

实验研究

三七总皂苷联合三苯氧胺对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡影响

黄 梅 杨丽娟 谢 丹

(广州中医药大学第一附属医院乳腺科, 广东省广州市机场路 16 号大院, 510405)

摘要 目的:探讨中药三七总皂苷和 TAM 联合应用对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡的影响。方法:分别或联合应用不同浓度的 TAM、三七总皂苷作用于 T47D 细胞,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法分析对细胞生长抑制作用。应用流式细胞技术测定细胞周期分布和凋亡率。结果:TAM 及三七总皂苷均可有效抑制乳腺癌 T47D 细胞生长,抑制作用随浓度增加和时间延长而增强,三苯氧胺(1.5×10^{-5} mol/L)与三种浓度三七总皂苷联合与单药应用相比均可显示出明显的抑制优势;两者均可使 T47D 细胞周期中 S 期细胞含量较空白对照明显降低;联用方案显示出明显促进细胞凋亡优势。结论:三七总皂苷对乳腺癌细胞有直接抑制作用,该作用具有时间及浓度依赖性;高浓度三七总皂苷与 TAM 联合可以增强 TAM 对乳腺癌细胞的抑制作用,其作用机制与影响细胞周期、协同促进凋亡有关。二者的联合应用会使抗肿瘤作用增强。

关键词 乳腺肿瘤;细胞周期;凋亡;三苯氧胺;三七总皂苷

Impact of Panax Notoginsenosidum and Tamoxifen on Breast Cancer T47D Cell

Huang Mei, Yang Lijuan, Xie Dan

(1st Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Add.: No. 16, Airport Road, Guangzhou, Guangdong Province, Post code: 510405)

Abstract **Objective:** To investigate impact of Panax Notoginsenosidum and Tamoxifen (TAM) on breast cancer T47D Cell. **Methods:** Different concentration of TAM and Panax Notoginsenosidum were administered to T47D Cell. The cell growth inhibition was assessed by MTT, the cell cycle distribution and apoptosis rate were assessed by FCM. **Results:** Panax Notoginsenosidum and Tamoxifen (TAM) can respectively inhibit growth of T47D cell, positively correlated with higher concentration and increasing time. TAM 1.5×10^{-5} mol/L on top of 3 different concentration of Panax Notoginsenosidum had more significant inhibition than used alone. Both can reduce amount of cell at cycle S in comparison with blank control group. Moreover, combined use had the tendency to stimulate apoptosis. **Conclusion:** Panax Notoginsenosidum has direct, time and concentration dependent inhibition effect on breast cancer T47D Cell. High dose of Panax Notoginsenosidum can enhance anti-tumor effect of TAM by impacting cell cycle and apoptosis.

Key Words Breast cancer; Cell Cycle; apoptosis; Panax Notoginsenosidum; Tamoxifen

三苯氧胺(TAM)是乳腺癌内分泌治疗最重要的药物之一,应用三苯氧胺对雌激素受体阳性乳腺癌患者进行抗雌激素治疗,获益率约为 60%,能减少复发率和提高生存率^[1]。但是临床有 40% 左右雌激素受体阳性乳腺癌患者不能获益,有相当部分患者最初 TAM 治疗有效,但是最后因获得性的 TAM 耐药导致治疗失败。TAM 耐药是目前乳腺癌研究的热点之一。本研究采用活血化瘀中药三七总皂苷和 TAM 联合应用于乳腺癌 T47D 细胞系,探索三七对 TAM 有无协同增效作用,从而为三七参与乳腺癌的内分泌治疗提供依据,为提高三苯氧胺临床疗效开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人乳腺癌 T47D 细胞株购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;RPMI1640 培养基和

胰蛋白酶:美国 Gibco 公司;胎牛血清:美国 Hyclone 公司;0.25% 胰酶:美国 Gibco 公司;二甲基亚砜:美国 Sigma 公司;MTT:美国 Sigma 公司;实验用试剂(Cell cycle staining buffer):杭州联科生物技术有限公司;三苯氧胺系美国 Sigma 公司产品;三七总皂苷:四川杰象药物原料有限公司;全自动酶标仪:美国 Bio. tad 公司;流式细胞仪:Beckman 公司。

