

赖氨大黄酒通过抑制 HER-2 信号通路诱导乳腺癌 SK-Br-3 细胞凋亡

林雅军¹, 黄云虹¹, 甄永占^{1,2}, 刘秀均¹, 甄永苏^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 为研究赖氨大黄酒(rhein lysinate, RHL)对人乳腺癌细胞株 SK-Br-3 细胞增殖、凋亡的影响及 HER-2 信号通路在其中的作用。应用 MTT 法检测赖氨大黄酒对 SK-Br-3 细胞增殖的影响;应用流式细胞仪检测细胞周期变化及细胞凋亡;应用 Western blotting 检测 HER-2 信号通路蛋白表达水平及蛋白磷酸化水平;应用 RT-PCR 和免疫化学方法分别检测 HER-2 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示, 赖氨大黄酒能有效抑制乳腺癌 SK-Br-3 细胞增殖, 作用 48 h 的 IC_{50} 值为 $85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并能诱导其凋亡, 随药物浓度的增加, 细胞凋亡率也逐渐升高; Western blotting 结果显示, 赖氨大黄酒抑制 HER-2 蛋白表达和蛋白磷酸化, 抑制 NF- κ B 蛋白表达, 升高 p53 和 p21 蛋白表达; RT-PCR 和免疫化学结果表明, 赖氨大黄酒能抑制 HER-2 mRNA 的转录水平, 从而抑制其蛋白表达。因此, 赖氨大黄酒能有效抑制 SK-Br-3 细胞增殖, 并诱导其凋亡, HER-2/NF- κ B/p53/p21 参与了赖氨大黄酒诱导 SK-Br-3 细胞凋亡的过程。赖氨大黄酒解决了大黄酒不溶于水的难题, 并且能够通过 HER-2 信号通路诱导细胞凋亡, 有望成为临床肿瘤辅助化疗药物。

关键词: 赖氨大黄酒; 细胞凋亡; HER-2 信号通路; 乳腺肿瘤

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2008)11-1099-07

Rhein lysinate induces apoptosis in breast cancer SK-Br-3 cells by inhibiting HER-2 signal pathway

LIN Ya-jun¹, HUANG Yun-hong¹, ZHEN Yong-zhan^{1,2}, LIU Xiu-jun¹, ZHEN Yong-su^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: This study is to investigate the effect of rhein lysinate on inducing human breast cancer cell line SK-Br-3 apoptosis and the role of HER-2 signal pathway in the apoptosis. MTT assay was used to detect SK-Br-3 cell proliferation. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The protein expression and the protein phosphorylation of HER-2 signal pathway were detected by Western blotting. The level of HER-2 mRNA was detected by RT-PCR and the level of HER-2 expression was also detected by immunofluorescence cytochemical methods. The results showed that rhein lysinate remarkably inhibited breast cancer SK-Br-3 cell proliferation. The IC_{50} value for 48 h treatment was $85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Apoptosis in SK-Br-3 cells was induced by rhein lysinate in a dose dependent manner. The protein expressions of HER-2, NF- κ B, and the protein phosphorylation of HER-2 were downregulated, however the protein expression of p53 and p21 was upregulated after rhein lysinate treatment. The level of HER-2 mRNA decreased by using RT-PCR assay and the level of HER-2 expression was also decreased by using immunofluorescence cytochemical assay after rhein lysinate treatment. It can be concluded that rhein lysinate could inhibit SK-Br-3 cell proliferation and induce apoptosis. HER-2/NF- κ B/p53/p21 signal

收稿日期: 2008-07-10.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2004CB518706); 国家自然科学基金资助项目(39870941).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-10-83158065, E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

pathway might be involved in this process. Rhein lysinate has a good prospect to be an adjuvant chemotherapeutic drug.

