

和三七中活性最显著的达玛烷型四环三萜皂苷以及甾体皂苷。本实验室前期研究工作发现——竹节参的有效活性部位,总皂苷对多种脑缺血模型有很好的保护作用,能够改善脑缺血动物的神经功能症状和血液流变学指标,减轻脑组织病理形态学改变,同时能够提高拟血管痴呆模型动物的学习记忆能力^[8-10],本次研究发现竹节参总皂苷可上调慢性脑缺血大鼠海马神经生长相关蛋白 GAP-43 的表达,降低海马星形胶质细胞的增生有一定的相关性。

参考文献

- [1] 赵晖,王嵩,张秋霞,等. 竹节参总皂苷对血管痴呆大鼠递质氨基酸及白蛋白代谢的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,11(30):3096-3098.
- [2] 田金洲. 血管性痴呆. 北京:人民卫生出版社,2003:598-607.
- [3] 谭来勋,孙圣刚,段申汉,等. 大鼠海马星形胶质细胞对突触可塑性的影响[J]. 卒中与神经疾病,2005,12(6):158.
- [4] Carulli D, Buff A, Strata P. Reparative Mechanisms in the Cerebellar Cortex. Prog Neurobiol,2004,72(6):373.
- [5] Takei H, Buckleair I.W, Rivera A, et al. Brain Tissue Microarrays in Neurodegenerative Diseases: Validation of Methodology and Immunohistochemical Study of Growth-associated Protein-43 and Calretinin. Pathol,2007,57(12):775-83.
- [6] Andersson M, Blomstrand F, Hanse E. Astrocytes Play a Critical Role in Transient Heterosynaptic Depression in the rat Hippocampal CA1 Region. J Physiol,2007,585(3):843-52.
- [7] Lee Y, Su M, Messing A, et al. Astrocyte Heterogeneity Revealed by Expression of a GFAP-LacZ Transgene. Glia,2006,53(7):677-87.
- [8] 赵晖,张秋霞,穆阳. 竹节参总皂苷对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(3):43.
- [9] 刘家兰,李德清,段先宇. 竹节人参提取物对大鼠和小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. 湖北民族学院学报(医学版),2002,19(1):35.
- [10] 赵晖,李佳,穆阳. 竹节参总皂苷对主动脉栓塞模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(11):33.

(2012-08-15 收稿)

软坚消瘤片药物血清对乳腺癌 MCF-7 细胞生长的机制研究

张士云 朱瑞丽 高 磊 王彦云 莫爵飞 潘菊华 刘起华 汪 莲 刘贵建

(中国中医科学院广安门医院,北京,100053)

摘要 目的:通过观察软坚消瘤片药物血清对乳腺癌 MCF-7 细胞的芳香化酶和雌激素受体基因的表达、细胞增殖周期及细胞凋亡的影响,探讨软坚消瘤片治疗乳腺肿块性疾病的可能机制。方法:制备软坚消瘤片含药动物血清,以体外培养的 MCF-7 细胞为研究对象,以 qRT-PCR 法检测乳腺癌细胞芳香化酶(CYP19)及雌激素受体(ER)mRNA 表达水平;流式细胞术(FCM)测定细胞增殖周期和凋亡水平;MTS 实验测定细胞生长曲线。结果:与空白对照组比较,含药血清组作用细胞 24 h 后能明显抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 的 CYP19 mRNA、ER mRNA 表达水平,表达水平分别降低 0.32 和 0.09 倍;药物血清作用 48 h 后 S 期和 G2/M 期细胞所占比例降低,尤以 G2/M 期最为显著,相应的 G0/G1 期细胞增加,药物血清抑制了细胞增殖的正常进行;凋亡实验示细胞早期凋亡率增加,药物血清组总体凋亡率高于对照组;药物血清作用细胞 48 h 以后细胞生长曲线幅度开始明显低于对照组,在 96 h 时抑制效果最明显。结论:软坚消瘤片药物血清影响乳腺癌 MCF-7 细胞的雌激素合成及其作用发挥,同时抑制一定时段的细胞生长。

关键词 乳腺癌/中医药疗法;@软坚消瘤片;药物血清;MCF-7 细胞

Mechanism Research of Inhibition of MCF-7 Cell Growth with Ruanjian Xiaoliu Pill Drug Serum

Zhang Shiyun, Zhu Ruili, Gao Lei, Wang Yanyun, Mo Juefei, Pan Juhua, Liu Qihua, Wang Lian, Liu Guijian

