

# 槐耳清膏诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 凋亡的研究

徐亮 张晟 张霖 牛瑞芳 张瑾

本实验研究了槐耳清膏对人乳腺癌 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞的生长抑制、凋亡诱导作用及其对凋亡相关基因 p53, caspase-3 表达水平的影响,为探索槐耳清膏诱导肿瘤细胞凋亡的机制提供线索,现报告如下。

## 材料与方 法

1. 材料与试剂: MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞系由天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室提供。槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供。四氮唑蓝 (MTT) 购自 Solabio

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2010.01.029

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目 (08jczdj23800)

作者单位: 300060 天津医科大学附属肿瘤医院 天津市“肿瘤防治”重点实验室 乳腺癌防治教育部重点实验室

通信作者: 张瑾, E-mail: David9132002@yahoo.com

5 mg/ml 及 10 mg/ml 的含药培养基 200  $\mu$ l, 空白对照组加入不含槐耳清膏的新鲜培养基 200  $\mu$ l, 每组 5 个复孔。分别于 24 h、48 h、72 h 行 MTT 检测槐耳清膏对两个细胞系的生长抑制率。(3) AnnexinV-FITC 细胞凋亡试剂盒检测槐耳清膏对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用: 将两乳腺癌细胞系分别加入含 3、5、10 mg/ml 槐耳清膏含药培养基。同时在空白对照组中加入新鲜不含药 1640 培养基继续培养。48 h 后弃上清胰酶消化后重悬细胞。加入 5  $\mu$ l AnnexinV-FITC 和 1  $\mu$ l SYTOX Green Dye, 轻轻混匀, 避光室温反应 5~10 min 后上机检测。(4) RT-PCR 法测定槐耳清膏对乳腺癌细胞凋亡相关基因 p53, caspase-3 表达的影响: 取对数生长期的两种细胞  $5 \times 10^5$  接种于方瓶中, 24 h 后换成含 10 mg/ml 槐耳清膏的培养液。作用 48 h 后采用 Trizol 法提取 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA。取 5  $\mu$ l cDNA 进行 PCR 反应。采用 Gel Doc200TM 型凝胶图像分析仪进行吸光度扫描分析条带吸光度值, 结果以各条带与内参  $\beta$ -actin 的灰度值之比表示。

3. 统计学处理: 所有数据用均数  $\pm$  标准差表示, 使用 SPSS13.0 软件包进行 *t* 检验和 ONE-WAY-ANOVA 统计分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 槐耳清膏对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用: 不同浓度的槐耳清膏处理 MCF-7 及 MDA-MB-231 乳

公司。AnnexinV-FITC 细胞凋亡试剂盒购自 Biovision 公司。P53, caspase-3 引物由北京信利来公司合成。Rtase M-MLV 反转录试剂盒及 Perfectshot TM Taq PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。

2. 实验方法: (1) 药品配制: 精确称取 1.0 g 槐耳清膏, 将其溶于 50 ml RPMI-1640 培养液中, 以 0.22  $\mu$ m 滤器滤过除菌, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。临用前将培养液分别配成 0.5~10 mg/ml 的工作液。(2) MTT 法测槐耳清膏对乳腺癌细胞的体外生长抑制作用: 将两乳腺癌细胞株分别接种于培养瓶内置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。待细胞贴壁良好、处于对数生长期时, 0.25% 胰酶消化细胞, 收集单细胞悬液加 2% 苔盼兰染液混匀后细胞计数板计数, 保证活细胞比例均在 95% 以上。调整单细胞悬液的细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml, 每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板上继续培养 24 h 后, 弃上清。分别加入含槐耳清膏 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、

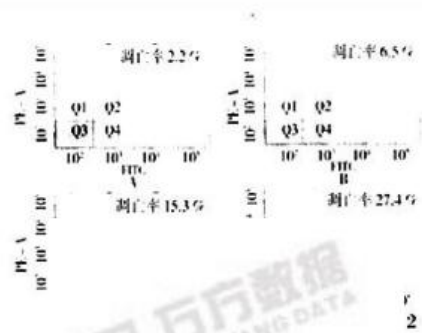


图 1 不同浓度的槐耳清膏对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用 (MTT 法检测)

