

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.16.004

基于核因子相关因子 2/ 血红素加氧酶 -1 信号通路探讨异荭草素对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响 *

王 喻¹ 庞兴华² 田一鸣³ 路 灿⁴ 苑 著^{5Δ}

(1 北京市和平里医院乳腺外科 北京 100013; 2 北京市丰台中西医结合医院外二科 北京 100072;

3 首都医科大学附属北京妇产医院怀柔妇幼保健院外科 北京 101400; 4 北京市大兴区妇幼保健院乳腺外科 北京 102600;

5 首都医科大学附属北京友谊医院普外科 北京 100050)

摘要 目的:探讨异荭草素(ISO)对乳腺癌(BC)细胞恶性生物学行为及核因子相关因子 2(Nrf2)/ 血红素加氧酶 -1(HO-1)信号通路的影响。**方法:**体外培养人 BC 细胞系 MDA-MB-231 并分组:MDA-MB-231 组、MDA-MB-231+ISO 组(100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组(转染 OE-NC 后用 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)、MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组(转染 OE-Nrf2 后用 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)。采用细胞计数试剂盒 -8(CCK-8)检测 MDA-MB-231 细胞增殖;流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞周期和凋亡;Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移能力;Western blot 检测 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白及凋亡蛋白表达。**结果:**与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组细胞活力、S 期和 G2 期细胞比例、迁移和侵袭能力、B 淋巴细胞瘤 -2(Bcl-2)、Nrf2、HO-1、基质金属蛋白酶 -9(MMP-9)蛋白水平显著下降($P<0.05$),细胞凋亡率、G1/G0 期细胞比例以及 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白水平显著上升($P<0.05$)。与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组细胞活力、S 期和 G2 期细胞比例、迁移和侵袭能力、Bcl-2、Nrf2、HO-1、MMP-9 蛋白水平显著上升($P<0.05$),细胞凋亡率、G1/G0 期细胞比例以及 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。**结论:**ISO 可能通过抑制 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 MDA-MB-231 细胞恶性增殖、迁移和侵袭等行为。

关键词:异荭草素;核因子相关因子 2/ 血红素加氧酶 -1 通路;增殖;迁移;侵袭;乳腺癌

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)16-3021-06

Effect of Isoorientin on Malignant Biological Behavior of Breast Cancer Cells Based on Nuclear Factor-related Factor 2/heme Oxygenase-1 Signaling Pathway*

WANG Yu¹, PANG Xing-hua², TIAN Yi-ming³, LU Can⁴, YUAN Zhu^{5Δ}

(1 Department of Breast Surgery, Beijing Hepingli Hospital, Beijing, 100013, China; 2 Second Department of Surgery, Beijing Fengtai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing, 100072, China; 3 Department of Surgery, Huairou Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing, 101400, China; 4 Department of Breast Surgery, Women's Health Centre, Daxing District Maternal and Child Health Care Hospital of Beijing, Beijing, 102600, China; 5 Department of General Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influences of isoorientin(ISO) on malignant biological behavior of breast cancer (BC) cells and nuclear factor-related factor 2(Nrf2)/heme oxygenase-1(HO-1) signaling pathway. **Methods:** Human BC cell line MDA-MB-231 was cultured in vitro and separated into groups: MDA-MB-231 group, MDA-MB-231+ISO group (100 $\mu\text{mol/L}$ ISO treatment), MDA-MB-231+ ISO+OE-NC group (treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO after transfection of OE-NC), and MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group (treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO after transfection of OE-Nrf2). MDA-MB-231 cells proliferation was detected by cell count kit-8 (CCK-8). Flow cytometry was used to detect MDA-MB-231 cells cycle and apoptosis. Transwell assay was used to detect the invasion and migration abilities of MDA-MB-231 cells. Western blot was used to detect the expression of Nrf2/HO-1 signaling pathway-related proteins and apoptosis proteins. **Results:** Compared with MDA-MB-231 group, MDA-MB-231+ISO group and MDA-MB-231+ISO+OE-NC group had obviously lower cell viability, S phase and G2 phase cells ratios, migration and invasion abilities, B-lymphocytoma-2 (Bcl-2), Nrf2, HO-1, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein levels ($P<0.05$), and obviously higher apoptosis rate, G1/G0 phase cells ratios, and Bax and cleaved-Caspase-3 protein levels ($P<0.05$). Compared with MDA-MB-231+ISO group, MDA-