Key words: rhein lysinate; apoptosis; HER-2 signal pathway; breast neoplasm

大黄酸是我国传统中药大黄中的主要蒽醌类化合物之一,据报道大黄酸能够引起细胞内 Ca^{2+} 积聚,降低线粒体膜电位,通过线粒体通路诱导肿瘤细胞凋亡^[1,2],而大黄酸是否能够引起 HER-2 高表达细胞株凋亡未见报道。HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) 是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族的第二位成员,是与人类肿瘤发生、发展关系最密切的原癌基因之一。在许多人类肿瘤组织中均发现 HER-2 的过度表达,有研究表明 25% ~ 30% 的乳腺癌组织中 HER-2 过度表达^[3]。而且肿瘤组织中 HER-2 的表达水平与肿瘤的分级、肿瘤的大小、淋巴结转移以及患者的生存期密切相关^[4]。细胞和动物实验研究表明:HER-2 酪氨酸激酶活性增加,细胞恶性表型也相应增加^[5]。据报道 HER-2 过度表达的乳腺癌细胞对乳腺癌常用化疗药产生耐药^[6]。正是由于 HER-2 过度表达与肿瘤恶性表型和肿瘤耐药密切相关,HER-2 过度表达的乳腺癌患者预后比较差。因此 HER-2 酪氨酸激酶受体是 HER-2 过度表达肿瘤的有效治疗靶点。人乳腺癌细胞株 SK-Br-3 EGFR 和 HER-2 高表达,HER-3 和 HER-4 低表达,并且对多种化疗药耐药,因此是研究 HER-2 受体比较理想的细胞株^[7]。

蒽醌类化合物的共同特点是不溶于水,限制了其在肿瘤治疗方面的应用。本实验室对大黄酸进行结构改造获得了水溶性好的赖氨大黄酸。本文研究赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞增殖、凋亡的影响及 HER-2 信号通路在其中的作用。为今后大黄酸在肿瘤治疗中的应用提供理论依据。

材料与方 法

细胞培养体系 人乳腺癌细胞株 SK-Br-3 由本实验室保存,用含 15% 胎牛血清 (Hyclone) 的高糖 DMEM 培养液 (Gibco); 于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养,3 d 传代 1 次,实验用细胞为对数生长期细胞。

药物及试剂 大黄酸购自南京青泽医药科技开发有限公司,纯度 98%。L-赖氨酸购自北京市科海军舟生物科技发展中心。赖氨大黄酸 (rhein

lysinate, RHL) 由本室合成,分子式: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8$, 相对分子质量: 430, 纯度 93%。

HER-2 抗体 MS-730 (Ab-17) 和 p-HER-2 抗体 MS-1072 (Ab-18) 购自 NeoMarkers 公司; NF- κ B (SC-8008)、p53 (SC-6243)、p21 (SC-6246)、Caspase-3 (SC-7272)、Bcl-2 (SC-492) 和 β -actin (SC-16) 抗体均购自 Santa Cruz 公司; 中分子量蛋白预染 marker p7708V 购自 New England Biolabs 公司; Western Blotting Luminol Reagent 和 PVDF 膜购自 Millipore 公司; 抗兔的二抗购自 Cell Signaling Co.; 抗小鼠的二抗购自 Santa Cruz 公司。

Annexin V-异硫氰酸酯荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 凋亡检测试剂盒和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞周期检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。一步法逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

细胞增殖活性检测 应用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法^[8]。将 SK-Br-3 细胞以细胞数 1×10^4 /孔接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μL 培养液,24 h 后,实验组分别加入 10、20、40、80 及 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赖氨大黄酸或大黄酸二甲基亚砷溶液 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Gibco 公司,作为溶剂),培养 48 h,实验结束前加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT (Gibco 公司) 20 μL ,继续培养 4 h 后小心吸去上清液,加入二甲基亚砷 150 μL ,振荡溶解结晶后置酶标仪 (Thermo LabSystems, Multiskan MK3) 于 570 nm 测吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50})。根据上述细胞增殖实验的赖氨大黄酸作用浓度及预实验结果,确定以下各项检测指标。

