

过氧化麦角甾醇衍生物对人三阴性乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响^Δ

张宏宇*,任文康,邹宇,韩迎龙,杨宏艳,卜明,都晓辉,林宇[#](齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江齐齐哈尔161006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)11-1355-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.13



摘要 目的 研究过氧化麦角甾醇衍生物 EP-3P 对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、迁移和侵袭的影响,为乳腺癌治疗相关药物的开发提供参考。方法 采用 MTT 法检测 0(空白对照)、1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P 作用于 MDA-MB-231 细胞 24、48、72 h 后细胞的增殖情况。以 0(空白对照)、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P 作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 后,分别采用细胞划痕法、Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力,采用流式细胞术分别测定细胞凋亡和周期分布情况,并采用 Western blot 法检测细胞中 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶 3(caspase-3)、活化的 caspase-3(cleaved-caspase-3)、细胞色素 C(Cyt-C)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 蛋白的表达水平。结果 与空白对比较,2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P 均可显著升高细胞的增殖抑制率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈浓度和时间依赖趋势。10、20 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P 作用 24 h 后,均可显著降低/减少细胞迁移愈合率和侵袭细胞数($P < 0.01$),将细胞周期阻滞于 G₂/M 期($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著升高细胞的凋亡率($P < 0.05$),并且可显著上调细胞中 Bax、Cyt-C、cleaved-caspase-3 蛋白表达和下调细胞中 Bcl-2、caspase-3、MMP-2、MMP-9 蛋白表达($P < 0.01$)。结论 EP-3P 可通过线粒体介导的内源性 caspase 途径抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖、迁移和侵袭,并可诱导细胞发生凋亡。

关键词 过氧化麦角甾醇衍生物;乳腺癌细胞;EP-3P;三阴性乳腺癌;迁移;侵袭;凋亡

Effect of ergosterol peroxide derivatives on the proliferation, migration and invasion of human triple negative breast cancer cell

ZHANG Hongyu, REN Wenkang, ZOU Yu, HAN Yinglong, YANG Hongyan, BU Ming, DU Xiaohui, LIN Yu (College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of ergosterol peroxide derivatives EP-3P on the proliferation, migration and invasion of human triple negative breast cancer cell MDA-MB-231, and to provide reference for the development of breast cancer related drugs. **METHODS** MTT assay was adopted to detect the proliferation of MDA-MB-231 cells after treated with 0 (blank control), 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P for 24, 48 and 72 h. Wound healing assay and Transwell chamber method were adopted to detect the migration and invasion ability of MDA-MB-231 cells after treated with 0 (blank control), 5, 10, 20 EP-3P for 24 h. The apoptosis and cell cycle distribution were detected by flow cytometry. Western blot assay was used to detect the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), caspase-3, cleaved-caspase-3, cytochrome C (Cyt-C), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9. **RESULTS** Compared with blank control group, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ EP-3P could significantly increase the inhibitory rate of cell proliferation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in a dose and time-dependent manner. After 24 h treatment of EP-3P (10, 20 $\mu\text{mol/L}$), the rate of cell migration and the number of invasive cells were decreased significantly ($P < 0.01$), and cell was arrested at G₂/M stage ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the apoptotic rate was increased significantly ($P < 0.05$); the protein expressions of Bax, Cyt-C and cleaved-caspase-3 were upregulated significantly, while those of Bcl-2, caspase-3, MMP-2 and MMP-9 were downregulated significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS** EP-3P can inhibit the proliferation, migration and invasion of human triple negative breast cancer cells MDA-MB-231 through mitochondrial mediated endogenous caspase pathway, and induce the apoptosis of cells.

KEYWORDS ergosterol peroxide derivatives; breast cancer cell; EP-3P; triple negative breast cancer; migration; invasion; apoptosis

^Δ 基金项目:齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(No.LHYD-2021021);黑龙江省中医药科研项目(No.ZHY18-164)

* 硕士研究生。研究方向:药效评价与体内过程研究。E-mail: 1941426704@qq.com

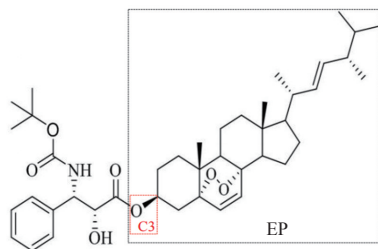
[#] 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物抗肿瘤基础。电话:0452-2663159。E-mail:linyuy7373@163.com

