、0.5、0.75、1 $\mu\text{mol/L}$ LukS-PV 刺激乳腺癌细胞 MAD-MB-231 后,利用倒置显微镜观察细胞形态的改变;用 CCK-8 检测 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞增殖的影响;通过 PI 单染流式细胞术检测 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞周期的改变;采用 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞凋亡的影响,利用 Western blot 检测 Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase3)、Caspase8 表达的变化。结果 LukS-PV 作用 MAD-MB-231 后,细胞逐渐变圆,随着浓度增加,悬浮细胞增多。LukS-PV 以时间和浓度依赖性的方式抑制乳腺癌细胞的增殖。LukS-PV 可使 MAD-MB-231 周期阻滞在 G1/G0 期,呈浓度依赖性。LukS-PV 可诱导 MAD-MB-231 凋亡,上调 Bax、活化的 caspase3 (Cleaved-caspase3)、活化的 caspase8 (Cleaved-caspase8) 的表达,下调 Bcl-2 的表达。结论 LukS-PV 可抑制 MAD-MB-231 增殖,使其周期阻滞在 G1/G0 期,并诱导其凋亡。

关键词 MAD-MB-231; LukS-PV; 增殖; 细胞周期; 凋亡

中图分类号 R 73-36

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0701-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.007

在女性中,乳腺癌是最常见的肿瘤类型,也是世界上第二大常见的肿瘤^[1]。三阴乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)约占所有乳腺癌病例的 10%~15%,它的病理特征是缺乏雌激素、孕激素和人类表皮生长因子三种受体^[2]。由于 TNBC 恶性程度高,并且缺乏靶向治疗药物,导致其预后较差。目前临床的治疗手段有手术切除、化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗,但是临床疗效不佳。所以急需新的有效并毒副作用小的靶向药物。

PV-杀白细胞素(panton-valentine leucocidin,

PVL)是由金黄色葡萄球菌分泌,PVL 含有 S 组分(LukS-PV)和 F 组分(LukF-PV)两种亚组分,课题组前期研究^[3]表明 LukS-PV 能够在体内外诱导白血细胞凋亡,且体内实验表明并没有明显的毒副作用,进一步研究显示 LukS-PV 是通过补体 C5a 的受体(C5a receptor, C5aR)发挥促凋亡作用^[4],结合 C5aR 在 TNBC 中高表达的文献报道^[5],由此可推测 LukS-PV 能够与高表达 C5aR 的 TNBC 细胞结合,发挥抗肿瘤效应。该研究采用 TNBC 细胞株 MAD-MB-231 研究 LukS-PV 对细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响,为其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 MAD-MB-231 购自中科院上海细胞库;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自南美 Gemini 公司;CCK-8 试剂盒、胰酶、青-链霉素、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;周期试剂盒、凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)、Caspase-8、 β -actin 一抗购自美国 CST 公司;二抗购自武汉爱博太克生物科技有限公司;大肠杆菌 BL21(DE3)重组表达载体 pET28a-LukS-PV 由本课题组构建并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 仪器与设备 超净工作台购自北京亚太科隆设备有限公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;细胞培养箱、多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 细胞培养 MDA-MB-231 细胞培养于含有 10% 的胎牛血清、1% 链霉素和青霉素的高糖 DMEM 培养基中,放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。在细胞生长至 80% 左右融合度时,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次,加入 1 ml 胰酶直到细胞形态变圆,加入 2 ml 含 10% 血清的

2019-01-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572065)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

作者简介:于文伟,男,硕士研究生;

马筱玲,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: maxiaoling@ustc.edu.cn

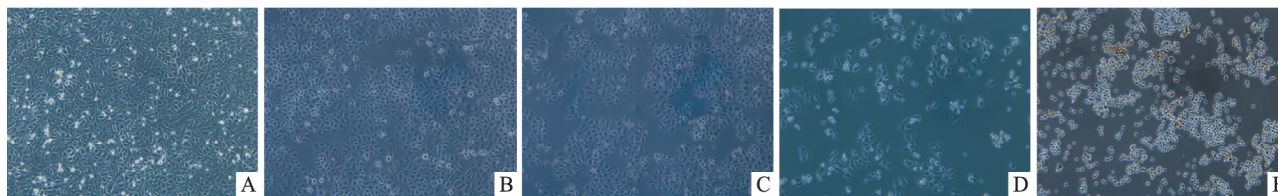


图1 不同浓度 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞形态学影响 ×200

A: PBS; B: 0.25 μmol/L LukS-PV; C: 0.5 μmol/L LukS-PV; D: 0.75 μmol/L LukS-PV; E: 1 μmol/L LukS-PV

