

低频超声联合微泡造影剂通过激活自噬和凋亡对 乳腺癌细胞活力的影响

袁哲英 黄凯西 李 慧 刘美快 姜海丹 陈 斌*

(温州医科大学附属第一医院, 温州 325000)

摘要 自噬和凋亡是乳腺癌细胞数量和活力减少的重要因素, 低频超声对肿瘤细胞的作用引起了研究者的广泛兴趣, 但是低频超声对乳腺癌细胞自噬和凋亡的作用尚不清楚。该文采用功率 0.5 W/cm^2 的1 MHz低频超声联合微泡造影剂, 作用于人乳腺癌细胞株MDA-MB-231 60 s后, 吖啶橙染色, 电镜观察自噬的数量, Western blot检测微管相关蛋白轻链3-II(microtubule associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)、自噬相关基因5(autophagy related 5, ATG5)和SQSTM1(sequestosome 1)/p62蛋白质水平变化, 分别分析自噬的水平。Western blot检测caspase-3, 膜联蛋白V/PI染色和DAPI染色方法分析MDA-MB-231细胞凋亡水平。ATG5 siRNA转染细胞可抑制自噬, caspase抑制剂Z-VAD-FMK可抑制凋亡, 使用CCK-8分析自噬和凋亡对MDA-MB-231细胞的作用。结果显示, 低频超声联合微泡造影剂促使LC3-II和ATG5蛋白质表达水平显著升高, 而使SQSTM1/p62蛋白质表达水平显著下降($P<0.05$)。透射电镜和共聚焦观察发现, MDA-MB-231细胞自噬体数量增加。低频超声联合微泡造影剂促使caspase-3蛋白质表达水平升高, 凋亡率增加。抑制自噬和凋亡后均明显缓解低频超声联合微泡造影剂对细胞活力的抑制作用($P<0.05$)。该研究结果说明, 低频超声联合微泡造影剂通过激活自噬和凋亡抑制乳腺癌细胞株MDA-MB-231的增殖活力。

关键词 乳腺癌细胞株MDA-MB-231; 低频超声结合微泡; 自噬; 凋亡

Low-Intensity Ultrasound Combined with Microbubbles Inhibit the Viability of Breast Cancer Cells through Activating Autophagy and Apoptosis

Yuan Zheyang, Huang Kaixi, Li Hui, Liu Meikuai, Jiang Haidan, Chen Bin*

(The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Autophagy and apoptosis are the key factors resulting in the cell death of breast cancer, and the therapeutic effect of low-intensity ultrasound (LPUS) combined with microbubbles (MBs) on tumor cells has aroused increasing attention. However, the effect of LPUS-MBs on autophagy and apoptosis in breast cancer cells remains unclear. In the present study, human breast cancer MDA-MB-231 cells were cultured and treated with 1 MHz LPUS with 0.5 W/cm^2 combined with MBs for 60 s. Acridine orange (AO) staining, transmission electron microscopy (TEM) and GFP-LC3 transfection were used to analyze the number of autophagosomes. The protein levels of microtubule associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II), ATG5 and SQSTM1(sequestosome 1)/p62 determined by Western blot reflected the level of autophagy. Annexin V/PI, DAPI staining and caspase-3 indicated the apoptosis of MDA-MB-231 cells. ATG5 siRNA transfection was employed to inhibit autophagy, and Z-VAD-FMK to inhibit apoptosis. The

收稿日期: 2017-04-02 接受日期: 2017-05-31

*通讯作者。Tel: 0577-88069567, E-mail: doctorchbe@126.com

Received: April 2, 2017 Accepted: May 31, 2017

*Corresponding author. Tel: +86-577-88069567, E-mail: doctorchbe@126.com

网络出版时间: 2017-07-25 17:22:37 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1722.010.html>

results showed that LPUS-MBs significantly enhanced the protein level of LC3-II and ATG5, but inhibited SQSTM1/p62 level ($P<0.05$). The result of TEM and GFP-LC3 assay found the increased number of autophagosomes in the LPUS-MBs-treated MDA-MB-231 cells. Furthermore, LPUS-MBs increased the level of caspase-3 and the percentage of apoptosis. Inhibition of autophagy and apoptosis attenuated the inhibitory effect of LPUS-MBs on cell viability ($P<0.05$). These results indicated that LPUS-MBs inhibited the cell viability by activating autophagy and apoptosis.

