

# ILP-2表达上调减轻双氧水诱导的 人MCF-7细胞株凋亡

朱林<sup>1</sup> 王思源<sup>1</sup> 向思琦<sup>2</sup> 周佩云<sup>1</sup> 王雅妮<sup>1</sup> 朱柳<sup>1</sup> 黄慧群<sup>1</sup> 向明钧<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>吉首大学医学院生物化学与免疫学系医学研究中心, 吉首 416000;

<sup>2</sup>北方民族大学生物科学与工程学院生物工程系, 银川 750021)

**摘要** 为探讨乳腺癌细胞生长中凋亡抑制蛋白样蛋白2(ILP-2)对活性氧(ROS)毒性的拮抗作用, 该研究用不同浓度双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对人乳腺癌细胞MCF-7进行氧化应激造模, 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐探针法(DCFH-DA)检测乳腺癌细胞中活性氧变化, 蛋白质印记法检测siRNA干扰效率及干扰后乳腺癌细胞ILP-2的表达, 噻唑蓝(MTT)法检测siRNA转染及双氧水处理后乳腺癌细胞的增殖活性, 划痕试验分析siRNA转染及双氧水处理对乳腺癌细胞迁移的影响, 吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色法(AO-EB)检测siRNA转染及双氧水处理对乳腺癌细胞凋亡的影响。结果显示, 200 μmol/L双氧水显著诱导MCF-7中活性氧的产生。蛋白质印记法结果显示, siRNA-5干扰效率较高; 双氧水+siRNA-5组ILP-2表达高于双氧水+siRNA阴性对照组。双氧水处理细胞24、48和72 h后, MTT结果显示, 细胞存活率明显低于空白对照组, 双氧水+siRNA-5组细胞存活率高于双氧水+siRNA阴性对照组; 划痕实验结果显示, 细胞迁移率低于空白对照组, 双氧水+siRNA-5组迁移率高于双氧水+siRNA阴性对照组; AO-EB结果显示, 与空白对照组相比, 双氧水组细胞凋亡率显著升高, 双氧水+siRNA-5组细胞凋亡率低于双氧水+siRNA阴性对照组。以上结果表明, 凋亡抑制蛋白ILP-2拮抗活性氧对乳腺癌细胞MCF-7的细胞毒性, 促进细胞增殖。

**关键词** 凋亡抑制蛋白; 活性氧; 乳腺癌细胞

## Increased Expression of ILP-2 Alleviate Apoptosis Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Human MCF-7 Cells

Zhu Lin<sup>1</sup>, Wang Siyuan<sup>1</sup>, Xiang Siqu<sup>2</sup>, Zhou Peiyun<sup>1</sup>, Wang Yani<sup>1</sup>, Zhu Liu<sup>1</sup>, Huang Huiqun<sup>1</sup>, Xiang Mingjun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Medical Research Center, Institute of Medicine, Jishou University,

Jishou 416000, China; <sup>2</sup>Department of Bioengineering, Biological Science and Engineering School,

North University of Nationalities, Yinchuan 750021, China)

**Abstract** The aim of this paper was to investigate the effect of ILP-2 (inhibitor of apoptosis protein-like protein-2) on reactive oxygen species (ROS) oxidative stress in breast cancer cells. Oxidative stress model on MCF-7 cells was established by different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. DCFH-DA probe was applied to detect ROS in breast cancer line. When small interfering RNA (siRNA) of ILP-2 was designed to transfect into the MCF-7 cells, the expression of ILP-2 was measured by Western blot. Additionally, the breast cancer line treated by the siRNA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the proliferation activity of MCF-7 cell was analyzed by MTT method. Cell scratch test was performed to

收稿日期: 2018-08-24 接受日期: 2018-10-23

国家自然科学基金(批准号: 81360397)、吉首大学校级科研项目(批准号: Jdy16024)和吉首大学研究生科研创新项目(批准号: JGY201772)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0743-8759168, E-mail: xmj688@163.com

Received: August 24, 2018 Accepted: October 23, 2018

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360397), the Scientific Research Project in Jishou University (Grant No.Jdy16024) and the Scientific Research Project for Graduates in Jishou University (Grant No.JGY201772)

\*Corresponding author. Tel: +86-743-8759168, E-mail: xmj688@163.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:39:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1438.016.html>

examine the migration effects of siRNA-transfected and hydrogen peroxide treatment MCF-7 cell. The apoptosis effects of siRNA-transfected and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated on MCF-7 cell was detected by AO-EB double staining method. The results demonstrated that 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly instigated the production of ROS in the breast cancer cell line MCF-7. Western blot results showed that siRNA-5 had the interference higher efficiency, what's more, the expression of ILP-2 was higher in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-5 group than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-NC group. After treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24, 48 and 72 hours, MTT assay results showed that cell survival rate was significantly lower than those in the control group, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-5 group's was higher than those in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-NC group's. The migration rate decreased compared with the control group, and the migration rate of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-5 group increased than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-NC group's. AO-EB results showed that compared with the control group, the cell apoptosis rate of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was obviously increased, and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-5 group's was decreased than that of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-NC. The apoptosis inhibitory protein ILP-2 can resist the cytotoxicity of ROS in breast cancer cells MCF-7 and promoted cell proliferation.

