

- kakonein and Panax notoginsenosides on multiple organs in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2010, 32(9):631-644
- 12 Ou JM, Zhang XP, Wu CJ, *et al.* Effects of dexamethasone and Salvia miltiorrhiza on multiple organs in rats with severe acute pancreatitis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(11):919-931
- 13 Alison MR, Lovell MJ, Direkze NC, *et al.* Stem cell plasticity and tumour formation [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(9):1247-1256
- 14 刘锐, 刘洪斌, 石钊, 等. 骨髓间充质干细胞对慢性胰腺炎胰腺损伤修复的价值 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(9):1163-1164
- 15 王建祥, 王平, 吴海龙, 等. 骨髓间充质干细胞在大鼠重症急性胰腺炎中的作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2010, 31(6):381-382
- 16 Xiping Z, Jun F, Jie Z, *et al.* Influence of dexamethasone on the expression levels of P-selectin protein in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(1):31-39
- 17 盛闽, 黄鹤光. 骨髓间充质干细胞对急性胰腺炎与肺损伤作用机制的研究 [J]. *武警医学*, 2011, 22(10):903-906
- (收稿日期:2013-07-09)
- (修回日期:2013-08-22)

三黄抗氧化方抑制乳腺癌 MCF-7 细胞氧化应激与增殖的实验研究

张晓清 卞卫和 李琳 姚昶 任晓梅 应语 郭檬檬 曹东阳 陈灵

摘要 目的 探查三黄抗氧化方抑制乳腺癌 MCF-7 细胞氧化应激与增殖的疗效。**方法** 将实验分为空白组:MCF-7 细胞培养;实验组按黄芪、制大黄、片姜黄比例分:实验组 1:1:1:1,实验组 2:3:1:1,实验组 3:6:1:1;氧化应激组:以过氧化氢模拟细胞氧化应激状态;乙酰谷氨酸液(NAC)还原组:氧化应激组中加入 NAC 还原应激反应;免疫荧光法评价其抗 MCF-7 细胞产生反应性氧化物疗效及 ELISA 法评价氧化应激后细胞培养液中 VEGF 含量;同时 MTT 法评价三黄抗氧化方抑制 MCF-7 细胞的增殖率。**结果** 实验组 2 抗氧化氧化应激结果优于其他两组,并显著降低细胞培养液中 VEGF 水平;同时各实验组 MCF-7 细胞增殖率得到显著抑制并呈现明显的浓度依耐性,相对空白组,实验组 1~3 在 8mg/ml 浓度下分别抑制 MCF-7 细胞增殖率达 57%、67% 及 56%,实验组 2 的 MCF-7 细胞增殖抑制率显著高于实验组 1 与 3,有统计学差异($P < 0.01$)。**结论** 三黄抗氧化方抑制 MCF-7 细胞氧化应激同时抑制其增殖率,并降低氧化应激引起的 VEGF 表达。

关键词 三黄抗氧化方 乳腺癌 MCF-7 细胞 氧化应激

Experimental Rresearch of Effects of Anti-oxidative Stress of Breast Cancer MCF-7 Cells and the Mechanism with Traditional Chinese Decoction of Sanhuangkang Oxide. Zhang Xiaqing, Bian Weihe, Li lin, *et al.* Department of Breast diseases, Jiangsu Province Hospital of TCM, Jiangsu 210000, China

Abstract Objective To explore the effects of anti-oxidative stress and suppressing proliferation rate of breast cancer MCF-7 cells with traditional Chinese decoction of Sanhuangkang Oxide. **Methods** Blank group with only MCF-7 cells culture, 3 experimental groups of experimental group1 with the ratios of Hangqi; Zhidahuang; Jianghuang to 1:1:1, followed by 3:1:1 and 6:1:1 for experimental group2 and 3, oxidative group with hydrogen peroxide stimulation and deoxidation group with NAC interfered were established for the research. The efficiency of suppressing reactive oxide produced from MCF-7 cells was measured by immunofluorescence technique. The VEGF level was measured in the super fluid of cell culture with ELISA experiment. The cell proliferative rate of Sanhuangkang oxide was measured by MMT. **Results** The group 2 was superior to other two groups in the aspect of anti-oxidative stress and reducing the VEGF level in the super fluid of cell culture. Compared with control group, the groups could significantly suppress the proliferation rate of MCF-7 cells, which depended on concentrations. The proliferation rate of groups were 57%, 67% and 56%, respectively in the concentration of 8mg/ml. Significant differences gotten from the experimental group 2 with the highly inhibition of MCF-7 cells proliferation of p value less than 0.01. **Conclusion** Traditional Chinese decoction of Sanhuangkang Oxide have the ability to inhibition of MCF-7 cells proliferation, reducing the oxidative stress, followed by down regulating the secretion of VEGF.