* 基金项目:北京市属医院科研培育计划项目(PX20190102)

作者简介:王喻(1993-),女,硕士,住院医师,研究方向:乳腺外科学,E-mail: dr_yuw@163.com

Δ 通讯作者:苑著(1977-),男,博士,主任医师,副教授,研究方向:乳腺外科学,E-mail: yuzhdoctor@163.com

(收稿日期:2023-03-05 接受日期:2023-03-27)

MB-231+ISO+OE-Nrf2 group had obviously higher cell viability, S phase and G2 phase cells ratios, migration and invasion abilities, Bcl-2, Nrf2, HO-1, MMP-9 protein levels ($P<0.05$), and obviously lower apoptosis rate, G1/G0 phase cells ratios, and Bax and cleaved-Caspase-3 protein levels ($P<0.05$). **Conclusion:** ISO may inhibit the malignant proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells by inhibiting the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: Isoorientin; Nuclear factor-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway; Proliferation; Migration; Invasion; Breast cancer

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

Article ID: 1673-6273(2023)16-3021-06

前言

乳腺癌(breast cancer, BC)是全球女性最常诊断出的癌症(占癌症病例总数的 24.2%)和癌症相关死亡的主要原因(占癌症死亡总数的 15%)^[1]。但近 12%的乳腺癌诊断患者最终会出现转移性疾病,转移性乳腺癌尚无治愈方法,并且预后较差:5 年生存率为 26%^[2]。目前临床上使用放疗、化疗等手段来延长患者的生存期,但存在较多的不良反应,且对复发及转移患者的作用效果不佳^[3]。因此,了解 BC 的发病机制,可能利于寻找新治疗方法。异荭草素(Isoorientin, ISO)是一种良好的天然类黄酮,可从山楂和黄芪等多种植物中提取,具有抗菌、抗炎和抗癌活性^[4]。研究证明,类黄酮在乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌中可减轻多药耐药性^[5]。有研究表明 ISO 可诱导结肠直肠癌 HT29 细胞的凋亡和细胞周期阻滞^[6]。然而,ISO 对人 BC 细胞增殖、迁移等恶性生物学行为的影响尚不清楚。最近研究发现,核因子相关因子 2 (Nuclear factor-related factor 2, Nrf2)/ 血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)信号通路在不同病理条件下具有促癌或抑癌功能, Nrf2 的受控激活可通过减少活性氧(Reactive oxygen, ROS)诱导的脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)损伤,降低正常细胞癌症病变的风险,然而在肿瘤环境中, Nrf2 的异常激活会促进肿瘤细胞侵袭的发生进而促进癌症发展^[7,8]。已有研究发现,可以通过下调 Nrf2/HO-1 信号通路来减弱缺氧诱导的 BC 进展^[9]。本研究以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,研究 ISO 对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响,并分析 ISO 对细胞中 Nrf2/HO-1 信号通路的调节作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人 BC 细胞系(MDA-MB-231)购自上海钰博生物科技有限公司;ISO 购自上海韵泰信息科技有限公司;Nrf2 过表达质粒(OE-Nrf2)和阴性对照(OE-NC)购自上海吉玛制药技术有限公司;细胞周期与细胞凋亡试剂盒购自上海佰利莱生物科技有限公司;细胞计数试剂盒-8(Cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司;Bax 抗体、cleaved-Caspase-3 抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Nrf2 抗体、HO-1 抗体、GAPDH 抗体购自 Abcam 公司;基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体购自 antibodies-online 公司。

