蛇床子素联合肿瘤坏死因子诱导凋亡配体对乳腺癌干细胞的杀伤效应

王倩,郑海雅,周颖,钟益芳(丽水市人民医院,浙江丽水 323000)

摘要:目的 探讨蛇床子素联合肿瘤坏死因子诱导凋亡配体[tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand, TRAIL]对乳腺癌干细胞的杀伤效应及机制。方法 用 TRAIL 及蛇床子素体外处理 MCF-7 乳腺癌非干细胞及 MCF-7 乳腺 癌干细胞, MTT 法检测乳腺癌细胞的细胞活力; 流式细胞术检测乳腺癌细胞的凋亡; Western blot 试验检测 caspase-9 和 caspase-3 的活化,凋亡酶激活因子(apoptotic protease activating facter-1, Apaf-1)的表达水平,细胞色素 C 的释放;免疫 共沉淀法检测 Apaf-1 和 caspase-9 前体的相互作用。结果 MCF-7 肿瘤干细胞对 TRAIL 的敏感性显著低于 MCF-7 非干 细胞。在 MCF-7 肿瘤干细胞的培养体系中加入蛇床子素能显著提高 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞的细胞活力抑制率。 Western blot 实验结果表明,蛇床子素能显著上调 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 的表达水平,但不影响细胞色素 C 的释放。 在 MCF-7 肿瘤干细胞中转染 Apaf-1 siRNA 后,蛇床子素联合 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞的协同杀伤活性受到显著抑制。 另外,免疫共沉淀实验结果表明,蛇床子素联合 TRAIL 能显著诱导 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 与 caspase-9 前体的相互 作用,并使之发生活化。结论 蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 TRAIL 对乳腺癌干细胞 caspase-9 的活化,从而增 强 TRAIL 对乳腺癌干细胞的凋亡诱导效应。

关键词:蛇床子素;肿瘤坏死因子诱导凋亡配体;乳腺癌干细胞; Apaf-1; caspase-9; 凋亡 中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)02-0225-07 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.016

Anti-tumor Effect of Osthol Combined with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand on Breast Cancer Stem Cells

WANG Qian, ZHENG Haiya, ZHOU Ying, ZHONG Yifang(People's Hospital of Lishui City, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the synergistic effect and mechanism of osthole and tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer stem cells. **METHODS** After treatment of osthole and TRAIL in the MCF-7 cancer stem cells (MCF-7-CSCs) as well as the MCF-7-non-cancer stem cells (MCF-7-non-CSCs), MTT assay was performed to detect the cell viability; flow cytometry analysis was performed to measure the cell apoptosis; Western blot analysis was performed to evaluate the activation of caspase-9 and caspase-3, expression of Apaf-1, and release of cytochrome C; co-immunoprecipitation was performed to detect the interaction with Apaf-1 and pro-caspase-9, respectively. **RESULTS** The sensitivity of MCF-7-CSCs to TRAIL was significantly lower than the MCF-7-non-CSCs. Addition of osthole significantly increased the inhibitory rate of MCF-7-CSCs treated with TRAIL. The results of Western blot indicated that the treatment of osthole could significantly upregulate the expression of Apaf-1 without changing the release of cytochrome C. Transfection with Apaf-1 siRNA abolished the synergistic effect of osthole and TRAIL in MCF-7-CSCs. In addition, the results of co-immunoprecipitation indicated that the combination of osthole and TRAIL significantly induced the interaction with Apaf-1 and pro-caspase-9, which led to the activation of caspase-9 in MCF-7-CSCs. **CONCLUSION** Osthole promotes the TRAIL-induced activation of caspase-9 and apoptosis by upregulating the expression of Apaf-1 in the breast cancer stem cells. **KEY WORDS:** osthole; tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL); breast cancer stem cells; Apaf-1; caspase-9; apoptosis

