

Surfactin 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及细胞骨架的影响

曹小红, 王爱华, 王春玲, 鲁梅芳, 焦润芝, 朱慧, 赵思思

天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457

摘要: 以体外培养的人乳腺癌细胞株 MCF-7 为研究对象, 探讨 surfactin 对肿瘤细胞增殖、凋亡及细胞骨架的影响。MTT 实验表明, surfactin 能抑制 MCF-7 的增殖, 并且呈现出浓度和时间的依赖关系, 作用 48 h 时的 IC_{50} 是 27.3 $\mu\text{mol/L}$ 。AO/EB 荧光染色法及流式细胞术检测发现, surfactin 可诱导 MCF-7 发生典型的凋亡形态学改变和 G_2/M 期阻滞。免疫荧光和免疫印迹结果表明, surfactin 显著抑制了细胞内 vimentin 的表达, 诱导了 α -tubulin 的解聚和重排, 使细胞的骨架系统发生了剧烈的变化。可见, surfactin 具有抑制 MCF-7 细胞增殖, 诱导细胞凋亡的作用, 其机制可能与细胞骨架蛋白的表达水平有关。

关键词: surfactin, 增殖, 凋亡, 细胞骨架

Effects of surfactin on proliferation, apoptosis and cytoskeleton in human breast cancer MCF-7 cells

Xiaohong Cao, Aihua Wang, Chunling Wang, Meifang Lu, Runzhi Jiao, Hui Zhu, and Sisi Zhao

College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: We studied the effect of surfactin on cell proliferation, apoptosis and the cytoskeleton in human breast cancer cell line MCF-7 *in vitro*. The result of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) showed that the surfactin inhibited proliferation of MCF-7 cells in a dose- and time-dependent manner, with IC_{50} at 48 h of 27.3 $\mu\text{mol/L}$. Surfactin-induced cell death was considered to be apoptotic by observing the typical apoptotic morphological changes by AO/EB staining. Flow cytometric analysis also demonstrated that surfactin caused time-dependent apoptosis of MCF-7 cells through cell arrest at G_2/M phase. Immunofluorescence and Western blotting showed that surfactin significantly suppressed the expression of vimentin, induced the α -tubulin depolymerization and rearrangement and then the skeleton system of the cells changed dramatically. Based on our findings, surfactin can significantly inhibit the growth of MCF-7 cells and induce apoptosis.

Keywords: surfactin, proliferation, apoptosis, cytoskeleton

细胞凋亡是一种主动的由基因决定的细胞自我死亡的过程。肿瘤过多过快地增长是由于肿瘤细胞

死亡过少及增殖过多的共同结果。许多抗癌药物通过干扰肿瘤的增殖、生长等过程诱导细胞凋亡, 从

Received: July 21, 2009; **Accepted:** September 18, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z319).

Corresponding author: Xiaohong Cao. Tel: +86-22-60601455; Fax: +86-22-60601332; E-mail: wahwayayu@126.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA10Z319)资助。

而最终导致肿瘤细胞的程序化死亡^[1]。

由微丝、微管和中间丝共同构成的细胞骨架是直接连接细胞表面与细胞核的唯一结构,因此成为细胞外信号和核内基因表达之间的桥梁;近年对细胞凋亡信号传导的研究发现:三种细胞骨架在细胞凋亡过程中变化非常活跃,它们在细胞内的状态直接影响凋亡信号的终点^[2-3];表明细胞骨架可能是信号传导的空间调控者和功能性分子。

目前,国内外对 surfactin 的研究主要集中在其表面活性方面,而对其生物活性特别是在抗肿瘤活性方面的研究少有报道。本研究通过观察 surfactin 对细胞骨架分布及完整性的影响,来深入探讨 surfactin 抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* TK-1(以下简称 TK-1),自日本高桥佑藏研究所生产的纳豆素中分离得到。人乳腺癌细胞株 MCF-7,由天津科技大学生物资源与功能食品研究室馈赠。MTT(溴化-4,5-二甲基-2-噻唑基-2,5-二苯基氮唑)、碘化丙啶(PI)、丫啶橙(AO)及溴化乙锭(EB)均购自 Sigma 公司。鼠抗人 vimentin、鼠抗 α -tubulin、FITC 标记羊抗鼠 IgG 均为 Santa cruz 生物工程公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 surfactin 的分离纯化