1.2 细胞培养、转染及分组

MDA-MB-231 细胞用 10%胎牛血清的 L-15 培养基悬浮

置于恒温培养箱培养,2 d 更换一次培养基,以保证营养成分充足。参照 Xu WT 等人^[10]的实验及前期预试验确定的 IC50 浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)作为 ISO 的给药浓度。将 MDA-MB-231 细胞分为:MDA-MB-231 组、MDA-MB-231+ISO 组(100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组(转染 OE-NC 后用 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)、MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组(转染 OE-Nrf2 后用 100 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理)。

转染:按照 Lipofectamine 3000TM 说明书将 OE-NC 和 OE-Nrf2 分别转入 MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组和 MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组 MDA-MB-231 细胞中,在恒温培养箱培养 8 h 后,更换新的培养基继续培养 2 d。

1.3 CCK-8 检测 MDA-MB-231 细胞增殖

将 MDA-MB-231 细胞按 2×10^4 个/孔接种到 96 孔板上,每个样本设置 6 个孔(以下实验相同)。待细胞长到 60%左右时,开始进行转染,之后在培养 24 h、48 h、72 h、96 h 时加入 CCK-8 溶液,并在 37℃下孵育 2 h,最后用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值,计算 MDA-MB-231 细胞活力。

1.4 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞周期和凋亡

MDA-MB-231 细胞按照 1.2 分组培养 2 d 后,离心收集 MDA-MB-231 细胞,用胰蛋白酶消化、磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered solution, PBS)洗涤,离心后加入预冷的 70%乙醇,置于 4℃冰箱过夜。离心后加入预冷的 PBS 溶液重悬细胞,再次离心,弃去上清,用手指轻弹管底使细胞分散,然后添加 PI 染液到每管细胞,37℃避光保存 1 h,上机检测 MDA-MB-231 细胞周期。

细胞经 PBS 处理,离心弃上清后,加入 500 μL Annexin 结合缓冲液,依次加入 Annexin-V-FITC 结合液和 PI 染液各 3 μL ,分别避光孵育 15 min,上机检测 MDA-MB-231 细胞凋亡。

1.5 Western blot 检测凋亡蛋白以及 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达

收集按照 1.2 分组培养 2 d 后的 MDA-MB-231 细胞,加入 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白,然后经电泳、转膜之后用脱脂乳封闭过夜,之后加入一抗 Nrf2(1:2000)、HO-1(1:2000)、MMP-9(1:1000)、Bax(1:1000)、cleaved-Caspase-3(1:500)、Bcl-2(1:2000)和 GAPDH 抗体(1:1000),室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次。加入二抗(1:1000)室温孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次,10 min/次。显色液显色后,使用 Image Lab™ 软件测定目的蛋白表达。

1.6 Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移能力

侵袭能力检测:收集按照 1.2 分组培养 2 d 后的 MDA-MB-231 细胞,经胰酶消化后制成细胞悬液,Transwell 上下室铺满 Matrigel 基质胶,上室加入细胞悬液,下室加入 FBS

溶液。于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 8 h,用甲醛固定,苏木精染色后,在显微镜下随机选取 3 个视野计算穿膜细胞数。

迁移能力检测:采用 Transwell 迁移实验,除不包被 Matrigel 基质胶,其它同上。

1.7 统计学方法

用 SPSS 23.0 进行统计分析。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析和 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ISO 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组 24 h、48 h、72 h、96 h 细胞活力均显著下降 ($P < 0.05$);与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组 24 h、48 h、72 h、96 h 细胞活力均显著上升 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 ISO 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 1 Effect of ISO on the proliferation of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	OD value(450 nm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
MDA-MB-231 group	0.58± 0.06	0.81± 0.08	1.41± 0.15	2.04± 0.21
MDA-MB-231+ISO group	0.41± 0.04 ^a	0.61± 0.06 ^a	0.93± 0.09 ^a	1.56± 0.15 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-NC group	0.42± 0.07 ^a	0.62± 0.06 ^a	0.92± 0.09 ^a	1.57± 0.15 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group	0.56± 0.05 ^b	0.79± 0.07 ^b	1.39± 0.14 ^b	1.98± 0.19 ^b
F	15.412	14.908	30.995	12.771
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the MDA-MB-231 group, ^a $P < 0.05$; Compared with the MDA-MB-231+ISO group, ^b $P < 0.05$.

