

黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖周期以及细胞凋亡、迁移影响的实验研究

刘晓丽 梁羽茜 胡秀华

摘要目的 探讨黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖、周期、凋亡及迁移的影响。**方法** 通过 MTT 法观察药物处理后对乳腺癌 MCF - 7 细胞的生长增殖情况的影响;通过流式细胞术检测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖周期、凋亡的影响;利用划痕实验检测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞的迁移的影响。**结果** MTT 结果发现,不同浓度的黄芪注射液(100、200、400、600、800mg/ml)对乳腺癌 MCF - 7 细胞的增殖具有不同程度的抑制作用;流式细胞术结果显示,与空白对照组相比,200 和 400mg/ml 黄芪注射液均能导致 G₁ 期增加,且两个浓度的凋亡率都大于空白对照组;划痕实验结果显示 200 和 400mg/ml 黄芪注射液组较空白对照组划痕愈合率低。**结论** 不同浓度的黄芪注射液在体外对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖具有一定的抑制作用;同时可将细胞增殖周期阻滞在 G₁ 期,促进 MCF - 7 细胞凋亡;一定浓度的黄芪注射液对 MCF - 7 细胞的迁移具有抑制作用,为乳腺癌的临床应用提供实验基础。

关键词 乳腺癌 MCF - 7 细胞 黄芪注射液 细胞增殖和细胞周期 细胞凋亡 细胞迁移

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.019

Effects of Astragalus Injection on Breast Cancer Cells Proliferation and Apoptosis and Migration. Liu Xiaoli, Liang Yuxi, Hu Xiuhua.

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract Objective To investigate the effect of Astragalus injection on cell proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of breast cancer MCF - 7 cells in vitro. **Methods** MTT method was used to observe cell proliferation of MCF - 7 treated with Astragalus injection; Flow cytometry was applied to detect cell cycle and apoptosis of MCF - 7 cells; Scratches test was used to study cell migration in MCF - 7 cells. **Results** MTT results showed that cell proliferation in MCF - 7 cells treating with different concentrations of Astragalus injection(100, 200, 400, 200, 800mg/ml) could be inhibited. Flow cytometry results indicated that the percentage of G₁ phase in MCF - 7 cells treated by 200mg/ml and 400mg/ml Astragalus injection, compared with the control group, could be increased; Moreover, we could observed that apoptosis rate was greater than the control group. The scratch analysis indicated that MCF - 7 cells treated by 200mg/ml and 400mg/ml Astragalus injection had lower wound healing rate than control. **Conclusion** We found Astragalus injection could inhibit cell proliferation and cell migration in different concentration in vitro. Interesting, G₁ phase arrest could be induced and apoptosis rate in MCF - 7 cells could be increased by Astragalus injection. Our findings can provide experiment foundation about application of Astragalus injection in clinic medicine.

Key words Breast cancer MCF - 7 cell; Astragalus injection; Cell proliferation and cell cycle; Apoptosis; Migration

乳腺癌是女性最常发的恶性肿瘤之一,常为无痛硬块,边界不清,不能推动,是中医证候中的“乳岩”。近年来,乳腺癌在我国城乡的发生率都呈上升趋势,并以每年 3% 的速度递增,中医标本兼治的思想在乳腺癌的治疗方面具有重要意义^[1]。目前西医治疗乳腺癌的方法依然是以切除原发病灶为主,保乳治疗是

一个重要的研究方向,对不同生物学分期和类型的患者提供个体化有针对性的治疗,提高生存率和生活质量^[2,3]。中医认为乳腺癌的发生、发展与肝、脾、肾三脏有密切关系,且大多患者证候表现为虚实夹杂,虚证为本,因此补虚扶正是治疗乳腺癌疾病的重要法则^[4]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的根,味甘,性微温,具有补气健脾、升阳举陷、益卫固表、利尿消肿、托毒生肌的功效,现代研究显示黄芪多糖具有降血糖、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗应激、抗氧化等作用^[5]。本实验基于中医健脾祛痰的理论,依据黄芪的健脾化痰功效及其现代研究,采用 MTT 法、流式

