

左旋咪唑抑制乳腺癌细胞MCF-7生长的作用机制

张智梁 向思琦 何世强 崔如霞 向明钧*

(吉首大学医学院生物化学与免疫学系医学研究中心, 湘西苗医小儿推拿医工交叉与转化国家民委重点实验室, 吉首 416000)

摘要 左旋咪唑可作为乳腺癌治疗的辅助药物, 然其抑制乳腺癌细胞MCF-7生长的作用机制仍未清楚。为探究左旋咪唑抑制乳腺癌细胞生长的分子机制, 该研究通过CCK-8法检测左旋咪唑对MCF-7细胞活力的影响, 细胞划痕检测细胞迁移变化, 显微镜下观察细胞形态学变化, 吖啶橙/溴化乙啶双荧光染色法(AO-EB)检测细胞凋亡, 免疫印迹法(Western blot, WB)检测PI3K/Akt、Bcl-2/Bax、Caspase-9/3相对表达变化。结果显示, 与对照组相比, 加药组细胞增殖受到显著抑制, 其效应与药物浓度和作用时间均呈正相关; 与对照组相比, 加药组细胞形态发生皱缩, 趋于圆形, 胞内出现大量空泡; 细胞划痕结果显示, 加药组细胞迁移能力受到显著抑制; AO-EB结果表明, 加药组细胞凋亡小体增加, 细胞凋亡率显著上升; 免疫印迹法结果表明, 与对照组相比, 加药组PI3K/Akt、Bcl-2相对表达量显著下降($P < 0.01$), Bax、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达显著上升($P < 0.001$)。结果表明, 左旋咪唑可通过抑制PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号途径来抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖、迁移, 从而促进细胞凋亡, 抑制细胞的生长。

关键词 左旋咪唑; 细胞凋亡; 细胞增殖; PI3K/Akt; Bcl-2/Bax

The Mechanism Underlying the Inhibition of the Growth of Breast Cancer Cell MCF-7 by Levamisole

ZHANG Zhiliang, XIANG Siqi, HE Shiqiang, CUI Ruxia, XIANG Mingjun*

(Department of Biochemistry and Immunology, Medical Research Center, Institute of Medicine, Jishou University, the Key Laboratory of the State Ethnic Affairs Commission of Xiangxi Miao Medicine Pediatric Tuina Medical Intersection and Transformation, Jishou 416000, China)

Abstract Levamisole can be used as an adjuvant drug in the treatment of breast cancer, but its mechanism of inhibiting the growth of breast cancer cells is not clear. To explore its molecular mechanism, used CCK-8 assay results showed that levamisole inhibited cell viability in a dose- and time-dependent manner. Verify cell migration ability using cell scratches, microscopic observation of its effect on cell morphology, double fluorescence staining with AO-EB (acridine orange/ethidium bromide) staining method revealed that levamisole treatment induced apoptosis, directly measured the expressions of PI3K/Akt, Bcl-2/Bax, and Caspase-9/3 by Western blot. The results showed that compared with the control, cell proliferation of the levamisole treatment group was significantly inhibited, and the effect was positively correlated with the drug concentration and time of action;

收稿日期: 2021-01-20 接受日期: 2021-03-22

国家自然科学基金(批准号: 81360397)、湖南省科技厅自然科学基金(批准号: 2020JJ4513)和湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 19A400)资助的课题

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

Received: January 20, 2021 Accepted: March 22, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360397), the Natural Science Foundation of Hunan Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2020JJ4513), and the Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education (Grant No.19A400)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5534>

Compare with the control group, the morphology of the cells in the levamisole treatment group shrank, tending to be round, meanwhile a large number of vacuoles appeared in the cells, and cell migration ability of the levamisole treatment group was significantly inhibited; AO-EB results showed that the apoptotic bodies increased after drug treatment, and the apoptotic rate increased significantly; the relative expressions of PI3K/Akt and Bcl-2 decreased significantly ($P < 0.01$), and the protein expression of Bax, Caspase-9, and Caspase-3 increased significantly ($P < 0.001$) detected by Western blot. In summary, levamisole inhibited the proliferation and migration of breast cancer cells MCF-7 by inhibiting PI3K/Akt and Bcl-2/Bax signal pathways, and promoted cell apoptosis to inhibit cell growth.

Keywords levamisole; apoptosis; cell proliferation; PI3K/Akt; Bcl-2/Bax

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,居世界女性肿瘤发病率第1位,女性肿瘤死亡率的第2位,严重威胁着世界女性的身心健康^[1]。在过去30年里,我国女性乳腺癌发病率上升趋势尤其明显^[2]。目前,乳腺癌晚期患者的5年生存率仍不足30%,全球每年仍有100万以上新生乳腺癌病例,超40万人死亡^[3]。因此寻找疗效更为确切的治疗药物刻不容缓^[4]。

近年来,具有多靶点、低毒性、良好疗效等的靶向药物及其单体成分在抗肿瘤方面的研究中取得很大进展,受到越来越多的关注^[5]。左旋咪唑(levamisole, LMS)(图1)又称保松噻或盐酸左旋咪唑,是由消旋四咪唑与D-樟脑-10-磺酸环合,再水解成盐而得^[6]。LMS是一种副作用少的广谱药,无明显毒性,能够刺激细胞免疫反应,增强宿主对细菌及病毒感染的抵抗能力,可用于自体免疫性疾病等^[7-8]。随着研究的深入,发现LMS具有较强癌症预防的能力,可用于癌症的治疗。目前,已试用于乳腺癌晚期化疗、乳腺癌术后的辅助治疗,也可用于急性白血病、恶化淋巴瘤化疗后的辅助治疗^[9-11]。然而,目前对于LMS的研究主要集中在功能学等方面^[12]。对于其抑制肿瘤细胞的生长、增殖,促进肿瘤细胞发生凋亡等方面的作用机制仍需深入研究。