Annexin V-FITC/PI 法细胞凋亡分析 将 20、40、80、160 及 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赖氨大黄酸作用 24 h 及未加药处理的 SK-Br-3 细胞用胰蛋白酶消化,并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤,将待测细胞数调整为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /mL,取 1 mL 于 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (4 °C) 离心 10 min,弃上清液, PBS 洗涤,将细胞重悬于 binding buffer 300 μL ,加入 Annexin V-FITC 10 μL ,轻轻摇匀,室温反应 1 h,加入 PI 5 μL 轻轻摇匀,室温反应 15

min, 细胞经 200 目尼龙网过滤后, 在流式细胞检测仪上进行检测。

细胞周期分析 将 20、40、80、160 及 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赖氨大黄酸作用 24 h 及未加药处理的 SK-Br-3 细胞用胰蛋白酶消化, 加入冰冷的 PBS 将细胞轻轻吹打成单个细胞, 离心, PBS 洗 2 遍, 用 PBS 约 500 μL 重悬细胞, 一边振荡一边加入预冷的 70% 乙醇 5 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜(如不及时测定, 可放 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存至 2 周)。染色前细胞用 PBS 洗 2 遍, 沉淀重悬于 PI 染液中(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI + 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min。细胞经 200 目尼龙网过滤后, 用流式细胞仪测定 DNA 含量并分析细胞周期变化。

Western blotting 分析 将 10、20、40、80 及 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赖氨大黄酸作用 48 h 及未加药处理的 SK-Br-3 细胞用预冷的 1 \times PBS 洗 3 遍, 加入新鲜配制的细胞裂解液(50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5; 1% NP-40; 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 ; 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF, 临用时加入 3 种蛋白酶抑制剂 1% aprotinin; 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ leupeptin; 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟) 100 μL , 立即用细胞刮刀刮下细胞使其与裂解液充分混合, 冰浴 20 min。于 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min(4 $^{\circ}\text{C}$), 收集上清液于新的微量离心管中, 按照 BCA 法测定蛋白含量。取各样品等量总蛋白 30 μg 加入 0.25 倍体积的 5 \times 上样缓冲液, 煮沸变性 5 min 后, 在 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 胶上进行电泳。然后转移到硝酸纤维素膜上, 1% BSA 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 加相应二抗孵育 2 h, 膜上滴加化学发光增强剂(Santa Cruz biotechnology SC-2048), 按照试剂说明进行操作, 通过化学发光成像系统 ChemiImager 5500(Alpha Innotech) 检测分析。

RT-PCR 分析 用 TRIzol 提取 SK-Br-3 细胞总 RNA, 并用蛋白核酸分析仪(Beckman DU800) 测定 RNA 的浓度。以 β -actin 为内标采用 RT-PCR 试剂盒对 HER-2 mRNA 水平进行检测。反应体系: 1 μg 总 RNA 作为模板; 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HER-2 引物对各加 1.0 μL ; 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -actin 引物对各加 1.0 μL ; 加入 2 \times 反应液 25 μL ; 加入 Taq mix(反转录酶及 DNA 聚合酶混合液) 1.0 μL , 补水至 50 μL , 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C} \times 30 \text{ min}$ 反转录, 94 $^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min}$ 打开双螺旋; 然后, 94 $^{\circ}\text{C} \times 15 \text{ s}$, 57 $^{\circ}\text{C} \times 30 \text{ s}$, 72 $^{\circ}\text{C} \times 40 \text{ s}$, 反应进行 30 循环, 最后延伸反应 72 $^{\circ}\text{C} \times 10 \text{ min}$ 。

反应完成后将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪照相并分析结果。RT-PCR 中用到的引物为 HER-2(片段长度 379 bp): 5'-ACACTGATAGACACCAACCGCTC-3'; 5'-CGTCCGTAGAAAGGTAGTTGTACC-3'; β -actin(片段长度 714 bp): 5'-CCCAGCCACCAGGGCGTGATGGT-3'; 5'-GGACTCCATGCCCAGGAAGAA-3'。