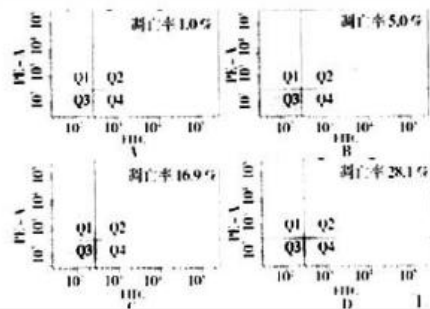


图 2 不同浓度的槐耳清膏对 MDA-MB-231 细胞凋亡的诱导作用 (MTT 法检测)

腺癌细胞在 24 h、48 h 及 72 h 三个不同时期均可见明显的生长抑制。除 0.5 mg/ml 槐耳清膏组处理 24 h 与空白对照组相比无统计学差异外 ( $P > 0.05$ ), 其余各浓度组各时期对两种细胞的生长抑制作用与空白组相比均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。并且槐耳清膏对这两种细胞的生长抑制作用呈剂量依赖关系, 随着槐耳清膏的药物浓度增加其抑制作用逐渐增强。10 mg/ml 槐耳清膏组对 MCF-7 及 MDA-MB-231 的生长抑制作用于 48 h 达高峰, 其抑制率分别为 54.2% 和 55.2%。槐耳清膏对 MCF-7 于 24 h、48 h 和 72 h 的半有效抑制浓度 (IC50) 分别为 21.14 mg/ml、7.07 mg/ml 和 7.89 mg/ml。而其对 MDA-MB-231 于 24 h、48 h 和 72 h 的半有效抑制浓度分别为 18.47 mg/ml、6.64 mg/ml 和 7.03 mg/ml。

2. 槐耳清膏诱导 MCF-7 及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞凋亡的检测: 不同浓度的槐耳清膏 (0、3、5、10 mg/ml) 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 其早期凋亡率分别为  $1.27\% \pm 0.25\%$ 、 $6.30\% \pm 1.14\%$ 、 $14.10\% \pm 3.34\%$  和  $27.07\% \pm 1.38\%$ 。而这几个浓度组作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, 其早期凋亡率分别为  $3.63\% \pm 1.29\%$ 、 $7.80\% \pm 1.21\%$ 、 $14.4\% \pm 1.77\%$  和  $26.6\% \pm 0.71\%$ 。各浓度组早期凋亡率与空白对照组相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1, 2。

3. RT-PCR 法检测槐耳清膏作用前后凋亡相关基因 p53, caspase-3 的表达变化: 槐耳清膏作用 48 h 后, MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞 p53 和 caspase-3 基因的表达较空白对照组均明显上升 ( $P < 0.05$ ), 见图 3, 表 1。

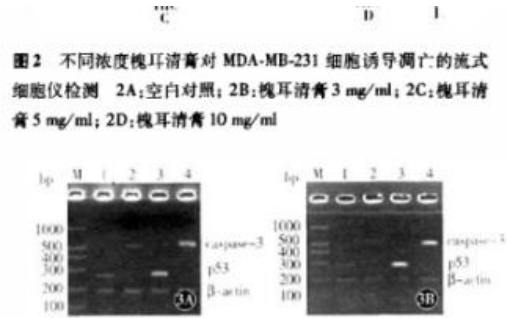


图 2 不同浓度槐耳清膏对 MDA-MB-231 细胞诱导凋亡的流式细胞仪检测 2A: 空白对照; 2B: 槐耳清膏 3 mg/ml; 2C: 槐耳清膏 5 mg/ml; 2D: 槐耳清膏 10 mg/ml

图 3 3A: 槐耳清膏作用后 MCF-7 细胞 p53 及 caspase-3 表达变化; 3B: 槐耳清膏作用后 MDA-MB-231 细胞 p53 及 caspase-3 表达变化

