

· 论著 ·

海绵来源的 smenospongine 诱导乳腺癌 MCF7 细胞凋亡机制研究

唐 杰, 林厚文, 孙 凡 (上海交通大学医学院附属仁济医院药学部, 上海 200127)

[摘要] 目的 研究海绵 *Spongia pertusa* Esper 来源的 smenospongine (Sme) 诱导乳腺癌细胞 MCF7 凋亡的作用机制。方法 使用 CCK-8 法检测 Sme 对 MCF7 细胞活力的影响; DAPI 染色检测凋亡细胞的细胞核形态; 使用流式细胞术检测细胞凋亡率和线粒体膜电位; Western blotting 检测 Sme 对 Bax、Bcl2、细胞色素 C (cytochrome C)、p-p38 和 p38 蛋白水平表达的影响。结果 CCK-8 法检测结果表明, Sme 抑制 MCF7 增殖, IC₅₀ 值为 (16.46 ± 0.88) μmol/L; DAPI 染色结果和 Annexin V-FITC/PI 染色结果显示 Sme 诱导细胞凋亡。随着加药浓度的增加, 细胞凋亡率从 4.18% 逐渐升至 21.49%; 流式细胞仪检测结果表明 Sme 引发 MCF7 细胞内线粒体膜电位下降; Western blotting 结果显示 Sme 激活了内源性凋亡途径和 p38 丝裂源活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路。结论 Sme 可能通过激活 p38 MAPK 通路, 诱导细胞内源性凋亡发挥抗乳腺癌作用。

[关键词] smenospongine; 乳腺癌; MCF7 细胞; 细胞凋亡; p38 MAPK

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0399-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.004

Effect of marine sponge-derived smenospongine on apoptosis in breast cancer MCF7 cells

TANG Jie, LIN Houwen, SUN Fan (Department of Pharmacy, Renji Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiao tong University, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the potential effect of marine sponge-derived smenospongine (Sme) on apoptosis in breast cancer MCF7 cells. **Methods** The CCK-8 method was used to detect growth-inhibitory effect of Sme against MCF7 cells. Flow cytometry was used to evaluate the mitochondrial membrane potential and apoptosis. Changes in nuclear morphology of apoptotic cells were assessed by DAPI staining. Western blotting was used to detect the expression of Bax, Bcl2, cytochrome C, p38 and p-p38. **Results** Sme exhibited suppressive effect on the proliferation of MCF7 cells, with IC₅₀ value of (16.46 ± 0.88) μmol/L. DAPI staining and Annexin V-FITC/PI double staining revealed that Sme significantly induced apoptosis. The apoptosis rate was increased rapidly from 4.18% to 21.49% with the raise of Sme concentration. Further study showed that mitochondrial membrane potential decreased after Sme incubation. Western blotting analysis displayed that the expression of Bax was increased and the expression of Bcl2 was decreased, which resulted in the release of cytochrome C. Meanwhile, the phosphorylated level of p38 was significantly elevated. **Conclusion** Sme inhibited the proliferation of MCF7 cells and might activate intrinsic apoptosis through p38 MAPK pathway.

[Key words] smenospongine; breast cancer; MCF7 cells; apoptosis; p38 MAPK

近年新药研发工作者们将目光转向天然产物寻找新药先导化合物。而海洋生物因其独特的生存环境为新药开发提供了许多结构新颖、活性多样的先导化合物, 从而备受青睐^[1,2]。Smenospongine (Sme) 是从海绵 *Spongia pertusa* Esper 中分离得到的倍半萜胺醌类化合物^[3]。已报道 Sme 有着广

泛的药理活性, 在白血病细胞中, Sme 通过促进人慢性髓系白血病细胞 K562 红系分化, 诱导细胞周期阻滞在 G1 期或诱导白血病细胞凋亡等途径抑制白血病细胞增殖^[4-6]。近几年研究发现, Sme 在实体瘤中发挥着抑制细胞增殖和血管形成的作用^[7]。但 Sme 抗乳腺癌的研究却未有报道。本实验通过研究乳腺癌 MCF7 细胞凋亡及相关信号途径探讨 Sme 抗乳腺癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Dulbecco's Modified Eagle's 培养基 (DMEM),