免疫荧光细胞化学方法分析 将 SK-Br-3 细胞胰酶消化后传代于含盖玻片的 6 孔板中, 置于细胞培养箱中培养 72 h; 取出盖玻片, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 1 \times PBS 冲洗 3 次; 用 0.5% H_2O_2 , 室温浸泡 20 min, 以灭活内源性过氧化物酶, PBS 冲洗; 加入抗 HER-2 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 1 \times PBS 冲洗 3 次; 加入荧光素化的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 1 \times PBS 冲洗 3 次; 在倒置荧光显微镜下(IX-70, Olympus) 观察并照相。

结果

1 赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞增殖的影响

不同浓度的赖氨大黄酸(10 ~ 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 SK-Br-3 细胞后可明显抑制细胞增殖, 并且呈浓度依赖性, 作用 48 h 后的 IC_{50} 值为 85 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时也发现赖氨大黄酸与大黄酸具有相似的抑制 SK-Br-3 细胞增殖作用(图 1)。

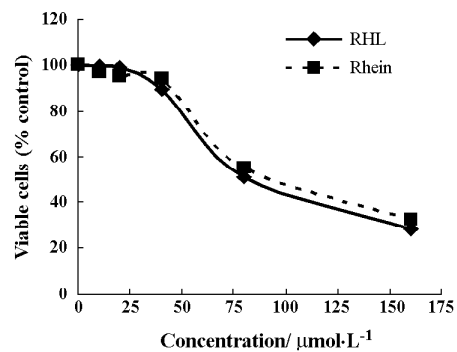


Figure 1 Effect of rhein lysinate (RHL) and rhein (in DMSO) on cell proliferation of SK-Br-3 cells. Cells were treated with various concentrations of RHL at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h. The effect on cell proliferation was examined by the MTT assay, and cell proliferation was calculated as the percentage of control. All determinations were made three times

2 赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞凋亡的影响

赖氨大黄酸(20 ~ 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于 SK-

Br-3 细胞 24 h 后,肿瘤细胞出现明显的早期凋亡现象,并且这种凋亡现象有明显的浓度依赖性关系。同时在 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下还出现了明显的晚期凋亡或者死亡的细胞(图 2)。

3 赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞周期的影响

赖氨大黄酸($20 \sim 320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于 SK-Br-3 细胞 24 h 后,随着浓度的增加 SubG₁ 期细胞数逐渐增多,而其他周期的细胞没有显著变化,进一步证明了赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞是通过细胞凋亡通路发挥抗肿瘤作用的(图 3)。

4 赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞 HER-2 蛋白表达水平的影响

在 HER-2 高表达的乳腺癌 SK-Br-3 细胞,赖氨大黄酸抑制表皮生长因子受体家族 HER-2 蛋白磷酸化,并且呈浓度依赖性关系; $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上浓度的赖氨大黄酸能够抑制 HER-2 蛋白表达;赖氨大黄酸同时抑制 NF- κ B 蛋白表达,促进 p53 和 p21 蛋白表达,并且呈明显的浓度依赖性关系;赖氨大黄酸对 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达水平没有影响(图 4)。

