

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.003

# 三氧化二砷对三阴乳腺癌干细胞 MDA-MB-231 细胞株凋亡和自噬作用机制研究\*

武瑞仙 李莹 陈云婷 庄文馨 洪日<sup>△</sup>

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心海南医院乳腺科 海南 三亚 572000)

**摘要 目的:**探讨三氧化二砷对 TNBC 干细胞 MDA-MB-231 细胞株凋亡和自噬作用机制。**方法:**取第 2 代培养 5 天的干细胞进行实验,共分为 4 组:对照组、三氧化二砷作用组、Rapa 联合三氧化二砷组和 3-MA 联合三氧化二砷组。观察检测细胞凋亡率、细胞自噬、蛋白表达情况。**结果:**三氧化二砷作用 48 h,细胞总凋亡率为 40%,采用 3MA 抑制细胞自噬活性,三氧化二砷诱导的细胞凋亡率降低约 50%,Rapa 可促使三氧化二砷诱导细胞凋亡增高约 50%。与对照组相比,三氧化二砷组、Rapa 联合三氧化二砷组、3-MA 联合三氧化二砷组细胞内荧光强度均较高。3-MA 联合三氧化二砷组 Bax、Beclin-1、P62 蛋白表达高于三氧化二砷组、Rapa 联合三氧化二砷组,Bcl-2 蛋白表达低于三氧化二砷组、Rapa 联合三氧化二砷组( $P<0.05$ )。**结论:**三氧化二砷诱导的 MDA-MB-231 干细胞中自噬和细胞凋亡现象共存且可能受共同基因的调控,三氧化二砷诱发自噬可促进细胞凋亡。

**关键词:**三阴乳腺癌;三氧化二砷;细胞凋亡;自噬

**中图分类号:**R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)23-4414-03

## Mechanism of Arsenic Trioxide on Apoptosis and Autophagy in Triple-negative Breast Cancer Stem Cell MDA-MB-231 Cell Line\*

WU Rui-xian, LI Ying, CHEN Yun-ting, ZHUANG Wen-xin, HONG Ri<sup>△</sup>

(Department of Breast Surgery, Shanghai Children's Medical Center Hainan Hospital,

Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Sanya, Hainan, 572000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the mechanism of arsenic trioxide on apoptosis and autophagy in triple negative breast cancer (TNBC) stem cell MDA-MB-231 cell line. **Methods:** The stem cells cultured in the second generation were taken for 5 and divided into four groups: control group, arsenic trioxide acting group, Rapa combined with arsenic trioxide group and 3-MA combined with arsenic trioxide group. The apoptosis rate, autophagy and protein expression were observed. **Results:** For 48 h, the total apoptosis was 40%. When 3MA inhibited the autophagic activity, the apoptosis induced by arsenic trioxide decreased by about 50%, and Rapa promoted the arsenic trioxide induced apoptosis increased by about 50%. Compared with the control group, the intracellular fluorescence intensity was higher in arsenic trioxide, Rapa combined with arsenic trioxide, and 3-MA combined with arsenic trioxide. Bax, Beclin-1 and P62 protein expression were higher in 3-MA and arsenic trioxide group and Rapa group, and Bcl-2 protein expression was lower than the group and Rapa with arsenic trioxide group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Arsenic trioxide induced autophagy and cell apoptosis coexist in MDA-MB-231 stem cells and may be regulated by common genes. Arsenic trioxide induced autophagy can promote cell apoptosis.

