

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-01-010

• 论 著 •
• ORIGINAL ARTICLE •

TO901317 经 LXR α /NF- κ B 抑制 MCF-7 乳腺癌细胞迁移

涂剑^{1a}, 王彦翔^{1a}, 周志刚^{1b}, 杨萍^{1c}, 刘晓旺², 余平²

(1. 桂林医学院 a. 药学院 b. 第二附属医院 c. 临床医学院 桂林 541199; 2. 南华大学药学院 衡阳 421001)

摘要 目的 探究肝 X 受体(LXR) 激动剂 TO901317 对 MCF-7 人乳腺癌细胞迁移能力的作用及机制。方法 体外培养 MCF-7 细胞。先运用不同浓度的 TO901317 处理 MCF-7 细胞 24 h, 然后通过 LXR α siRNA 转染或核因子 κ B(NF- κ B) 抑制剂 PDTC 处理细胞, 划痕愈合实验检测 MCF-7 细胞迁移能力的改变, 同时运用蛋白免疫印迹法检测 LXR α 、NF- κ B p65 与 I κ B α 的表达。结果 随着 TO901317 处理浓度的增加, MCF-7 细胞的迁移能力明显得到抑制, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 同时 LXR α 与 I κ B α 的表达逐渐增强, 而 NF- κ B p65 的表达则显著降低。LXR α siRNA 可显著延缓 TO901317 的上述作用, PDTC 处理则进一步增强 TO901317 对乳腺癌细胞迁移的抑制作用。结论 TO901317 可激活 LXR α , 下调 NF- κ B p65、上调 I κ B α 的表达, 抑制乳腺癌细胞迁移。

关键词: TO901317; 肝 X 受体 α ; 核因子 κ B; MCF-7 乳腺癌细胞; 细胞迁移

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)01-0069-06

TO901317 inhibits the migration of MCF-7 breast cancer cells through LXR α /NF- κ B

TU Jian^{1a}, WANG Yanxiang^{1a}, ZHOU Zhigang^{1b}, YANG Ping^{1c}, LIU Xiaowang², YU Ping²

(1. a. College of Pharmacy b. The Second Affiliated Hospital, c. College of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. College of Pharmacy, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of liver X receptor (LXR) agonist TO901317 on the migration ability of MCF-7 human breast cancer cells. **Methods** MCF-7 cells were cultured in vitro. At first, MCF-7 cells were treated with TO901317 with different concentrations for 24 h, and then the cells were transfected with LXR α siRNA or treated with PDTC, a nuclear factor κ B (NF- κ B) inhibitor. The

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060662 81541163); 广西区自然科学基金项目(2022JJA140776 2022JJA140639); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202110601011)。

第一作者: 涂剑, 博士, 教授, 研究方向为肿瘤药理; 王彦翔, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理。

通信作者: 余平, 1941775346@qq.com。

changes of migration ability of MCF-7 cells were detected by scratch healing experiment, and the expressions of LXR α , NF- κ B p65 and I κ B α were detected by Western blot. **Results** With the increase of TO901317 concentration, the migration ability of MCF-7 cells was obviously inhibited, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At the same time, the expressions of LXR α and I κ B α increased gradually, while the expression of NF- κ B p65 decreased significantly. LXR α siRNA can significantly delay the above-mentioned effects of TO901317, and PDTC treatment can further enhance the inhibitory effect of TO901317 on breast cancer cell migration. **Conclusion** TO901317 can activate LXR α , down-regulate NF- κ B p65, up-regulate the expression of I κ B α , and inhibit the migration of breast cancer cells.