1.2 常用工作液的配制 1)磷酸缓冲液的配制:称取 KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.89g,混合溶解于 1000mL 的双蒸水中,并调定 pH 7.2~7.4。2)细胞培养液配制:高糖 DMEM + 10% 胎牛血清 + 200mL/40U 胰岛素。3)三七母液配制:三七总皂苷 162.5mg + 16mL 细胞培养液可以得到 $10^4 \mu\text{g/mL}$ 母液。4)三苯氧胺母液配制:取三苯氧胺 10mg 溶

于 17.742mL 无水乙醇中即可得 10^{-3} mol/L 母液。

1.3 细胞培养 将 T47D 细胞培养于含 100mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、100% 湿度、5%(体积分数)的 CO₂ 培养箱内。

1.4 实验分组 实验设空白细胞对照组和实验组,实验组又分为不同浓度的单药组和联合用药组,其中 TAM 按浓度不同分为 1.5×10^{-5} mol/L、 1.5×10^{-6} mol/L、 1.5×10^{-7} mol/L 3 个亚组;三七总皂苷按剂量不同分为 800μg/mL、1000μg/mL、1600 μg/mL 3 个亚组;联合用药组按单药浓度的不同进行组合。

1.5 MTT 比色分析法 浓度为每毫升 5×10^4 个 T47D 细胞接种于 96 孔培养板内,每孔 200μL,每组 6 孔。药物作用 68h 后加 5g/L MTT 液每孔 20μL,继续培养 4h,吸去上清液,每孔加入二甲基亚砷 200μL,震

荡 10min,在自动酶标仪(波长 570nm)上进行比色,自动记录每孔吸光度(A)。计算不同浓度药物单用或合用对 T47D 细胞株的生长抑制率。

抑制率(%)=(对照组平均 A 值-实验组平均 A 值)/对照组平均 A 值 × 100%。

1.6 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期和凋亡率 胰酶消化药物作用 24h、48h、72h 的细胞,制成单细胞悬液,用碘化丙啶(PI)染色,4℃ 冰箱保存,30min 后用流式细胞仪测定细胞周期和凋亡率。每份标本记数 10000 个细胞,用随机所附软件对测量值进行分析。

