

重楼皂苷 I 靶向 EGFR 影响人乳腺癌细胞增殖及凋亡的作用机制

张特^{1,2}, 张亮^{1,3}, 陆俊霏^{1,3}, 文君^{1,3}, 熊艺璇^{1,3}, 刘莹^{1,2,3*}

(1. 湖北医药学院 生物医药研究院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000; 3. 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 探讨重楼皂苷 I (polyphyllin I, PP I) 抑制人乳腺癌细胞增殖及分子机制。以人乳腺癌细胞株 BT474 细胞、MDA-MB-436 细胞为研究对象, 设为空白组和不同浓度的 PP I 处理组。采用 MTT 法、台盼蓝染色细胞计数实验、实时无标记动态细胞分析技术和克隆形成实验检测 PP I 对 2 种细胞增殖的影响; 采用 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率, JC-1 法检测线粒体膜电位; 蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白 caspase-3 和 PARP 的表达及 EGFR、Akt 和 ERK 信号通路蛋白的表达及磷酸化水平; 分子对接模拟 PP I 与 EGFR 的结合方式及作用模式; 基于靶点稳定性的药物结合实验检测 PP I 与 EGFR 的直接结合作用。结果表明, PP I 以时间和浓度依赖方式抑制细胞增殖及克隆形成。PP I 处理组的细胞凋亡率显著增加, 线粒体膜电位显著降低; PP I 能下调 caspase-3 蛋白前体的表达, 促进 PARP 切割。PP I 对 EGFR、Akt 和 ERK 总蛋白表达水平无明显影响, 但明显能降低 EGFR、Akt、ERK 的磷酸化水平; 分子对接模拟发现 PP I 能够与 EGFR 胞外区发生结合, 与其中 Gln366 残基形成氢键; 靶点稳定性的药物结合实验进一步确证了 PP I 能显著阻止了蛋白酶 pronase 对 EGFR 的水解作用, 表明 PP I 与 EGFR 具有直接结合作用。总之, PP I 能通过靶向 EGFR 阻断其下游信号通路抑制乳腺癌细胞增殖并诱导凋亡。该研究为 PP I 后续在乳腺癌的靶向治疗药物的开发奠定了基础。

[关键词] 重楼皂苷 I; 乳腺癌; 凋亡; EGFR; 分子对接

Mechanism of polyphyllin I targeting EGFR to affect proliferation and apoptosis of human breast cancer cells

ZHANG Te^{1,2}, ZHANG Liang^{1,3}, LU Jun-fei^{1,3}, WEN Jun^{1,3}, XIONG Yi-lian^{1,3}, LIU Ying^{1,2,3*}

(1. Biomedical Research Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
2. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
3. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] This study aims to investigate the molecular mechanism of polyphyllin I (PP I) inhibiting proliferation of human breast cancer cells. Human breast cancer BT474 and MDA-MB-436 cells were treated with different concentrations of PP I, and then the effect of PP I on cell proliferation was detected by MTT assay, trypan blue dye exclusion assay, real-time cell analysis, and clone forming assay, respectively. The apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining and then analyzed by flow cytometry. The change of mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry after fluorescent probe JC-1 staining. Western blot was used to detect protein expression and phosphorylation. Molecular docking was performed to detect the binding between PP I and EGFR. The affinity between PP I and EGFR was determined by drug affinity responsive target stability assay. The results indicated that PP I in-

[收稿日期] 2021-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82072928); 十堰市科技局引导性项目(19Y15); 湖北医药学院人才启动金项目(2018QDJZR27); 大学生创新创业训练项目(S202110929002, 202110929004)

[通信作者] * 刘莹, 教授, 硕士生导师, E-mail: ying_liu1002@163.com

[作者简介] 张特, 实验师, 研究方向为肿瘤发病机制及靶向治疗, E-mail: zhangte813@163.com

hibited the proliferation and colony formation of BT474 and MDA-MB-436 cells in a time- and concentration-dependent manner. The PP I treatment group showed significantly increased apoptosis rate and significantly decreased mitochondrial membrane potential. PP I down-regulated the expression of pro-caspase-3 protein, promoted the cleavage of PARP, and significantly reduced the phosphorylation levels of EGFR, Akt, and ERK. Molecular docking showed that PP I bound to the extracellular domain of EGFR and formed hydrogen bond with Gln366 residue. Drug affinity responsive target stability assay confirmed that PP I significantly prevented pronase from hydrolyzing EGFR, indicating that PP I and EGFR have a direct binding effect. In conclusion, PP I inhibited the proliferation and induced apoptosis of breast cancer cells by targeting EGFR to block its downstream signaling pathway. This study lays a foundation for the further development of PP I -targeted drugs against breast cancer.