通过酸沉、醇提、薄层层析和 HPLC 等^[4]方法从 *Bacillus natto* TK-1 发酵液中分离纯化得到分子量为 1036 D 的脂肪酸链上有 15 个碳的环状 surfactin。

1.2.2 肿瘤细胞体外增殖抑制实验

采用 MTT 法,取对数生长的肿瘤细胞 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔培养板上,每孔 0.1 mL。设不同浓度的实验组和空白对照组,每组设 5 个平行孔。贴壁生长的细胞需培养 24 h,待细胞贴壁后再加入不同浓度的 surfactin(其中浓度分别为 10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、60 μ mol/L、80 μ mol/L、100 μ mol/L),继续培养 24、48、72 h,实验终止前 4 h 加入 MTT 液,再培养 4 h,弃上清加

DMSO 150 μ L,在波长 570 nm 处测定吸光值,计算细胞存活率。存活率% = 加药组平均 OD 值/对照组平均 OD 值 \times 100%

1.2.3 细胞荧光染色(AO/EB 染色)

取对数生长期细胞,以 1×10^6 个细胞/瓶接种于 50 mL 的细胞培养瓶中,24 h 后用 27.3 μ mol/L surfactin 分别干预 24 h 和 48 h。收集上清细胞和贴壁细胞,PBS 洗 2 次,制成细胞悬液,加入 AO/EB 染液混匀。取 1 滴混合悬液滴于载玻片上,覆盖盖玻片,在荧光显微镜下观察 200 个细胞,分别计数。结果判断:活细胞(VN),核染色质着绿色并呈正常结构;早期凋亡细胞(VA),核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状;非凋亡的死亡细胞(NVN),核染色质着橘红色并呈正常结构;晚期凋亡细胞(NVA),核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。每次实验重复 3 次,计算平均凋亡率。细胞凋亡率计算公式:凋亡率(%) = (VA+NVA)/(VN+NVN+VA+NVA) \times 100%。

1.2.4 流式细胞术(FCM)分析细胞周期阻断与凋亡

细胞单层接种在培养瓶中,细胞数为 1×10^6 个/mL,培养 24 h 后加药,在 MCF-7 细胞中加入 27.3 μ mol/L 的样品,分别培养 0、24、48 h,收集贴壁的细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,用预冷的 PBS 液重悬细胞,1000 r/min 离心 5 min,重复 1 次,70%冰乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 18 h,离心弃去固定液,PBS 洗 2 次,1.0 g/L 核糖核酸酶 A,溶液 37 $^{\circ}$ C 水浴处理 30 min,随后加入 250 μ L 75 μ mol/L 的碘化丙啶(PI),4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,用流式细胞仪检测肿瘤细胞周期变化及细胞凋亡率,激发和发射波长分别为 488 nm 和 630 nm。

1.2.5 Vimentin 及 α -tubulin 免疫荧光染色

在无菌盖玻片上接种 MCF-7 细胞,置 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,用 27.3 μ mol/L surfactin 分别处理不同时间。定时取盖玻片做如下处理:PBS 清洗 2 次,3.7%甲醛室温固定 15 min,0.1% Triton X-100 透化处理 5 min,1% BSA-PBS 封闭 30 min,4 $^{\circ}$ C 湿盒内一抗(小鼠单抗 anti-vimentin,小鼠单抗 anti- α -tubulin)孵育过夜(1:100;1% BSA-PBS 稀释)。PBS 漂洗 3 次后,37 $^{\circ}$ C, FITC 荧光二抗避光孵育 1 h(1:100;1% BSA-PBS 稀释)。树脂封片,立刻用荧光显微镜观察。

