

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.004

· 基础研究 ·

甘草查尔酮B对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制作用及其机制

王琳琳¹, 曹露², 杨洪川², 王凤泽¹, 吴开祥² (1. 山东第一医科大学暨山东省医学科学院 生命科学学院, 山东泰安 271000; 2. 山东第一医科大学第二附属医院 病理科, 山东泰安 271000)

[摘要] **目的:** 探讨甘草查尔酮B(LCB)对三阴性乳腺癌(TNBC)MDA-MB-231细胞的抑制作用及其机制。**方法:** 常规培养MDA-MB-231细胞,用不同浓度LCB处理后,采用CCK-8法、免疫荧光法、FCM和WB法分别检测MDA-MB-231细胞的增殖活力、细胞核内DNA双链断裂标志物 γ -H2AX的表达,以及细胞周期和周期调控、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、内质网应激信号途径相关蛋白的表达水平。**结果:** LCB能显著抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖活力($P<0.05$),使 γ -H2AX阳性细胞数和蛋白表达水平均显著升高(均 $P<0.05$)、G2/M和S期的细胞数量均明显增加(均 $P<0.05$)、MAPK家族主要成员细胞外调节激酶1/2(ERK1/2)和p38MAPK蛋白的磷酸化水平均显著上调(均 $P<0.05$),还使内质网应激途径相关蛋白Bip、ATF4和CHOP的表达均显著上调(均 $P<0.05$)。**结论:** LCB能够显著抑制MDA-MB-231细胞的增殖活力、诱导DNA损伤和细胞周期阻滞于G2/M和S期,LCB对MDA-MB-231细胞的抑制作用可能与其激活MAPK和内质网应激信号通路相关。

[关键词] 甘草查尔酮B;三阴性乳腺癌;MDA-MB-231细胞;增殖;DNA损伤;细胞周期阻滞;丝裂原活化蛋白激酶;内质网应激
[中图分类号] R739.9; R730.23; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1061-05

The inhibitory effect of Licochalcone B on the triple negative breast cancer cell MDA-MB-231 and its mechanism

WANG Linlin¹, CAO Lu², YANG Hongchuan², WANG Fengze¹, WU Kaixiang² (1. School of Life Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Taian 271000, Shandong, China; 2. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian 271000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Licochalcone B (LCB) on a triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods:** MDA-MB-231 cells were routinely cultured and treated with different concentrations of LCB, and then CCK-8 assay, immunofluorescence, FCM and WB analysis were used to detect the proliferative viability of MDA-MB-231 cells, the expression of γ -H2AX, a marker of DNA double-strand breaks in the nucleus, the cell cycle, and the expression levels of proteins related to cycle regulation, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the endoplasmic reticulum stress (ER stress), respectively. **Results:** LCB significantly inhibited the proliferative viability of breast cancer MDA-MB-231 cells (all $P<0.05$), the number of γ -H2AX-positive cells and protein expression levels were significantly increased after LCB treatment (all $P<0.05$), the number of cells in G2/M and S phases was significantly increased (all $P<0.05$), the phosphorylation levels of the main members of the MAPK family, extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 MAPK phosphorylation levels were significantly upregulated (all $P<0.05$), and the expression of ER stress pathway-related proteins Bip, ATF4 and CHOP were significantly upregulated (all $P<0.05$). **Conclusion:** LCB could significantly inhibit the proliferation vitality of MDA-MB-231 cells and induce DNA damage and cell cycle arrest at G2/M and S phases. The inhibitory effect of LCB on MDA-MB-231 cells may be related to the activation of MAPK and ER stress signaling pathway.

[Key words] Licochalcone B (LCB); triple-negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-231 cell; proliferation; DNA damage; cell cycle arrest; mitogen-activated protein kinase (MAPK); endoplasmic reticulum stress (ER stress)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12): 1061-1065. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.004]

乳腺癌是女性最常见的致死性恶性肿瘤,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)约占乳腺癌的20%,其易复发转移,恶性程度及病死率均较高^[1]。目前,手术治疗是乳腺癌最有效的治疗手段,但是对于中晚期乳腺癌患者,单纯手术治疗效果有限,因此化疗便成为其主要治疗手段之一^[2]。然

而,大多数化疗药物存在不良反应,加之患者容易产

[基金项目] 山东省自然科学基金(No. ZR2018MH026);泰安市科技创新发展项目(No. 2022NS322, No. 2022NS353)