(Guang An Men Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Ruanjian Xiaoliu Pill (RJXLp) drug serum on aromatase, estrogen receptor (ER) expression level, cell generation cycle and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7 cells. **Methods:** RJXLp drug serum was prepared and MCF-7 cells were treated with it for 24, 48 and 96h respectively. Then the expression of aromatase and ER mRNA were analyzed by qRT-PCR, cell generation cycle and apoptosis were assayed by flow cytometry (FCM) and cell growth curve was determined by MTS. **Results:** After incubated in RJXLp drug serum for 24h, expression of CYP19 mRNA, ER mRNA of MCF-7 cells decreased significantly compared to control group (0.32 and 0.09 fold, respectively). For the cell generation cycle analysis, cell cycle process of MCF-7 cells

基金项目:中国中医科学院广安门医院科研基金资助附属项目(编号:81333)

通信作者:刘贵建,教授,主任医师, E-mail:liuguijian@hotmail.com

was changed after 48h treatment with RJXLp drug serum. Cells in S and G2/M phase decreased, especially in G2/M phase, while cells in G0/G1 phase increased. Both early and late apoptosis cells increased compared with control group. MTS assay showed cell growth curve declined after incubated in drug serum for 48h for the drug serum group and inhibition effects reached the peak when incubated for 96h. **Conclusion:** RJXLp drug serum can inhibit estrogen biosynthesis, attenuate its effects, and suppress cell growth as well.

Key Words Breast carcinoma /Chinese medical therapy; @ Ruanjian Xiaoliu Pill; MCF-7 cells

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.02.024

软坚消瘤片为中国中医科学院传统经验方,以中医“健脾益气、解毒散结”为法配方,具有健脾益气化痰、解毒软坚散结等功效,用来治疗乳腺增生、乳腺癌、乳腺癌、子宫肌瘤、卵巢瘤、神经纤维瘤等常见肿瘤,尤其在治疗脾虚痰结证的乳腺良恶性肿瘤性疾病,效果较好。鉴于软坚消瘤片治疗乳腺良恶性肿瘤性疾病的良好作用,本研究拟通过观察软坚消瘤片药物血清对乳腺癌 MCF-7 细胞色素 P450 芳香化酶基因 (Cytochrome P450 aromatase, CYP19)、雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER) mRNA 表达、细胞生长周期及细胞凋亡的影响,以期探讨软坚消瘤片对乳腺癌细胞的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 雌性 Wistar 大鼠 40 只,购于中国医学科学院实验动物中心,批号:SCXK 京(2009-0007),饲养于中国中医科学院广安门医院动物室,在无特殊病原体 (SPF) 环境下饲养。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株,来源于北京市肿瘤防治研究所细胞库。

1.1.3 药物与试剂 软坚消瘤片由薏苡仁、拳参、北败酱草、夏枯草等成分组成,由中国中医科学院广安门医院药剂科制剂中心提供,批准文号:京药制字 Z20063248。细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC kit)、细胞周期测试试剂盒 (CycleTest Plus Reagent kit),均购自美国 BD 公司;荧光染料,购自美国 ABI 公司;MTS 细胞增殖试剂盒 (promega, Cat# G3582),购于北京利文商贸有限责任公司;Trizol 试剂 (Qiagen, Cat# 15596-018)、Hyclone 胎牛血清,购于北京市普京康利科技有限公司;PCR 引物,由上海生工生物有限公司合成。引物序列见表 1。

1.1.4 仪器与设备 二氧化碳培养箱 (MCO-15AC),SANYO 公司产品;超速低温离心机 (Centrifuge 5430R),德国 Eppendorf 产品;流式细胞仪 (FACSCalibur),美国 BD 公司生产;基因扩增仪 (LightCycler 480 II),Roche 公司产品;核酸定量分析仪 (NANODROP 2000),Thermo 公司产品。

表 1 PCR 扩增引物序列

名称	序列 (5'→3')
TBP	Aacaacagcctgccacctta Ctgaataggctgtgggtca
Aromatase	Tgtggacgtgtgacccttct Accacgatagcactttgtcca
Steroid Sulfatase	Gatcattcagcagcccatgt Gaggtaggacaagacaagcagg
ER α	Ccaccacccagtgcaccatt Ggttttttgatccacatttc
ER β	Agagtcctgtgtgaagcaag Gacagcgcagaagtgcacac

