

## · 论著 ·

# 鞣花酸对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖及 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 信号通路的影响

李文仿 欧琴 张丹峰 张华 赵宗彬

**【摘要】 目的** 探讨鞣花酸对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖侵袭转移的作用。**方法** 采用 0 (对照)、6、12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸培养液分别处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 分别于培养后 24、48、72 h 计数 MDA-MB-231 细胞数。细胞趋化实验观察鞣花酸对 MDA-MB-231 细胞趋化运动的影响, Western Blot 观察鞣花酸对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 SDF-1 $\alpha$  信号通路激活的抑制作用。数据分析采用重复测量的方差分析, 两两比较采用 SNK-q 分析方法。**结果** 与对照组比较, 6、12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸处理组在 24、48、72 h 的细胞计数显著降低。重复测量的方差分析结果提示分组比较 ( $F=4875.56, P=0.00$ ) 及三个时间点间比较 ( $F=670.73, P=0.00$ ) 差异有统计学意义, 而分组与时间有交互作用 ( $F=122.92, P=0.00$ ), 表明鞣花酸对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖有显著抑制作用。乳腺癌细胞趋化运动实验提示各组乳腺癌细胞的趋化数分别为  $(14.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$ 、 $(7.70 \pm 0.58) \times 10^5/\text{ml}$ 、 $(3.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$ , 差异有统计学意义 ( $F=117.57, P=0.00$ )。Western Blot 结果显示鞣花酸明显抑制 CXCR4 表达及 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 对乳腺癌细胞 AKT 信号通路的激活。**结论** 鞣花酸可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖, SDF1 $\alpha$ /CXCR4 介导的细胞趋化运动及其 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 信号通路激活, 在预防乳腺癌复发及转移中可能有潜在价值。

**【关键词】** 鞣花酸; 乳腺肿瘤; 受体, CXCR4

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Effect of ellagic acid on proliferation and SDF1 $\alpha$ /CXCR4 signal path in breast cancer cells MDA-MB-231** LI Wen-fang\*, OU Qin, ZHANG Dan-feng, ZHANG Hua, ZHAO Zong-bin. \* Department of General Surgery, Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical University, Shiyan 442000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of ellagic acid on proliferation and invasion and metastasis of breast cancer cells MDA-MB-231. **Methods** The MDA-MB-231 cells were cultured and treated with 0 (control group), 6, 12  $\mu\text{g/ml}$  ellagic acid respectively, then the cells were counted at 24, 48, 72 h after culture. Chemotaxis experiment and Western Blot were conducted to observe the effects of ellagic acid on chemotactic movement of MDA-MB-231 cells and SDF-1 $\alpha$  signaling pathway activation. The data were analyzed using repeated measurement analysis of variance, and pairwise comparison was performed using the SNK-q analysis. **Results** Compared with the control group, cell counts in 6, 12  $\mu\text{g/ml}$  ellagic acid treatment groups were significantly reduced at 24, 48, 72 h. Repeated measurement analysis of variance indicated that the comparison between groups ( $F=4875.56, P=0.00$ ) and among the three time points ( $F=670.727, P=0.00$ ) showed a statistically significant difference and the interaction existed between group and time ( $F=122.92, P=0.00$ ). It showed that ellagic acid can significantly inhibit the proliferation of breast cancer cells MDA-MB-231. Chemotaxis experiment of breast cancer cells showed that chemotactic cells were  $(14.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$ ,  $(7.70 \pm 0.58) \times 10^5/\text{ml}$ ,  $(3.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$  in each group respectively, and the difference was statistically significant ( $F=117.57, P=0.00$ ). Western Blot result showed that ellagic acid significantly inhibited CXCR4 expression and activation of AKT signaling pathway by SDF1 $\alpha$ /CXCR4 in breast cancer cells. **Conclusion** Ellagic acid can inhibit the proliferation and SDF1 $\alpha$ /CXCR4 mediated chemotactic movement of breast cancer cells MDA-MB-231 and regress the activation of SDF1 $\alpha$ /CXCR4 signaling pathway, which may have potential value in the prevention of breast cancer recurrence and metastasis.