Keywords: TO901317; liver X receptor α ; NF- κ B; MCF-7 breast cancer cells; cell migration

乳腺癌的发病率全球第一,死亡率世界第五,均位于世界前列^[1],但截至目前其发病机制尚不明确,故深入探究相关分子机制,对乳腺癌的靶向治疗具有重大意义。肝 X 受体(liver X receptor, LXR)包含 LXR α 和 LXR β 两种亚型,能够被人工合成配体(TO901317)、氧固醇等激活,然后同维甲酸结合激发二聚体活性,参与乳腺癌、结肠癌、肝癌等多种癌症的发展进程^[3-6]。有研究结果表明,激活 LXR α 可以调节细胞周期信号,抑制 S 期激酶相关蛋白^[7];而本课题组前期研究也发现,激活 LXR α 可以下调细胞周期蛋白 D1 活性,抑制乳腺癌细胞增殖^[8-9]。上述研究结果提示, LXR α 可能为抑癌因子,有望成为乳腺癌调控的新靶点。癌细胞的持续增殖是癌症出现转移的先决条件^[10],而炎症因子能促进乳腺癌细胞的迁移,核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路是调控炎症和癌症的关键^[11-12]。因此,本文主要探讨 TO901317 经 NF- κ B 对 MCF-7 乳腺癌细胞迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞(实验室保存);超敏型 ECL 发光试液、胰蛋白酶和 RIPA 裂解液(购自碧云天生物技术研究所);LXR 激动剂 TO901317(购自美国 Cayman 科技有限公司);NF- κ B p65 和 I κ B α 兔源一抗(购自美国 Proteintech 公司);PDTC 和 β -actin 鼠源一抗(购自美国 Sigma 公司);LXR α 兔源一抗(购自美国 Epitomics 公司);HRP 标记的羊抗鼠 IgG(购自艾佳生物科技股份有限公司);HRP 标记的羊

抗兔 IgG(购自北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养和转染

采用高糖培养基培养人乳腺癌 MCF-7 细胞。当接种的细胞密度达 50%~60% 时即可进行细胞转染,严格按照转染试剂盒说明书步骤加入转染试剂和 siRNA。处理后的各组细胞培养 6 h 后更换新鲜的高糖培养基,48~72 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3 划痕愈合实验

用胰酶消化生长状态良好的细胞。计数后以每孔 5×10^5 个的细胞密度接种于六孔板中,加入含 10% 胎牛血清培养基,摇匀后轻轻置于培养箱中。细胞贴壁且状态良好时进行划痕,继续放入培养箱中孵育。按划痕 0 h、24 h 时镜下拍照记录。使用 Image J 软件分析图片,计算细胞迁移率。

1.4 蛋白免疫印迹(Western blot)

将已处理好的各组细胞加入裂解液裂解 0.5 h。4 $^{\circ}$ C 离心后收集上清液。收集到的蛋白需严格按照 BCA 蛋白定量试剂盒的说明检测各组浓度。检测浓度后,将蛋白加入适量 1 \times 蛋白上样缓冲液高温变性 10 min 后进行电泳,浓缩胶 80 V 电泳 0.5 h,分离胶 120 V 电泳 1 h,250 mA 恒流转膜 1.5 h,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,最后分别孵育对应的一抗和二抗。在全自动化学发光成像仪中加入发光液进行显影,得到的条带用 Alpha Imager 2200 软件灰度扫描分析各基因的灰度值。

