

乳康饮及拆方对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞增殖及凋亡的影响

李 凯 孙丽艳 许兴超 郭淑丽 李湘奇

摘 要 **目的** 研究乳康饮及拆方对人三阴性乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 增殖抑制及诱导凋亡的作用。**方法** 采用乳康饮及拆方含药血清处理人三阴性乳腺癌细胞 MDA - MB - 231, 分别在 24、48、72h 时间点, 用 cell counting kit - 8 (CCK - 8 法) 检测乳康饮及拆方在不同时间点对 MDA - MB - 231 细胞增殖的抑制作用, FCM 法 (流式细胞术) 检测乳康饮及拆方诱导 MDA - MB - 231 细胞凋亡。**结果** 各组中药处理 48h 后, 细胞增殖出现明显抑制, 抑制率分别为 46.05%、31.85%、41.24%, 相对氟尿嘧啶组抑制作用时间有明显延迟, 乳康饮组在 48h 与氟尿嘧啶组抑制率之间差异无统计学意义 ($P=0.076$)。各处理组 48h 凋亡率分别为 40.7%、16.3%、23.2%、57.5%, 比空白对照组凋亡率显著增加 ($P<0.05$), 乳康饮组与氟尿嘧啶组凋亡率差异无统计学意义, 但高于拆方 2 组 ($P=0.000$)。**结论** 乳康饮及其拆方能够显著抑制乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞增殖, 并诱导其凋亡。

关键词 三阴性乳腺癌 乳康饮 细胞凋亡 细胞增殖

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.009

Effect of Rukangyin and Seperated Prescriptions on Proliferation and Apoptotic of MDA - MB - 231. Li Kai, Sun Liyan, Xu Xingchao, et al. Hebei Yanda Hospital, Hebei 065200, China

Abstract **Objective** To study the effect of Rukangyin and its seperated prescriptions on the proliferation inhibition and apoptotic inducement of human triple negative breast cancer cells MDA - MB - 231. **Methods** We treated human triple - negative breast cancer cells MDA - MB - 231 at 24h, 48h, and 72h by using serum medicated in Rukangyin and its seperated prescriptions, and then tested the inhibiting effect of Rukangyin and its seperated prescriptions on the proliferation of MDA - MB - 231 cells and induced these cells to be apoptotic at different times by using cell counting kit - 8 (CCK - 8) and FCM respectively. **Results** After 48h of treatment with traditional Chinese medicine, significant inhibition of cell proliferation arose, whose inhibition ratio was 46.05%, 31.85% and 41.24%. Compared with Fluorouracil group, inhibition time significantly delayed, which declared that the difference of the inhibition ratio between Rukangyin group and Fluorouracil group at 48h was not statistically significant ($P=0.076$). The apoptosis ratio of each treatment group was 40.7%, 16.3%, 23.2% and 57.5% respectively, which showed a significant increase compared with the control groups ($P<0.05$), and it declared that apoptosis ratio between Rukangyin group and Fluorouracil group was not statistically significant, but they were higher than the two seperated prescription groups ($P=0.000$). **Conclusion** Rukangyin and its seperated prescriptions can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of breast cancer MDA - MB - 231 cells.

Key words Triple negative breast cancer; Rukangyin; Cell apoptosis; Cell proliferation

近年来随着人们生活水平的提高和医疗水平的不断发展, 乳腺癌的检出率和发生率都逐年上升, 已成为威胁女性身体健康的最常见的恶性肿瘤。据最新统计结果, 相对于美国、加拿大等国家, 我国乳腺癌

发生率较低, 每百万女性有 2.16 个患有乳腺癌, 而病死率达 15.74%^[1]。现有的治疗是以手术为主的综合性治疗, 已使大部分患者的预后得到明显改善, 无病生存期得到有效延长, 但现有的医疗技术很难逆转复发转移过程, 一旦出现转移复发, 患者预后很差。因此控制乳腺癌的转移是临床研究的热点, 中医药对乳腺癌有较系统的防治理念, 通过中医药的整体干预, 可以改善机体的内环境, 提高生存质量, 降低乳癌的复发与转移率, 从而进一步减少病死率^[2]。前期研究发现乳康饮可以通过调控 VEGF - C、VEGFR - 3 的表达, 抑制乳腺癌自发性转移模型裸鼠乳腺癌组织

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473687); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2009CM039, ZR2013HM038); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2011HW084)