Keywords breast cancer cells; low-intensity ultrasound combined with microbubbles; autophagy; apoptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 并且是女性因癌症死亡的第二因素^[1]。乳腺癌常见的治疗方法包括外科手术、放疗和化疗等, 但均有不可避免的副作用。由于无创、安全和经济, 超声目前已广泛应用于影像诊断和介入性治疗^[2]。近年来, 超声治疗在肿瘤中逐渐得到应用, 主要包括直接的物理声波治疗以及联合化疗的超声介导化疗, 这些治疗均是通过抑制肿瘤细胞的增殖活力来达到治疗肿瘤的目的^[2]。低频超声(low-intensity ultrasound, LPUS)联合微泡(microbubbles, MBs)已被证实可以抑制肿瘤细胞的增殖活力, 但是在乳腺细胞中的作用尚不明确。

凋亡和自噬(autophagy)均为细胞程序性死亡方式。自噬是细胞的一种自我保护机制, 主要通过溶酶体融合降解错构的蛋白质和损伤的细胞器来维持细胞内的稳定^[3], 但过度的自噬会引起细胞的自噬性死亡(autophagic cell death)。已有研究报道, LPUS联合MBs可以促进肿瘤的凋亡^[2], 但是对于自噬的作用尚不清楚。本文拟将LPUS联合MBs作用于人乳腺癌细胞株MDA-MB-231, 并检测自噬、凋亡和细胞活力等指标来分析LPUS联合MBs对MDA-MB-231细胞自噬和凋亡的作用以及自噬和凋亡在其抑制细胞增殖活力中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

膜联蛋白V/PI(annexin V/PI)试剂盒、Western blot电泳、转膜和曝光相关试剂盒以及DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)和细胞总蛋白的提取试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; ATG5(autophagy related 5)、LC3-II(microtubule associated protein 1 light chain 3-II)、SQSTM1(sequestosome 1)/p62和 β -actin的一抗均购自Abcam公司; 细胞培养的试剂, 包括DMEM细胞培养及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶均购自Thermo公司; CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自Dojindo公司; Z-VAD-FMK、

吖啶橙染色荧光(acridine orange, AO)购自Sigma公司。低频低强度超声波治疗仪(BTL-5825SL超声波治疗仪)购自比特乐(BTL)科技有限公司。

1.2 MDA-MB-231细胞的培养及实验设计

MDA-MB-231细胞购自中国科学院上海细胞库, 使用10% FBS的DMEM培养在37 °C、含5% CO₂的湿化培养箱中, 每2~3 d传代1次, 每2 d换1次培养基。

分析LPUS联合MBs造影剂对MDA-MB-231细胞自噬和凋亡的影响时, 分为对照组(Control)、单纯MBs组、单纯LPUS组和LPUS联合MBs组(LPUS+MBs)。分析自噬对MDA-MB-231细胞增殖活力的影响时, 分为Control组、ATG5 siRNA组、LPUS+MBs组、LPUS+MBs+ATG5 siRNA组。分析凋亡对MDA-MB-231细胞增殖活力的影响时, 分为Control组、Z-VAD-FMK组、LPUS+MBs组和LPUS+MBs+Z-VAD-FMK组。上述处理后, 细胞均继续培养24 h。

根据已发表的文献[2]进行LPUS处理。使用0.25%胰蛋白酶消化处理细胞后, 转移至平底的35 mm培养皿。将超声探头辐射面垂直向上置于装有细胞悬液的培养皿底部, 探头与培养皿管间涂有耦合剂, 0.5 W/cm²的1 MHz LPUS联合MBs造影剂作用于细胞达60 s。如联合MBs处理时, 在DMEM培养基中稀释SonoVue(Bracco公司)超声造影剂, 使终浓度为 2×10^6 MBs/mL。超声处理后, 细胞继续培养24 h。

1.3 吖啶橙染色

上述LPUS联合微泡处理后再培养24 h, 吸掉培养基, 加入事先配置好并预温的50 μ mol/L AO染液, 在37 °C培养箱中孵育MDA-MB-231细胞60 min; 吸管吸去上述液体, 加入新鲜的含有10% FBS的DMEM; 将6孔板转移至荧光显微镜下观察。

1.4 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察

上述LPUS联合MBs处理后, 在培养瓶中培养24 h, 再分别使用刮刀轻柔地将细胞从培养瓶上分离下来, 离心后转移至EP管。4 °C条件下, 2%戊二

醛固定过夜, PBS漂洗3次, 每次5 min。4 °C条件下, 1%锇酸固定2 h。4 °C条件下, 醋酸铀染色, 70%、80%、90%和100%丙酮梯度脱水, 进行预包埋和Epon812环氧树脂包埋, 再进行半薄切片, 并使用甲苯胺蓝染色。显微镜下观察进行细胞定位, 根据半薄切片的结果使用LKB-V超薄切片机进行超薄切片, 透射电镜下观察MDA-MB-231细胞中的自噬体。

1.5 GFP-LC3转染

消化MDA-MB-231细胞后, 在培养基液量为2 mL中将细胞密度调整至50%~70%。使用滴度为 10^{10} /mL的GFP-LC3腺病毒[汉恒生物科技(上海)有限公司物]进行感染, 感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为100。根据厂商的实验操作手册, 使用1 mL的无血清培养基稀释腺病毒, 具体计算方式为, 6孔板中MDA-MB-231细胞数量为 $(1\sim 2)\times 10^6$, 病毒数量为 2×10^8 , MOI值100, 腺病毒剂量为20 μ L。将培养基替换成无血清的培养基1 mL后, 把20 μ L的腺病毒溶于无血清的培养基中。37 °C培养箱中孵育2 h后, 无血清的培养基更换成正常培养基, 37 °C培养箱孵育过夜, 最后在倒置荧光显微镜下观察转染效率和效果。显微镜下观察到绿色荧光占据大部分细胞的时候, 根据实验设计进行处理。细胞转移到玻璃培养皿中培养24 h, 激光共聚焦显微镜(Leica TCS, SP8)观察。