全球最新癌症负担数据显示,2020年全球乳腺癌新发病例高达226万例,超过了肺癌的220万例,已成为全球第一大癌症^[1]。虽然随着化疗、内分泌治疗、靶向治疗等综合治疗手段的运用,癌症患者的病死率已大幅度下降,但我国仍约有7.82%的女性因乳腺癌复发或转移而

死亡^[2]。因此,探寻治疗乳腺癌的有效药物仍然是亟待解决的问题。

从天然产物中寻找抗肿瘤药物或抗肿瘤辅助药物,并对其结构进行改造或修饰,已成为国内外研究的重点内容之一。过氧化麦角甾醇(ergosterol peroxide, EP)是一种过氧化甾体类天然产物,广泛存在于多种真菌中^[3-4]。已有大量文献报道,EP可通过细胞毒性作用抑制癌细胞生长^[5-7]。研究发现,EP作为一种重要的活性先导化合物,其特有的5 α ,8 α -过氧桥是关键药效载体^[8-10]。EP的C-3位和C-17位具有较大的结构修饰空间,如Li等^[11]、Han等^[12]分别在EP的C-17位引入吡啶取代基和酰肼侧链合成了新的化合物,并发现上述合成的化合物均可显著抑制癌细胞的增殖、诱导癌细胞凋亡;再如Bu等^[13]发现,在EP的C-3位引入氨基甲酸酯极性基团对提升其抑制肿瘤细胞增殖的活性至关重要。

紫杉醇是一种公认的治疗乳腺癌的药物,其结构中的C-13侧链与其抗肿瘤作用密切相关^[14]。为进一步推进EP结构衍生化研究,筛选具有更强抗肿瘤活性的新化合物,本课题组前期以EP作为先导化合物,通过在其C-3位羟基引入紫杉醇的侧链(4*S*,5*R*)-3-叔丁氧羰基-2,2-二甲基-4-苯基-1,3-噁唑烷-5-甲酸,合成了全新的EP衍生物EP-3P(结构见图1)。本研究拟通过体外实验初步考察EP-3P对人三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、迁移和侵袭的影响,并探讨其可能的作用机制,以为乳腺癌治疗相关药物的开发研究提供参考。



化学分子式: C₃₂H₅₀NO₂

图1 EP-3P的化学结构

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:Axio observer A1型倒置显微镜(德国Zeiss公司),SAFIRE2型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),Power/PAC3000型电泳仪、Chemi-Doc MP型凝胶成像仪、FACS Calibur型流式细胞仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂包括:EP-3P(由齐齐哈尔医学院药物化学研究室提供,批号20211020,经高效液相色谱法和核磁共振法检测其纯度均在98%以上),L-15培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司),重组胰蛋白酶消化液、二甲基亚砜(DMSO)、MTT细胞增殖与

细胞毒性检测试剂盒(批号C0038)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度试剂盒(批号P0010)、RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(美国Invitrogen公司,批号1753025),细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号KGA512),Matrigel基质胶(美国BD公司,批号356234),鼠源B淋巴细胞瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和兔源Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)、胱天蛋白酶3(cysteiny aspartate specific proteinase 3, caspase-3)、活化的caspase-3(cleaved-caspase-3)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)8种单克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Cell Signaling Technology公司),ECL发光试剂盒(北京康为世纪生物科技股份有限公司,批号CW0049),其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

将MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、1%双抗(100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)的L-15培养基中,置于37 $^{\circ}$ C、无CO₂的培养箱中培养。本研究选用传代6~10代的细胞进行实验。

2.2 EP-3P对MDA-MB-231细胞增殖的影响

采用MTT法进行检测。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,胰酶消化后用L-15完全培养基稀释成 2×10^4 个/mL的细胞悬液,将细胞悬液按100 μ L/孔接种于96孔板中。实验设置空白对照组(不加任何药物处理培养的细胞,即0 μ mol/L)、EP-3P不同浓度组(1.25、2.5、5、10、20、40 μ mol/L,药物浓度根据前期预实验结果设置),每组平行设置3个复孔;并设置空白调零孔(不加细胞,只加培养液)。分别在培养24、48、72 h时,每孔加入0.5 mg/mL的MTT溶液10 μ L,培养箱中常规培养4 h后弃去MTT,再每孔加入150 μ L DMSO振荡30 min溶解甲瓞结晶;然后采用多功能酶标仪测定各孔在490 nm波长处的光密度值,并计算细胞的增殖抑制率:增殖抑制率(%)=[1-(给药组光密度值-空白调零孔光密度值)/(空白对照组光密度值-空白调零孔光密度值)] \times 100%。实验重复3次。