Key words Sanhuangkang oxide decoction; Breast cancer; MCF-7 cells; Oxidative stress

基金项目:江苏省中医药领军人才基金资助项目(LJ2009002)

作者单位:210000 南京,江苏省中医院乳腺科(张晓清、卞卫和、李琳、姚昶、任晓梅、应语);南京中医药大学硕士研究生(郭檬檬、曹东阳、陈灵)

通讯作者:姚昶,主任中医师,博士生导师,电子信箱:yaochang67@126.com

氧化应激是指细胞处于过度的反应性氧化物(ROS)活性状态并倾向于氧化作用,是干细胞、肿瘤和肿瘤干细胞的重要调节机制之一^[1]。乳腺癌细胞对氧化应激反应基因具有高水平表达,同时对抗癌治疗产生抵抗性^[2]。研究显示,氧化应激可以升高缺氧诱导因子、白介素6、血管内皮生长因子、趋化因子(CXCL12)及金属蛋白酶1的表达,促进肿瘤转移与复发^[3-5]。乳腺癌患者围手术期机体处于氧化应激状态,如果不加于控制,可能对患者的预后产生不良影响。笔者前期临床研究显示三黄抗氧化方具有抗患者围手术期氧化应激与全身炎症反应的功效^[6]。本研究拟从细胞实验探查其抗乳腺癌MCF-7细胞产生氧化反应族(ROS)的功效及其对细胞增殖的抑制作用。

材料与方法

1. 一般材料:实验于2012年3~9月在江苏省中医院中心实验室完成。实验药物制备:黄芪、制大黄、片姜黄(根据中医气血理论,本实验探索性按6:1:1,3:1:1和1:1:1分成3组),水煎浓缩,冷却后去除沉淀,取上清液,定容至100ml,使用时分别加入无血清培养基中。实验分组:空白组:MCF-7细胞培养;实验组按黄芪、制大黄、片姜黄比例分:实验组1:1:1:1,实验组2:3:1:1,实验组3:6:1:1;氧化应激组:8.8mol/L过氧化氢稀释至100μmol/L模拟细胞氧化应激状态;NAC还原组:氧化应激组中加入1mol/L N-乙酰谷氨酸液,稀释至500μg/L。

2. MCF-7细胞活性氧化反应物(ROS)检定:MCF-7细胞按10⁵个/孔接种于6孔细胞培养板中培养至达80%汇合度后换无血清的培养基孵育12h以达到细胞周期同步化,加入8.8mol/L过氧化氢,以RPMI 1640培养液稀释至100μmol/L模拟细胞氧化应激状态。配置N-乙酰丝氨酸(NAC)I储液1mol/L以培养液稀释至500μg/L作为氧化应激还原剂,按实验分组加入MTT实验选择的最佳剂量不同比例实验组10μl预处理1h,用过氧化氢处理1h或单用过氧化氢处理1h,加入2ml浓度为10μl/L的DCFH-DA孵育20min,充分洗涤后在荧光显微镜下观察细胞,并拍照,以Image-Pro Plus 6.0软件分析其平均荧光强度。

3. MCF-7细胞培养液中VEGF含量测定:收集上述各组MCF-7细胞培养液6孔板中的细胞上清和标准品,空白组做3个复孔。采用深圳达科为生物技术有限公司ELISA试剂盒,通过VEGF标准品蛋白系列浓度稀释梯度100μl/well取得标准曲线。实验与空白各组加待测样品加样,室根据试剂盒操作步骤,在ELISA检测仪上,于450nm处测各孔OD值,通过标准曲线公式计算各组样品实际VEGF含量,实验重复3次,取均值。

4. MCF-7细胞增殖抑制率测定:各实验组分别按1、2、4、8mg/L 4个剂量组测定细胞增殖率。实验步骤:用含10%胎牛血清的培养传3代至以每孔10⁴个MCF-7细胞接种于

96孔板中,培养1~2天后,细胞汇合度至90%,每孔加入各组药物,继续培养24h,加入MTT溶液20μl,继续孵育4h,加150μl DMSO,终止培养,选择490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值(OD值),记录结果,增殖率(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/空白组OD值×100%。