1.2.6 Vimentin 和聚合微管蛋白免疫印迹检测

参照 Kavallaris 等^[5]的方法检测聚合微管的比例, 0.25%胰酶消化收集 surfactin 作用不同时间的细胞, PBS 清洗 2 次, 加入 200 μL 低渗裂解液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光裂解 10 min; 16 000 r/min 室温离心 10 min, 沉淀用 100 μL 低渗缓冲液重悬, 冰浴 30 min, 1000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 除去不溶的细胞碎片, 此部分的上清中即含有原来聚合的微管蛋白。Vimentin 和聚合微管蛋白免疫印迹分析: SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭 30 min, 用含 0.05% Tween20 的 PBS 漂洗 3 次, 一抗(小鼠单抗 anti-vimentin, 小鼠单抗 anti- α -tubulin)孵育过夜, PBS 漂洗 3 次后, 辣根酶标记二抗孵育 1 h。洗膜后 DAB 显色。以 β -actin 作内参照。采用凝胶成像分析软件对条带进行灰度扫描, 以目的条带和内参照灰度的比值表示蛋白含量。

2 结果

2.1 Surfactin 对 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖抑制作用

Surfactin 对 MCF-7 人乳腺癌细胞活力的影响如图 1 所示。从图中可以看出, Surfactin 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖, 并且随着作用时间的延长和浓度的增加, 抑制率增加, 即呈现出时间和浓度依赖关系。其中细胞被 Surfactin 处理 48 h 时的 IC_{50} 为 27.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

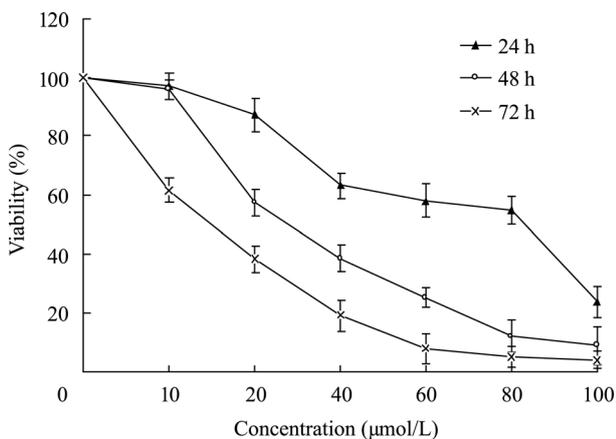


图 1 Surfactin 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制作用 (MTT)

Fig. 1 Growth inhibitory effect of Surfactin in MCF-7 human breast cancer cells (MTT).

2.2 荧光染色检测细胞凋亡

AO/EB 荧光染色发现(图 2a), 对照组细胞呈绿色荧光未见凋亡改变。surfactin 处理 24 h 后(图 2b), 可以观察到典型的早期凋亡细胞和坏死细胞。早期凋亡细胞的细胞核染色质也被 AO 染成绿色或黄绿色, 但染色不均一, 荧光增强, 细胞核呈固缩状或圆株状。坏死细胞的核染色质被 EB 染色呈橙色或红色但细胞核模糊。随孵育时间延长到 48 h(图 2c), 出现晚期凋亡细胞, 其核染色质被 EB 染成橙色或红色并呈固缩状或圆株状, 或边集在核膜内侧呈新月体型排列, 或呈碎裂状, 部分细胞可以出芽形成凋亡小体。各组凋亡细胞计数取平均凋亡率作统计学分析(表 1), 结果显示随孵育时间延长, MCF-7 细胞凋亡明显增加, 与对照组相比较, $P < 0.01$ 。

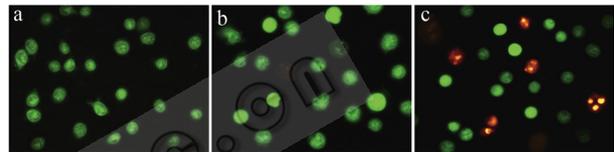


图 2 AO/EB 染色法观察 MCF-7 细胞形态改变

Fig. 2 Morphological observation of MCF-7 cells using AO/EB staining. (a) Control. (b) 24 h. (c) 48 h.

