

二氟尼柳调控ILP-2/Bcl-2/Bax信号通路促进 乳腺癌细胞凋亡

彭航 向思琦 蒋双艳 崔如霞 向明钧*

(吉首大学医学院基础医学系, 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 该文旨在探讨二氟尼柳对乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231凋亡的影响及分子机制。采用CCK-8法检测不同浓度二氟尼柳对乳腺癌细胞增殖的影响; 平板克隆形成实验检测二氟尼柳对乳腺癌细胞克隆形成的作用; 细胞划痕实验检测细胞的迁移情况; 吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色法(AO-EB)分析细胞凋亡情况; 采用Western blot(WB)法检测ILP-2、Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3的蛋白表达水平。结果显示, 与对照组相比, 二氟尼柳显著抑制MCF-7、MDA-MB-231细胞增殖, 且抑制率与药物浓度和时间呈正相关; 平板克隆形成率降低; 药物显著抑制细胞的迁移能力; 细胞凋亡的数量增加, 凋亡率呈药物浓度依赖性趋势; Cleaved-caspase-3、促凋亡蛋白Bax表达量上调, 凋亡抑制蛋白ILP-2及抗凋亡蛋白Bcl-2表达显著下调, 且呈药物浓度依赖性。结果表明, 二氟尼柳下调ILP-2蛋白表达影响Bcl-2/Bax信号通路从而促进乳腺癌细胞凋亡。

关键词 二氟尼柳; 乳腺癌; ILP-2; Bcl-2/Bax; 凋亡

Diffenil Promotes Breast Cancer Cells Apoptosis by Regulating the ILP-2/Bcl-2/Bax Signaling Pathway

PENG Hang, XIANG Siqi, JIANG Shuangyan, CUI Ruxia, XIANG Mingjun*

(Department of Basic Medicine, Jishou University School of Medicine, the Key Laboratory of the State Ethnic Affairs Commission of Xiangxi Miao Medicine, Pediatric Tuina Medical Intersection and Transformation, Jishou 416000, China)

Abstract This paper aimed to discuss the effects of diffenil on the apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells and its molecular mechanism. CCK-8 assay was applied to detect the effect of different concentrations of diffenil on breast cancer cell proliferation. The effect of diffenil on the clone formation of breast cancer cell was detected by plate clone formation. The migration of breast cancer cell was determined by the scratch assay. Apoptosis of breast cancer cell was analyzed by AO-EB (acridine orange/ethidium bromide). The protein expression levels of ILP-2, Bax, Bcl-2 and Cleaved-caspase-3 were detected by WB (Western blot). CCK-8 showed that compared with the control group, the diffenil group significantly inhibited MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells, and the inhibition increased with concentration and time. Diffenil significantly inhibited the migration ability of the cells. The number of apoptotic cells increased, and the apoptosis rate was drug concentration-dependent. Western blot showed upregulation of pro-apoptotic proteins Cleaved-caspase-3 and Bax, and significant downregulation of apoptosis inhibitor protein ILP-2 and anti-apoptotic protein Bcl-2. As the drug concentration

收稿日期: 2023-03-31

接受日期: 2023-05-23

国家自然科学基金(批准号: 81360397)和湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 22A0354)资助的课题

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

Received: March 31, 2023

Accepted: May 23, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360397) and the Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education (Grant No.22A0354)

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

increased, the expression level of each protein changed more significantly. Results indicate that diflunisal induces breast cancer cell apoptosis by downregulating ILP-2 protein expression and subsequently affecting the Bcl-2/Bax signaling pathway.

Keywords diflunisal; breast cancer; ILP-2; Bcl-2/Bax; apoptosis

乳腺癌(breast cancer)是女性最常见的恶性肿瘤^[1]。国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)于2020年发布了最新全球癌症统计报告:全球乳腺癌患者发病率与死亡率突破新高^[2]。乳腺癌已成为威胁女性健康最严重的癌症类型。化疗是治疗乳腺癌患者最主要的方式之一,对早期乳腺癌患者预后改善有着重要作用。由于耐药性的存在,化疗的药效会逐渐降低,若要与用药初期取得同等疗效,不得不增加剂量,而高剂量所产生毒副作用会对心脏及其他组织器官功能造成一定程度的损伤,引起化疗治疗的失败^[3]。耐药性是乳腺癌患者死亡率居高不下原因之一^[3]。因此,寻找新型、安全、有效的抗肿瘤药物刻不容缓。近年来抗炎药与肿瘤之间的关系受到广泛关注,二氟尼柳(diflunisal, DFL)是一种非甾体抗炎镇痛药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs),是阿司匹林(aspirin, ASP)的衍生物^[4]。临床上主要用于治疗多种风湿病和骨及关节炎的化学药物,其部分衍生物甚至具有更强的抗炎、镇痛、退热效果^[5]。据报道,DFL及其衍生物具有多种生物学作用,包括抗癌活性,显著抑制胶质母细胞瘤、白血病、乳腺癌、肝癌、前列腺癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤的增殖,被视为癌症治疗的辅助药物,具有预防作用^[6-7]。而DFL对肿瘤的作用机制研究还有待深入。