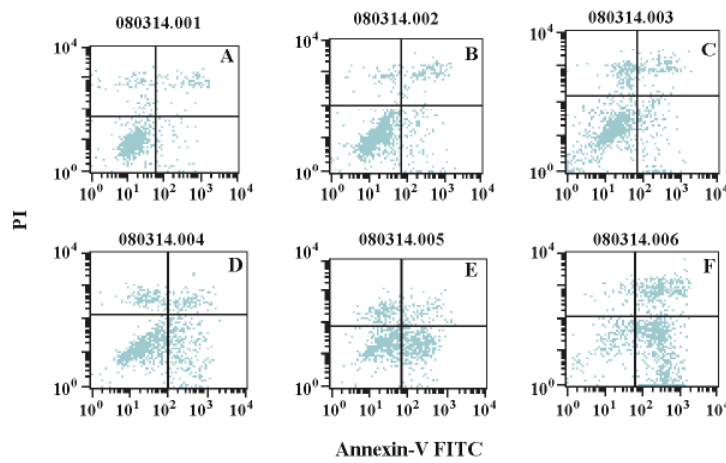


Figure 2 Effect of RHL on the rate of apoptosis of SK-Br-3 cells detected by Annexin V-FITC apoptosis detection kit. A: Control (4.03%); B: RHL $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (9.06%); C: RHL $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (10.80%); D: RHL $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (21.83%); E: RHL $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (31.05%); F: RHL $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (57.76%)

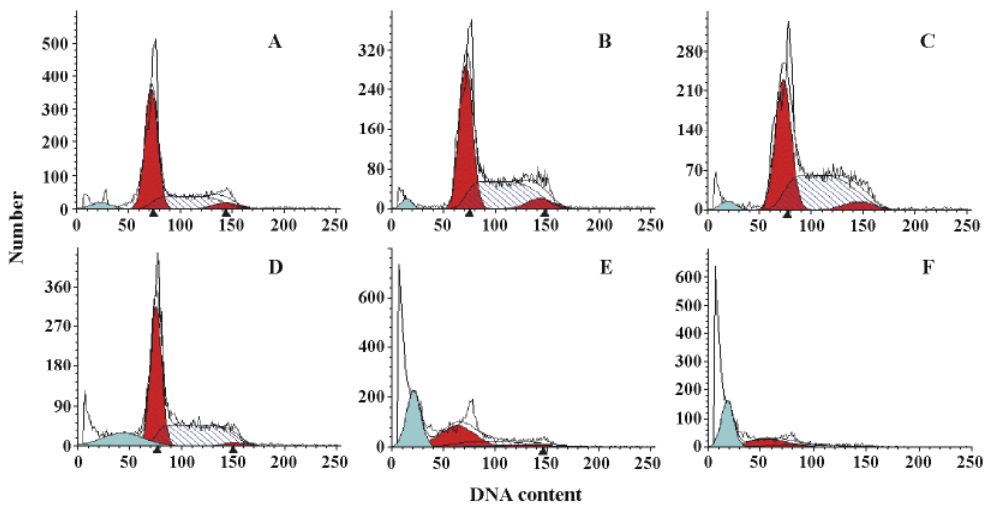


Figure 3 The ratio of SubG₁ period cells in SK-Br-3 cells after RHL treating 24 h was analyzed by flow cytometry. A: Control (5.02%); B: RHL $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.66%); C: RHL $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3.05%); D: RHL $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (14.88%); E: RHL $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (38.42%); F: RHL $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (52.53%)

