

核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及 EGFR/MAPK 信号通路的影响^Δ

张硕稳^{1*}, 李 丹¹, 贺 静¹, 杜志兴¹, 庞建民¹, 李瑞池¹, 刘永建^{1#}, 郑丽华² (1. 河北医科大学第一医院健康管理中心, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学第一医院普外科, 石家庄 050000)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)06-0684-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.012

摘 要 目的:探讨核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及表皮生长因子受体(EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响。方法:采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)筛选干预乳腺癌 MCF-7 细胞的核桃青皮提取物合适浓度。将乳腺癌 MCF-7 细胞分为空白对照组、阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组、核桃青皮提取物高浓度组和核桃青皮提取物高浓度+EGFR 激动剂(NSC228155)组。采用 CCK-8 和集落形成实验检测各组细胞增殖情况;采用 TUNEL 法和流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况;采用蛋白质印迹法检测各组细胞中增殖、凋亡及 EGFR/MAPK 信号通路相关蛋白表达水平。结果:当核桃青皮提取物浓度 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞增殖率显著降低,故选择 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 分别为核桃青皮提取物低浓度组、高浓度组的核桃青皮提取物处理浓度。与空白对照组相比,阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组和高浓度组细胞增殖率、细胞集落形成数量,细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、增殖细胞核抗原(PCNA)和 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)蛋白表达水平,磷酸化 EGFR(p-EGFR)/EGFR、磷酸化胞外信号调节激酶(p-ERK)/胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)/p38 MAPK 和磷酸化 c-Jun 氨基端蛋白激酶(p-JNK)/c-Jun 氨基端蛋白激酶(JNK)蛋白比值均显著降低;TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与核桃青皮提取物低浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度组细胞增殖率、细胞集落形成数量,CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平,p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值均降低;TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率和 Bax 蛋白表达水平均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。核桃青皮提取物高浓度组与阳性对照组上述指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。与核桃青皮提取物高浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组细胞增殖率、细胞集落形成数量,CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平,p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值均升高;TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率和 Bax 蛋白表达水平均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:核桃青皮提取物可能通过抑制 EGFR/MAPK 信号通路抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,诱导其凋亡。

关键词 核桃青皮提取物;乳腺癌 MCF-7 细胞;增殖;凋亡;表皮生长因子受体/丝裂原活化蛋白激酶信号通路

Effects of Walnut Green Husk Extract on Proliferation, Apoptosis and EGFR/MAPK Signal Pathway of Breast Cancer MCF-7 Cells^Δ

ZHANG Shuowen¹, LI Dan¹, HE Jing¹, DU Zhixing¹, PANG Jianmin¹, LI Ruichi¹, LIU Yongjian¹, ZHENG Lihua² (1. Health Management Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Dept. of General Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of walnut green husk extract on proliferation, apoptosis and epidermal growth factor receptor (EGFR)/mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway of breast cancer MCF-7 cells. **METHODS:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to screen the proper concentration of walnut husk extract interfering with breast cancer MCF-7 cells. The breast cancer MCF-7 cells were divided into the blank control group, positive control group, walnut husk extract low concentration group, walnut green husk extract high concentration group, walnut green husk extract high concentration + EGFR agonist (NSC228155) group. CCK-8 and colony formation experiment were used to detect cell proliferation in each group. TUNEL method and flow cytometry were used to detect cell apoptosis in each group. Western blot was used to detect the expression levels of proliferation, apoptosis and EGFR/MAPK signaling pathway related proteins of cells in each group. **RESULTS:** When the concentration of walnut green husk extract was $\geq 20 \mu\text{g/mL}$, the cell proliferation rate decreased significantly, 20 $\mu\text{g/mL}$ and 40 $\mu\text{g/mL}$ were selected as the walnut green husk extract low and high concentration treatment,

^Δ 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No. 20190484)