本研究首先验证了LMS能够抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖。通过细胞划痕来检测LMS对细胞迁移能力的影响。接着通过吖啶橙/溴化乙啶双荧

光染色法(acridine orange/ethidium bromide, AO-EB)染色技术来检测LMS对于细胞凋亡的影响。最后通过免疫印迹法(Western blot, WB)检测LMS对PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号通路的影响,期待探索LMS抑制乳腺癌细胞生长的分子机制,为LMS抗乳腺癌的临床运用以及相关靶向药物研发提供科学的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

人类乳腺癌细胞MCF-7购于苏州齐氏生物科技有限公司; RPMI 1640培养液、低内毒素胎牛血清购于美国Gibco公司;青-链霉素EDTA混合液、0.25%胰酶消化液(含EDTA)、LMS购于北京索莱宝生物科技有限公司;细胞裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂、BCA(bicinchoninic acid)蛋白质检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司、WB增强化学发光试剂盒(enhanced chemoluminescence, ECL)超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司; CCK-8(cell counting kit-8)法细胞增殖检测试剂盒、活细胞/凋亡细胞/坏死细胞(AO-EB)细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物技术有限公司; Bax、Bcl-2、Caspase-9、Caspase-3兔多抗购于武汉三鹰生物技术有限公司; PI3K、Akt兔多抗、内参蛋白 β -肌动蛋白、微管蛋白兔多抗购于美国Abcam公司。主

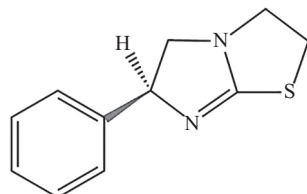


图1 左旋咪唑化学结构

Fig.1 The chemical structure of levamisole

要仪器包括: BX51荧光显微镜、EL×800酶标仪、Centrifuge5430R低温离心机、DYY-11型电泳仪、MiniChmi420化学发光成像仪。

1.2 细胞培养

将冻存有细胞的冻存管迅速置于37 °C条件下温浴, 并不断摇动至还剩少许冰块时取出, 将细胞悬液吸到15 mL离心管中, 1000 r/min离心5 min后弃上清, 在沉淀中加入10 mL完全培养基并吹打均匀, 再1 000 r/min离心5 min后弃上清; 加入适当培养基后将细胞转移至培养箱中, 次日观察并换液。将长满细胞的培养皿中原来的培养液弃除, 加入1 mL胰酶消化2 min, 倒置观察, 等细胞逐渐趋于圆形, 弃胰酶, 加入3 mL完全培养液终止消化。再用吸管将贴壁的细胞吹打成悬液, 分到另外2或3个100 mm培养皿中, 放入37 °C、5% CO₂、95%饱和湿度的培养箱中培养, 以备后续实验使用。

1.3 CCK-8法检测LMS对MCF-7增殖活力的影响

取对数生长期的MCF-7细胞, 用胰酶消化后制备成2 mL细胞悬液进行细胞计数, 将细胞量稀释为所需要的浓度备用。药物配置: 将准备好的LMS溶解于适量的去离子水中并配制成储备液, 备用。取1 mL LMS储备液用无血清培养基PRMI 1640稀释为0、50、100、150、200、250、300、350、400、500 mg/L的细胞培养液。取100 μL细胞悬液接种到96孔板(约8×10⁴细胞/孔)中, 每组设立6个平行复孔, 于37 °C、5% CO₂过夜孵育后加入含不同浓度的LMS的新鲜培养基, 分别培养24、48、72 h后, 每孔加入10 μL CCK-8染液, 37 °C培养箱避光孵育1 h, 用酶标仪读取波长为450 nm处的光密度(optical density, *D*)值, 其中加入等体积细胞培养液和CCK-8溶液, 但未加入细胞的孔作为空白对照, 实验重复3次。细胞抑制率(%)=[1-(*D*_{450给药组}-*D*_{450空白对照组})/(*D*_{450对照组}-*D*_{450空白对照组})]×100%。

1.4 实验分组

将6孔板中每孔加入5×10⁴个MCF-7的细胞悬液, 用5%低内毒素胎牛血清RPMI 1640培养基培养24 h。待细胞长到50%~60%时, 弃培养基, 将细胞分成对照组和给药组, 对照组为不加药物只加入相应体积的培养液, 给药组加入含有100、300、500 mg/L的LMS培养基(该药物浓度梯度是根据CCK-8结果所得出的药物IC₅₀值挑选的)共4组, 处理时间分别为24、48、

72 h, 以备后续实验。

1.5 细胞划痕实验

先用Marker笔在6孔板背面均匀地画5条平行横线中间一条粗一些, 每条横线间隔0.5 cm, 横穿过孔。在每个孔中加入50 μL(约2×10⁵个/孔)细胞, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h。待细胞铺满以后弃培养基, 用100 μL枪头垂直于背后的横线划痕, 不同孔之间最好使用同一根枪头, 划3条竖线。用预冷的PBS清洗细胞3次, 去掉划下的细胞, 加入的血清含有不同浓度的LMS培养液, 设立对照组不加药, 采集0 h的细胞图像, 将细胞放入培养箱中培养, 接着分别采集24、48、72 h细胞图。用ImageJ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。

1.6 细胞形态学变化观察

在6孔板中每孔加入5×10⁴个MCF-7的细胞悬液, 加入适量培养基, 37 °C、5% CO₂过夜孵育, 24 h后弃原培养基后加入300 mg/L的LMS溶液的培养基后倒置荧光下拍照记录作为对照组, 再继续培养24、48、72 h后, 倒置荧光显微镜下观察并拍照记录各时间段细胞形态学变化, 实验设立3组重复对照。