1.6 Western blot

使用含有1%苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)的RIPA(radio-immunoprecipitation assay)细胞裂解液来提取细胞总蛋白质, 使用BCA方法测定蛋白质浓度, 按照浓度比例配置样品后进行SDS-PAGE分离蛋白质。切取需要的蛋白质到转移槽中, 通过湿转的方法将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜(Bio-Rad公司)上。5%的脱脂牛奶封闭2 h后, 在4 °C冰箱中使用ATG5、LC3-II和p62一抗(1:1 000稀释)孵育过夜, 最后在常温下使用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育2 h, 在成像系统(PerkinElmer公司)上加增强型化学发光液(enhanced chemiluminescent, ECL)(Thermo公司)进行曝光。得到的结果使用AlphaEaseFC 4.0软件进行蛋白质条带的半定量分析。

1.7 DAPI染色

MDA-MB-231细胞经过上述处理后在24孔板中培养24 h, 使用10%多聚甲醛在4 °C冰箱中固定

30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min, 再使用0.1% Triton X-100冰浴孵育2 min以穿透细胞膜, DAPI染液染色5 min。PBS清洗后在倒置荧光显微镜下观察。

1.8 膜联蛋白V/PI染色

在24孔板中铺完 2×10^4 细胞, 培养过夜后, 按照分组不同进行相应的处理, 根据膜联蛋白V/PI染色的说明书(上海碧云天生物技术有限公司)进行处理。使用0.25%的胰蛋白酶消化MDA-MB-231细胞后, 使用1 000 \times g的转速离心5 min, 使用膜联蛋白V-FITC染液染色10 min, 然后再使用PtdIns染液在20~25 °C条件下染色10 min。最后将MDA-MB-231细胞行流式细胞仪(FACSCaliber, BD公司), 分析细胞的凋亡率。

1.9 ATG5 siRNA的转染

ATG5 siRNA正义序列: 5'-AAU UCG UCC AAA CCA CAC AUC UCG A-3', 并由上海吉玛制药技术有限公司合成。MDA-MB-231细胞消化后置于6孔板中, 每孔加入 2×10^5 细胞。孵育过夜后使用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000进行转染, 具体的转染方法依据Invitrogen公司的操作手册。在转染48 h后根据实验设计中的处理方法进行干预。非特异性、非靶向的siRNA作为对照RNA。最后, 提取细胞总蛋白质行Western blot检测转染后ATG5沉默的程度。

1.10 Cell Counting Kit-8分析

MDA-MB-231细胞经过上述处理后, 在96孔板中每孔铺5 000个细胞, 培养24 h后更换成100 μ L新鲜的培养基, 再将10 μ L的CCK-8反应剂加入到每个孔中, 在37 °C培养箱中孵育1 h, 使用450 nm波长在酶标仪上读取D值。

1.11 统计学分析

SPSS 15软件包(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)分析数据, 不同组之间的差异应用方差分析ANOVA进行统计。两两之间的分析使用LSD方法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LPUS联合MBs处理可增加MDA-MB-231细胞中自噬体数目

为证实LPUS联合MBs对MDA-MB-231细胞自噬的促进作用, 经AO染色, GFP-LC3转染和TEM观察细胞中的酸性自噬泡和自噬体的数量, 发现相对于对照组, LPUS组细胞中红色荧光斑点明显增加,

而LPUS联合MBs组则进一步促进了细胞中酸性的红色荧光斑点数量的增加(图1A)。TEM观察发现, LPUS处理60 s后的细胞中双层膜结构的自噬体数量明显增加(图1B), 而LPUS联合MBs组中的自噬体数量则进一步增加。同样, 如图1C所示, GFP-LC3转染细胞后, 在LPUS联合MBs组处理后的细胞中观察到大量点状LC3阳性细胞, 这说明LPUS联合MBs明显提高MDA-MB-231细胞中自噬水平。