* 主治医师。研究方向:乳腺肿瘤。E-mail: zhangshuowen374@163.com

通信作者:主治医师。研究方向:乳腺肿瘤。E-mail: zswykd@qq.com

respectively. Compared with the blank control group, the cell proliferation rate, the number of cell colonies, the expression levels of CyclinD1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and B cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein, the ratio of phosphorylated-EGFR (p-EGFR)/EGFR, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphorylated-p38 MAPK (p-p38 MAPK)/p38 MAPK and phosphorylated c-Jun amino-terminal protein kinase (p-JNK)/c-Jun amino-terminal protein kinase (JNK) protein in the positive control group, the walnut green husk extract low concentration group and high concentration group decreased significantly, and the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the expression level of Bcl-2 related X protein (Bax) increased significantly, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the walnut green husk extract low concentration group, the cell proliferation rate, the number of cell colonies, the expression levels of CyclinD1, PCNA and Bcl-2 protein, the ratio of p-EGFR/EGFR, p-ERK/ERK, p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-JNK/JNK protein in the walnut green husk extract high concentration group decreased, and the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the expression level of Bax protein increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the walnut green husk extract high concentration group and the positive control group ($P>0.05$). Compared with the walnut green husk extract high concentration group, the cell proliferation rate, the number of cell colonies, the expression levels of CyclinD1, PCNA and Bcl-2 protein, the ratio of p-EGFR/EGFR, p-ERK/ERK, p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-JNK/JNK protein in the walnut green husk extract high concentration + NSC228155 group increased, and the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the expression level of Bax protein decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Walnut green husk extract may inhibit the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and induce the apoptosis by inhibiting the EGFR/MAPK signaling pathway.

KEYWORDS Walnut green husk extract; Breast cancer MCF-7 cells; Proliferation; Apoptosis; Epidermal growth factor receptor/mitogen activated protein kinase signaling pathway

乳腺癌是一种异质性疾病,被认为是世界女性中发病率和病死率较高的一种恶性肿瘤^[1]。根据国际癌症研究机构2018年发布的全球统计数据,乳腺癌的发病患者占有恶性肿瘤的11.6%,乳腺癌为仅次于肺癌的全球第二大常见恶性肿瘤^[2]。尽管在诊断和联合治疗方面取得了进步,但乳腺癌患者的预后仍然不令人满意^[3]。近年来,随着中医药的快速发展,越来越多的天然产物被发现具有抗肿瘤作用^[4]。据研究报道,核桃青皮中具有多种药理活性成分,如核桃多糖、胡桃醌和鞣花酸等,具有抗菌、镇痛和抑癌等功效^[5-6]。高杨等^[7]的研究结果表明,核桃青皮提取物可显著抑制胃癌细胞的增殖和转移,可能是胃癌预防的潜在治疗药物。然而,核桃青皮提取物在乳腺癌中是否有相同的功效还未可知。表皮生长因子受体(EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路为细胞中重要的调控机制,且已证实抑制EGFR/MAPK通路可诱导乳腺癌MCF-7细胞凋亡^[8]。推测核桃青皮提取物可能通过抑制EGFR/MAPK信号通路抑制乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡。为验证该猜想,进行了以下研究,以期对乳腺癌的治疗提供帮助。

1 材料

1.1 实验细胞

人乳腺癌MCF-7细胞(批号为CM-H061),购自美国模式培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 仪器

LT-CIX90型CO₂细胞培养箱、DG5031型酶标仪,均购自上海立德泰勃科学仪器有限公司;M205FA型显微镜、Attune NxT型流式细胞仪、GIS-300型凝胶成像系统,均购自北京昊