1.7 吖啶橙/溴化乙啶双荧光染色法(AO-EB)检测细胞凋亡

在6孔板中放入已灭菌处理的盖玻片(24 mm×24 mm), 每孔加入1×10⁴个细胞, 37 °C、5% CO₂过夜孵育后加入含有不同浓度的LMS培养基处理后, 放入37 °C、5% CO₂的培养箱中, 分别在24、48、72 h时用PBS清洗细胞2次, 并使用AO-EB双染色法对细胞进行染色处理。将盖玻片倒置于已灭菌处理的载玻片上, 荧光显微镜下观察并拍照, 采集6个视野进行计数。正常细胞: 细胞被均匀地染成绿色, 并保持原有形状; 坏死细胞: 整体被染成橙红色或者红色, 呈圆形或保持椭圆形, 形态结构单一; 凋亡早期细胞: 核质体呈绿色, 细胞形态不规则, 多呈新月状; 凋亡晚期细胞: 细胞核质体被染成绿色或核碎裂成点状, 形态不规则, 或细胞趋于破裂, 核质体染成橙红色。明显可见有胞质芽状突起。细胞凋亡率(%)=(凋亡早期细胞+凋亡晚期细胞)/细胞总数×100%, 实验重复3次。

1.8 蛋白质免疫印迹检测各标志蛋白的变化

分别用含有不同浓度的LMS培养基处理MCF-7细胞, 放入37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 培养24 h

后收集各组细胞,用预冷的PBS清洗细胞2次,加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液RIPA,实验方法严格按照产品说明书进行操作,提取总蛋白。BCA法测定各组提取的总蛋白浓度,蛋白质溶液与5×蛋白质上样缓冲液以4:1体积比混匀后,100 °C煮沸10 min,使蛋白质完全变性。每孔分别取20 μL总蛋白上样,进行SDS-PAGE,80 V电泳30 min后,电压调至100 V,继续电泳1.5 h,用半干转膜法将蛋白质转移至0.22 μm PVDF膜上,用含有5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h,加入一抗PI3K/Akt、Bcl-2/Bax、Caspase-9、Caspase-3于4 °C孵育过夜。次日用TBST漂洗5次,每次5 min后,于二抗中室温孵育1 h, TBST漂洗5次,每次5 min后,用增强化学发光试剂(ECL)显影,利用化学发光成像系统检测各组间PI3K/Akt、Caspases-9/3、Bcl-2/Bax蛋白表达的差异。用ImageJ软件处理所得条带光密度值,根据蛋白分子量选择合适的内参蛋白作为对照,以目的蛋白光密度值/内参蛋白光密度值来反映目的蛋白质的相对表达量。

1.9 统计学方法

所有数据以及图表均采用Graphpad Prism 8制作。结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异显著性检验采用独立样本 t 检验分析。每组实验独立重复3次, $P < 0.05$ 统计学差异显著。

2 结果

2.1 LMS抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖

为探究LMS对MCF-7细胞增殖活力的影响,用不同浓度的LMS分别处理24、48、72 h后,利用CCK-8法检测各组细胞增殖活性变化(图2)。结果显示,随着处理浓度的增大和时间的延长,LMS对MCF-7细胞细胞活力的抑制作用明显增强,

且呈一定的浓度-时间依赖关系。LMS处理24 h时, IC_{50} 为(380.83±10.47) mg/L;处理48 h时, IC_{50} 为(308.58±1.39) mg/L;处理72 h时, IC_{50} 为(191.62±1.25) mg/L。结果表明,LMS能够有效抑制MCF-7细胞增殖。

2.2 LMS抑制MCF-7细胞迁移

为探究LMS对于MCF-7细胞迁移能力的影响,利用细胞划痕法在6孔板中分别检测不同浓度的LMS处理24、48、72 h后MCF-7细胞迁移活力的变化(图3)。结果显示,与对照组相比,100 mg/L LMS处理24、48、72 h细胞迁移率为(17.457%±3.820%),无显著差异, $P > 0.05$; (32.766%±9.419%, $P < 0.05$)、(39.760%±8.396%, $P < 0.05$),有显著差异;300 mg/L LMS处理24、48、72 h,细胞迁移率为(6.794%±3.141%, $P < 0.01$)、(16.589%±2.972%, $P < 0.001$)、(22.779%±2.810%, $P < 0.001$),差异极其显著;500 mg/L LMS处理24、48、72 h,细胞迁移率分别为(4.070%±2.536%, $P < 0.01$)、(6.782%±1.485%, $P < 0.0001$)、(12.071%±2.068%, $P < 0.0001$),差异极其显著。结果表明,细胞迁移活力呈药物浓度和时间依赖性,随着加入的药物浓度与时间的增加,抑制细胞迁移效果越显著。

2.3 LMS处促进MCF-7细胞形态改变

为探究LMS对于MCF-7形态结构的影响,通过显微观察细胞形态的变化,结果见图4。与对照组细胞相比,加药处理后细胞形态发生皱缩,细胞趋于圆形,结构单一,多呈新月状,且随着作用时间的增加,多数细胞形态呈弥散,细胞内出现大量空泡,已不具有完整细胞形态,多数细胞发生凋亡,表明LMS能够显著改变细胞形态,促使细胞发生凋亡。