**【Key words】** Ellagic acid; Breast neoplasms; Receptors, CXCR4

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.06.005

基金项目:十堰市太和医院院级项目(2012TXXM01)

作者单位:442000 湖北 十堰, 湖北医药学院附属太和医院普外三科(李文仿, 张丹峰, 张华, 赵宗彬), 微生物教研室(欧琴)

通信作者:赵宗彬, Email:2671422764@qq.com

鞣花酸(ellagic acid)是一种在各种蔬菜及水果(包括山核桃、石榴、枸杞等)中广泛分布的天然黄酮化合物。它是没食子酸的二聚衍生物,是一种多酚二内酯,不仅能以游离的形式存在,而且更多的是以缩合形式(如鞣花单宁、鞣花苷等)存在于自然界。它是天然酚类抗氧化剂,具有明显的抗增生和抗氧化特性,这激发了学者们对鞣花酸潜在的抗肿瘤价值的研究<sup>[1]</sup>。鞣花酸可以通过抗增殖和诱导凋亡机制抑制甲状腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤细胞的生长<sup>[2]</sup>。

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancers, TNBC)是指 ER、PR 和 HER-2 均为阴性的一种特殊类型乳腺癌<sup>[3]</sup>。TNBC 约占所有乳腺癌的 15%,其许多生物学特性和基底细胞样型乳腺癌相似,但两者之间存在某些基因表达谱和免疫表型上的差异,因此亦不能完全等同。TNBC 因缺乏内分泌及抗 HER-2 治疗的靶点,目前尚无针对性的标准治疗方案。TNBC 的内科治疗仍以化疗为主,然而晚期 TNBC 的治疗选择有限,多数患者已接受过蒽环类、紫杉类和环磷酰胺治疗,一旦复发转移,可选择的药物很少,患者预后极差。本文研究了鞣花酸对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 的增殖、趋化运动及信号激活的抑制作用,探讨了鞣花酸用于乳腺癌防治的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自中国科学院细胞库上海保藏中心,细胞在含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素的培养基 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养,每 3~4 d 传代一次,取对数生长期的细胞进行实验,高纯度鞣花酸购自上海顺强科技有限公司(批号:476-66-4),兔抗人趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗人磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT) 及内参照 (GAPDH) 单克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司。

### 1.2 细胞计数实验

用 DMEM 培养液调整 MDA-MB-231 细胞数为  $1.5 \times 10^5$ /ml,将 2 ml 含有 MDA-MB-231 细胞的 DMEM 培养液均匀贴壁培养在 6 孔培养皿中,3 h 后,MDA-MB-231 细胞完全贴壁,将培养皿的培养液换为 0、6、12 μg/ml 鞣花酸培养液,每种浓度设

三个重复孔并取其均值,分别于培养后 24、48、72 h 计数 MDA-MB-231 细胞数。

### 1.3 细胞趋化实验

选择直径为 8 μm 的 Transwell 趋化小室,基底用胶原蛋白包被 0.5 h 后将 Transwell 趋化小室倒置,将 100 μl 细胞数为  $1 \times 10^5$ /ml 的 MDA-MB-231 细胞培养液置于趋化小室基底,贴壁 4 h 后轻轻吸去培养液,将趋化小室倒置在含 500 μl 0、6、12 μg/ml 鞣花酸培养液的下室培养 12 h,然后将趋化小室上室培养液换为 100 ng/ml 的间质细胞衍生因子 1α (stromal cell-derived factor 1 alpha, SDF1α) 培养液 500 μl,MDA-MB-231 细胞趋化运动 4 h 后,用棉签轻轻刮去没有发生趋化运动的 MDA-MB-231 细胞,将小室基底以含 2% 甲苯胺蓝 (toluidine blue) 的 44.40 mmol/L 低聚甲醛染色 1 h,显微镜下随机计数 10 个视野的已经发生趋化运动的细胞。