基金项目:北京市共建项目——大学生科研基金资助项目(BJGJ1507)

作者单位:100029 北京中医药大学

通讯作者:胡秀华,副教授,电子信箱:xiuhuahu@126.com

细胞术及划痕实验,来探讨不同浓度黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 增殖周期、凋亡及迁移的影响,为深入研究黄芪治疗乳腺癌提供实验基础。

材料与方法

1. 主要仪器:倒置显微镜(日本 Olympus 公司),酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司),96 孔细胞培养板、细胞培养瓶(美国 Corning 公司)。

2. 主要试剂:胎牛血清(美国 Gibco 公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),生理盐水、碘化丙啶(PI,美国 Sigma 公司),RNA 酶(美国 Sigma 公司),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司)。黄芪注射液(2g/ml,10 毫升/支)购自神威药业有限公司;乳腺癌 MCF - 7 购自北京协和医学院基础学院细胞中心。

3. MTT 法测定黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖的影响:乳腺癌 MCF - 7 细胞株为本实验室留存,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置 37℃、5% CO₂ 的培养箱内静置培养,取对数生长期的乳腺癌 MCF - 7 细胞以每孔 2×10^4 个/毫升接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养 24h 后换液,加入含不同质量浓度黄芪注射液的培养基(终浓度分别为 100、200、400、600、800 mg/ml),同时设置阴性对照孔,每个组设 6 个平行孔,继续培养 48h 后,吸出每孔中的药液并用生理盐水清洗 1 次,避光条件下,每孔加入质量浓度为 5 g/ml 的 MTT 溶液 10 μl,再每孔加入 90 μl 无血清培养基混匀,用锡纸包裹在培养箱中继续培养 4h 后弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,摇床震荡 40min,放入酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度值(A 值),通过公式计算细胞生长抑制率,抑制率(%) = (1 - 实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) × 100%。

4. 流式细胞术检测乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖周期及细胞凋亡:将对数生长期的乳腺癌 MCF - 7 以 1×10^6 个/毫升接种于 25 cm² 培养瓶中,待 80% 细胞汇合成片后,弃培养基。实验组加入不同浓度的黄芪注射液,终浓度分别为 200、400 mg/ml,设立空白对照组,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48h 后收集细胞。用冷生理盐水洗涤细胞 1 次后离心(1000 r/min,5 min),弃上清液,加入 4℃ 预冷的 75% 乙醇,4℃ 固定过夜。将固定好的细胞用 4℃ 生理盐水洗两次,分别加

入 50 μg/ml 的 RNA 酶孵育 40min 后,加入 50 μg/ml 的 PI,避光 10min 后上机检测分析细胞的增殖周期。

5. 划痕实验检测乳腺癌 MCF - 7 细胞迁移情况:

将对数生长期的 MCF - 7 细胞接种于 24 孔板内,细胞浓度为 1.8×10^5 个/毫升,培养 24h 后,用无菌 1000 μl 枪头在每个孔底划出一条直线,用生理盐水洗 2 遍,拍照记录后,分别加入 200、400 mg/ml 的黄芪注射液,设立空白对照组,继续培养 24h 后在显微镜下观察划痕愈合度,拍照记录,并分析细胞的迁移情况。

6. 统计学方法:数据采用 SAS8.2 软件进行统计分析,所有实验均重复 3 次以上,实验结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 个独立样本组间均数比较用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖的影响:分别用不同浓度的黄芪注射液处理细胞(终浓度分别为 100、200、400、600、800 mg/ml),同时设立空白对照组。MTT 结果如表 1 所示,与对照组相比,不同浓度的黄芪注射液处理细胞 48h 后,乳腺癌 MCF - 7 细胞的增殖均受到抑制,抑制率分别是 23.20%、25.63%、26.78%、27.27%、32.47%,与对照组相比,各组统计学分析差异有统计学意义($P < 0.05$),不同剂量组相比,100、200、800 mg/ml 差异有统计学意义($P < 0.05$),400、600 mg/ml 剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 MTT 法测定黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 的抑制情况($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物浓度(mg/ml)	A 值	抑制率(%)
空白对照组	0	1.314 ± 0.031	0
黄芪注射液作用	100	$1.009 \pm 0.028^{* \#}$	23.20
48h 实验组	200	$0.977 \pm 0.039^{* \#}$	25.63
	400	$0.962 \pm 0.031^{*}$	26.78
	600	$0.956 \pm 0.038^{*}$	27.27
	800	$0.887 \pm 0.139^{* \#}$	32.47