2.2 ISO 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组 G1/G0 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$),S 期和 G2 期细胞比例显著下降 ($P < 0.05$);与

MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组 G1/G0 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$),S 期和 G2 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$),见图 1、表 2。

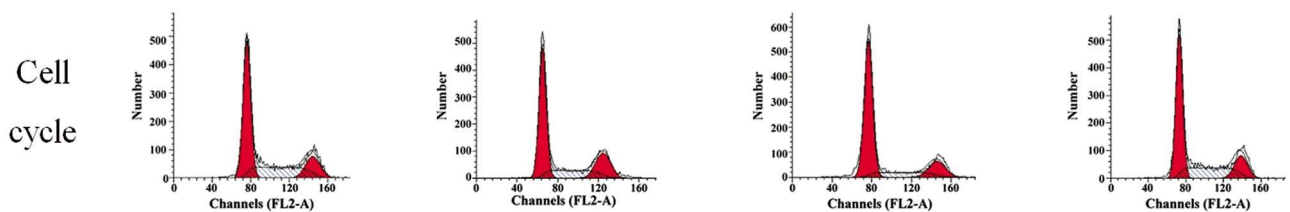


图 1 ISO 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响(流式细胞术)

Fig.1 Effect of ISO on the cell cycle of MDA-MB-231 (flow cytometry)

表 2 ISO 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Effect of ISO on MDA-MB-231 Cell Cycle($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Cell cycle distribution(%)		
	G1/G0	S	G2/M
MDA-MB-231 group	55.40± 5.74	23.59± 2.16	21.01± 1.90
MDA-MB-231+ISO group	66.54± 6.89 ^a	17.03± 1.51 ^a	16.43± 1.38 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-NC group	66.69± 6.89 ^a	17.11± 1.83 ^a	16.20± 1.50 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group	58.48± 5.83 ^b	20.98± 2.15 ^b	20.54± 2.07 ^b
F	4.861	16.413	13.298
P	0.010	<0.001	<0.001

Note: Compared with the MDA-MB-231 group, ^a $P < 0.05$; Compared with the MDA-MB-231+ISO group, ^b $P < 0.05$.

2.3 ISO 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组细胞凋亡率、Bax、cleaved-Cas-

pase-3 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白水平降低 ($P < 0.05$);与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组细胞凋亡率、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白水平显著

降低($P<0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著升高($P<0.05$), 见图 2、图 3、表 3。

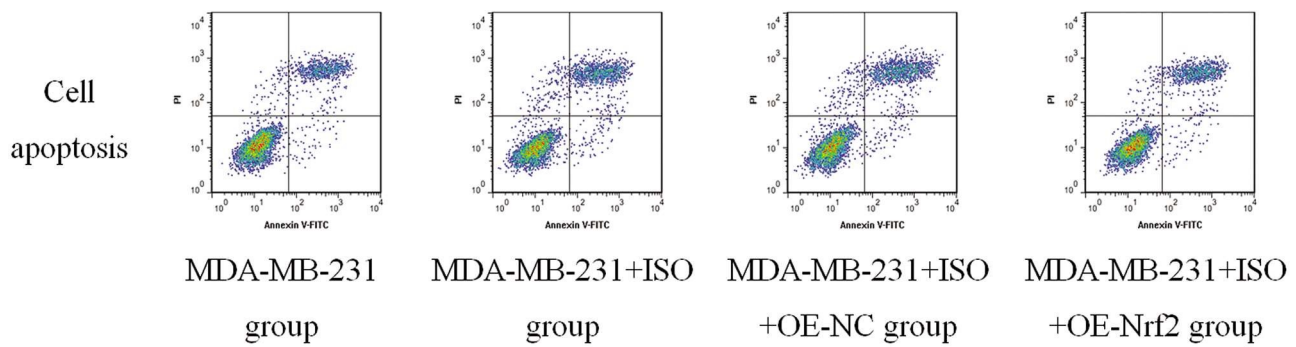


图 2 ISO 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响(流式细胞术)