有报道表明,乳腺癌是女性群体中发病率和 致死率最高的恶性肿瘤,是严重危害女性健康的 世界性难题^[1]。尽管对于乳腺癌的研究已经取得了 一些进展,肿瘤的发生及转移的内在分子机制正 逐步被揭示,关于乳腺癌对药物治疗的耐药性及 分子机制目前仍不十分清楚^[2]。近期的研究表明, 癌症可以被认为是一种干细胞失调性疾病,肿瘤 可能是由一种具有"干细胞样"的恶性细胞增殖 形成的,这种具有高度自我更新能力的肿瘤细胞 被称为"肿瘤干细胞"^[3-4]。肿瘤坏死因子诱导凋 亡配体[tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand, TRAIL]是一种属于 TNF 超家族的 细胞因子^[5],它能选择性诱导肿瘤细胞发生凋亡, 却不影响正常组织细胞的功能,因此 TRAIL 是一

E-mail: lishuiwangqian@163.com

作者简介:王倩,女,硕士,主管技师 Tel: 18957092550

种有良好前景的新型低毒肿瘤治疗药物^[6-7]。然而, 一些肿瘤细胞(特别是肿瘤干细胞)对 TRAIL 的治 疗不敏感,并且分子机制也不十分清楚^[8]。因此, 研究肿瘤干细胞如何产生对 TRAIL 抵抗的分子机 制并采取辅助治疗手段提高肿瘤干细胞对 TRAIL 的敏感性有十分重要的意义。

1 材料

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系 MCF-7 购于美国 ATCC。 CD24-FITC 和 CD44-PE 荧光抗体用于 MCF-7 肿 瘤干细胞的分选,简要步骤如下:将 MCF-7 细胞 系用 CD24-FITC 和 CD44-PE 荧光抗体在暗处冰上 孵育 40 min,之后用生理盐水将细胞洗涤 3 遍后, 用流式细胞仪进行细胞分选,CD44 阳性且 CD24 阴性的 MCF-7 细胞即为 MCF-7 乳腺癌干细胞,剩 余细胞则为 MCF-7 非干细胞^[9]。MCF-7 肿瘤干细 胞及 MCF-7 非干细胞均培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 ℃恒温培养箱中培养, 通入 5% CO₂。

1.2 试剂与仪器

噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide, MTT, 货号: M2128)、 蛇床子素(osthole, 批号: O9265)、Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(批号: APOAF)均购于美国 Sigma-Aldrich; TRAIL(美国 R&D Systems); CD24-FITC 和 CD44-PE 荧光抗体均购于美国 BD 公司; DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco; 细胞蛋白提取液、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、caspase-9 前体(pro-caspase-9)、调亡酶 激活因子 (apoptotic protease activating facter-1, Apaf-1)、细胞色素 C 和 β-actin 抗人抗体均购于美 国 Cell Signaling; 蛋白 G 免疫共沉淀琼脂糖珠(美 国 Santa Cruz); Apaf-1 siRNA 购于上海吉玛生物, 序列正向: 5'-UGCUCUACUACAUGAAGGA UU-3',反向: 5'-UCCUUCAUGUAGUAGAGCA UU-3'; Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen); ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 32106)。

TECAN Sunrise Microplate Reader 酶标仪(瑞 士 TECAN 公司); BD FACSAria II 流式细胞分选 仪(美国 BD Biosciences 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 Apaf-1 基因沉默

为了抑制 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 的蛋白 表达,作者设计了 Apaf-1 siRNA。将 MCF-7 肿瘤 干细胞接种在培养板上,孵育过夜后将 Apaf-1 siRNA(终浓度为 50 pmol·mL⁻¹)用 Lipofectamine 2000 转染入肿瘤细胞中,培养 24 h。

2.2 线粒体分离

为了检测 MCF-7 肿瘤干细胞中细胞色素 C 的 释放,按文献所述方法使用 0.015%地高辛蔗糖溶 液分离 MCF-7 肿瘤干细胞中的细胞质,用 Western blot 方法检测从线粒体释放到细胞质中的细胞色 素 C^[10]。