与空白对照组相比,^{*} $P < 0.05$;各剂量组间相比,[#] $P < 0.05$

2. 流式细胞术检测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞周期的影响:不同浓度黄芪注射液作用 48h 后,流式细胞术分析结果如表 2、图 1 所示,200、400 mg/ml 黄芪注射液作用 48h 后,药物组与对照组相比,细胞周期有明显变化,200 mg/ml 作用 48h 后,

与对照组相比, G_1 期细胞数升高 5.81%, S 期细胞数升高 1.99%, G_2 期细胞数减少 7.8%; 400mg/ml 作用 48h 后, 与对照组相比, G_1 细胞数升高 11.73%, S 期细胞数降低 2.2%, G_2 期细胞数减少 9.53%, 与 200mg/ml 作用 48h 组相比 G_1 期细胞数升高 5.92%, S 期细胞数降低 4.19%, G_2 期细胞数减少 1.73%。

表 2 不同浓度黄芪注射液作用 48h 后流式细胞术检测乳腺癌 MCF - 7 细胞周期中各时相所占百分数

药物浓度 (mg/ml)	占细胞总数的百分数(%)		
	G_1 期	S 期	G_2 期
0	64.61	16.88	18.51
200	70.42	18.87	10.71
400	76.34	14.68	8.98

