

# 桔梗不同配伍对乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 增殖及侵袭的影响

吴金娜<sup>1</sup> 龚旭初<sup>1</sup> 陈海东<sup>1</sup> 杨万富<sup>1</sup> 刘 胜<sup>2</sup>

(1 江苏省南通市中医院中医外科,南通,226001; 2 上海中医药大学附属龙华医院中医外科,上海,200032)

**摘要** 目的:应用 MTT 比色法及 Transwell 试验检测桔梗配伍不同中药对乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 增殖及侵袭能力的影响。方法:给予 SD 大鼠中药煎剂灌胃,制备含药血清。应用 MTT 比色法检测桔梗不同配伍含药血清对 4T1 细胞增殖的影响;应用 Transwell 实验检测桔梗不同配伍含药血清对 4T1 细胞侵袭能力的影响。结果:桔梗及桔梗配伍不同中药组含药血清干预 24 h 后,对 4T1 细胞的增殖均有一定的抑制作用。各组合药血清对乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 的增殖抑制率分别为桔梗组 30.75%、桔梗加麦冬组 34.44%、桔梗加蛇床子组 44.71%、桔梗加莪术组 49.84%。Transwell 实验结果显示,桔梗及桔梗配伍不同中药各组均能降低透过小室的 4T1 细胞数,对于乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 的侵袭能力有显著的抑制作用,同模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。同桔梗单用组比较,桔梗配伍不同中药组的抑制作用较强,其中桔梗配伍麦冬组及桔梗配伍蛇床子组效果显著,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),桔梗配伍莪术组在抑制作用方面虽然由于桔梗单用组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:桔梗及桔梗配伍不同治则中药对乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 的增殖及侵袭有不同程度的抑制作用。

**关键词** 桔梗;配伍;4T1 细胞;肺转移

## Effect of Platycodon in Different Combination with Active Ingredients of Chinese Herbs on Multiplication and Metastasis of 4T1 Cell Line

Wu Jinna<sup>1</sup>, Gong Xuchu<sup>1</sup>, Chen Haidong<sup>1</sup>, Yang Wanfu<sup>1</sup>, Liu Sheng<sup>2</sup>

(1 Institute of Traditional Chinese Medicine Surgery, Nan Tong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, China;

2 Institute of Traditional Chinese Medicine Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**Abstract Objective:** To study the effects of platycodon in different combination with active ingredients of Chinese herbs on multiplication and metastasis of 4T1 cell line by MTT assay and transwell method. **Methods:** Preparation of medicated serum through SD mouse which Stock diet was given with traditional Chinese medicine apozem by stomach tube. Effects of medicated serum on multiplication and metastasis of 4T1 cell line were detected by MTT assay and transwell method. **Results:** The medicated serum of platycodon in combination with different active ingredients of Chinese herbs may inhibit the proliferation of 4T1 cell line after 24 hours. The inhibition rate of platycodon was 30.75%, platycodon plus ophiopogon japonicas was 34.44%, platycodon plus cnidium monnieri group was 44.71%, and platycodon plus rhizoma curcumae was 49.84%. Platycodon and Platycodon in combination with different active ingredients of Chinese herbs all can reduce the number of 4T1 cell line of through the chamber by transwell method, they can inhibit the metastasis of 4T1 cell line significantly (compared with control,  $P < 0.01$ ). The inhibition of Platycodon in combination with different active ingredients of Chinese herbs was stronger than that of the Platycodon, and the inhibition of platycodon plus ophiopogon japonicas and platycodon plus cnidium monnieri group showed statistically significant differences (compared with Platycodon,  $P < 0.01$ ). The inhibition of platycodon plus rhizoma curcumae was stronger than that of the platycodon, showing no statistically differences ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Platycodon in combination with different active ingredients of Chinese herbs can inhibit the multiplication and metastasis of 4T1 cell line.