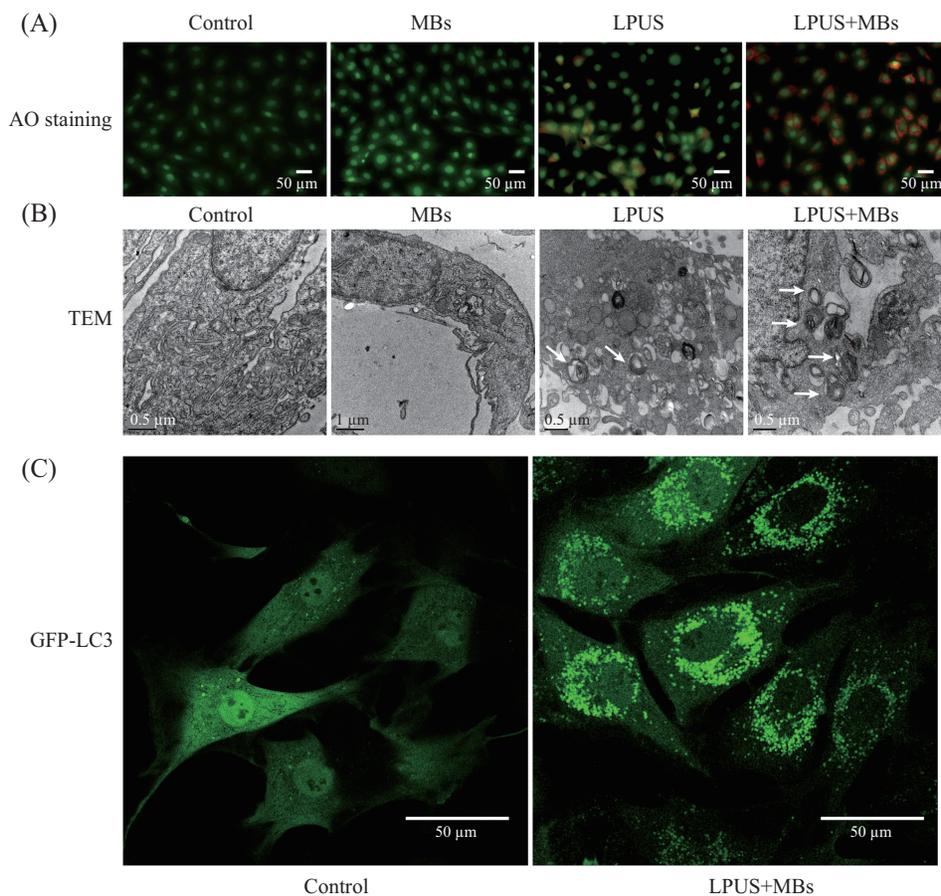
2.2 LPUS联合MBs处理可升高MDA-MB-231细胞自噬标志蛋白质水平

应用Western blot方法进一步分析LPUS联合MBs对MDA-MB-231细胞自噬水平的影响。功率为0.5 W/cm²的1 MHz LPUS联合MBs作用MDA-MB-231细胞60 s, 继续培养24 h后, 分析自噬标志蛋白质LC3、Beclin-1和p62水平。对照组和单纯MBs组中, 上述蛋白质水平并无差异, 但是相对于对照组和单纯LPUS组, LPUS联合MBs组中的LC3-II水平明显

升高($P<0.05$, 图2A和图2B)。ATG5与LC3-II的变化相似($P<0.05$, 图2A和图2C), 但是p62水平在LPUS联合MBs组明显下降, 这说明LPUS联合MBs明显激活MDA-MB-231细胞中的自噬($P<0.05$, 图2A和图2D)。

2.3 LPUS联合MBs处理促进MDA-MB-231细胞凋亡

DAPI染色、膜联蛋白V/PI染色以及cleaved caspase-3分析LPUS联合MBs对MDA-MB-231细胞凋亡的影响。LPUS作用60 s后, 经DAPI染色发现, 相对于对照组细胞中出现细胞核皱缩和碎裂的数量明显增加, 在LPUS联合MBs组中细胞核碎裂的细胞数量进一步增加($P<0.05$, 图3A)。膜联蛋白V/PI染色分析发现, LPUS联合微泡明显增加了MDA-MB-231细胞的凋亡, 达 30.36 ± 7.62 , 与对照组和单纯LPUS组相比具有统计学差异($P<0.05$, 图3B和图3C), 但是单纯MBs组并不会引起细胞的凋亡。