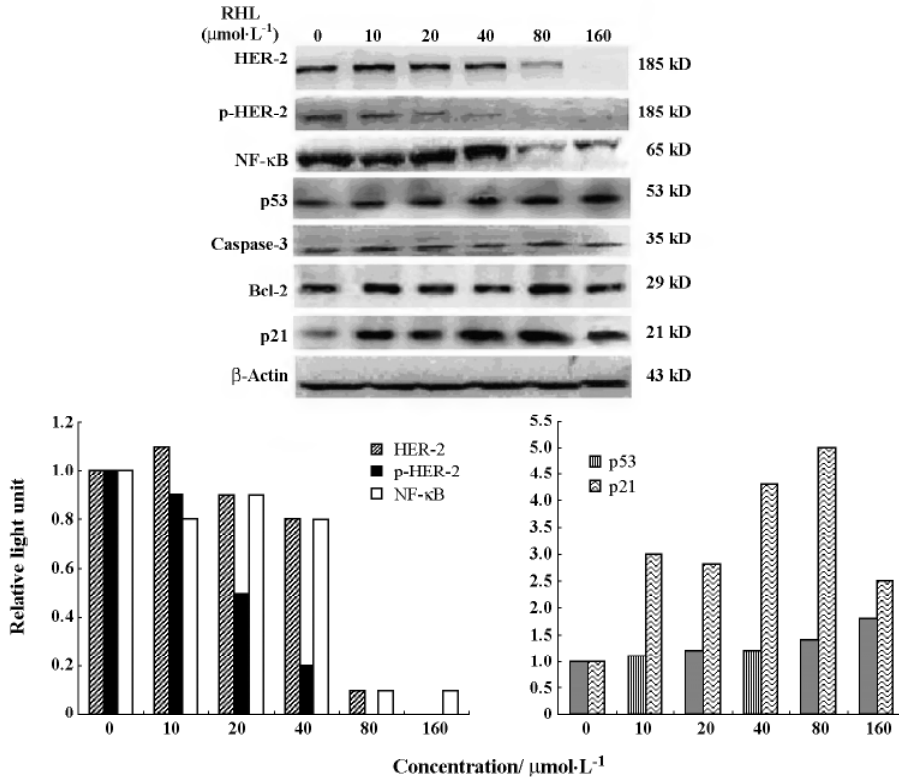


Figure 4 The protein expression of HER-2/NF-κB/p53/p21 signal pathway in SK-Br-3 cells treated with RHL ranging from 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48 h was detected by Western blotting

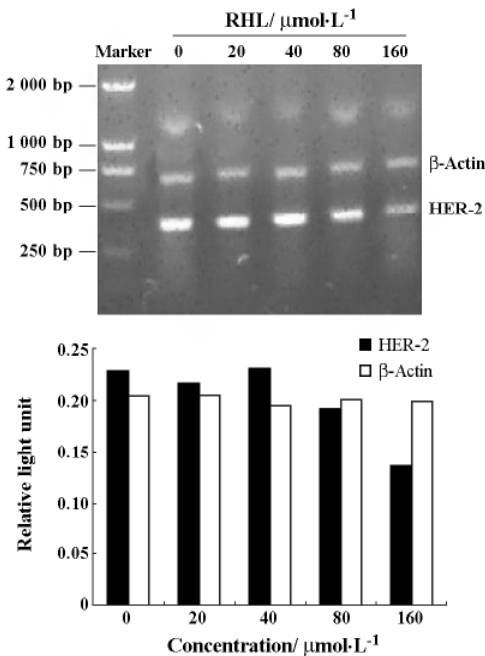


Figure 5 The level of HER-2 mRNA in SK-Br-3 cells treated with RHL ranging from 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48 h was detected by RT-PCR. Total RNA was extracted and HER-2 mRNA was amplified by RT-PCR and detected by agarose gel electrophoresis. β -actin: 714 bp; HER-2: 379 bp

5 赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞 HER-2 mRNA 水平的影响

RT-PCR 扩增后的 HER-2 mRNA 的产物大小为 379 bp, 内标基因 β -actin 扩增后的产物大小为 714 bp. 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下浓度的赖氨大黄酸对 HER-2 mRNA 的水平没有影响, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度的赖氨大黄酸抑制 HER-2 mRNA 的表达, 说明赖氨大黄酸从转录水平上抑制 HER-2 蛋白的表达(图 5)。

6 免疫荧光细胞化学方法分析赖氨大黄酸对 SK-Br-3 细胞 HER-2 蛋白表达水平的影响

实验结果表明: 随着赖氨大黄酸浓度的增加, SK-Br-3 细胞荧光强度逐渐减低, 当赖氨大黄酸的浓度达到 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SK-Br-3 细胞的荧光强度显著降低; 赖氨大黄酸的浓度达到 160 和 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SK-Br-3 细胞数量明显减少, 而且单位细胞的荧光强度几乎消失(图 6)。

讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 严重影响女性的健康。目前临床上治疗乳腺癌的方案很多, 并且取得了显著的临床疗效, 但是由于 HER-2 高表