1.5 统计学方法

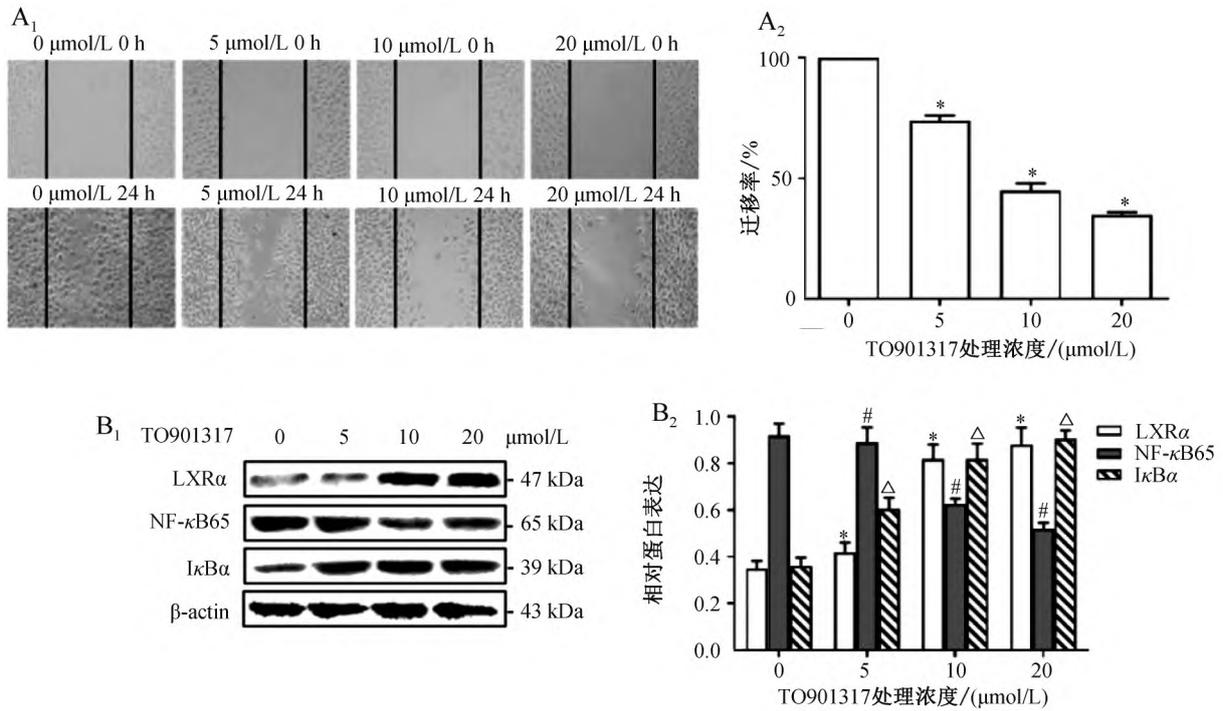
采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验和方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TO901317 抑制 MCF-7 细胞迁移及对 LXR α 、NF- κ B 等表达的影响

使用 TO901317 处理 MCF-7 细胞,按照不同浓度分为 4 个处理组,即 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$,划痕 24 h 后观察细胞愈合程度。结果显示,随着药物浓度的

递增,MCF-7 细胞划痕愈合速度呈现递减的趋势(图 1A₁、A₂)。这提示 TO901317 可以显著抑制 MCF-7 细胞的迁移能力。此外,通过 Western blot 检测发现,药物浓度的增加可引起 LXR α 、NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B, I κ B α) 的表达上调,NF- κ B p65 的表达下调(图 1B₁、B₂)。