**Key Words** Platycodon; Combination; 4T1 cell line; Lung metastasis

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.055

现今社会中,乳腺癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤之一,对妇女的健康影响巨大<sup>[1]</sup>,是美国女性癌症死亡的第二大因素<sup>[2]</sup>,亚洲发病率虽然最低<sup>[3]</sup>,但我国的乳腺癌发病率一直处于上升阶段<sup>[4]</sup>,2011

年统计,乳腺癌居我国女性肿瘤发病率之首<sup>[5]</sup>。随着医学诊疗手段的发展,早期乳腺癌的治愈率在逐年提高,但转移性乳腺癌的治疗进展缓慢,对患者的危害极大,其中15%~25%的转移性乳腺癌为肺转移,仅次于骨转移居转移性乳腺癌的第2位<sup>[6-7]</sup>。因此,研究乳腺癌肺转移发生发展的机制<sup>[8]</sup>,发掘能够有效对抗肺转移的中药药对或中药单药,对乳腺癌肺转移的临床治疗意义重大。

我们研究组在“从化”理论及“归经”理论的指导下,根据乳腺癌肺转移的病机特点,从扶正祛邪角度出发观察桔梗<sup>[9]</sup>、桔梗分别配伍麦冬、蛇床子、莪术对乳腺癌肺转移的影响。通过MTT及Transwell观察各组含药血清对乳腺癌高转移潜能细胞株4T1增值及侵袭的影响。

## 1 实验材料

1.1 仪器和试剂 胎牛血清(Gibco, USA); 1640培养基(Gibco, USA); 胰蛋白酶(Gibco, USA); 四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma, USA); 二甲基亚砜(DMSO)(Sigma, USA); Forma Series 11 CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Electron Corporation, USA); Forma Class II B2生物安全柜(Thermo Electron Corporation, USA); Multiskan MK3多功能酶标仪(Thermo LabSystems, USA); Image-Pro Plus 6.0图像分析系统(Media Cybernetics, USA)。

1.2 实验药物 桔梗(产地安徽,由上海养和堂中药饮片公司加工,购自龙华医院中药房); 麦冬(产地四川,由上海养和堂中药饮片公司加工,购自龙华医院中药房); 蛇床子(产地山东,由上海养和堂中药饮片公司加工,购自龙华医院中药房); 莪术(产地广西,由上海养和堂中药饮片公司加工,购自龙华医院中药房); 生理盐水(无锡华裕制药有限公司,批号:11062002)。

1.3 实验细胞系 小鼠乳腺癌高转移潜能4T1细胞由中国科学院上海细胞库提供,将其置于50 kU/L青霉素及50 mg/L链霉素、10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。

1.4 实验动物 雌性SD大鼠50只,SPF级,体重(280±20)g,购于中国科学院上海实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。室温下饲养于上海中医药大学附属龙华医院实验动物中心,自由进水及取食。

## 2 实验方法

2.1 药物血清的制备 将SD大鼠随机分为5组,每组10只,按照人鼠等效剂量<sup>[10]</sup>给药。每只大鼠

每次给药生药量为:桔梗组3 g/kg、桔梗加蛇床子(3+4.5)g/kg、桔梗加麦冬(3+4.5)g/kg、桔梗加莪术(3+6)g/kg。分早晚2次灌胃给药,连续3 d后,末次给药1.5 h后用3%戊巴比妥钠溶液予腹腔注射麻醉实验动物,具体用药量为100 g体重给予1 mL。待大鼠麻醉后,采取腹主动脉取血,将取得血液置于离心管中,室温下静置4 h后,3 000 r/s离心机中离心10 min,无菌分离血清,将同组10只大鼠血清充分混合,通过0.22 μm过滤膜过滤后,置于56℃水浴中灭活30 min, -80℃冰箱保存以备后用。