Fig.2 Effect of ISO on apoptosis of MDA-MB-231 cells (flow cytometry)

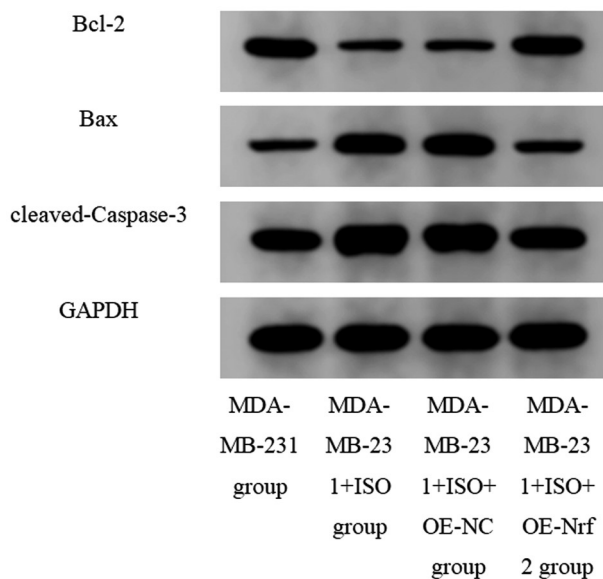


图 3 ISO 对 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白的影响(Western blot)

Fig.3 Effect of ISO on apoptosis related proteins in MDA-MB-231 cells (Western blot)

2.4 ISO 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响

与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组迁移和侵袭能力显著下降($P<0.05$); 与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组迁移和侵袭能力显著上升($P<0.05$), 见图 4、表 4。

2.5 ISO 对 MDA-MB-231 细胞 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响

与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组 Nrf2、HO-1、MMP-9 蛋白水平显著下降($P<0.05$); 与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组 Nrf2、HO-1、MMP-9 蛋白水平显著上升($P<0.05$), 见图 5、表 5。

3 讨论

BC 是最常见的癌症,也是全球女性癌症相关死亡的第二大原因,其发生与癌基因的异常表达有关^[11,12]。目前,BC 仍然是全球女性发病率最高的恶性肿瘤,因而寻找新的 BC 生物标志物对其诊断、治疗和预后至关重要^[13]。

表 3 ISO 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

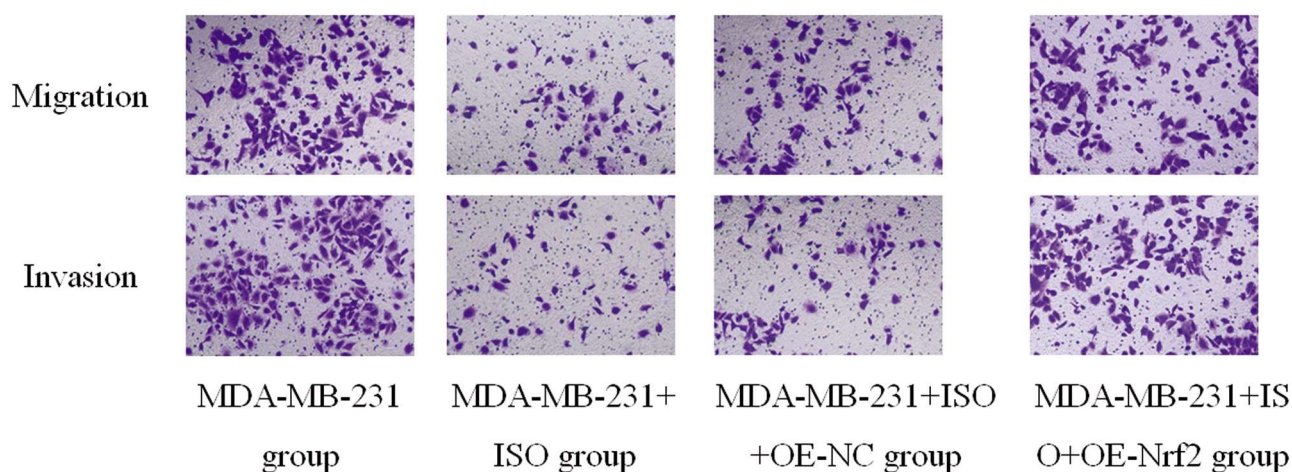
Table 3 Effect of ISO on apoptosis of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Apoptosis rate(%)	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	cleaved-Caspase-3/GAPDH
MDA-MB-231 group	14.64 $\pm$ 1.45	0.76 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.08
MDA-MB-231+ISO group	25.56 $\pm$ 2.56 ^a	0.32 $\pm$ 0.03 ^a	0.84 $\pm$ 0.08 ^a	1.43 $\pm$ 0.14 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-NC group	25.87 $\pm$ 2.53 ^a	0.36 $\pm$ 0.04 ^a	0.87 $\pm$ 0.09 ^a	1.39 $\pm$ 0.11 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group	17.24 $\pm$ 1.64 ^b	0.67 $\pm$ 0.06 ^b	0.41 $\pm$ 0.04 ^b	0.81 $\pm$ 0.07 ^b
F	44.619	105.800	96.045	68.220
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the MDA-MB-231 group, ^a $P<0.05$; Compared with the MDA-MB-231+ISO group, ^b $P<0.05$.