诺斯科技有限公司。

1.3 药品与试剂

核桃青皮提取物(原料药,纯度 $\geq 98\%$,批号为WJ-6013R)购自西安四叶草生物科技有限公司;盐酸阿霉素(原料药,纯度99%,批号为25219-27,实验时用完全培养液稀释成浓度为0.01 mg/mL)购自山东永信中和生物科技有限公司;DEME培养基(批号为LM-P0523)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)增殖检测试剂盒(批号为LM-K0149),均购自上海联迈生物公司;EGFR激动剂(NSC228155,批号为HY-10142)购自美国MedChemExpress公司;TUNEL红色荧光原位凋亡检测试剂盒(批号为A209-11)、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(批号为A315-14),均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;高效RIPA细胞快速缓冲液(批号为R4512)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号为PC01595)和ECL超敏发光液(批号为PE0615-28),均购自北京索莱宝科技有限公司;鼠抗人细胞周期蛋白D1(CyclinD1,批号为ab170099)、增殖细胞核抗原(PCNA,批号为ab52894)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2,批号为ab40815)、Bcl-2相关X蛋白(Bax,批号为ab201015)、EGFR(批号为ab32503)、磷酸化EGFR(p-EGFR,批号为ab219584)、胞外信号调节激酶(ERK,批号为ab92552)、磷酸化ERK(p-ERK,批号为ab182858)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK,批号为ab179461)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK,批号为ab184699)、c-Jun氨基端蛋白激酶(JNK,批号为ab16713)、磷酸化JNK(p-JNK,批号为ab60124)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,批号为ab00129)单克隆抗体、鼠抗人二抗(批号为ab00258),均购自美国Abcam公司。

2 方法

2.1 细胞培养

乳腺癌 MCF-7 细胞在含 10%胎牛血清的 DEME 培养基中培养,培养条件为 37 ℃、5%CO₂ 的湿润培养箱,至细胞融合度>70%,进行传代培养,选择传 3 代对数期生长的细胞进行后续研究。

2.2 CCK-8 检测不同浓度核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

将对数期生长的乳腺癌 MCF-7 细胞接种于 96 孔板中(5×10³ 个/孔),待细胞贴壁生长后,更换为含不同浓度梯度的核桃青皮提取物(0、5、10、20、40 和 80 μg/mL)的培养基培养 48 h。依次向每孔中添加 CCK-8 溶液 10 μL,继续培养 2 h 后使用酶标仪检测各孔乳腺癌 MCF-7 细胞在 450 nm 波长处的吸光度(OD),计算细胞增殖率。细胞增殖率=OD_{实验组}/OD_{对照组}×100%,实验组为不同浓度梯度的核桃青皮提取物组,对照组为 0 μg/mL 核桃青皮提取物组。各组均设 6 个平行样。

2.3 细胞分组

将对数期生长的乳腺癌 MCF-7 细胞依次分为空白对照组、阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组、核桃青皮提取物高浓度组和核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组。空白对照组细胞不进行任何处理,正常培养 48 h;阳性对照组细胞使用含 0.01 mg/mL 盐酸阿霉素^[9]的培养基培养 48 h;核桃青皮提取物低、高浓度组细胞分别使用含 20、40 μg/mL 核桃青皮提取物的培养基培养 48 h;核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组细胞使用含 40 μg/mL 核桃青皮提取物和 100 μmol/L NSC228155^[10]的培养基培养 48 h。各组均设 6 个平行样。通过“2.2”项下方法,采用 CCK-8 检测各组乳腺癌 MCF-7 细胞增殖情况。

2.4 集落形成实验检测各组乳腺癌 MCF-7 细胞集落形成数量

将经过“2.3”项下方法处理的各组乳腺癌 MCF-7 细胞接种于培养皿中(1×10² 个/皿),以十字线方向轻轻晃动培养皿,使细胞均匀分散。将培养皿置于培养箱中培养 2~3 周,期间根据培养基 pH 变化更换培养基;直至出现肉眼可见的克隆时,中止培养。吸出培养基后干燥。添加甲醇固定 15 min,后使用 Giemsa 染色 10 min,轻轻冲洗掉染色液,干燥后于显微镜中拍照并对>50 个细胞克隆数的集落进行计数。

2.5 TUNEL 法检测各组乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡水平

将经过“2.3”项下方法处理的各组乳腺癌 MCF-7 细胞制备形成 5×10⁷ 个/mL 的悬浮液,吸取 100 μL 接种至细胞爬片上,待爬满细胞后使用磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗细胞,添加甲醇固定 15 min。之后严格按照 TUNEL 红色荧光原位凋亡检测试剂盒说明进行操作。在显微镜下观察,并统计凋亡细胞数量,TUNEL 阳性细胞率=每个视野中凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.6 流式细胞仪检测各组乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡率