2.3 细胞活力检测

将 MCF-7 肿瘤干细胞或 MCF-7 非干细胞按每 孔 5×10³ 接种在 96 孔板上, 孵育过夜使细胞完全 贴壁。将 Apaf-1 siRNA(终浓度为 50 pmol·mL⁻¹) 用 0.5 µL 的 Lipofectamine 2000 进行转染并用 100 µL 无血清培养基孵育 6 h, 之后将无血清培养 基更换为 100 µL 有血清 DMEM 继续培养 24 h。 然后按实验设计将蛇床子素(终浓度为 20 µmol·L⁻¹)及TRAIL(终浓度为5 ng·mL⁻¹)加入到 培养体系中,培养 48 h。之后加入 20 µL MTT (5 mg·mL⁻¹)培养 4 h,移除孔内培养基,加入 100 µL 二甲亚砜, 570 nm 波长下测定 OD 值。相 对细胞活力结果用实验组与对照组的 OD 值比值 表示。TRAIL 的半数有效浓度(IC50)根据细胞活力 曲线进行计算。实验分为对照组、蛇床子素组、 TRAIL 组、蛇床子素+TRAIL 组、蛇床子素 +TRAIL+Apaf-1 siRNA 组,每组3个复孔。

2.4 细胞凋亡试验

将 MCF-7 肿瘤干细胞或 MCF-7 非干细胞按每 孔 5×10⁵ 接种在 6 孔板上, 孵育过夜使细胞完全 贴壁。将 TRAIL(终浓度为 5 ng·mL⁻¹)加入到培养 体系中,培养 48 h。之后将细胞用生理盐水洗涤 2 次,按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI(碘化丙啶) 和 Annexin-V 加入细胞中孵育 20 min,采用流式 细胞术检测肿瘤细胞的凋亡。实验分为对照组及 TRAIL 治疗组,每组采用 3 个复孔。

2.5 Western blot 试验

将 MCF-7 肿瘤干细胞或 MCF-7 非干细胞按每

孔 5×10⁵ 接种在 6 孔板上, 孵育过夜使细胞完全 贴壁。将 Apaf-1 siRNA(终浓度为 50 pmol·mL⁻¹) 用 0.5 µL 的 Lipofectamine 2000 进行转染并用 100 µL 无血清培养基孵育 6 h, 之后将无血清培养 基更换为 100 µL 有血清 DMEM 继续培养 24 h。 然 后 按 实 验 设 计 将 蛇 床 子 素 (终 浓 度 为 20 µmol·mL⁻¹)及 TRAIL(终浓度为 5 ng·mL⁻¹)加入 到培养体系中,培养 48 h。之后将细胞用蛋白提 取液进行裂解,裂解后的样品用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完毕后通过电转方法将蛋白 质从分离胶上转到 PVDF 膜上,用 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、caspase-9 前体、 Apaf-1、细胞色素 C 和 β -actin 抗体孵育过夜, 之 后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条 带用 ECL 试剂盒显色发光。目的蛋白的相对表达 用目标蛋白灰度值与β-actin 灰度值的比值表示, 蛋白灰度值分析用 Image J 软件处理。实验分为对 照组、蛇床子素组、TRAIL 组、蛇床子素+TRAIL 组、蛇床子素+TRAIL+Apaf-1 siRNA 组,每组采 用3个复孔。

2.6 免疫共沉淀

将 MCF-7 肿瘤干细胞按每孔 5×10⁵ 接种在 6 孔板上, 孵育过夜使细胞完全贴壁。将 Apaf-1 siRNA(终浓度为 50 pmol·mL⁻¹)用 0.5 µL 的 Lipofectamine 2000进行转染并用 100 µL 无血清培 养基孵育6h,之后将无血清培养基更换为100 µL 有血清 DMEM 继续培养 24 h。然后按照实验设计 将蛇床子素(终浓度为 20 µmol·mL⁻¹)及 TRAIL(终 浓度为 5 ng·mL⁻¹)加入到培养体系中,培养 48 h。 之后裂解细胞并将细胞在 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收取上清液分成等量 2 份, 一份直接进行 Western blot 试验检测 β-actin 的表达作为对照,另 外一份加入 Apaf-1 抗体孵育过夜。Apaf-1 抗体孵 育完毕后加入蛋白 G 琼脂糖珠孵育 2 h。经过 2 h 免疫沉淀反应后进行 Western blot 试验,检测与 Apaf-1 结合的 pro-caspase-9 蛋白。结合 pro-caspase-9 蛋白的相对表达用目标蛋白灰度值 与β-actin 灰度值的比值表示。实验分为对照组、 蛇床子素组、TRAIL 组、蛇床子素+TRAIL 组、蛇 床子素+TRAIL+Apaf-1 siRNA 组,每组3个复孔。