[Key words] polyphyllin I; breast cancer; apoptosis; EGFR; molecular docking

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20210824.704

乳腺癌是女性常见的癌症,发病率逐年增加^[1],也是女性癌症死亡的主要原因。在世界卫生组织最新发布的2020年全球癌症统计中,乳腺癌新发病例数快速增长,已取代了肺癌成为全球发病率排名第一的癌症^[2],且患者预后不良,呈年轻化趋势^[3]。乳腺癌目前以外科手术切除为主,以放疗和药物治疗作为辅助手段,但放化疗的副作用较大,且在治疗后期常出现耐药性^[4]。因此,寻找新的有效杀伤乳腺癌细胞且毒副作用较小的药物具有重要意义。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是表皮生长因子受体(HER)家族(HER1/erbB1/EGFR、HER2/erbB2/NEU、HER3/erbB3、HER4/erbB4)成员之一。EGFR是一种受体酪氨酸激酶,由细胞外配体结合区、疏水跨膜区和细胞内受体酪氨酸激酶区组成。EGF配体结合导致EGFR的自磷酸化和下游级联通路的激活,进而参与调节细胞的生长、分化、存活和形成转移的能力^[5]。许多肿瘤的发生与EGFR的过表达、突变密切相关^[6-9],EGFR已成为肿瘤选择性靶向治疗的分子靶点。目前针对乳腺癌的EGFR靶向抑制剂有单克隆抗体(西妥昔单抗、尼妥珠单抗)及小分子酪氨酸激酶抑制剂(拉帕替尼、吉非替尼、厄洛替尼)^[10]。然而,单克隆抗体的抗肿瘤活性有限,单独用药的疗效较差,研究者更加注重单抗联合或与化疗药物联合治疗乳腺癌的研究^[11-13]。拉帕替尼是第一个用于临床的HER1(erbB1,EGFR)和HER2(erbB2,Neu)酪氨酸激酶双抑制剂。然而,目前仅用于与卡培他滨联合治疗既往接受过治疗的HER2阳性晚期或转移性乳腺癌患者^[14]。吉非替尼、厄洛替尼对乳腺癌临床治疗效果不理想,还有待进一步研究^[15]。其次,因肿瘤的异质性和耐药性极大地限制了靶向

药物的使用效果,使得患者出现复发转移^[16-17]。故有必要寻找新的EGFR靶向药物用于乳腺癌的靶向治疗。

重楼 *Paris Rhizoma* 是百合科植物七叶一枝花 *Paris polyphylla* 的根茎。在中国作为一种常用中草药已有两千多年的历史,其具有清热解毒、消肿镇痛、止血抗炎和抗肿瘤的功効^[18]。重楼皂苷 I (polyphyllin I, PP I) 是重楼的主要有效成分之一,是一种甾体皂苷^[19]。研究表明 PP I 有调节免疫^[20]、抗病毒^[21]、抗肿瘤^[19,22-25] 等作用。YANG Q 等^[26] 发现 PP I 对吉非替尼耐药的 非小细胞肺癌细胞和异种移植模型存在抑制作用并诱导细胞凋亡。彭鹏等^[27] 研究表明,PP I 能通过直接靶向活化 AMPK 诱导细胞发生自噬进而抑制非小细胞肺癌细胞生长和增殖。胡炜彦等^[28] 报道了 PP I 对人乳腺癌细胞 MCF-7 体内外生长有抑制作用。LI G B 等^[29] 研究发现,PP I 可通过增加线粒体的 PINK1 水平来诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞发生自噬和凋亡。然而,PP I 对乳腺癌的潜在靶点及作用机制如何,尚未有深入研究。因此,本研究旨在探索 PP I 对乳腺癌细胞的抑制作用及分子机制。

1 材料

1.1 细胞 BT474 细胞株、MDA-MB-436 细胞株均购自 ATCC 公司。BT474 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和双抗抗生素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃, 5% CO₂ 恒温培养箱中;MDA-MB-436 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和双抗抗生素的 L15 培养基中,置于在 37 ℃, 无 CO₂ 的恒温培养箱中。

1.2 药物及试剂 胎牛血清(批号 SH30396)、DMEM 培养基(批号 SH30021)、L15 培养基(批号 SH30525)均购自 HyClone;PP I(批号 B21668)购

自上海源叶生物科技有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)至 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中存储;MTT (批号 M1020-500T) 购于北京索莱宝科技有限公司;台盼蓝染液(批号 C0011)、结晶紫染液(批号 C0121-500 mL)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062M)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(批号 C2006)、细胞裂解液(批号 P0013)、青霉素和链霉素的双抗生素溶液($100 \times$)(批号 C0222)、PVDF 膜(批号 FFP26)均购自碧云天生物技术有限公司;PARP 抗体(批号 9542)、caspase-3 抗体(批号 9662)、p-EGFR 抗体(Tyr1068,批号 3777)、EGFR 抗体(批号 4267)、p-ERK1/2(Thr202/204,批号 9101)、ERK1/2(批号 9102)均购自 Cell Signal Technology;p-Akt 抗体(Ser473,批号 sc-7985)、Akt 抗体(批号 sc-8312)均购自 Santa Cruz Biotechnology;GAPDH 抗体(批号 M20006)购自 Abmart;HRP-兔二抗及鼠二抗(批号 E030120-01、E030110-01)购自 EarthOx。

1.3 仪器 CO_2 的恒温培养箱(赛默飞科技有限公司,型号 i160);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices,型号 SpectraMax i3);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter,型号 Cytoflex);RTCA 系统(美国 xCELLigence,型号 RTCADP)。

2 方法

2.1 MTT 实验 将 BT474 细胞(每 $90 \mu\text{L}$ 1.0×10^4 个)、MDA-MB-436 细胞(每 $90 \mu\text{L}$ 0.8×10^4 个)分别铺于 96 孔板,预培养 24 h,然后加入 PP I (终浓度分别为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组设置 3 个复孔,孵育 24、48 h。采用 MTT 法研究细胞毒性,用酶标仪于 490 nm 处测定样本吸光度 A 。通过公式计算,抑制率 = $1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.2 台盼蓝染色细胞计数实验 在 12 孔板中,以 MDA-MB-436 和 BT474 细胞密度分别为 1.5×10^5 、 2.5×10^5 个/L,每孔加入 990 μL 的细胞悬液,孵育 4 h,每孔加入 10 μL 已配好的 PP I (终浓度分别为 0、1.2、2.0、2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别培养 12、24、48 h 后用台盼蓝染色计数,绘制生长曲线。