### 1.4 鞣花酸抑制 MDA-MB-231 细胞中 CXCR4 表达及 SDF1α/CXCR4 介导的 AKT 激活

实验设对照组(0 μg/ml 鞣花酸),6 μg/ml 及 12 μg/ml 鞣花酸处理组共 3 组,每组重复 3 次。具体步骤为将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞在 6 孔培养皿培养至融合状态,然后将处理组培养液替换为分别含 6、12 μg/ml 鞣花酸培养液,继续培养 12 h,吸掉培养液,然后用含 100 ng/ml 的 SDF1α 培养液处理细胞 15 min,吸掉培养液,最后用含磷酸化酶抑制剂的细胞裂解液(RIPA)裂解细胞。3 组均取 100 μg 蛋白行 Western Blot。在 10% 分离胶上等蛋白条带分离清晰,以硝酸纤维薄膜转膜,PBS 清洗,5% 胎牛血清封闭 1 h,然后加入浓度为 1:1000 的 p-AKT(或 CXCR4)在 4℃ 过夜,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔单克隆二抗 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,加入显色剂,X 线机读片。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同浓度鞣花酸处理组乳腺癌细胞 MDA-MB-231 计数分析采用重复设计多水平方差分析,趋化细胞数分析采用完全随机设计资料方差分析,均数间两两比较采用 SNK-q 分析方法,检验水平为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 鞣花酸抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖

细胞计数实验表明鞣花酸可显著抑制乳腺癌

细胞增殖, 各组在各时间点的细胞计数详见表 1。6  $\mu\text{g/ml}$  组鞣花酸作用 24、48、72 h 均可明显抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞增殖, 而 12  $\mu\text{g/ml}$  组鞣花酸抑制乳腺癌细胞增殖作用更加明显。重复设计方差分析结果提示分组比较 ( $F=4875.56$ ,  $P=0.00$ ) 及三个时间点间比较 ( $F=670.73$ ,  $P=0.00$ ), 差异有统计学意义, 而分组与时间有交互作用 ( $F=122.92$ ,  $P=0.00$ ), 表明鞣花酸处理对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖有显著抑制作用。

表 1 不同浓度鞣花酸组在不同时间点的细胞计数比较 ( $\times 10^5/\text{ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	重复次数	24 h	48 h <sup>c</sup>	72 h <sup>d</sup>
0 $\mu\text{g/ml}$	3	4.90 $\pm$ 0.31	11.20 $\pm$ 0.57	20.50 $\pm$ 0.75
6 $\mu\text{g/ml}$ <sup>a</sup>	3	3.70 $\pm$ 0.57	7.80 $\pm$ 0.49	12.80 $\pm$ 0.42
12 $\mu\text{g/ml}$ <sup>b</sup>	3	2.80 $\pm$ 0.42	3.90 $\pm$ 0.61	5.20 $\pm$ 0.51

a:  $q=4.18$ ,  $P=0.00$ , 与对照组比较; b:  $q=8.11$ ,  $P=0.00$ , 与对照组比较; c:  $q=8.74$ ,  $P=0.00$ , 与 24 h 比较; d:  $q=3.77$ ,  $P=0.00$ , 与 24 h 比较

## 2.2 鞣花酸抑制 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 介导的 MDA-MB-231 细胞趋化运动

趋化实验显示 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  培养液对乳腺癌细胞趋化计数约为  $(14.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$ , 6  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的趋化计数约为  $(7.70 \pm 0.58) \times 10^5/\text{ml}$ , 12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸组的趋化计数约为  $(3.00 \pm 1.00) \times 10^5/\text{ml}$ , 显示 12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸基本抑制了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的趋化运动 (表 2)。