2.7 统计学方法

实验重复3次,实验数据用 x ± s 表示,并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理, P 值计算采用 非配对双边 t 检验进行分析, P<0.05 认为有显著 性差异。

3 结果

3.1 MCF-7 肿瘤干细胞对 TRAIL 的敏感性显著 低于 MCF-7 非干细胞

MTT 细胞活力试验显示, TRAIL(0~20 ng·mL⁻¹)对 MCF-7 肿瘤干细胞的杀伤活性显著低于 MCF-7 非干细胞(P<0.05),同时 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞的 IC₅₀显著高于 MCF-7 非干细胞(P<0.05),表明乳腺癌干细胞对 TRAIL 有耐药性,结果见图 1。



图1 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞和非干细胞的杀伤活性 及 IC₅₀ 影响的比较(*n*=3, *x*±*s*) 与 MCF-7 非干细胞相比, ¹⁾*P*<0.05。

Fig. 1 Comparison of cytotoxic activity and IC₅₀ of TRAIL on MCF-7 tumor stem cells and non-stem cells(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with the MCF-7 non-stem cells, ¹⁾*P*<0.05.

流式细胞试验结果显示,在 TRAIL 处理下, MCF-7 肿瘤干细胞的凋亡率显著低于 MCF-7 非干 细胞(P<0.05), MCF-7 肿瘤干细胞 caspase-9 和 caspase-3 的活化程度显著低于 MCF-7 非干细胞 (P<0.05),结果见图 2。以上结果表明,乳腺癌干 细胞对 TRAIL 诱导的凋亡信号不敏感。

3.2 蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达提高 MCF-7 肿瘤干细胞对 TRAIL 的敏感性

MTT 细胞活力试验结果显示, TRAIL (5 ng·mL⁻¹)单独处理对 MCF-7 肿瘤干细胞的抑制 作用较弱,然而联合蛇床子素后,TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞的杀伤活性显著提高(*P*<0.05),表明蛇 床子素辅助治疗能提高乳腺癌干细胞对 TRAIL 的 敏感性,结果见图 3。



图 2 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞和非干细胞的细胞凋亡率、caspase-9 和 caspase-3 活化程度影响的比较(*n*=3, *x*±*s*) A-对细胞凋亡率的影响; B-对 caspase-9 和 caspase-3 活化程度的影响; 与 MCF-7 非干细胞对照组相比, ¹⁾P<0.05; 与 MCF-7 肿瘤干细胞对照组 相比, ²⁾P<0.05; 与 MCF-7 非干细胞 TRAIL 组相比, ³⁾P<0.05。

Fig. 2 Comparison of apoptotic rate and activation of caspase-9 and caspase-3 of TRAIL on MCF-7 tumor stem cells and non-stem cells $(n=3, \bar{x} \pm s)$

A–apoptotic rate; B–activation of caspase-9 and caspase-3; compared with the MCF-7 non-stem cells control group, ${}^{1)}P<0.05$; compared with the MCF-7 cancer stem cells group, ${}^{3)}P<0.05$.