**Keywords** ILP-2; ROS; MCF-7

乳腺癌是全世界女性常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 中国女性乳腺癌发病率和死亡率逐年上升<sup>[2]</sup>。凋亡抑制蛋白样蛋白-2(inhibitor of apoptosis protein-like protein-2, ILP-2)是Richter等<sup>[3]</sup>扩增X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)基因时首次发现的, 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员, 是定位于人19号染色体(q13.3-13.4)上的基因。ILP-2可抑制由Bax(Bcl-2-associated X protein)或Apaf-1/caspase-9引起的细胞凋亡<sup>[4]</sup>, 使细胞迁移、增殖及凋亡失衡, 进而促进癌细胞生长<sup>[5]</sup>。近期研究发现, ILP-2为乳腺癌血清标志物<sup>[6]</sup>, 且有效促进乳腺癌细胞增殖和细胞迁移<sup>[7]</sup>。

活性氧(reactive oxygen speices, ROS)是细胞代谢过程产生的化学性质活泼的氧原子或原子团, 线粒体代谢是该过程的关键部位<sup>[8]</sup>。在正常生理状态下, 机体通过调节细胞内各种酶类和非酶类物质维持正常的氧化还原反应系统及ROS的代谢平衡<sup>[9]</sup>。当机体受到外源性物质干扰后, 氧化还原动态平衡被打破, 引起细胞内各种氧化应激的发生, 使细胞受到损伤, 严重时导致细胞死亡<sup>[9-10]</sup>。ROS可双向调控肿瘤细胞的增殖和凋亡<sup>[11]</sup>; 低浓度活性氧可靶向诱导乳腺上皮细胞发生上皮-间质转化, 促进乳腺癌的转移和侵袭; 高浓度活性氧可诱导乳腺癌细胞凋亡甚至坏死<sup>[12-13]</sup>。活性氧对乳腺癌细胞的影响通过线粒体介导的凋亡途径发挥重要作用<sup>[14]</sup>。我们前期的研究发现, ILP-2在乳腺癌患者血清中有高表达, 表明ILP-2可能与乳腺癌的发生、发展密切相关<sup>[6,15]</sup>。目前, 关于ILP-2的研究主要集中在对其分子结构和功能的探

究, 但对ILP-2促进乳腺癌细胞生长及抗凋亡机制的报道极少。因此, 深入研究乳腺癌的致病机理对降低乳腺癌发病率及早期确诊治疗乳腺癌具有积极意义。本研究旨在探讨ILP-2对乳腺癌细胞氧化应激下的保护机制, 为研究ILP-2促进乳腺癌细胞生长的分子机制提供思路和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞株MCF-7购自苏州齐氏生物科技有限公司(ATCC细胞库)。

### 1.2 试剂及仪器

RPMI 1640培养液基购自美国Gibco公司; 胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司; 青-链霉素混合液、0.25%胰酶细胞消化液、二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝生物科技有限公司; ILP-2兔多克隆抗体购自美国Abcam公司; Tubulin兔多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; Lipofectamin 2000 Reagent转染试剂购自美国Life Technologies公司; ILP-2干扰片段由苏州吉玛基因股份有限公司合成; MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒购自南京凯基生物公司。

### 1.3 细胞培养

37 °C水浴复苏乳腺癌细胞株MCF-7, 加入完

表1 ILP-2干扰片段序列  
Table 1 ILP-2 siRNA sequences

名称 Name	正义序列(5'→3') Sense (5'→3')	反义序列(5'→3') Antisense (5'→3')
siRNA-5	CUA UAC GAA UGG GAU UUG ATT	UCA AAU CCC AUU CGU AUA GTT
siRNA-3	UGG UAC AAA CUA CCA AGA ATT	UUC UUG GUA GUU UGU ACC ATT
siRNA-NC	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

全培养基(含10% FBS及1%青-链霉素的RPMI 1640培养基),用微量移液器轻轻吹打混匀,转移细胞悬液到新100 mm培养皿中,于37 °C、5%二氧化碳、100%湿度的培养箱中培养。次日,观察细胞是否贴壁生长。细胞每两天更换1次培养液,连续传代2次,待细胞状态稳定后用于后续实验。

#### 1.4 荧光分光法测定活性氧浓度

在6孔细胞培养板中每孔加入 $5 \times 10^4$ 个细胞悬液,待细胞贴壁生长后分别加0、25、50、100、200和400  $\mu\text{mol/L}$ 双氧水,在37 °C、5%二氧化碳中培养24 h,吸弃旧培养液,加入1.5 mL 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA孵育20 min, PBS清洗3次,收集细胞,荧光酶标仪525 nm处检测荧光值,实验重复3次。