表 1 MCF-7 细胞经 27.3 $\mu\text{mol/L}$ surfactin 作用后细胞凋亡计数

Table 1 Effect of surfactin on the average apoptotic rate of MCF-7 cells

Time (h)	Cell numbers					Apoptotic cells (%)
	VA	NVA	VN	NVN	Amount	
0	3	0	196	1	200	1.5%
24	22	3	169	6	200	12.5%**
48	28	10	153	9	200	19.0%**

Note: ** $P < 0.01$

2.3 FCM 检测细胞周期阻断与凋亡结果

流式细胞术 PI 染色结果显示(图 3), 27.3 $\mu\text{mol/L}$ 的 surfactin 对 MCF-7 细胞作用 0、16、32、48 h 后, G_2/M 期细胞比例逐渐增加。该时期细胞数比例从 $(9.2 \pm 2.4)\%$ 提高至 $(42.7 \pm 1.9)\%$, 同时凋亡细胞碎片也逐渐从 $(2.24 \pm 0.96)\%$ 增加到 $(13.2 \pm 2.3)\%$, 并发现亚二倍体峰。上述结果表明, surfactin 能使 MCF-7 肿瘤细胞的增殖周期阻断在 G_2/M 期, surfactin 可能通过阻断细胞周期和诱导细胞凋亡而抑制肿瘤细胞生长。

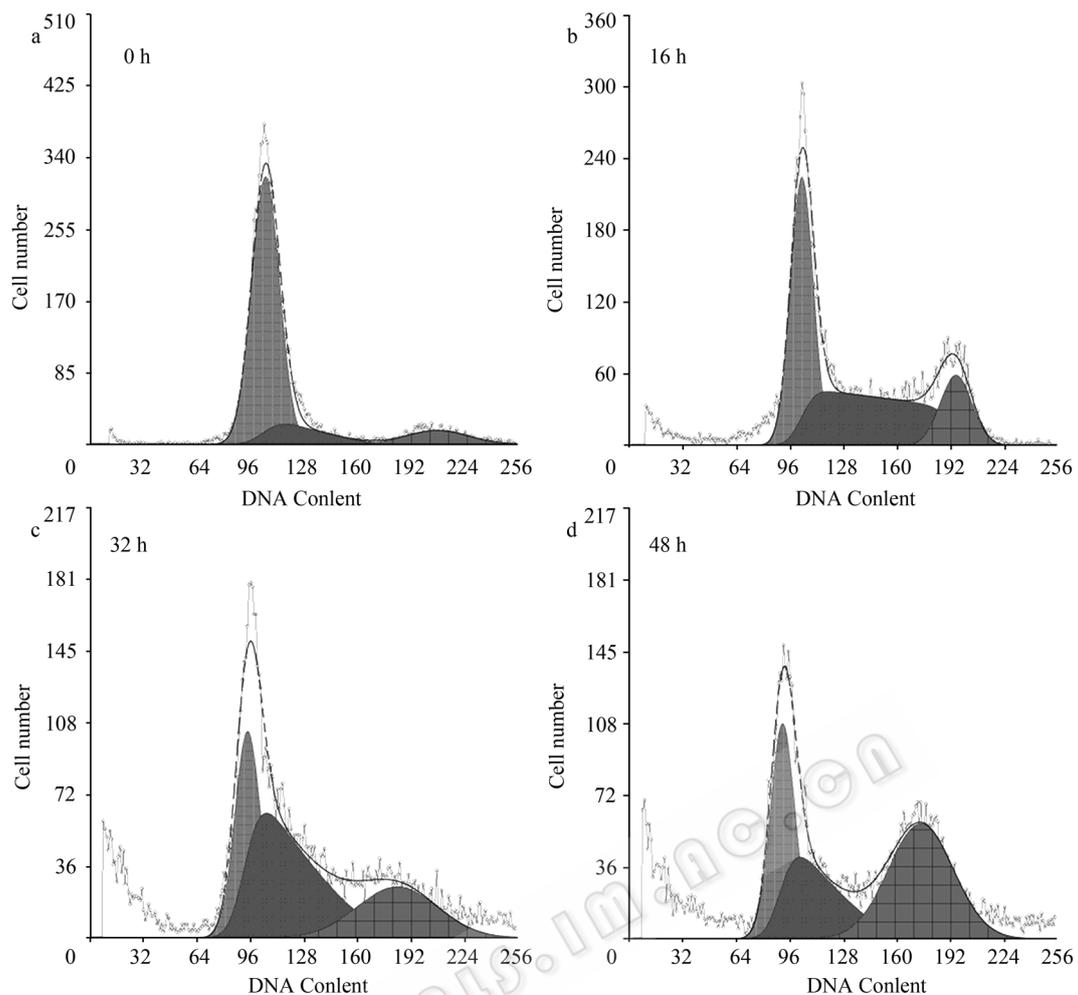


图3 Surfactin对MCF-7细胞周期分布的影响

Fig. 3 Effect of cell cycle change of MCF-7 cell lines by surfactin.