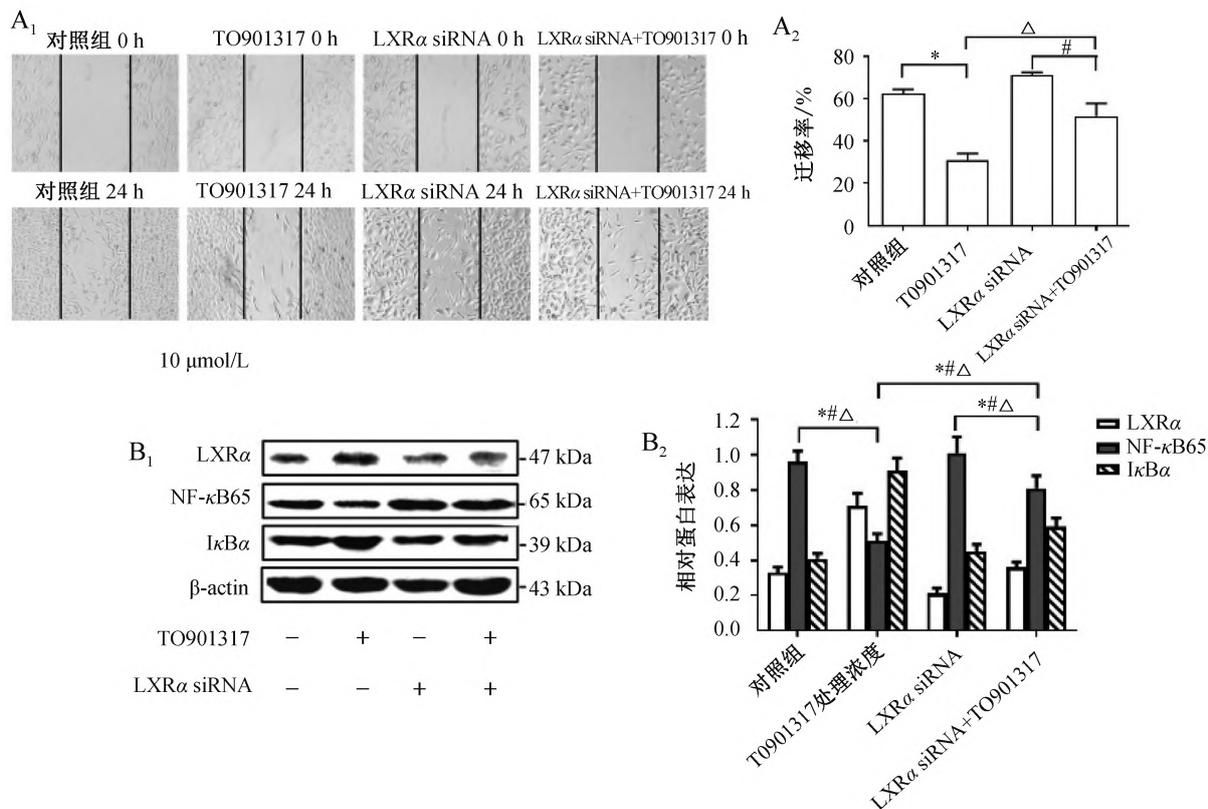
注: A₁ 为不同浓度 TO901317 对 MCF-7 细胞迁移能力影响的划痕图(划痕愈合实验检测,40 \times),A₂ 为统计图; B₁ 为不同浓度 TO901317 处理 MCF-7 细胞后 LXR α 、NF- κ B、I κ B α 蛋白表达变化的显影图(Western blot 检测),B₂ 为统计图;与 0 $\mu\text{mol/L}$ TO901317 处理组相比,*、#、 Δ 表示 $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度 TO901317 对 MCF-7 细胞迁移及 LXR α 、NF- κ B、I κ B α 表达的影响

2.2 LXR α siRNA 对 MCF-7 细胞迁移能力及 LXR α 、NF- κ B 表达的影响

单独给予 TO901317 药物的 MCF-7 细胞迁移率比对照组下降更显著(图 2A₁、A₂)。而敲低 LXR α 的表达后,TO901317 对 MCF-7 细胞迁移能力的抑制作用减弱。进一步通过 Western blot 实验检测发现:TO901317 和 LXR α siRNA 共同处理后的乳腺癌细

胞中 LXR α 蛋白表达的上调幅度低于单独给予 TO901317 组的乳腺癌细胞,表明敲低 LXR α 表达后可能抑制 TO901317 对 LXR α 表达的上调作用。此外,在 TO901317 和 LXR α siRNA 共同处理组中,敲低 LXR α 的表达,同样降低 TO901317 对 NF- κ B p65 表达的下调作用(图 2B₁、B₂)。