2.3 EP-3P对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响

采用细胞划痕法进行检测。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于6孔板中,常规培养过夜,然后采用无菌枪头在垂直于板的横轴方向划出等宽的直线划痕,用磷酸盐缓冲液(PBS)

清洗细胞3次。将细胞分为空白对照组(0 μmol/L)和EP-3P不同浓度组(5、10、20 μmol/L,浓度根据“2.2”项下MTT实验结果和本课题组前期预实验结果设置,下同),每组设置3个复孔。分别在培养0、24 h后,用倒置显微镜观察划痕愈合情况,并拍照。利用Image J V1.8.0软件测定划痕面积,计算细胞的迁移愈合率:迁移愈合率(%)=(0 h时划痕面积-24 h时划痕面积)/0 h时划痕面积×100%。实验重复3次。

2.4 EP-3P对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响

采用Transwell小室法进行检测。将Matrigel基质胶与无血清培养基按照体积比1:8混匀后,按50 μL/孔的量加入到Transwell小室上层。将细胞侵袭小室置于培养箱中,将Matrigel烘干,然后弃掉多余的培养基。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,制成 1.5×10^5 个/mL的细胞悬液,分别给予0(空白对照组)、5、10、20 μmol/L的EP-3P(EP-3P不同浓度组)刺激,每个浓度组设置3个平行组。然后分别取上述给药后的细胞悬液100 μL加入到Transwell小室上层,下层中加入含10%胎牛血清的培养基700 μL。将细胞侵袭小室置于培养箱中培养24 h,然后以4%多聚甲醛固定30 min,再用1%结晶紫染色30 min后,于倒置显微镜下观察穿过基底膜的侵袭细胞。每个样本计数5个视野,取平均值作为检测结果。实验重复3次。

2.5 EP-3P对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI双染色法进行检测。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,常规制备细胞悬液后,将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,培养24 h后,按照“2.3”项下方法分组与给药。继续培养24 h后,收集、洗涤细胞,先后加入Annexin V-FITC、PI试剂各5 μL,混匀,于室温下避光反应15 min后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并通过Flow jo 10软件分析各组细胞的凋亡率。实验重复3次。

2.6 EP-3P对MDA-MB-231细胞周期分布的影响

采用流式细胞术进行检测。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,按照“2.5”项下方法接种、分组、给药、培养并收集。制备细胞密度为 1×10^6 个/mL的单细胞悬液,离心(2 000 r/min,5 min)去除上清,加入70%冷乙醇500 μL,4 ℃固定过夜;用预冷的PBS洗细胞3遍,除去残留的乙醇;加入500 μL提前配制好的PI/RNase A染色液(临用前PI与RNase A染色液按9:1的体积比配制),37 ℃避光孵育30 min进行染色,采用流式细胞仪检测,并通过Flow jo 10软件分析细胞周期分布。实验重复3次。

2.7 EP-3P对MDA-MB-231细胞中凋亡和侵袭相关蛋白表达的影响

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的MDA-MB-231细胞,制成单细胞悬液后,以 8×10^5 个/皿

的细胞密度接种于直径为60 mm的细胞培养皿中,待细胞培养至贴壁后,将细胞分为空白对照组(0 μmol/L)和EP-3P不同浓度组(5、10、20 μmol/L)。药物作用24 h后,每个培养皿加入PMSF和RIPA裂解液的混合液(PMSF和RIPA裂解液的体积比为1:100)500 μL,于冰上裂解细胞30 min,提取细胞中总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,并将蛋白高温变性。取变性后的蛋白样品30 μg,在80 V电压下进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,在300 mA恒流下将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,用5%的脱脂奶粉在室温下封闭2 h;加入内参蛋白GAPDH一抗(稀释比例1:5 000)和目标蛋白Bcl-2、Bax、Cyt-C、caspase-3、cleaved-caspase-3、MMP-2、MMP-9一抗(稀释比例均为1:1 000),4 ℃孵育过夜;以TBST缓冲液漂洗10 min×3次,加入相应二抗(稀释比例均为1:3 000),室温孵育2 h;以TBST缓冲液漂洗10 min×3次,加ECL发光液,然后于凝胶成像仪中成像。用Image J V1.8.0软件对蛋白条带进行分析,以目标蛋白条带灰度值与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 EP-3P对MDA-MB-231细胞增殖的影响结果