Western blot 试验结果显示, MCF-7 肿瘤干细 胞中的 Apaf-1 蛋白表达水平明显低于 MCF-7 非干 细胞(*P*<0.05),提示乳腺癌干细胞可能通过 Apaf-1 途径抵抗 TRAIL 的抗肿瘤活性,结果见图 4。

蛇床子素能显著上调 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 的表达水平(P<0.05),提示蛇床子素在 MCF-7 肿瘤干细胞中对 TRAIL 的增效作用可能和 Apaf-1 的上调有关,结果见图 5。

进一步实验结果显示,在 MCF-7 肿瘤干细胞 中转染 Apaf-1 siRNA 沉默 Apaf-1 的表达后,蛇床 子素联合 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞的杀伤活性 受到显著抑制(P<0.05),证实了蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达提高 MCF-7 肿瘤干细胞对 TRAIL 的敏感性,结果见图 6。

3.3 蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 caspase-9 的活化

研究表明,只有在细胞色素 C 的存在下, caspase-9 前体才能通过与 Apaf-1 的结合而发生活 化^[11]。实验结果显示,TRAIL 能显著诱导细胞色 素 C 从线粒体中释放到细胞质中(*P*<0.05),而与蛇 床子素无关(图 7A)。另外,蛇床子素单独处理虽 能上调 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 的表达却不能 直接诱导 Apaf-1 与 caspase-9 的相互作用,而蛇床 子素联合 TRAIL 不仅能上调 MCF-7 肿瘤干细胞中 Apaf-1 的表达,同时也能诱导 Apaf-1 与 caspase-9 的相互作用(图 7B)。以上结果表明,TRAIL 通过 诱导细胞色素 C 的释放介导细胞的凋亡,而蛇床 子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 TRAIL 诱导的 Apaf-1 和 caspase-9 前体的相互作用。

Western blot 实验结果显示蛇床子素联合 TRAIL 能显著活化 caspase-9 及其下游效应分子 caspase-3。沉默 Apaf-1 的表达后,蛇床子素则不 能促进 TRAIL 对 caspase-9 的活化(图 7C),表明蛇 床子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 TRAIL 对 caspase-9 及其下游效应分子 caspase-3 的活化。



图 3 蛇床子素联合 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞杀伤活性的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

与对照组相比,¹⁾P<0.05;与TRAIL组相比,²⁾P<0.05。

Fig. 3 Effect of osthole combined with TRAIL on cytotoxicity of MCF-7 tumor stem cells(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with the control group, ¹⁾*P*<0.05; compared with the TRAIL group, ²⁾*P*<0.05.



图4 MCF-7 肿瘤干细胞和非干细胞的 Apaf-1 表达水平的 比较(*n*=3, *x*±*s*)

与 MCF-7 非干细胞相比, ¹⁾P<0.05。

Fig. 4 Comparison of expression of Apaf-1 on MCF-7 tumor stem cells and non-stem cells(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with the MCF-7 non-stem cells, ¹⁾P<0.05.



图 5 蛇床子素联合 TRAIL 对 MCF-7 肿瘤干细胞 Apaf-1 表达水平的影响(*n*=3, *x*±*s*)

与对照组相比, ¹⁾*P*<0.05; 与 TRAIL 组相比, ²⁾*P*<0.05. **Fig. 5** Effect of osthole combined with TRAIL on expression of MCF-7 tumor stem cells(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with the control group, ¹⁾*P*<0.05; compared with the TRAIL group, ²⁾*P*<0.05.



图 6 Apaf-1 siRNA 对蛇床子素联合 TRAIL 杀伤 MCF-7 肿瘤干细胞的抑制作用(n=3, $\overline{x} \pm s$)

与对照组相比,¹⁾P<0.05; 与蛇床子素+TRAIL 组相比,²⁾P<0.05。

Fig. 6 Inhibitory effect of the cytotoxicity of the co-treatment with TRAIL and osthole in the MCF-7 cancer stem cells(n=3, $\overline{x} \pm s$)

Compared with the control group, $^{1)}P\!\!<\!\!0.05;$ compared with the osthole +TRAIL group, $^{2)}P\!\!<\!\!0.05.$