[作者简介] 王琳琳(1999—),女,硕士生,主要从事医学生物化学与分子生物学的研究。E-mail: linlin1999@qq.com

[通信作者] 吴开祥, E-mail: wukaixiang117@163.com

生耐药性等,因此寻找高效低毒的候选药物对于乳腺癌的治疗具有重要意义。天然产物具有来源丰富、结构新颖、低毒高效和靶点多等优势,从中筛选抗肿瘤活性成分一直是抗肿瘤药物研发的重要方向^[3-4]。甘草查尔酮B(Licochalcone B, LCB)是从中国传统中草药甘草中分离得到的黄酮类化合物,具有抗氧化、抑制炎症和抗肿瘤等活性,其机制与LCB促进活性氧的生成及调控Nrf2等信号分子相关^[5-6]。更为有意义的是LCB能够诱导肺癌细胞凋亡,而对正常皮肤角质形成细胞HaCaT无明显毒性^[7]。此外,LCB能显著促进肝癌细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的敏感性^[8]。目前,LCB对乳腺癌细胞的抑制作用及其相关机制尚不清楚。本研究主要探讨LCB对TNBC细胞MDA-MB-231的体外抑制活性,并阐明LCB抗肿瘤作用的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要材料

乳腺癌MDA-MB-231细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,LCB购自宝鸡市辰光生物科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$,10 mg LCB溶于0.4 mL 100% DMSO中配制成80 mmol/L的储存液溶解,并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存),胎牛血清购自GIBCO,ECL化学发光底物购自Millipore公司,CCK-8试剂购自上海陶术生物科技有限公司,鼠抗人 β -actin和兔抗人p38MAPK抗体购自Sigma-Aldrich公司,兔抗人p-p38MAPK和CHOP抗体购自Cell Signaling Technology公司,鼠抗人ERK、p-ERK、cyclinB1、p-Cdc2、Cdc2、ATF4和Bip抗体均购自Santa Cruz公司,兔抗人cyclin D1和鼠抗人DNA双链断裂标志物 γ -H2AX抗体购自Abcam公司,HRP标记的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗均购自Sigma-Aldrich公司,Alexa Fluor[®]488标记山羊抗鼠二抗购自Thermo Fisher公司。

1.2 CCK-8法检测不同浓度LCB对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响

将MDA-MB-231细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。将对数生长期的MDA-MB-231细胞(5×10^3 个/孔)接种于96孔板中,用不同浓度(0.5、1、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)的LCB处理24 h,对照组培养液中含0.1%的DMSO。药物处理结束后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,继续培养1 h,最后用酶标仪于450 nm波长处测定光密度(D)值,以D值代表细胞增殖活性,并对结果进行统计分析。

1.3 免疫荧光法检测LCB处理后MDA-MB-231细胞核内 γ -H2AX蛋白的表达

将对数生长期的MDA-MB-231细胞(8×10^4 /孔)接种于24孔板中的盖玻片上过夜培养。用0(培养液中含0.1% DMSO)、10和20 $\mu\text{mol/L}$ 的LCB处理24 h后,用预冷PBS洗涤细胞1次,加入无水甲醇室温固定20 min,加入含0.1% Triton X-100的PBS处理5 min,用3% BSA室温下处理1 h,加入抗 γ -H2AX抗体(稀释比例1:500)室温下处理3 h,Alexa Fluor[®]488标记二抗室温下处理1 h,加入DAPI室温下染色15 min后,倒置荧光显微镜下观察染色结果并拍照,随机选取5个视野,计算阳性细胞数目(绿色)与总细胞数目(蓝色)的百分比。

1.4 FCM检测不同浓度LCB对MDA-MB-231细胞周期的影响

将对数生长期的MDA-MB-231细胞(6×10^5 /孔)接种于6孔板中,待细胞汇合度至60%~70%时给予0(培养基含0.1%的DMSO)、5和20 $\mu\text{mol/L}$ 的LCB处理24 h。胰酶消化1 min,150 \times g离心5 min后收集细胞。经PBS洗涤1次并加入1 mL 75%的乙醇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜。150 \times g离心5 min去除乙醇后,用PBS洗涤细胞2次,并重悬于500 μL 的PBS溶液中,加入RNase A(50 $\mu\text{g/mL}$)于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理30 min,用PI溶液(50 $\mu\text{g/mL}$)避光染色10 min,最后经Accuri C6 Plus流式细胞仪检测细胞周期分布,Flowjo软件分析实验结果。