2.3 实时无标记细胞分析(real time cellular analysis, RTCA) 按照仪器使用操作规程,于 RTCA 专用孔板,每孔加入 50 μL 培养基,测量基线。将 BT474 细胞(每 150 μL 1.6×10^4 个)、MDA-MB-436

细胞(每 150 μL 1.3×10^4 个)分别铺于孔板,预培养 24 h,然后加入 PP I (终浓度分别为 0、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组设置 2 个复孔,每隔 30 min,实时监测药物处理 48 h 内的细胞生长状况,绘制细胞生长指数曲线。

2.4 平板克隆形成实验 用 PP I (浓度分别为 0、1.2、2.0、2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 BT474 细胞、MDA-MB-436 细胞 12 h 后,以 2 mL/孔,250 个/mL,分别将细胞接种到 6 孔板。2 周后,弃除培养基,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,弃去固定液,然后 0.1% 结晶紫染色并计算克隆数。

2.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡 接种细胞 MDA-MB-436 (1.5×10^5 个/mL)、BT474 (2.5×10^5 个/mL)于 6 孔板,孵育 24 h,用 PP I (浓度分别为 0、1.2、2.0、2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育处理 24 h。按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的使用说明进行样本收集和染色,用流式细胞仪上机检测凋亡率。

2.6 JC-1 检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 接种细胞 MDA-MB-436 (1.5×10^5 个/mL)、BT474 (2.5×10^5 个/mL)于 6 孔板,孵育 24 h,用 PP I (浓度分别为 0、1.2、2.0、2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育处理 24 h。收集细胞,加入 500 μL 培养基。加入 500 μL 已配好的 JC-1 染色工作液,重悬,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,孵育 20 min。 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,弃上清。加 1 mL JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。加入 300 μL JC-1 染色缓冲液,用流式细胞仪上机检测。用红色荧光和绿色荧光的比值来表示线粒体膜电位水平,以此反映细胞早期凋亡。

2.7 蛋白免疫印迹实验(Western blot) 收集 PP I (浓度分别为 0、1.2、2.0、2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后的细胞,加 RIPA 裂解液,于冰浴 15 min。在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取上清,加相应体积的 loading buffer,混匀,于 $99 \text{ }^\circ\text{C}$ 水中煮 5 min。SDS-PAGE 电泳分离后,通过 PVDF 膜进行转膜 1.5 h,用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育过夜后,用带 HRP 标记的二抗孵育 1.5 h,用 ECL 发光试剂盒显影检测。

2.8 分子对接 EGFR 蛋白结构在蛋白质数据库(Protein Data Bank)中 PDB 的编号为 3P0Y。运用 AutoDock 4.2 程序进行对接实验。在 AutoDock 4.2 计算程序中,采用 0.375 间隔的 $70 \times 70 \times 70$ 点

阵模块。使用 Lamarckian 遗传算法进行对接计算,算法如下:150 的群体,最大值 2 500 万次能源评估,最高次数 2 000,交叉率 0.8,突变率 0.02,独立对接运行 50 次。使用公差为 2 的均方根偏差将对接构象聚类,并根据结合自由能评估最终对接结构^[19]。

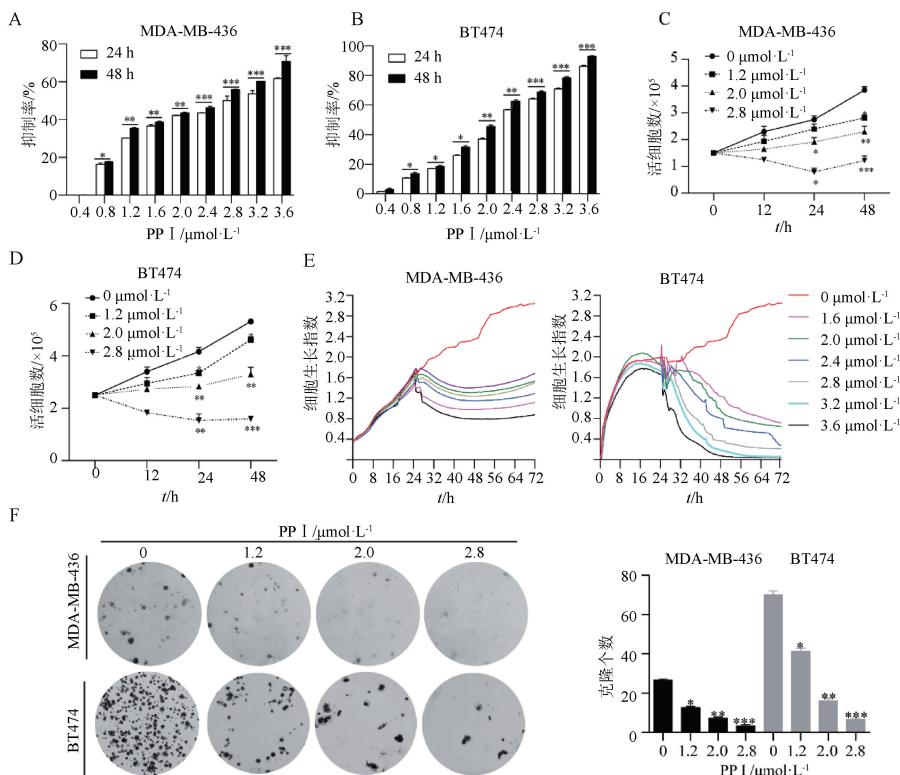
2.9 靶点稳定性的药物亲和反应实验 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 收集细胞,加适量细胞裂解液裂解,提取总蛋白。用不同浓度的 PP I 处理总蛋白,4 ℃ 下与蛋白酶孵育 30 min,用 Western blot 检测各组别蛋白的水解程度。

