

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.32.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 32-0033-05

三溴丙酮酸对 MCF-7 细胞增殖、侵袭的影响及其机制研究*

李浩¹, 戴世龙¹, 赵宇², 许博文¹, 张青松¹

(1. 河北省开滦总医院 普外科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学 研究生学院, 河北唐山 063210)

摘要: 目的 探讨三溴丙酮酸 (3-BrPA) 对 MCF-7 细胞增殖、侵袭, 以及对真核转录起始因子 5A2 (eIF5A2)、c-myc 基因、转移相关蛋白 1 (MTA1) 表达的影响。**方法** 实验分为 5 组: 加入等量 PBS 的对照组, 75、100、125 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 3-BrPA 组。分别将 3-BrPA 作用于 MCF-7 细胞 24、48 和 72 h, 利用 MTT、Transwell 法检测 3-BrPA 对 MCF-7 细胞存活率和侵袭的影响。采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blot 检测 eIF5A2、c-myc、MTA1 基因和蛋白的变化。**结果** 与对照组比较, 3-BrPA 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后, 细胞存活率降低 ($P < 0.05$), 并且具有时间和剂量依赖性。Transwell 结果显示, 3-BrPA 作用于 MCF-7 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 穿过小室的细胞数减少 ($P < 0.05$)。RT-PCR 和 Western blot 检测结果提示, eIF5A2、c-myc、MTA1 基因和蛋白表达水平随着药物浓度的增加而降低 ($P < 0.05$)。**结论** 3-BrPA 可以抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖及侵袭, 其作用机制可能与降低 eIF5A2、c-myc、MTA1 基因和蛋白的表达有关。

关键词: 乳腺癌; 三溴丙酮酸; 肿瘤侵袭; 转移相关蛋白 1

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Effect of tribromopyruvic acid on proliferation and invasion of MCF-7 cells and its mechanism*

Hao Li¹, Shi-long Dai¹, Yu Zhao², Bo-wen Xu¹, Qing-song Zhang¹

(1. Department of General Surgery, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Postgraduate College, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of tribromopyruvic acid (3-BrPA) on the proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells and the expressions of eukaryotic initiation factor 5A2 (eIF5A2), c-myc and metastasis-associated protein 1 (MTA1). **Methods** There were 5 experimental groups, namely control group (adding PBS), 75 $\mu\text{mol/L}$ 3-BrPA group, 100 $\mu\text{mol/L}$ 3-BrPA group, 125 $\mu\text{mol/L}$ 3-BrPA group and 150 $\mu\text{mol/L}$ 3-BrPA group. MTT and Transwell assay were used to detect the effect of 3-BrPA on the viability and invasion of MCF-7 cells after treated with 3-BrPA for 24, 48 and 72 h respectively. RT-PCR and Western blot were used to detect the changes of eIF5A2, c-myc and MTA1 genes and proteins. **Results** Compared with the control group, the viability of the MCF-7 cells treated with 3-BrPA was significantly decreased ($P < 0.05$) in a time- and dose-dependent manner. Transwell results showed that the number of MCF-7 cells passing through the wells was significantly reduced after 3-BrPA interaction for 24 h ($P < 0.05$) compared to the control group. RT-PCR and Western blot showed that the expression levels of eIF5A2, c-myc and MTA1 genes and proteins decreased with the increase of drug concentration ($P < 0.05$). **Conclusions** Tribromopyruvic acid can inhibit the proliferation and invasion of breast cancer MCF-7

收稿日期: 2018-05-21

* 基金项目: 河北省唐山市科技支撑项目 (No: 14130260)

[通信作者] 张青松, E-mail: kly888888@163.com

cells. The mechanism may be related to the decrease of *eIF5A2*, *c-myc* and *MTA1* gene and protein expressions.