将经过“2.3”项下方法处理的各组乳腺癌 MCF-7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中(1×10⁵ 个/孔),培养 24 h,使用 PBS 洗涤细胞,将细胞悬浮于结合缓冲液中,并添加 Annexin

V-FITC 和碘化丙啶(PI)各 5 μL,于 4 ℃下避光孵育 30 min,使用结合缓冲液洗涤 3 次以去除多余的染料,后重悬于 500 μL 的结合缓冲液中,在 1 h 内使用流式细胞仪分析各组乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡率。

2.7 蛋白免疫印迹法检测各组乳腺癌 MCF-7 细胞中增殖、凋亡及 EGFR/MAPK 信号通路相关蛋白的表达水平

使用高效 RIPA 细胞快速缓冲液提取按照“2.3”项下方法处理的各组乳腺癌 MCF-7 细胞总蛋白,经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量。通过电泳分离蛋白,然后转移至聚偏氟乙 烯膜上,使用 TBST 配制的 5%牛血清白蛋白封闭 1 h,将聚偏氟乙 烯膜与 CyclinD1、PCNA、Bax、Bcl-2、p-EGFR、EGFR、p-ERK、ERK、p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-JNK、JNK 和 GAPDH 一抗(均为 1:1 000)在 4 ℃下孵育过夜。隔日洗膜 3 次后添加鼠抗人二抗(1:3 000)室温(25 ℃)孵育 1 h。最后,使用 ECL 超敏发光液可视化免疫印迹,采用 Image J 软件分析蛋白质印迹的灰度值。

2.8 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件处理数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

使用不同浓度核桃青皮提取物干预乳腺癌 MCF-7 细胞,结果显示,当核桃青皮提取物浓度<20 μg/mL 时,各浓度下细胞增殖率的差异均无统计学意义(*P*>0.05);当核桃青皮提取物浓度≥20 μg/mL 时,细胞增殖率显著降低,与 0 μg/mL 比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。故选择 20、40 μg/mL 分别为低、高浓度核桃青皮提取物处理浓度。

表 1 不同浓度的核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 1 Effects of different concentrations of walnut green husk extract on proliferation of breast cancer MCF-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

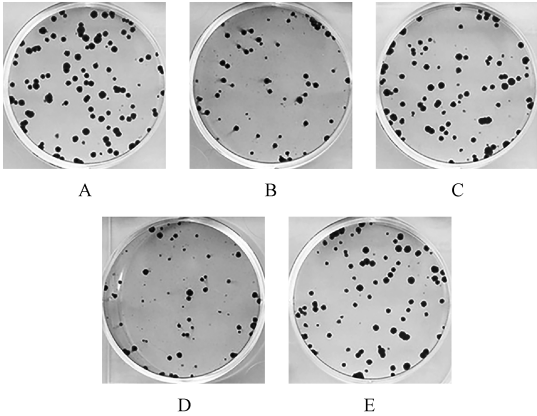
核桃青皮提取物浓度/(μg/mL)	细胞增殖率/%
0	100.00±0.00
5	89.32±5.47
10	83.11±5.08
20	76.62±6.12 ^a
40	61.89±5.04 ^a
80	48.57±4.86 ^a

注:与核桃青皮提取物 0 μg/mL 比较,^a*P*<0.05
Note:rs. the walnut green husk extract 0 μg/mL, ^a*P*<0.05

3.2 各组乳腺癌 MCF-7 细胞增殖率和集落形成数量比较

与空白对照组相比,阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组和高浓度组细胞增殖率、细胞集落形成数量均显著降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与阳性对照组相比,核桃青皮提取物低浓度组细胞增殖率、集落形成数量升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);而核桃青皮提取物高浓度组细胞增殖率、集落形成数量与阳性对照组的差异无统计学意义(*P*>0.05);与核桃青皮提取物低浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度组细胞增殖率、集落形成数量降低,差异有统计学意义(*P*<

0.05);与核桃青皮提取物高浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组细胞增殖率、集落形成数量升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1、表 2。



A. 空白对照组;B. 阳性对照组;C. 核桃青皮提取物低浓度组;D. 核桃青皮提取物高浓度组;E. 核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组
A. blank control group; B. positive control group; C. walnut green husk extract low concentration group; D. walnut green husk extract high concentration group; E. walnut green husk extract high concentration+NSC228155 group