2.10 统计分析 使用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 8、ImageJ 软件进行统计学分析、作图和灰度分析。

所有实验均独立重复 3 次,数据结果用平均数±标准差表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PP I 显著抑制乳腺癌 MDA-MB-436、BT474 细胞的增殖 通过 MTT 检测 PP I 对 MDA-MB-436 和 BT474 细胞增殖的影响,发现 PP I 处理 24、48 h 后,2 种细胞的抑制率均显著增加,呈一定的剂量和时间依赖性(图 1A、1B),PP I 处理 MDA-MB-436 和 BT474 的 24 h IC_{50} 分别为 2.92、2.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。台盼蓝染色细胞计数实验发现,PP I 在 1.2~2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时对 MDA-MB-436 和 BT474 细胞的增殖均有显著的抑制作用(图 1C、1D)。



与空白组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图 2~4 同); A. MTT 法检测 PP I 对 MDA-MB-436 细胞的增殖抑制作用; B. MTT 法检测 PP I 对 BT474 细胞的增殖抑制作用; C. 台盼蓝染色计数检测 PP I 对 MDA-MB-436 细胞的细胞活性作用; D. 台盼蓝染色计数检测 PP I 对 BT474 细胞的细胞活性作用; E. RTCA 监测 PP I 对 MDA-MB-436 和 BT474 细胞生长的影响; F. 平板克隆形成实验检测 PP I 对 MDA-MB-436、BT474 细胞的克隆形成能力的抑制作用。

图 1 不同浓度 PP I 对 MDA-MB-436、BT474 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

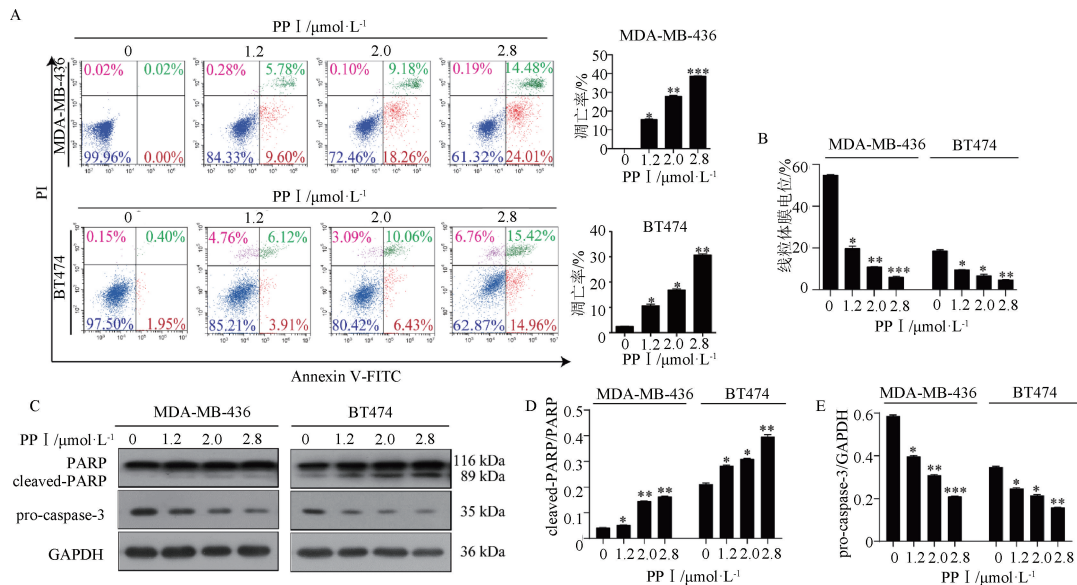
Fig. 1 Effects of different concentrations of polyphyllin I on the proliferation of MDA-MB-436 and BT474 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

采用 RTCA 系统实时监测 PP I 对 MDA-MB-436 和 BT474 细胞生长的影响,结果显示(图 1E),细胞生长指数随药物浓度的增加呈下降趋势。与空

白组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,PP I 在 1.6~3.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时对 MDA-MB-436 和 BT474 细胞的生长均有明显抑制作用。

克隆形成实验结果(图 1F)显示,与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,各浓度(1.2 、 2.0 、 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 PP I 处理 24 h 后 MDA-MB-436 克隆数和 BT474 的克隆数均明显减少,差异有统计学意义。总之,PP I 对乳腺癌 MDA-MB-436、BT474 细胞的增殖具有显著的抑制作用。

3.2 PP I 通过线粒体途径激活 caspase 介导的乳腺癌细胞凋亡 Annexin V-FITC/PI 双染法检测结果(图 2A)表明,与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,各浓度(1.2 、 2.0 、 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)PP I 处理的 MDA-MB-436 细胞凋亡率和 BT474 细胞凋亡率均明显增加,差异有统计学意义。