Keywords: breast cancer; tribromopyruvic acid; tumor invasion; metastasis-associated protein 1

乳腺癌是常见的恶性肿瘤之一, 部分患者确诊时肿瘤已浸润、转移, 因此寻找有效的治疗中、晚期肿瘤的药物具有重要意义。三溴丙酮酸 (3 bromopyruvate, 3-BrPA) 是可促进凋亡或自噬的抗肿瘤新药^[1-2]。目前, 对其抑制肿瘤增殖及侵袭的机制知之甚少。真核转录起始因子 5A2 (eukaryotic translation initiation factor 5A2, eIF5A2)、*c-myc* 基因及转移相关蛋白 1 (metastasis-associated protein 1, MTA1) 在肿瘤增殖、侵袭中起重要作用^[3]。3-BrPA 是否通过该途径发挥抗肿瘤作用, 尚未见报道。本实验通过研究 3-BrPA 对 eIF5A2、*c-myc* 基因、MTA1 表达的影响, 探讨其抑制肿瘤增殖、侵袭的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及仪器 乳腺癌 MCF-7 细胞株由华北理工大学中心实验室保存。

1.1.2 主要仪器 iMark 酶标仪、Mini-Protein Tetra System、Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell 购自美国伯乐公司, QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (美国 life 公司), 超速低温离心机 (美国 Sigma 公司), Transwell 小室 (美国 Costar 公司)。

1.1.3 主要试剂 3-BrPA (大连美仑生物技术有限公司), MTT (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (澳大利亚 Bovogen Biologicals 公司), Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司), eIF5A2、MTA1 兔抗人单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司), *c-myc* 兔抗人多克隆抗体 (美国 Epitomics 公司), β -actin 鼠抗人单克隆抗体 (台湾 Arigo 公司); 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自大连宝生生物技术有限公司, RT-PCR 特异性引物 (上海英潍捷基贸易有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 乳腺癌 MCF-7 细胞在 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 双抗), 置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 恒温培养箱中常规培养, 2 d 或 3 d 换液 1 次。待长至 80% ~ 90% 密度时, 按 1 : 2 传代培养。实验分为 5 组: 加入等量 PBS 的对照组, 75、100、125 和 150 μ mol/L 3-BrPA 组 (实验组)。

1.2.2 MTT 法 利用 MTT 法检测细胞增殖情况。取

对数生长期 MCF-7 细胞, 将细胞按 5×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板。细胞贴壁后, 实验组加入等体积不同浓度的 3-BrPA (以 PBS 稀释), 对照组加入等体积 PBS, 每组 6 个复孔, 常规培养 24、48 和 72 h 后加入 MTT 15 μ l / 孔, 37℃ 孵育 4 h, 弃上清, 加入二甲亚砜 150 μ l / 孔, 摇床上震荡 10 min, 酶标仪检测 490 nm 处光密度值 (optical density, OD 值)。细胞存活率 = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 \times 100%, 实验重复 3 次。

1.2.3 Transwell 实验 依据 Transwell 实验, 研究 3-BrPA 对 MCF-7 细胞侵袭的影响。在上室中均匀加入 Matrigel 胶, 加入 100 μ l 以无血清培养基重悬的 MCF-7 细胞悬液, 细胞数约 2×10^4 个 / 孔; 下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基 600 μ l。细胞贴壁后, 实验组分别加入等体积的 75、100 和 150 μ mol/L 3-BrPA 溶液, 对照组加入等体积 PBS, 常规培养 24 h 后取出 Transwell 小室, PBS 清洗 2 遍或 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 用棉签轻轻拭去室内未侵袭出的细胞, 瑞士-吉姆萨染色 10 min 后 PBS 清洗 3 遍, 每个小室随机取 3 个视野采集图像, 实验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 采用 RT-PCR 检测 *eIF5A2*、*c-myc* 及 *MTA1* 基因的表达。实验组 MCF-7 细胞以 100 μ mol/L 3-BrPA 处理 24 h, 对照组加入与药物等体积的 PBS, 提取细胞总 RNA, 纯度控制在 1.8 ~ 2.1。按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s; 60℃ 退火 34 s, 共 40 个循环。以 2% 琼脂糖凝胶电泳行荧光扩增产物验证。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对结果进行分析, β -actin 为内参, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	长度 /bp
<i>eIF5A2</i>	正向: TGTCTTCTACTCACAACAT	144
	反向: CCTCACGAACTTCACCGAG	
<i>c-myc</i>	正向: CGTCCTCGGATTCTCTGCTC	280
	反向: GCTGCGTAGTTGTGCTGATC	
<i>MTA1</i>	正向: AAGACCACCCAGAGATAC	123
	反向: GTTGTGACGCTGATTTG	
<i>actin</i>	正向: TGAAGTGTGACGTGGACATC	151
	反向: GGAGGAGCAATGATCTTGAT	