1.2 药物血清制备 选用 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 40 只,于购入 1 周后按体质量分层,随机分为治疗组、空白对照组,每组 20 只。治疗组灌服软坚消瘤片浸膏,剂量 0.333 g/kg (相当于人临床用量 10 倍);空白对照组给同体积生理盐水。每日 2 次,连续 3 d,第 4 天给药后 1 h,用戊巴比妥钠腹腔麻醉 (40mg/kg),腹主动脉取血,分离血清,将含药血清和对照血清于 -70℃ 冰箱中保存。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 芳香化酶、雌激素受体 mRNA 测定 常规细胞培养至对数生长期,加入含药血清和对照血清作用 24 h 后,收集细胞提取细胞 RNA。采用荧光染料掺入 qRT-PCR 法测定芳香化酶、雌激素受体 mRNA 的表达水平,以相对定量的方法计算含药血清组各指标变化情况,重复 3 次取均值。选择 TBP 基因作为内参基因,根据 ABI 染料标准操作配制反应体系。

1.3.2 细胞周期测定 取 2 组对数生长期 MCF-7 细胞加入 1 mL 基础培养液 (含 hyclone 胎牛血清),4 mL 动物血清 (治疗和对照各一组),作用 48 h 后,胰酶消化处理,制成单细胞悬液,按细胞周期测试试剂盒操作程序测定细胞周期,拟合细胞周期各时相比例。

1.3.3 细胞凋亡测定 取 2 组对数生长期 MCF-7 细胞加入 1 mL 基础培养液 (含 hyclone 胎牛血清),4 mL 动物血清 (治疗和对照各一组),作用 48 h 后,胰酶消化处理,制成单细胞悬液,按细胞凋亡检测试剂盒操作程序分析细胞凋亡比例。

1.3.4 细胞生长曲线测定 96 孔细胞培养板内种

4 000 个细胞/孔,每孔加入 100 μ L 培养液,7d 连续培养。每隔 24 h 测定一批,测定每批前先加入 20 μ LMTS 试剂,避光 37 度潮湿孵育 2 h 后 490 nm 波长处检测吸光度值。每组测定 4 个孔,取均值。96 孔反应板周边各孔加基础培养液做保湿孔。

1.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,各指标的表达差异采用 t 检验,细胞周期差异采用构成比的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 对 FCM-7 细胞芳香化酶、雌激素受体 mRNA 表达的影响 将对照组各基因表达水平作为基数 1,药物血清作用 24 h 后治疗组与对照组比较,FCM-7 细胞芳香化酶和雌激素受体 α (ER α) 的表达水平显著降低,而雌激素受体 β (ER β) 的表达水平无明显改变,见表 2。

表 2 2 组细胞芳香化酶及雌激素受体 mRNA 表达比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	芳香化酶	雌激素受体 α	雌激素受体 β
对照组	1	1	1
治疗组	0.337 $\pm$ 0.02	0.091 $\pm$ 0.01	0.976 $\pm$ 0.10
P	0.04	0.01	0.91

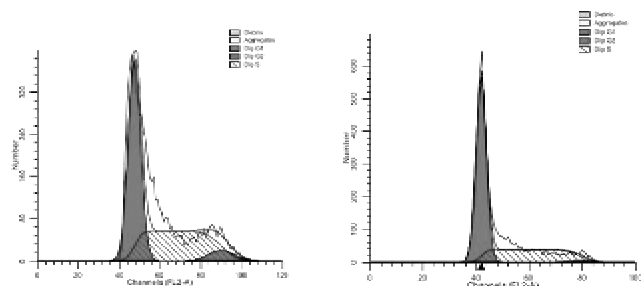


图 1 细胞周期 FCM 图

2.2 对 FCM-7 细胞生长周期的影响 药物血清作用 48 h 后,FCM-7 细胞的 S 期和 G2/M 期下降,尤其以 G2/M 期为明显,相应的 G0/G1 期增加。表明细胞用药后 DNA 复制和分裂活动减弱,而静止期及合成前期状态的细胞增多,药物抑制了细胞周期的正常进行。见表 3,图 1。

表 3 2 组 FCM-7 细胞各周期时相比较 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	G0/G1	S	G2/M	P
对照组	58.15 $\pm$ 9.70	35.83 $\pm$ 9.02	6.03 $\pm$ 0.69	0.00
药物组	71.21 $\pm$ 3.46	27.40 $\pm$ 4.34	1.40 $\pm$ 0.88	

2.3 对 FCM-7 细胞凋亡的影响 药物血清作用细胞 48 h 后,FCM-7 细胞早期凋亡率明显增加,晚期凋亡率有所下降,用药组总体凋亡率高于对照组。见表

4、图 2。

表 4 2 组 FCM-7 细胞凋亡情况比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	凋亡总计率	P
对照组	4.07 $\pm$ 1.21	4.63 $\pm$ 0.72	8.70 $\pm$ 1.93	0.05
治疗组	6.43 $\pm$ 0.13	3.23 $\pm$ 0.24	9.66 $\pm$ 0.11	