肿瘤的发生通常是由细胞增殖和凋亡失衡造成的,因此抑制肿瘤细胞的增殖或者促进肿瘤细胞的凋亡是治疗肿瘤的有效途径之一^[14]。ISO 是人类饮食中常见的类黄酮,已从许多植物物种中分离出来^[4]。Huang HK 等人^[15]研究发现,ISO 可以抑制人肺癌细胞增殖和迁移;Panieri E 等人^[17]研究发现,ISO 可以抑

制人结肠癌细胞的增殖,抑制其凋亡,提示 ISO 可能在多种肿瘤疾病治疗中起积极作用。本研究检测发现,ISO 显著降低了 MDA-MB-231 细胞增殖活力、迁移和侵袭能力,显著升高了 MDA-MB-231 细胞凋亡率,提示 ISO 可抑制 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为,可能在 BC 治疗中起积极作用。细胞增殖

图 4 ISO 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响(结晶紫染色, $\times 200$)Fig. 4 Effect of ISO on migration and invasion of MDA-MB-231 cell migration(Crystal violet staining, $\times 200$)表 4 ISO 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 4 Effect of ISO on migration and invasion of MDA-MB-231 cell migration($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Groups	Number of migrating cells	Invasive cell count
MDA-MB-231 group	150.58 $\pm$ 15.06	150.81 $\pm$ 15.35
MDA-MB-231+ISO group	58.41 $\pm$ 6.87 ^a	65.75 $\pm$ 6.24 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-NC group	59.43 $\pm$ 5.98 ^a	66.09 $\pm$ 6.46 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group	142.56 $\pm$ 14.65 ^b	139.79 $\pm$ 13.65 ^b
F	117.703	101.262
P	<0.001	<0.001

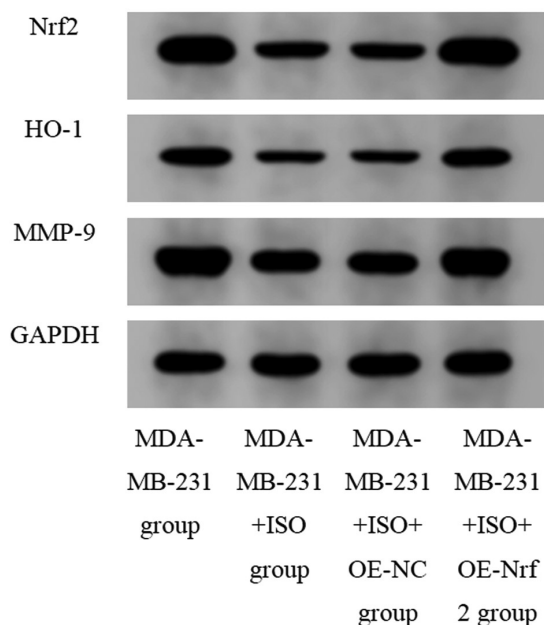
Note: Compared with the MDA-MB-231 group, ^a $P<0.05$; Compared with the MDA-MB-231+ISO group, ^b $P<0.05$.