1.2.5 Western blot 检测 采用 Western blot 检测 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 蛋白的表达。用药物处理各组细胞 24 h, BCA 法定量提取蛋白, 与 $5 \times$ 上样缓冲液按 4 : 1 的比例混合均匀后煮沸 3 ~ 5 min 备用。制胶、电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 4℃ 孵育一抗过夜。TBST 漂洗 3 次, 5 min/次, 摇床上二抗孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 5 min/次。化学发光剂显影, 内参选用 β -actin, 采用 Image J 软件分析图像灰度值, 每组实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 t 检验, 多组比较用方差分析, 方差齐则两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

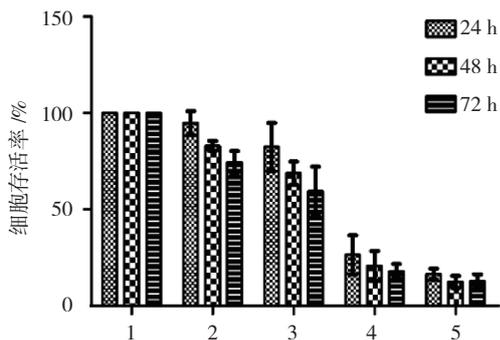
2.1 3-BrPA 对乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制作用

24、48 和 72 h 时, 5 组 MCF-7 细胞存活率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。3-BrPA 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后, 细胞存活率降低, 并具有剂量和时间依赖性。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 3-BrPA 作用 24 h 时, 75 和 100 μ mol/L 3-BrPA 组细胞存活率与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 药物处理 48 h 时, 各实验组较对照组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 150 与 125 μ mol/L 3-BrPA 组细胞存活率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 3-BrPA 作用于细胞 72 h 时, 各实验组较对照组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 75 和 100 μ mol/L 3-BrPA 作用于细胞后, 其存活率随药物作用时间延长而降低 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

表 2 各组不同时间点 MCF-7 细胞存活率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
75 μ mol/L 3-BrPA 组	94.85 \pm 6.20	83.00 \pm 2.60 [†]	74.58 \pm 5.75 [†]
100 μ mol/L 3-BrPA 组	82.4 \pm 12.59	68.79 \pm 6.07 [†]	59.62 \pm 12.6 [†]
125 μ mol/L 3-BrPA 组	26.38 \pm 10.16 [†]	20.75 \pm 7.72 [†]	17.83 \pm 3.82 [†]
150 μ mol/L 3-BrPA 组	16.43 \pm 2.91 [†]	12.37 \pm 3.18 [†]	12.78 \pm 3.50 [†]
F 值	152.206	394.904	191.023
P 值	0.000	0.000	0.000

注: [†] 与对照组比较, $P < 0.05$



1: 对照组; 2: 75 μ mol/L 3-BrPA 组; 3: 100 μ mol/L 3-BrPA 组; 4: 125 μ mol/L 3-BrPA 组; 5: 150 μ mol/L 3-BrPA 组

图 1 各组不同时间点 MCF-7 细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 3-BrPA 对 MCF-7 细胞侵袭的影响

MCF-7 细胞经 3-BrPA 处理 24 h 时, 对照组, 以及 75、100 和 150 μ mol/L 3-BrPA 组细胞数分别为 (281.67 \pm 18.77)、(159.00 \pm 24.06)、(76.33 \pm 9.07) 和 (40.67 \pm 11.50) 个, 经方差分析, 差异有统计学意义