DMEM 培养基,用枪头轻轻吹打混匀并按适宜比例进行传代。

1.4 LukS-PV 的表达、纯化及定量 按照常文娇等^[6]报道的方法对 LukS-PV 的表达、纯化,用 BCA 法检测蛋白浓度。

1.5 CCK-8 检测细胞增殖 细胞生长至对数生长期后,用胰酶消化并接种于 96 孔细胞培养板,每孔 4×10^3 个细胞,每组 3 个复孔,24 h 后加入对应浓度的 LukS-PV,继续培养,分别在刺激后 12、24、36 h 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,在 450 nm 波长下检测吸光度(optical density, OD) 值。细胞增殖抑制率的计算方法为:增殖抑制率(%) = $1 - OD(\text{实验组} - \text{空白组}) / OD(\text{对照组} - \text{空白组}) \times 100\%$ 。

1.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 细胞生长至对数生长期后,用胰蛋白酶消化并混匀,以每孔 2×10^5 个细胞的浓度接种于 6 孔板中,培养 1 h 待细胞贴壁后,加入相应浓度的 LukS-PV,继续培养 24 h,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,加入 400 μl Annexin V 结合液重悬细胞,在避光条件下加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI,避光室温孵育 15 min,上机检测。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期 当细胞在对数生长期后,用胰蛋白酶消化并混匀,以每孔 2×10^5 个细胞的密度铺于 6 孔板中,培养 12 h 待细胞贴壁后,加入相应浓度的 LukS-PV,继续培养 24 h,用胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,在 4 °C 条件下用 70% 乙醇过夜固定,并用 PBS 洗涤 2 次,加入 0.5 ml 的 PI/RNase staining 染液,避光室温孵育 30 min,上机检测。

1.8 蛋白印记检测凋亡相关蛋白的表达 LukS-PV 刺激细胞 24 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入适量细胞蛋白提取试剂,冰上摇动 30 min,用 BCA 法检测蛋白浓度。用 12% 或 15% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳,转移至 NC 膜,结束后用 5% 的

脱脂牛奶封闭 2 h,分别放入以 1 : 1 000 倍稀释的对应一抗 4 °C 孵育过夜,用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后放入以 1 : 10 000 稀释的二抗中室温孵育 1.5 h,结束后用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,最后加入发光液,并在凝胶成像系统中进行曝光。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析用于多组数据之间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LukS-PV 对 MAD-MB-231 形态学影响

LukS-PV 刺激 MAD-MB-231 细胞 24 h 后,显微镜下观察, PBS 组细胞呈贴壁生长,形态清晰,大小均一,而随着 LukS-PV 浓度增加,细胞数量变少,细胞间隙增加,细胞变圆,悬浮细胞数量增多。见图 1。

2.2 LukS-PV 对 MAD-MB-231 增殖的影响

用不同浓度的 LukS-PV 作用 MAD-MB-231 细胞 12、24、36 h 后,采用 CCK-8 法检测 LukS-PV 对 MAD-MB-231 增殖抑制率,结果表明,随着 LukS-PV 浓度的增加,对细胞增殖的抑制率越高,且对细胞的增殖抑制率随着作用时间延长而增加,表明 LukS-PV 对 MAD-MB-231 增殖的抑制作用是浓度-时间依赖性的。见图 2。

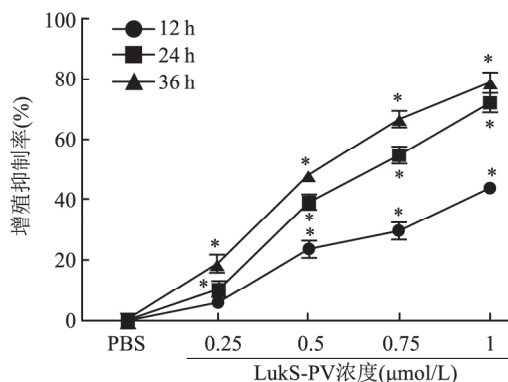


图2 不同浓度 LukS-PV 对 MAD-MB-231 增殖的抑制作用与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