抑制蛋白样蛋白-2(inhibitor of apoptosis protein-like protein-2, ILP-2)是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员之一,存在于19q13.3-13.4号染色体上^[8]。近年来发现ILP-2在多种肿瘤组织异常表达,而在正常细胞组织中不易被检测。研究人员发现,ILP-2在乳腺癌血清中高表达,对乳腺癌的发生发展,癌细胞的增殖、迁移,癌细胞抵抗细胞凋亡及机体的预后不良至关重要^[9-11]。然而以ILP-2为药物靶点在乳腺癌的研究中尚未报道。本文研究DFL是否抑制ILP-2蛋白表达进而影响Bcl-2/Bax信号通路,为DFL诱导乳腺癌细胞凋亡的机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231购自江苏齐氏生物有限公司;DMEM、RPMI 1640培养液培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自天杭生物科技试剂公司;二氟尼柳购自上海阿拉丁生化科技有限公司;青-链霉素双抗、0.25%胰酶消化液、0.1%结晶紫溶液购自北京索莱宝生物科技有限公司;CCK-8试剂盒购自美国Glpbio公司;细胞裂解液RIPA、ECL显影液、抗体稀释液购自碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自Biosharp试剂公司;细胞凋亡试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;DMSO购自美国Sigma公司;兔多抗蛋白ILP-2、Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Tubulin购自美国Proteintech公司。

1.2 主要实验仪器

主要实验仪器包括:CO₂培养箱(HF151型)、倒置显微镜(XD-202型)、电子天平(LE204E型)、荧光显微镜(CKX41型)、超净工作台(SW-CJ-2D型)、酶标仪(EL×800型)、高速冷冻离心机(CR21G型)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 从-80℃冰箱取MCF-7、MDA-MB-231细胞株于37℃恒温水浴锅复苏,待冻存管只剩少许冰块后取出,移至超净工作台,待冰块全部融化后,将其转至15 mL离心管中并加入新鲜培养基,1 000 r/min离心5 min。弃上清,加入10%含双抗新鲜胎牛血清培养基,放置于37℃、5% CO₂、95%相对饱和湿度的细胞培养箱中继续培养。待细胞融合率达到80%~90%时用胰蛋白酶(含EDTA)消化并传代,一周完成2~3次传代后,细胞用于后续实验。

1.3.2 CCK-8检测细胞增殖 取对数生长期MCF-7、MDA-MB-231细胞接种于96孔板,密度调整为 8×10^3 个/孔,不同方向轻晃96孔板,待细胞悬液铺匀后,于37℃、5% CO₂培养箱过夜。待细胞贴壁后,将孔板内旧培养基吸出,分别加入新鲜培养基DFL(0、30、60、90、120、150) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组加入等量DMSO。待药物处理24 h、48 h、72 h后,向96孔板

中加入10 μL CCK-8溶液, 注意不要孔洞中引入气泡, 培养板置于潮湿的培养箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育1~4 h。使用酶标仪测量450 nm处的吸光度(D)值, 以未加药物浓度孔为空白对照, 实验重复3次。细胞抑制率($\%$)= $[1-(D_{\text{药物组}}-D_{\text{空白对照组}})/(D_{\text{对照组}}-D_{\text{空白对照组}})]\times 100\%$, 并绘制DFL抑制乳腺癌的生长曲线, 通过GraphPad Prism 8计算出药物 IC_{50} 值, 用于后续实验。

1.3.3 细胞克隆形成实验 将MCF-7、MDA-MB-231细胞接种于6孔板中, 每孔 1.5×10^3 个细胞, 培养24 h。待细胞贴壁后, 去除旧培养基, 更换新鲜含有不同浓度DFL(60、90、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的完全培养基, 中途每隔3天进行换液并在倒置显微镜下观察细胞集落形成大小与数量。培养两个星期后, 待细胞克隆数在培养板上肉眼可见时, 去除旧培养基, 用PBS洗涤2次, 室温条件下4%多聚甲醇固定细胞15 min。PBS洗涤2次, 每孔加入1 mL 0.1%结晶紫染料溶液, 染色10 min。PBS洗涤细胞3次, 待晾干后并用照相机或手机拍照计数, 用ImageJ计算细胞克隆形成率, 实验重复3次。

1.3.4 细胞划痕实验检测细胞迁移 培养板接种细胞前用记号笔在6孔板背面划线标记, 消化后接种生长对数期的MCF-7、MDA-MB-231细胞于6孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱继续培养24 h。待细胞生长数量铺满整个6孔板底时, 弃旧培养基, 用100 μL 枪头垂直底部画3条竖线, 尽量保证各个划痕宽度一致, 然后用PBS洗2~3次, 去除旧培养基, 加入含有DFL(60、90、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的低浓度胎牛血清培养基, 置于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中继续培养。分别在0 h、24 h、48 h、72 h的单层细胞同一划痕部位的不同时间进行拍照记录, 用软件ImageJ计算细胞迁移率, 实验重复3次。

1.3.5 吖啶橙/溴化乙啶双荧光染色法(AO-EB)检测细胞凋亡率 将盖玻片(22 mm $\times$ 22 mm)和载玻片用强酸清洗干净, 并灭菌备用。取对数生长的MCF-7、MDA-MB-231细胞接种在提前放置含有盖玻片的6孔板中, 调整细胞密度为 1×10^5 个/孔, 放置在5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱培养过夜。待细胞贴壁后, 各皿加入不同浓度DFL的新培养基, 并培养48 h。去除旧培养基, 用新鲜PBS清洗2~3次, 吸取AO-EB染料室温避光均匀滴加洁净的载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞, 使得染料均匀充分接触细胞, 室温下避光处理5 min。后移至荧光显微镜于510 nm激发波