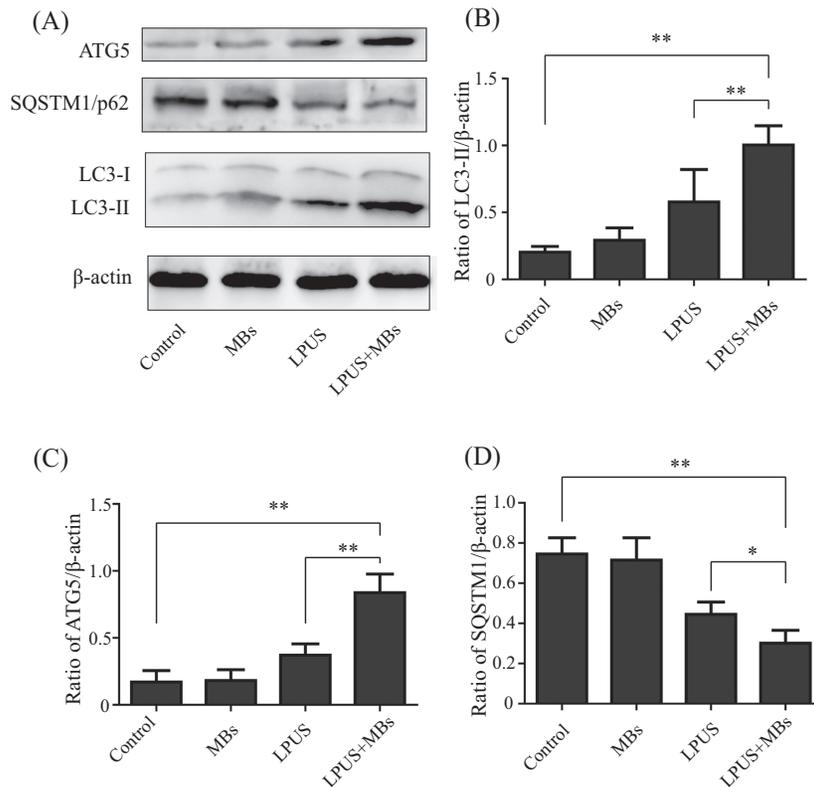


A: AO染色分析细胞中酸性囊泡数量; B: 透射电镜观察不同MDA-MB-231细胞中的自噬体; C: GFP-LC3转染的细胞中自噬体。

A: AO staining for the acidic vesicles; B: the autophagosome in MDA-MB-231 cells under TEM; C: the autophagosome in MDA-MB-231 cells transfected with GFP-C3 under confocal microscopy.

图1 LPUS联合MBs处理增加A-MB-231细胞自噬体数目

Fig.1 The number of autophagosome increased in the MDA-MB-231 cells treated with LPUS combined with MBs



A: Western blot分析自噬标志蛋白质水平; B: LC3-II的半定量分析; C: Beclin-1的半定量分析; D: p62的半定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。
A: the protein level of LC3-II, SQSTM1 and ATG5 determined by Western blot; B: semi-quantity analysis of LC3-II level; C: semi-quantity analysis of Beclin-1 level; D: semi-quantity analysis of p62 level. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$.

图2 LPUS联合MBs处理MDA-MB-231细胞对自噬标志蛋白质水平的影响

Fig.2 The levels of autophagy related proteins in MDA-MB-231 cells treated with LPUS combined with MBs

Caspase-3是凋亡的执行者, LPUS联合MBs明显比对照组和单纯LPUS组明显增加cleaved caspase-3水平($P < 0.05$, 图3D和图3E)。以上结果均说明, LPUS联合MBs处理显著提高了MDA-MB-231细胞凋亡的水平。