A. 用 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡;B. 用 JC-1 流式检测线粒体膜电位;C. Western blot 检测相关蛋白的表达情况;D. 灰度分析 cleaved-PARP/PARP 蛋白表达; E. 灰度分析 pro-caspase-3 蛋白表达。

图 2 PP I 通过线粒体途径激活 caspase 介导的乳腺癌细胞凋亡($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 PP I activates caspase-mediated apoptosis of breast cancer cells through the mitochondrial pathway($\bar{x}\pm s, n=3$)

进一步,线粒体膜电位检测结果(图 2B)表明,各浓度(0 、 1.2 、 2.0 、 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) PP I 处理的 MDA-MB-436 细胞线粒体膜电位分别为 $54.8\% \pm 0.1\%$ 、 $19.7\% \pm 0.3\%$ 、 $10.8\% \pm 0.1\%$ 和 $5.9\% \pm 0.2\%$,BT474 细胞线粒体膜电位分别为 $18.5\% \pm 0.2\%$ 、 $9.4\% \pm 0.1\%$ 、 $6.6\% \pm 0.3\%$ 和 $4.6\% \pm 0.1\%$;与空白组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,各浓度(1.2 、 2.0 、 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)PP I 处理的 MDA-MB-436 细胞和 BT474 细胞的线粒体膜电位均明显降低,差异有统计学意义。

Western blot 检测经不同浓度 PP I 作用细胞 24 h 后,细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、PARP 的表达水平变化(图 2C、2D、2E)。结果显示,随着 PP I 浓度的增加,PARP 切割带增加,caspase-3 前体 (pro-caspase-3) 的表达下调。以上结果表明 PP I 能够通过线粒体途径激活 caspase 介导的乳腺癌细胞凋亡。

3.3 PP I 抑制乳腺癌细胞中 EGFR 及其下游信号分子的磷酸化水平 用不同浓度的 PP I 处理 MDA-MB-436、BT474 细胞 24 h 后,Western blot 检测细胞中 EGFR 蛋白的表达水平。结果显示(图 3A),PP I 处理后 MDA-MB-436、BT474 细胞中 EGFR 磷酸化(pEGFR)水平明显降低,但总 EGFR 总蛋白的表达量并没有改变,表明 PP I 可以抑制 EGFR 的活化。Akt、ERK 是 EGFR 的下游级联信号分子。进一步检测了 PP I 对 Akt、ERK 蛋白的表达的变化。结果表明,PP I 处理后 MDA-MB-436、BT474 细胞中 Akt、ERK 总蛋白的表达量并没有改变,但 p-Akt、p-ERK 的水平明显降低(图 3B)。以上结果表明 PP I 可以抑制 EGFR 的活化进而降低下游信号 Akt、ERK 的磷酸化水平。

3.4 PP I 与 EGFR 存在直接结合作用 分子对接模拟 PP I 与 EGFR 的结合,在对接结果中选择能

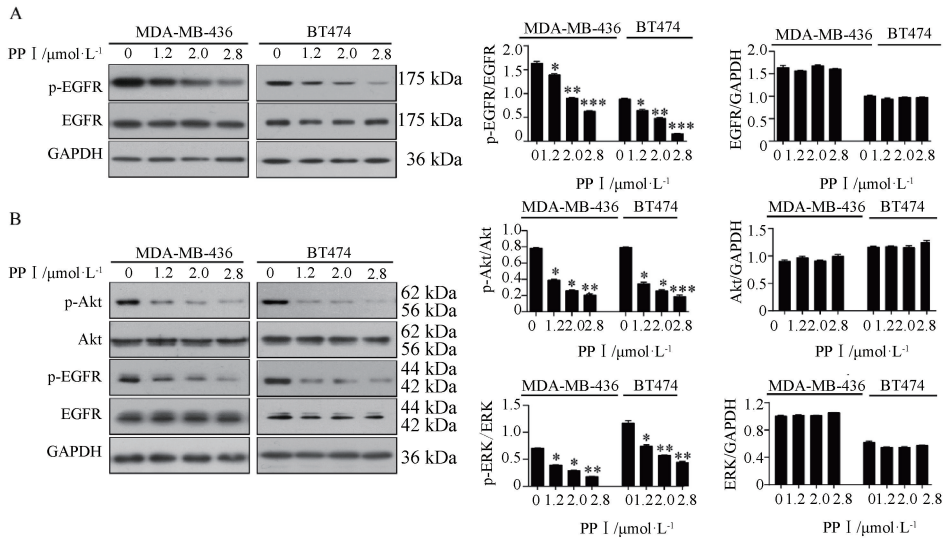
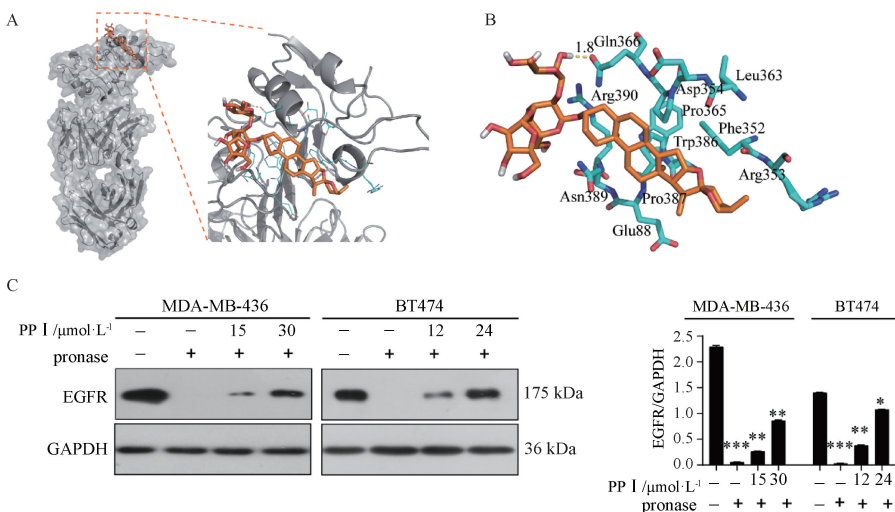