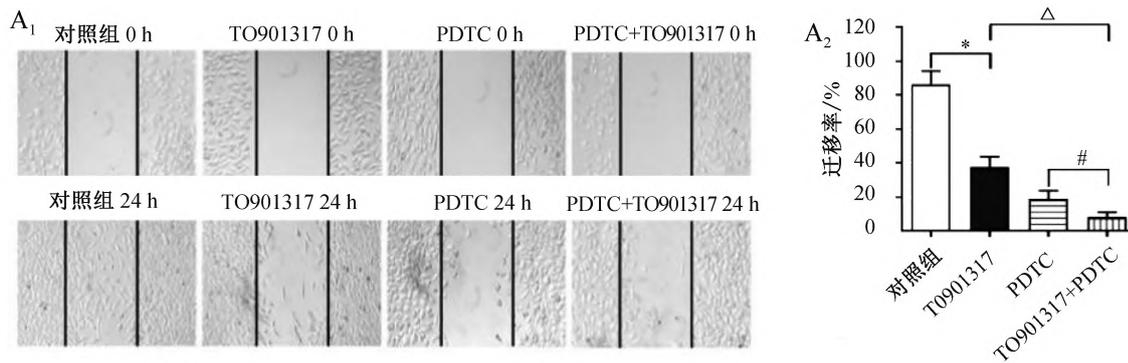
注: A₁ 为敲低 LXRα 表达后对 MCF-7 细胞迁移能力影响的划痕图(划痕愈合实验检测 40×), A₂ 为统计图; B₁ 为敲低 LXRα 表达后 MCF-7 细胞中 LXRα、NF-κB、IκBα 蛋白表达变化的显影图(Western blot 检测), B₂ 为统计图; 分别与对照组、LXRα siRNA 以及 TO901317 组比较, *、#、Δ 表示 P<0.05; + 表示加入, - 表示不加入。

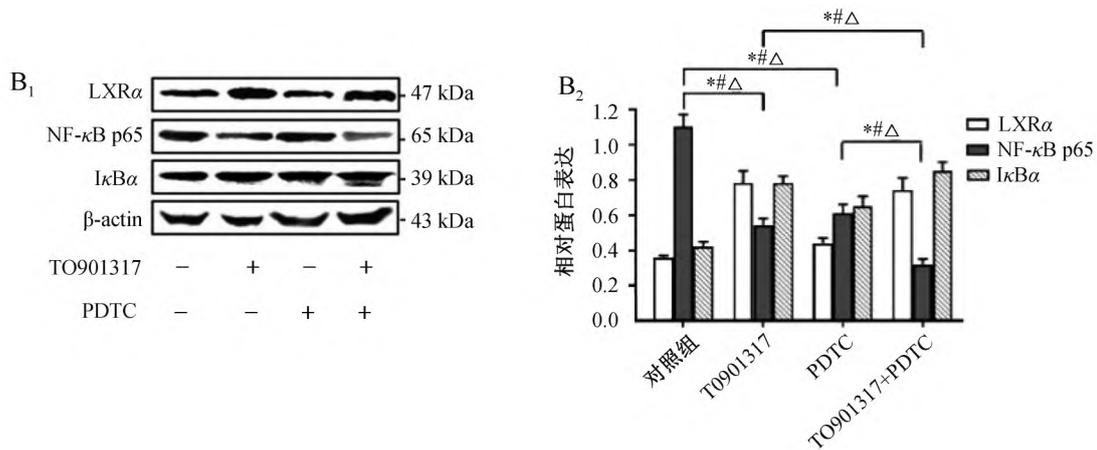
图 2 LXRα siRNA 对 MCF-7 细胞迁移及 LXRα、NF-κB、IκBα 表达的影响

2.3 NF-κB 抑制剂 PDTC 对 MCF-7 细胞迁移能力及 LXRα、NF-κB 表达的影响

划痕愈合实验结果显示,单独给予 PDTC 和单独给予 TO901317 都能使细胞迁移率显著降低,表明抑制 NF-κB 的表达可以抑制 MCF-7 细胞迁移能力;而当乳腺癌细胞共同给予 TO901317 和 PDTC 处理

时,细胞的迁移率明显进一步下降(图 3A₁、A₂)。Western blot 实验结果表明,TO901317 和 PDTC 单独处理的乳腺癌细胞中 IκBα 的表达上调、NF-κB p65 的表达下调,两者共同作用后 NF-κB p65 表达下调的趋势更为显著(图 3B₁、B₂)。