2.3 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞周期的影响

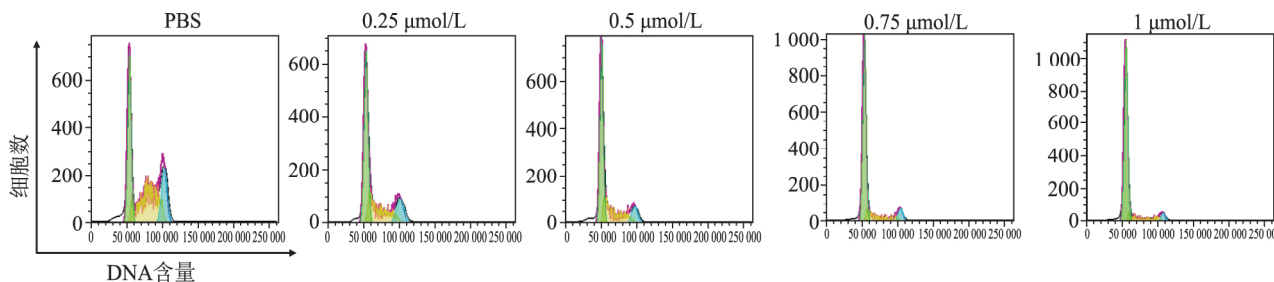


图3 不同浓度 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞周期分布的影响

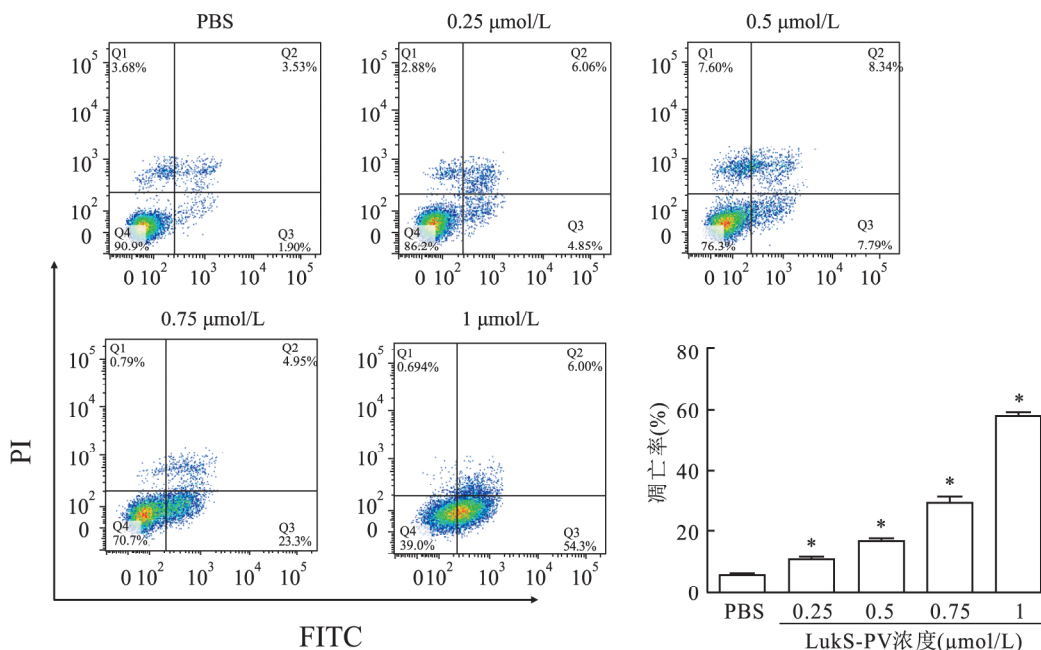


图4 不同浓度 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞凋亡的影响
与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

用流式细胞仪检测细胞周期变化。在不同浓度的 LukS-PV 作用 MAD-MB-231 细胞 36 h 后,结果显示 细胞周期被阻滞在 G_1/G_0 期,且 LukS-PV 的浓度越高,阻滞在 G_1/G_0 期细胞越多 ($F = 130.1, P < 0.05$)。见图 3、表 1。

表 1 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞周期变化的影响

组别	G_0/G_1 (%)	S (%)	G_2/M (%)
PBS	40.67 ± 0.89	40.03 ± 2.62	19.30 ± 2.87
0.25 μmol/L	56.86 ± 2.44*	29.76 ± 2.51	13.38 ± 2.81
0.5 μmol/L	64.69 ± 2.01*	27.14 ± 3.59	8.17 ± 1.78
0.75 μmol/L	77.69 ± 3.57*	15.88 ± 2.62	6.43 ± 1.79
1 μmol/L	81.10 ± 2.52*	13.59 ± 4.14	5.31 ± 1.65

与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

2.4 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞凋亡的影响

不同浓度 LukS-PV 刺激 MAD-MB-231 细胞 24 h 后,流式结果显示,不同浓度 LukS-PV (0.25、0.5、0.75、1 μmol/L) 作用 24 h 后,凋亡率分别为 (10.63 ± 1.24) %、(16.45 ± 1.49) %、(29.19 ± 3.45) %、