2.4 Surfactin对MCF-7细胞vimentin表达的影响

以 $27.3 \mu\text{mol/L}$ 的 surfactin 对 MCF-7 乳腺癌细胞作用 24、48、72 h 后, 应用免疫荧光方法检测细胞内 vimentin 表达的情况, 并用 Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件测定平均光密度(OD)值。结果显示(图 4, 图 5): 未经 surfactin 处理的对照细胞内有大量的 vimentin(图 4a), 但 surfactin 作用于细胞 24 h(图 4b)后, 其平均光密度值由 84.50% 降至 73.25%, 差异显著 $P < 0.05$, 作用 48 h(图 4c)和 72 h(图 4d)后, vimentin 的表达量降至 40.00% 和 15.50%, 差异极显著 $P < 0.01$ 。免疫印迹结果(图 6)与免疫荧光结果一致, 随着作用时间的增加细胞内的 vimentin 明显发生了降解。与对照组相比, surfactin 作用 24、48、72 h 后, vimentin 的相对光密度值分别降至 71.7%、66.2% 和

33.7%。这说明 surfactin 显著抑制了细胞内 vimentin 的表达, 并且随着时间的延长而持续减少, 使细胞的中间纤维骨架发生了剧烈的变化。

2.5 免疫荧光观察 surfactin 作用后 MCF-7 细胞微管的变化

用药前, MCF-7 细胞胞质内见分布较为规则的绿色毛玻璃样微管网络分布, 从核周向四周辐射状排列(图 7a)。 $27.3 \mu\text{mol/L}$ surfactin 作用 12 h 后, 细胞核周围的微管呈网状分布而部分区域呈束状分布(图 7b)。随用药时间延长, 变形、皱缩细胞增多, 胞质内丝状微管结构减少(图 7c)。用药 48 h 后(图 7d), 细胞皱缩, 胞质内丝状结构减少甚至消失, 可见颗粒状荧光并呈聚集状, 部分收缩细胞核周围荧光明显增强, 部分凋亡发泡细胞在发泡的连接处荧光增强, 说明 tubulin 发生了解聚和重排。

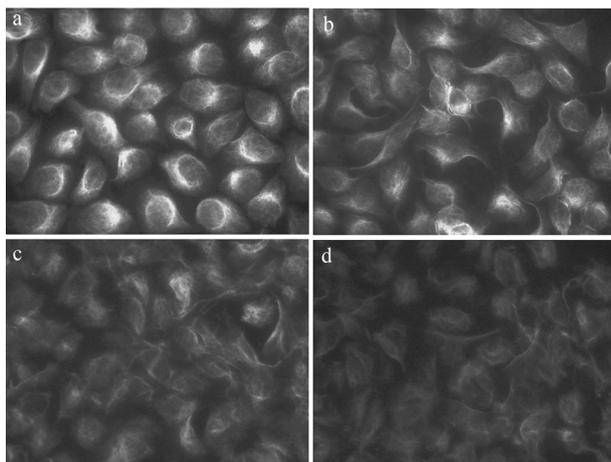


图 4 Surfactin 对 MCF-7 乳腺癌细胞 vimentin 表达的影响

Fig. 4 Effect of surfactin on expression of vimentin protein in MCF-7 human breast cancer cells. (a) Control. (b) 24 h. (c) 48 h; (d) 72 h.