($F = 119.894$, $P = 0.000$), 各组穿过的细胞数不同。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 与对照组相比, 各实验组细胞数降低, 且具有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 3-BrPA 对 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 基因表达的影响

RT-PCR 结果表明, 标准化对照组基因表达量为 (1.000 \pm 0.000), 则 100 μ mol/L 3-BrPA 组 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 基因的相对表达量分别为 (0.764 \pm 0.088)、(0.735 \pm 0.144) 和 (0.606 \pm 0.095)。100 μ mol/L 3-BrPA 作用 24 h 时的 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 基因表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($t = 4.664$ 、3.186 和 7.170, $P = 0.010$ 、0.033 和 0.019), 100 μ mol/L 3-BrPA 组较对照组降低。见图 3。

2.4 3-BrPA 对 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 蛋白表达的影响

MCF-7 细胞经 3-BrPA 处理 24 h 后, 75 和

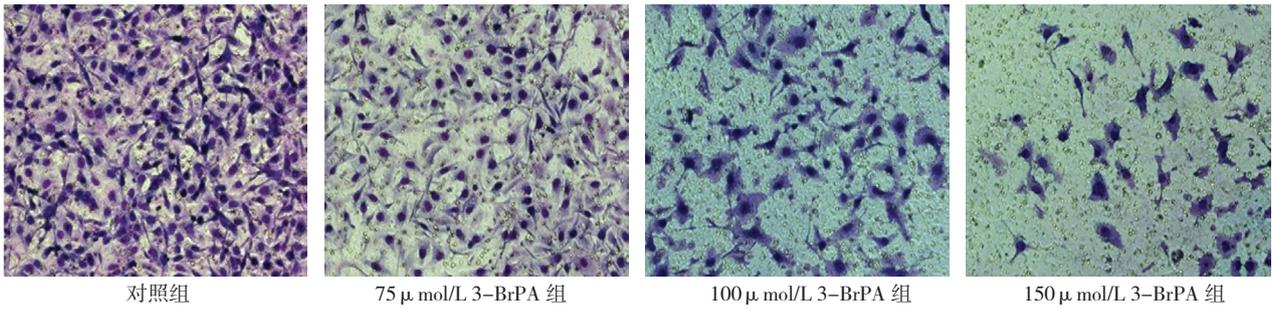


图 2 3-BrPA 作用 24 h 时各组 MCF-7 细胞侵袭情况 (×200)

