

乳病消片含药血清对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

梁 莉¹, 王法琴¹, 达 礼², 白银亮¹, 李兴杰³, 周辉年⁴
(1. 兰州大学第二医院药学部, 甘肃 兰州 730030; 2. 兰州市西固区中医医院, 甘肃 兰州 730060;
3. 兰州大学第二医院健康管理中心, 甘肃 兰州 730030; 4. 兰州大学第二医院普外一科, 甘肃 兰州 730030)

摘要: **目的** 探讨乳病消片含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。**方法** 细胞悬液加入低剂量 (25%)、中剂量 (50%) 或高剂量 (100%) 含药血清后分别孵育 24、48、72 h, MTT 法测定细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡, Hoechst 33258 染色法观察细胞核形态变化, Western blot 法检测胞浆细胞色素 C (Cyt-C)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 表达。**结果** 与对照组 (空白血清) 比较, 含药血清组在不同孵育时间均可显著抑制细胞增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$); 孵育 48 h 后, G₀/G₁ 期细胞比例显著增加 ($P<0.05$), S 期细胞比例显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率显著升高 ($P<0.01$); 细胞核碎裂、浓缩程度和蓝色荧光强度呈剂量依赖性增加, 中、高剂量组出现凋亡小体, Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9 表达均显著增加 ($P<0.05$)。**结论** 乳病消片含药血清对 MCF-7 细胞增殖具有显著抑制作用, 其机制可能与启动线粒体凋亡途径有关。

关键词: 乳病消片; 含药血清; MCF-7 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)10-2122-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.002

Inhibition effects of Rubingxiao Tablets medicated serum on MCF-7 cells proliferation

LIANG Li¹, WANG Fa-qin¹, DA Li², BAI Yin-liang¹, LI Xing-jie³, ZHOU Hui-nian⁴
(1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. The Hospital of Traditional Chinese Medicine in Xigu District, Lanzhou City, Lanzhou 730060, China; 3. Health Management Center, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 4. The First Department of General Surgery, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the inhibition effects of Rubingxiao Tablets medicated serum on the proliferation of the human breast cancer cell line, MCF-7 cells. **METHODS** Cell suspensions treated with corresponding low-dose (25%), medium-dose (50%) or high-dose (100%) medicated serum were cultured for 24, 48, 72 h, respectively. And the inhibition rate of cell proliferation was determined by MTT assay, the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, the cell nuclear morphological changes were observed by Hoechst 33258 staining, and the expressions of Cyt-C, Caspase-3 and Caspase-9 were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group (blank serum), medicated serum groups shared significantly inhibited cell proliferation at different incubation time ($P<0.05$, $P<0.01$). After 48h incubation, markedly increased cell proportion in G₀/G₁ phase ($P<0.05$), strikingly decreased cell proportion in S phase ($P<0.05$), remarkably increased apoptosis rate ($P<0.01$) were observed. The dose-dependent increase of cellular nuclear fragmentation, extent of concentration, and blue fluorescence intensity, as well as the apoptotic bodies appearing in both medium-dose and high-dose groups, obviously increased expressions of Cyt-C, Caspase-3 and Caspase-9 were ($P<0.05$) all noticed. **CONCLUSION** The significant inhibition effects of Rubingxiao Tablets medicated serum on the proliferation of MCF-7 cells may be related to its impact on the initiation of mitochondrial apoptotic pathway.

KEY WORDS: Rubingxiao Tablets; medicated serum; MCF-7 cells

收稿日期: 2018-02-24
基金项目: 甘肃省科技计划自然科学基金项目 (1606RJZA116)
作者简介: 梁 莉 (1977—), 女, 副主任中药师, 研究方向为医院药学。E-mail: lzuliangli@163.com