#### 1.5 ILP-2 siRNA细胞转染和干扰效率检测

将6孔细胞培养板每孔加入 $1 \times 10^4$ 个细胞悬液培养24 h。用250  $\mu\text{L}$ 无血清RPMI 1640稀释5  $\mu\text{L}$  Lipofectamin 2000,轻柔混匀,静置5 min,再加入50 nmol/L待转染的siRNA,静置20 min。待转染混合物加入到相应组别的细胞中,在37 °C、5%二氧化碳中培养24 h。设置MCF-7空白对照组、siRNA阴性对照组、siRNA-3和siRNA-5组四组(ILP-2干扰片段序列见表1),通过蛋白质印迹法检测干扰效率。

#### 1.6 蛋白质印迹法检测ILP-2蛋白表达

在6孔细胞培养板中每孔加入 $1 \times 10^4$ 个细胞悬液,待细胞贴壁生长后,在37 °C、5%二氧化碳中培养24 h。提取相应组别蛋白质,用BCA法测定其浓度。配制10% SDS-PAGE胶(按试剂盒说明书操作),凝胶每孔中加入30  $\mu\text{g}$ 蛋白,在80 V恒定电压下电泳30 min,随后将电压升高至120V,电泳至溴酚蓝到达胶底部。半干法电转1 h,含5%脱脂奶粉的 $1 \times \text{TBST}$ 室温封闭膜条1 h,一抗(ILP-2兔多抗1:1 000; Tubulin兔多抗1:1 000) 4 °C孵育过夜,二抗(羊抗兔1:8 000)室温下孵育2 h,用化学发光成像系统检测。图像处理系统分析条带灰度值,以ILP-2与Tubulin蛋白条带的灰度值之比代表ILP-2相对表达量,实验重复3次。

#### 1.7 MTT法检测细胞增殖

将96孔细胞培养板每孔中分别加入 $1 \times 10^3$ 个细胞悬液,每组6个复孔,于37 °C、5%二氧化碳培养箱中培养。24、48和72 h后分别做MTT实验。将 $5 \times \text{MTT}$ 用稀释液稀释成 $1 \times \text{MTT}$ ,每孔加入50  $\mu\text{L}$   $1 \times \text{MTT}$ ,在37 °C孵育4 h后每孔加150  $\mu\text{L}$  DMSO,室温摇床孵育10 min。酶标仪490 nm波长处检测吸光度值。细胞存活率(%)=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ ,实验重复3次。

#### 1.8 划痕试验检测细胞迁移

用记号笔在6孔细胞培养板背面画5条平行线,接种 $2 \times 10^4$ 个细胞,于37 °C、5%二氧化碳培养箱中培养24 h后,用100  $\mu\text{L}$  TiP头垂直于背面画3条竖线, PBS轻洗3次,5%低浓度血清培养,0、24、48、72 h后在显微镜下观察细胞迁移情况并采集图像,用Photoshop软件对单层细胞同一个部位的不同时间图像进行测量分析。细胞迁移率(%)=各组细胞的迁移值/对照组细胞的迁移值 $\times 100\%$ ,实验重复3次。

#### 1.9 吖啶橙-溴化乙啶(AO-EB)双染法检测细胞凋亡

在6孔细胞培养板中放入已灭菌的盖玻片(24 mm  $\times$  24 mm),每孔加入 $1 \times 10^4$ 细胞,在37 °C、5%二氧化碳培养箱中培养,分别在24、48和72 h后PBS洗涤细胞2次,采用AO-EB双染法染色(按试剂盒说明书操作),荧光显微镜观察,采集5个视野进行计数。正常细胞:细胞保持原有形态,整个细胞被均匀染成绿色;坏死细胞:细胞呈圆形或椭圆形,细胞整体被染成橙黄色或红色,形状结构单一;凋亡细胞:细胞形状规则多变,多呈新月形,核质体被染成绿色或核碎裂成点状,明显可见胞质芽状突起,核质体被染成橙色,细胞趋于破裂。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ ,实验重复3次。

#### 1.10 统计学方法

所有图表用GraphPad Prism 5制作。实验数据均采用SPSS 17.0统计软件进行分析,结果用均数 $\pm$

标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间显著性检验采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 双氧水可诱导细胞活性氧产生变化

25、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理MCF-7细胞24 h, 荧光分光光度计检测细胞内荧光值。由图1可以观察到, 细胞中加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ 达200  $\mu\text{mol/L}$ 时细胞内荧光值呈现一个拐点, 表明该浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理MCF-7细胞后细胞内ROS将会显著升高(为保证细胞的存活率, 后续实验采用200  $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢处理细胞)。