中国现代应用药学 2017 年 2 月第 34 卷第 2 期



图 7 蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 caspase-9 的活化

A-TRAIL 诱导 MCF-7 肿瘤干细胞中细胞色素 C 的释放; B-蛇床子素通过上调 Apaf-1 的表达促进 TRAIL 诱导的 Apaf-1 和 pro-caspase-9 的相互 作用; C-蛇床子素联合 TRAIL 显著活化 MCF-7 肿瘤干细胞中的 caspase-9 及其下游效应分子 caspase-3;与对照组相比,¹⁾P<0.05;与蛇床子素+TRAIL 组相比,²⁾P<0.05。

Fig. 7 Osthole promoted the activation of caspase-9 through upregulating the expression of Apaf-1 A-TRAIL induced the release of cytochrome C in the MCF-7 cancer stem cells; B–Osthole promoted the TRAIL-induced interaction with Apaf-1 and pro-caspase-9 through upregulating the expression of Apaf-1 in the MCF-7 cancer stem cells; C–Co-treatment with osthole and TRAIL significantly triggered the caspase-9 and the downstream of caspase-3 in the MCF-7 cancer stem cells; Compared with the control group, ¹⁾P<0.05; compared with the osthole+TRAIL group, ²⁾P<0.05.

4 讨论

有文献指出,乳腺癌组织中肿瘤干细胞的存 在是造成药物抵抗的重要因素^[12],因此提高乳腺 癌干细胞对 TRAIL 治疗的敏感性可能是克服 TRAIL 抵抗的有效策略^[13]。在本研究中,实验结 果表明乳腺癌干细胞对 TRAIL 的敏感性显著低于 非干细胞,TRAIL 单独处理对乳腺癌干细胞的凋 亡诱导能力较弱,这些实验结果与文献报道一致。

蛇床子素是从中药蛇床子中提取的活性物 质,在现代中医治疗中有广泛的用途^[14]。近些年 来的研究发现,蛇床子素还具有一定的抗肿瘤作 用^[15],然而蛇床子素对乳腺癌干细胞的辅助治疗 作用至今还很少报道。在本研究中,实验结果表 明蛇床子素单独处理虽不能显著杀伤乳腺癌干细 胞,但却能显著提高 TRAIL 对乳腺癌干细胞的杀 伤能力,两者联合存在治疗乳腺癌干细胞的药物 协同效应。

研究表明,TRAIL 能诱导肿瘤细胞发生凋亡, 它主要通过激活 caspase-8/tBid 信号通路损伤肿瘤

细胞的线粒体膜电位, 使细胞色素 C 等凋亡诱导 因子释放到细胞质中,从而激活细胞的凋亡通路[16-17]。 在细胞色素 C 依赖的凋亡信号通路中,下游分子 caspase-9的活化至关重要,活化的 caspase-9 能直 接激活 caspase-3 这一效应分子,进而使肿瘤细胞 的 DNA 发生片段化,从而发生凋亡^[18-19]。研究表 明在细胞色素 C 活化 caspase-9 的过程中, Apaf-1 蛋白的参与至关重要。Apaf-1 是 1 个分子量为 130 kDa 的凋亡相关蛋白,有多个 caspase 结合位 点。细胞质中的 Apaf-1 在细胞色素 C 的活化下能 与 caspase-9 前体结合,从而激活 caspase-9 并诱导 细胞发生 caspases 依赖的凋亡^[20-21]。在本研究中, 实验结果表明蛇床子素增强 TRAIL 对乳腺癌干细 胞杀伤活性的机制和其能上调 Apaf-1 的表达有 关。TRAIL 能引起乳腺癌干细胞细胞色素 C 的释 放,而蛇床子素可能通过上调 Apaf-1 的表达增加 其与 caspase-9 的结合,从而增强 caspase-9 的活化 和凋亡,因此 TRAIL 和蛇床子素存在协同抗肿瘤 作用。

综上所述,本研究证明了蛇床子素能显著提高乳腺癌干细胞对 TRAIL 的敏感性。通过机制研究发现,蛇床子素能通过上调 Apaf-1 的表达使乳腺癌干细胞中的 caspase-9 在细胞色素 C 的作用下与 Apaf-1 结合而发生活化,进而使乳腺癌干细胞进入凋亡程序。这些研究为逆转 TRAIL 对乳腺癌的耐药性提供了新的思路和理论依据。