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一,其发病率呈现急剧上升趋势,已经成为女性健康的最大威胁^[1-2]。目前,中医药在乳腺癌治疗中的作用受到广泛关注,复方中药已经成为相关综合治疗中的一个重要组成部分。乳病消片是兰州大学第二医院自制的复方中药制剂(甘药制字 2004000823),由柴胡、青皮、丹参、元胡、当归、淫羊藿等 15 味药材组成,临床上主要用于治疗乳腺炎和乳腺增生,疗效肯定^[3-5],但具体作用机制尚不明确。本实验以乳病消片含药血清作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞,观察它对 MCF-7 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,并初步阐明其作用机制,以期对相关临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 试药 清洁级 SD 大鼠[兰州大学医学动物实验中心,合格证号兰州大学动物实验中心 SCXK(甘)-2013-0002];人乳腺癌 MCF-7 细胞(中国科学院上海细胞库)。乳病消片(270 mg/片,兰州大学第二医院,批号 170311),由柴胡、青皮、丹参、枳壳、红藤、元胡、鳖甲、川楝子、当归、浙贝、淫羊藿、茯苓、王不留行、炙甘草、黄芪组成,分别以 14、12、10 倍水量煎煮 3 次,合并滤液并浓缩为清膏,烘干后粉碎,加入辅料压片。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst 33258 染色试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术研究);鼠抗人 Caspase-3、Caspase-9、Cyt-C、Bcl-2、Bax、 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶标记兔抗鼠二抗(美国 Jackson ImmunoResearch 公司);胎牛血清、RPMI-1640 培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司]。

1.2 仪器 FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);尼康 80 荧光显微镜(日本尼康公司);全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 20 只 SD 大鼠随机分为给药组、对照组,每组 10 只。乳病消片临床常用量为 5.94 g/d,根据等效剂量折算系数法换算成大鼠灌胃剂量约为 600 mg/kg,2 次/d,连续 7 d。末次给药 2 h 后,水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,2 000 r/min 离心 10 min 取血清,56 ℃ 下灭活 30 min,0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后,-80 ℃ 下保存备用。使用时,空白血清倍比稀释成相应浓度。

2.2 MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖 取对数生长期

的 MCF-7 细胞悬液,以 5×10^4 /孔密度接种于 96 孔板,37 ℃、5% CO₂ 下孵育 24 h 后弃除原培养液总体积的 10%,然后加入等体积不同浓度(25%、50%、100%,即低、中、高剂量组)含药血清或空白血清(占总培养体系的 10%),另设不含药物的血清作为对照组,加药后继续孵育 24、48、72 h。培养结束后 MTT 染色,于 490 nm 波长处测定光密度(OD),计算细胞增殖抑制率,公式为增殖抑制率 = (1 - 含药血清组 OD/对照组 OD) $\times$ 100%,重复 3 次。

2.3 流式细胞术检测 MCF-7 细胞周期和凋亡 实验分组同“2.2”项,细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 12 孔培养板中,孵育 24 h 后弃除原培养液总体积的 10%,然后加入等体积不同浓度含药血清或空白血清(占总培养体系的 10%)。药物继续孵育 48 h 后收集细胞,根据细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。

2.4 Hoechst 33258 染色法观察细胞核形态 实验分组、细胞处理及给药方法同“2.3”项。取 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,孵育 24 h 后弃除原培养液总体积的 10%,然后加入等体积不同浓度含药血清或空白血清(占总培养体系的 10%),48 h 后收集细胞并制成细胞悬液,根据 Hoechst 33258 试剂盒说明书进行操作,于显微镜下观察 Hela 细胞核形态,并对图像进行分析。

2.5 Western blot 法检测 Caspase-3、Caspase-9、Cyt-C 表达 实验分组、细胞处理及给药方法同“2.3”项。MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,孵育 24 h 后弃除原先培养液总体积的 10%,然后加入等体积不同浓度含药血清或空白血清(占总培养体系的 10%)。待药物作用 48 h 后弃上清,PBS 冲洗 3 次,加入适量含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃、15 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法对所提总蛋白进行定量,规定上样量为 40 μ g,加入 Loading Buffer 煮沸变性。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜,一抗(Caspase-3、Caspase-9、Cyt-C,1:2 000)4 ℃ 下孵育过夜,加入二抗(1:8 000),室温下孵育 2 h,ECL 法显色,通过 Image-Pro Plus 7.0 软件分析条带 IOD。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析或 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 含药血清对 MCF-7 细胞增殖的影响 与对照组比较,含药血清组作用 24、48、72 h 后均能显著抑制 MCF-7 细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 含药血清对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab. 1 Effect of medicated serum on the proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
含药血清低剂量组	11.14 ± 1.13 *	20.98 ± 3.13 **	30.11 ± 4.12 **
含药血清中剂量组	23.04 ± 3.16 **	36.09 ± 5.45 **	49.63 ± 5.69 **
含药血清高剂量组	32.42 ± 6.14 **	56.33 ± 4.47 **	61.34 ± 7.02 **