长处观察细胞凋亡情况。细胞总量须超过200个。细胞凋亡率($\%$)= $[(\text{早期凋亡细胞}+\text{晚期凋亡细胞})/\text{细胞总数}]\times 100\%$, 实验重复3次。

1.3.6 Western blot法检测相关蛋白水平表达量 将生长处于对数期的MCF-7、MDA-MB-231细胞接种于6孔板中, 细胞密度为 1×10^5 个/孔, 放置在5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养过夜。待细胞贴壁, 向各组中加入不同浓度药物, 培养48 h。药物处理后收集各组细胞, 用预冷的PBS洗2次, 加入预冷的细胞裂解液, 按照细胞裂解液和BCA说明书分别提取细胞总蛋白和测定蛋白质浓度, 使用酶标仪测定562 nm处的吸光度(D)值, 按最低浓度为标准, 将各组蛋白质样品浓度调为相同, 蛋白质与5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液以4:1体积比混匀后100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴10 min, 使蛋白质充分变性。每孔分别取30 μg 总蛋白质上样, 设置SDS-PAGE电压条件80 V, 电泳30 min。后调节电压100 V, 继续电泳90 min。用湿转膜法将胶上的蛋白转移到0.22 μm PVDF膜上, 用脱脂奶粉将转移在膜上的蛋白室温封闭1 h。加入一抗ILP-2(1:750)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Tubulin(1:3 000)、Cleaved-caspase-3(1:1 000)于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用TBST漂洗10 min, 重复3次。于二抗(1:5 000)中室温孵育1 h, TBST漂洗10 min, 重复3次。利用化学发光成像系统检测各组蛋白表达水平差异。用ImageJ软件分析处理所得条带光密度值, 以Tubulin为内参, 目的蛋白质光密度/内参蛋白质光密度值反映目的蛋白质的相对表达量。实验重复3次。

1.4 统计分析

所有数据及图表采用GraphPad prism 8 软件对实验结果进行分析, 计数资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DFL抑制乳腺癌细胞增殖

为探究DFL对乳腺癌细胞增殖活性的影响, 通过不同药物浓度处理细胞24 h、48 h、72 h, CCK-8检测细胞增殖活性(图1)。与对照组相比, DFL能显著降低乳腺癌细胞的活力, 随着时间的延续和药物浓度的提高, 抑制细胞增殖的程度更加明显, 具有显著性差异($P<0.05$), 且呈剂量和时间依赖性。进一

步通过不同浓度DFL处理乳腺癌单个细胞克隆, 利用结晶紫染色观察细胞克隆数量(图2)。与对照组相比, 随着药物剂量增加, 乳腺癌细胞的克隆数降低, 单个克隆大小和独立生存能力呈下降趋势, 具有显著性差异($P<0.05$), 表明DFL可显著抑制乳腺癌细胞增殖。

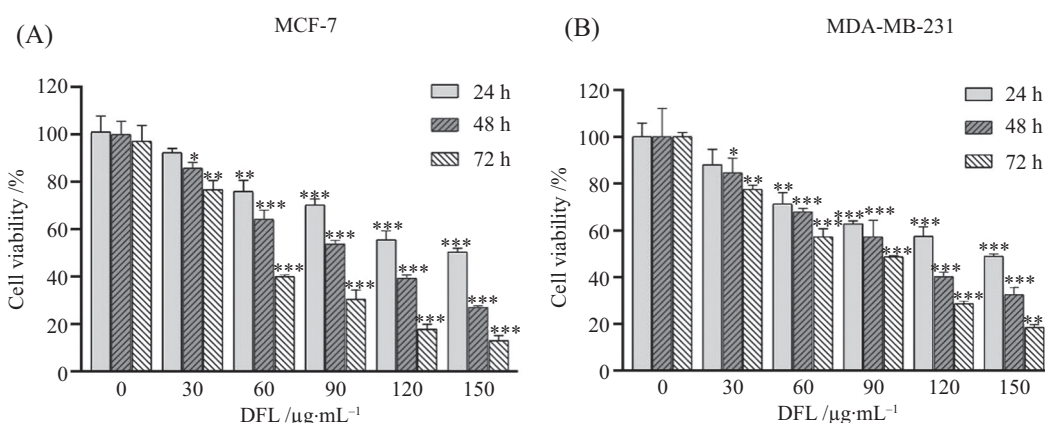
2.2 DFL抑制乳腺癌细胞迁移

为探究DFL对乳腺癌细胞迁移能力的影响, 通过不同浓度DFL处理划痕的细胞24 h、48 h、72 h, 利用倒置显微镜观察迁移情况(图3)。与对照组相比, 随着药物浓度提高与时间延长, 乳腺癌细胞运动能力明显减弱, 迁移的细胞数量呈下降趋势, 具有显著

性差异($P<0.05$), 表明DFL能显著抑制乳腺癌细胞迁移, 且呈明显的药物浓度与时间依赖性。

2.3 DFL诱导乳腺癌细胞凋亡

为探究DFL对乳腺癌细胞凋亡的影响, 利用不同浓度DFL处理乳腺癌细胞48 h后, AO-EB染色并在荧光显微镜下观察(图4)。与对照组相比, 随着药物浓度增加, 细胞形体发生明显变化, 绿色圆形正常细胞数量减少, 黄色形态各异的细胞数量增多, 细胞发生凋亡的数量和凋亡小体的数量明显上升, 具有显著性差异($P<0.05$), 表明DFL能诱导乳腺癌细胞凋亡。