注: A₁ 为 PDTC 对 MCF-7 细胞迁移能力影响划痕图(划痕愈合实验检测 40 \times) A₂ 为统计图; B₁ 为 PDTC 处理后 MCF-7 细胞中 LXR α 、NF- κ B、I κ B α 蛋白表达变化的显影图(Western blot 检测) B₂ 为统计图; 分别与对照组、PDTC 组和 TO901317 组比较, *、#、 Δ 表示 $P < 0.05$; + 表示加入, - 表示不加入。

图 3 PDTC 对 MCF-7 细胞迁移及 LXR α 、NF- κ B、I κ B α 表达的影响

3 讨论

世界卫生组织最新数据显示,全球乳腺癌发病率在逐年升高,严重威胁患者的生命和健康,对患者的家庭以及整个社会造成严重的负担^[1,13]。因此,寻找新的乳腺癌靶向药物显得尤为重要。

据近年的相关研究报道^[14],LXR α 在乳腺癌患者中低表达,上调 LXR α 的表达能够抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭,并促进乳腺癌细胞凋亡,这表明 LXR α 与乳腺癌的发展进程密切相关。TO901317 是 LXR α 人工合成激动剂,尤其对 LXR α 基因具有高亲和力,TO901317 激活 LXR α 后可显著抑制乳腺癌细胞增殖^[9,15]。癌细胞不断增殖的能力与癌细胞出现转移息息相关,而癌细胞转移是严重阻碍晚期癌症患者治愈的关键因素之一。炎症反应能够促进肿瘤复发转移,在某些肿瘤类型早期细胞癌变阶段就已出现。NF- κ B 是一种诱导型转录因子,其主要形式为 p50 和 p65 组成的二聚体,其中 p65 主要参与基因转录的起始调节。NF- κ B 可以调控炎症细胞因子、趋化因子等直接靶向调节炎症,且在乳腺癌中呈现异常高表达^[16]。有文献报道,LXR α 被激活后可抑制 NF- κ B 途径来抑制炎症因子表达^[17]。I κ B α 是调节 NF- κ B 活性的重要蛋白,能够抑制 NF- κ B 活化,进而达到抑制促炎因子基因的转录激活。

本研究采用划痕愈合实验检测了 4 种不同

TO901317 浓度处理组,结果表明,随着处理浓度的增加,乳腺癌 MCF-7 细胞的迁移率逐渐降低,且迁移率降低的程度与 TO901317 浓度的增加息息相关。与此同时,Western blot 实验结果显示,随着 TO901317 浓度的增加,LXR α 、I κ B α 的表达逐渐升高,NF- κ B p65 的表达则逐渐降低。I κ B α 能够与 NF- κ B 结合,是其关键调控蛋白,能够抑制 NF- κ B p65 调控促炎因子的转录激活,I κ B α 表达逐渐升高能够进一步说明 NF- κ B p65 活性被抑制。上述结果表明,TO901317 能够抑制乳腺癌细胞迁移并上调 LXR α 的表达、下调 NF- κ B p65 的表达,但 TO901317 抑制乳腺癌细胞迁移的机制是否与 LXR α /NF- κ B 通路相关还需进一步验证。接下来课题组将 LXR α siRNA 和 TO901317 同时给予到乳腺癌细胞中,发现敲低 LXR α 的表达后,TO901317 对 MCF-7 细胞迁移能力的抑制作用减弱,且显著降低 TO901317 对 LXR α 、I κ B α 表达的上调作用以及对 NF- κ B p65 表达的下调作用,提示 TO901317 抑制乳腺癌细胞迁移的机制与 LXR α 表达上调密切相关。进一步通过 NF- κ B 抑制剂 PDTC 处理 MCF-7 细胞,单独给予 PDTC 能使乳腺癌细胞迁移率显著降低,且 LXR α 的表达并未随之同步被调节,表明 NF- κ B p65 受 LXR α 的调控。而同时给予细胞 PDTC 和 TO901317 后,NF- κ B p65 表达显著下调,下调幅度大于 PDTC 和 TO901317 单独处理组。