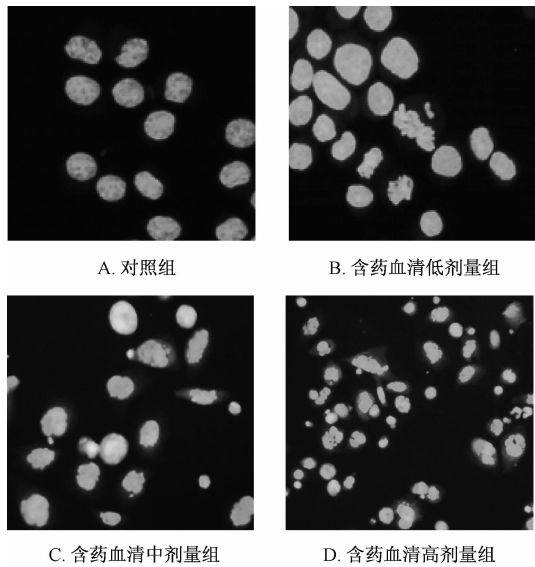
注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 含药血清对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab. 2 Effects of medicated serum on the cycle and apoptosis of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	细胞周期/%			凋亡率/%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照组	51.01 ± 4.86	35.69 ± 4.92	11.21 ± 2.45	3.01 ± 0.48
含药血清低剂量组	56.89 ± 4.44 *	30.08 ± 4.12 *	10.26 ± 2.03	18.23 ± 1.58 **
含药血清中剂量组	62.02 ± 6.56 *	25.15 ± 2.56 *	10.01 ± 1.25	37.68 ± 5.14 **
含药血清高剂量组	70.23 ± 6.51 **	19.21 ± 5.47 **	8.12 ± 2.33 *	46.17 ± 3.85 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$



A. 对照组

B. 含药血清低剂量组

C. 含药血清中剂量组

D. 含药血清高剂量组

图 1 含药血清对 MCF-7 细胞核形态的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of medicated serum on the nucleic morphology of MCF-7 cells (×200)

4 讨论

血清药理学是研究中药复方抗肿瘤作用的有效方法,也是从细胞分子水平研究中药药理学的新手段^[6]。乳病消片是兰州大学第二医院自制复方中药制剂,已有十多年临床应用实践^[3-5],但尚缺乏

3.2 含药血清对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响 与对照组比较,含药血清组作用 48 h 后,G₀/G₁ 期细胞比例显著增加 ($P < 0.05$),S 期细胞比例显著减小 ($P < 0.05$),凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

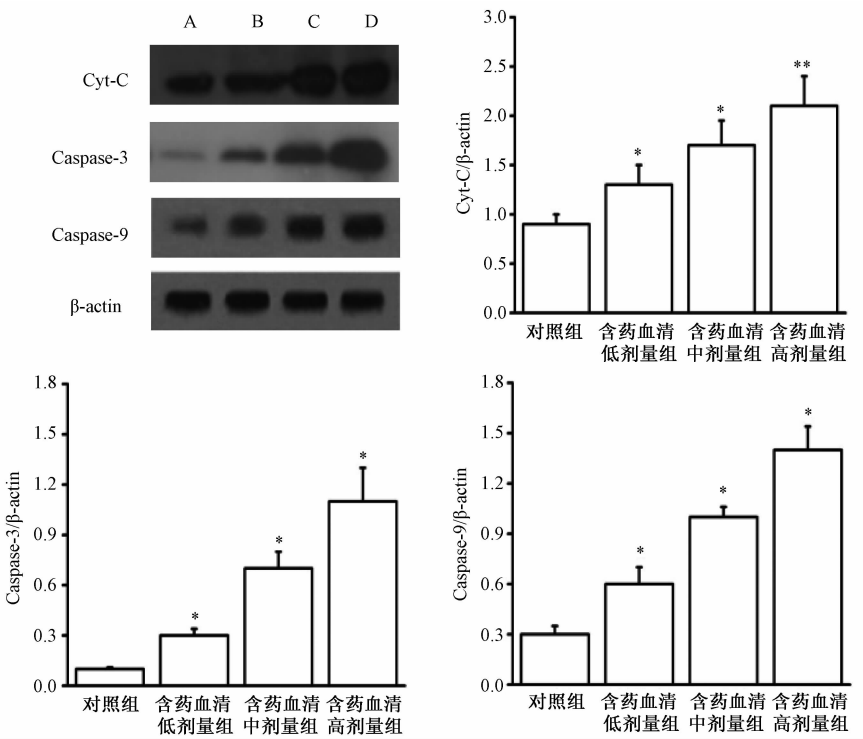
3.3 含药血清对 MCF-7 细胞核形态的影响 随着含药血清浓度增加,MCF-7 细胞核碎裂、浓缩程度、蓝色荧光强度呈剂量依赖性地增加,并且中、高剂量组出现凋亡小体。见图 1。