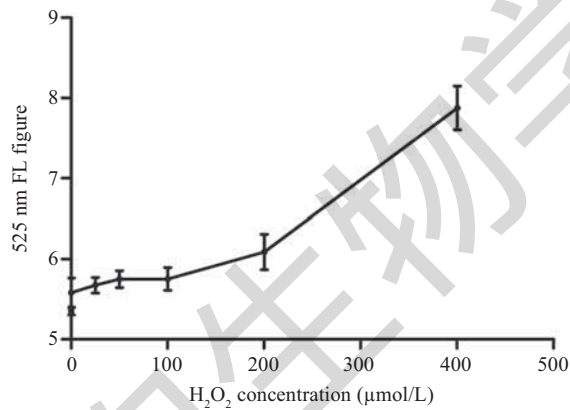
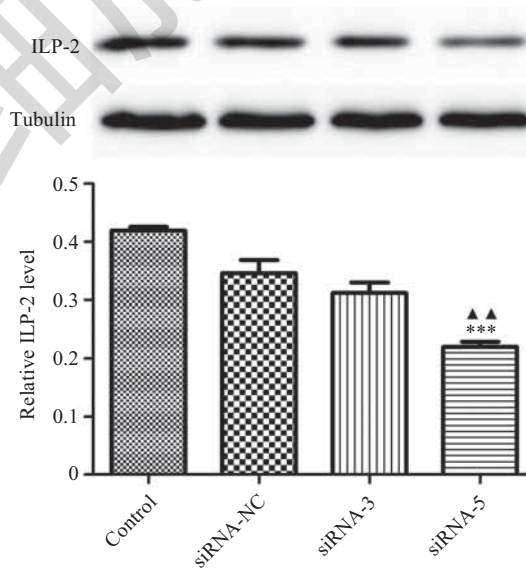


图1 不同浓度双氧水处理MCF-7细胞24 h后的荧光值

Fig.1 The fluorescence value of the breast cancer cell line MCF-7 treated 24 h by the different concentration  $\text{H}_2\text{O}_2$



\*\*\* $P<0.001$ , 与对照组相比较; \*\* $P<0.01$ , 与siRNA阴性对照组比较。

\*\*\* $P<0.001$  vs control group; \*\* $P<0.01$  vs siRNA negative control group.

图2 各组ILP-2表达分析

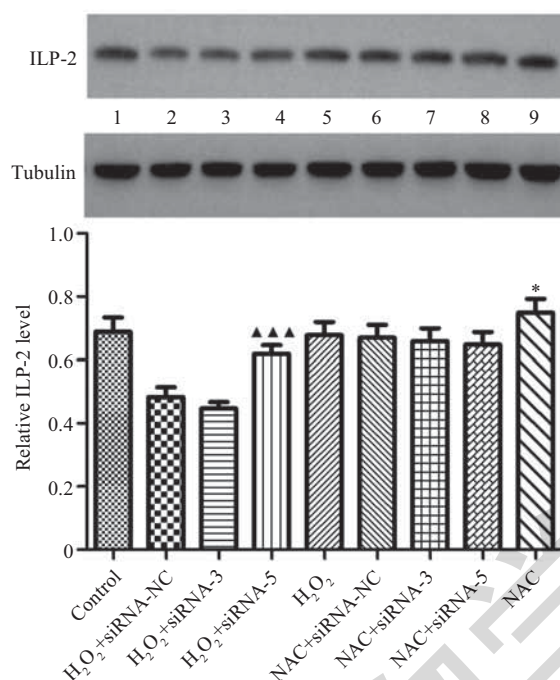
Fig.2 Protein expression of ILP-2

### 2.2 siRNA转染MCF-7细胞后ILP-2蛋白表达

利用siRNA阴性对照、siRNA-3和siRNA-5干扰片段分别转染MCF-7细胞, 蛋白质印迹法检测ILP-2表达。如图2所示, siRNA阴性对照组、siRNA-3组和siRNA-5组ILP-2相对表达量分别为0.54、0.50、0.39; siRNA-3组ILP-2相对表达量与siRNA阴性对照组差异无统计学意义; siRNA-5组ILP-2相对表达量显著低于siRNA阴性对照组。结果表明, siRNA-5对ILP-2的干扰效率较高。

### 2.3 ILP-2对活性氧有抵抗作用

采用蛋白质印迹法检测经过氧化氢处理后细胞中ILP-2表达情况, 如图3所示, 去活性氧组ILP-2



1~9: 分别是空白对照组、双氧水+siRNA阴性对照组、双氧水+siRNA-3组、双氧水+siRNA-5组、双氧水组、NAC+siRNA阴性对照组、NAC+siRNA-3组、NAC+siRNA-5组和NAC组。\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; ▲▲▲ $P < 0.001$ , 与双氧水+siRNA阴性对照组比较。

1-9: control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-NC group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-3 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA-5 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+group, NAC+siRNA-NC group, NAC+siRNA-3 group, NAC+siRNA-5 group and NAC group, respectively. \* $P < 0.05$  vs control group; ▲▲▲ $P < 0.001$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA negative control group.