作者单位: 065200 三河, 河北燕达医院普外科 (李凯); 100700 北京, 中国人民解放军陆军总医院 (孙丽艳); 271000 泰安, 泰山医学院 (许兴超、郭淑丽); 271000 泰安, 泰山医学院附属医院乳腺外科 (李湘奇)

通讯作者: 李湘奇, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: drlxqi@126.com

淋巴管生成,减少淋巴管密度,从而抑制乳腺癌的生长和转移^[3]。本研究应用 CCK-8、流式细胞技术检测中药乳康饮及拆方对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡的影响,探讨乳康饮对三阴性乳腺癌的治疗作用。

材料与方法

1. 材料:人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购于中国科学院上海生科院细胞资源中心,乳康饮(黄芪 30g、茯苓 15g、柴胡 12g、青皮 12g、薏苡仁 30g、莪术 9g),按照功效拆方为益气健脾组(黄芪 30g、茯苓 15g、薏苡仁 30g)和疏肝理气组(柴胡 12g、青皮 12g、莪术 9g),采用水提醇沉法将乳康饮及拆方组制成口服液剂型,浓度分别为 1.08、0.75、0.33g/ml;氟尿嘧啶(规格 250mg/10ml,批号 H31020593)购于上海旭东海普药业),DMEM 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司,染色剂 CCK-8 购自日本同仁化学公司,Annexin V-FITC/碘化丙锭 PI 双染试剂盒购于北京大学人类疾病基因研究中心,Wistar 大鼠雌性,3 月龄,体重 250~300g,购于山东鲁抗医药集团公司实验动物中心。

2. 方法:(1)含药血清的制备:20 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 5 组即模型对照组、乳康饮组、益气健脾组、疏肝理气组、氟尿嘧啶组,每组 4 只,适应环境后分组分别给予生理盐水、乳康饮口服液、益气健脾口服液、疏肝理气口服液、氟尿嘧啶灌胃,连续给药 15 天,按《抗癌药物研究与实验技术》附表“人和动物间接体表面积折算表”换算人鼠等效灌胃剂量。末次给药 2h 后经下腔静脉采血,离心后取血清-80℃冻存备用。实验用药时加入完全培养基使药物血清浓度为 20%,4℃保存备用。(2)细胞的培养:人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长状态良好时,进行传代。(3)CCK-8 法检测细胞增殖:将处于对数生长期的 MDA-MB-231 接种于 96 孔板,调整密度为 1×10^5 个/毫升,每孔体积 100μl,置于培养箱培养(37℃、5% CO₂),待细胞完全贴壁后,更换含有各组 20% 药物血清的培养液 100μl,分别在孵育 24、48、72h 后,加入 10μl CCK-8 溶液。另设调零孔,每组 8 个复孔,将培养板在培养箱中孵育 1.5h 后,用酶标仪测定 450nm 处的吸光度(A 值)。计算细胞抑制率 = (空白组 A 值 - 实验组 A 值) / (空白组 A 值 - 调零孔 A 值) × 100%。(4)流式细胞仪检测细胞凋亡:采用 Annexin V-FITC 凋亡

检测试剂盒检测细胞凋亡。选择处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁完全后,加入各组药物血清至终浓度为 20%,培养箱培养 48h。根据以下步骤操作:①用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞,计数后各组各取 5×10^5 个细胞,1000r/min 离心 3min,弃上清;②预冷的 PBS 洗涤细胞二次(1000r/min,3min),弃上清;③用 500μl Binding Buffer 重悬细胞,加入 5μl Annexin V-FITC 轻轻混匀后;再加入 5μl Propidium Iodido,混匀;④避光、室温反应 5min;⑤用流式细胞仪检测(激发波长 Ex = 488nm;发射波长 Em = 530nm)。通过 FITC 通道(FL1)检测 Annexin V-FITC 的绿色荧光,FL3 通道检测 PI 红色荧光通道;⑥用未经凋亡诱导处理的正常细胞作为对照进行荧光补偿调节,去除光谱重叠,设定十字门的位置。总凋亡率为右下及右上细胞所占比例的总和。