2.4 LMS促进MCF-7细胞凋亡

为进一步探究LMS对乳腺癌细胞MCF-7凋亡的影响,利用吖啶橙/溴化乙啶双荧光染色法(AO-EB)检测不同浓度LMS分别作用细胞24、48、72 h后

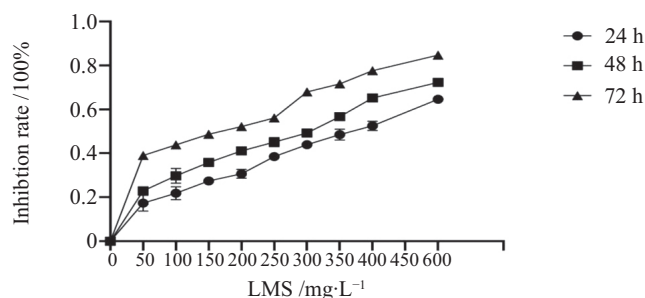
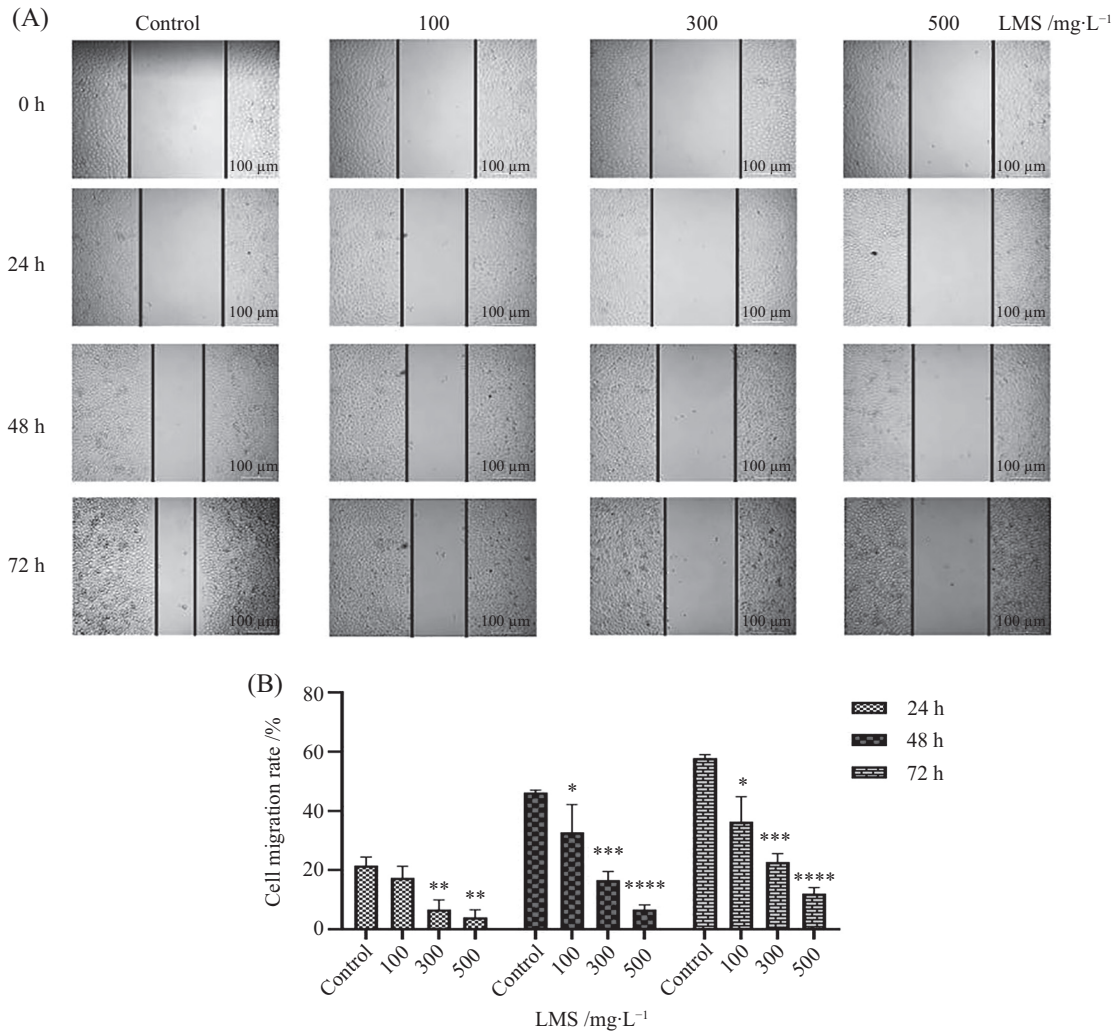


图2 左旋咪唑以剂量和时间依赖的方式抑制MCF-7细胞增殖

Fig.2 Levamisole inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a dose- and time-dependent manner

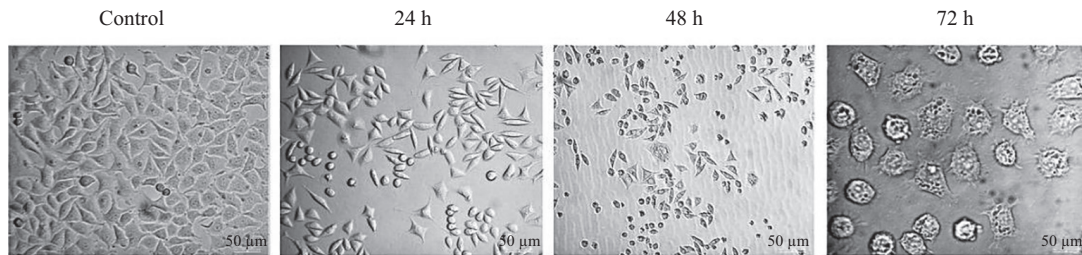


A: 细胞划痕分析用不同浓度的左旋咪唑处理24、48、72 h, MCF-7细胞迁移活性的变化; B: 不同时间点的细胞迁移率分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与对照组相比较; $n=3$ 。

A: cell scratch analysis of the changes in the migration activity of MCF-7 cells after treatment with different concentrations of levamisole for 24, 48, 72 hours; B: analysis of cell migration rate at different time points. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs the control group; $n=3$.