2.2 Transwell 将Matrigel胶用1640培养基以1:2的浓度稀释,将混合液均匀铺于Transwell小室内,剂量为70 μL/室,后将Transwell上下室置于1640培养基中过夜水化;取对数生长期的4T1细胞接种于6孔培养板中,按照实验分组加入含药血清配置的培养基,24 h后抽吸上清液后消化细胞,先用PBS液(Phosphate-buffered Saline,磷酸盐缓冲溶液)冲洗2遍,后将细胞重悬于1640培养基中,显微镜计数并调整细胞浓度为5×10<sup>5</sup>个/mL;将药物血清干预后的各组细胞悬液加入Transwell小室的上室,每个小室为100 μL,各组取3个复孔,在下室中加入含10%胎牛血清的1640培养基,每个下室剂量为500 μL,将Transwell放入培养箱中培养24 h。抽吸Transwell上室及下室的培养基后,小心取出小室用棉签轻轻擦掉小室底部的Matrigel胶,用PBS溶液清洗小室3次,后加4%多聚甲醛固定20 min,抽吸多聚甲醛,用蒸馏水洗小室2 min×2,加入苏木素染色5 min,用自来水反复冲洗去掉多余染色液,再用蒸馏水清洗1次,加95%乙醇5 s后弃去,用依红染色15 min,取70%乙醇清洗2次。最后用手术刀片将小室底部的薄膜沿边缘小心割下,将薄膜的下表面朝上置于载玻片上,盖上盖玻片。置于200倍倒置显微镜下计数穿孔的细胞,每个样本选择5个不同方向的视野。

2.3 桔梗配伍不同中药对乳腺癌转移潜能细胞4T1增殖活性的影响 将对数生长期的乳腺癌高转移潜能细胞4T1消化计数后,以1640培养基调整细胞浓度至1×10<sup>5</sup>个/mL,将细胞重悬取细胞悬液200 μL/孔接种于96孔培养板,每组5个复孔,至于36℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱,培养至80%的4T1细胞在融合状态下,而后抽吸原培养液并加入各组含有药物的血清,再培养细胞24 h,在培养板上加5 g/L的MTT试剂,150 μL/孔,再培养4 h后抽吸培养板中的上清液,取二甲基亚砜100 μL/孔加入各个

培养板孔洞中,震荡 10 min。将培养板放置入酶标仪中测定以 490 nm 波长,测定各个培养孔的光密度 (Optical Density, OD) 值,计算细胞的增殖抑制率,公式如下。

4T1 细胞的增殖抑制率 = (1-给药组 OD/对照组 OD) × 100%

2.4 统计学方法 各组实验数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 15.0 for Windows 软件中多样本均数比较单因素方差分析进行数据处理及分析。方差齐,采用 LSD-*t* 检验进行数据处理;方差不齐,采用 Games-Howell 检验进行数据处理,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

表 1 桔梗配伍不同中药含药血清对 4T1 细胞增殖的抑制

组别	OD 值	抑制率 (%)
模型组	0.74 ± 0.04	—
桔梗	0.51 ± 0.06 **	30.75
桔梗加麦冬	0.49 ± 0.03 **	34.44
桔梗加蛇床子	0.41 ± 0.07 **□	44.71
桔梗加莪术	0.37 ± 0.04 **□□▲	49.84

注:同对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;同桔梗组比较, □  $P < 0.05$ , □□  $P < 0.01$ ;同桔梗加麦冬组比较, ▲  $P < 0.05$ 。

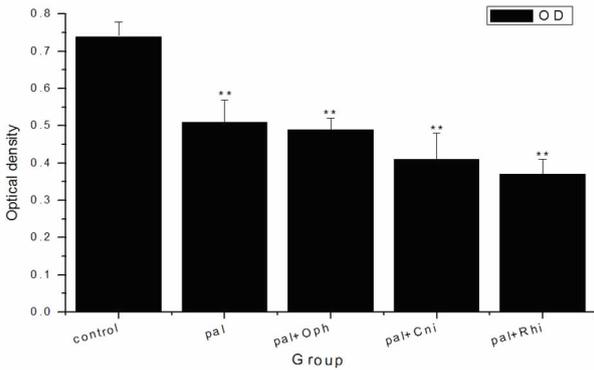


图 1 桔梗配伍不同中药含药血清对 4T1 细胞增殖的影响 (OD 值)

注:control:对照;pal:桔梗;Oph:麦冬;Cni:蛇床子;Rhi:莪术。同模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