REFERENCES

- SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] ZANARDI E, BREGNI G, DI COSIMO S, et al. Better together: Targeted combination therapies in breast cancer [J]. Semin Oncol, 2015, 42(6): 887-895.
- [3] DE SOUSA E, MELO F, VERMEULEN L. Wnt signaling in cancer stem cell biology [J]. Cancers (Basel), 2016, 8(7): 60.
- [4] HONG M, TAN H Y, FENG Y, et al. Cancer stem cells: the potential targets of chinese medicines and their active compounds [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 893.
- [5] OSHI P, JEON Y J, CROCE C M, et al. MicroRNA-148a reduces tumorigenesis and increases TRAIL-induced apoptosis in NSCLC [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(28): 8650-8655.
- [6] HARI Y, HARASHIMA N, HARADA M, et al. Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL [J]. Oncotarget, 2015, 6(39): 41902-41915.
- [7] AMARANTE-MENDES G P, GRIFFITH T S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond [J]. Pharmacol Ther, 2015(155): 117-131.
- [8] RECIO-BOILES A, ILMER M, ALT E, et al. JNK pathway inhibition selectively primes pancreatic cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis without affecting the physiology of normal tissue resident stem cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9890-9906.
- [9] NANDY S B, ARUMUGAM A, LAKSHMANASWAMY R, et al. MicroRNA-125a influences breast cancer stem cells by targeting leukemia inhibitory factor receptor which regulates the Hippo signaling pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6(19): 17366-17378.
- [10] XU Y, CUI J H, DU Z J, et al. Antisensenucleic acids of miR-24 promoted the doxorubicin-induced apoptosis via BIM-Smac/DIABLO pathway in colon cancer [J]. Chin J Mod

Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 175-181.

- [11] MCSTAY G P, GREEN D R. Preparation of cytosolic extracts and activation of caspases by cytochrome C [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2014, 2014(7): 778-782.
- [12] YANG Z X, SUN Y H, JIANG G Q, et al. Increased activity of CHK enhances the radioresistance of MCF-7 breast cancer stem cells [J]. Oncol Lett, 2015, 10(6): 3443-3449.
- [13] PIGGOTT L, OMIDVAR N, CLARKSON R W, et al. Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent TRAIL [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(5): R88.
- [14] BALAYSSAC S, GILARD V, MALET-MARTINO M, et al. Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: first characterization of propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 63(7): 135-150.
- [15] LIN K, GAO Z, FU Q, et al. Osthole suppresses the proliferation and accelerates the apoptosis of human glioma cells via the upregulation of microRNA-16 and downregulation of MMP-9 [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4592-4597.
- [16] HAN M A, WOO S M, KWON T K, et al. 6-Shogaol enhances renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated cytochrome c release and down-regulation of c-FLIP(L) expression [J]. Chem Biol Interact, 2015(228): 69-78.
- [17] LI G, FU D, CHENG B, et al. CYC1 silencing sensitizes osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(6): 2070-2080.
- [18] WEN Q, ZHANG X, YANG P H, et al. A novel strategy for real-time and in situ detection of cytochrome C and caspase-9 in Hela cells during apoptosis [J]. Analyst, 2014, 139(10): 2499-2506.
- [19] LIU J, QIN CK, QIN C Y, et al. OSU-03012, a non-Cox inhibiting celecoxib derivative, induces apoptosis of human esophageal carcinoma cells through a p53/Bax/cytochrome c/caspase-9-dependent pathway [J]. Anticancer Drugs, 2013, 24(7): 690-698.
- [20] HU Q, WU D, SHI Y, et al. Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(46): 16254-16261.
- [21] SHANG J, YANG F, SUN S, et al. MicroRNA-23a antisense enhances 5-fluorouracil chemosensitivity through APAF-1/ caspase-9 apoptotic pathway in colorectal cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2014, 115(4): 772-784.

收稿日期: 2016-07-21