1.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同浓度的 TAM 及三七总皂苷单药或联用对

表 1 不同浓度的 TAM 及三七总皂苷单药或联用对 T47D 细胞生长抑制的影响

药物分组	24h 吸光度	48h 吸光度	72h 吸光度	72h 细胞生长抑制率(%)
T1	0.3618 ± 0.0215	0.3145 ± 0.0177 ^{△△}	0.2725 ± 0.0283 ^{△△}	10.36%
T2	0.2763 ± 0.0277 ^{△△}	0.2600 ± 0.0700 ^{△△}	0.2697 ± 0.0121 ^{△△}	11.28%
T3	0.2675 ± 0.0292	0.2540 ± 0.0072 ^{△△}	0.1248 ± 0.0074 ^{△△}	58.94%
S1	0.3712 ± 0.0210	0.3217 ± 0.0144 ^{△△}	0.2408 ± 0.0115 ^{△△}	20.79%
S2	0.4077 ± 0.0342	0.3358 ± 0.0120 ^{△△}	0.2415 ± 0.0143 ^{△△}	20.56%
S3	0.3192 ± 0.0395 ^{△△}	0.2010 ± 0.0136 ^{△△**}	0.1125 ± 0.0037 ^{△△}	62.99%
T1 + S1	0.3668 ± 0.0138	0.3363 ± 0.0133 ^{△△}	0.2283 ± 0.0161 ^{△△}	24.90%
T1 + S2	0.3400 ± 0.0277	0.2682 ± 0.0091 ^{△△}	0.2448 ± 0.0137 ^{△△}	19.47%
T1 + S3	0.3112 ± 0.0736	0.2280 ± 0.0079 ^{△△**}	0.1388 ± 0.0165 ^{△△}	54.34%
T2 + S1	0.3370 ± 0.0702 ^{△△}	0.2983 ± 0.0176 ^{△△}	0.2600 ± 0.0174 ^{△△}	14.47%
T2 + S2	0.3517 ± 0.0253	0.2790 ± 0.0134 ^{△△}	0.2392 ± 0.0216 ^{△△}	21.32%
T2 + S3	0.2647 ± 0.0209 ^{△△}	0.1887 ± 0.0062 ^{△△**}	0.1342 ± 0.0150 ^{△△}	55.86%
T3 + S1	0.2700 ± 0.0424 ^{△△}	0.1147 ± 0.0052 ^{△△**▲▲}	0.1123 ± 0.0149 ^{△△}	63.06%
T3 + S2	0.1988 ± 0.0486 ^{△△▲▲}	0.0943 ± 0.0063 ^{△△**▲▲}	0.0862 ± 0.0058 ^{△△**▲▲}	71.64%
T3 + S3	0.1540 ± 0.0346 ^{△△**▲▲}	0.0897 ± 0.0062 ^{△△**▲▲}	0.0838 ± 0.0023 ^{△△**▲▲}	72.43%
空白组	0.3897 ± 0.0457	0.3580 ± 0.0366	0.3040 ± 0.0165	—

注:与空白组比较,^{△△}*P* < 0.01;与 T3 比较,^{**}*P* < 0.01;与 S3 比较,^{▲▲}*P* < 0.01。

表 2 不同浓度、时间 TAM 及三七总皂苷单药或合用 T47D 细胞细胞周期分布情况(%, $\bar{x} \pm s$)

药物分组	细胞周期分布								
	G0/G1 期细胞			S 期细胞			G2/M 期细胞		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
T1	63.5 ± 3.0 [*]	66.7 ± 3.0	69.0 ± 2.0	34.0 ± 1.3 [△]	35.0 ± 1.5 [△]	30.2 ± 1.5 [△]	4.9 ± 0.2 [△]	3.8 ± 0.4 [△]	2.9 ± 0.1 [△]
T2	76.1 ± 3.1 ^{△*▲}	77.1 ± 3.2 ^{△*▲}	75.1 ± 2.6 ^{△*▲}	49.8 ± 1.6	45.1 ± 2.1	28.9 ± 1.1 [△]	8.1 ± 0.6	7.0 ± 0.8	6.1 ± 0.5 [△]
S1	68.6 ± 2.5 ^{△*▲}	64.2 ± 2.6	62.1 ± 1.8	47.2 ± 2.1	33.0 ± 1.5 ^{△▲}	32.0 ± 1.2 [△]	8.0 ± 0.5	1.8 ± 0.2 ^{△▲}	1.0 ± 0.07 ^{△▲}
S2	62.5 ± 1.6 [*]	65.8 ± 1.4	63.8 ± 1.9	35.1 ± 2.0 [△]	42.0 ± 2.0 [△]	35.1 ± 2.0 [△]	2.4 ± 0.1 ^{△*▲}	5.7 ± 0.4 [△]	3.7 ± 0.2 [△]
T1 + S1	61.7 ± 2.5 [*]	60.0 ± 1.3	62.2 ± 1.7	36.5 ± 1.6 ^{△*▲}	27.0 ± 0.6 ^{△▲}	28.7 ± 2.1 [△]	4.1 ± 0.9 ^{△▲}	2.1 ± 0.3 ^{△▲}	1.6 ± 0.05 [△]
T1 + S2	58.6 ± 2.0	67.7 ± 2.0	70.9 ± 3.0	28.3 ± 1.2 [△]	27.8 ± 1.2 ^{△▲}	25.9 ± 1.6 ^{△▲}	2.9 ± 0.3 ^{△*}	1.5 ± 0.2 ^{△▲}	1.3 ± 0.08 ^{△▲}
T2 + S1	68.3 ± 2.7 ^{△*▲}	70.1 ± 2.1	67.1 ± 2.3	47.0 ± 1.9	45.9 ± 2.5	29.0 ± 2.3 [△]	5.2 ± 1.0 [△]	4.9 ± 0.5 [△]	1.3 ± 0.3 ^{△▲}
T2 + S2	58.7 ± 2.1	63.2 ± 2.7	68.5 ± 2.5	35.2 ± 1.2 [△]	32.3 ± 1.0 ^{△▲}	38.5 ± 2.7 [△]	3.8 ± 0.3 ^{△*}	3.7 ± 0.4 [△]	4.5 ± 0.8 [△]
空白组	64.9 ± 1.7	66.83 ± 2.1	67.2 ± 2.6	47.2 ± 1.5	48.1 ± 1.2	48.3 ± 0.5	7.2 ± 0.8	7.01 ± 1.0	8.3 ± 0.5