**Key words:** Triple-negative breast cancer; Arsenic trioxide; Apoptosis; Autophagy

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R737.9 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2024)23-4414-03

### 前言

三阴性乳腺癌(TNBC)常见于年轻绝经前女性以及突变携带女性,发病率高,近年来发病率有年轻化趋势,患者预后差,易复发转移<sup>[1]</sup>。外科手术适用于早期癌症初始治疗,化疗和靶向治疗可明显提高晚期癌症患者总生存期和无进展生存期<sup>[2]</sup>。如何对 TNBC 患者实施有效治疗,已成为临床研究重难点之一。三氧化二砷是中药砒霜有效成分,临床用于治疗白血病、肝癌等,效果较好<sup>[3]</sup>。诱导分化和细胞凋亡是三氧化二砷参与抗肿瘤

作用主要方式。凋亡和自噬是细胞程序性死亡方式,虽然其生化代谢途径及形态学存在差异,但共同调控细胞生存和死亡,成为多种抗肿瘤药物作用靶点<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨三氧化二砷对 TNBC 干细胞 MDA-MB-231 细胞株凋亡和自噬作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞培养及分组

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞株,接种于含 bFGF 10 ng/mL、EGF 20 ng/mL、2%B27 的 DMEM/F12 培养基中培

\* 基金项目:上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心海南医院金椰种子基金项目(JYZZ-201915);

海南省自然科学基金青年基金项目(821QN1009);海南省卫生健康行业科研项目(20A200121)

作者简介:武瑞仙(1982-),女,博士研究生,副主任医师,研究方向:中医药防治乳腺疾病,E-mail: wu7888808@163.com

△ 通讯作者:洪日(1975-),男,博士研究生,副主任医师,研究方向:中医药防治乳腺疾病,E-mail: 61307992@qq.com

(收稿日期:2024-06-18 接受日期:2024-07-15)

养。取第2代培养5天的干细胞悬浮培养细胞进行实验,共分为4组:对照组、三氧化二砷作用组[(6.0  $\mu\text{mol/L}$ )]、Rapa联合三氧化二砷组和3-MA联合三氧化二砷组。其中3-MA与三氧化二砷作用组在细胞悬液中预先加入4 mmol/L 3-MA预处理细胞3小时,然后再在各实验组中加入不同浓度的三氧化二砷。在Rapa与三氧化二砷共同作用组可将药物同时加入并使Rapa的终浓度达到0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。将分组处理的细胞分别培养不同时间。

### 1.2 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集各组MDA-MB-231干细胞,每mL中有 $1 \times 10^6$ 个,使用染液Annexin V-FITC / PI(哈尔滨新海基因检测有限公司)5 mL,放入无光线地方,孵育20 min,取出放入流式细胞仪中,开展相应检测。

### 1.3 电镜观察细胞自噬

收集对照组及各药物组处理后的MDA-MB-231干细胞,PBS洗3次,2%多聚甲醛和3%戊二醛在PBS缓冲液中固定,

4 $^{\circ}\text{C}$ 状态下保存。透射电子显微镜采集图片。

### 1.4 蛋白质印迹法检测 Bax、Bcl-2、Beclin-1、P62 蛋白

收集对照组及各药物组处理48 h后的MDA-MB-231干细胞,PBS清洗三次后加入细胞裂解液200  $\mu\text{L}$ 吹散细胞,置于冰上裂解30 min,再予低温离心机12000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低温离心30 min,进行蛋白质印迹,最后用ImageJ软件分析灰度值。

### 1.5 统计学方法

SPSS23.0软件,计量资料 $\bar{x} \pm s$ ,t检验、方差检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学变化