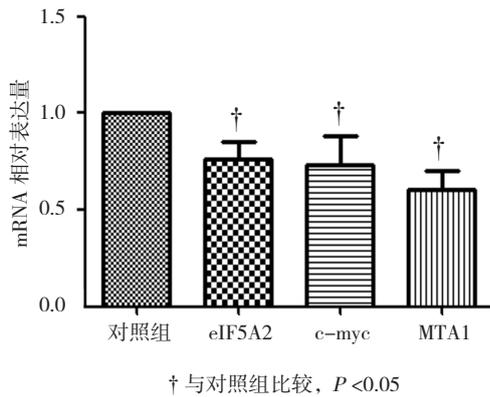


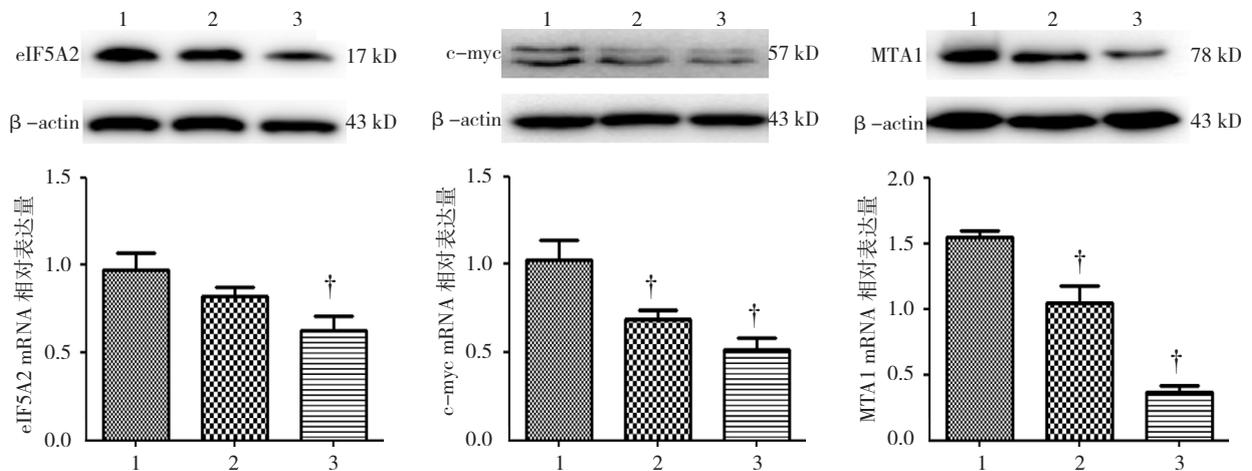
图 3 对照组与 100 μmol/L 3-BrPA 组 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

100 μmol/L 3-BrPA 组、对照组 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 75 和 100 μmol/L 3-BrPA 组较对照组降低。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 75 μmol/L 3-BrPA 组 eIF5A2 蛋白表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 100 μmol/L 3-BrPA 组 eIF5A2 蛋白表达水平较对照组降低 ($P < 0.05$); 与对照组相比, c-myc 和 MTA1 蛋白表达量经 3-BrPA 处理后均降低, 且具有浓度依赖性 ($P < 0.05$), 其中 MTA1 蛋白降低更明显。见表 3 和图 4。

表 3 各组 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	eIF5A2	c-myc	MTA1
对照组	0.971 ± 0.102	1.029 ± 0.112	1.549 ± 0.045
75 μmol/L 3-BrPA 组	0.821 ± 0.057	0.687 ± 0.057 [†]	1.049 ± 0.125 [†]
100 μmol/L 3-BrPA 组	0.628 ± 0.083 [†]	0.516 ± 0.069 [†]	0.368 ± 0.044 [†]
F 值	12.976	29.749	160.834
P 值	0.007	0.001	0.000

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$



1: 对照组; 2: 75 μmol/L 3-BrPA 组; 3: 100 μmol/L 3-BrPA 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 各组 eIF5A2、c-myc 及 MTA1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

乳腺癌发病率居女性肿瘤之首, 且近 10 年仍有上升趋势^[4]。部分患者被确诊为乳腺癌时, 已发生浸润及远处转移, 此时化疗具有重要意义。3-BrPA 是近年发现的一种新型有效的抗肿瘤药物, 目前处于研究阶段, 尚未进入临床应用。以往的研究主要集中在对肿瘤糖代谢及凋亡方面的研究^[5], 关于其抑制肿瘤增殖及侵袭的机制知之甚少。

eIF5A2 在胃癌、卵巢癌、结肠癌、非小细胞性肺癌及食管癌等实体肿瘤中均有过表达^[6]。*eIF5A2* 过表达与患者生存期的缩短呈正相关, 并且会增加肿瘤的侵袭及转移, 促进肿瘤上皮间质转化。降低 *eIF5A2* 基因的表达, 肿瘤的侵袭、转移及上皮间质转化受到抑制。有研究表明, *eIF5A2* 可通过 *c-myc* 调节 MTA1 的表达, 来降低肿瘤侵袭和转移的能力^[7-8]。有研究表明, *eIF5A2-c-myc/MTA1* 轴在肿瘤的上皮间质转化、增殖、迁移及侵袭中可能起重要作用^[3]。MTA1 为 *eIF5A2* 的下游靶点, 下调 MTA1 的表达后, 胰腺癌 SW1900 细胞的增殖、迁移及侵袭作用受抑制, 细胞凋亡率增加^[9]。MENG 等^[10] 研究提示, 下调 *eIF5A2* 基因以降低 CyclinD1、CyclinD3 的表达, 可抑制胰腺癌 MKN28 细胞的增殖; 亦可通过 *eIF5A2* 抑制 *c-myc*、MTA1 的表达及上皮间质转化途径, 降低其侵袭和迁移能力。XU 等^[11] 通过 miR-9 靶向作用于非小细胞肺癌细胞 *eIF5A2* 基因后, 细胞上皮间充质转化受抑制, 增殖和迁移能力也降低。MENG 等^[8] 通过 siRNA 抑制 *eIF5A2* 基因, 可明显抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