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (81502936)

[作者简介] 唐 杰, 硕士研究生, 研究方向: 药理学, Tel: (021) 68383339, Email: tang_pao_pao@126.com

[通讯作者] 孙 凡, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药理学, Tel: (021) 68383339, Email: sunfan2017@126.com

胎牛血清(FBS)以及青霉素/链霉素(美国 Gibco 公司);本实验所用一抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自英国 Abcam 公司;四甲基罗丹明甲酯荧光探针(TMRM)购自美国 Invitrogen 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自美国 Sigma 公司;重组人胰岛素(德国 Novo Nordisk 公司);CCK-8 溶液和凋亡试剂盒(日本同仁公司)。

1.2 方法

1.2.1 Sme 的提取和鉴定

Sme 由本实验室从中国南海采集的 *Spongia pertusa* Esper 海绵中分离,通过和文献比对 MS、NMR、ECD 和特定旋光度数值确定结构^[3]。图 1 为 Sme 的化学结构。使用 DMSO 将 Sme 配成 10 mmol/L 储备液,保存在 -20°C 冰箱中备用。

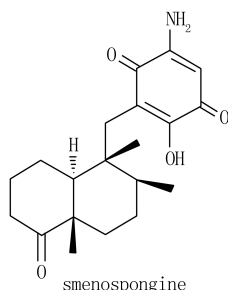


图 1 Sme 化学结构

1.2.2 细胞培养

乳腺癌细胞株 MCF7 购自中科院典型培养物保藏委员会细胞库。MCF7 细胞培养于含 10% FBS, 1% 青霉素/链霉素和 200 U/ml 人重组胰岛素的 DMEM 培养基,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力

将 MCF7 细胞 (8×10^4) 铺于 96 孔板,放置在 37°C 培养箱培养 24 h。Sme 稀释至不同浓度 (0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 加入 96 孔板,放置培养箱继续培养。72 h 后移去培养液,加入 CCK-8 溶液反应 1 h 左右,使用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度。

1.2.4 检测线粒体膜电位

将 10 nmol/L 荧光探针四甲基罗丹明甲酯加入细胞中孵育 30 min。使用 PBS 震荡洗涤 3 次,洗脱荧光探针。使用 10 $\mu\text{mol/L}$ Sme 处理细胞 48 h,收集细胞,使用流式细胞仪检测线粒体膜电位,FlowJo 7.6 用于数据分析。

1.2.5 DAPI 染色

将细胞铺于 48 孔板中,加入不同浓度的 Sme (0、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h。使用 4% 的多聚

甲醛室温下固定细胞 30 min,弃去多聚甲醛,使用 PBS 洗涤细胞 3 次。加入稀释好的 DAPI 溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$) 于暗处孵育 1~2 h 后,在 200 倍显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.6 细胞凋亡检测

分别使用不同浓度 Sme (0、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 MCF7 细胞 48 h 后收集细胞,使用 PBS 洗涤细胞,离心弃去 PBS。在细胞中加入 500 μl 稀释 10 倍的 Annexin V 结合液重悬细胞,放于 37°C 培养箱培养孵育 30 min。离心弃去 Annexin V 结合液后,每管加入 100 μl 的 Annexin V 结合液重悬细胞。每管各加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 碘化丙啶溶液 (PI) 避光染色 15 min,加入 400 μl Annexin V 结合液稀释重悬细胞后,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。使用 FlowJo 7.6 分析流式结果。

1.2.7 Western blotting 检测蛋白表达

将细胞以 4×10^7 密度铺于 6 孔板,加入 Sme (0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h 后,提取总蛋白。按照 BCA 试剂盒的操作说明,测定蛋白浓度。总蛋白溶液中加入上样缓冲液, 100°C 煮沸 5 min。蛋白上样量为 30 μg ,依次进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭液封闭 1 h 后, $1 \times \text{TBST}$ 洗涤 3 次,每次 5 min。将膜剪成所需分子量后倒入一抗,于 4°C 脱色摇床上缓慢摇动孵育过夜。回收一抗, $1 \times \text{TBST}$ 洗涤 5 次,每次 5 min。使用 HRP 标记的二抗体孵育 1 h, $1 \times \text{TBST}$ 洗涤 5 次,每次 5 min,曝光条带。使用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.2.8 统计学分析