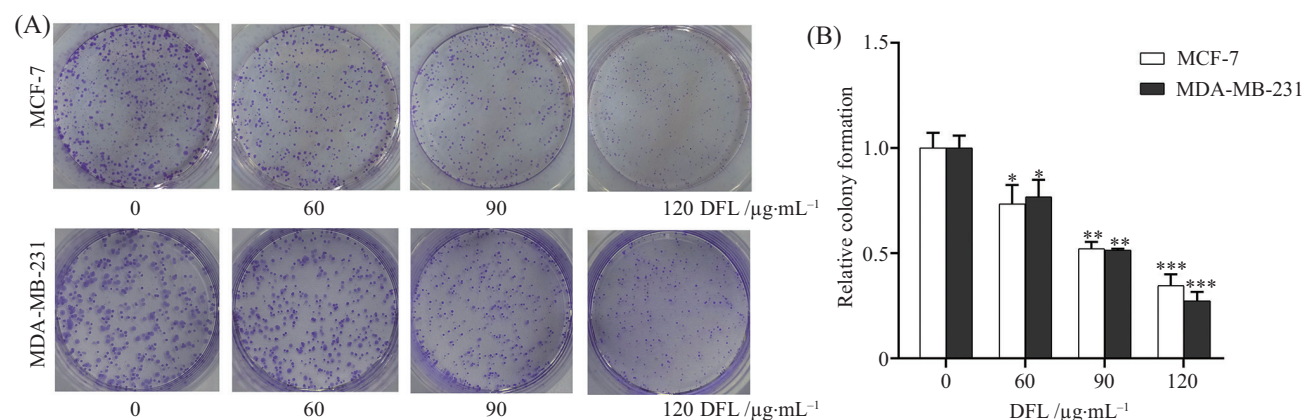


A: 不同浓度二氟尼柳处理对MCF-7细胞24 h、48 h、72 h增殖的影响; B: 不同浓度二氟尼柳处理对MDA-MB-231细胞24 h、48 h、72 h增殖的影响。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A: effect of different concentrations of difunisal on the proliferation of MCF-7 cells at 24, 48, 72 h; B: effect of different concentrations of difunisal on proliferation of MDA-MB-231 cells at 24, 48, 72 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group; $n=3$.