(58.10 ± 2.15) % ,与 PBS 组 (5.40 ± 1.15) % 相比, LukS-PV 能诱导 MAD-MB-231 细胞凋亡,呈浓度依赖性 ($F = 298, P < 0.05$)。见图 4。

2.5 LukS-PV 对 MAD-MB-231 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

随着 LukS-PV 浓度增加, Bax、Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase8 表达增加, Bcl-2 表达减少。见图 5。

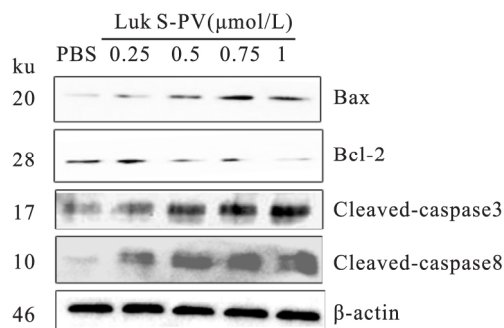


图5 不同浓度 LukS-PV 对凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

TNBC 由于恶性程度高,缺乏有效的靶向治疗药物,导致患者预后较差,因此寻找高效低毒的靶向治疗药物是研究的热点。细菌毒素兼具与靶细胞结合的特异性与细胞毒性,能够靶向结合并杀伤靶细胞,起到抗肿瘤作用。研究^[7-8]表明一些细菌毒素有很好的抗肿瘤效应,其中部分已用于临床治疗,例如肉毒杆菌分泌的神经毒素,对前列腺癌、乳腺癌、神经母细胞癌具有良好的抑制作用,目前已经临床 3 期试验。白喉杆菌产生的白喉毒素对胶质瘤、宫颈癌、乳腺癌有很好的抗癌作用,目前已经进入临床 2 期试验^[9-10],另外绿脓假单胞菌产生的外毒素和李斯特菌产生的溶血素^[11]也显示了很好的抗癌作用。这表明细菌毒素具有广阔的应用前景。

本文研究的细菌毒素 LukS-PV 是金黄色葡萄球菌分泌的杀白细胞素 PVL 的双组分之一(LukS-PV 和 LukF-PV),结果表明 LukS-PV 能够抑制 MAD-MB-231 增殖,使其周期阻滞在 G₀/G₁ 期,研究结果与前期在白血病中研究^[12]结果一致。细胞凋亡是细胞程序性细胞死亡,并且诱导癌细胞凋亡在抗肿瘤治疗中有重要意义,也是评价抗肿瘤药物药效的一个重要方面。本研究显示 LukS-PV 能够浓度依赖性诱导 MAD-MB-231 凋亡。线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径是凋亡的三条主要通路^[13]。Bcl-2 家族在线粒体凋亡通路中扮演者关键作用,课题组通过检测线粒体凋亡通路相关蛋白显示,LukS-PV 能够上调 Bax、Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase8 表达增加,下调 Bcl-2 表达,说明 LukS-PV 可能是通过激活线粒体通路而诱导 MAD-MB-231 凋亡。

课题组前期实验^[4]表明 LukS-PV 是通过 C5aR 发挥抗白血病作用,近年研究^[5]显示,C5aR 在 TNBC 中的阳性率约为 40%,且 C5aR 在癌旁组织中不表达,C5aR 的高表达与肿瘤的大小、肿瘤分期呈正相关性,与 5 年生存率呈负相关性。所以根据以上研究,LukS-PV 未来可能作为 C5aR 阳性的 TNBC 的靶向治疗药物。