### 3 结果

3.1 桔梗配伍不同中药含药血清对 4T1 细胞增殖的抑制作用 桔梗及桔梗配伍不同中药组含药血清干预 24 h 后,对 4T1 细胞的增殖均有一定的抑制作用。同模型组比较,其他各组含药血清 OD 值明显降低 ( $P < 0.01$ );同单用桔梗组比较,桔梗加蛇床子的 OD 值显著降低 ( $P < 0.05$ ),桔梗加莪术组的 OD 值更低 ( $P < 0.01$ ),而桔梗加麦冬组的 OD 值虽然较桔梗单用低,但差异不明显 ( $P > 0.05$ );同桔梗加麦冬组比较,桔梗加莪术组的 OD 值也显著降低 ( $P < 0.05$ )。各组含药血清对乳腺癌高转移潜能细胞

4T1 的增殖抑制率分别为桔梗组 30.75%、桔梗加麦冬组 34.44%、桔梗加蛇床子组 44.71%、桔梗加莪术组 49.84%。见图 1、表 1。

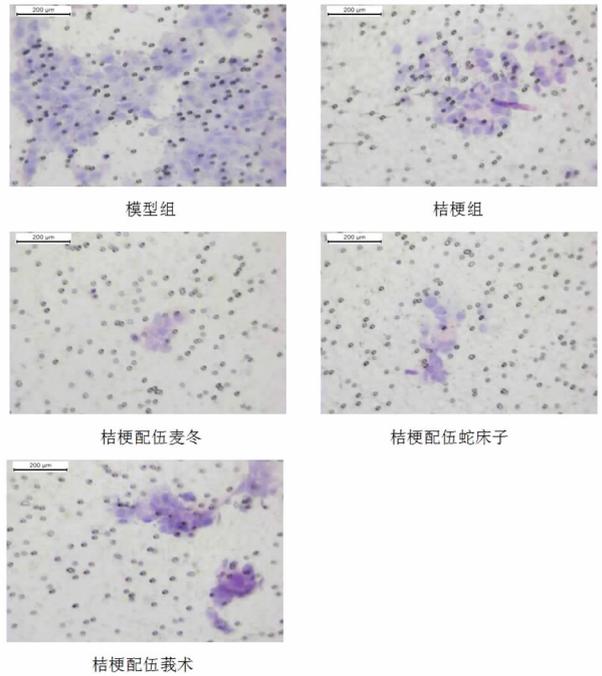


图 2 桔梗配伍不同中药 Transwell 图片

表 2 桔梗配伍不同中药对 4T1 侵袭能力的影响

组别	N(复孔)	细胞数
模型组	15(3)	55.80 ± 25.69
桔梗	15(3)	20.60 ± 8.26 **
桔梗加麦冬	15(3)	7.07 ± 2.28 **□□
桔梗加蛇床子	15(3)	7.33 ± 2.50 **□□
桔梗加莪术	15(3)	12.67 ± 8.50 **

注:同模型组比较 \*\*  $P < 0.01$ ;同桔梗组比较 □□  $P < 0.01$ 。

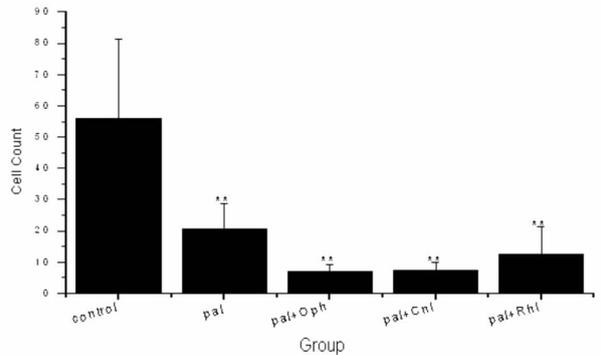


图 3 桔梗配伍不同中药对 4T1 侵袭能力的影响

注:control:对照;pal:桔梗;Oph:麦冬;Cni:蛇床子;Rhi:莪术。同模型组比较 \*\*  $P < 0.01$ 。

3.2 Transwell 实验结果 结果显示,桔梗及桔梗配伍不同中药各组均能降低透过小室的 4T1 细胞数,对于乳腺癌高转移潜能细胞 4T1 的侵袭能力有显著的抑制作用,同模型组比较具有显著有统计学

意义 ( $P < 0.01$ )。同桔梗单用组比较,桔梗配伍不同中药组的抑制作用较强,其中桔梗配伍麦冬组及桔梗配伍蛇床子组效果显著 ( $P < 0.01$ ),桔梗配伍莪术组在抑制作用方面虽然由于桔梗单用组,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表2,图2、图3。