与空白对照组比较,不同浓度EP-3P作用于MDA-MB-231细胞24、48、72 h后,细胞的增殖抑制率均不同程度地升高,并呈一定的浓度和时间依赖趋势。其中,除EP-3P 1.25 μmol/L组细胞在培养24 h时的增殖抑制率外,其余各浓度EP-3P组细胞在药物作用24、48、72 h后的增殖抑制率均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞的增殖抑制率测定结果见表1。

表1 各组细胞的增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
EP-3P 1.25 μmol/L组	5.91 ± 4.55	6.53 ± 4.02 ^a	10.60 ± 3.62 ^b
EP-3P 2.5 μmol/L组	11.13 ± 4.85 ^a	14.95 ± 4.15 ^b	22.98 ± 2.13 ^b
EP-3P 5 μmol/L组	36.94 ± 7.86 ^b	40.39 ± 4.76 ^b	48.42 ± 4.51 ^b
EP-3P 10 μmol/L组	58.59 ± 6.74 ^b	60.75 ± 6.29 ^b	72.42 ± 1.72 ^b
EP-3P 20 μmol/L组	70.88 ± 3.86 ^b	79.47 ± 4.39 ^b	84.53 ± 1.80 ^b
EP-3P 40 μmol/L组	86.82 ± 5.74 ^b	92.15 ± 4.06 ^b	95.32 ± 1.61 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与空白对照组比较, $P<0.01$

3.2 EP-3P对MDA-MB-231细胞迁移和侵袭能力的影响结果

与空白对照组比较,EP-3P 10、20 μmol/L组细胞的迁移愈合率显著降低($P<0.01$),EP-3P 5、10、20 μmol/L组穿过基底膜的侵袭细胞数显著减少($P<0.01$),且均呈一定的浓度依赖趋势。结果见图2、图3和表2。

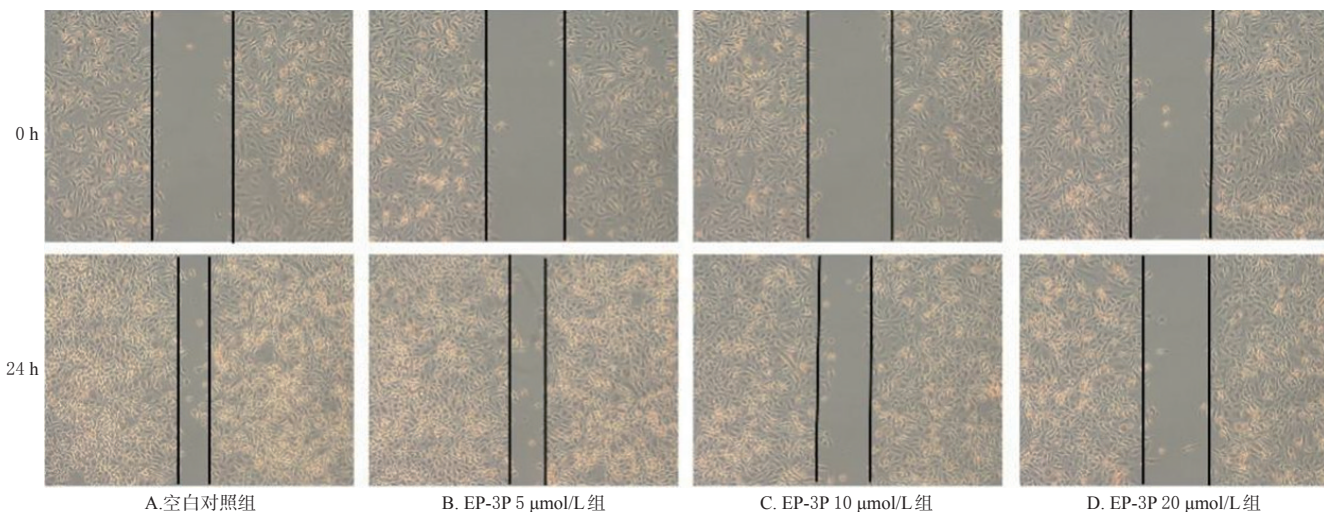


图2 各组细胞迁移能力检测的显微图($\times 200$)