图3 细胞划痕检测左旋咪唑对细胞迁移的影响

Fig.3 Cell scratch detection of the effect of levamisole on cell migration



300 mg/L左旋咪唑处理0、24、48和72 h后细胞形态和结构的变化。

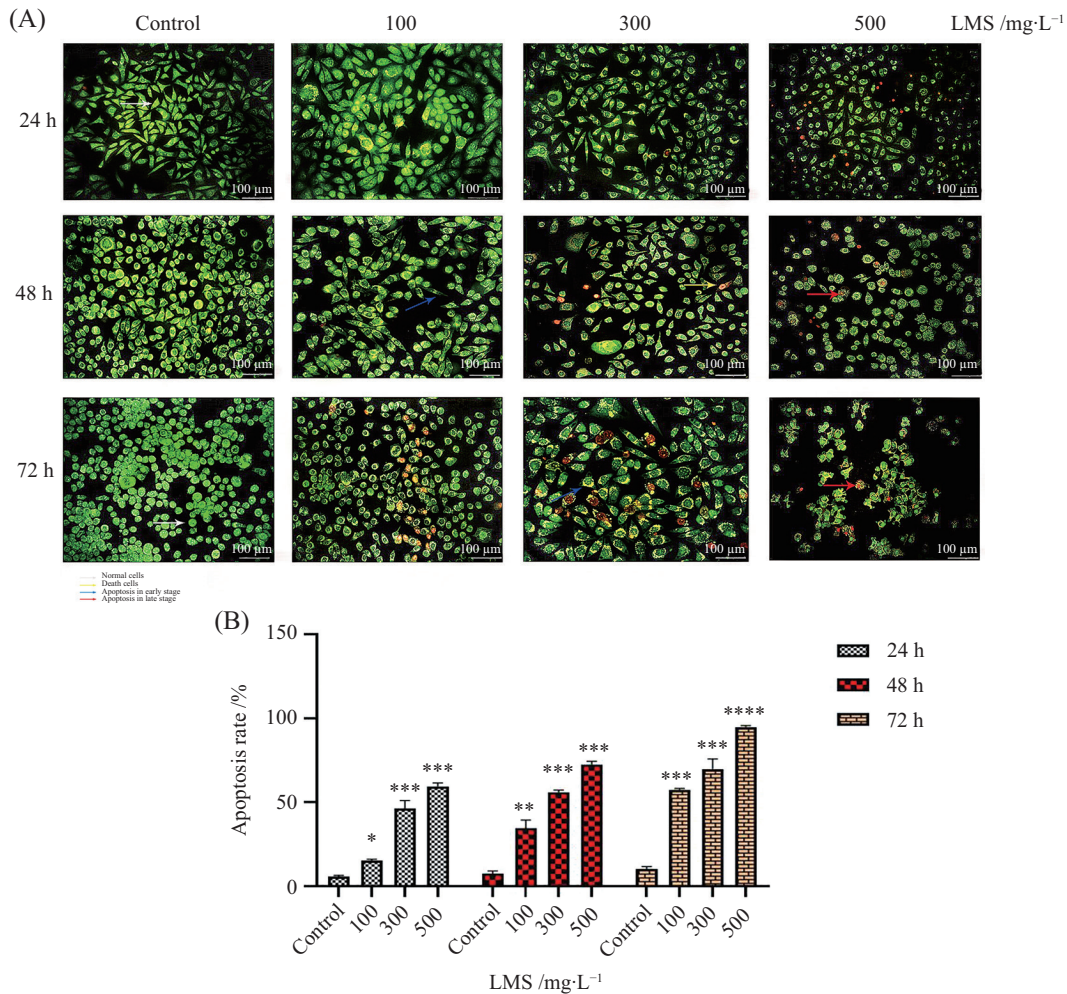
The changes of cell morphology and structure after treatment with 300 mg/L levamisole for 0, 24, 48 and 72 hours.

图4 左旋咪唑对细胞形态的影响

Fig.4 Effect of levamisole on cell morphology

细胞凋亡情况, 结果见图5。100 mg/L LMS处理24、48、72 h细胞凋亡率为(15.469%±0.737%, $P<0.05$)、(34.641%±4.833%, $P<0.01$)、(57.620%±0.662%,

$P<0.001$); 300 mg/L LMS处理24、48、72 h, 细胞凋亡率为(46.468%±4.551%, $P<0.001$)、(56.012%±1.333%, $P<0.001$)、(69.760%±6.081%, $P<0.001$), 凋亡率显著高



A: AO/EB检测不同浓度左旋咪唑处理MCF-7乳腺癌细胞24、48和72 h后细胞凋亡情况; B: 分析不同时间点的细胞凋亡率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与对照组比较; $n = 3$ 。

A: AO/EB staining of MCF-7 breast cancer cells after treatment with different concentrations of levamisole for 24, 48, 72 hours; B: analysis of cell apoptosis rate at different time points. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs the control group; $n = 3$.