注:与空白组比较,[△]*P* < 0.05;与 T1 比较,[▲]*P* < 0.05;与 T1 + S2 比较,^{*}*P* < 0.05。

T47D 细胞生长抑制的影响 研究表明, TAM 及三七总皂苷均可有效抑制乳腺癌 T47D 细胞生长, 抑制作用随浓度增加和时间延长而增强, 单药运用以三七总皂苷 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 72h 抑制作用最明显, 其次是 TAM $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 浓度作用 72h; 联合用药同样可以有效抑制乳腺癌 T47D 细胞生长, 但不是所有的联合方案与单药运用相比都有优势。高浓度三苯氧胺 ($1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 与 3 种浓度三七总皂苷联合与单药应用相比均可显示出明显的抑制优势; 同样, 高浓度三七总皂苷 (1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与三苯氧胺联合亦显现出类似优势。抑制效果最好的方案是 T3 + S3 作用 72h。详见表 1 (T1: TAM $1.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; T2: TAM $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; TAM $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; S1: 三七总皂苷 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$; S2: 三七总皂苷 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; S3: 三七总皂苷 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.2 不同浓度及作用时间的 TAM 及三七总皂苷单药或合用对 T47D 细胞周期的影响 TAM 及三七总皂苷单药或联用一定程度上可影响 T47D 细胞株的细胞周期进程, 与空白对照组相比主要表现在提高 G₀/G₁ 期细胞比例、降低 S 期及 G₂/M 期细胞比例。联合用药与单药相比在对 G₀/G₁ 期细胞影响方面未显示出明显优势, 其优势主要表现在能够显著降低降低 S 期及 G₂/M 期细胞比例, 见表 2。

2.3 不同浓度、时间 TAM 及三七总皂苷单药或合用 T47D 细胞细胞凋亡情况 TAM 及三七总皂苷单药或联用均可加速 T47D 细胞株凋亡, 并且显示出时间及浓度依赖。联合用药较单药应用显示出明显诱导凋亡优势, 其中以 T1 + S1 效果最突出。详见表 3 (T1: TAM $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; T2: TAM $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; S1: 三七总皂苷 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; S2: 三七总皂苷 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 3 不同浓度、时间 TAM 及三七总皂苷单药或合用 T47D 细胞细胞凋亡情况 (%, $\bar{x} \pm s$)