#### 4 结论

从上述实验结果可以看出,桔梗含药血清对于4T1细胞的增殖具有抑制作用,且在配伍麦冬、莪术、蛇床子后,其含药血清的抑制作用更强,特别是桔梗配伍莪术组,效果显著。在抑制细胞侵袭方面,桔梗单用组含药血清同对照组比较差异有统计学意义,且配伍不同中药后,效果更为明显,其中桔梗配伍麦冬及桔梗配伍蛇床子组效果最优。

综上所述,中药桔梗配伍不同治则含药血清对4T1细胞的增殖及侵袭确有不同程度抑制作用,其具体作用机制仍需进一步实验研究。

#### 参考文献

[1] Seow A, Duffy S, McGee M, et al. Breast cancer in Singapore: trends in incidence 1968-1992. *Int J Epidemiol*, 1996, 25(1): 40-45.

[2] Lag R, Harkins D, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute [M]. Bethesda, MD: My Publications, 2006.

[3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[4] 邱梅清, 佟仲生, 郝春芳, 等. 乳腺癌肺转移117例临床病例特征及预后相关因素分析 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(11): 907-912.

[5] 赫捷, 赵平, 陈万青. 2011中国肿瘤登记年报 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012: 89-90.

[6] 刘玲琳, 刘胜. 乳移平配伍肺经引经药桔梗抗乳腺癌肺转移作用及机制的实验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(10): 61-65.

[7] Klover P, Hennighausen L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1489-1497.

[8] 胡啸明, 刘胜. 乳腺癌肺转移的机制研究进展及其临床指导作用 [J]. *癌症进展*, 2016, 14(1): 43-45.

[9] 俞泓波, 刘胜, 胡啸明, 等. 桔梗配伍对乳腺癌肺转移细胞株的干预作用 [J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(2): 52-56.

[10] 徐书云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-906.

(2015-01-27 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第1855页)

[8] 杨琨, 董方田. 新生大鼠视网膜 Müller 细胞原代培养方法的改良 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(4): 336-339.

[9] 周臻, 张绍丹, 李颖, 等. Müller 细胞在视网膜绿光损伤模型中的激活反应 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(4): 287-291.

[10] 陈惠军, 宋舜意, 李志萍, 等. 雌激素干预对高浓度氧致新生大鼠视网膜细胞损伤的影响 [J]. *中国新生儿科杂志*, 2011, 26(6): 411-415.

[11] 郭龙, 许惠卓, 夏晓波, 等. 高糖对视网膜 Müller 细胞 VEGF、EPO 和 EPORmRNA 表达的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2010, 10(3): 449-452.

[12] 薛黎萍, 丁鹏, 吴开力, 等. Nestin 和 GFAP 在缺氧大鼠视网膜神经胶质细胞中的表达及高氧治疗的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(6): 1214-1216, 1243.

[13] 薛黎萍, 丁鹏, 吴开力, 等. Nestin 在视神经横断大鼠视网膜 Müller 细胞上的诱导表达 [J]. *国际眼科杂志*, 2014, 9(3): 433-436.

[14] 刘坤, 万瑾, 郑华, 等. 小鼠视神经 Müller 细胞在深层血管发育中的作用 [J]. *中国循环研究杂志*, 2011, 1(1): 12-15.

[15] 郝长英, 陈明霞, 郭平, 等. 糖网明目颗粒对糖尿病大鼠视网膜病变防治作用及机制研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 1(3): 62-66.

[16] 马栋, 王静波, 郭承伟, 等. 络治法对 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜 NF- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2015, 2(4): 82-86.

[17] 何洁, 韩静, 郝改梅, 等. 糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片技术的改进及技巧探讨 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2015, 1(1): 1-5.

(2015-12-02 收稿 责任编辑: 张文婷)