· 实验研究 ·

槐耳清膏体外逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐三苯氧胺的研究

薛丹青 凌立君 肇毅 刘晓安 王水 查小明

【摘要】 **目的** 探讨槐耳清膏体外逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐三苯氧胺(TAM)的作用及其机制。**方法** 使用噻唑蓝(MTT)比色法测定不同药物处理对耐 TAM 的乳腺癌细胞株 MCF-7/R 的抑制率,流式细胞仪检测不同处理后 MCF-7/R 的凋亡情况和细胞周期变化。Western blot 检测 MCF-7/R 不同处理后各组 Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2)及 P44/42MAPK(ERK1/2)表达的差异。**结果** MTT 实验结果显示 MCF-7/R 的联合用药组抑制率(45.99 ±6.06)% 和单药组抑制率(40.20 ±5.54)% 分别与 TAM 对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);流式细胞检测结果显示与 TAM 对照组比较,MCF-7/R 的联合用药组和单药组 G_1 期峰前出现显著的凋亡峰,且联合用药组的凋亡率(20.03%)与单药组的凋亡率(11.06%)与 TAM 对照组(2.15%)比较作用显著;Western blot 检测蛋白表达经灰度分析显示,药物作用 12 h 后 Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2)蛋白在联合用药组的表达(0.3153 ±0.0179)和单药组的表达(0.5362 ±0.0030)分别与 TAM 对照组(0.9752 ±0.0034)比较均有下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且联合组与单药组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 槐耳清膏具有体外逆转 MCF-7/R 细胞对 TAM 的耐药作用,逆转机制可能与下调 MAPK 通路磷酸化蛋白 ERK1/2 的表达水平相关,提示槐耳清膏是一种有意义的耐药逆转剂。

【关键词】 逆转耐药; 三苯氧胺; 槐耳清膏

Experimental study on reversal of drug-resistance of human breast cancer cell line MCF-7 by Huaier fungi extract *in vitro*

XUE Dan-qing, LING Li-jun, ZHAO Yi, LIU Xiao-an, WANG Shui, ZHA Xiao-ming. Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: ZHA Xiao-ming, Email: zhaxm@medmail.com.cn

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect and primary mechanism of Huaier fungi extract on reversal of tamoxifen-resistance of human breast cancer cell line MCF-7 *in vitro*. **Methods** Tamoxifen resistant cell line MCF-7/R cells were treated with the combination of Huaier fungi extract and Tamoxifen or separately, then the cell proliferation inhibition rates were determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. The ratios of cells apoptosis and the change of cell cycle were also observed by flow cytometry. Protein expression of Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2) and P44/42MAPK(ERK1/2) in each group were detected using Western blotting. **Results** It was demonstrated by MTT assay that the growth of MCF-7/R cells was inhibited in the combined group(%) (45.99 ±6.06) and single groups (40.20 ±5.54)% compared with control group ($P<0.05$). It was revealed by flow cytometry that the MCF-7/R cell apoptosis rate were higher in the combined group (20.03%) and single groups (11.06%) compared with control group (2.15%), and the combined group was the highest. Western blotting revealed that protein levels of Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2) in combined group (0.3153 ±0.0179) and single group (0.5362 ±0.0030) were inhibited significantly compared with control group (0.9752 ±0.0034) at the 12-hour time point, and the difference is of significance in statistics science ($P<0.05$). Moreover, the difference between combined group and single group is of significance in statistics science ($P<0.05$). **Conclusion** Huaier fungi extract could reverse the tamoxifen-resistance of human breast cancer cell line MCF-7/R *in vitro*, and the reversal mechanism may related to the down-regulation of Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2) in MAPK pathway. It implied that Huaier fungi extract could be a significant reversal agent for clinic.