3. 统计学方法:实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验进行组间均数的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 乳康饮及拆方对 MDA-MB-231 细胞形态的改变及增殖抑制作用:(1)将各组细胞药物干预 48h 后,在倒置显微镜下观察,空白对照组 MDA-MB-231 细胞呈典型的长形、多角形态,细胞丰满,有较好的立体感,贴壁生长;氟尿嘧啶组 MDA-MB-231 细胞数目明显少于空白对照组,且细胞出现皱缩,培养液中出现明显脱落细胞及碎片,贴壁状态不佳,细胞生长受到明显抑制作用;乳康饮及各拆方组 MDA-MB-231 细胞也不同程度出现生长抑制现象,以乳康饮组为重,抑制现象近似于氟尿嘧啶组;疏肝理气组抑制现象略低于乳康饮组,而益气健脾组抑制现象则明显低于乳康饮(图 1)。(2)CCK-8 法检测各组处理因素对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制影响:分别在 24、48、72h 测得各组抑制率之间差异均有统计学意义($F = 58.248、19.566、34.457, P < 0.05$),各时间点抑制作用以氟尿嘧啶组最为显著,其次为乳康饮组,而益气健脾组、疏肝理气组两组抑制作用较弱。氟尿嘧啶组抑制率在 24h 已较为明显,随着作用时间延长,抑制率不断增加,中药各组在 24~48h 抑制率增长幅度明显高于氟尿嘧啶组,48h 后乳康饮组与氟尿嘧啶组间抑制率差异无统计学意义($P = 0.076$,图 2,表 1)。

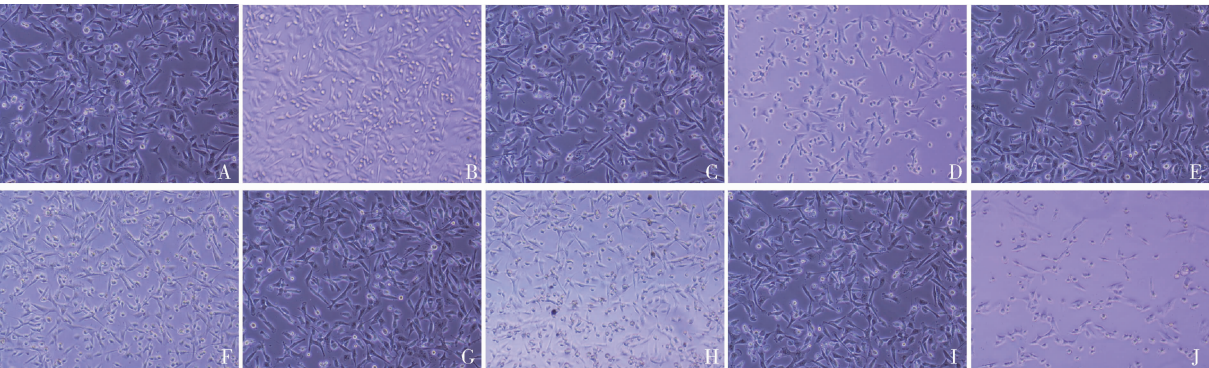


图 1 乳康饮及拆方对 MDA - MB - 231 细胞形态的改变及增殖抑制作用 (× 100)

A. 空白对照组干预前;B. 空白对照组干预后;C. 乳康饮组干预前;D. 乳康饮组干预后;E. 益气健脾组干预前;F. 益气健脾组干预后;G. 疏肝理气组干预前;H. 疏肝理气组干预后;I. 氟尿嘧啶组干预前;J. 氟尿嘧啶组干预后

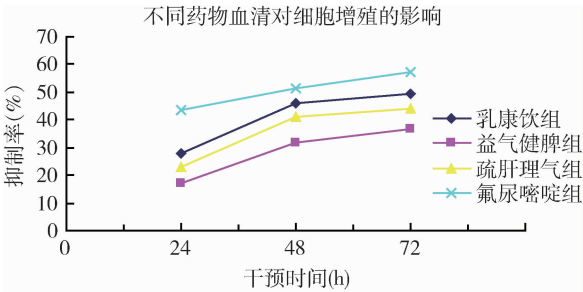


图 2 不同药物血清对细胞增殖的影响

2. 乳康饮及拆方对 MDA - MB - 231 细胞凋亡的影响:流式细胞仪检测细胞凋亡结果,将各组细胞分别加入各组药物血清处理 48h 后,利用流式细胞仪对细胞凋亡进行定量检测。结果显示,各处理组细胞凋亡率与空白对照组比较均显著增加,以氟尿嘧啶组增加最为明显,依次为乳康饮组、疏肝理气组、益气健脾组 ($P < 0.05$)。乳康饮组与氟尿嘧啶组凋亡率差异无统计学意义,但明显高于疏肝理气组、益气健脾组 ($P = 0.000$,图 3,表 1)。