4 结论

LXR α 被 TO901317 激活后,可显著抑制乳腺癌细胞迁移,且这种抑制作用可能与 LXR α 下调 NF- κ B p65 表达,抑制相关通路有关。本研究结果揭示了 LXR α /NF- κ B 通路在乳腺癌转移中的作用,有望为乳腺癌的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] 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): 209-249.
- [2] 郭心怡,吕青.2023 年《NCCN 乳腺癌风险降低指南》解读[J].*中国胸心血管外科临床杂志*, 2023, 30(6): 787-804.
- [3] LIANTO P, HUTCHINSON S A, MOORE J B, et al. Characterization and prognostic value of LXR splice variants in triple-negative breast cancer [J]. *iScience* 2021, 24(10): 103212.
- [4] PICCININ E, CARIELLO M, MOSCHETTA A. Lipid metabolism in colon cancer: role of Liver X Receptor (LXR) and Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) [J]. *Mol Aspects Med* 2021, 78: 100933.
- [5] DU D Y, LIU C, QIN M Y, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Pharm Sin B* 2022, 12(2): 558-580.
- [6] BOVENGA F, SABBÀ C, MOSCHETTA A. Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer [J]. *Cell Metab* 2015, 21(4): 517-526.
- [7] LI Y T, JING C W, TANG X Y, et al. LXR activation causes G1/S arrest through inhibiting SKP₂ expression in MIN₆ pancreatic beta cells [J]. *Endocrine* 2016, 53(3): 689-700.
- [8] 涂剑,刘晓旺,李涛,等.在人乳腺癌细胞增殖中 LXR α 、NF- κ B p65 和 cyclinD1 的差异表达(英文) [J].*生物化学与生物物理进展* 2016, 43(3): 226-235.
- [9] 涂剑,陆凯强,丁维珂,等.TO901317 通过上调 LXR α 表达促进人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡 [J].*中国病理生理杂志* 2016, 32(5): 836-840.
- [10] SAHA T, SOLOMON J, SAMSON A O, et al. Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer [J]. *J Clin Med* 2021, 10(16): 3498.
- [11] CRUCERIU D, BALDASICI O, BALACESCU O, et al. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches [J]. *Cell Oncol (Dordr)* 2020, 43(1): 1-18.
- [12] LIU B D, SUN L J, LIU Q, et al. A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis [J]. *Cancer Cell* 2015, 27(3): 370-381.
- [13] XIONG T, LI Z H, HUANG X L, et al. TO901317 inhibits the development of hepatocellular carcinoma by LXR α /Glut1 decreasing glycometabolism [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019, 316(5): G598-G607.
- [14] HAN X, WEI L L, WU B. PRMT5 promotes aerobic glycolysis and invasion of breast cancer cells by regulating the LXR α /NF- κ Bp65 pathway [J]. *Onco Targets Ther* 2020, 13: 3347-3357.
- [15] 王彦翔,刘叶琴,袁敏,等.肝 X 受体 α : 胆固醇转运和癌症调控的共同平台 [J].*华夏医学* 2023, 36(3): 8-13.
- [16] XU Q X, YU J S, JIA G W, et al. Crocin attenuates NF- κ B-mediated inflammation and proliferation in breast cancer cells by down-regulating PRKCQ [J]. *Cytokine* 2022, 154: 155888.
- [17] LI P, WANG G, ZHANG X L, et al. MicroRNA-155 promotes heat stress-induced inflammation via targeting liver X receptor α in microglia [J]. *Front Cell Neurosci* 2019, 13: 12.

[收稿日期: 2023-09-22]

[责任编辑: 桂根浩 英文编辑: 覃涛]