【**Key words**】 Drug-resistant reversal; Tamoxifen; Huaier fungi extract

三苯氧胺(TAM)是传统的乳腺癌内分泌治疗药物,由于有部分患者对内分泌治疗不敏感,或初期治疗有效,长期诱发耐药性,因此探寻克服耐药性的有效方法,对临床指导治疗乳腺癌有重要的意义[1-3]。我们选择雌激素受体阳性的耐 TAM 的人乳腺癌细胞株 MCF-7/R 及对应的敏感细胞株 MCF-7/S,进行体外实验并研究槐耳清膏是否具有逆转 TAM 耐药的作用并探讨其机制。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2010.11.033

作者单位:210029 南京医科大学附属江苏省人民医院乳腺外科

通信作者:查小明,Email:zhaxm@medmail.com.cn

材料与方法

1. 材料：耐 TAM 的人乳腺癌细胞株 MCF-7/R 由 Virginia 大学 Santen 教授实验室馈赠，敏感细胞株 MCF-7/S 由 Georgetown 大学 Jordan 教授馈赠。槐耳清膏由江苏启东盖天力制药有限公司生产，产品批号：KC16。培养液 RPMI 1640 和胎牛血清为美国 Gibco 公司产品；胰蛋白酶、二甲基亚砜（DMSO）和噻唑蓝（MTT）为 Amresco 公司产品；碘化丙锭（PI）和 RNaseA 购自美国 Sigma 公司；抗 ERK1/2 抗体购自美国 CST 公司；抗 GAPDH 抗体购自杭州联科公司；辣根过氧化物酶耦联羊抗兔和羊抗鼠 IgG 抗体均购自美国 Immunology Consultants Laboratory 公司。

2. 细胞毒性实验：（1）细胞培养：细胞株采用含 100 ml/L 胎牛血清、终水平为 100 kU/L 的青霉素和链霉素的 RPMI 1640 液体培养体系，置 37 ℃、50 ml/L CO_2 恒温培养箱中培养。MCF-7/R 细胞除上述培养条件外，需加入 1×10^{-6} mol/L 的 TAM，以维持细胞的耐药性。（2）MTT 比色法检测槐耳清膏 IC_{30} 值：槐耳清膏精确称取后其溶于 RPMI 1640 培养液中，滤器滤过除菌，4 ℃保存。TAM 粉剂溶于纯乙醇，使用前稀释至 1×10^{-6} mol/L。分别取对数生长期的 MCF-7/R 和 MCF-7/S 细胞，0.25% 胰蛋白酶消化后，用 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液，以每孔 5000 个/ml 接种入 96 孔板，200 μl/孔，37 ℃、50 ml/L CO_2 恒温培养箱中培养。设阴性对照组（RPMI 1640 培养液），实验组（不同浓度的槐耳清膏培养液），各组均设空白对照孔。12 h 细胞完全贴壁后各组加入相应培养液，每浓度设 6 个复孔，培养 48 h 后，每孔加入 MTT 液 20 μl（5 g/L），继续避光培养 4 h 后，去掉上清液，加入 DMSO，每孔 100 μl，振荡溶解甲簪，5 min 内用酶标仪测定每孔的吸光度（A）值，测定波长为 520 nm，取 6 个平行孔的均值，按公式计算细胞抑制率（IR），IR = 1 -（实验组 A 值 - 空白对照组 A 值）/（阴性对照组 A 值 - 空白对照组 A 值）×100%，重复 3 次，计算 IC_{30} 值。（3）MTT 比色法检测联合用药的抑制作用：临床使用的 TAM 口服剂量（20 mg/d）相当于体外培养中所加 TAM 的浓度约为 1×10^{-6} mol/L。此浓度下 TAM 对 MCF-7 细胞具有 30% 左右的抑制率（IC_{30}）。取对数生长期的 MCF-7/R 和 MCF-7/S 细胞，以每孔 1×10^{5}/ml 接种入 12 孔板，37 ℃、50 ml/L CO_2 恒温培养箱中培养。设阴性对照组（含 1/1000 纯乙醇的 RPMI 1640 培养液 1 ml），联合组（含 IC_{30} 槐耳清膏 + IC_{30} TAM 的培养液 1 ml），槐耳单药组（含 IC_{30} 槐耳清膏 + 1/1000 纯乙醇的培养液 1 ml），TAM 对照组（含 IC_{30} TAM 培养液 1 ml），各组均设空白对照孔。12 h 细胞完全贴壁后孔内分别加入含上述 4 种培养液，每组设 3 个复孔。隔天换液，1 周后行 MTT 法检测各组细胞的生长抑制率，方法同上。