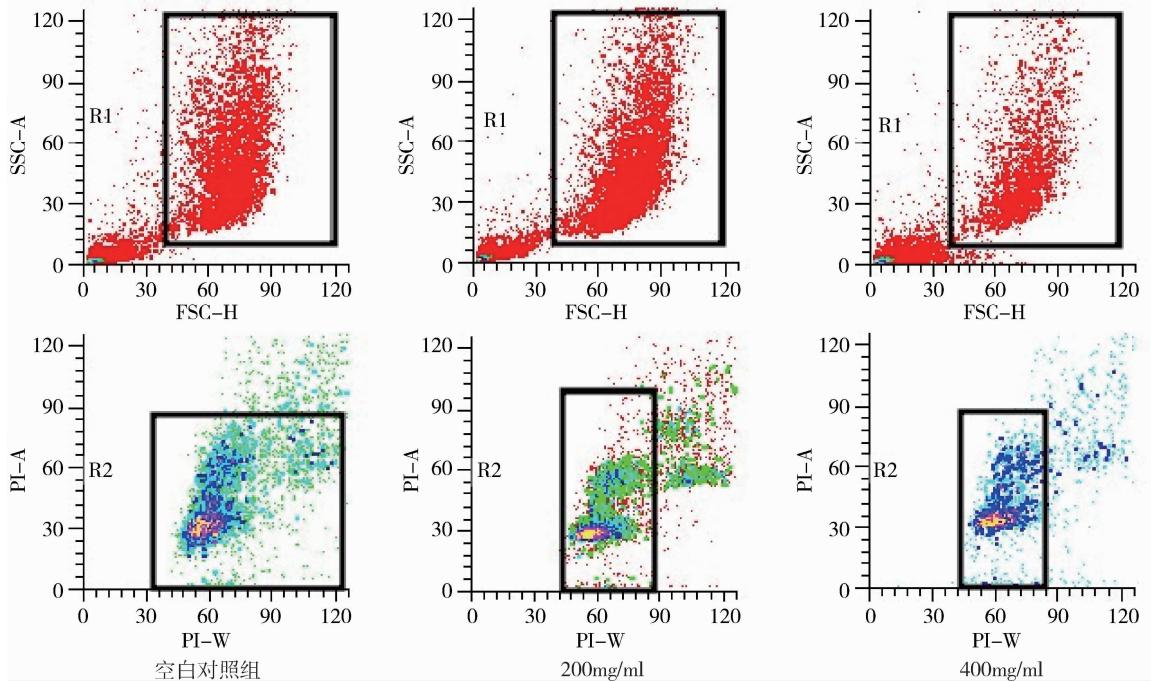


图 1 不同浓度黄芪注射液对 MCF - 7 细胞周期的影响

3. 流式细胞术检测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡的影响: 不同浓度黄芪注射液作用 48h 后, 流式细胞术分析细胞凋亡结果显示, 0、200、400mg/ml 黄芪注射液作用 48h 后, 细胞凋亡率分别为 0.65%、1.31%、2.65%。

4. 划痕实验检测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞迁移的影响: 划痕实验结果发现, 与空白对照组相比浓度为 200、400mg/ml 的黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞迁移有一定的抑制作用, 如图 2 所示。药物作用 24h 后观察发现, 空白对照组乳腺癌 MCF - 7 细胞与 0h 相比有明显的生长, 划痕有愈合趋势。200mg/ml 黄芪注射液作用 24h 后乳腺癌 MCF - 7 细胞生长较空白对照组较少, 划痕愈合趋势不明显。400mg/ml 黄芪注射液作用 24h 后乳腺癌 MCF - 7 细胞较空白组受到较明显的抑制, 细胞稀疏生长, 未见划痕愈合趋势。表明黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞迁移有较为明显的抑制作用。

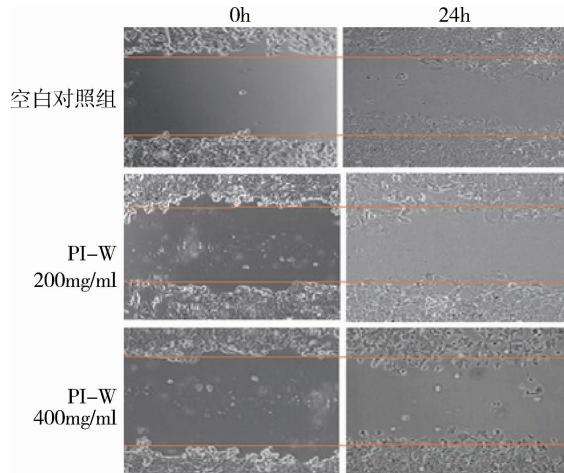


图 2 黄芪对乳腺癌 MCF - 7 细胞迁移的影响

讨 论

乳腺癌是女性最常见的肿瘤, 在女性恶性肿瘤病死率中, 乳腺癌位居第 2 位, 严重威胁女性健康, 每年

全球的发生率高达 167 万例,尤其是西方国家女性更易发病^[6]。黄芪注射液为中药黄芪的提取物,能够提高白细胞作用和免疫调节作用,因而在抗肿瘤治疗中具有积极的治疗作用,此外较多临床研究表明黄芪注射液联合化疗治疗恶性肿瘤能够降低化疗不良反应提高患者生活质量^[7]。乳腺癌 MCF - 7 细胞是雌激素受体阳性细胞,而雌激素能够有效的促进细胞凋亡起到预防治疗乳腺癌疾病的作用^[8,9]。因此本实验旨在证实中药黄芪自身即具有抗肿瘤的作用,结果显示 200 和 400mg/ml 黄芪注射液与空白对照组相比均能使乳腺癌 MCF - 7 细胞 G₁ 期增加,使 G₂ 期减少,且两个浓度的凋亡率都大于空白对照组,说明细胞增殖受到抑制,这与 MTT 结果相一致。因此,可以认为两个浓度的黄芪注射液都具有抑制细胞增殖的生物学意义,而黄芪注射液 200mg/ml 组的 S 期、G₁ 期与空白对照组相比均升高,400mg/ml 组的 S 期与空白对照组及 200mg/ml 组相比降低、G₁ 期与空白对照组与 200mg/ml 组相比均升高,可以推测黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞周期阻滞在 G₁ 期及 S 期,但随着药物浓度的增加细胞周期阻滞在 G₁ 期,这表明黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 的增殖的抑制作用主要通过 G₁ 期阻滞来完成的,由此推断 G₁ 期可能是黄芪注射液作用于乳腺癌 MCF - 7 的治疗靶点,具体机制仍需进一步实验证实。