表 1 不同药物血清作用下对 MDA - MB - 231 细胞株的增殖及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	24h 抑制率	48h 抑制率	72h 抑制率	凋亡率
空白对照组	-	-	-	3.89 ± 0.12
乳康饮组	27.98 ± 1.63	46.05 ± 3.28	49.61 ± 0.79	40.67 ± 1.53
益气健脾组	16.90 ± 1.72	31.85 ± 0.43	36.79 ± 2.16	16.27 ± 1.47
疏肝理气组	23.17 ± 0.92	41.24 ± 1.94	44.30 ± 2.25	23.16 ± 1.94
氟尿嘧啶组	43.39 ± 3.86	51.48 ± 5.27	57.17 ± 3.92	57.53 ± 3.13

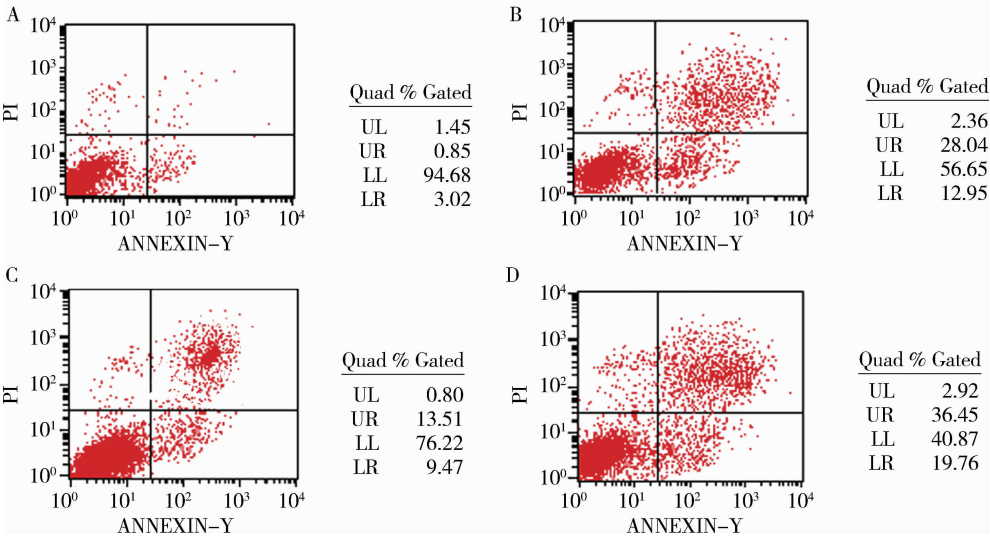


图 3 流式细胞仪测 MDA - MB - 231 凋亡

A. 空白对照组;B. 乳康饮组;C. 疏肝理气组;D. 氟尿嘧啶组

讨 论

乳腺癌是最为常见的女性恶性肿瘤之一,作为一种高度异质性的恶性肿瘤,根据其分子亚型的不同分为 Luminal A 型、Luminal B 型、Basal-like 型、HER-2 过表达型和正常乳腺样型^[4]。其中大部分 Basal-like 型中,ER、PR、HER-2 均表达阴性,称为三阴性乳腺癌,其组织学分级高,恶性程度相对较高,较其他类型乳腺癌更易复发,治疗方法也相对局限,无法进行内分泌治疗及靶向治疗,故预后较差^[5]。前期对中药乳康饮在乳腺癌淋巴转移模型中作用的研究表明,乳康饮可以通过干预 VEGF-C/D、VEGFR-3、Ang-2 蛋白和基因的表达,从而影响淋巴管的生成,达到抑制乳腺癌淋巴转移的作用^[3,6]。而现在越来越多的实验研究表明,中药可以干预乳腺癌发生、发展中的多个信号通路。

本研究所用的中药乳康饮(黄芪、茯苓、柴胡、青皮、薏苡仁、莪术),其单药或联合方剂的作用已经大量国内外实验研究证实。莪术具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤的作用,对癌细胞本身进行杀伤,其中的重要活性成分莪术醇可以通过调节羟基末端结合蛋白 1(GtBP1)的表达从而调控相关基因,进而调节上皮-间质转化(EMT),影响多种肿瘤抑制因子的表达,破坏癌细胞有丝分裂,使其停滞在 G₁ 期,抑制肿瘤细胞的增殖促进肿瘤细胞的凋亡^[7]。