图1 二氟尼柳抑制乳腺癌细胞增殖

Fig.1 Difunisal inhibits breast cancer cell proliferation

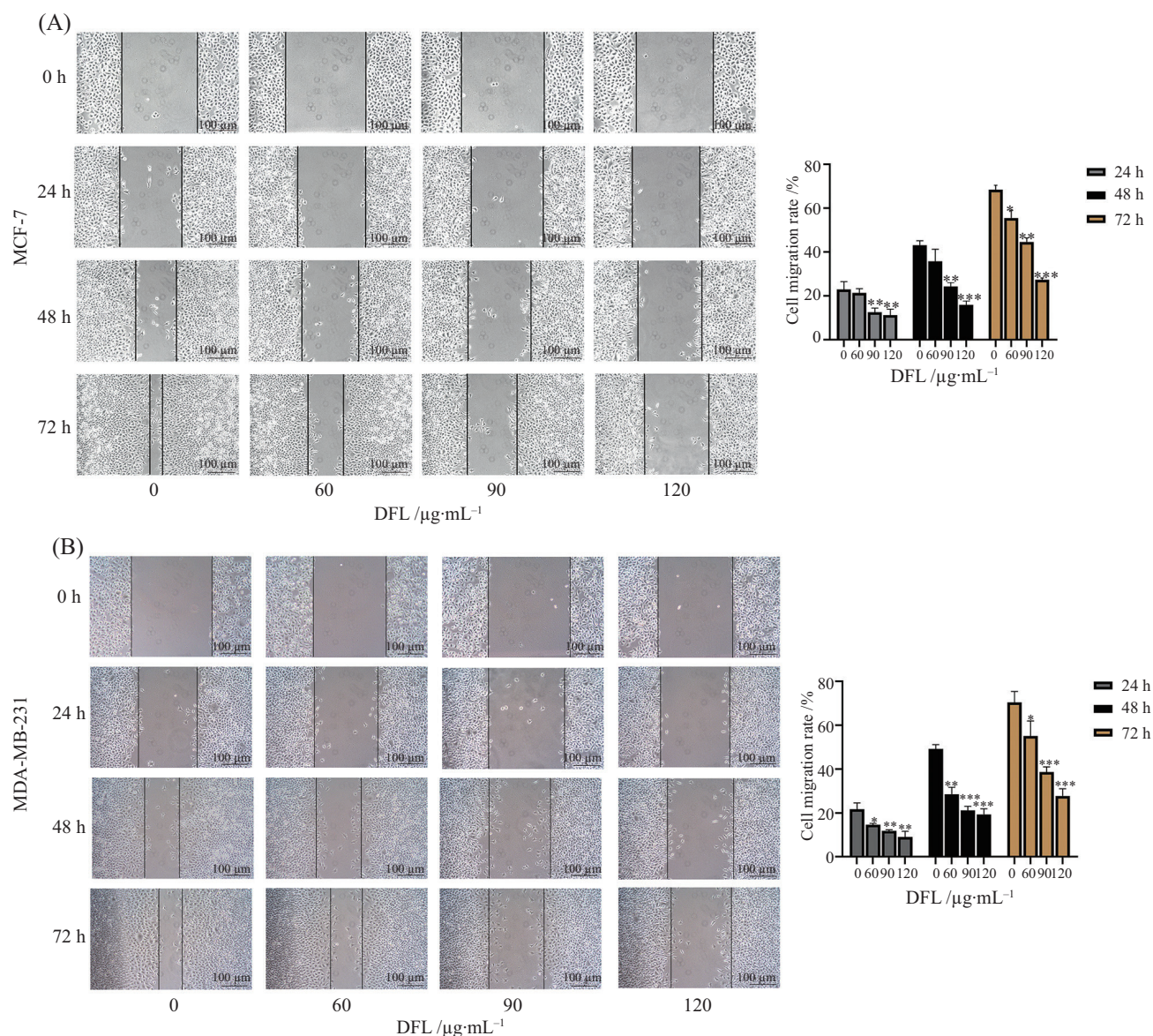


A: 不同浓度二氟尼柳处理对MCF-7、MDA-MB-231细胞平板克隆形成的影响; B: MCF-7、MDA-MB-231细胞平板克隆形成率分析。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A: effect of different concentrations of difunisal on plate clone formation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells; B: analysis of the plate clone formation rate of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group; $n=3$.

图2 二氟尼柳抑制乳腺癌细胞克隆形成

Fig.2 Difunisal inhibits clonal formation of breast cancer cell



A: 不同浓度二氟尼柳对MCF-7细胞24 h、48 h、72 h迁移的影响; B: 不同浓度二氟尼柳对MDA-MB-231细胞24 h、48 h、72 h迁移的影响。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A: effect of different concentrations of diflunisal on the migration of MCF-7 cells at 24, 48, 72 h; B: effect of different concentrations of diflunisal on migration of MDA-MB-231 cells at 24, 48, 72 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group; $n=3$.

图3 二氟尼柳抑制乳腺癌细胞迁移

Fig.3 Diflunisal inhibits breast cancer cell migration

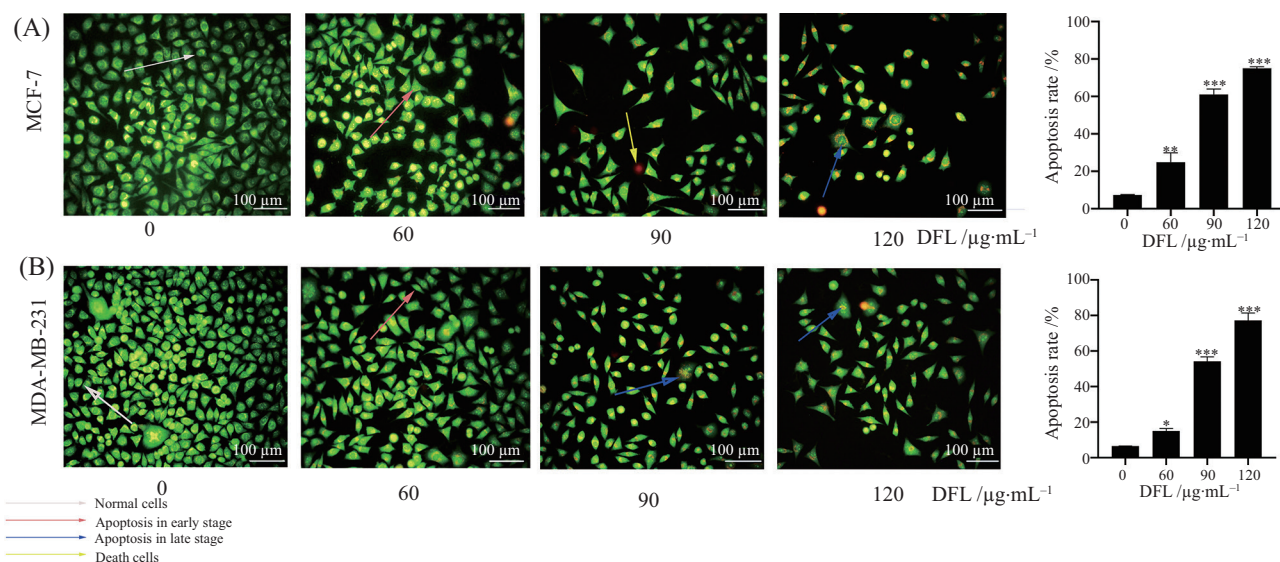
2.4 DFL调节ILP-2/Bcl-2/Bax信号通路促进乳腺癌细胞凋亡

为进一步验证DFL是否通过ILP-2/Bcl-2/Bax信号通路对乳腺癌细胞凋亡产生影响, DFL处理细胞48 h后, 利用Western blot检测ILP-2、Bcl-2、Bax及Cleaved-caspase-3蛋白表达量(图5)。与对照组相比, 药物浓度处理的乳腺癌细胞中, Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达量上调, ILP-2、Bcl-2蛋白表达量下调。随着药物浓度增加, 各蛋白量发生变化的程

度更加显著, 具有显著性差异($P<0.05$)。这表明DFL可能通过下调ILP-2影响Bcl-2/Bax信号通路进而诱导乳腺癌细胞凋亡。

3 讨论

乳腺癌具有高度异质性, 根据受体存在情况主要分为以下3种分子亚型, 激素受体阳性: 雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR), 人类表皮生长因子-2(human growth