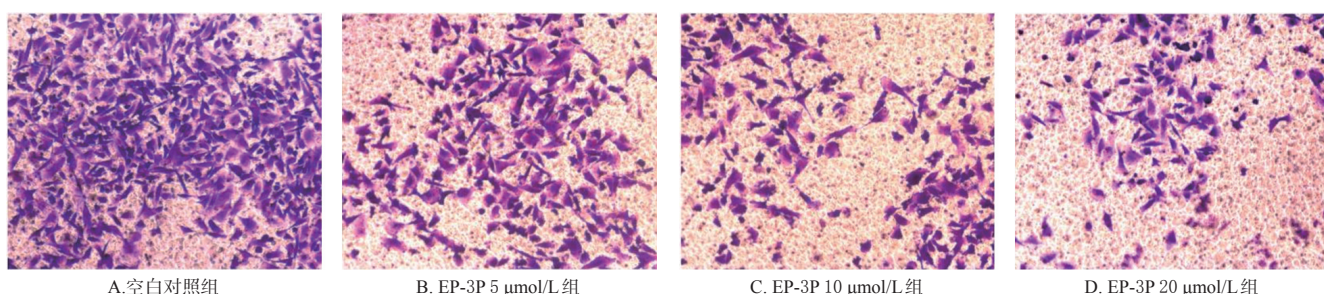


图3 各组细胞侵袭能力检测的显微图($\times 200$)

表2 各组细胞迁移愈合率和侵袭细胞数检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	迁移愈合率/%	侵袭细胞数/个
空白对照组	69.16 \pm 2.65	344.67 \pm 17.39
EP-3P 5 μ mol/L组	63.92 \pm 1.51	196.67 \pm 30.44 ^a
EP-3P 10 μ mol/L组	38.06 \pm 3.17 ^a	128.33 \pm 12.50 ^a
EP-3P 20 μ mol/L组	13.45 \pm 5.37 ^a	98.67 \pm 13.05 ^a

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$

3.3 EP-3P对MDA-MB-231细胞凋亡的影响结果

与空白对照组比较, EP-3P 5、10、20 μ mol/L组细胞的凋亡率显著升高($P < 0.05$), 且呈一定的浓度依赖趋势。结果见图4、表3。

3.4 EP-3P对MDA-MB-231细胞周期分布的影响结果

与空白对照组比较, EP-3P 5、10、20 μ mol/L组G₀/G₁期细胞占比显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), G₂/M期细胞占比显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定的浓度依赖趋势。结果见图5、表3。

3.5 EP-3P对MDA-MB-231细胞中凋亡和侵袭相关蛋白表达的影响结果

与空白对照组比较, EP-3P 5、10、20 μ mol/L组细胞中Bcl-2、MMP-9蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$), 而Bax蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$); EP-3P 10、20 μ mol/L组细胞中caspase-3、MMP-2蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$), 而Cyt-C、cleaved-caspase-3蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$)。结果见图6、表4。