图 1 五组乳腺癌 MCF-7 细胞集落形成染色图 (Giemsa 染色,×40)

Fig 1 Colony formation staining of breast cancer MCF-7 cells in five groups (Giemsa staining, ×40)

表 2 五组乳腺癌 MCF-7 细胞增殖率和集落形成数量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Comparison of proliferation rate and number of colonies of breast cancer MCF-7 cells among five groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

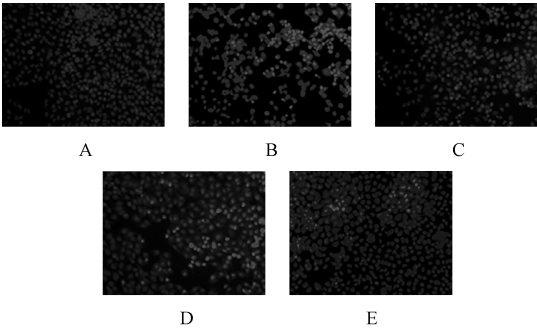
组别	细胞增殖率/%	集落形成数量/个
空白对照组	100.00±0.00	87.23±4.86
阳性对照组	60.98±5.08 ^a	45.33±5.08 ^a
核桃青皮提取物低浓度组	75.33±3.12 ^{ab}	68.25±4.08 ^{ab}
核桃青皮提取物高浓度组	62.31±4.26 ^{ac}	42.33±3.96 ^{ac}
核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组	72.34±5.52 ^{abd}	59.27±4.02 ^{abd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与阳性对照组比较,^b $P<0.05$;与核桃青皮提取物低浓度组比较,^c $P<0.05$;与核桃青皮提取物高浓度组比较,^d $P<0.05$

Note:rs. the blank control group, ^a $P<0.05$; rs. the positive control group, ^b $P<0.05$; rs. the walnut green husk extract low concentration group, ^c $P<0.05$; rs. the walnut green husk extract high concentration group, ^d $P<0.05$

3.3 各组乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡情况比较

与空白对照组相比,阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组和高浓度组 TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与阳性对照组相比,核桃青皮提取物低浓度组 TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而核桃青皮提取物高浓度组 TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率与阳性对照组的差异无统计学意义($P>0.05$);与核桃青皮提取物低浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度组 TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与核桃青皮提取物高浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组 TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2—3、表 3。



A. 空白对照组;B. 阳性对照组;C. 核桃青皮提取物低浓度组;D. 核桃青皮提取物高浓度组;E. 核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组
A. blank control group; B. positive control group; C. walnut green husk extract low concentration group; D. walnut green husk extract high concentration group; E. walnut green husk extract high concentration+NSC228155 group

图 2 五组乳腺癌 MCF-7 细胞 TUNEL 染色图 (×200)

Fig 2 TUNEL staining of breast cancer MCF-7 cells in five groups (×200)

表 3 五组乳腺癌 MCF-7 细胞 TUNEL 阳性细胞率和细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 3 Comparison of rate of TUNEL positive cells and apoptosis rate of breast cancer MCF-7 cells among five groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

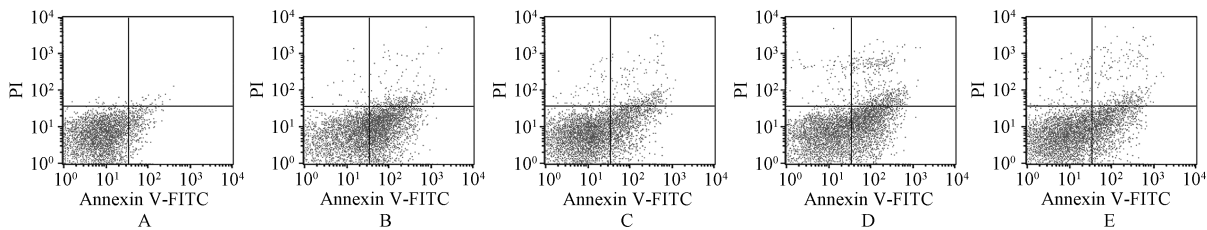
组别	TUNEL 阳性细胞率/%	细胞凋亡率/%
空白对照组	7.62±2.01	10.36±2.34
阳性对照组	45.23±5.10 ^a	52.84±5.74 ^a
核桃青皮提取物低浓度组	22.86±4.11 ^{ab}	26.79±4.38 ^{ab}
核桃青皮提取物高浓度组	43.15±3.05 ^{ac}	49.96±3.42 ^{ac}
核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组	26.32±4.20 ^{abd}	31.45±4.48 ^{abd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与阳性对照组比较,^b $P<0.05$;与核桃青皮提取物低浓度组比较,^c $P<0.05$;与核桃青皮提取物高浓度组比较,^d $P<0.05$