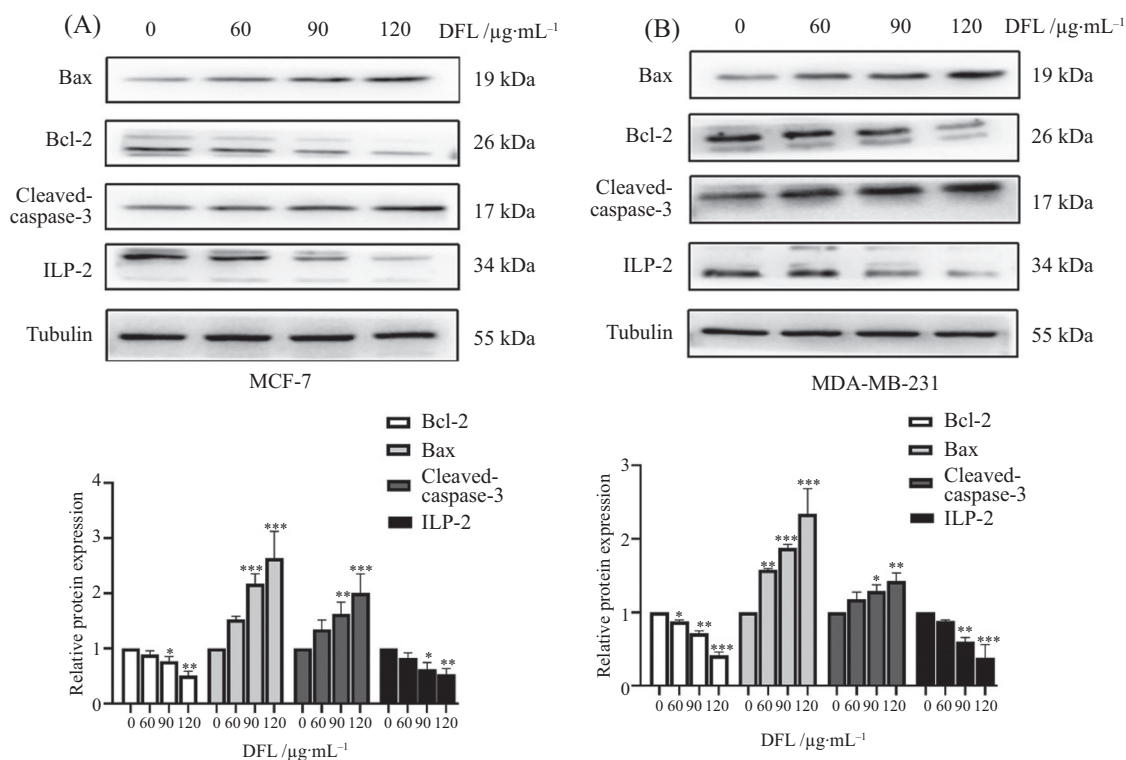


A: 不同浓度二氟尼柳对MCF-7细胞凋亡的影响; B: 不同浓度二氟尼柳对MDA-MB-231细胞凋亡的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A: effect of different concentrations of diflunisal on MCF-7 cell apoptosis; B: effect of different concentrations of diflunisal on MDA-MB-231 cell apoptosis. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group; $n=3$.

图4 二氟尼柳诱导乳腺癌细胞凋亡

Fig.4 Diflunisal induces apoptosis in breast cancer cells



A: 二氟尼柳对MCF-7中ILP-2、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平的影响; B: 二氟尼柳对MDA-MB-231中ILP-2、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=3$ 。

A: effect of diflunisal on the protein expression levels of ILP-2, Bcl-2, Bax, and Cleaved-caspase-3 in MCF-7; B: effect of diflunisal on the protein expression levels of ILP-2, Bcl-2, Bax, and Cleaved-caspase-3 in MDA-MB-231. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group; $n=3$.

图5 二氟尼柳诱导乳腺癌细胞凋亡的分子机制

Fig.5 Molecular mechanism of diflunisal induces apoptosis in breast cancer cells

factor receptor-2, HER2)受体阳性和三种受体均为阴性的乳腺癌(简称三阴性)^[12]。不同分子亚型下,实施精准治疗方案取得不错疗效,但在部分激素受体阳性患者中,激素受体的突变会引起内分泌治疗脱靶现象,同时,伴随耐药性的出现,使得疗效耐大打折扣^[13]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)患者本身缺乏激素受体,不能得益于内分泌治疗,而化疗是主要的治疗方式,同样耐药性的存在导致疗效不佳,易出现肿瘤的复发和转移。因此,寻找新型高效的靶向药物迫在眉睫。DFL是ASP的衍生物,表现出良好的抗肿瘤效果,能抑制多种肿瘤活性^[14],相较于ASP,DFL具有更强的抗炎和抑制肿瘤效果,但国内外鲜有关于DFL抑制乳腺癌增殖及其分子机制的报道。本研究通过CCK-8和平板克隆实验发现,DFL显著抑制激素受体阳性和阴性的乳腺癌细胞的活性。细胞划痕实验表明乳腺癌细胞迁移能力显著下降。AO-EB结果表明,DFL促进乳腺癌细胞凋亡,随着药物浓度增加,凋亡率明显上升。结果充分表明DFL明显抑制两种乳腺癌细胞增殖,诱导乳腺癌细胞凋亡。