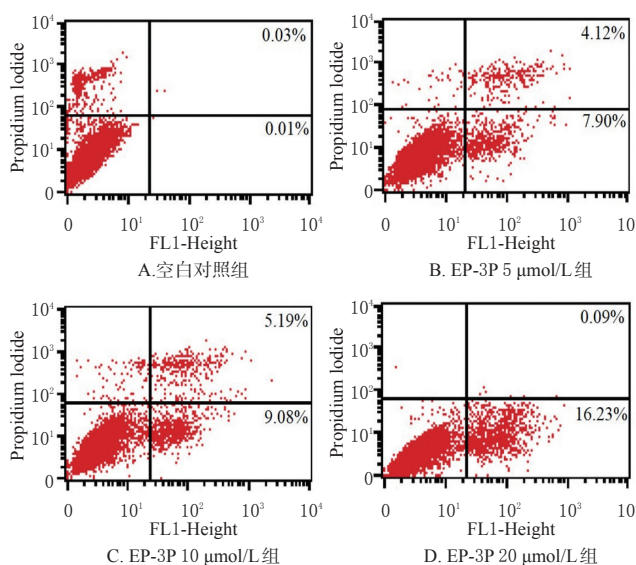


图4 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

表3 各组细胞凋亡率和周期分布百分比测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	凋亡率	周期分布		
		G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白对照组	4.51 \pm 3.90	60.18 \pm 2.97	18.39 \pm 3.45	21.44 \pm 2.74
EP-3P 5 μ mol/L组	14.69 \pm 3.44 ^a	45.16 \pm 8.53 ^a	25.93 \pm 5.75	28.91 \pm 2.83 ^a
EP-3P 10 μ mol/L组	20.66 \pm 6.04 ^a	39.22 \pm 9.48 ^a	29.02 \pm 6.95	31.77 \pm 2.58 ^b
EP-3P 20 μ mol/L组	24.59 \pm 7.22 ^a	34.74 \pm 5.99 ^b	29.63 \pm 6.84	35.64 \pm 2.90 ^b