表 1 槐耳清膏对人乳腺癌细胞 p53 及 caspase-3 表达的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	p53 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA		caspase-3 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA	
	对照组	槐耳清膏 (10 mg/ml)	对照组	槐耳清膏 (10 mg/ml)
MCF-7	0.562 $\pm$ 0.061	1.347 $\pm$ 0.105 <sup>a</sup>	0.632 $\pm$ 0.114	1.522 $\pm$ 0.187 <sup>b</sup>
MDA-MB-231	0.523 $\pm$ 0.088	1.415 $\pm$ 0.157 <sup>c</sup>	0.693 $\pm$ 0.082	1.446 $\pm$ 0.205 <sup>d</sup>

注: <sup>a</sup> 槐耳清膏组 (10 mg/ml) p53 表达与 MCF-7 细胞对照组 (槐耳清膏 0 mg/ml) 相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 槐耳清膏组 caspase-3 表达与 MCF-7 细胞对照组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> 槐耳清膏组 p53 表达与 MDA-MB-231 细胞对照组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup> 槐耳清膏组 caspase-3 表达与 MDA-MB-231 细胞对照组相比,  $P < 0.05$

### 讨 论

槐耳清膏是槐耳菌经热水提取所得, 其主要抗癌活性成分为多糖蛋白 (PS-T), 在肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤的应用研究中发现, 其能增强机体免疫功能, 并可能存在诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等作用<sup>[1]</sup>。槐耳清膏对体外培养的肿瘤细胞生长也有明显的抑制作用。本实验 MTT 结果表明槐耳清膏对人乳腺癌细胞 MCF-7 及 MDA-MB-231 均有明显的生长抑制作用, 呈一定的剂量依赖性, 细胞抑制率随槐耳清膏的浓度的增加而增强。

研究发现槐耳清膏能明显诱导人肝癌 Hep-G2 细胞的凋亡, 并且其诱导凋亡的作用随槐耳清膏浓度的增加而增强<sup>[2]</sup>。亦有报道槐耳清膏可协同羟基脲抑制白血病细胞 K562 增殖及诱导 K562 细胞凋亡<sup>[3]</sup>。本研究发现槐耳清膏 3 mg/ml、5 mg/ml 和 10 mg/ml 作用于 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞系 48 h 后, 其凋亡率较空白对照组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。可见槐耳清膏各浓度组对两个乳腺癌细胞均有明显的凋亡诱导作用且随浓度的增加而增强。当槐耳清膏达到一定浓度时, 细胞的凋亡率迅速上升。

p53 与 caspase-3 是凋亡相关密切的基因。p53 可启动细胞的程序性死亡过程引起细胞凋亡, 从而保证有癌变倾向的细胞不再存活下去<sup>[4]</sup>。caspase-3 是细胞凋亡效应期的中

心分子, 参与细胞的生理及病理性死亡过程。激活的 caspase-3 能酶解切割多种特异性底物, 从而诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本实验发现槐耳清膏 10 mg/ml 组作用于 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, p53 及 caspase-3 的表达较空白对照组均明显升高。而同时相同浓度的槐耳清膏作用在相同时期也能显著诱导这两种细胞的凋亡。提示槐耳清膏对乳腺癌细胞的生长抑制作用和凋亡诱导作用可能与这两个基因的上调表达有关。

### 参 考 文 献

- [1] 李思维, 邹立勇, 尹宜发. 槐耳颗粒在肿瘤临床中的应用. 中国肿瘤, 2005, 14: 698-700.
- [2] 任建庄, 郑传胜, 冯敢生, 等. 槐耳清膏体外抑制肝癌细胞生长的研究. 临床放射学杂志, 2008, 27: 1778-1781.
- [3] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏联合羟基脲对 K562 细胞增殖、凋亡及相关基因表达的影响. 实用儿科临床杂志, 2009, 24: 190-192.
- [4] Meek DW. The p53 response to DNA damage. DNA Repair. 2004, 3: 1049-1056.
- [5] Chien SY, Wu YC, Chung JG, et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. Hum Exp Toxicol, 2009, 28: 493-503.

(收稿日期: 2009-06-12)

(本文编辑: 尚永刚)