Note:rs. the blank control group, ^a $P<0.05$; rs. the positive control group, ^b $P<0.05$; rs. the walnut green husk extract low concentration group, ^c $P<0.05$; rs. the walnut green husk extract high concentration group, ^d $P<0.05$

3.4 各组乳腺癌 MCF-7 细胞中增殖、凋亡相关蛋白表达水平比较

与空白对照组相比,阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组和高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,Bax 蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与阳性对照组相比,核桃青皮提取物低浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平升高,Bax 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);而核桃青皮提取物高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平与阳性对照组的差异均无统计学意义($P>0.05$);与核桃青皮提取物低浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Bax 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与核桃青皮提取物高浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平升高,Bax 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4—5。

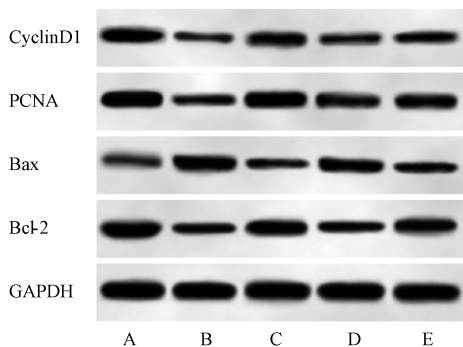


A. 空白对照组; B. 阳性对照组; C. 核桃青皮提取物低浓度组; D. 核桃青皮提取物高浓度组; E. 核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组

A. blank control group; B. positive control group; C. walnut green husk extract low concentration group; D. walnut green husk extract high concentration group; E. walnut green husk extract high concentration+NSC228155 group

图3 五组乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡流式图

Fig 3 Apoptosis flow chart of breast cancer MCF-7 cells in five groups

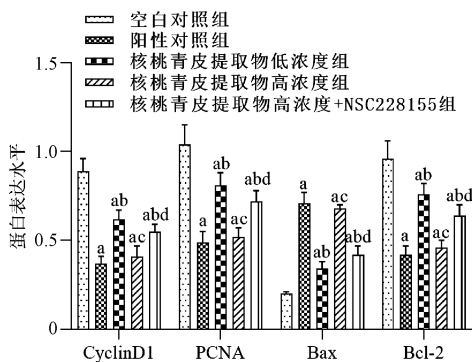


A. 空白对照组; B. 阳性对照组; C. 核桃青皮提取物低浓度组; D. 核桃青皮提取物高浓度组; E. 核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组

A. blank control group; B. positive control group; C. walnut green husk extract low concentration group; D. walnut green husk extract high concentration group; E. walnut green husk extract high concentration+NSC228155 group

图4 五组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白质印迹图

Fig 4 Western blotting of CyclinD1, PCNA, Bax and Bcl-2 protein in breast cancer MCF-7 cells of five groups



与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与核桃青皮提取物低浓度组比较, ^c $P < 0.05$; 与核桃青皮提取物高浓度组比较, ^d $P < 0.05$

Note: vs. the blank control group, ^a $P < 0.05$; vs. the positive control group, ^b $P < 0.05$; vs. the walnut green husk extract low concentration group, ^c $P < 0.05$; vs. the walnut green husk extract high concentration group, ^d $P < 0.05$