电子透射显微镜下观察,细胞呈现胞膜凸起、染色质浓缩边集、核碎裂及凋亡小体形成等典型凋亡形态学改变,还可观察到细胞核周有自噬体形成,见图1。

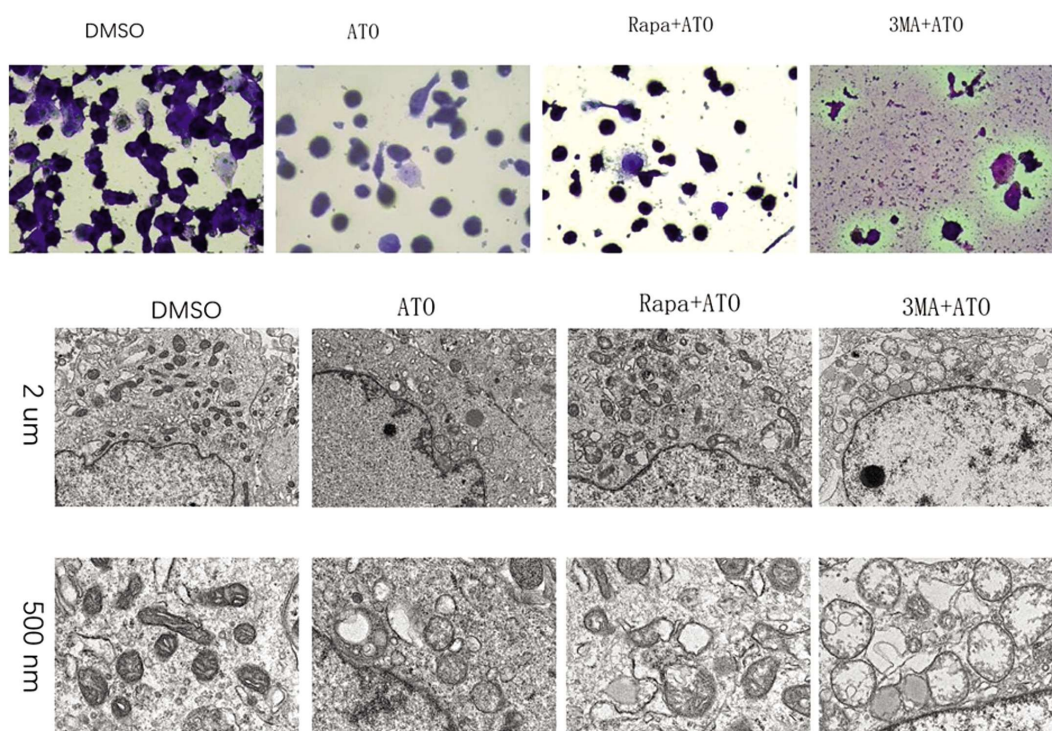


Fig.1 Arsenic trioxide-induced morphological changes in MDA-MB-231 stem cells

Note: B Wright-Giemsa staining ( $\times 100$ ); C TEM ( $\times 6000$ )

### 2.2 三氧化二砷对MDA-MB-231干细胞凋亡的影响

三氧化二砷作用48 h,细胞总凋亡率为40%,采用3MA抑制细胞自噬活性,三氧化二砷诱导的细胞凋亡率降低约50%,提示3MA可逆转三氧化二砷诱导细胞凋亡,降低MDA-MB-231干细胞对三氧化二砷的敏感性。Rapa可促使三氧化二砷诱导细胞凋亡增高约50%,提示Rapa诱导自噬可促进三氧化二砷诱导细胞凋亡,提高MDA-MB-231干细胞对三氧化二砷的敏感性。

### 2.3 三氧化二砷诱导MDA-MB-231干细胞自噬活化

MDC荧光染色在细胞核周区域出现大量点块状荧光,与对照组相比,三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组、3-MA联合三氧化二砷组胞内荧光强度均较高,3-MA联合三氧化二砷组高于三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组,说明三氧化二砷可诱导MDA-MB-231干细胞发生不同程度自噬活化。

### 2.4 4组细胞中Bax、Bcl-2、Beclin-1、P62蛋白表达

与对照组相比,三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组、3-MA联合三氧化二砷组Bax、Beclin-1、P62蛋白表达均升高,3-MA联合三氧化二砷组高于三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组( $P < 0.05$ );与对照组相比,三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组、3-MA联合三氧化二砷组Bcl-2蛋白表达均降低,3-MA联合三氧化二砷组低于三氧化二砷组、Rapa联合三氧化二砷组( $P < 0.05$ ),见表1。