所有的实验结果至少重复 3 次,并以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。使用 GraphPad Prism 6.0 绘图。单因素方差分析用于统计学检验,以 $P < 0.05$ 认为是具有统计学差异。

2 结果

2.1 Sme 抑制 MCF7 细胞增殖

使用 CCK-8 法检测 Sme 对乳腺癌细胞 MCF7 的增殖抑制作用,将实验结果绘制成抑制曲线。如图 2 所示,Sme 以剂量依赖的方式抑制 MCF7 细胞增殖, IC_{50} 值为 $(16.46 \pm 0.88) \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 Sme 诱导 MCF7 细胞凋亡

很多药物通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤的作用,为了探究 Sme 是否引起乳腺癌细胞发生凋亡,课题组进行了 DAPI 染色实验。结果如图 3 所示,与对照组相比,随着 Sme 浓度的加大,加药组细胞染色质固缩向外周聚集并发出更加明亮的荧光,提

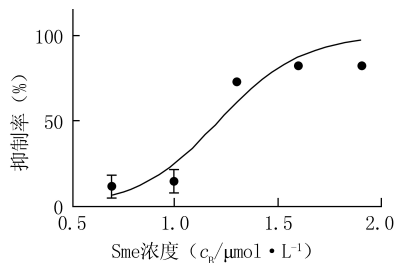


图2 Sme抑制MCF7细胞增殖

示细胞发生凋亡。Annexin V-FITC/PI 双染实验反映细胞凋亡率,如图 4A 所示,Sme 作用于 MCF7 细胞 48 h 后细胞出现凋亡。随着 Sme 浓度的升高,凋亡细胞比例从 4.18% 逐渐增加至 21.49%,表明 Sme 能够剂量依赖性地诱导 MCF7 细胞凋亡(图 4B)。

2.3 Sme 降低 MCF7 细胞线粒体膜电位

使用四甲基罗丹明甲酯荧光探针检测 Sme 对

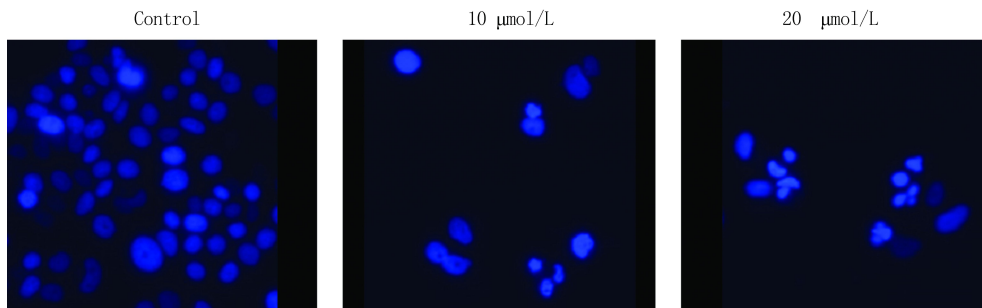


图3 DAPI染色检测细胞凋亡情况(200×)