表 2 鞣花酸处理后各组 MDA-MB-231 的趋化细胞数

组别	重复次数	趋化细胞数 ( $\times 10^5/\text{ml}$ , $\bar{x} \pm s$ )	统计量	P 值
0 $\mu\text{g/ml}$	3	14.00 $\pm$ 1.00		
6 $\mu\text{g/ml}$	3	7.70 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	117.57	0.000
12 $\mu\text{g/ml}$	3	3.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>		

a:  $q=6.33$ ,  $P=0.000$ , 与对照组比较; b:  $q=11.00$ ,  $P=0.000$ , 与对照组比较

## 2.3 鞣花酸抑制 CXCR4 表达及 SDF1 $\alpha$ 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 AKT 激活

本实验通过免疫印迹检测 CXCR4 蛋白表达变化, 发现 6、12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸作用 24 h 可显著抑制 CXCR4 表达, 蛋白表达相对强度通过 Image J 软件分析结果为 1 : 0.63 : 0.25 (对照组 : 6  $\mu\text{g/ml}$  处理组 : 12  $\mu\text{g/ml}$  处理组, 图 1)。MDA-MB-231 乳腺癌细胞经 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  培养液作用 10 min 后, 可明显激活乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 AKT 信号通路, 但是经 6、12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸预先处理 12 h

后, MDA-MB-231 的 AKT 信号通路可明显被抑制, 蛋白表达相对强度通过 Image J 软件分析结果为 1 : 0.44 : 0.16 (对照组 : 6  $\mu\text{g/ml}$  处理组 : 12  $\mu\text{g/ml}$  处理组, 图 2)。这表明鞣花酸可明显抑制 SDF1 $\alpha$  对乳腺癌 MDA-MB-231 中 AKT 的激活。

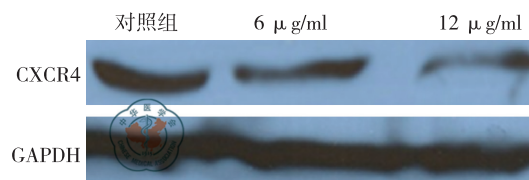


图 1 趋化因子受体 4 (CXCR4) 的 Western Blot 分析

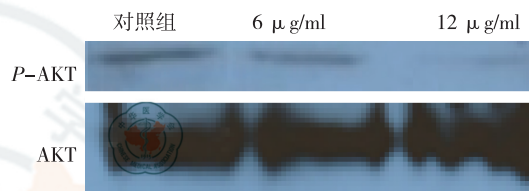


图 2 蛋白激酶 B (AKT) 及磷酸化 AKT (P-AKT) 的 Western Blot 分析

## 3 讨论

MDA-MB-231 细胞系属 TNBC, 分子生物学特征不表达 ER、PR, 同时缺乏 HER-2 表达。TNBC 对内分泌治疗无效, 化疗反应性极差, 而且临床具有高度侵袭性, 极易复发、转移, 是威胁患者生命健康的重要乳腺癌类型。

目前文献报道, 多种天然黄酮类化合物具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、清除氧自由基及抗癌、抗凝、抗血栓形成等作用, 以及保护肝脏、心脑血管等多种药理活性, 尤其是天然抗癌作用机制受到肿瘤学家重视, 成为肿瘤学研究热点之一<sup>[4]</sup>。鞣花酸是一种天然黄酮化合物, 在多种恶性肿瘤中表现出抗癌作用。在前列腺癌中鞣花酸可抑制 mTOR 激活并下调内源性  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 及抗凋亡基因沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIR1), 并增加细胞周期抑制蛋白 P21 表达, 抑制白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 表达<sup>[2]</sup>。而在胰腺癌裸鼠模型中, 鞣花酸抑制了胰腺癌肿瘤生长, 而且下调胰腺癌组织低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子受体 (vascular epithelial growth factor receptor, VEGFR) 及间质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9 的表达, 抑制了胰腺癌的 Akt 及 Notch 信号通路<sup>[5]</sup>。而目前文献报道鞣花酸在乳腺癌中也具有抑制作用, 可能机



制是雌激素在乳腺癌发生、发展中发挥重要作用,而鞣花酸可逆转雌激素对乳腺癌细胞的 miR-375、miR-182、miR-122 等的调节作用,抑制其具有抗凋亡作用的靶蛋白 cyclin D1、Bcl-2 等的表达<sup>[6]</sup>。研究还发现鞣花酸可抑制 VEGFR-2 激活,在乳腺癌血管生成中发挥重要的抑制作用,这表明鞣花酸可通过多种机制发挥抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>。恶性肿瘤不断增殖并发生转移是其重要的生物学特征,本研究结果也表明,鞣花酸可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖,而且明显抑制了 MDA-MB-231 细胞趋化运动,其中 12  $\mu\text{g/ml}$  鞣花酸的抑制作用更为明显,提示鞣花酸具有极大的抗乳腺癌潜力。