图5 AO-EB法检测细胞凋亡

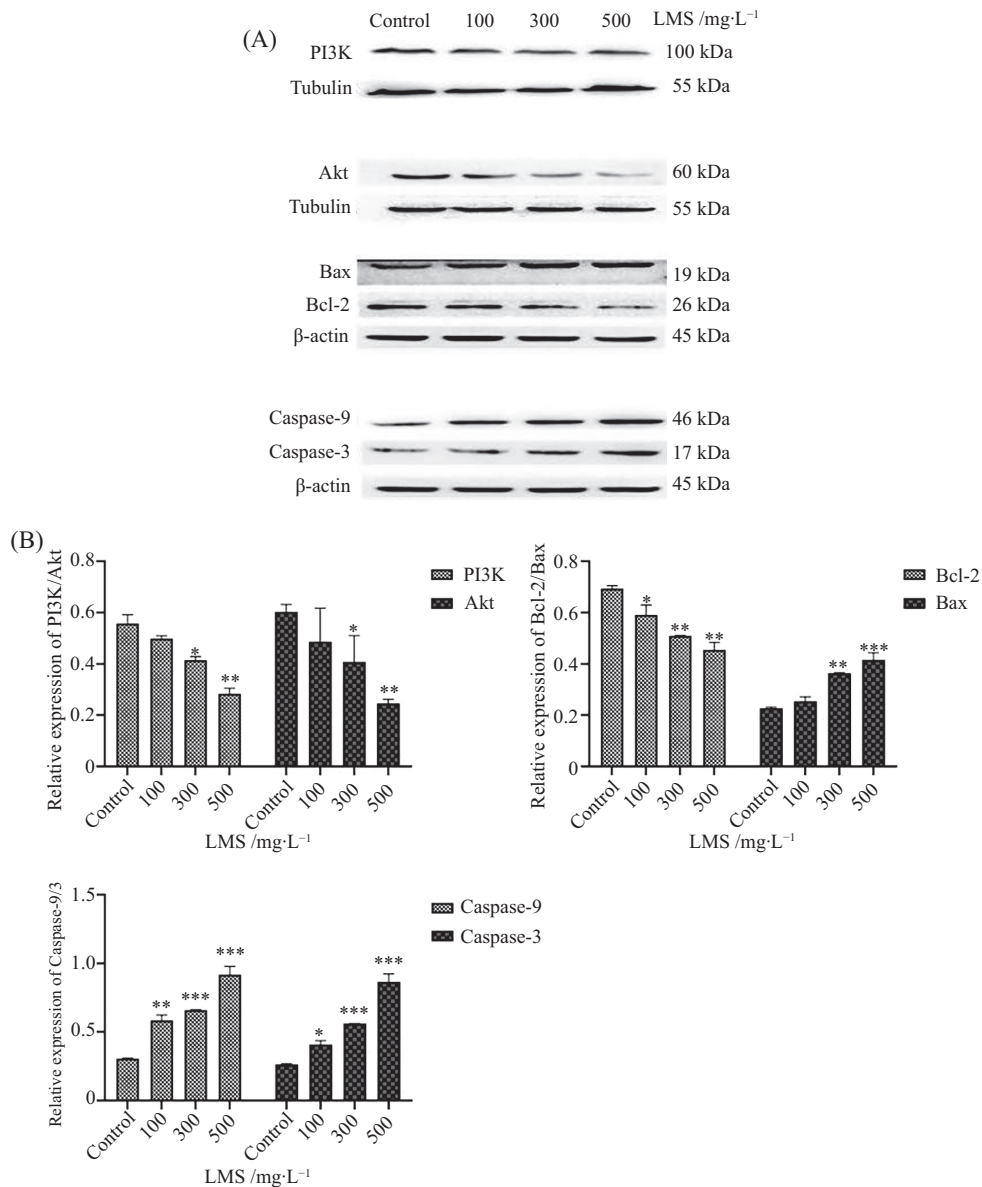
Fig.5 Cell apoptosis was detected using AO-EB method

于对照组, 且具有显著性差异; 500 mg/L LMS处理24、48、72 h, 细胞凋亡率为(59.623%±1.903%, $P < 0.001$)、(72.520%±1.877%, $P < 0.001$)、(94.760%±0.956%, $P < 0.0001$), 凋亡率显著高于对照组。结果表明, LMS能够有效促进乳腺癌细胞MCF-7的凋亡, 并呈药物浓度与作用时间的依赖性。

2.5 LMS通过抑制PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号通路诱导MCF-7细胞凋亡

为探究LMS是否通过PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号通路影响细胞增殖与凋亡, 利用蛋白质免疫印迹法来检测LMS处理乳腺癌细胞48 h后相关信号通路蛋白表达的变化, 结果见图6。与对照组相比, 100 mg/L LMS作用48 h后的乳腺癌细胞MCF-7中PI3K(0.499±0.011,

$P > 0.05$)、Akt(0.486±0.131, $P > 0.05$)、Bax(0.254±0.017, $P > 0.05$), 无显著差异; Bcl-2(0.590±0.040, $P < 0.05$)、Caspase-9(0.585±0.039, $P < 0.01$)、Caspase-3(0.410±0.027, $P < 0.05$), 差异显著。300 mg/L LMS作用48 h后的乳腺癌细胞MCF-7中PI3K(0.414±0.014, $P < 0.05$)、Akt(0.408±0.103, $P < 0.05$)、Bcl-2(0.509±0.002, $P < 0.01$)、Bax(0.364±0.001, $P < 0.01$)、Caspase-9(0.660±0.002, $P < 0.001$)、Caspase-3(0.560±0.002, $P < 0.001$), 与对照组相比有显著差异性。500 mg/L LMS作用48 h后的乳腺癌细胞MCF-7中PI3K(0.283±0.023, $P < 0.01$)、Akt(0.246±0.016, $P < 0.01$)、Bcl-2(0.454±0.030, $P < 0.001$)、Bax(0.416±0.028, $P < 0.001$)、Caspase-9(0.917±0.061, $P < 0.001$)、Caspase-3(0.866±0.058, $P < 0.001$), 显著差增加。结果表明, LMS可能通过调控



A、B: 不同浓度的左旋咪唑对MCF-7细胞PI3K/Akt、Bcl-2/Bax、Caspase-9/3蛋白表达的影响。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A,B: the effect of different concentrations of levamisole on PI3K/Akt, Bcl-2/Bax, Caspase-9/3 protein expression in MCF-7 cells. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with the control group; $n=3$ 。

图6 WB检测相关蛋白的相对表达

Fig.6 WB detects the relative expression of related proteins

PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号途径来抑制乳腺癌MCF-7增殖, 促进细胞凋亡的发生。

3 讨论

研究表明, LMS具有较强的癌症预防及治疗作用。本文研究发现, LMS呈浓度和时间依赖性地抑制MCF-7细胞活力的作用。LMS亦具有明显诱导细胞凋亡的作用, 与以往研究结果相符^[9]。以上结果提示, LMS可能成为临床上用于抗乳腺癌的潜在药物。