多项研究表明,Akt 参与的信号转导途径与乳腺癌相关基因的突变或异常表达密切相关,且发现 Akt 调控的 CDK2 基因的磷酸化既可以调节细胞增殖,又可以调节细胞凋亡,且可能和 G₁/S 细胞周期阻滞有关^[11,12]。王宴颖等^[13]的研究发现黄芪多糖能上调大鼠急性脊髓损伤后 Akt 的表达,来修复脊髓损伤。赵海梅等^[14]的研究发现黄芪多糖能够下调急性溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 PI₃K/Akt 信号的调控作用,通过抑制 PI₃K 表达、p-Akt 活化来减轻炎性损伤,刘宏帅等^[15]的研究发现黄芪皂苷 I 调控 PI₃K/Akt/NF-κB 通路抑制 LPS 诱导 BV - 2 细胞激活,从而抑制炎性因子鸡蛋白的生成。因此研究黄芪注射液调节 Akt 参与的信号转导途径对乳腺癌相关基因的影响将是笔者进一步研究的内容。黄芪注射液除可抑制细胞增殖,促进细胞凋亡外,实验中笔者还发现黄

芪注射液可以抑制乳腺癌 MCF - 7 细胞的迁移,抑制迁移的机制需要进一步研究确定。

综上所述,本实验确定了中药黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 的增殖具有抑制作用,并可将细胞增殖周期阻滞在 G₁ 期。同时发现,黄芪注射液促进乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡,抑制 MCF - 7 细胞迁移,为中药黄芪的临床应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 黄宏. 中医治疗乳腺癌的历史发展与现代价值[D]. 杭州:浙江大学,2013
- 2 李金锋. 乳腺癌治疗研究进展[J]. 科技导报,2014,26:22-26
- 3 张彦收,刘运江. 乳腺癌手术治疗回顾和进展[J]. 现代肿瘤医学,2015,5:719-723
- 4 彭磊. 乳腺癌中医治疗研究进展[J]. 亚太传统医药,2016,9(12):52-53
- 5 曹琦,陈若文,孙桂菊,等. 黄芪多糖生理功能研究进展[J]. 粮食与食品工业,2016,2;57-60,65
- 6 Nasim M, Paul DPP, Kyriaki M, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants[J]. J Natl Cancer Inst,2015,107(5):36
- 7 荣震,陈羽娜,王同彪,等. 黄芪注射液联合化疗对癌症治疗的 Meta 分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,12:12-15
- 8 Jordan VC. The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer,2015,22(1):R1-R31
- 9 杨小敏,徐晓武,潘丹,等. 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达及临床意义[J]. 医学研究杂志,2016,2(45):95-98
- 10 顾蕾,陈一飞,应明真,等. 磷酸化 AKT 和 HER-2 蛋白在早发性乳腺癌中的表达及意义[J]. 医学研究杂志,2014,6(43):30-34
- 11 Nicole MD, Melissa S, Kristin S, et al. Deregulation of the EGFR/PI₃K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention[J]. Oncotarget, 2014,5(13):4603-4650
- 12 Liu P, Begley M, Michowski W, et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus[J]. Nature,2014,508(7497):541-545
- 13 王宴颖,孙瑶. 黄芪多糖对大鼠急性脊髓损伤后 Akt 表达的影响[J]. 解剖科学进展,2015,2:181-183
- 14 赵海梅,黄敏芳,刘端勇,等. 黄芪多糖对急性溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 PI₃K/Akt 信号的调控作用[J]. 中成药,2015,9;2029-2031
- 15 刘宏帅,李文慧,沈慧,等. 黄芪皂苷 I 调控 PI₃K/Akt/NF-κB 通路抑制 LPS 诱导 BV - 2 细胞激活[J]. 中华中医药杂志,2016,5:1946-1950

(收稿日期:2016-06-18)

(修回日期:2016-07-11)