图3 PP I抑制乳腺癌细胞中EGFR(A)及下游信号AKT,ERK(B)的磷酸化水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 PP I inhibits phosphorylation of EGFR (A) and the downstream AKT and ERK (B) in MDA-MB-436 and BT474 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

量最优构象(图4A)。PP I主要通过疏水、范德华力进入EGFR的胞外配体结合区域,主要与Phe352、Arg353、Leu356、Asp364、Pro365、Gln366、Trp386、Pro387、Glu388、Asn389等氨基酸残基产生相互作用,结合能量为 $-5.98 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (图4B)。另外,PP I的氢原子能够与Gln366氨基酸残基上

的氧原子形成氢键,氢键键长为 1.8 \AA 。氢键的形成促进了PP I与EGFR结合的稳定性。进一步,基于靶点稳定性的药物亲和实验(DARTS)显示PP I显著阻止了蛋白酶pronase对EGFR的水解作用(图4C),表明PP I与EGFR存在直接结合作用。



A. PP I与EGFR的对接模式(EGFR为灰色,PP I为金色);B. PP I与EGFR结合的氨基酸残基位点;C. 基于靶点稳定性的药物亲和实验检测PP I与EGFR的结合作用;与空白组(不加PP I和酶)比较 $*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$;

图4 PP I直接结合EGFR($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Molecular docking showed that PP I directly bound to EGFR and inhibited its activity($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

研究表明,PP I 在神经胶质瘤^[19]、前列腺癌^[22]、黑色素瘤^[23]、膀胱癌^[24]、肺癌^[26]等多种肿瘤类型中通过 JAK/STAT、CIP2A/PP2A/ERK、PI3K/Akt/mTOR、FoxO3 等多种信号通路来抑制肿瘤细胞的生长、克隆形成及迁移,促进细胞凋亡及自噬等作用。本研究初步探讨了 PP I 通过靶向 EGFR 而抑制乳腺癌的作用机制。

通过线粒体途径诱导细胞发生凋亡已成为治疗癌症的的路径之一^[29]。已有研究表明,PP I 能诱导多种肿瘤细胞的凋亡,如 PP I 能通过降低线粒体膜电位诱导人神经胶质瘤 U251 细胞发生剂量依赖性细胞凋亡^[19];LONG J^[23] 研究表明,PP I 通过线粒体途径,上调 Bax、cleaved-caspase-3 水平和下调 Bcl-2 水平促进黑色素瘤细胞 A375 细胞凋亡;LI J^[24] 等研究发现,PP I 能显著提高膀胱癌 T24 和 UMUC3 细胞中 cleaved-caspase-3 的表达水平,降低了细胞线粒体膜电位,促使细胞发生凋亡。本研究通过用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术、JC-1 法和蛋白免疫印迹法对乳腺癌细胞凋亡和线粒体膜电位进行检测证明,经 PP I 处理后,细胞凋亡率随剂量增加而增加,线粒体膜电位显著降低。细胞凋亡分 3 种途径:外部途径、内部途径、内质网途径。外部途径,即通过细胞表面死亡受体的活化 caspase-8 途径;内在途径,即线粒体途径,BH3-only 家族促凋亡蛋白(BIM、BAD 等)能通过结合拮抗 Bcl-2 家族成员的抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1),引起促凋亡蛋白 Bax、Bak 的活化,进而引起细胞中线粒体膜电位的降低,最终产生细胞色素 c 的释放、caspase-9 级联反应^[30]。caspase 家族在凋亡过程中起重要作用,caspase-3 是 caspase 途径细胞凋亡的执行人。当其被外部凋亡途径的 caspase-8 或内部凋亡途径的 caspase-9 切割后,发生活化。活化的 caspase-3(cleaved-caspase-3)进一步切割底物 PARP,最终导致细胞凋亡^[29]。本研究发现 PP I 通过线粒体途径激活 caspase-3 诱导乳腺癌细胞发生凋亡。

EGFR 及其家族其他成员是多种肿瘤靶向治疗的关键靶点^[31]。本研究发现 PP I 可以显著下调乳腺癌细胞中 EGFR 的磷酸化(图 3A)。Akt 和 ERK 是 EGFR 的下游关键信号分子,其组成性活化在肿瘤细胞细胞周期、增殖、生存、衰老和代谢等生物学