黄芪具有补中益气、固表升阳等功效,临床常用于提高肿瘤患者机体免疫功能,叶媚娜等^[8]的研究表明黄芪可以通过下调丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B(Akt)磷酸化的水平调控磷脂酰肌醇-3 激酶(PI₃K)/AKT 信号通路,进而调控肿瘤细胞周期,对肿瘤细胞达到抑制增殖、促进凋亡、减少脱落扩散的作用,并影响前列腺素 E₂(PGE-2)、血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶 2(COX-2)等相关蛋白的表达,抑制肿瘤血管和淋巴管的生长,阻碍肿瘤的生长及侵袭转移过程^[9]。茯苓为多孔菌科真菌类中药,其中主要有效作用成分为茯苓多糖和茯苓三萜类,茯苓可以通过增强机体免疫功能、活化免疫细胞、调节多种免疫分子等多种途径相互作用,影响肿瘤细胞生长周期,起到抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡^[10]。柴胡的主要活性成分为柴胡皂苷,可以促使肿瘤细胞停滞于细胞分裂静止期,抑制细胞的分裂和增殖,并通过多种途径调节基因促进细胞的凋亡,并抑制基质金属蛋白酶的表达,继而发挥抑制肿瘤转移的作用^[11]。薏苡仁通过破坏肿瘤细胞的 DNA 来抑制细

胞增殖,并通过抑制细胞周期素 A 的表达、诱导多二磷酸腺苷核糖多聚酶的分解,促进细胞凋亡,并通过下调 CD44、CD133、VEGF 的表达,抑制肿瘤血管及淋巴管的生成,降低恶性肿瘤的黏附、侵袭转移的能力^[12,13]。青皮的有效成分为橙皮苷,可促进人体对致癌物质的排泄,并可诱发肿瘤细胞的凋亡^[14]。

本实验表明,乳康饮可以抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖,并促进其凋亡,而其拆方的作用效果明显低于全方,说明各中药成分间有着相互促进作用。在细胞增殖实验中,乳康饮组抑制细胞增殖的作用及起效时间均优于其他拆方组,而疏肝理气组作用要强于益气健脾组,推测疏肝理气组中的中药成分对肿瘤抑制作用要偏强于益气健脾组。结合前期实验表明,乳康饮对于乳腺癌的治疗均具有一定的疗效,具体药物之间的相互促进或抑制作用仍需开展进一步的实验予以论证。

参考文献

- 1 Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, *et al.* Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7):279-289
- 2 陈建萍,赵淑华,卓灏栢,等. 中医防治乳腺癌复发与转移的策略与方法[J]. *环球中医药*, 2011, 4(2):125-128
- 3 李湘奇,党相国. 乳康饮对裸鼠乳腺癌自发性转移模型淋巴管生成的干预作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(12):1657-1661
- 4 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797):747-752
- 5 王周权,王学良. 三阴性乳腺癌的临床病理特点及预后分析研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 5:913-916
- 6 孙喜波,李湘奇. 乳康饮干预裸鼠乳腺癌组织 Ang-2 表达抑制淋巴转移的作用[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(9):70-74
- 7 李海龙,刘培,高秀飞. 中药莪术提取物对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(10):2416-2418
- 8 叶媚娜,陈红风,周瑞娟,等. 黄芪多糖对基底细胞样乳腺癌细胞增殖和 Akt 磷酸化的影响[J]. *中西医结合学报*, 2011, 12:1339-1346
- 9 李凯,石来敏,孟会会,等. 乳腺癌中 PTEN、SHIP 的表达对淋巴转移的影响[J]. *中国癌症防治杂志*, 2015, 7(5):372-375
- 10 王颜佳. 茯苓抗肿瘤、免疫调节药理作用研究及应用[J]. *海峡药学*, 2014, 5:16-18
- 11 彭顺利,张巍,李妍. 柴胡皂甙 d 的作用及其机制的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2014, 35(1):66-68
- 12 耿春霞. 浅谈薏苡仁在肿瘤治疗中的作用[J]. *云南中医中药杂志*, 2014, 35(12):74-76
- 13 苏芳,于常华. 薏苡仁油抗恶性肿瘤作用的研究进展[J]. *临床荟萃*, 2014, 9:1075-1078
- 14 Tsai TH, Liu MC. Determination of extracellular hesperidin in blood and bile of anaesthetized rats by microdialysis with high-performance liquid chromatography: a pharmacokinetic application[J]. *J Chromatog B*, 2004, 806(2):161-166

(收稿日期:2016-04-14)

(修回日期:2016-04-29)