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与空白对照组比较, $P < 0.01$

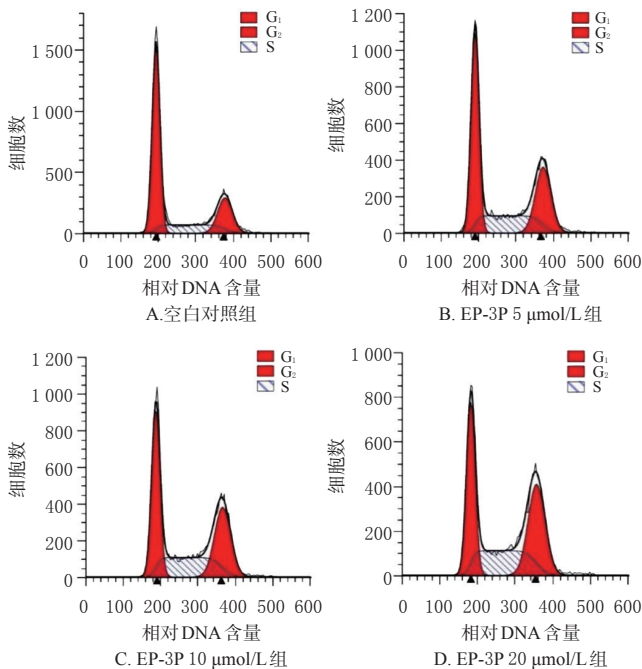


图5 各组细胞周期分布检测的流式细胞图

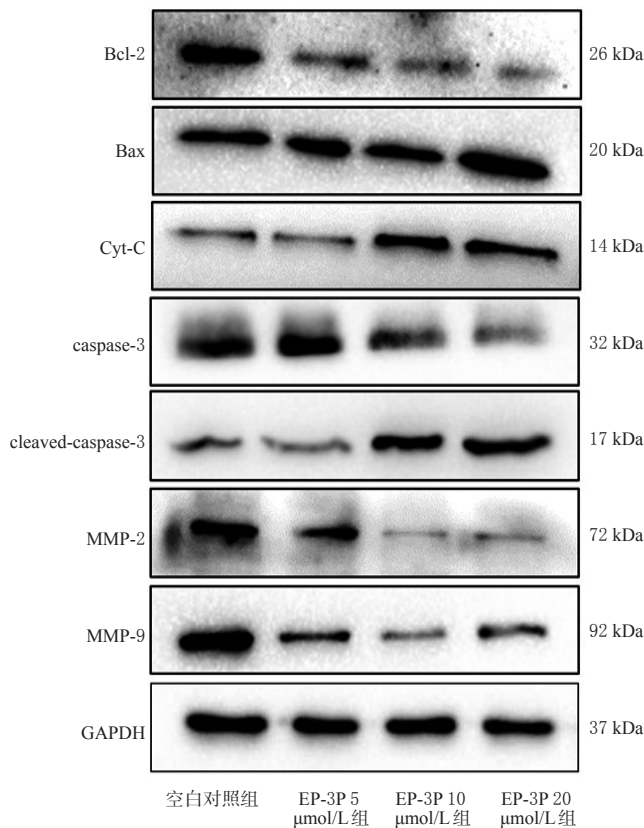


图6 各组细胞中凋亡和侵袭相关蛋白表达的电泳图

表4 各组细胞中凋亡和侵袭相关蛋白的表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Cyt-C/GAPDH	caspase-3/GAPDH	cleaved-caspase-3/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
空白对照组	1.37 ± 0.06	0.96 ± 0.13	0.69 ± 0.05	1.38 ± 0.09	0.68 ± 0.03	1.39 ± 0.02	1.36 ± 0.20
EP-3P 5 μmol/L组	1.03 ± 0.19 ^a	1.24 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.17	1.46 ± 0.07	0.79 ± 0.08	1.23 ± 0.07	0.93 ± 0.13 ^a
EP-3P 10 μmol/L组	0.87 ± 0.11 ^a	1.25 ± 0.08 ^a	1.06 ± 0.11 ^a	0.93 ± 0.24 ^a	1.09 ± 0.11 ^a	0.55 ± 0.26 ^a	0.72 ± 0.12 ^a
EP-3P 20 μmol/L组	0.55 ± 0.13 ^a	1.54 ± 0.07 ^a	1.17 ± 0.15 ^a	0.58 ± 0.06 ^a	1.19 ± 0.11 ^a	0.48 ± 0.20 ^a	0.71 ± 0.09 ^a

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$

4 讨论

EP具有抗病毒、抗癌、抗真菌等药理作用^[15-16]。近年来,EP的抗肿瘤作用也逐渐受到研究者的关注。研究发现,EP可抑制17 β -雌二醇诱导的乳腺癌细胞MCF-7的增殖活性^[17]。El-Sherif等^[5]首次从埃及树脂灵芝菌丝体中分离得到EP,并发现其在体外可显著抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖。据文献^[18]报道,EP可抑制乳腺癌细胞SUM-149、MDA-MB-231的增殖,诱导其凋亡,并可抑制细胞中蛋白激酶B、细胞周期蛋白D1和原癌基因*c-Myc*调控蛋白的表达,从而抑制细胞的迁移和侵袭。然而EP的抗肿瘤作用及机制尚不清楚。本课题组在前期药物筛选时发现,EP的衍生物EP-3P对MDA-MB-231细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(11.29 ± 3.13) μmol/L,对正常人乳腺细胞CCD-1095Sk的IC₅₀为(54.73 ± 2.48) μmol/L;而EP对MDA-MB-231细胞的IC₅₀为(20.54 ± 1.98) μmol/L。上述结果表明,EP-3P对MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用明显强于EP,且其对正常乳腺细胞的毒性作用较弱。本研究中MTT实验和细胞周期实验检测结果显示,EP-3P作用后对MDA-MB-231细胞的增殖有一定抑制作用,可将细胞周期阻滞于G₂/M期,还可有效抑制细胞的迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,并具有一定的浓度依赖趋势。

Bcl-2家族是细胞凋亡研究中最重要的一类,其在线粒体介导的内源性凋亡通路中起着重要作用^[19]。该家族中的Bcl-2和Bax蛋白分别具有抑制和促进细胞凋亡的作用,可通过调节线粒体膜的通透性来调控线粒体凋亡途径^[20]。在正常状态下,Cyt-C位于线粒体外膜,当外膜通透性增加时,Cyt-C进入细胞质,引起caspase级联放大反应,导致caspase-3进入活化状态(即cleaved-caspase-3);活化的caspase-3可裂解细胞内生物酶结构中的天冬氨酸残基肽键,使酶失活,从而导致细胞凋亡^[21]。本研究结果显示,EP-3P作用于MDA-MB-231细胞后,可以诱导细胞中Bcl-2、caspase-3蛋白表达下调和Bax、Cyt-C、cleaved-caspase-3蛋白表达上调。该结果提示,EP-3P可能通过上调细胞中Bax蛋白表达、下调细胞中Bcl-2蛋白表达,介导线粒体的内源性途径来诱导MDA-MB-231细胞凋亡。

MMP-2和MMP-9是MMPs家族的重要成员,可参与肿瘤细胞转移的调控。已有相关报道证实,MMP-2和MMP-9的高表达可能与乳腺癌的高转移潜能有关^[22-23]。本研究发现,EP-3P可以有效抑制MDA-MB-231细胞中

MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达,表明 EP-3P 可能是通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达从而影响 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭。