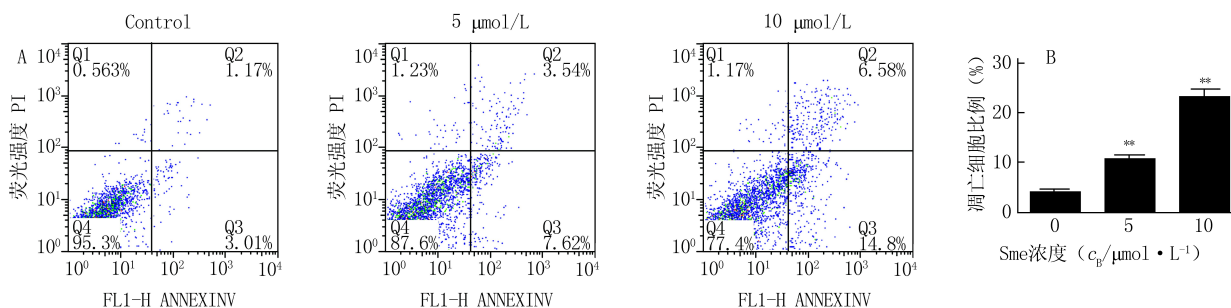


图4 流式细胞术检测细胞凋亡情况

A.流式细胞术检测细胞凋亡情况;B.凋亡细胞比例; ** $P < 0.01$, 与未加药组比较

MCF7 细胞的线粒体膜电位的影响。如图 5 所示,和对照组相比,使用 10 μmol/L Sme 干预 MCF7 细胞 48 h 后,Sme 组曲线左移,荧光强度减弱,表明 Sme 能降低线粒体膜电位。

2.4 Sme 诱导内源性凋亡

Western blotting 检测线粒体促凋亡蛋白 Bax

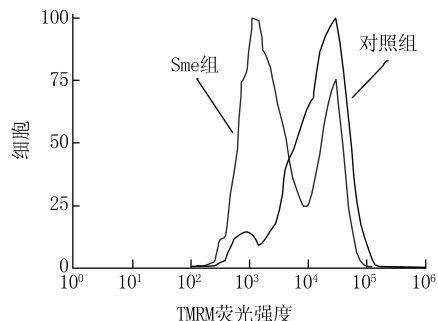


图5 Sme导致MCF7细胞线粒体膜电位降低

和抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达,结果显示 Sme 显著促进了 Bax 表达,下调了 Bcl2 的表达(图 6A),导致 Bax/Bcl2 的比值降低,增加了线粒体膜的通透性,细胞色素 C 释放至胞浆中(图 6B)。

2.5 Sme 促进 p38 磷酸化水平的提高

为了探究 p38 MAPK 通路是否参与了 Sme 诱导的细胞凋亡,使用 Western blotting 检测 p38 和 p-p38 在蛋白水平的表达。结果如图 7 所示,Sme 处理细胞 48 h 后,p38 磷酸化水平显著提高。

3 讨论

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,影响全球至少 1 亿女性的健康,病死率较高^[8]。全球每年约有 138 万人被确诊为乳腺癌,因而寻找和开发新的治疗药物迫在眉睫^[9]。

Sme 最早在 1987 年由 Kondracki 等^[10]从

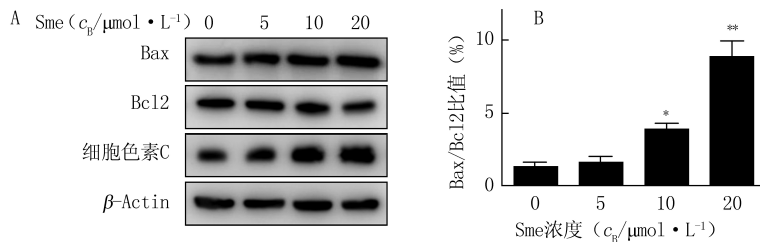


图6 Sme 诱导内源性凋亡

A. Western blotting 检测 Bax、Bcl2 和细胞色素 C 的表达水平; B. Bax/Bcl2 比值;
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与未加药组比较

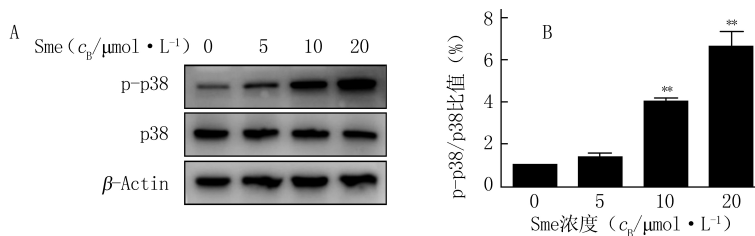


图7 Sme 对 p38 MAPK 通路的影响

A. Western blotting 检测 p-p38 和 p38 的表达水平; B. p-p38/p38 比值;
** $P < 0.01$, 与未加药组比较

Smenospongia sp 海绵中分离鉴定。虽然 Sme 发现时间较早,但 Sme 抗实体瘤活性机制的研究并不多。已报道 Sme 对肺癌、乳腺癌、结肠癌等均有较好的抑制作用^[7],但其抗肿瘤药理机制却未曾详细探索。