1.5 WB法检测不同浓度LCB处理MDA-MB-231细胞后 γ -H2AX、MARK通路和细胞周期相关蛋白的表达

将对数生长期的MDA-MB-231细胞(6×10^5 /孔)接种于6孔板中,用0(培养基中含0.1%的DMSO)、5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ 的LCB处理24 h后,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液于冰上裂解20 min,12 000 \times g离心20 min并收集上清液,并测定总蛋白含量。取30 μg 蛋白样品进行SDS-PAGE,然后电转至硝酸纤维素膜上;室温下在含有5%脱脂奶粉的PBS溶液中封闭1 h,加入抗 γ -H2AX(1:2 000)、 β -actin(1:40 000)、p38MAPK(1:5 000)、cyclin D1(1:1 000)、p-p38MAPK(1:800)和CHOP(1:1 000)、ERK(1:1 000)、p-ERK(1:800)、cyclinB1(1:1 000)、p-Cdc2(1:1 000)、Cdc2(1:1 000)、ATF4(1:500)和Bip(1:1 000)一抗,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜;加入HRP标记山羊抗鼠(1:20 000)和山羊抗兔(1:40 000)二抗,室温下处理1 h,最后用ECL化学发光底物曝光显影。以 β -actin为内参,用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.6 统计学处理

以上各组实验均独立重复3次。采用SPSS 24.0

统计软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,多组间两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

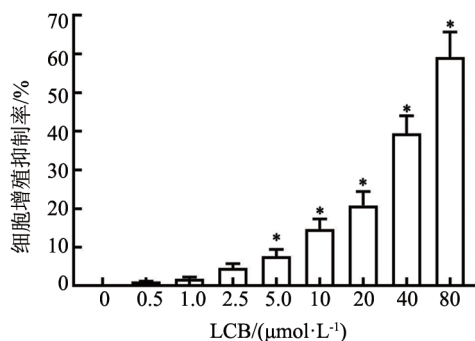
2.1 LCB能显著抑制MDA-MB-231细胞的增殖活力

CCK-8法结果(图1)显示,与对照组比较,浓度大于 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 的LCB处理各组MDA-MB-231细胞的增殖抑制率均显著增加(均 $P < 0.05$)。LCB对MDA-MB-231细胞的 IC_{50} 为 $69.76 \mu\text{mol/L}$ 。实验结果说明,LCB可明显抑制MDA-MB-231细胞的增殖活性。

2.2 LCB诱导MDA-MB-231细胞中表达 γ -H2AX蛋白

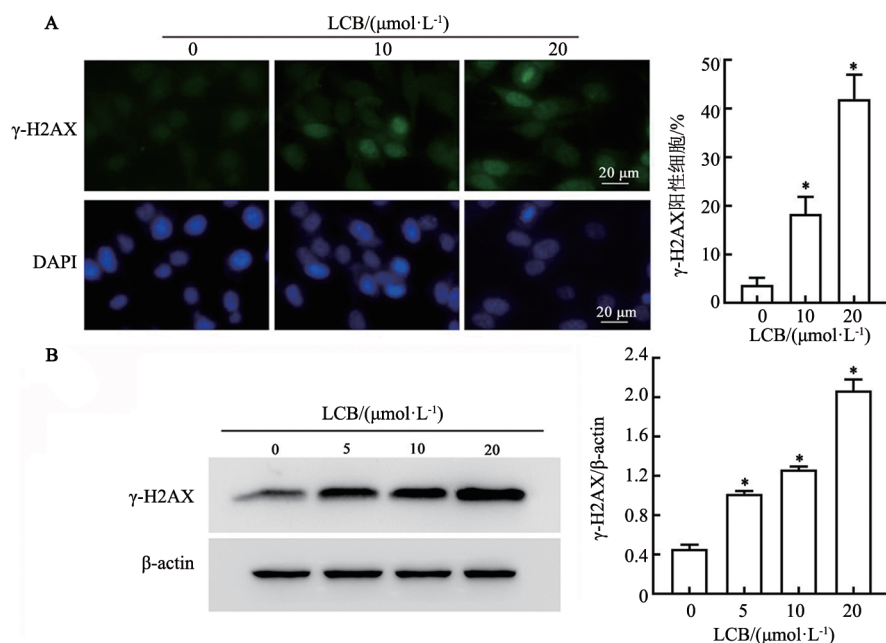
免疫荧光法检测结果(图2A)显示,与对照组比较,LCB处理组DNA双链断裂标志物 γ -H2AX阳性