图3 ILP-2在不同组表达变化

Fig.3 The protein expression of ILP-2 in different groups

相对表达量高于空白对照组; 双氧水+siRNA-5组ILP-2相对表达量显著高于双氧水+siRNA阴性对照组; 去活性氧+siRNA-5组ILP-2相对表达量与去活性氧+siRNA阴性对照组间差异无统计学意义。结果表明, ILP-2对活性氧有抵抗作用。

#### 2.4 ILP-2可拮抗活性氧对细胞增殖的影响

采用MTT法分析双氧水处理细胞24、48、72 h后, 细胞增殖情况见图4。细胞存活率较空白对照组降低; 双氧水+siRNA-5组的细胞存活率较双氧水+siRNA阴性对照组升高。结果显示, 活性氧浓度升高可以抑制MCF-7细胞增殖, 而ILP-2可以拮抗活性氧对MCF-7细胞增殖的影响。

#### 2.5 ILP-2可拮抗活性氧对细胞迁移的影响

分别在24、48、72 h时观察细胞的迁移情况。如图5所示, 与空白对照组比较, 细胞的迁移速度明显减慢; 去活性氧组与空白对照组细胞迁移率显著升高; 双氧水+siRNA-5组的细胞迁移率较双氧水+siRNA阴性对照组升高。结果显示, 活性氧浓度升高可以抑制细胞迁移, ILP-2可以拮抗活性氧对MCF-7细胞迁移的影响。

#### 2.6 ILP-2可拮抗活性氧对细胞凋亡的影响

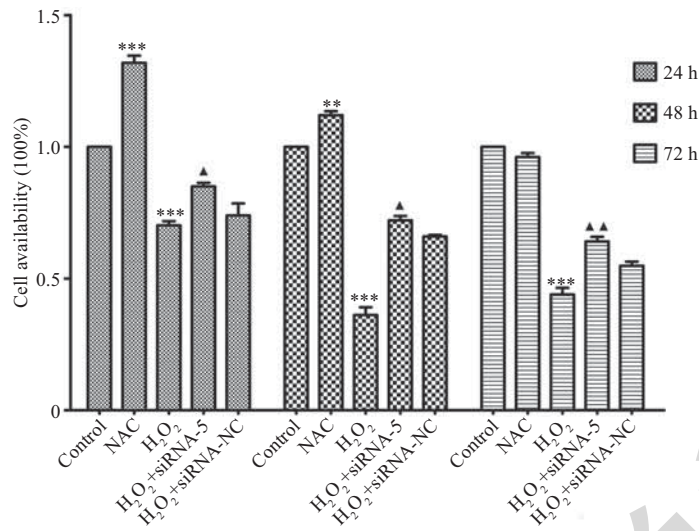
细胞经AO-EB双染后再荧光显微镜下观察, 分析显示, 随着双氧水处理时间加长, 与空白对照组比较细胞凋亡率升高(图6); 双氧水+siRNA-5组的细胞凋亡率较双氧水+siRNA阴性对照组降低。结果表明, 活性氧浓度升高可以促进MCF-7细胞凋亡, 而ILP-2可以拮抗活性氧对MCF-7细胞凋亡的影响。

### 3 讨论

肿瘤的发生是细胞增殖和凋亡失衡的结果, 凋亡抑制蛋白的表达促进了肿瘤细胞的生长<sup>[16]</sup>。凋亡抑制蛋白能有效调控肿瘤细胞凋亡, 是化疗药物敏感的关键分子, 有望成为降低肿瘤细胞耐药、提高化疗效果的新靶点<sup>[17]</sup>。

凋亡抑制蛋白ILP-2在乳腺癌等多种肿瘤中异常表达<sup>[18]</sup>, 它对肿瘤细胞生长增殖有促进作用<sup>[19]</sup>。小干扰片段沉默ILP-2表达可增加肿瘤凋亡敏感性<sup>[20]</sup>。在药物诱导肝癌细胞凋亡过程中发现, HepG2通过增加ILP-2表达抑制细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