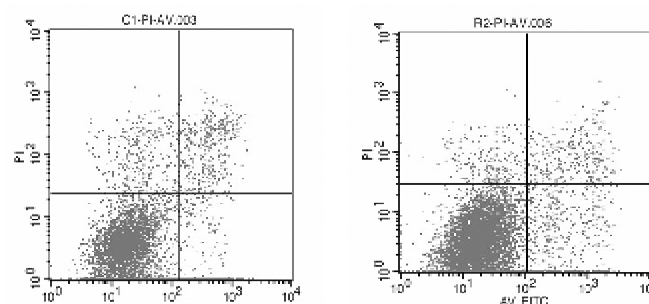


图 2 细胞凋亡 FCM 图

2.4 细胞生长曲线测定 在细胞培养 0 ~ 48 h 期间,2 组生长曲线无明显差异;而在细胞培养 48 h 以后,治疗组的细胞生长曲线幅度开始明显低于对照组,在 96 h 时抑制效果最明显,至细胞培养 120 h 以后,治疗组的细胞生长的抑制作用开始减弱。见图 3。

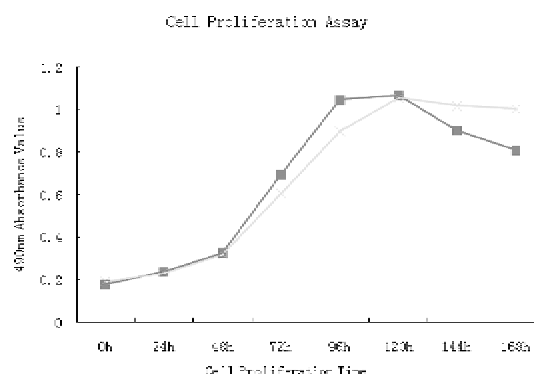


图 3 细胞生长曲线

3 讨论

软坚消瘤片由薏苡仁、拳参、北败酱草、夏枯草等成分组成,方中薏苡仁、拳参健脾益气,北败酱草、夏枯草解毒散结。临床实践证实,该药对于脾虚痰结证的乳腺良恶性肿瘤性疾病具有一定的临床疗效。MCF-7 细胞系是雌激素依赖性的人乳腺癌细胞系,其 ER、PR 表达均为阳性,是研究乳腺癌疾病的常见模型。由于目前没有很好的乳腺增生的细胞模型,而乳腺增生症与乳腺癌的发生关系密切^[1],乳腺增生症的最大危害就是癌变,因此本研究借用了 MCF-7 细胞系和含药动物血清作为研究对象,探讨了软坚消瘤片作用细胞后的分子生物学改变。

乳腺是雌激素作用的靶器官之一。雌激素在乳腺癌发生过程中起重要作用,大约 60% 绝经前和 70% 绝经后乳腺癌患者是雌激素依赖性肿瘤^[2]。雌激素局部

水平的增高与合成增多有关,其中最重要的是合成酶的高表达,其抑制剂已经成为乳腺癌内分泌治疗的重要手段。ER、PR 阳性强度、数量随着乳腺增生程度加重而增加^[3],ER 在正常乳腺组织、单纯性增生、不典型增生和早期癌中的表达,阳性表达率依次为 11.5%、22.0%、64.4% 和 67.4%,ER 在不典型增生中呈现高表达,提示 ER 高表达与乳腺癌的发生有关^[4]。因此,调控雌激素合成及功能发挥成为药物干预的重要靶点。软坚消瘤片药物血清作用于 MCF-7 细胞之后,能有效的降低雌激素主要合成酶芳香化酶的表达水平,该作用与目前芳香化酶抑制剂^[5]起到异曲同工之效。雌激素与雌激素受体的结合启动雌激素的信号转导作用,选择性雌激素受体调节剂,如他莫昔芬在乳腺癌的治疗中起到重要作用^[6]。本研究经药物血清作用 24 h 后的细胞,雌激素受体 α 表达水平下降非常明显。内分泌治疗,如芳香化酶抑制剂能有效的延长乳腺癌患者的复发、转移并延长生存期,但是其弊端也很明显,如芳香化酶抑制剂价格较贵,并有增加患者骨质疏松、甚至骨折的发病率,升高血脂以及雄激素过量引起的相应不适症状^[7]。枸橼酸他莫昔芬增加子宫内膜癌的风险、治疗过程中易出现 TAM 抵抗^[8],是这些药物的临床应用受到一定限制。软坚消瘤片作为中药组方,在抑制芳香化酶和雌激素受体 α 基因表达水平的同时,可以有效的解决上述弊端,但是其在实际临床应用中的疗效比较和量化需要在以后的研究中证实。