细胞凋亡是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的、程序化的死亡过程^[13]。当细胞的凋亡信号受到抑制发生基因突变后, 细胞将无法识别清除受损以及突变细胞, 导致细胞异常增殖, 最终导致肿瘤的发生^[14]。乳腺癌的生长与细胞凋亡调节紊乱密切相关, 在乳腺癌的发生发展中细胞凋亡起负调控作用, 可以阻遏癌细胞的生长。本研究通过CCK-8检测发现, LMS能够显著抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖; 划痕结果表明, LMS处理后细胞迁

移能力显著下降; AO-EB荧光染色结果表明, LMS处理细胞后凋亡小体数目明显增加, 细胞凋亡率显著提升。以上结果提示, LMS具有抑制乳腺癌细胞增殖、促进其发生凋亡的作用。已有大量研究显示, 肿瘤的发生发展与PI3K/Akt信号通路有密切关系, 探讨PI3K/Akt通路对于肿瘤的防治具有重要的理论意义和临床应用价值。

为探究LMS是否能够通过PI3K/Akt信号途径来影响乳腺癌细胞MCF-7的生长与凋亡^[15], LMS处理48 h后检测相关信号蛋白的相对表达变化。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 由一个催化亚基p110和一个调节亚基p85构成^[16]。其自身具有Ser/Thr激酶的活性, 也具有磷脂酰肌醇激酶的活性^[17]。PI3K/Akt通路广泛存在于细胞中, 是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路。PI3K/Akt信号转导通路抗细胞凋亡作用可能与下面几种机制有关^[18-20]。

(1) PI3K依赖性的Akt的激活可以使Bad磷酸化, 磷酸化的Bad与Bcl-2或Bcl-xL解聚, 促使Bcl-2发挥抗凋亡作用^[21-22]。同时, PI3K/Akt通路的激活, 促使Bax磷酸化而失活, 从而抑制细胞凋亡^[23-24]。(2) 活化的Akt可直接催化磷酸化Caspase-9和Caspase-3, 使其失活, 抑制Caspase导致的细胞凋亡^[25]。(3) 活化的Akt能够抑制线粒体释放胞色素c及凋亡因子, 从而降低Caspase-9的激活, 进一步抑制Caspase-3的活性, 从而抑制细胞凋亡^[26]。(4) 活化的Akt还能通过促进P53的降解来影响细胞存活^[27]。(5) 通过TSC1/2蛋白复合物激活mTOR的活性来调节细胞的增殖、凋亡与迁移^[28]。本研究结果显示: 药物作用48 h后细胞PI3K/Akt的相对表达较对照组显著下降, 导致其下游相关信号蛋白Caspase-9/3受到抑制, 进一步导致细胞生长受到显著抑制, 增殖能力显著下降, 迁移能力下降, 细胞凋亡率显著上升。

Bcl-2家族蛋白是公认的细胞凋亡调节蛋白^[29-31], Bcl-2与Bax蛋白的比例是反映细胞凋亡的重要指标, 当细胞发生凋亡后Bcl-2/Bax比值下降^[32-33]。基于验证LMS是否能够通过Bcl-2/Bax信号途径来影响乳腺癌细胞MCF-7的增殖与凋亡, 设计了本研究, 结果显示: 与对照组相比, 加入药物处理后Bcl-2/Bax比值降低, 其下游促生长相关信号通路也随之受到抑制, 促凋亡信号通路被激活, 最终使得细胞凋亡率显著提升。Caspase家族是促进细胞凋亡的核心因子, 在执行细胞凋亡的过程中发挥关键作用^[34]。Caspase-9

是凋亡通路的关键蛋白, Caspase-3是细胞凋亡最重要的执行者, 当发生细胞凋亡时, Caspase-9、Caspase-3的表达和活性提升, 细胞高表达的Caspase-9能够进一步剪切激活Caspase-3, 使其执行凋亡, 最终使得细胞凋亡率显著提升^[35]。本研究结果显示: LMS处理细胞后Caspase-9、Caspase-3表达显著上调。以上结果提示, LMS可能通过下调Bcl-2相关蛋白的表达, 抑制其相关活性, 而Bax表达上调, 导致Bcl-2/Bax比值下降, 进一步促进凋亡相关蛋白Caspase-9、Caspase-3的表达来抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖和迁移、促进细胞凋亡的发生。

综上所述, LMS可能通过抑制PI3K/Akt、Bcl-2/Bax相关信号通路, 促进Caspase-9/3的活性与表达, 来抑制乳腺癌MCF-7的生长、增殖与迁移, 促进其凋亡的发生, 且此效应随着加入LMS浓度及作用时间的增加显著提升。本研究揭示了LMS抑制乳腺癌细胞MCF-7生长、增殖和迁移的相关分子机制, 为LMS抗乳腺癌作用的深入研究、临床运用以及相关靶向药物研发提供科学的理论支持。至于是否与其他分子机制如腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路、基质金属蛋白-2/3/9(matrix metalloproteinase-2/3/9, MMP-2/3/9)等信号途径有关, 本研究将会继续探究。

参考文献 (References)

- [1] FENG R M, ZONG Y N. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 1-12.
- [2] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. *中国肿瘤临床(CHEN W Q, ZHENG R S. Incidence, mortality and survival analysis of breast cancer in China [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology)*, 2015, 42(13): 668-74.
- [3] FERLAY J. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018 [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 103: 356-87.
- [4] CHAUDHRY G E. Induction of cytotoxicity by *Bruguiera gymnorhiza* in human breast carcinoma (MCF-7) cell line via activation of the intrinsic pathway [J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2020, 11(4): 233-7.
- [5] CARNEIRO B A, ELDEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417.
- [6] GUPTA M. Levamisole: A multi-faceted drug in dermatology [J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2016, 82(2): 230-6.
- [7] 李向东, 王莹, 舒培, 等. 盐酸左旋咪唑免疫调节作用的临床观察[J]. *天津药学(LI X D, WANG Y, SHU P, et al. Clinical observation on the immunomodulation effect of levamisole hydrochloride suppository [J]. Tianjin Pharmacy)*, 2000(2): 44-5.
- [8] 李璐瑒. 驱虫药左旋咪唑的其他用途[J]. *首都医药(LI L Y.*