图 5 ISO 对 MDA-MB-231 细胞 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响

Fig.5 Effect of ISO on Nrf2/HO-1 pathway related proteins in MDA-MB-231 cells

的正常进行通常依赖于细胞周期严格有序的进行,肿瘤发生的早期阶段通常与细胞周期的紊乱有关^[16],通过阻止肿瘤细胞进入 S 期和 G2 期,使其停滞在 G1/G0 期,可抑制肿瘤细胞的增殖从而治疗肿瘤。例如研究^[17,18]称,调节细胞周期可以抑制肝癌

和胆管癌细胞增殖。本研究结果发现,与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组 S 期和 G2 期细胞比例显著下降,G1/G0 期细胞比例显著上升,提示 ISO 可能通过将 MDA-MB-231 细胞阻滞在 G1/G0 期来抑制其增殖,可能具有抑制 BC 发展的潜力。

报道称,调节 Nrf2/HO-1 轴可以减少亲电体和 ROS,减少 DNA 损伤并降低基因组不稳定性从而对细胞起到保护作用^[19]。然而,Nrf2/HO-1 轴在癌症中的双重作用仍存在争议。有研究认为,人类肿瘤组织中 HO-1 的含量升高,HO-1 在肿瘤细胞生长发展、血管生成和肿瘤微环境的转移等方面起到促进作用^[20]。但也有研究认为,HO-1 上调会诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡和细胞周期停滞,抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移,并降低动物模型中的肿瘤负荷^[21]。研究表明,HO-1 主要通过降低 MMPs 的表达来抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,且 MMP-9 与 BC 中肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关^[22]。因此,本研究检测了 MMP-9 的表达,结果发现,与 MDA-MB-231 组相比,MDA-MB-231+ISO 组、MDA-MB-231+ISO+OE-NC 组 Nrf2、HO-1、MMP-9 蛋白水平显著下降,提示 ISO 可能通过下调 Nrf2/HO-1 抑制了 BC 的发展。为了证实该推出,随后在 ISO 处理的 MDA-MB-231 细胞中转染 OE-Nrf2,结果发现,与 MDA-MB-231+ISO 组相比,MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 组细胞活力、迁移和侵袭能力、S 期和 G2 期细胞比例、Nrf2、HO-1、MMP-9 蛋白水平显著上升,细胞凋亡率、G1/G0 期细胞比例以

表 5 ISO 对 MDA-MB-231 细胞 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of ISO on Nrf2/HO-1 Pathway Related Proteins in MDA-MB-231 Cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	MMP-9/GAPDH
MDA-MB-231 group	1.52± 0.15	0.85± 0.08	1.97± 0.19
MDA-MB-231+ISO group	0.78± 0.08 ^a	0.43± 0.04 ^a	1.10± 0.11 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-NC group	0.77± 0.07 ^a	0.42± 0.04 ^a	1.11± 0.13 ^a
MDA-MB-231+ISO+OE-Nrf2 group	1.41± 0.14 ^b	0.78± 0.08 ^b	1.89± 0.18 ^b
F	120.399	77.300	56.113
P	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the MDA-MB-231 group, ^a $P<0.05$; Compared with the MDA-MB-231+ISO group, ^b $P<0.05$.