过程中起着重要的调节作用^[32]。Akt 和 ERK 亦是肿瘤治疗的关键靶信号^[32-34]。LI G B 等^[29] 研究发现,吉非替尼在非小细胞肺癌中能阻断 EGFR-MEK-ERK 和 EGFR-PI3K-Akt 通路,分别通过抑制 ERK 的磷酸化来增强 BH3-only 家族中 BIM 的活性和通过抑制 Akt 的磷酸化来增加 BAD 的促凋亡活性,进而激活促凋亡蛋白 BAX,引起线粒体途径的细胞凋亡。SARKAR S 等^[35] 研究发现,ZD6474 能通过下调 cyclin D1 和 cyclin e 的表达,抑制 G₀~G₁ 期细胞的增殖,抑制生长因子诱导的 EGFR、VEGFR-2、MAPK 和 Akt 的磷酸化,ZD6474 还下调 Bcl-2 等抗凋亡标志物,上调凋亡过程中促凋亡蛋白 Bax 表达及 caspase-3 激活和 poly(ADP-核糖)聚合酶诱导的促凋亡信号事件。笔者进一步探究 PP I 对 Akt、ERK 活性的影响,发现 PP I 能降低乳腺癌细胞中 Akt、ERK 的磷酸化水平(图 3B)。这表明 PP I 可能作为 EGFR 的一种靶向抑制剂,通过下调 EGFR 的活性,进而抑制其下游 Akt、ERK 的磷酸化,经线粒体途径引起细胞凋亡。

近年来,通过计算模拟小分子药物配体与蛋白受体靶点对接和来研究药物与蛋白或聚合物的作用已逐渐得到应用^[36-38]。配体与受体相互作用是分子间通过氢键、疏水、范德华、静电作用等相互识别的过程。通过计算,可以预测两者间的结合模式和亲和力^[27]。分子对接模拟常作为靶向药物设计和挑选候选化合物的重要参考依据^[39]。本研究通过分子对接模拟发现 PP I 与 EGFR 蛋白胞外区的配体结合结构域的第Ⅲ亚结构域中多个氨基酸残基发生相互作用,尤其是能够与 Gln366 残基形成稳定结合的氢键。该结合增强了 PP I 靶向 EGFR 的能力。胞外配体结合结构域的第Ⅰ和Ⅲ个亚结构域是配体结合的关键区域^[40]。PP I 与Ⅲ亚结构域的结合可能阻遏了配体 EGF 对 EGFR 的结合作用,进而阻遏其Ⅱ亚结构域的二聚化作用,以及后续的自体磷酸化激活作用。Tyr1068 是 EGFR 自体磷酸化的关键位点,其活性的下降表明 PP I 可能通过结构的结合而抑制 EGFR 的活化。DARTS 实验可以检测小分子蛋白靶点,用于验证已知的小分子与蛋白质的相互作用,药物与靶蛋白结合后,能保护靶蛋白不被蛋白酶水解,进而维护靶蛋白的活性和功能。通过该技术说明 PP I 能稳定 EGFR 免受蛋白酶的水解,证明 PP I 能与 EGFR 直接结合。

在乳腺癌治疗中,EGFR 是否是 PP I 的唯一靶点。经文献调研,LI G B^[29] 等研究表明,PP I 通过调节 PINK1 诱导乳腺癌细胞凋亡并抑制 MDA-MB-231 异种移植瘤的肿瘤生长,PINK1 可能是 PP I 治疗乳腺癌的一个重要靶点。柴冬亚^[41] 研究 PP I 逆转 MCF-7/ADM 细胞耐药的机制,发现 PP I 能下调 P-gp 蛋白、抑制 JNK、ERK 信号通路、降低耐药细胞的膜流动性,PP I 与 ADM 联合,能诱导 MCF-7/ADM 凋亡。王一乔^[42] 研究表明 PP I 能通过 IK-BKE/NF- κ B 通路,抑制乳腺癌 4T1 细胞生长和转移,阻断细胞周期,抑制 IKBKE、Akt、NF- κ B 的表达,诱导细胞凋亡。另外,EGFR 是肺癌的靶向治疗的重要靶点,本课题组在 PP I 对肺癌的研究中发现,PP I 能直接与 NSCLC 细胞中 AMPK 的 ADaM 位点结合并激活 AMPK,通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导自噬并抑制癌细胞生长^[43]。综上,PP I 作为一种中草药来源的甾体皂苷,在乳腺癌的治疗中可能在多个通路和多个作用靶点发挥抗癌作用。

总之,本研究表明 PP I 通过直接靶向抑制 EGFR,阻断其下游信号通路而在乳腺癌中存在治疗作用。本研究可为 PP I 作为治疗乳腺癌的靶向药物研究及应用提供临床前研究基础。

[参考文献]

[1] THORAT M A, BALASUBRAMANIAN R. Breast cancer prevention in high-risk women[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020, 65:18.

[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.

[3] STONE J K, KIM J H, VUKADIN L, et al. Hypoxia induces cancer cell specific chromatin interactions and increases MALAT1 expression in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2019, 11(11):294.

[4] 雷婷, 肖斌, 何咏茵, 等. 锌指蛋白 ZNF652 在乳腺癌组织和细胞中的高表达可促进乳腺癌的发生发展[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(12):1732.

[5] PAPANASTASIOU A D, SIRINIAN C, PLAKOULA E, et al. RANK and EGFR in invasive breast carcinoma [J]. Cancer Genet, 2017, 216/217:61.

[6] SINGH D, ATTRI B K, GILL R K, et al. Review on EGFR inhibitors: critical updates[J]. Mini Rev Med Chem, 2016, 16(14):1134.

[7] SIGISMUND S, AVANZATO D, LANZETTI L. Emerging functions of the EGFR in cancer[J]. Mol Oncol, 2018, 12(1):3.

[8] SHENG W, GONG J, JIANG M, et al. The recombinant EGFR/

CD13 bi-targeted fusion protein induces apoptosis and blocks tube formation[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6):3507.