## 3 讨论

目前对TNBC发病机制、临床病理特征及预后指标研究有限,为TNBC患者判断预后及制定个体化治疗方案提供理论依据,是目前临床研究急需解决问题<sup>[5]</sup>。化疗、内分泌治疗、生物靶向治疗等方式在乳腺癌治疗中有举足轻重作用,其显著降低乳

表 1 4 组细胞中 Bax、Bcl-2、Beclin-1、P62 蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 1 Comparison of Bax, Bcl-2, Beclin-1, and P62 protein expression in 4 groups of cells( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	Bax	Bcl-2	Beclin-1	P62
Control group	0.40±0.02	2.85±0.23	0.21±0.01	1.01± 0.05
Arsenic trioxide group	0.71±0.08 <sup>△</sup> ▽	1.88±0.15 <sup>△</sup> ▽	1.40±0.13 <sup>△</sup> ▽	1.31± 0.06 <sup>△</sup> ▽
Rapa combined with the arsenic trioxide group	0.59±0.05 <sup>△</sup>	2.23±0.16 <sup>△</sup>	0.50±0.06 <sup>△</sup>	1.12± 0.06 <sup>△</sup>
3-MA combined with the arsenic trioxide group	0.85±0.09 <sup>△</sup> ▽	1.45±0.16 <sup>△</sup> ▽	1.51±0.14 <sup>△</sup> ▽	1.49± 0.11 <sup>△</sup> ▽

Note: compared with Control group, <sup>△</sup> $P<0.05$ ; compared with Arsenic trioxide group, <sup>△</sup> $P<0.05$ ; compared with Rapa combined with the arsenic trioxide group, <sup>▽</sup> $P<0.05$ , the same below.

腺癌复发率和转移率,提高生存率<sup>[6]</sup>。但部分患者无法从化疗中获益,且易出现骨髓抑制、肝肾功能损害、消化道反应等副作用,原发或继发耐药性也是乳腺癌治疗一大难题。开发研制新抗肿瘤药物成为乳腺癌研究重要内容。

近年来临床一直认为凋亡是细胞程序性死亡唯一机制,化疗不仅可引起细胞凋亡,还会引起坏死、自噬等其他非凋亡形式坏死,自噬作为新的细胞死亡方式受到临床关注<sup>[7]</sup>。细胞会在已损害细胞器、多余蛋白质清除中,出现再利用情况,可将其作为细胞在人体中自我保护机制。但是在肿瘤患者治疗中,自噬被视为“双刃剑”<sup>[8]</sup>。研究显示,化疗过程中肿瘤细胞会因为出现较明显耐药现象,而发生自噬,在细胞出现较明显自噬抑制现象时,会增加细胞对药物敏感度,使细胞耐药性明显变少<sup>[9]</sup>。抗自噬策略已在临床试验中启动,其目的是克服对放射线或化学疗法抗药性发展。肿瘤发生与发展以及肿瘤细胞对化疗药物耐药与肿瘤细胞凋亡失调有着直接或间接联系,诱发细胞凋亡因素各式各样,如物理射线、化学物质等等,寻找靶向药物,目标性诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤重要方法之一<sup>[10]</sup>。一方面长时间抑制剂暴露会导致癌症,另一方面砷化合物又是一种抗癌潜在药物。目前三氧化二砷已被用作抗肿瘤剂,用于治疗急性早幼粒细胞白血病<sup>[11]</sup>。三氧化二砷还用于其他实体瘤治疗,如肝脏、乳腺癌、胃和前列腺<sup>[12]</sup>。在大多数情况下,癌细胞中三氧化二砷抑制增殖和/或诱导细胞凋亡效果较好。三氧化二砷还减弱肝细胞癌细胞迁移/侵袭潜力,作为模型药物,三氧化二砷可导致脑癌、肝癌、乳腺癌和胃癌血管关闭<sup>[13]</sup>。还有研究揭示三氧化二砷一种新功能,即在胰腺癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤以及肝细胞癌中耗尽癌症干细胞种群或诱导癌症干细胞分化<sup>[14]</sup>。然而,其中涉及分子机制仍不清楚。本研究结果显示,本研究使用三氧化二砷处理细胞后,通过电镜观察到细胞内出现自噬小体,提示三氧化二砷可诱导细胞发生自噬。本研究采用自噬抑制剂 3MA+ 三氧化二砷预处理细胞,发现其抑制细胞自噬活性,三氧化二砷诱导的细胞凋亡率降低约 50%,提示 3MA 可逆转三氧化二砷诱导细胞凋亡。为进一步了解三氧化二砷诱导 MDA-MB-231 细胞自噬和凋亡机制,本研究分析三氧化二砷对 Bax、Bcl-2、Beclin-1、P62 蛋白表达影响,发现 3-MA 联合三氧化二砷组 Bax、Beclin-1、P62 蛋白表达较高,Bcl-2 蛋白表达较低。本研究认为 3-MA 可逆转三氧化二砷诱导的 Bax、Beclin-1、P62 等基因的表达上调以及 Bcl-2 基因的表达下调,而 Rapa 的作用则相反。提示三氧化二砷诱导的 MDA-MB-231 干细胞自噬活性与凋亡之间存在密切的联系,其可能共同受 Bax、Beclin-1、P62 和 Bcl-2 等基因的表达调控。