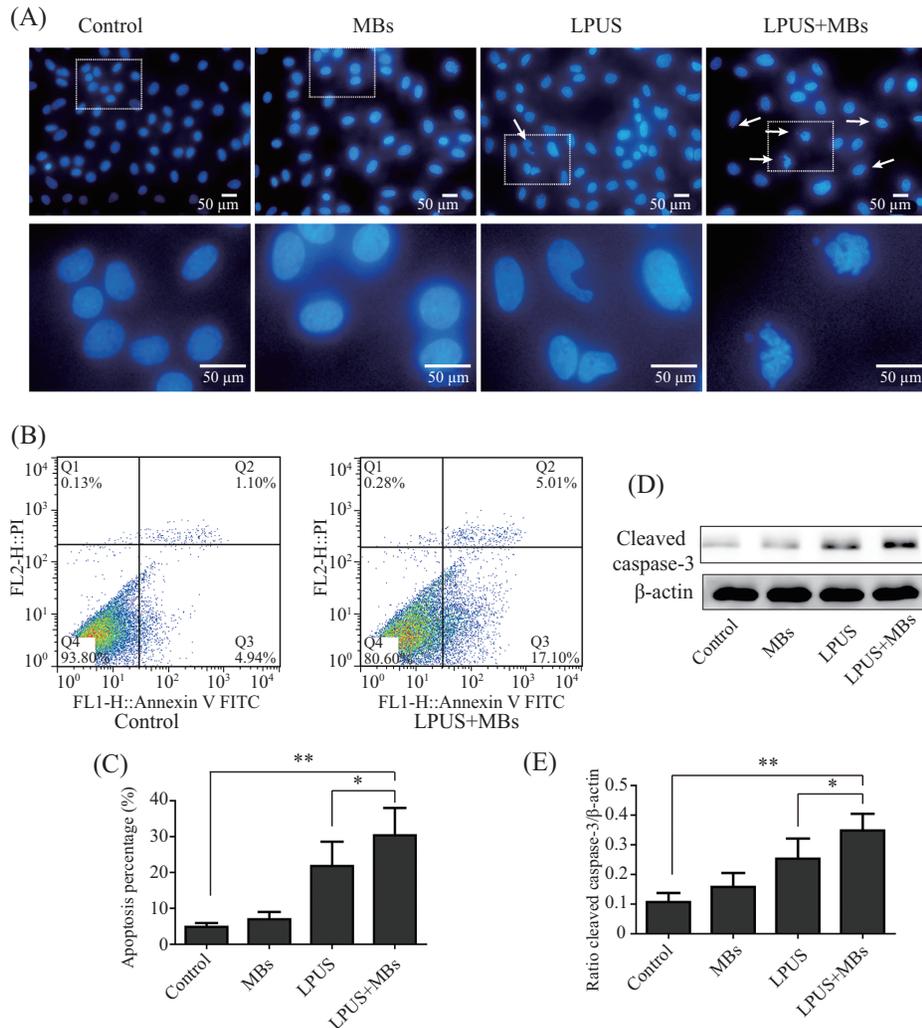
2.4 自噬和凋亡介导LPUS联合MBs抑制MDA-MB-231细胞增殖活力

RNAi方法沉默ATG5抑制自噬水平, 进一步分析自噬在LPUS联合MBs对MDA-MB-231细胞的作用。细胞转染ATG5 siRNA 48 h后, Western blot结果表明, 相对于转染Control siRNA的细胞, 转染ATG5 siRNA的细胞中ATG5的水平明显下降($P < 0.05$, 图4A和图4B), 此实验结果证实, ATG5被成功地沉默。LPUS联合MBs处理60 s后, 相对于转染Control siRNA的细胞, Western blot结果表明, 转染了ATG5 siRNA的细胞LC3-II水平明显下降, 证实ATG5的沉默降低了细胞中的自噬水平($P < 0.05$, 图4C和图4D)。CCK-8分析发现, LPUS联合MBs处理显著抑制细胞的增殖活力, 但是抑制自噬水平可以部分逆转LPUS联合MBs对细胞活力的抑制作用($P < 0.05$, 图4G)。

Z-VAD-FMK是caspase抑制剂, 可以显著抑制细胞的凋亡。Western blot分析表明, Z-VAD-FMK显著减少LPUS联合MBs处理引起的cleaved caspase-3的上升($P < 0.05$, 图4E和图4F), 证实细胞凋亡水平的下降。CCK-8分析发现, LPUS联合MBs处理显著抑制细胞的增殖活力, 但是抑制凋亡水平可以部分逆转LPUS联合MBs对细胞活力的抑制作用($P < 0.05$, 图4H)。

3 讨论

尽管全球范围内乳腺癌的发病率逐渐增加, 但是得益于先进的检查手段和系统性的治疗方法, 乳腺癌的死亡率在发达国家反而下降。然而, 目前三阴性乳腺癌的治疗手段效果较少且效果也较差^[4], 因此, 需要发展新方法来治疗三阴性乳腺癌。三阴性乳腺癌是指雌激素、孕激素和ERBB2/人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)基因缺乏的乳腺癌, 占有乳腺癌16%左右^[5], 本文所使用的MDA-MB-231细胞即为三阴乳腺癌



A: MDA-MB-231细胞的DAPI染色, 第一排中白色方框的图片放大成第二排, 箭头指凋亡的细胞核; B: 膜联蛋白V/PI染色; C: 根据膜联蛋白V/PI染色结果进行凋亡率的半定量分析; D: Western blot分析cleaved caspase-3蛋白质水平; E: cleaved caspase-3条带的半定量分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: DAPI staining for MDA-MB-231 cells. The figures in the upper row were enlarged into the figures in the lower row. The white arrows indicated the apoptotic nucleus; B: Annexin V/PI staining for MDA-MB-231 cells; C: apoptosis percentage according to the result of Annexin V/PI staining; D: the cleaved caspase-3 level determined by Western blot; E: semi-quantity analysis of cleaved caspase-3 level; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$.