CXCR4 在前列腺癌、肝癌等多种肿瘤恶性转化中发挥重要作用,SDF1 $\alpha$ /CXCR4 能介导肿瘤细胞向特异性的部位“归巢”,即诱导肿瘤细胞器官特异性的转移。抑制 CXCR4 可明显抑制多种癌细胞的侵袭、转移。Müller 等<sup>[8]</sup>在 2001 年研究了 CXCR4 在转移性乳腺癌中的功能,发现乳腺癌常转移至高表达 CXCL12(CXCR4 的配体)的部位,如骨髓、肝脏和肺等,而很少转移至低表达 SDF1 $\alpha$ 的部位,如皮肤、肌肉等。本研究结果显示鞣花酸可明显抑制 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 生物轴介导的乳腺癌细胞趋化运动,而且鞣花酸对 CXCR4 表达具有抑制作用,表明鞣花酸是很好的乳腺癌细胞侵袭转移的抑制物。

乳腺癌细胞中 SDF1 $\alpha$  通过特异的 CXCR4 可异常激活 AKT 信号通路,在 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 导致乳腺癌侵袭、转移的恶性转换的生物过程中发挥重要作用,而且肿瘤间质细胞可通过分泌 SDF1 $\alpha$  激活肿瘤细胞,促进肿瘤细胞发生转移<sup>[9]</sup>。基因敲除第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源等位基因(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)可导致 AKT 异常激活,可产生包括低分化前列腺癌的多发肿瘤小鼠模型,表明 AKT 信号通路异常激活在前列腺癌等恶性肿瘤的进展中发挥极为重要的作用<sup>[10]</sup>。本研究还发现 SDF1 $\alpha$  可激活乳腺癌细胞 AKT,表明 SDF1 $\alpha$  可通过 AKT 通路促进乳腺癌细胞增殖和发生恶性转换,但鞣花酸抑制了乳腺癌中 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 介导的 AKT 信号通路激活作用。因此,鞣花酸不仅可以抑制乳腺癌细胞

MDA-MB-231 的增殖,而且能抑制 SDF1 $\alpha$ /CXCR4 介导的细胞趋化运动及 AKT 激活,这表明鞣花酸在抑制乳腺癌细胞增殖及复发转移中可能具有重要作用,需要进一步研究其作为临床上乳腺癌辅助治疗的应用价值。

## 参考文献

- [1] Ferreres F, Grosso C, Gil-Izquierdo A, et al. Ellagic acid and derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. Extracts: HPLC-DAD-ESI/MS(n) profiling, quantification and *in vitro* anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities [J]. *Phytochem Anal*, 2013, 24(6):534-540.
- [2] Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, et al. Apoptotic markers in a prostate cancer cell line: effect of ellagic acid [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6):2804-2810.
- [3] Keegan TH, Press DJ, Tao L, et al. Impact of breast cancer subtypes on three-year survival among adolescent and young adult women [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(5): R95.
- [4] Rocha A, Wang L, Martins-Green M. Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(3):647-658.
- [5] Zhao M, Tang SN, Marsh JL, et al. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb/c nude mice [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2):210-217.
- [6] Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, et al. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):175-184.
- [7] Wang N, Wang ZY, Mo SL, et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(3):943-955.
- [8] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824):50-56.
- [9] Yang Q, Chen C, Yang Z, et al. Suppression of breast cancer proliferation and induction of apoptosis via AKT and ERK1/2 signal transduction pathways by synthetic polypeptide derived from viral macrophage inflammatory protein II [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 31(4):497-503.
- [10] Wang S, Gao J, Lei Q, et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(3):209-211.

(收稿日期:2013-10-16)

(本文编辑:刘军兰)