本研究发现,海绵 *Spongia pertusa* Esper 来源的化合物 Sme 显著抑制乳腺癌 MCF7 细胞系的增殖。DAPI 染色和流式结果表明,Sme 诱导 MCF7 细胞凋亡。细胞凋亡是一种高度保守的程序性细胞死亡方式,在调节组织的稳态和清除受损细胞过程中发挥着重要作用。细胞内有 2 条主要的凋亡途径:由死亡受体介导的外源性凋亡途径和线粒体介导的内源性凋亡途径^[11]。为了检测 Sme 是否通过线粒体途径介导了凋亡,使用四甲基罗丹明甲酯荧光探针检测 Sme 对 MCF7 细胞的线粒体膜电位的影响。四甲基罗丹明甲酯染料聚集在线粒体中呈现红色荧光,一旦线粒体膜电位去极化,线粒体膜通透性发生改变,四甲基罗丹明甲酯从线粒体中释放至胞浆中,红色荧光将淬灭。本实验结果表明,Sme 引起线粒体膜电位降低,同时上调线粒体促凋亡蛋白 Bax 表达和下调抗凋亡蛋白 Bcl2 表达,线粒体膜的通透性增加,细胞色素 C 释放至胞浆中,激活内源性的凋亡途径引起细胞凋亡。

MAPK 能够响应胞外的刺激,参与胞内的信号传导^[12-14]。研究表明 ERK MAPK 的激活促进细胞增殖,而 JNK MAPK 和 p38 MAPK 的激活将抑制细胞增殖引发细胞凋亡^[15,16]。本实验结果显示

Sme 显著提高磷酸化 p38 MAPK 水平,提示 Sme 可能通过激活 p38 MAPK 通路诱导 MCF7 细胞凋亡。但 Sme 是否通过 ERK MAPK、JNK MAPK 或者其他途径调控 MCF7 细胞增殖仍需进一步研究。综上所述,本研究表明 Sme 通过激活 p38 MAPK 通路诱导内源性凋亡发挥抗乳腺癌的作用。

【参考文献】

- [1] KOBAYASHI J. Search for new bioactive marine natural products and application to drug development [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2016, 64(8):1079-1083.
- [2] MOLINSKI TF, DALISAY DS, LIEVENS SL, et al. Drug development from marine natural products [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(1):69-85.
- [3] LI J, GU BB, SUN F, et al. Sesquiterpene quinones/hydroquinones from the Marine Sponge *Spongia pertusa* Esper [J]. J Nat Prod, 2017, 80(5):1436-1445.
- [4] KONG D, AOKI S, SOWA Y, et al. Smenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces G1 arrest or apoptosis in different leukemia cells [J]. Mar Drugs, 2008, 6(3):480-488.
- [5] AOKI S, KONG D, MATSUI K, et al. Smenospongine, a spongean sesquiterpene aminoquinone, induces erythroid differentiation in K562 cells [J]. Anticancer Drugs, 2004, 15(4):363-369.
- [6] AOKI S, KONG D, MATSUI K, et al. Sesquiterpene aminoquinones, from a marine sponge, induce erythroid differentiation in human chronic myelogenous leukemia, K562 cells [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2004, 52(8):935-937.

(下转第 421 页)

4 讨论

初步的体外抗炎活性实验结果表明: 17 个青藤碱衍生物对炎症均有一定的抑制作用, 其活性均优于青藤碱, 化合物 **4f** 和 **4g** 效果最佳, 可作为候选药物, 进一步开展深入研究, 对开发 RA 药物具有重要意义。17 个青藤碱衍生物均引入疏水基团苯环, 并在苯环上引入了新的官能团, 进一步改善了分子的脂溶性, 同时新引入的基团可能成为参与抗炎活性的药效基团, 观察其中 2 个活性最好的化合物, 可以发现均为间位取代产物, 可能间位构象与抗炎作用靶点更容易结合或结合更为稳定, 有利于发挥抗炎作用。化合物 **4f** 的甲氧基与苯环相连为供电子基团, 能改善脂水分配系数、增加脂溶性而有利于药物透膜。化合物 **4g** 的氟取代基为吸电子基, 其基团空间较小, 且易于与靶蛋白形成分子间氢键, 有利于与靶点结合, 由于化合物数量有限, 构效关系的深入探讨有待于进一步的研究。