综上所述,EP-3P 可通过线粒体介导的内源性 caspase 途径抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖、迁移和侵袭,并可诱导细胞发生凋亡。本研究结果为后续研究 EP-3P 抗乳腺癌作用机制提供了一定参考,但本研究仅采用单一的乳腺癌细胞系进行了实验,有关 EP-3P 对其他肿瘤细胞及其抗乳腺癌的相关机制有待进一步探讨。同时,衍生物 EP-3P 抑制乳腺癌细胞转移和凋亡的作用是否优于其先导化合物 EP,尚需进一步验证。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(1):1-14.
- [3] DEMBITSKY V M, GLORIOZOVA T A, POROIKOV V V. Natural peroxy anticancer agents[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2007, 7(6):571-589.
- [4] ZHANG C C, YIN X, CAO C Y, et al. Chemical constituents from *Hericium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(22):5078-5082.
- [5] EL-SHERIF N F, AHMED S A, IBRAHIM A K, et al. Ergosterol peroxide from the Egyptian red Lingzhi or reishi mushroom, *Ganoderma resinaceum* (Agaricomycetes), showed preferred inhibition of MCF-7 over MDA-MB-231 breast cancer cell lines[J]. *Int J Med Mushrooms*, 2020, 22(4):389-396.
- [6] MEZA-MENCHACA T, POBLETE-NAREDO I, ALBORES-MEDINA A, et al. Ergosterol peroxide isolated from oyster medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), potentially induces radiosensitivity in cervical cancer[J]. *Int J Med Mushrooms*, 2020, 22(11):1109-1119.
- [7] NOWAK R, DROZD M, MENDYK E, et al. A new method for the isolation of ergosterol and peroxyergosterol as active compounds of *Hygrophoropsis aurantiaca* and *in vitro* antiproliferative activity of isolated ergosterol peroxide[J]. *Molecules*, 2016, 21(7):946.
- [8] HE L F, SHI W J, LIU X C, et al. Anticancer action and mechanism of ergosterol peroxide from *Paecilomyces cicadae* fermentation broth[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12):3935.
- [9] WU Q P, XIE Y Z, DENG Z Q, et al. Ergosterol peroxide isolated from *Ganoderma lucidum* abolishes microRNA miR-378-mediated tumor cells on chemoresistance[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e44579.
- [10] JEONG Y U, PARK Y J. Ergosterol peroxide from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* inhibits differentiation and lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2):460.
- [11] LI H L, WANG H J, WANG J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 5 α , 8 α -endoperoxide steroidal derivatives with hybrid side chain as anticancer agents[J]. *Steroids*, 2020, 153:108471.
- [12] HAN Y L, LIN Y, WANG Y Q, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of steroidal endoperoxide derivatives with hydrazide side chain as anticancer agents[J]. *Heterocycles*, 2020, 100(5):790-801.
- [13] BU M, CAO T T, LI H X, et al. Synthesis of 5 α , 8 α -ergosterol peroxide 3-carbamate derivatives and a fluorescent mitochondria-targeting conjugate for enhanced anticancer activities[J]. *Chem Med Chem*, 2017, 12(6):466-474.
- [14] CHEN X X, GAO F, WANG Q, et al. Design, synthesis and biological evaluation of paclitaxel-mimics possessing only the oxetane D-ring and side chain structures[J]. *Fito-terapia*, 2014, 92:111-115.
- [15] DIEU A, MAMBU L, CHAMPAVIER Y, et al. Antibacterial activity of the lichens *Usnea florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae) [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(23):3358-3362.
- [16] DUAN C, WANG J C, LIU Y, et al. Antiviral effects of ergosterol peroxide in a pig model of porcine *Deltacoronavirus* (PDCoV) infection involves modulation of apoptosis and tight junction in the small intestine[J]. *Vet Res*, 2021, 52(1):86.
- [17] LEE S, LEE D, RYOO R, et al. Calvatianone, a sterol possessing a 6/5/6/5-fused ring system with a contracted tetrahydrofuran B-ring, from the fruiting bodies of *Calvatia nipponica*[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(9):2737-2742.
- [18] MARTÍNEZ-MONTEMAYOR M M, LING T T, SUÁREZ-ARROYO I J, et al. Identification of biologically active *Ganoderma lucidum* compounds and synthesis of improved derivatives that confer anti-cancer activities *in vitro*[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:115.
- [19] GROSS A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8):1243-1246.
- [20] CAMPBELL K J, TAIT S W G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer[J]. *Open Biol*, 2018, 8(5):180002.
- [21] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36:489-517.
- [22] LI K, TAY F R, YIU C K Y. The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 207:107465.
- [23] ALREHAILI A A, GHARIB A F, KARAM R A, et al. Clinical significance of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as biomarkers for tumor expression in breast cancer patients in Egypt[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(2):1153-1160.

(收稿日期:2022-01-18 修回日期:2022-04-23)
(编辑:林 静)