细胞数明显增多($P < 0.05$);WB法检测结果(图2B)显示,与对照组比较,LCB处理组 γ -H2AX蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$)。实验结果提示,LCB能够诱导MDA-MB-231细胞的DNA双链发生断裂。



与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图1 LCB处理后MDA-MB-231细胞的增殖抑制率明显升高



A:免疫荧光法显示LCB处理后 γ -H2AX阳性细胞增加;B:WB法显示LCB处理后细胞中 γ -H2AX蛋白的表达升高。

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 LCB处理后MDA-MB-231细胞中DNA双链断裂标志物 γ -H2AX蛋白的表达水平升高

2.3 LCB可阻滞MDA-MB-231细胞周期于G2/M和S期

FCM检测结果(图3A)显示,与对照组比较,LCB处理组MDA-MB-231细胞周期停滞于G2/M和S期。WB法检测结果(图3B)显示,与对照组比较,LCB处理各组MDA-MB-231细胞中cyclinB1和p-Cdc2的表达水平升高,而cyclinD1的蛋白表达下调($P < 0.05$)。实验结果说明,LCB可阻滞MDA-MB-231细胞周期于G2/M和S期。

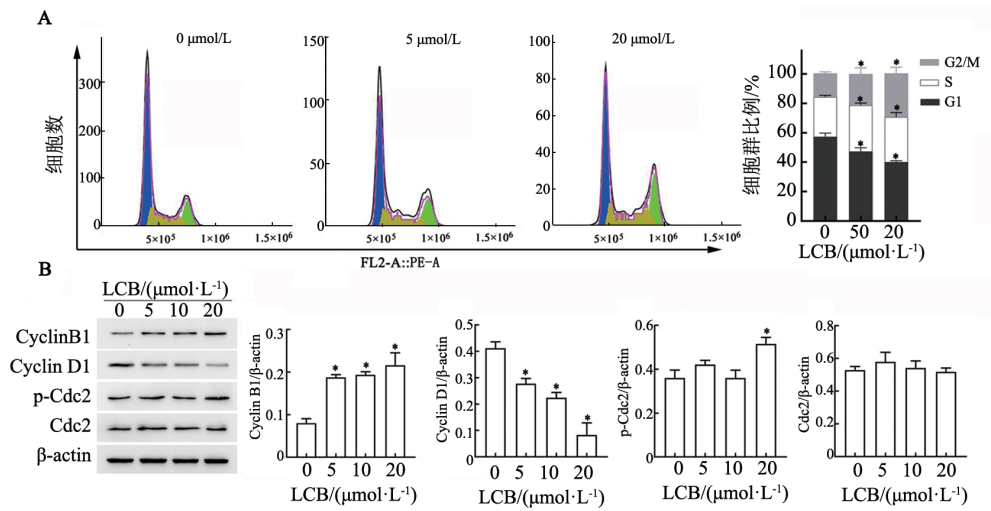
2.4 LCB处理后MDA-MB-231细胞中MAPK通路相关蛋白磷酸化水平明显升高

WB法检测结果(图4)显示,与对照组相比,

LCB处理各组MDA-MB-231细胞中MAPK家族主要成员ERK和p38MAPK的磷酸化水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明,LCB能够显著激活MDA-MB-231细胞中ERK和p38MAPK通路的活性。

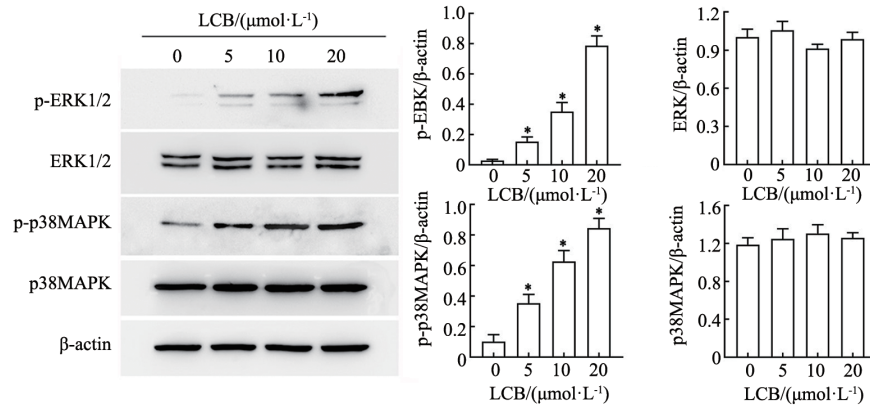
2.5 LCB可诱导MDA-MB-231细胞中内质网应激相关蛋白的表达

WB法检测结果(图5)显示,与对照组比较,LCB处理的MDA-MB-231细胞中内质网应激通路关键因子Bip、ATF4和CHOP的表达均显著上调(均 $P < 0.05$),表明LCB能够激活乳腺癌MDA-MB-231细胞中的内质网应激途径。