图5 五组乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较

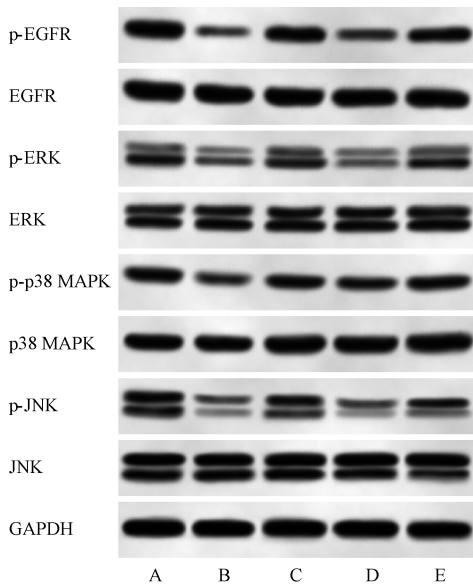
Fig 5 Comparison of expression levels of CyclinD1, PCNA, Bax and Bcl-2 protein in breast cancer MCF-7 cells among five groups

3.5 各组乳腺癌 MCF-7 细胞中 EGFR/MAPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

与空白对照组相比,阳性对照组、核桃青皮提取物低浓度组和高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照组相比,核桃青皮提取物低浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而核桃青皮提取物高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值与阳性对照组的差异均无统计学意义($P > 0.05$);与核桃青皮提取物低浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与核桃青皮提取物高浓度组相比,核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 6—7。

4 讨论

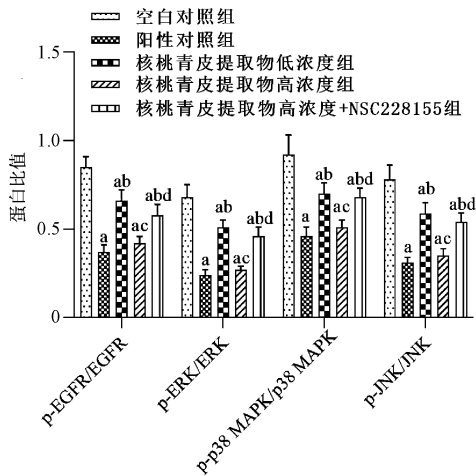
核桃青皮中富含多种生物活性成分,如胡桃醌可抑制卵巢癌细胞增殖、转移并诱导其凋亡,抗肿瘤效果较好^[11];核桃青皮提取物对包括胃癌^[7]、肺癌^[12]在内的多种恶性肿瘤具有一定的抑制作用。本研究通过使用不同浓度的核桃青皮提取物干预乳腺癌 MCF-7 细胞,筛选出合适的核桃青皮提取物处理浓度。经对核桃青皮提取物干预后的乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡检测发现,核桃青皮提取物可明显降低乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖能力,提高细胞凋亡能力,且随着核桃青皮提取物浓度的升高,其影响作用也随之增加。该结果表明,核桃青皮提取物可能通过抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、诱导细胞凋亡,进而发挥抑癌作用。为验证该结果,本研究添加临床抗肿瘤药盐酸阿霉素作为阳性对照,结果发现,低浓度的核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡的作用小于盐酸阿霉素,高浓度的核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 增殖、凋亡的作用与盐酸阿霉素相当,表明在乳腺癌 MCF-7 细胞中,高浓度的核桃青皮提取物与盐酸阿霉素的功效类似,均具有抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、促进细胞凋亡的作用,但其如何在乳腺癌 MCF-7 细胞中发挥作用,还未可知。



A. 空白对照组; B. 阳性对照组; C. 核桃青皮提取物低浓度组; D. 核桃青皮提取物高浓度组; E. 核桃青皮提取物高浓度+NSC228155 组

A. blank control group; B. positive control group; C. walnut green husk extract low concentration group; D. walnut green husk extract high concentration group; E. walnut green husk extract high concentration+NSC228155 group

图 6 五组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR、EGFR、p-ERK、ERK、p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-JNK 和 JNK 蛋白质印迹图
Fig 6 Western blotting of p-EGFR, EGFR, p-ERK, ERK, p-p38 MAPK, p38 MAPK, p-JNK and JNK protein in breast cancer MCF-7 cells among five groups