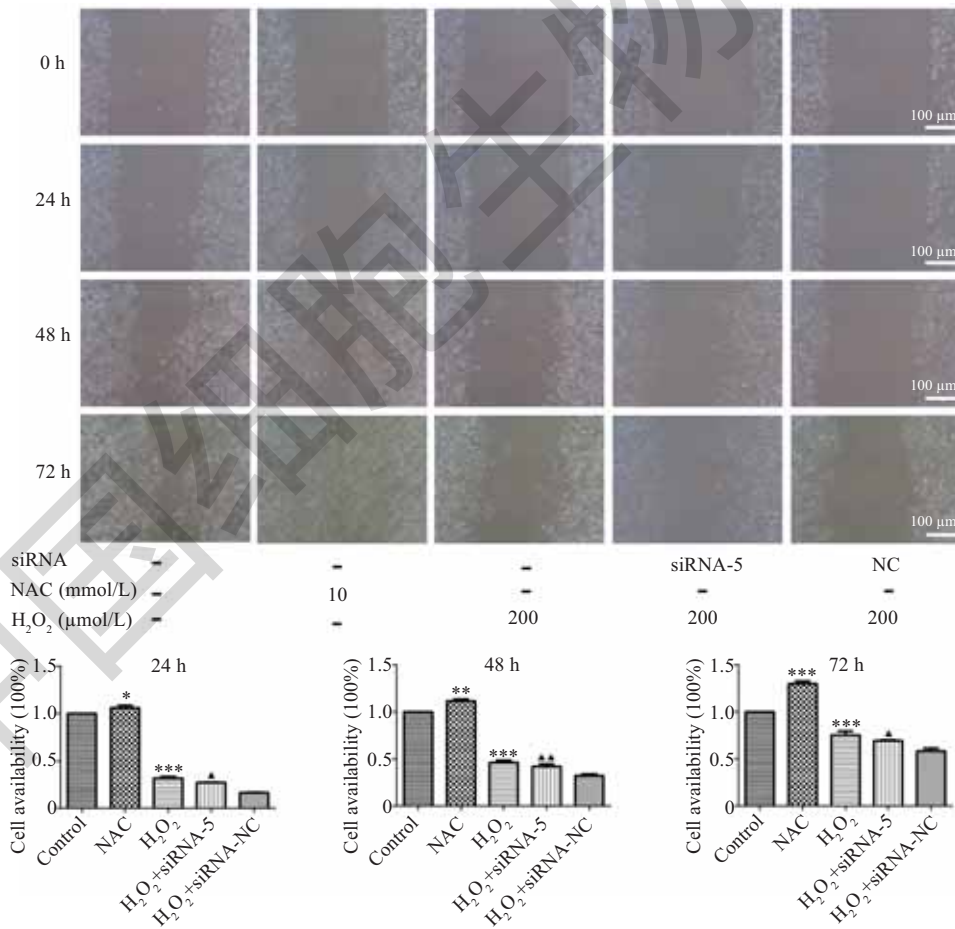
活性氧调节细胞的氧化还原平衡, 参与调节机



\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与空白对照组比较; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ , 与双氧水+siRNA-NC组比。  
 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA negative control group.

图4 双氧水处理MCF-7细胞24、48、72 h时细胞存活率变化

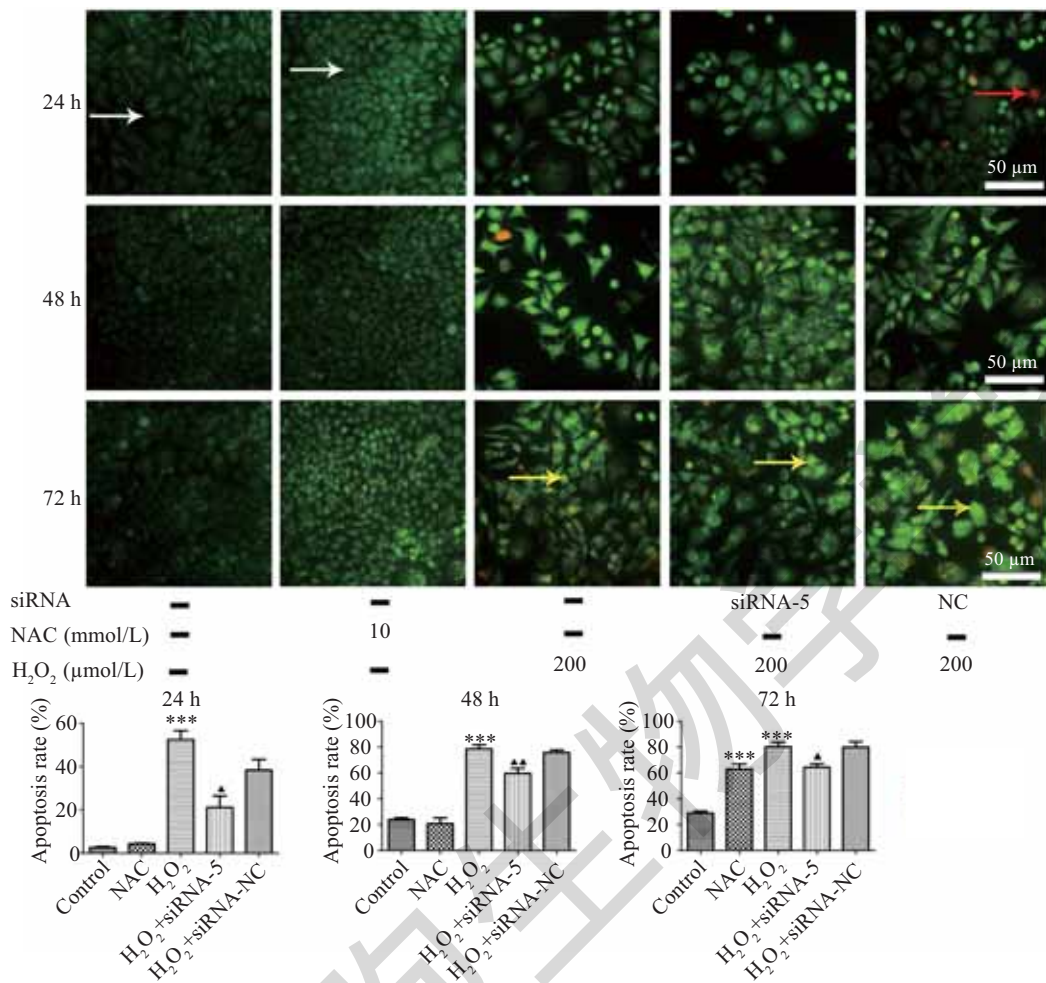
Fig.4 The cell viability of the breast cancer cell line MCF-7 treated 24, 48, 72 h by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与空白对照组比较; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ , 与双氧水+siRNA阴性对照组比。  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA negative control group.