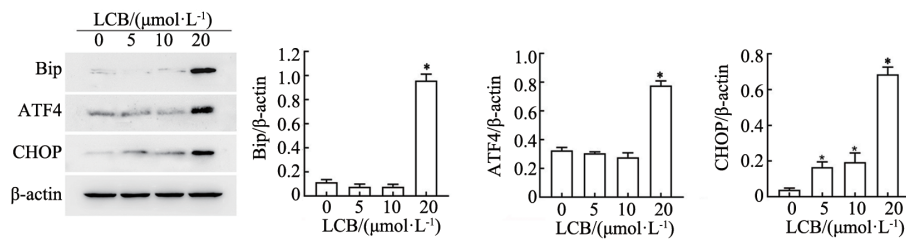
A: LCB 诱导 MDA-MB-231 细胞周期阻滞于 G2/M 和 S 期; B: LCB 处理后 MDA-MB-231 细胞中细胞周期相关蛋白表达的情况。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 LCB 处理后 MDA-MB-231 细胞周期和细胞周期相关蛋白表达的变化



与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 LCB 处理后 MDA-MB-231 细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白磷酸化水平升高



与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 LCB 处理后 MDA-MB-231 细胞中内质网应激信号通路相关蛋白表达水平升高

3 讨论

甘草在中国药用历史悠久,其所含化学成分种类繁多,其中黄酮类化合物是其抗肿瘤活性的主要成分^[9-10]。本研究检测了甘草黄酮类化合物 LCB 对乳腺癌细胞的体外抑制作用,发现 LCB 能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖活力,并诱导 DNA 损伤和细胞周期阻滞;LCB 对乳腺癌细胞的抑制活性可能与激活 MAPK 信号通路和内质网应激途径相关。

诱导细胞 DNA 损伤是药物抗肿瘤的重要机制之一。当 DNA 双链出现断裂时,组蛋白 H2AX 发生磷酸化(γ -H2AX)并聚集在断裂位点,因而 γ -H2AX 可作为 DNA 双链断裂的标志物^[11]。本研究发现,LCB 处理 MDA-MB-231 细胞后, γ -H2AX 阳性细胞数和表达水平显著增加,提示 LCB 能够诱导细胞 DNA 双链断裂。当 DNA 发生损伤时,细胞可激活周期检查点,诱导细胞阻滞于 G2/M 或 S 期,从而阻止带有损伤 DNA 的细胞在修复前进入有丝分裂^[12]。本研究结

果显示,LCB能够调控 cyclinB1、cyclinD1及 p-Cdc2等蛋白表达水平,诱导乳腺癌细胞发生G2/M和S期阻滞,从而抑制细胞周期进程。

ERK1/2和p38MAPK通路是构成MAPK信号途径的两条主要通路,参与调节肿瘤增殖、侵袭迁移、凋亡和应激等多种生物学过程^[13-14]。本研究发现,LCB能够促进MDA-MB-231细胞中ERK1/2和p38MAPK的磷酸化水平,表明激活MAPK信号途径可能是LCB抑癌活性的主要机制之一。内质网应激是机体应对蛋白质表达异常的防御性反应,其主要过程为内质网伴侣蛋白BiP(GRP78)与未折叠蛋白质结合并促进蛋白质折叠或抑制蛋白质合成,从而缓解内质网压力^[15-16]。当异常蛋白质在细胞内持续累积,ATF4表达上调,促进了转录因子CHOP表达水平,从而激活内质网应激反应性凋亡^[17-18]。本研究发现较高浓度LCB(20 μmol/L)处理MDA-MB-231细胞后,BiP、ATF4和CHOP蛋白表达水平显著上调,推测LCB可能破坏肿瘤细胞氧化应激微环境,诱导钙离子平衡失调或激活未折叠蛋白质反应,进而促进CHOP介导的乳腺癌细胞凋亡,这有待于实验的进一步证实。