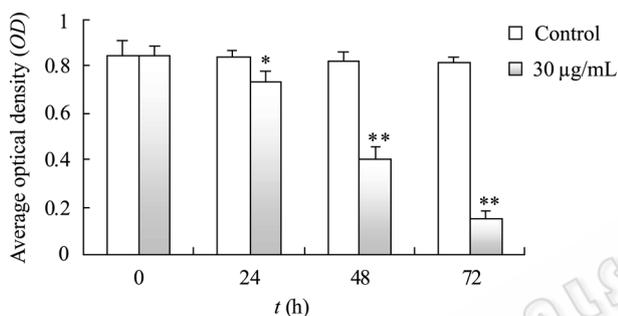


图 5 Surfactin 作用不同时间后 vimentin 蛋白平均光密度值变化

Fig. 5 Changes in average optical density of vimentin at different time after surfactin treatment (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

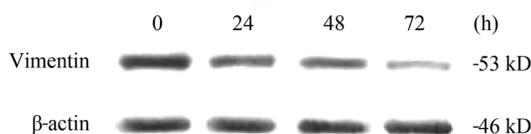


图 6 蛋白免疫印迹分析 surfactin 对 vimentin 表达的影响

Fig. 6 Effect of surfactin on expression of vimentin by Western blotting analysis.

2.6 聚合微管免疫印迹分析

免疫印迹结果显示(图 8), 随着 surfactin 作用时间的延长, 聚合的微管蛋白比例逐渐下降, 这与免疫荧光观察到细胞内的微管网络稀疏结果一致。与对照组相比, surfactin 作用 12、24、48 h 后, 聚合微管蛋白的相对光密度值分别降至 71.4%、38.9%和

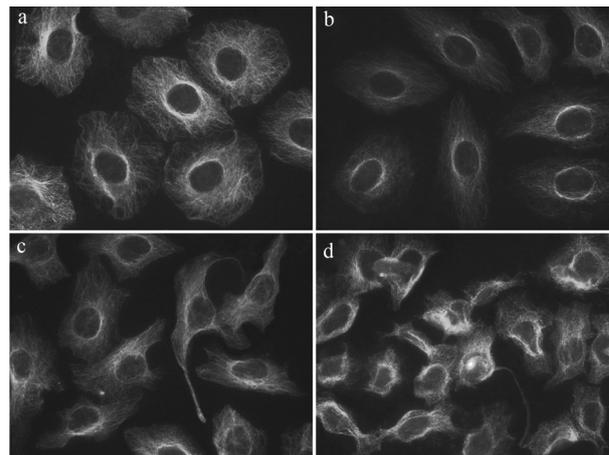


图 7 Surfactin 对 MCF-7 乳腺癌细胞 α -tubulin 表达的影响

Fig. 7 Effect of surfactin on expression of α -tubulin protein in MCF-7 human breast cancer cells. (a) Control. (b) 12 h. (c) 24 h. (d) 48 h.



图 8 蛋白免疫印迹分析 surfactin 对聚合微管蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of surfactin on expression of polymeric tubulin protein by Western blotting analysis.

24.3%。结果表明, surfactin 抑制了细胞内微管蛋白的聚合, 并且随着作用时间的延长, 其对细胞内微管蛋白聚合的抑制作用呈增加趋势。

3 讨论

寻找化学结构新颖、作用机制独特的新药是新抗肿瘤药研究的焦点。由于通过化学合成途径生产抗癌药物步骤多、收率低、污染大, 人们已把注意力转移到微生物上, 现已发现许多微生物的提取物、次级代谢产物具有抗肿瘤作用。本实验通过 MTT 发现 surfactin 对 MCF-7 细胞表现出较强的抑制作用, 其中细胞被 surfactin 处理 48 h 时的 IC_{50} 是 27.3 $\mu\text{mol/L}$ 。诱导细胞凋亡是许多抗肿瘤药物发挥作用的重要手段, 在本实验中通过 AO/EB 荧光双染法观察到了凋亡的特征性改变, 流式细胞仪分析观察到经 surfactin 处理的 MCF-7 细胞出现了亚二倍体峰和 G2/M 期阻滞, 这都说明 surfactin 能够诱导 MCF-7 细胞产生凋亡。