参考文献

- [1] Foulkes W D, Smith I E, Reis-Filho J S. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-48.
- [2] Agarwal G, Nanda G, Lal P, et al. Outcomes of triple-negative breast cancers (TNBC) compared with non-TNBC: does the survival vary for all stages[J]. *World J Surg*, 2016, 40(6): 1362-72.
- [3] Shan W, Bu S, Zhang C, et al. LukS-PV, a component of Pantan-Valentine leukocidin, exerts potent activity against acute myeloid leukemia *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Biochem Cell Bio*, 2015, 61(5): 20-8.
- [4] 彭静, 马筱玲, 孙晓曦, 等. LukS-PV 通过 C5aR 诱导急性髓系白血病细胞 THP-1 凋亡的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(2): 164-8.
- [5] Imamura T, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, et al. Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis[J]. *Breast Cancer*, 2016, 23(6): 876-85.
- [6] 常文娇, 马筱玲, 沈继龙, 等. Pantan-Valentine 杀白细胞素原核表达、纯化及生物学活性鉴定[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(1): 6-10.
- [7] Karsenty G, Rocha J, Chevalier S, et al. Botulinum toxin type A inhibits the growth of LNCaP human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Prostate*, 2009, 69(11): 1143-50.
- [8] Bandala C, Perez-Santos J L, Lara-Padilla E, et al. Effect of botulinum toxin A on proliferation and apoptosis in the T47D breast cancer cell line[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 891-4.
- [9] Martarelli D, Pompei P, Mazzoni G. Inhibition of adrenocortical carcinoma by diphtheria toxin mutant CRM197 [J]. *Chemotherapy*, 2009, 55(6): 425-32.
- [10] Shafiee F, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A. Production and evaluation of cytotoxic effects of DT386-BR2 fusion protein as a novel anti-cancer agent[J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 130(11): 100-5.
- [11] Karpinski T M, Szkaradkiewicz A K. Anti-cancer peptides from bacteria[J]. *Bangladesh J Pharmacol*, 2013, 8(5): 343-8.
- [12] Bu S, Xie Q, Chang W, et al. LukS-PV induces mitochondrial-mediated apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest in human acute myeloid leukemia THP-1 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8): 1531-7.
- [13] Hsieh C J, Hsu Y L, Huang Y F, et al. Molecular mechanisms of anticancer effects of phytoestrogens in breast cancer[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(3): 323-32.

(下转第 709 页)

Helix B surface peptide attenuates acute myocardial infarction induced-inflammation *via* inhibiting the Erk1/2 pathway

Wang Shixiang¹, Wang Bin², Guo Guofeng¹, et al

(¹Dept of Cardiology, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000;

²Dept of Radiological, Heze Municipal Hospital of TCM, Heze 274000)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of erythropoietin derived peptide (HBSP) on cardiac inflammation in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Thirty 8 week old SD male rats were randomly divided into 3 groups (sham operation group, operation group and HBSP group). The AMI rat model was established by ligating the anterior descending coronary artery. The HBSP (90 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was injected intraperitoneally in the AMI group, and the sham operation group and the AMI group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. Cardiac function was detected by color Doppler echocardiography before the rats were killed. The expression of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), p-Erk 1/2 and Erk1/2 protein were detected in each group. **Results** Compared with sham group, the expression of IL-6, TNF- α , p-Erk1/2 and Erk1/2 protein in myocardial tissue of AMI group was significantly increased ($P = 0.001$), while that of IL-6, TNF- α , p-Erk1/2 and Erk1/2 protein in myocardial tissue of HBSP group was significantly decreased ($P = 0.001$). The cardiac function index of AMI model group was significantly lower than that of sham group, while that of HBSP treatment group was significantly higher than that of AMI model group ($P = 0.001$). **Conclusion** HBSP can attenuate myocardial infarction inflammation and myocardial damage by inhibiting Erk1/2 signaling pathway, thereby protecting myocardial tissue and improving cardiac function in rats.

Key words acute myocardial infarction; helix B surface peptide; Erk1/2; inflammatory factor; myocardial injury

(上接第 704 页)

Effect of LukS-PV on proliferation, apoptosis and cell cycle of breast cancer cell line MAD-MB-231

Yu Wenwei, Xu Liangfei, Wang Ziran, et al

(Dept of Laboratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To study the effects of S component of panton-valentine leucocidin (LukS-PV) on morphology, proliferation, cell cycle and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MAD-MB-231 *in vitro*. **Methods** Cells were exposed to LukS-PV at different concentrations, the cell morphology was observed under an inverted microscope. CCK-8 was used to detect the effects of LukS-PV on cell proliferation. Cell cycle was detected by flow cytometry following PI staining. Cell apoptosis was detected by flow cytometry following Annexin V/PI staining and apoptosis-related proteins were detected by Western blot. **Results** With different concentration of LukS-PV was applied to MAD-MB-231, the cells gradually became round and the suspended cells increased. LukS-PV inhibited the proliferation of breast cancer cells in a time- and concentration-dependent manner. LukS-PV could block MAD-MB-231 in G_1/G_0 phase in a concentration-dependent manner. LukS-PV could induce apoptosis of MAD-MB-231, up-regulate the expression of Bax, Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase8, and down-regulate the expression of Bcl-2. **Conclusion** LukS-PV can inhibit the proliferation of MAD-MB-231, arrest its cycle in G_1/G_0 phase, and induce its apoptosis.

Key words MAD-MB-231; LukS-PV; proliferation; cell cycle; apoptosis