及 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白水平显著降低,进一步证实 ISO 可能通过抑制 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭和迁移,促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。

综上所述,ISO 可能通过抑制 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 BC 细胞恶性增殖、迁移和侵袭等行为,这为 ISO 治疗 BC 提供了重要参考数据,Nrf2/HO-1 信号通路可能是 BC 治疗的潜在靶点。

参考文献(References)

- [1] DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(6): 438-451
- [2] Peart O. Metastatic Breast Cancer [J]. Radiol Technol, 2017, 88(5): 519M-539M
- [3] 季文媛,魏少荫,刘炜.大蓟麻提取物对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响及其可能的机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(8): 803-809
- [4] Ko YH, Kwon SH, Lee SY, et al. Isoorientin improves scopolamine-induced cognitive impairments by restoring the cholinergic system, antioxidant defense, and p-CREB/BDNF signaling in the hippocampus and frontal cortex [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(8): 722-731
- [5] Costea T, Vlad OC, Miclea LC, et al. Alleviation of Multidrug Resistance by Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds in Breast, Lung, Colorectal and Prostate Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 401-452
- [6] Gundogdu G, Dodurga Y, Elmas L, et al. Investigation of the Anticancer Mechanism of Isoorientin Isolated from Eremurus Spectabilis Leaves via Cell Cycle Pathways in HT-29 Human Colorectal Adenocarcinoma Cells [J]. Eurasian J Med, 2018, 50(3): 168-172
- [7] Panieri E, Buha A, Telkoparan-Akillilar P, et al. Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(3): 193-240
- [8] 姜红云,郭琳,葛俊丽,等. miR-19 通过 Keap-Nrf2/HO-1 信号通路对卵巢癌细胞增殖的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(17): 3217-3221, 3211
- [9] Mahajan M, Sitasawad S. miR-140-5p Attenuates Hypoxia-Induced Breast Cancer Progression by Targeting Nrf2/HO-1 Axis in a Keap1-Independent Mechanism[J]. Cells, 2021, 11(1): 12-30
- [10] Xu WT, Shen GN, Li TZ, et al. Isoorientin induces the apoptosis and cell cycle arrest of A549 human lung cancer cells via the ROS regulated MAPK, STAT3 and NF κ B signaling pathways [J]. Int J Oncol, 2020, 57(2): 550-561
- [11] Cha YJ, Kim ES, Koo JS. Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 907-923
- [12] Zu C, Zhang M, Xue H, et al. Emodin induces apoptosis of human breast cancer cells by modulating the expression of apoptosis-related genes[J]. Oncol Lett, 2015, 10(5): 2919-2924
- [13] Zu C, Qin G, Yang C, et al. Low dose Emodin induces tumor senescence for boosting breast cancer chemotherapy via silencing NRARP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(4): 973-978
- [14] Lv M, Dong ZJ, Tong YX, et al. Retrospective Analysis of Clinicopathological Characteristics of Lacrimal Gland Pleomorphic Adenoma and Mechanism of Tumorigenesis by the Imbalance Between Apoptosis and Proliferation [J]. Med Sci Monit, 2021, 27: e929152
- [15] Huang HK, Lee SY, Huang SF, et al. Isoorientin Decreases Cell Migration via Decreasing Functional Activity and Molecular Expression of Proton-Linked Monocarboxylate Transporters in Human Lung Cancer Cells[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(1): 201-222
- [16] Dai X, Chen C, Yang Q, et al. Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5): 454-467
- [17] Liu P, Xia P, Fu Q, et al. miR-199a-5p inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by regulating CDC25A to induce cell cycle arrest[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 571(1): 96-103
- [18] Shi T, Gong J, Fujita K, et al. Aspirin inhibits cholangiocarcinoma cell proliferation via cell cycle arrest in vitro and in vivo [J]. Int J Oncol, 2021, 58(2): 199-210
- [19] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. J Adv Res, 2021, 34(1): 43-63
- [20] Tsai CF, Chen JH, Chang CN, et al. Fisetin inhibits cell migration via inducing HO-1 and reducing MMPs expression in breast cancer cell lines[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 120(1): 528-535
- [21] Gandini NA, Alonso EN, Fermento ME, et al. Heme Oxygenase-1 Has an Antitumor Role in Breast Cancer [J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(18): 2030-2049
- [22] Li H, Qiu Z, Li F, et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis [J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5865-5870