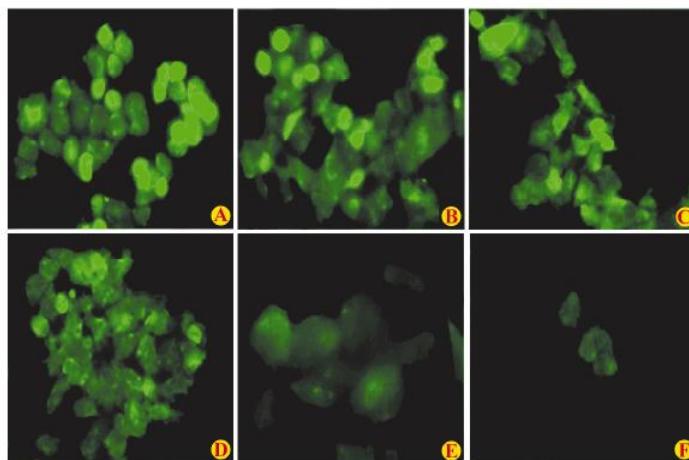


Figure 6 Effect of RHL treating for 24 h on the protein expression of HER-2 was examined by immunofluorescence cytochemical assay. A: Control; B: RHL $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C: RHL $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D: RHL $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; E: RHL $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; F: RHL $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

达的乳腺癌细胞对目前多种肿瘤化疗药具有耐药性,使得 HER-2 高表达的乳腺癌患者预后比较差。人源化单抗 Herceptin 的问世给 HER-2 高表达的乳腺癌患者带来了曙光。然而,临床治疗发现,应用单药治疗疗效不理想^[9]。已有实验表明 HER-2 和 EGFR 的共同表达和 PI3K-Akt 信号通路的激活是对 Herceptin 产生耐药的重要机制之一^[10]。据报道 Herceptin 结合在 HER-2 受体胞外区的区域 IV,区域 IV 在二聚体形成中并不起作用,因此即使是 Herceptin 存在的情况下,配体依然能够诱导 HER-2 在内的异源二聚体形成^[11]。因此开发更有效的针对 HER-2 高表达乳腺癌细胞的治疗药物迫在眉睫。据报道大黄酸能够通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,但未见大黄酸对 HER-2 受体作用的报道。本研究发现大黄酸的可溶性盐——赖氨大黄酸能够通过抑制 HER-2 蛋白表达和蛋白磷酸化,抑制乳腺癌 SK-Br-3 细胞的增殖,并诱导其发生凋亡。流式细胞仪检测结果表明:赖氨大黄酸($20 \sim 320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24 h,可以使 HER-2 高表达的 SK-Br-3 细胞出现凋亡和 SubG_1 期凋亡峰,而且凋亡细胞的数目与药物的浓度有明显的相关性。进一步研究发现,赖氨大黄酸是通过抑制 HER-2 蛋白表达和蛋白磷酸化,抑制 NF- κ B 蛋白表达,升高 p53 和 p21 蛋白表达,发挥诱导 SK-Br-3 细胞凋亡作用的。

另据报道,在 Ca Ski 子宫颈癌细胞,大黄酸通过依赖 Caspase 和依赖线粒体的通路诱导肿瘤细胞凋亡,其能够诱导线粒体膜电位的丢失,增加 Fas、

p53、p21 和 Bax 表达,降低 Bcl-2 表达^[1]。这与本研究发现的赖氨大黄酸引起 p53、p21 升高一致。也有报道,心衰猴的心肌细胞通过 ErbB2 (erythroblastosis oncogene B, 与人类 HER-2 同源)/PKB/Bcl-xl 信号通路引起心肌细胞发生凋亡^[12]。作者在研究中发现赖氨大黄酸也通过 HER-2/NF- κ B/p53/p21 信号通路诱导 SK-Br-3 细胞发生凋亡。进一步研究发现赖氨大黄酸不仅能够抑制 HER-2 蛋白的磷酸化,而且能够从转录水平抑制 HER-2 蛋白表达。对于赖氨大黄酸是否也引起 SK-Br-3 细胞内 Ca^{2+} 浓度、EGFR 和其他信号通路改变需要进一步研究。