3. 形态学观察：如上 4 组处理 MCF-7/R 细胞 1 周后，于倒置显微镜下观察细胞形态变化，并拍照。

4. PI 染色检测细胞周期：分别收集如上 4 组处理 1 周后的 MCF-7/R 细胞，用预冷磷酸盐缓冲液（PBS）洗细胞 2 次，1000 r/min，5 min 离心弃上清。加入 70% 乙醇，4 ℃固定过夜。加入 0.1% TritonX 100 μl 及 50 mg/L RNA 酶 5 μl，37 ℃，40 min 后，加入 50 mg/L PI 100 μl，室温下避光反应 45 min，重复 3 次，计算平均值，Multicycle 软件分析处理数据。

5. Western blot 检测：收集如上 4 组处理 12 h 及 24 h 的 MCF-7/R 细胞，用裂解液提取蛋白样品作 SDS-PAGE，电泳后转膜，封闭 1 h 后加入一抗，PBST 洗膜 4 次，每次 7 min；加入二抗工作液，PBST 洗膜 4 次，每次 7 min；浸于 ECL 化学发光试剂中 2 min，取出，室温下用保鲜膜包置于暗盒中，压片曝光 3 min，洗片，用 Quantity One 软件进行灰度分析。

6. 统计学方法：应用 STATA10.0 统计软件分析，所有定量数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析。

结　果

1. MTT 比色法检测结果：随着槐耳清膏浓度的升高，对 MCF-7/R 和 MCF-7/S 细胞的抑制率也升高，重复 3 次后得出对两种细胞的 30% 的抑制率（IC_{30}）值为 5 g/L。各组用药 1 周后联合组及槐耳单药组都表现出对肿瘤细胞的生长抑制作用，MCF-7/R 的联合用药组抑制率（45.99 ± 6.06）% 和单药组抑制率（40.20 ± 5.54）% 分别与 TAM 对照组（-12.07 ± 2.47）% 比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$），联合组与槐耳单药组比较有更强的抑制趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$），MCF-7/S 各组间比较均未表现出明显差异（$P>0.05$，表 1）。

表 1　不同处理组对两种细胞株的抑制率（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	MCF-7/R	MCF-7/S
联合组	45.99 ± 6.06	40.95 ± 18.12
槐耳单药组	40.20 ± 5.54	41.26 ± 18.37
TAM 对照组	-12.07 ± 2.47	3.51 ± 1.49

注：MCF-7/R 细胞株：联合组与 TAM 对照组比较，$P<0.05$；槐耳单药组与 TAM 对照组比较，$P<0.05$

2. 形态学观察：在倒置显微镜下可见 MCF-7/R 阴性对照组和 TAM 对照组细胞生长旺盛，胞体饱满，细

胞走向趋于一致，细胞核较大，呈卵圆形且多居中，而TAM 对照组细胞尤为密集。槐耳单药组细胞随着作用时间延长，细胞质减少，细胞体缩小，黑色颗粒增多，渐与周围的细胞脱离，而联合组除了出现上述表现，还有明显的空泡化。

3. 细胞周期分析：流式细胞术检测结果见图 1。与阴性对照组比较，MCF-7/R 在联合用药组和单药组的 G_1 期峰前出现显著的凋亡峰，且联合用药组的凋亡率(20.03%)与单药组的凋亡率(11.06%)与 TAM 对照组(2.15%)比较作用显著。同时 S 期细胞比例在联合用药组(0.97%)和单药组(11.33%)均比 TAM 对照组(12.50%)有所下降，G_1/G_2 未见明显差异。

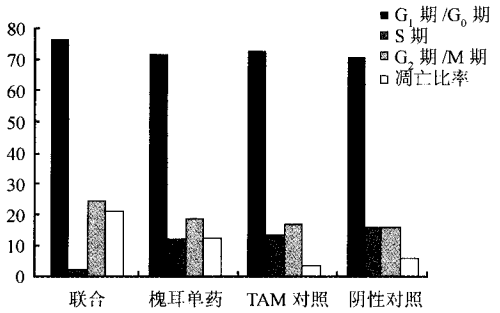


图 1 MCF-7/R 4 组不同细胞周期细胞数占总细胞数的比率(%)及凋亡比率(%)