综上,三氧化二砷诱导的 MDA-MB-231 干细胞中自噬和细胞凋亡现象共存且可能受共同基因的调控,三氧化二砷诱发的自噬可促进细胞凋亡。

#### 参考文献(References)

- [1] Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review[J]. Cancer J, 2021, 27(1): 8-16.
- [2] Hu J, Dai C, Zhang Y, et al. Effect of surgical treatment on patients with stage T3 or T4 triple-negative breast cancer: a SEER-based retrospective observational study [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1184173.
- [3] Sun J, Cheng M, Ye T, et al. Nanocarrier-based delivery of arsenic trioxide for hepatocellular carcinoma therapy [J]. Nanomedicine (Lond), 2022, 17(26): 2037-2054.
- [4] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(6): 582-592.
- [5] Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer. Semin Cancer Biol, 2021, 72: 136-145.
- [6] Korde LA, Somerfield MR, Carey LA, et al. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline[J]. J Clin Oncol, 2021, 39(13): 1485-1505.
- [7] Cao W, Li J, Yang K, et al. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress [J]. Bull Cancer, 2021, 108 (3): 304-322.
- [8] Ariosa AR, Lahiri V, Lei Y, et al. A perspective on the role of autophagy in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(12): 166262.
- [9] Marsh T, Debnath J. Autophagy suppresses breast cancer metastasis by degrading NBR1[J]. Autophagy, 2020, 16(6): 1164-1165.
- [10] Cocco S, Leone A, Piezzo M, et al. Targeting Autophagy in Breast Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 7836.
- [11] Ghiuzeli CM, Stýblo M, Saunders J, et al. The pharmacokinetics of therapeutic arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia patients [J]. Leuk Lymphoma, 2022, 63(3): 653-663.
- [12] Yang X, Zhao J, Wei D, et al. Enzalutamide combination with Arsenic trioxide suppresses the progression of castration-resistant prostate cancer[J]. J Chemother, 2023, 35(8): 760-770.
- [13] Deng ZT, Liang SF, Huang GK, et al. Autophagy plays a pro-apoptotic role in arsenic trioxide-induced cell death of liver cancer[J]. J Integr Med, 2024, 22(3): 295-302.
- [14] 罗春燕,刘婵,杜凤,等.三氧化二砷通过下调 TET2 促进 Nanog 甲基化并抑制胚胎干细胞向中胚层分化[J].解剖科学进展, 2023, 29 (2): 149-152, 156.