[9] CORTEZ A J, TUDREJ P, KUJAWA K A, et al. Advances in ovarian cancer therapy [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 81(1):17.

[10] SABBAAH D A, HAJJO R, SWEIDAN K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors [J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(10):815.

[11] 郭伟春. 西妥昔单抗联合 NK 细胞对乳腺癌细胞体外杀伤作用的实验研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学, 2020.

[12] YANG Y, GUO R, TIAN X, et al. Synergistic anti-tumor activity of Nimotuzumab in combination with trastuzumab in HER2-positive breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 489(4):523.

[13] DORJSUREN B, CHAURASIYA B, YE Z, et al. Cetuximab-coated thermo-sensitive liposomes loaded with magnetic nanoparticles and doxorubicin for targeted EGFR-expressing breast cancer combined therapy[J]. Int J Nanomed, 2020, 15:8201.

[14] VOIGTLAENDER M, SCHNEIDER M T, TREPEL M. Lapatinib[J]. Recent Results Cancer Res, 2018, 211:19.

[15] 盛英文, 徐冰. 乳腺癌的分子靶向治疗[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(23):3905.

[16] BRAND T M, IIDA M, WHEELER D L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(9):777.

[17] LIANG Y, ZHANG H, SONG X, et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: molecular mechanism and potential therapeutic targets[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60:14.

[18] 贾天颖, 张晓南, 苏钰, 等. 重楼质量研究及对《中国药典》重楼药材标准规定的思考[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10):2425.

[19] 刘雪文, 杨锐, 赵红艳, 等. 重楼皂苷 I 直接靶向 STAT3 抑制神经胶质瘤 U251 细胞增殖并诱导凋亡[J]. 肿瘤, 2020, 40(3):163.

[20] 李春江. 重楼皂苷抗乳腺癌及免疫调节作用研究[D]. 长春:东北师范大学, 2011.

[21] 司渊, 王纠, 张亮, 等. 三种七叶一枝花活性成分抗新型冠状病毒的分子对接预测[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7):1099.

[22] 向雨晨, 杨锐, 周彤, 等. 重楼皂苷 I 通过下调 CIP2A/PP2A/ERK 信号通路抑制前列腺癌转移的机制研究[J]. 湖北医药学院学报, 2019, 38(3):201.

[23] LONG J, PI X. Polyphyllin I promoted melanoma cells autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:5149417.

[24] LI J, MA W, CHENG X, et al. Activation of FoxO3 pathway is involved in polyphyllin I-induced apoptosis and cell cycle arrest in human bladder cancer cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 687:108363.

- [25] TIAN Y, GONG G Y, MA L L, et al. Anti-cancer effects of polyphyllin I: an update in 5 years[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 316:108936.
- [26] YANG Q, CHEN W Y, XU Y F, et al. Polyphyllin I modulates MALAT1/STAT3 signaling to induce apoptosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 356:1.
- [27] 彭鹏, 金鑫, 申杰, 等. 重楼皂苷 I 通过激活 AMPK 信号通路诱导非小细胞肺癌自噬的作用机制[J]. *湖北医药学院学报*, 2021, 40(1):1.
- [28] 胡伟彦, 李菊, 贺智勇, 等. 重楼皂苷 I 对人乳腺癌细胞 MCF-7 体内外生长的抑制作用[J]. *中成药*, 2015, 37(7):1582.
- [29] LI G B, FU R Q, SHEN H M, et al. Polyphyllin I induces mitophagic and apoptotic cell death in human breast cancer cells by increasing mitochondrial PINK1 levels[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6):10359.
- [30] CRAGG M S, KURODA J, PUTHALAKATH H, et al. Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(10):1681.
- [31] CHONG C R, JÄNNE P A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1389.
- [32] HE Q, XUE S, TAN Y, et al. Dual inhibition of AKT and ERK signaling induces cell senescence in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 448:94.
- [33] SONG M, BODE A M, DONG Z, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6):1019.
- [34] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3):1997.
- [35] SARKAR S, MAZUMDAR A, DASH R, et al. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3K and induces apoptosis in breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(8):592.
- [36] 谭小芹. 基于虚拟筛选和深度生成模型的药物发现与优化研究[D]. 上海:中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2021.
- [37] 周昊言, 孙若岚, 季千惠, 等. 基于网络药理-分子对接解析川芎-赤芍药对干预脑缺血的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(12):3007.
- [38] 林传燕, 李陈子, 李畅, 等. 基于分子对接技术的三七抗心肌缺血活性组分筛选[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11):2560.
- [39] 艾观华, 顾月清. 采用基于结构的药效团模型和分子对接方法用于发现新的表皮生长因子受体抑制剂[J]. *药物生物技术*, 2014, 21(2):126.
- [40] MITCHELL R A, LUWOR R B, BURGESS A W. Epidermal growth factor receptor: structure-function informing the design of anticancer therapeutics[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1):1.
- [41] 柴冬亚. 重楼皂苷 I 逆转人乳腺癌细胞耐药的作用及机制研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2019.
- [42] 王一乔. 基于 IKBKE/NF- κ B 通路探讨重楼皂苷 I 抗小鼠乳腺癌的作用机制[D]. 恩施:湖北民族大学, 2020.
- [43] WU Y, SI Y, XIANG Y, et al. Polyphyllin I activates AMPK to suppress the growth of non-small-cell lung cancer via induction of autophagy[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 687:108285.

[责任编辑 陈玲]