与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$;
与核桃青皮提取物低浓度组比较, ^c $P < 0.05$; 与核桃青皮
提取物高浓度组比较, ^d $P < 0.05$

Note: vs. the blank control group, ^a $P < 0.05$; vs. the positive control group, ^b $P < 0.05$; vs. the walnut green husk extract low concentration group, ^c $P < 0.05$; vs. the walnut green husk extract high concentration group, ^d $P < 0.05$

图 7 五组乳腺癌 MCF-7 细胞中 p-EGFR/EGFR、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-JNK/JNK 蛋白比值比较
Fig 7 Comparison of p-EGFR/EGFR, p-ERK/ERK, p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-JNK/JNK protein ratios of breast cancer MCF-7 cells among five groups

MAPK 信号通路已被认为是抗恶性肿瘤治疗的有效级联通路, MAPK 为丝氨酸/苏氨酸激酶, 将其特定底物磷酸化为丝氨酸和(或)苏氨酸残基, 以调节基因表达、有丝分裂、增殖、运动、代谢和程序性细胞凋亡^[13]。MAPK 通路具有 3 个亚通路, 包括 ERK、JNK 和 p38 MAPK 亚通路, 据报道, ERK 通路对细胞存活很重要, 而 JNK 和 p38 MAPK 则与细胞的凋亡相关^[14]。已有研究结果证实, 阻断 p38 MAPK 通路可在一定程度上减少白细胞介素 32 诱导的上皮间充质转化标志物的表达和乳腺癌细胞的侵袭及转移^[15]。此外, 调节细胞存活/死亡的途径还涉及 EGFR 通路, EGFR 为受体酪氨酸激酶, 通过各种下游信号通路被激活以促进细胞增殖、运动和存活^[16]; 且已有研究结果证实, EGFR 为三阴性乳腺癌治疗的靶点^[17]。因此, 抑制 EGFR/MAPK 通路可能是治疗乳腺癌的一种新策略。本研究结果发现, 低浓度和高浓度的核桃青皮提取物可下调 EGFR、ERK、p38 MAPK 和 JNK 的磷酸化水平, 表明核桃青皮提取物可能通过抑制 EGFR/MAPK 通路抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 并诱导细胞凋亡。同时, 添加 EGFR 通路激动剂可有效逆转核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及 EGFR/MAPK 通路的影响。此外, 本研究结果亦发现, 核桃青皮提取物可明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中 CyclinD1、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达, 促进 Bax 蛋白表达。已知 CyclinD1、PCNA 是与增殖相关的蛋白, 二者的表达水平可在一定程度上反映细胞的增殖能力; Bcl-2 和 Bax 为凋亡过程中的一对关键因子, 上调 Bax 水平、下调 Bcl-2 水平可有效促进细胞凋亡^[18]。以上结果表明, 核桃青皮提取物通过抑制 EGFR/MAPK 通路调控增殖、凋亡相关蛋白水平, 从而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 促进细胞凋亡。

综上所述, 核桃青皮提取物通过抑制 EGFR/MAPK 信号通路对乳腺癌 MCF-7 细胞发挥抑制其增殖、促进其凋亡的作用, 并可能与调控增殖、凋亡相关蛋白有关, 为乳腺癌的预防和治疗提供了新的思路。但本研究并未探究是否还有其他通路参与核桃青皮提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡的作用, 以及 EGFR/MAPK 信号通路是否直接调控增殖、凋亡相关的蛋白发挥作用, 后续将从这两个方向重点探究, 以完善核桃青皮提取物的功效。

参考文献

- [1] GROZA M, ZIMTA A A, IRIMIE A, et al. Recent advancements in the study of breast cancer exosomes as mediators of intratumoral communication[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 691-705.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] FIROUZABADI D, DEHGHANIAN A, REZVANI A, et al. Addition of carboplatin-gemcitabine as second-line neoadjuvant chemotherapy in non-responsive locally advanced breast cancer patients to standard neoadjuvant chemotherapy and evaluation of factors affecting response: a randomized controlled trial[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 47.

(下转第 695 页)