雌激素受体 beta 是另外一种雌激素受体,ER α 和 ER β 同属雌激素受体家族成员^[9]。其作用机制仍存在争议,但普遍的认为该基因在癌变的乳腺组织中表达水平明显降低,属于抑癌基因的范畴^[10-11]。本研究中药物血清作用后,ER α 基因的表达水平下降了 10 多倍,而 beta 基因表达水平基本没有变化。因此认为软坚消瘤片在抑制 ER α 基因表达的同时对 beta 基因的抑癌效果没有削弱。

细胞增殖与凋亡的失调对于疾病的发生起到重要的作用。药物血清作用于 MCF-7 细胞后,干扰了细胞的增殖周期,使细胞增殖过程在 G₀/G₁ 期停滞,DNA 复制和分裂活动减弱,而静止期及合成前期状态的细胞增多,药物抑制了细胞周期的正常进行,从而使其乳腺癌细胞增殖受到阻碍。因此,软坚消瘤片具有降低乳腺癌细胞增殖比率、抑制乳腺癌细胞生长的作用。之后进行的细胞生长实验进一步证实在细胞培养 0 ~ 48 h 期间,药物血清组生长曲线差异较小;而在细胞培养 48 h 以后,治疗组的细胞生长曲线幅度开始明显低

于对照组,在 96 h 时抑制效果最明显,至细胞培养 120 h 以后,治疗组的细胞生长的抑制作用开始减弱。说明软坚消瘤片在乳腺癌细胞培养的一定时段内,表现出了明显抑制乳腺癌细胞株的细胞生长的作用。

本研究涉及到诸多指标,综合指向都说明软坚消瘤片在调控细胞生长过程中发挥重要作用。以往的治疗药物往往为单一靶向治疗,如芳香化酶和硫酸酯酶抑制剂等^[5,8]可以针对性的抑制芳香化酶和封闭 ER 的活性,从而降低局部乳腺组织雌激素的合成及其信号转导,本研究发现软坚消瘤片药物血清抑制乳腺癌细胞生长的作用靶点不是单一途径的,而是多途径综合协调发挥作用,包括:软坚消瘤片能较好地抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 的 CYP19mRNA、ERmRNA 表达水平;抑制乳腺癌细胞株的一定时段内的细胞生长;抑制细胞周期的正常进行;促进乳腺癌细胞的凋亡。

综上所述,软坚消瘤片药物血清与目前的内分泌药物相比,在细胞学上能有效的多途径综合性调控 MCF-7 细胞的生长及内分泌通路,这为未来乳腺良恶性患者的内分泌治疗药物研究提供实验依据。

参考文献

- [1] Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia[J]. *Cancer*, 1993, 71: 1258 - 1265.
- [2] Kulendran M, Salhab M, Mokbel K. Oestrogen - synthesising enzymes and breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29: 1095 - 1109.
- [3] 周导, 易维真, 徐英纳, 等. 乳腺增生动物模型的建立及 ER、PR 表达的观察[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6: 3.
- [4] 黄焰, 朱月华, 王德文, 等. 乳腺癌前不同病变中多种生物标志物的变化规律及意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13 (19): 1482 - 1495.
- [5] Carpenter R, Miller WR. Role of aromatase inhibitors in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93 (Suppl 1): S1 - S5.
- [6] Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 - year survival. An overview of the randomised trials[J]. *Lancet*, 2005, 365: 1687 - 1717.
- [7] 吴世凯, 宋三泰. 第三代芳香化酶抑制剂临床应用的常见不良反应[J]. *中国药物警戒*, 2006, 3 (2): 4.
- [8] Bernstein LM, Wang JP, Zheng H, et al. Long - term exposure to tamoxifen induces hypersensitivity to estradiol[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 1530 - 1534.
- [9] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade[J]. *Cell*, 1995, 83: 835 - 839.
- [10] Bardin A, Boulle N, Lazennec G, et al. Loss of erbA expression as a common step in estrogen - dependent tumor progression[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11: 537 - 551.
- [11] Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: A subtle balance between er alpha and er beta[J]. *Mol Interv*, 2003, 3: 281 - 292.

(2012 - 09 - 18 收稿)