4. Western blot 检测结果：4 组药物处理后，蛋白表达经灰度分析显示，各组细胞内参 GAPDH 蛋白和 P44/42MAPK(ERK1/2)蛋白表达相当($P>0.05$)。将各组蛋白与内参 GAPDH 的灰度值之比作为比较值。药物处理 12h 后，Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2)蛋白在联合用药组的表达(0.3153 ±0.0179)和单药组的表达(0.5362 ± 0.0030)分别与 TAM 对照组(0.9752 ± 0.0034)比较均有下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，且联合组与单药组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。药物处理 24h 后，Phospho-P44/42MAPK(ERK1/2) 蛋白在联合用药组的表达(0.2716 ±0.1014)和在单药组的表达(0.3241 ± 0.0098)分别与 TAM 对照组(0.5610 ± 0.0434) 比较均有下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，但联合组与单药组的差异未表现出统计学意义($P>0.05$，表 2，图 2)。

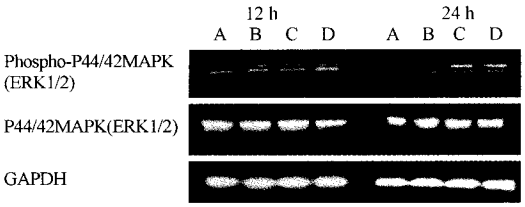
讨 论

有研究显示槐耳颗粒与化疗药合用具有逆转多药耐药的功能[4]。在我们的研究中，MTT 结果表明槐耳清膏在体外联合 TAM 与槐耳单药比较对 MCF-7/R 具有更强的抗肿瘤作用，流式结果说明药物作用加速了肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖能力，而且联合组比槐耳单药组显示出更明显的优势。Western blot 结果说明槐耳清膏能作用于 ERK/MAPK 信号转导通路发挥作用，并且槐耳清膏与 TAM 联合用药的作用效果要强于槐耳单药。这些结果表明，槐耳清膏在体外与 TAM 联合发挥出比槐耳单药更强的抗耐 TAM 肿瘤细胞作用，提示 TAM 在耐药细胞中的作用亦被激发，并且与槐耳清膏协同作用。因此，槐耳可能具有体外逆转 MCF-7/R 细胞耐 TAM 的作用，这种作用同时伴有丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路中磷酸化蛋白 ERK1/2 的表达水平下调，提示槐耳清膏可能通过抑制耐药细胞中活跃的生长因子通路实现耐药性的逆转。

表 2 MCF-7/R 各组 Phospho-P44/42MAPK 与内参 GAPDH 的灰度值之比($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h
联合组	0.3153 ±0.0179	0.2716 ±0.1014
槐耳单药组	0.5362 ±0.0030	0.3241 ±0.0098
TAM 对照组	0.9752 ±0.0034	0.5610 ±0.0434
阴性对照组	0.8183 ±0.0412	0.4435 ±0.0042

注：；除处理 24 h 后联合组与槐耳单药组间比较，$P>0.05$；其余各时间段内任意两组间比较，$P<0.05$



注：A：联合组；B：槐耳单药组；C：阴性对照组；D：TAM 对照组

图 2 MCF-7/R 各组 Western blot 结果

参 考 文 献

[1] 张波，陈道达，王国斌，等. 雌二醇、三苯氧胺对乳腺癌和子宫内膜细胞增殖的影响. 中华实验外科杂志，2002，19：139-140.
[2] 宋文哲，宋燕，谭岩，等. 三苯氧胺对 Survivin 基因的作用及其机制. 中华实验外科杂志，2009，26：1765.
[3] Treeck O, Zhou R, Diedrich K, et al. Tamoxifen long-term treatment *in vitro* alters the apoptotic response of MCF-7 breast cancer cells. Anticancer Drugs, 2004, 15: 787-793.
[4] 李戎，谢莎，张莉，等. 槐耳颗粒逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐药的初步机制. 中国实用医药，2009，4：1-2.

(收稿日期：2010-05-17)