老药重新定位在药物研发中受到越来越多的期待。药物再利用是临床研究阶段或已经批准的药物重新评估其治疗适应症与新用途,新型药物研发模式是从药物结构发现、研发,再到临床试验上市,耗时之久、成功率低、周期长、研发成本昂贵等特点^[15]。但随着信息化时代到来,数据挖掘技术广泛应用于从传统的药物中寻找新靶点、新用途,进而降低研发成本。筛选的老药通常已通过了临床试验阶段,节省在药物安全性与毒性测试的时间与成本,进一步缩减从研发到上市的周期,为患者提供更多的治疗选择^[16]。沙利度胺曾因具有强烈的副作用而被终止生产,而后因发现其具有抗癌活性,被证明对治疗多发性骨髓瘤和转移性前列腺癌有良好的治疗效果,并获得食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)的批准,用于联合地塞米松治疗多发性骨髓瘤^[17]。由此可见,调整传统老药在临床应用的思路,可以让更多有效、廉价的传统化学药物充分利用。在不同领域中发挥更重要的作用。

NSAIDs在临床应用上的历史悠久,是一种传统的化学药物,作为辅助药不仅在晚期肿瘤中发挥镇痛作用,同样也在预防和抗肿瘤的研究中,效果引人注目。据报道非甾体抗炎药与乳腺癌有着密切联系^[6]。

有学者发现ASP能降低乳腺癌细胞对他莫昔芬的耐药性^[18]。MA等^[19]通过流行病学调查发现,每日服ASP能显著降低乳腺癌发病率和死亡率,具有预防乳腺癌的功效,ASP受到学者的青睐。与此同时,塞来昔布(celecoxib)联合化疗药物及天然产物的组合也可发挥不错的效果,起到协同抗肿瘤作用,获得更高的治疗效果并减少药物耐药性和副作用,具有潜在的应用价值^[20-21]。因此,挖掘更多NSAIDs在抗肿瘤领域的研究很有必要。

细胞凋亡是一种主动程序性细胞死亡,在正常细胞中,细胞面对不利生存环境可激活细胞凋亡信号清除损伤、衰老、基因突变等多种异常细胞,维持生命活动的正常进行。对维持机体的稳态具有重要意义^[22]。Bcl-2家族蛋白在调节细胞凋亡中扮演重要的角色。在Bcl-2家族内,最关键两个分子是Bcl-2和Bax,当Bcl-2高表达时,Bcl-2可以和Bax形成异源二聚体,抑制细胞凋亡。细胞内Bcl-2/Bax的比例决定细胞凋亡是否进行,同时也是内源性凋亡途径的关键^[23-25]。本研究表明,DFL下调Bcl-2蛋白的表达,上调Bax蛋白的表达,随着药物浓度增加,Bcl-2/Bax值显著下降,进一步调节凋亡相关蛋白Caspase-3的表达,促进乳腺癌细胞凋亡。

IAPs是细胞凋亡重要的一类蛋白调节因子,是调节Caspase家族成员的关键,在维持细胞的增殖与死亡动态平衡中起到重要作用^[26]。IAPs家族在各类型肿瘤细胞中异常表达,从而打破细胞增殖与死亡的平衡,该家族在抵抗细胞死亡、促进肿瘤的恶性生长、导致化疗耐药以及引起预后不良和复发转移方面进一步发展^[27-28]。因此,以细胞凋亡关键调控因子为靶点,已成为抗肿瘤药物研发的新策略^[29]。选择性抑制IAPs蛋白表达,对提高化疗药物疗效和肿瘤治疗的有效性尤为重要。ILP-2是IAPs家族成员之一,发挥抵抗细胞凋亡作用主要有以下原因:(1)本身含有BIR3结构域,可以特异性地与Caspase-9结合形成异二聚体,潜在地抑制Caspase-9的活性来抵抗细胞凋亡;(2)ILP-2改变Bcl-2/Bax比例,进而抑制细胞凋亡^[24]。ILP-2在乳腺癌、肝癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤和血液瘤中异常表达^[30],尤其在乳腺癌中,ILP-2的表达更加活跃。我们课题组前期通过双向电泳-蛋白质谱和ELISA法对乳腺癌患者、其他类型癌症患者、乳腺增生患者血清样品与健康女性血清患者样品进行比较时发现,在乳腺癌患者血清中,

ILP-2的表达量相比其他癌症类型的血清更高。ZHU等^[9]通过免疫组化以及免疫印迹发现, ILP-2在乳腺癌组织以及乳腺癌细胞系中过度表达, 敲低ILP-2的乳腺癌细胞凋亡率明显增加。王思源等^[31]发现, 在乳腺癌细胞中, ILP-2与细胞外基质蛋白1(extracellular matrix protein 1, ECM1)相互作用并调控下游信号通路, 促进乳腺癌细胞生长与迁移。ILP-2在维持乳腺癌生长、迁移以及在信号通路的调控起到重要作用。SAEED等^[32]利用分子对接技术, 筛选出FDA批准的临床药物, 该药物能竞争性地与ILP-2结合, 使Caspase蛋白家族恢复活性, 从而发挥凋亡的功能。通过对药物与ILP-2在空间位置、结合能阈值等多种参考标准进行评分, 预测DFL与ILP-2具有较强的亲和力。本研究发现, DFL下调ILP-2蛋白表达, 随药物浓度增加, ILP-2相对蛋白表达水平明显降低, 与该预测的结果一致。由此可见, DFL可能通过下调ILP-2蛋白表达进而影响Bcl-2/Bax信号通路, 诱导乳腺癌细胞凋亡。