图3 LPUS联合MBs促进MDA-MB-231细胞凋亡

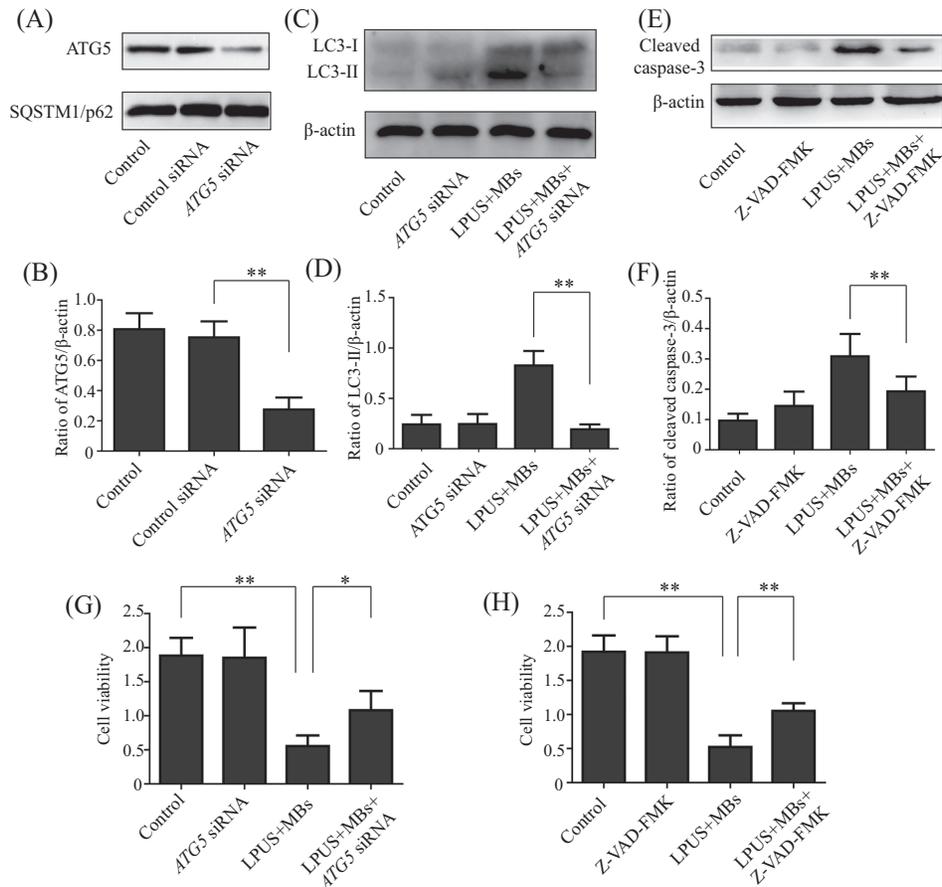
Fig.3 LPUS combined with MBS promoted apoptosis of MDA-MB-231 cells

细胞。通过化学、物理或者生物方法抑制乳腺癌细胞的增殖或诱导细胞的生长阻滞被认为是治疗三阴性乳腺癌的可行方法^[6], 而通过LPUS结合MBs抑制MDA-MB-231细胞增殖或许是将来有希望获得成功的一种治疗方式。

MBs是超声造影检查的增强剂, 直径小于 $10 \mu\text{m}$ ^[7]。在高频超声区域内MBs发生非线性的振动, 但是在LPUS区域内, MBs出现塌陷和击破, 可以诱导周围细胞产生大量的活性氧类(reactive oxygen species, ROS)发生氧化应激反应。另一方面, LPUS结合MBs可以引起微声流黏滞应力, 从而导致细胞骨架损伤

以及DNA链断裂, 两方面因素共同引起细胞凋亡, 但是对于细胞自噬尚不清楚^[8]。不仅如此, LPUS作用于MBs后引起空化作用, 增强组织中细胞膜的通透性, 促使DNA片段、药物和其他生物大分子等通过细胞膜上的穿孔运输至细胞内, 形成穿孔效应^[9]。细胞膜上的孔径大小为纳米级, 但MBs的大小是微米级, 因此难以进入到细胞内^[10]。目前尚未见MBs进入细胞内的报道, 亦无体内实验的研究, 但是临床上作为超声造影剂在患者体内的注射对患者的身体健康并未造成影响。

本文使用LPUS结合MBs作用于三阴性乳腺癌



A: Western blot分析ATG5蛋白质水平; B: ATG5条带的半定量分析; C: Western blot分析LC3-II蛋白质水平; D: LC3-II条带的半定量分析; E: Western blot分析cleaved caspase-3蛋白质水平; F: cleaved caspase-3条带的半定量分析; G: 抑制自噬水平后, CCK-8分析细胞增殖; H: 抑制凋亡水平后, CCK-8分析细胞增殖活力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: ATG5 level determined by Western blot; B: semi-quantity analysis of ATG5 level; C: LC3-II level determined by Western blot; D: semi-quantity analysis of LC3-II level; E: cleaved caspase-3 level determined by Western blot; F: semi-quantity analysis of cleaved caspase-3 level; G: CCK-8 analysis after autophagic inhibition; H: CCK-8 analysis after apoptotic inhibition。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图4 自噬和凋亡介导LPUS联合MBs抑制MDA-MB-231细胞增殖活力

Fig.4 LPUS combined with MBs inhibited the viability of MDA-MB-231 cells through the autophagy and apoptosis

MDA-MB-231细胞,发现相对于单纯MBs组和单纯LPUS组,LPUS结合MBs不仅可以促进MDA-MB-231细胞的凋亡,亦可引起细胞的自噬。更重要的是,本文证实LPUS结合MBs激活的凋亡和自噬在其抑制细胞增殖活力中具有重要的作用,这为将来临床治疗提供了一定的依据。

在乳腺癌细胞中,自噬是一把“双刃剑”,既有研究报道自噬通过清除损坏的细胞器和多余的蛋白质来保护乳腺癌细胞,亦有研究报道激活自噬导致细胞的死亡^[1],而自噬的具体作用或许与乳腺癌发展过程中的不同阶段和状态相关^[1,11]。自噬性死亡与MDA-MB-231细胞增殖活力的下降密切相关,治疗乳腺癌的多种药物与诱导自噬性死亡相关。研究发现,姜黄素与黄连素的合用可以通过诱导自噬性死亡和凋亡抑制MDA-MB-231细胞增殖活力^[6];萝卜