3.4 含药血清对 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-表达的影响 与对照组比较,含药血清组作用 48 h 后,Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9 表达均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。

分子水平药理学研究。

细胞周期是细胞增殖的基本过程,周期阻滞已成为抗肿瘤药物研发的重要方向^[7-8],本实验发现,给予乳病消片含药血清后人乳腺癌 MCF-7 细胞发生 G₁/G₀期阻滞,即可阻止 G₁/G₀ 期的细胞顺利进入 S 期及 G₂/M 期,从而使 MCF-7 细胞的有丝分裂过程受到干扰,导致其增殖受到抑制。细胞凋亡是指程序性细胞死亡,其紊乱与肿瘤细胞过度增殖密切相关,故诱导肿瘤细胞凋亡对抑制肿瘤细胞增殖至关重要,本实验发现,乳病消片含药血清可显著增加 MCF-7 细胞凋亡率,并能引起细胞核凋亡性改变,即诱导 MCF-7 细胞发生凋亡。线粒体凋亡途径是细胞凋亡的最主要途径之一^[9],通常凋亡信号能引起线粒体跨膜电位下降,导致 Cyt-C 释放进入胞浆,作为凋亡诱导因子,它可通过 Apaf-1 因子的多聚化与 Caspase-9 前体形成凋亡小体,激活 Caspase-3,从而诱发下游 Caspases 蛋白酶家族凋亡级联反应,最终导致细胞凋亡^[10-14],结合本实验结果可知,乳病消片含药血清能显著升高胞浆 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9 表达水平,推测它可能启动了 MCF-7 细胞线粒体凋亡途径。

综上所述,乳病消片含药血清对 MCF-7 细胞



注：A 为对照组，B 为含药血清低剂量组，C 为含药血清中剂量组，D 为含药血清高剂量组。与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 2 含药血清对 Cyt-C、Caspase-3、Caspase-9 表达的影响

Fig. 2 Effects of medicated serum on the expressions of Cyt-C, Caspase-3 and Caspase-9

增殖具有显著的抑制作用，能引起细胞周期 G_0/G_1 阻滞，诱导细胞凋亡，其机制可能与启动线粒体凋亡途径有关。

参考文献：

[1] Bevers T B, Anderson B O, Bonaccio E, *et al.* NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2009, 7 (10) : 1060-1096.

[2] Bombonati A, Sgroi D C. The molecular pathology of breast cancer progression [J]. *J Pathol*, 2011, 223 (2) : 307-317.

[3] 王立宏, 王 利. 乳病消治疗乳腺疾病的临床观察 [J]. 甘肃科技纵横, 2013, 42(5) : 129-130.

[4] 荆晓红, 李红卫, 焦海胜, 等. 乳病消片治疗乳腺增生病的临床观察 [J]. 中国药师, 2010, 13(1) : 106-108.

[5] 宋三孔, 宋 霞, 杨效宇, 等. 乳病消片定性鉴别及其延胡索乙素的含量测定 [J]. 中国药业, 2012, 21(3) : 22-23.

[6] 张灵娜, 林 兵, 宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望 [J]. 中草药, 2015, 46 (17) : 2662-2666.

[7] Bai J W, Li Y C, Zhang G J. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery [J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14 (4) : 348-362.

[8] Zhu Y Y, Huang H Y, Wu Y L. Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (4) : 5012-5018.

[9] 刘 铮, 张元霞, 周 萍, 等. 线粒体膜通透性增加引起凋亡机制的研究进展 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50 (1) : 90-93.

[10] Pistritto G, Trisciunglio D, Ceci C, *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8 (4) : 603-619.

[11] Wong W W, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *IUBMB Life*, 2008, 60 (6) : 390-397.

[12] Palai T K, Mishra S R. Caspases: An apoptosis mediator [J]. *J Adv Vet Anim Res*, 2015, 2 (1) : 18-22.

[13] Unsain N, Barker P A. New views on the misconstrued: executioner caspases and their diverse non-apoptotic roles [J]. *Neuron*, 2015, 88 (3) : 461-474.

[14] Tor Y S, Yazan L S, Foo J B, *et al.* Induction of apoptosis in MCF-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa* and its chemical profile [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6) : e0127441.