图5 双氧水处理MCF-7细胞0、24、48、72 h时细胞迁移率变化

Fig.5 The cell migration rate of the breast cancer cell line MCF-7 treated 0, 24, 48, 72 h by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



白色箭头所指为正常细胞,红色箭头所指为死细胞,黄色箭头所指为凋亡细胞。\*\*\* $P < 0.001$ ,与空白对照组比较;▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ ,与双氧水+siRNA阴性对照组比较。

The normal cells are referred by white arrows, while the dead cells and the apoptosis cells are respectively referred by red arrow and yellow arrows. \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs  $H_2O_2$ +siRNA negative control group.

图6 双氧水处理MCF-7细胞24、48、72 h时细胞凋亡率的变化  
Fig.6 The cell apoptosis rate of the breast cancer cell line MCF-7 treated 24, 48, 72 h by  $H_2O_2$

体多种生物过程及细胞增殖和分化<sup>[22-23]</sup>。高浓度活性氧通过损伤DNA及破坏蛋白质等而改变细胞的相关功能<sup>[24]</sup>。肿瘤细胞通常维持较高的氧化状态<sup>[25]</sup>。目前,许多抗肿瘤药物通过改变体内活性氧水平而诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[26-27]</sup>。

MCF-7细胞加双氧水及去活性氧处理,结果显示,细胞中活性氧含量越低,对应ILP-2表达越高,提示双氧水抑制细胞中ILP-2的表达。设计合成siRNA干扰片段敲低MCF-7细胞ILP-2的表达,并加双氧水处理MCF-7细胞,结果显示,双氧水+siRNA-5组ILP-2相对表达量显著升高,提示高浓度的双氧水对细胞产生毒害,细胞通过增加ILP-2表达拮抗其毒害作用。

凋亡抑制蛋白在调节细胞迁移中起关键作用,过表达凋亡抑制蛋白(XIAP)能够增加细胞定向迁移<sup>[28]</sup>。干扰肾癌细胞中凋亡抑制蛋白(Livin)表达,能诱导细胞凋亡和细胞自噬的发生<sup>[29]</sup>。利用药物诱导乳腺癌细胞内产生高浓度活性氧,促发细胞氧化损伤,增加细胞凋亡和自噬<sup>[30]</sup>。本实验结果显示,双氧水处理乳腺癌细胞MCF-7后引起细胞生长和增殖能力下降,抑制细胞迁移,同时导致乳腺癌细胞凋亡增加,提示双氧水对MCF-7细胞生长、迁移和细胞凋亡等产生影响。在氧化应激状态下,干扰片段处理的乳腺癌细胞的生长和迁移增加,细胞凋亡减缓,提示细胞通过增加ILP-2表达拮抗活性氧的细胞毒性而促进细胞生长。

综上所述,双氧水对乳腺癌MCF-7细胞生长、迁移和细胞凋亡等产生影响,凋亡抑制蛋白ILP-2对活性氧引起的乳腺癌细胞氧化损伤有抵御作用。本研究为探讨ILP-2促进乳腺癌细胞生长的机制和明确ILP-2作为乳腺癌治疗的靶点提供了实验依据。