5. 统计学方法:采用SPSS 17.0统计学软件包进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,率的检验采取 χ^2 检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 三黄抗氧化方抑制MCF-7细胞活性氧化物疗效:如图1所示,阴性对照组MCF-7细胞活性氧化物荧光强度很弱,过氧化氢处理后荧光强度显著增强,其荧光强度相当于阴性对照组50倍,加入还原剂后,荧光强度显著下降至阴性对照组10倍左右,显示细胞氧化应激反应的可逆性,可以进行抑制氧化应激实验。将实验各组加入氧化应激的细胞培养后,细胞氧化应激反应迅速下降,荧光强度下降至1.52~2.86,显著低于氧化应激及还原组,其中实验组2荧光强度又显著低于实验组1及3,有统计学差异,具体结果见表1。

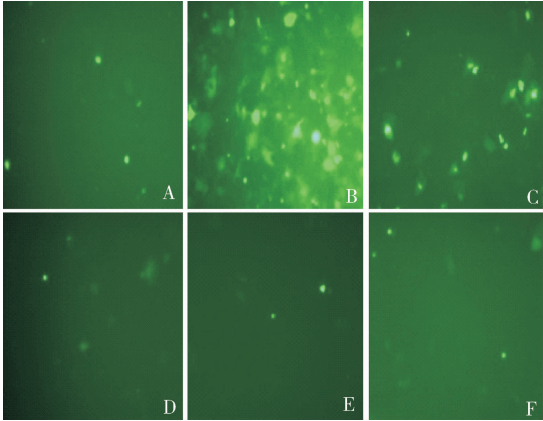


图1 三黄抗氧化方抑制MCF-7细胞氧化应激反应免疫荧光照片(×100)

A. 阴性对照组;B. 氧化应激组;C. NAC还原组;D. 实验组1;E. 实验组2;F. 实验组3

表1 三黄抗氧化方抑制MCF-7细胞氧化应激反应结果

组别	视野数	平均荧光强度
阴性对照组	6	1.00 ± 0.00
氧化应激组 H ₂ O ₂	6	50.34 ± 4.23
NAC + H ₂ O ₂	6	10.96 ± 3.57 *
实验组 1 + H ₂ O ₂	6	2.86 ± 1.37 **
实验组 2 + H ₂ O ₂	6	1.52 ± 0.56 **△
实验组 3 + H ₂ O ₂	6	1.89 ± 1.69 **

与氧化应激组 H₂O 相比, * P<0.01;与 NAC + H₂O₂ 相比, # P<0.01;与实验组 1 及 3 相比, △ P<0.01

2. 各组细胞培养液中 VEGF 含量结果: MCF-7 细胞未经氧化应激时的 VEGF 含量为 350.76pg/ml, 经过氧化应激后细胞上清液中 VEGF 含量增加至 409.64pg/ml, 显著高于阴性对照组; 加入还原剂 NAC 后细胞上清液中 VEGF 含量下降至 359.96pg/ml, 与阴性对照组水平相当; 实验各组细胞上清液中 VEGF 含量较氧化应激组显著下降, 并且显著低于阴性对照组及氧化应激还原组 ($P < 0.01$), 其中实验组 2 VEGF 含量仅为氧化应激组的一半, 阴性对照组的 60%, 并显著低于其他两个实验组, 具体见表 2。

表 2 各组 MCF-7 氧化应激细胞液中 VEGF 含量结果

组别	n	VEGF 含量 (pg/ml)
阴性对照组	3	350.76 ± 10.01
氧化应激组 H ₂ O ₂	3	409.64 ± 11.63
NAC + H ₂ O ₂	3	359.96 ± 9.53 *
实验组 1 + H ₂ O ₂	3	299.58 ± 7.55 *#
实验组 2 + H ₂ O ₂	3	204.11 ± 6.23 *#△
实验组 3 + H ₂ O ₂	3	295.67 ± 6.80 *#

与氧化应激组 H₂O 相比, * $P < 0.01$; 与 NAC + H₂O₂ 相比, # $P < 0.01$; 与实验组 1 及 3 相比, △ $P < 0.01$