- Other uses of anthelmintic levamisole [J]. *Capital Medicine*, 2009, 16(17): 41.
- [9] QIAO X. Levamisole enhances DR4-independent apoptosis induced by TRAIL through inhibiting the activation of JNK in lung cancer [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118034.
- [10] 李莉, 周延安. 左旋咪唑的临床新用途[J]. *医药导报*(LI L, ZHOU Y N. New clinical uses of levamisole [J]. *Herald of Medicine*), 1994(5): 235-6.
- [11] 庄潮平, 沈文律, 吴俊伟, 等. 大肠癌术后5-Fu、醛氢叶酸、左旋咪唑联合化疗的临床研究[J]. *中国普外基础与临床杂志*(ZHUANG C P, SHEN W L, WU J W. Clinical study on the allied chemotherapy with 5-Fu, leucovorin and levamisole after colorectal cancer surgery [J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*), 2001(3): 164-5.
- [12] 康健, 周联波, 谢占武. 免疫增强剂的研究进展[J]. *实用药物与临床*(KANG J, ZHOU L B, XIE Z W. Research progress of immune enhancers [J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*), 2005(S1): 26-9.
- [13] KACZANOWSKI S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging [J]. *Phys Biol*, 2016, 13(3): 031001.
- [14] PISTRITTO G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-19.
- [15] XIONG Y, LU H, XU H. Galangin reverses hepatic fibrosis by inducing HSCs apoptosis via the PI3K/Akt, Bax/Bcl-2, and Wnt/ β -Catenin pathway in LX-2 cells: regular articles [J]. *Biol PharmBull*, 2020, 43(11): 1634-42.
- [16] SARA E. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer [J]. *Drugs*, 2020, 80: 1685-97.
- [17] 吴日平, 黄昌明. PI3K/Akt信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. *医学综述*(WU R P, HUANG C M. Correlation of PI3K/Akt signaling pathway to tumors [J]. *Medical Recapitulate*), 2009, 15(10): 1501-4.
- [18] 廖明娟, 陈红风. PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制剂在乳腺癌中的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*(LIAO M J, CHEN H F. Targeted therapy on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer Chinese [J]. *Journal of Cancer Prevention and Treatment*), 2012, 19(3): 230-4.
- [19] 席广民, 牛瑞芳. PI3K-Akt信号通路阻断在乳腺癌治疗中的作用[J]. *中华肿瘤防治杂志*(XI G M, NIU R F. Effects of blocking PI3K-Akt signal pathway in breast cancer therapy [J]. *Journal of Cancer Prevention and Treatment*), 2007(3): 230-3.
- [20] LEE J J, LOH K, YAP Y S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer [J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(4): 342-54.
- [21] WAN G, MAHAJAN A, LIDKE D, et al. Bcl-2 together with PI3K p110 α regulates cell morphology and cell migration [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e2006.
- [22] WANG C Y, DING C F, HUA Z J, et al. Cangfudaotan decoction alleviates insulin resistance and improves follicular development in rats with polycystic ovary syndrome via IGF-1-PI3K/Akt-Bax/Bcl-2 pathway [J]. *Med Inflamm*, 2020, 2020: 1-16.
- [23] LI L P, WANG F X, ZHANG J J, et al. Typical phthalic acid esters induce apoptosis by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway in rat insulinoma cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: e111461.
- [24] JEBABI A, VILLEDIEU M, PETIGNY C, et al. 849: PI3K/mTOR dual inhibition modulates Bcl-2 family proteins expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737 [J]. *European J Cancer*, 2014, 50: s207.
- [25] RAHMAN M A, SIK B, AHAC D, et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway [J]. *Gene*, 2021, 768: e145288.
- [26] SONG L Q, ZHANG H F, HU M, et al. Sinomenine inhibits hypoxia induced breast cancer side population cells metastasis by PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 31: 115986.
- [27] CHEN Y H, YANG S F, YANG C K, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells [J]. *Molr Med Rep*, 2021, 23(1): 1.
- [28] HAMUNYELA R H, SERAFIN A M, AKUDUGU J M. Strong synergism between small molecule inhibitors of HER2, PI3K, mTOR and Bcl-2 in human breast cancer cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2017, 38: 117-23.
- [29] DONG B Z, YANG Z J, JU Q, et al. Anticancer effects of fufang Yiliu Yin formula on colorectal cancer through modulation of the PI3K/Akt pathway and BCL-2 family proteins [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 704.
- [30] ROBERTS A W. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2020, 2020(1): 1-9.
- [31] DEVERAUX Q L, SCHENDEL S.L, REED J C. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families [J]. *Cardiol Clin*, 2001, 19(1): 57-74.
- [32] MEHRI N. Methanolic extract of *Artemisia absinthium* prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio, cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(11): 8831-40.
- [33] ANTONSSON B, MARTINOUC J C. The Bcl-2 protein family [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256(1): 50-7.
- [34] CULLEN S P. Martin. Caspase activation pathways: some recent progress [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7): 935-8.
- [35] FARHAD E, MAJID M, ESMAEIL B, et al. Down-regulation of survivin and Bcl-2 concomitant with the activation of caspase-3 as a mechanism of apoptotic death in KG1a and K562 cells upon exposure to a derivative from ciprofloxacin family [J]. *Toxicol App Pharmacol*, 2020, 409: 115113.