细胞的癌变伴随着细胞的功能及形态的变化。自从作用于微管的抗癌药物紫杉醇开发成功以来,细胞骨架分析已成为肿瘤治疗及肿瘤药物研究的重要指标之一^[6-12]。波形蛋白表达量减少会降低细胞之间的黏附力,在细胞内会出现凝集和片段化的细胞核,破坏细胞完整的支撑体系,影响细胞信号由胞质向胞核内部传递的途径,继而严重影响了细胞的生活能力。细胞内的微管蛋白在有丝分裂过程中会聚合成为纺锤体,起到牵引染色体从着丝粒处分开走向两端的作用。纺锤体如不能正确形成也会使细胞不能正常分裂,最终阻滞于G₂/M期而引起细胞凋亡。本研究探讨了 surfactin 是否通过影响细胞中间丝和微管系统的生物学特性而起到诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用。免疫荧光结果显示, surfactin 显著抑制了细胞内 vimentin 的表达和诱导 α -tubulin 发生解聚和重排;免疫印迹分析结果表明, surfactin 抑制了微管蛋白聚合的作用。

本研究通过对细胞凋亡时细胞骨架结构形态的动态变化研究,显示细胞骨架与细胞凋亡密切相关。利用这一点,可通过改变细胞骨架诱导细胞凋亡,提高对抗肿瘤药物的敏感性,达到治疗肿瘤的目的。怎样才能使特定的细胞或细胞群骨架发生改变,或怎样通过细胞骨架对细胞凋亡进行精确的调控,很值得进行深入研究。

REFERENCES

- [1] Wu H, Shao HM. Apoptosis and breast cancer. *Chin Oncol*, 1997, 7(2): 137-139.
吴昊, 邵惠敏. 细胞凋亡与乳腺癌. 中国癌症杂志, 1997, 7(2): 137-139.
- [2] Carpenter CL. Actin cytoskeleton and cell signaling. *Crit Care Med*, 2000, 28(4 suppl): 94-99.
- [3] Paul AJ. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 763-781.
- [4] Cao XH, Jiao RZ, Wang CL, et al. The structural identification and antitumor activity on MCF-7 cells of surfactin from *Bacillus subtilis* TK-1. *Chin Biotechnol*, 2009, 29(2): 54-58.
曹小红, 焦润芝, 王春玲, 等. *Bacillus natto*TK-1 产脂肽的结构鉴定及其诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究. 中国生物工程杂志, 2009, 29(2): 54-58.
- [5] Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5803-5809.
- [6] He QY, Jiang B, Li DD, et al. Effects of lidamycin on apoptotic gene expressions and cytoskeleton in human hepatoma bel-7402 cells. *Chinese J Cancer*, 2002, 21(4): 351-355.
何琪杨, 姜兵, 李电东, 等. 力达霉素对人肝癌 bel-7402 细胞凋亡基因表达和细胞骨架的影响. 癌症, 2002, 21(4): 351-355.
- [7] Donald CD, Cooper CR, Harris Hooker S, et al. Cytoskeletal organization and cell motility correlates with metastatic potential and state of differentiation in prostate cancer. *Cell Mol Biol*, 2001, 47(6): 1033-1038.
- [8] Holwell SE, Cooper PA, Thompson MJ, et al. Anti-tumor and anti-vascular effects of the novel tubulin-binding agent combretastatin A-1 phosphate. *Anticancer Res*, 2002, 22(6C): 3933-3940.
- [9] Grzanka A, Grzanka D, Orlikowska M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1611-1617.
- [10] Müller K, Dulku S, Hardwick SJ, et al. Changes in vimentin in human macrophages during apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 2001, 156(1): 133-144.
- [11] Shi XC, Liu QH, Zhao X. Development in the research on the relationship between mitochondrial shape, function and cytoskeleton. *J Xi'an U Arts Sci (Nat Sci E)*, 2007, 10(1): 5-9.
史秀超, 刘全宏, 赵霞. 线粒体形态和功能与细胞骨架关系的研究进展. 西安文理学院学报(自然科学版), 2007, 10(1): 5-9.
- [12] Wang L, Yang YJ, Chen SH, et al. Effects of β -sitosterol on microtubular systems in cervical cancer cells. *Natl Med J Chin*, 2006, 86(39): 2771-2775.
王莉, 杨永杰, 陈松华, 等. β -谷甾醇对宫颈癌细胞微管系统的影响. 中华医学杂志, 2006, 86(39): 2771-2775.