3. 三黄抗氧化方干预 MCF-7 细胞增殖抑制率: 三黄抗氧化方显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 显示明显的剂量依耐性, 各实验组浓度在 2mg/ml 以上 MCF-7 细胞增殖抑制率显著高于 1mg/ml, 有统计学差异。各实验组在浓度为 8mg/ml 时细胞抑制率均高于各组其他浓度组, 其中浓度为 8mg/ml 的实验组 2 细胞增殖抑制率疗效最佳, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。以下实验将选取浓度为 8mg/ml 的实验各组进一步实验。具体见表 3。

表 3 三黄抗氧化方抑制 MCF-7 细胞增殖率 (n = 3)

组别 浓度	实验组 1	实验组 2	实验组 3
1mg/ml	0.22 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.21 ± 0.01
2mg/ml	0.55 ± 0.03 *	0.56 ± 0.04 *	0.47 ± 0.04 *
4mg/ml	0.53 ± 0.07 *	0.53 ± 0.12 *	0.51 ± 0.06 *
8mg/ml	0.57 ± 0.03 *	0.67 ± 0.04 *#	0.56 ± 0.03 *

各组中与浓度为 1mg/ml 相比, * $P < 0.01$; 与实验组 1 及 3 相比, # $P < 0.01$

讨 论

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤, 研究显示乳腺癌组织 ROS 含量较癌旁组织明显升高, 说明乳腺癌组织处于氧化应激状态, 较高水平的 ROS, 可激活

敏感的转录因子和相关基因如 NF- κ B 和 API 等, 促进肿瘤细胞的生存、增殖以及迁移^[9,10]。研究显示, 氧化应激可以促使巨噬细胞和血管平滑肌细胞分泌 VEGF, 诱使血管内皮细胞产生管样结构, 有利于肿瘤生长、浸润、复发及转移^[11]。同时, 易静等^[12]研究认为, 过高的活性氧簇产生, 可以诱发肿瘤细胞 DNA 损伤而凋亡, 提出了通过提高肿瘤细胞活性氧簇以提高化疗疗效的治疗理念。笔者认为在乳腺癌围术期, 患者处于氧化应激状态, 影响机体恢复, 此时无法进行全身化疗, 此时抑制机体活性氧簇的产生, 有利于患者恢复与预后^[13]。因此本研究采用的三黄抗氧化方, 用于患者围术期抗氧化治疗。

前期研究显示, 乳腺癌围手术期患者多表现为神疲乏力、手术创面刺痛不移、舌淡边有齿印夹瘀斑、脉玄细等征象, 中医证属气虚血瘀, 治当益气化瘀, 三黄抗氧化方药方组成: 君药黄芪、臣药制大黄及佐药姜黄, 具有益气化瘀、通经止痛功效, 临床研究显示患者临床症状积分改善明显, 降低患者血清白介素-6、丙二醛、肿瘤坏死因子的水平的同时升高超氧化物歧化酶水平。现代研究均显示出黄芪、制大黄及姜黄具有抗氧化应激与血管新生的疗效^[14,15]。同时亦有研究提示不同姜黄素对氧化应激的双向调节作用。本研究结果显示三黄抗氧化方具有显著抗乳腺癌 MCF-7 细胞活性氧簇生成作用, 其最佳比例为 3:1:1, 提高比例则疗效反而减弱, 提示出中药复方制剂亦具有双向调节作用。实验结果显示, MCF-7 细胞经过氧化氢氧化后疗效后, 培养液中 VEGF 表达上升, 提示 ROS 可以促进 VEGF 表达, 与梅爱红等研究结果一致。三黄抗氧化方抑制氧化应激细胞 VEGF 分泌的疗效与其抗 ROS 生成作用一致。研究显示细胞产生的 ROS 通过介导 Ras-ERK 信号通路活化, 促进细胞增殖。研究显示通过抑制机体细胞 ROS 产生, 可以抑制细胞增殖。笔者研究结果显示三黄抗氧化方的抗氧化应激的疗效与抑制 MCF-7 细胞增殖功效一致, 并具有一定的剂量依耐性, 与之结果一致。

总之, 本研究结果首次揭示三黄抗氧化方显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞氧化应激活性物产生, 继而降低氧化应激引起的 VEGF 表达及抑制细胞增殖, 最佳药方比例示黄芪: 制大黄: 姜黄为 3:1:1, 适合于临床围术期运用。今后可进一步进行临床研究, 观察其抗乳腺癌患者术后远期复发或转移的疗效。