综上所述,赖氨大黄酸能够通过 HER-2 信号通路抑制乳腺癌 SK-Br-3 细胞增殖,诱导其发生凋亡。HER-2/NF- κ B/p53/p21 信号通路是赖氨大黄酸诱导细胞凋亡的通路之一。与大黄酸相比,赖氨大黄酸的水溶性显著提高,有利于对其进行体内疗效评价,为今后的体内实验研究和临床试验提供了理论依据。

References

- [1] Ip SW, Weng YS, Lin SY, et al. The role of Ca^{2+} on rhin-induced apoptosis in human cervical cancer Ca Ski cells [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27:379-389.
- [2] Lin ML, Chen SS, Lu YC, et al. Rhein induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} -dependent mitochondrial death pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27:3313-3322.

- [3] Whenham N, D'Hondt V, Piccart MJ. HER-2-positive breast cancer: from trastuzumab to innovative anti-HER2 strategies [J]. *Clin Breast Cancer*, 2008,8:38-49.
- [4] Nishimura R, Okumura Y, Arima N. Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer; time to progression and survival [J]. *Breast Cancer*, 2008,15:57-64.
- [5] Doyle DM, Miller KD. Development of new targeted therapies for breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2008,15:49-56.
- [6] Bender LM, Nahta R. HER-2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer [J]. *Front Biosci*, 2008,13:3906-3912.
- [7] Xu H, Yu Y, Marciniak D, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005,4:435-442.
- [8] Wang TX, Yang XH. Reversal effect of isotetrandrine, an isoquinoline alkaloid extracted from *Caulis mahoniae*, on P-glycoprotein-mediated doxorubicin-resistance in human breast cancer (MCF-7/DOX) cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008,43:461-466.
- [9] Kong A, Calleja V, Leboucher P, et al. HER2 oncogenic function escapes EGFR tyrosine kinase inhibitors via activation of alternative HER receptors in breast cancer cells [J]. *PLoS ONE*, 2008,3:e2881.
- [10] Dieras V, Vincent-Salomon A, Degeorges A, et al. Trastuzumab (Herceptin) and breast cancer: mechanisms of resistance [J]. *Bull Cancer*, 2007,94:259-266.
- [11] Cho HS, Mason K, Ramyar KX, et al. Structure of the extracellular region of HER-2 alone and in complex with the Herceptin Fab [J]. *Nature*, 2003,421:756-760.
- [12] Li J, Chen YN, Duan JC, et al. Effects of ErbB signal and protein kinase B on monkey cardiocyte apoptosis induced by rapid pacing [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007,42:470-474.

欢迎订阅 2009 年《药学报》

《药学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870)是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目:述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来,一直报道药学领域原始性、创新性科研成果,旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学报》为我国自然科学核心期刊,据中国科学引文数据库的数据库统计,在中国科技核心期刊排行表中,《药学报》名列前茅,在药学类期刊中居首位;本刊已被世界主要检索系统收录,为我国药学界高水平的学术刊物,在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”,2001 年入选中国期刊方阵“双高”(高知名度、高学术水平)期刊;2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”,并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖;2002~2007 年连续 6 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号;2007 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助(B类)。

本刊为 112 页,月刊,大 16 开本。每期定价 20 元,全年定价 240 元。国内邮发代码:2-233,国外代码:M105。欢迎广大作者踊跃投稿,欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下:

- 通过当地邮局;
- 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn)或从网上(www.yxxb.com.cn)下载订阅单,填好后寄至编辑部;
- 通过本刊编辑部,联系人:李淑芬、张晓晔

电话:86-10-63165208, 传真:86-10-63026192

编辑部地址:北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部

邮编:100050