硫素通过激活自噬性死亡和凋亡诱导MDA-MB-231细胞的死亡^[12];香杉芝通过诱导氧化应激、凋亡和自噬性死亡发挥抗乳腺癌作用^[13]。因此,通过诱导自噬性死亡或许是抑制乳腺癌的方式之一。

本文观察到,LPUS结合MBs作用下,MDA-MB-231细胞中自噬泡数量的增加,ATG5、SQSTM1/p62和LC3-II蛋白质水平变化进一步证实了自噬的激活。自噬体膜上的LC3-II是自噬的经典标志物;SQSTM1/p62是携带特异性蛋白质给予自噬降解的“运输者”,胞质中SQSTM1/p62的水平反映该细胞中自噬的激活程度和蛋白质聚体的积聚程度,因此,SQSTM1/p62的水平与自噬水平相反^[11]。ATG5是自噬形成过程中必要的蛋白质,因此可以作为RNAi方法抑制自噬的沉默靶点^[14],并使用ATG5 siRNA抑制自噬水平后,证实了自噬性死亡在LPUS结合MBs抑

制MDA-MB-231细胞增殖活力中的作用,这与其他抗乳腺癌药物的研究结果相似。

细胞凋亡在消除肿瘤细胞中发挥了独立的作用,通过诱导肿瘤细胞凋亡可以显著抑制癌症的发展。与自噬类似,凋亡亦是程序性死亡方式之一,分为线粒体途径和死亡受体介导的途径,而caspases在凋亡过程中具有重要的作用,尤其是caspase-3是凋亡的执行者。Li等^[2]发现,LPUS通过诱导MDA-MB-231细胞凋亡增强姜黄素抗乳腺癌作用。本文发现,LPUS结合MBs促进MDA-MB-231细胞凋亡。Z-VAD-FMK通过降低caspase-3活性而抑制凋亡,同时也证实凋亡介导了LPUS结合MBs抑制MDA-MB-231增殖活力的作用。

综上所述,LPUS结合MBs处理可促进MDA-MB-231细胞自噬和凋亡,而通过沉默*ATG5*表达抑制自噬发生,从而缓解LPUS结合MBs引起的细胞增殖活力下降,另一方面,Z-VAD-FMK抑制凋亡同样缓解LPUS结合MBs引起的细胞增殖活力下降。因此,自噬和凋亡可能是LPUS结合MBs处理抑制MDA-MB-231细胞活力的机制之一。

参考文献 (References)

- Zarzynska JM. The importance of autophagy regulation in breast cancer development and treatment. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 710345.
- Li Y, Wang P, Chen X, Hu J, Liu Y, Wang X, *et al.* Activation of microbubbles by low-intensity pulsed ultrasound enhances the cytotoxicity of curcumin involving apoptosis induction and cell motility inhibition in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Ultrason Sonochem* 2016; 33: 26-36.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451(7182): 1069-75.
- Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: Therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007; 8(3): 235-44.
- Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012; 486(7403): 395-9.
- Wang K, Zhang C, Bao J, Jia X, Liang Y, Wang X, *et al.* Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Sci Rep* 2016; 6: 26064.
- Qiu Y, Zhang C, Tu J, Zhang D. Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection *in vitro* at low acoustic pressures. *J Biomechanics* 2012; 45(8): 1339-45.
- Gong Y, Wang Z, Dong G, Sun Y, Wang X, Rong Y, *et al.* Low-intensity focused ultrasound mediated localized drug delivery for liver tumors in rabbits. *Drug Deliv* 2016; 23(7): 2280-9.
- Chen YC, Jiang LP, Liu NX, Wang ZH, Hong K, Zhang QP. P85, Optison microbubbles and ultrasound cooperate in mediating plasmid DNA transfection in mouse skeletal muscles *in vivo*. *Ultrason Sonochem* 2011; 18(2): 513-9.
- Carson AR, McTiernan CF, Lavery L, Hodnick A, Grata M, Leng X, *et al.* Gene therapy of carcinoma using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37(3): 393-402.
- Yoshida GJ. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: From pathophysiology to treatment. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 67.
- Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, *et al.* Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30(9): 3381-90.
- Chang CT, Korivi M, Huang HC, Thiyagarajan V, Lin KY, Huang PJ, *et al.* Inhibition of ROS production, autophagy or apoptosis signaling reversed the anticancer properties of Anrodia salmonea in triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cells. *Food Chem Toxicol* 2017; 103: 1-17.
- Jiang LB, Cao L, Yin XF, Yasen M, Yishake M, Dong J, *et al.* Activation of autophagy via Ca-dependent AMPK/mTOR pathway in rat notochordal cells is a cellular adaptation under hyperosmotic stress. *Cell Cycle* 2015; 14(6): 867-79.