【参考文献】

[1] ZHAO ZJ, ZHAO C, XIAO J, *et al.* Transdermal permeation and anti-inflammation activities of novel sinomenine derivatives[J]. *Molecules*, 2016, 21(11):1520.
[2] 高晨鑫, 张湛明, 陈继红, 等. 青藤碱对类风湿关节炎因子影响的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2017, 6(2):72-75.
[3] ZHAO XX, PENG C, ZHANG H, *et al.* Sinomenium acutum: A review of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(8):1053-1061.

[4] 吴娟, 李燕红. 正清风痛宁药物治疗的副作用及防治[J]. *中国医药导刊*, 2012, 14(2):250-252.
[5] 游素芬, 戈萌. 青藤碱的医药新用途: CN1679574 [P]. 2005-10-12.
[6] CHEN C, XU HQ, ZHONG J. New use of sinomenine: 1149456 [P]. 1997-05-14.
[7] 秦峰, 蔡辉. 青藤碱药理作用研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2016(4):81-86.
[8] HE L, DUAN H, LI X, *et al.* Sinomenine down-regulates TLR4/TRAF6 expression and attenuates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and osteolysis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 779:66-79.
[9] HUANG L, LI T, ZHOU H, *et al.* Sinomenine potentiates degranulation of RBL-2H3 basophils via up-regulation of phospholipase A2 phosphorylation by Annexin A1 cleavage and ERK phosphorylation without influencing on calcium mobilization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(2):945-951.
[10] LOU YT, ZHOU HB, ZOU J, *et al.* Modification of poorly bioactive sinomenine into more potent immunosuppressive agents by embedding of drug-like fragments[J]. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51(3):485-488.
[11] 姚祝军, 周海滨. C 环连接吡嗪环的青藤碱衍生物、合成方法及其用途: 1687065 A [P]. 2005-10-26.
[12] 姚祝军, 周海滨. C 环连接有五元杂环的青藤碱衍生物和合成方法: 1687070 A [P]. 2007-10-26.
[13] TANG J, ZHANG R, XU XQ, *et al.* Synthesis, characterization, and NF-kappa B pathway inhibition of 1-halogenated sinomenine derivatives [J]. *Chem Nat Comp*, 2013, 48(6):1031-1034.

[收稿日期] 2018-01-26 [修回日期] 2018-05-03
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 402 页)

[7] KONG D, YAMORI T, KOBAYASHI M, *et al.* Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone [J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(2):154-161.
[8] SMITH RA, COKKINIDES V, BROOKS D, *et al.* Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(2):99-119.
[9] QUEIROZ EA, PUUKILA S, EICHLER R, *et al.* Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5):e98207.
[10] KONDRACKI ML, GUYOT M. Smenospongine: a cytotoxic and antimicrobial aminoquinone isolated from *ja:math sp*[J]. *Tetrahedron Letters*, 1987, 28(47):5815-5818.
[11] LOPEZ J, TAIT SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6):957-962.
[12] HUANG HL, CHAO MW, LI YC, *et al.* MPT0G066, a novel anti-mitotic drug, induces JNK-independent mitotic ar-

rest, JNK-mediated apoptosis, and potentiates antineoplastic effect of cisplatin in ovarian cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31664.
[13] ROOVERS K, ASSOIAN RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery [J]. *Bioessays*, 2000, 22(9):818-826.
[14] ZHANG X, WANG X, WU T, *et al.* Isoliensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12579.
[15] JUNTILLA MR, LI SP, WESTERMARCK J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival [J]. *FASEB J*, 2008, 22(4):954-965.
[16] SCHROETER H, BOYD CS, AHMED R, *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis[J]. *Biochem J*, 2003, 372(Pt 2):359-369.

[收稿日期] 2018-03-28 [修回日期] 2018-05-11
[本文编辑] 李睿旻