综上所述, DFL抑制乳腺癌细胞增殖和迁移运动能力, 诱导细胞凋亡。作用机制可能是DFL通过下调ILP-2蛋白, 进一步调控Bcl-2/Bax信号通路, 增强Caspase-3的蛋白活性, 进而诱导乳腺癌细胞凋亡。本实验初步为DFL促进乳腺癌细胞凋亡提供了初步的理论依据, 为进一步阐明NSAD药物抑制乳腺癌的机制研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] GINSBURG O, BRAY F, COLEMAN M P, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health [J]. *Lancet*, 2017, 389(10071): 847-60.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] VAGIA E, MAHALINGAM D, CRISTOFANILLI M. The landscape of targeted therapies in TNBC [J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 916.
- [4] 胡红丹, 茅松青, 钟光祥. 二氟尼柳衍生物的研究进展[J]. 浙江化工(HU H D, MAO S Q, ZHONG G X. Progress in studies of diflunisal derivatives [J]. *Zhejiang Chemical Industry*), 2010, 41(3): 1-4.
- [5] LU X, XIE W, REED D, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7961-5.
- [6] COŞKUN G P, DJIKIC T, HAYAL T B, et al. Synthesis, molecular docking and anticancer activity of diflunisal derivatives as cyclooxygenase enzyme inhibitors [J]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1969.
- [7] KHANDIA R, MUNJAL A. Interplay between inflammation and cancer [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 119: 199-245.
- [8] RICHTER B W, MIR S S, EIBEN L J, et al. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(13): 4292-301.
- [9] ZHU L, ZHOU W, ZHU X, et al. Inhibitor of apoptosis protein-like protein-2: a novel growth accelerator for breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2047-55.
- [10] XIANG M, ZHOU W, GAO D, et al. Inhibitor of apoptosis protein-like protein-2 as a novel serological biomarker for breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 16737-50.
- [11] GARG H, SURI P, GUPTA J C, et al. Survivin: a unique target for tumor therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16: 49.
- [12] BOU ZERDAN M, GHORAYEB T, SALIBA F, et al. Triple negative breast cancer: updates on classification and treatment in 2021 [J]. *Cancers*, 2022, 14(5): 1253.
- [13] ANDRÉ F, CIRUELOS E, RUBOVSKY G, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(20): 1929-40.
- [14] SNETKOV P, MOROZKINA S, OLEKHOVICH R, et al. Diflunisal targeted delivery systems: a review [J]. *Materials*, 2021, 14(21): 6687.
- [15] WÜRTH R, THELLUNG S, BAJETTO A, et al. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(1): 190-9.
- [16] ISLAM S, WANG S, BOWDEN N, et al. Repurposing existing therapeutics, its importance in oncology drug development: kinases as a potential target [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88(1): 64-74.
- [17] SHIM J S, LIU J O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(7): 654-63.
- [18] LIU B, WANG T, WANG H, et al. Oncoprotein HBXIP enhances HOXB13 acetylation and co-activates HOXB13 to confer tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 26.
- [19] MA S, GUO C, SUN C, et al. Aspirin use and risk of breast cancer: a meta-analysis of observational studies from 1989 to 2019 [J]. *Clin Breast Cancer*, 2021, 21(6): 552-65.
- [20] AUMEERUDDY M Z, MAHOMOODALLY M F. Combating breast cancer using combination therapy with 3 phytochemicals: piperine, sulforaphane, and thymoquinone [J]. *Cancer*, 2019, 125(10): 1600-11.
- [21] ALQAHTANI A M, CHIDAMBARAM K, PINO-FIGUEROA A, et al. Curcumin-celecoxib: a synergistic and rationale combination chemotherapy for breast cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(4): 1916-27.
- [22] CHENG X, FERRELL J E. Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves [J]. *Science*, 2018, 361(6402): 607-12.
- [23] ESTAQUIER J, VALLETTE F, VAYSSIÈRE J L, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 157-83.
- [24] ZHANG Z, XIANG S, CUI R, et al. ILP-2: a new bane and therapeutic target for human cancers [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 922596.

- [25] NAZERI M, MIRZAIIE-ASL A, SAIDIJAM M, et al. 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.
- [26] FINLAY D, TERIETE P, VAMOS M, et al. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 587.
- [27] XIE X, LEE J, LIU H, et al. Birinapant enhances gemcitabine's antitumor efficacy in triple-negative breast cancer by inducing intrinsic pathway-dependent apoptosis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(2): 296-306.
- [28] MIAO X, DENG Z, WANG S, et al. IAP-1 promoted cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma via inhibition of caspase-3-mediated apoptosis [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(3): 640-67.
- [29] DUBREZ L, BERTHELET J, GLORIAN V. IAP proteins as targets for drug development in oncology [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 9: 1285-304.
- [30] LIANG J, ZHAO W, TONG P, et al. Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 7.
- [31] 王思源, 向思琦, 王雅妮, 等. ILP-2-ECM1(P85)促进乳腺癌细胞的生长[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(WANG S Y, XIANG S Q, WANG Y N, et al. ILP-2-ECM1 (P85) promotes the proliferation of breast cancer cells [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2019, 35(9): 996-1005.
- [32] KHALILI S, MOHAMMADPOUR H, SHOKROLLAHI BA-ROUGH M, et al. ILP-2 modeling and virtual screening of an FDA-approved library:a possible anticancer therapy [J]. *Turk J Med Sci*, 2016, 46(4): 1135-43.