参考文献

- 1 Vishal R. T, Sharma S, Mahajan A, et al. Oxidative stress: a novel

- strategy in cancer treatment[J]. JK Sci, 2005, 1(7): 1-3
- 2 Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V, *et al.* Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008, 11(1): 1-15
- 3 Bertucci F, Finetti P, Cervera N. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers[J]. Oncogene, 2006, 25(6): 2273-2284
- 4 Drost J, Agami R. Transformation locked in a loop[J]. Cell, 2009, 139(4): 654-656
- 5 Tsuchida R, Das B, Yeger H, *et al.* Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side - population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling[J]. Oncogene, 2008, 27(28): 3923-3934
- 6 姚昶, 杨理, 陈运, 等. 芪黄煎剂干预胆囊术后创面炎症反应促进修复的临床研究[J]. 中国临床医药研究杂志, 2010, 6(38): 10-14
- 7 Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 270(8): 181-224
- 8 唐昱, 盛国太, 钟志英. 丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(3): 3110-3111
- 9 黎思毅, 彭红娟. 乳腺癌组织氧化应激反应指标的变化[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(16): 2626-2627
- 10 Lopez-lozaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy[J]. Cancer Lett, 2007, 252(1): 1-8
- 11 Pawlak K, Pawlak D, Myliwiec M. Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients[J]. Med sci Monit, 2006, 12(4): 181-185
- 12 易静, 杨洁. 活性氧调控蛋白质修饰影响肿瘤细胞行为机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报, 2012, 32(9): 1122-1127
- 13 Singh G, Maulik S, Jaiswal A, *et al.* Effect on antioxidant levels in patients of breast carcinoma during neoadjuvant chemotherapy and mastectomy[J]. Malays J Med Sci. 2010, 17(2): 24-28
- 14 赵正, 吴丽君. 黄芪提取物对大鼠氧自由基的影响[J]. 长治医学院学报, 2012, 26(2): 87-90
- 15 黄云峰, 李连锬, 谢早红, 等. 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠抗肿瘤作用机制[J]. 武警医学, 2011, 22(7): 562-564

(收稿日期: 2013-07-03)

(修回日期: 2013-07-18)

小鼠模型疫苗 HBV S - ecdCD40L 表达载体的构建及其融合蛋白生物活性预测

徐 英 吴金明 吴文治 蓝松松 吴乐灿

摘 要 **目的** 制备小鼠模型疫苗 HBV S - ecdCD40L 融合基因表达载体并采用软件预测其所表达蛋白的合理性及生物活性。**方法** 首先从质粒中扩增 HBV S 基因, 从小鼠淋巴细胞中扩增 CD40L 胞外段 (extracellular domain, ECD) 基因。然后通过 RT - PCR 法将其串联并与载体相连接, 完成构建后采用软件分析其所表达蛋白是否与预期一致。**结果** 构建小鼠模型表达载体并通过软件分析 HBV S、ecdCD40L 两个基因连接之后其蛋白的疏水性和亲水性无改变, 也没有出现新的表位。连接链 (linker) 不影响融合蛋白的二级结构。**结论** 该载体的设计符合预期, 其表达的融合蛋白保留了 HBV S 和小鼠 CD40L 胞外段的生物学活性, 为进一步研究奠定了基础。

关键词 乙型肝炎病毒表面抗原 S 基因 小鼠 CD40 - 配体胞外段 生物活性预测

Construction of Murine HBV S - ecdCD40L Expression Vector and Prediction of Its Biological Activity. Xu Ying, Wu Jinming, Wu Wenzhi, Lan songsong, Wu Lecan. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To construct murine HBV S - ecdCD40L expression vector by biotechnology and forecast the biological activity of HBV S - ecdCD40L fusion protein. **Methods** First HBV S gene was amplified from plasmid and mouse ecdCD40L from lymphocytes, then HBV S genes was fused and murine ecdCD40L genes in RT - PCR and expression vector was constructed. Whether the expressed proteins in line with expectations was analyzed by software. **Results** The expression vector was constructed successfully. The hydrophobic and hydrophilic of fusion protein was the same and fusion protein secondary structure level had no new epitope. The linker did

基金项目: 温州市科技局基金资助项目 (Y20100204)

作者单位: 325000 温州医科大学附属第一医院消化内科

通讯作者: 吴金明, 博士, 教授, 主任医师, 电子信箱: phdww0003@aliyun.com