药物分组	凋亡率		
	24h	48h	72h
T1	11.1 $\pm$ 1.20 [△]	13.5 $\pm$ 0.85 [△]	15.3 $\pm$ 1.09 [△]
T2	2.3 $\pm$ 0.30	4.7 $\pm$ 0.30 [△]	8.3 $\pm$ 0.70 [△]
S1	12.6 $\pm$ 0.90 ^{△▲}	15.1 $\pm$ 1.13 [△]	16.9 $\pm$ 1.25 [△]
S2	3.4 $\pm$ 0.20 [△]	6.1 $\pm$ 0.35 ^{△*}	8.5 $\pm$ 0.60 ^{△*}
T1 + S1	19.6 $\pm$ 1.05 ^{△*▲}	21.0 $\pm$ 0.30 ^{△*▲}	22.2 $\pm$ 1.35 ^{△*▲}
T1 + S2	15.5 $\pm$ 0.98 ^{△*▲}	17.0 $\pm$ 1.02 ^{△*▲}	19.8 $\pm$ 1.47 ^{△*▲}
T2 + S1	18.0 $\pm$ 1.02 ^{△*▲}	18.6 $\pm$ 1.17 ^{△*▲}	19.7 $\pm$ 0.85 ^{△*▲}
T2 + S2	5.5 $\pm$ 0.48 [△]	07.8 $\pm$ 0.50 [△]	10.2 $\pm$ 0.92 [△]
空白组	1.9 $\pm$ 0.10	2.1 $\pm$ 0.20	2.5 $\pm$ 0.02

注: 与空白组比较, [△] $P < 0.05$; 与 T1 比较, [▲] $P < 0.05$; 与 S1 比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨论

作为乳腺癌内分泌治疗最重要的药物之一, 三苯氧胺取得了良好的临床疗效, 但长期应用也产生了一系列问题, 例如毒副反应、耐药导致治疗失败等。因此, 如何减少毒副反应, 减少耐药现象, 提高临床治疗效果成为目前研究热点。

三七又名田七, 为五加科人参属植物, 是临床常用传统中药, 皂苷类成分是三七的主要生理活性成分。近年来, 有不少临床及实验研究发现三七对肝癌、胃癌、血液病、妇科肿瘤、黑色素细胞瘤、乳腺癌等多种肿瘤具有抗肿瘤活性。三七抗肿瘤的途径包括: 直接抑制肿瘤细胞^[2]、促进癌细胞凋亡^[3]、诱导癌细胞分化以及逆转肿瘤细胞多药耐药^[4]等。通过流式细胞仪细胞周期分析显示, TAM 及三七总皂苷单药或联用一定程度上可影响 T47D 细胞株的细胞周期进程, 主要表现在降低 S 期及 G₂/M 期细胞比例, 与空白组对照, T1 组、S1 组及 (T1 + S1) 组显示出了明显抑制优势, 组间比较显示, 高浓度的三苯氧胺及三七总皂苷联合运用 (T1 + S1) 较其他组抑制优势更明显, 并且显示出一定的时间优势。由此可见, TAM 及三七总皂苷对 T47D 细胞所产生的抑制作用是通过影响细胞周期的进程而发挥作用。

促进肿瘤细胞凋亡是目前肿瘤治疗方向之一, 现在研究认为三七总皂苷和 TAM 治疗均可诱导肿瘤细胞发生凋亡。本次研究显示, TAM 及三七总皂苷单药或联用均可加速 MCF-7 细胞株凋亡, 并且显示出时间及浓度依赖。联合用药优势较单药更突出, 显示出联合用药具有一定的协同优势。本实验研究结果表明, 三七总皂苷对乳腺癌细胞有直接抑制作用, 该作用具有时间及浓度依赖性; 高浓度三七总皂苷与 TAM 联合可以增强 TAM 对乳腺癌细胞的抑制作用, 其作用机制与影响细胞周期、协同促进凋亡有关。二者的联合应用会使抗肿瘤作用增强, 从而为乳腺癌的内分泌治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. Lancet, 1998, 351: 1451-1467.
- [2] 李元青, 马成杰, 陈信义. 三七活性成分抗肿瘤作用及其免疫学机制初探. 北京中医药大学学报 (中医临床版), 2008, 15(1): 17-19.
- [3] 王国俊, 周黎明, 王莉. 三七皂甙 R1 诱导 HL260 细胞凋亡的初步研究. 四川生理科学杂志, 2004, 26(1): 14.
- [4] 刘丽丽, 刘艳娥, 房国涛. 三七总皂苷逆转乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 多药耐药的实验研究. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 954-956.

(2011-04-14 收稿)◎