有研究表明, 3-BrPA 可以抑制 MCF-7 细胞增殖, 使细胞周期阻滞在 S 期及 G₂/M 期, 并促进其凋亡, 该过程可能与降低 Bcl-2、*c-myc* 及突变型 P53 的表达有关^[12]。依据 MTT 和 Transwell 结果, 3-BrPA 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞, 其增殖和侵袭能力降低; RT-PCR 和 Western blot 结果表明, 3-BrPA 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 24 h, *eIF5A2*、*c-myc*、MTA1 基因和蛋白表达水平降低, 其中 MTA1 基因和蛋白降低更为明显。

综上所述, 3-BrPA 可以抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖和侵袭, 其机制可能与降低 *eIF5A2*、*c-myc*、MTA1 基因和蛋白的表达有关, 但具体作用机制有待

进一步深入研究。目前, 3-BrPA 尚处于临床前研究阶段, 细胞实验和动物体内实验效果均比较理想。由于 3-BrPA 在溶剂中的化学性质不稳定, 见光易分解。因此, 解决药物成药问题是其进入临床应用的关键, 也是下一步的研究重点。

参考文献:

- [1] ZHANG Q, ZHANG Y, ZHANG P, et al. Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells[J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(3/4): 100-112.
- [2] CHEN Z, ZHANG H, LU W, et al. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-Bromopyruvate[J]. *BBA-Bioenergetics*, 2009, 1787(5): 553-560.
- [3] 孟庆彬, 于健春, 马志强. EIF5A2 在肿瘤中的作用研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(1): 123-125.
- [4] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况 [J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(13): 668-674.
- [5] 曾常茜, 吴思宇. 3-溴丙酮酸抗肿瘤作用及机制研究 [J]. *中国新药杂志*, 2009(9): 793-796.
- [6] TANG D J, DONG S S, MA N F, et al. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1255.
- [7] ZHU W, CAI M Y, TONG Z T, et al. Overexpression of EIF5A2 promotes colorectal carcinoma cell aggressiveness by upregulating MTA1 through C-myc to induce epithelial-mesenchymal transition[J]. *Gut*, 2012, 61(4): 562.
- [8] MENG Q B, KANG W M, YU J C, et al. Overexpression of eukaryotic translation initiation factor 5A2 (EIF5A2) correlates with cell aggressiveness and poor survival in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0119229.
- [9] LIN X H, ZHENG L, SONG H L, et al. Effects of microRNA-183 on epithelial-mesenchymal transition, proliferation, migration, invasion and apoptosis in human pancreatic cancer SW1900 cells by targeting MTA1[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(3): 522-532.
- [10] MENG Q B, YU J C, KANG W M, et al. Effects of eukaryotic translation initiation factor 5A2 down-regulation by small interfering rna on aggressiveness of MKN28 human[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2014, 36(5): 482-487.
- [11] XU G, SHAO G, PAN Q, et al. MicroRNA-9 regulates non-small cell lung cancer cell invasion and migration by targeting eukaryotic translation initiation factor 5A2[J]. *American Journal of Translational Research*, 2017, 9(2): 478.
- [12] LIU X H, ZHENG X F, WANG Y L. Inhibitive effect of 3-bromopyruvic acid on human breast cancer MCF-7 cells involves cell cycle arrest and apoptotic induction[J]. *Chinese Medical Journal*, 2009, 122(14): 1681-1685.

(童颖丹 编辑)