综上所述,LCB可显著抑制TNBC细胞MDA-MB-231的增殖活力,并诱导细胞发生DNA损伤与周期阻滞。LCB的抗肿瘤活性可能与其激活MAPK和内质网应激信号通路相关。本研究为中草药的开发利用及乳腺癌的临床治疗提供实验依据。

[参考文献]

- [1] PENG B, HE R, XU Q H, *et al.* Ginsenoside 20(S)-protopanaxadiol inhibits triple-negative breast cancer metastasis *in vivo* by targeting EGFR-mediated MAPK pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 1-13. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.02.003.
- [2] LI Y, ZHANG H J, MERKHER Y, *et al.* Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 1-30. DOI: 10.1186/s13045-022-01341-0.
- [3] 张旭, 蒙凌华. 源于天然产物或其衍生物分子靶向抗肿瘤药物研究进展[J]. *药学学报*, 2020, 55(11): 2491-2500. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0248.
- [4] WANG D N, LIANG J, ZHANG J, *et al.* Natural chalcones in Chinese materia Medica: licorice[J/OL]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2020, 2020: 3821248[2023-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102474/>. DOI: 10.1155/2020/3821248.
- [5] ZHOU B, WANG H, ZHANG B, *et al.* Licochalcone B attenuates neuronal injury through anti-oxidant effect and enhancement of Nrf2 pathway in MCAO rat model of stroke[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100:108073[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576921007098?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.intimp.2021.108073.
- [6] CAO Y Y, XU W X, HUANG Y Y, *et al.* Licochalcone B, a chalcone derivative from *Glycyrrhiza inflata*, as a multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(5): 736-739. DOI: 10.1080/14786419.2018.1496429.
- [7] OH H N, LEE M H, KIM E, *et al.* Licochalcone B inhibits growth and induces apoptosis of human non-small-cell lung cancer cells by dual targeting of EGFR and MET[J/OL]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153014[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711319301801?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153014.
- [8] ZHANG Y Y, FENG P P, WANG H F, *et al.* Licochalcone B induces DNA damage, cell cycle arrest, apoptosis, and enhances TRAIL sensitivity in hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2022, 365:110076[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279722002812?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110076.
- [9] ZHANG Z, YANG L, HOU J, *et al.* Molecular mechanisms underlying the anticancer activities of licorice flavonoids[J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113635[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120335236?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.jep.2020.113635.
- [10] WANG Y S, XIA W X, TAO M X, *et al.* Oncopreventive and oncotherapeutic potential of licorice Chalcone compounds: molecular insights[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2023, 23(6): 662-699. DOI: 10.2174/1389557522666220827161943.
- [11] RAHMANIAN N, SHOKRZADEH M, ESKANDANI M. Recent advances in γH2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair[J/OL]. *DNA Repair (Amst)*, 2021, 108: 103243[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786421001993?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103243.
- [12] MALEKI DANA P, SADOUGHI F, MIRZAEI H, *et al.* DNA damage response and repair in the development and treatment of brain tumors [J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 924:174957[2023-10-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299922002187?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.ejphar.2022.174957.
- [13] WEI J E, LIU R N, HU X Y, *et al.* MAPK signaling pathway-targeted marine compounds in cancer therapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(1): 3-22. DOI: 10.1007/s00432-020-03460-y.
- [14] WANG J R, LUO Y H, PIAO X J, *et al.* Mechanisms underlying isoliquiritigenin-induced apoptosis and cell cycle arrest via ROS-mediated MAPK/STAT3/NF-κB pathways in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(4): 461-470. DOI: 10.1002/ddr.21518.
- [15] QI Z H, CHEN L X. *Endoplasmic reticulum stress and autophagy [M]/Autophagy: Biology and Diseases*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 167-177. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4_8.
- [16] 刘要甫, 谭正之, 田芳, 等. 靶向内质网应激作为肿瘤治疗的新策略[J]. *生命科学*, 2021, 33(7): 810-816. DOI: 10.13376/j.cbls/2021087.
- [17] RELLMANN Y, EIDHOF E, DREIER R. Review: ER stress-induced cell death in osteoarthritic cartilage[J/OL]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109880[2023-07-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656820303570?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109880.
- [18] HUGHES A, OXFORD A E, TAWARA K, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cartilage pathophysiology; contributing factors to apoptosis and osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 665. DOI: 10.3390/ijms18030665.

[收稿日期] 2023-08-15

[修回日期] 2023-12-08

[本文编辑] 郁晓路, 向正华