### 参考文献 (References)

- 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征. 中国癌症杂志(Zheng Ying, Wu Chunxiao, Zhang Minlu. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China. *China Oncology*) 2013; 23(8): 561-9.
- 柏尚柱. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征. 世界最新医学信息文摘(电子版)[Bo Shangzhu. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China. *World Latest Medicine Information (Electronic Version)*] 2017; 17(41): 253-6.
- Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, *et al.* Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol* 2001; 21(13): 4292-301.
- Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(3): 351-9.
- Lacasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008; 27(48): 6252-75.
- Xiang M, Zhou W, Gao D, Fang X, Liu Q. Inhibitor of apoptosis protein-like protein-2 as a novel serological biomarker for breast cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(12): 16737-50.
- Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 80: 50-64.
- 黎莉莉, 董芳蕊, 臧诗蕾, 臧林泉. 活性氧对肿瘤双向调节作用的研究进展. 中国临床药理学杂志(Li Lili, Dong Fangrui, Zang Shilei, Zang Linqun. Research progress of the bidirectional regulation of reactive oxygen species on tumor. *Chin J Clin Pharmacol*) 2017; 33(19): 1993-6.
- Khan MS, Dwivedi S, Priyadarshini M, Tabrez S, Siddiqui MA, Jagirdar H, *et al.* Ribosylation of bovine serum albumin induces ROS accumulation and cell death in cancer line (MCF-7). *Eur Biophys J* 2013; 42(11/12): 811-8.
- Ren G, Sha T, Guo J, Li W, Lu J, Chen X. Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. *J Nat Med* 2015; 69(4): 522-30.
- Gianni D, Taulet N, Dermardirossian C, Bokoch GM. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21(23): 4287-98.
- Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 2010; 112(1): 3-25.
- Shi X, Zhao Y, Jiao Y, Shi T, Yang X. ROS-dependent mitochondria molecular mechanisms underlying antitumor activity of *Pleurotus abalonus* acidic polysaccharides in human breast cancer MCF-7 cells. *PLoS One* 2013; 8(5): e64266.
- De Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 2012; 34(3): 200-11.
- 许杨, 赵晓航. IAP家族分子与肿瘤靶向治疗. 生命科学(Xu Yang, Zhao Xiaohang. IAP family and IAP-targeted cancer therapy. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2010; 22(2): 161-8.
- Wang S, Bai L, Lu J, Liu L, Yang CY, Sun H. Targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for new breast cancer therapeutics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17(3/4): 217-28.
- 向明钧, 方先松, 马明星, 谭德勇. 应用比较蛋白质组学技术筛选乳腺癌血清标志物. 云南大学学报(自然科学版)[Xiang Mingjun, Fang Xiangsong, Ma Mingxing, Tan deyong. Searching the breast cancer serum marker by using the comparative proteomics technology. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*] 2011; 33(4): 479-83.
- Abe S, Yamamoto K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, *et al.* Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia. *Leuk Res* 2005; 29(9): 1095-6.
- Li G, Chang H, Zhai YP, Xu W. Targeted silencing of inhibitors of apoptosis proteins with siRNAs: a potential anti-cancer strategy for hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(9): 4943-52.
- Chuturgoon AA, Phulukdaree A, Moodley D. Fumonisin B1 inhibits apoptosis in HepG2 cells by inducing Birc-8/ILP-2. *Toxicol Lett* 2015; 235(2): 67-74.
- Ren G, Luo W, Sun W, Niu Y, Ma D, Leung C, *et al.* Psoralidin induced reactive oxygen species (ROS)-dependent DNA damage and protective autophagy mediated by NOX4 in breast cancer cells. *Phytomedicine* 2016; 23(9): 939-47.
- Holbrook NJ, Ikeyama S. Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5/6): 999-1005.
- 熊珊珊, 石英英, 石汉平. 活性氧与肿瘤研究进展. 中华肿瘤防治杂志(Xiong Shanshan, Shi Yingying, Shi Hanping. Research status of reactive oxygen species and tumor. *Chin J Cancer Prev Treat*) 2014; 21(13): 1045-8.
- 易静, 杨洁. 活性氧调控蛋白质修饰影响肿瘤细胞行为机制的研究进展. 上海交通大学学报(医学版)[Yi Jing, Yang Jie. Study on the mechanisms underlying that reactive oxygen species regulate posttranslational modification of the proteins and affect the behaviors of cancer cells. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*] 2012; 32(9): 1122-7.
- Singh DV, Agarwal S, Singh P, Godbole MM, Misra K. Curcumin conjugates induce apoptosis via a mitochondrion dependent pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(10): 5797-804.
- Yu JQ, Liu HB, Tian DZ, Liu YW, Lei JC, Zou GL. Changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species during wogonin-induced cell death in human hepatoma cells. *Hepato Res* 2007; 37(1): 68-76.
- Dubrez L, Rajalingam K. IAPs and cell migration. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 39: 124-31.
- Wang Z, Liu S, Ding K, Ding S, Li C, Lu J, *et al.* Silencing Livin induces apoptotic and autophagic cell death, increasing chemotherapeutic sensitivity to cisplatin of renal carcinoma cells. *Tumor Biol* 2016; 37(11): 15133-43.
- Shi JM, Bai LL, Zhang DM, Yiu A, Yin ZQ, Han WL, *et al.* Saxifragifolin D induces the interplay between apoptosis and autophagy in breast cancer cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(7): 913-26.