

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.13.017

土贝母皂苷对转染绿色荧光蛋白基因人乳腺癌细胞 MDA-MB-231(GFP)、MCF-7(GFP)的作用

安超¹, 胡明昕¹, 傅延龄², 胡凯文¹ 左明焕^{1*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区 6 号, 100078; 2. 北京中医药大学)

基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2009DFA31490); 北京中医药大学自主选题项目 (2009ZYBZZ-JS089)

[摘要] 目的 观察土贝母皂苷对转染绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 的体外抗肿瘤活性。方法 采用倒置光学显微镜观察土贝母皂苷作用下转染 GFP 基因的乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 形态学变化, MTT 法检测土贝母皂苷对两种乳腺癌细胞的生长抑制作用。结果 土贝母皂苷作用 24 h 后, 两种人乳腺癌细胞均表现出典型凋亡形态改变; MTT 结果显示土贝母皂苷对两种乳腺癌细胞的生长具有强抑制作用, MDA-MB-231 (GFP)、MCF-7 (GFP) 经土贝母皂苷作用 48 h 后的 IC₅₀ 分别为 (17.03±3.22)、(27.96±0.34) μg/ml。结论 土贝母皂苷对两种人乳腺癌细胞均有较强的抑制作用。
[关键词] 土贝母皂苷; 绿色荧光蛋白; MDA-MB-231; MCF-7; 凋亡

中药抗乳腺癌、降低化疗副反应等是目前主要研究方向^[1-2]。术后高危人群预防复发转移、晚期乳腺癌的维持治疗是未来中西医结合治疗乳腺癌的重要切入点^[3]。土贝母, 味苦, 性微寒, 归肺、脾经, 具有清热解毒、消肿散结之功效, 可治疗乳岩、乳痈等疾病。本研究通过土贝母皂苷作用于乳腺癌细胞的体外实验, 采用转染绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的肿瘤细胞株, 观察土贝母皂苷作用后的乳腺癌细胞改变, 以期深入挖掘土贝母治疗乳腺癌作用的潜在优势。

1 材料和方法

1.1 药物及细胞

土贝母皂苷由北京中医药大学中药学院提供。紫外线照射灭菌, PBS 溶解, 4℃ 冰箱保存备用。转染 GFP 的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 (GFP)、MCF-7 (GFP), 由安泰康生物技术 (北京) 有限公司提供。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清 (FBS): 美国 Gibco 公司产品, 批号: 100226; 培养基 (RPMI-1640): 美国 Thermo Fisher 公司产品, 批号: 1020708; 胰蛋白酶 (Trypsin): 美国 Thermo Fisher 公司产品, 批号:

1040409; 四甲基嘧啶蓝 (MTT): 美国 Invitrogen 公司产品, 批号: 100609; 二甲基亚砜 (DMSO): 美国 Amresco 公司产品, 批号: 20051026。MCO15AC CO₂ 培养箱, 日本三洋公司; Mercury 100 倒置显微镜, 日本奥林巴斯公司; Heales 酶标仪, 深圳汇松科技发展有限公司; TDZ5-WS 离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限公司。

1.3 细胞凋亡形态学观察

经 15 μg/ml 土贝母皂苷作用于两种人乳腺癌细胞 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态学变化, 并拍照记录观察结果。

1.4 细胞增殖检测

取对数生长期的细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调整浓度为 6000 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔加入 200 μl 细胞贴壁后, 分别加入 50 μl 药液, 终浓度分别为 0.1、1、10、20、40 μg/ml 5 个不同的浓度, 每个浓度均 10 复孔, 空白对照组为等容积的 RPMI-1640 培养基。在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h。每孔加入 20 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 振荡混匀后继续培养 4 h。弃去上清液, 每孔加入 150 μl MSO 溶液, 轻轻振荡 10 min 使 MTT 甲瓩沉淀溶解, 用酶标仪 (测定波长为 570 nm) 测定其 OD 值, 绘制抑制率—药物浓度曲线, 用回归分析方法计算药物对细

* 通讯作者: kaiwenh@163.com, (010)67689787

胞半数抑制浓度 (IC₅₀)。

1.5 统计学方法

运用 SPSS 13.0 软件统计分析, 实验结果采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 土贝母皂苷作用于 MDA-MB-231、MCF-7 的形态学观察

空白对照的 MDA-MB-231 (GFP)、MCF-7 (GFP) 细胞形态正常, 大小均一, 发出绿色荧光。经 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的土贝母皂苷作用 24h 后, MDA-MB-231 (GFP)、MCF-7 (GFP) 细胞表现出细胞凋亡特征性的形态学变化, 细胞变形, 肿胀变圆, 大小不一致, 胞质空泡化明显, 细胞核大小改变, 染色质浓聚、边集, 细胞核分解, 并逐渐碎裂成小的脆片散在细胞质中, 凋亡明显的细胞可见凋亡小体出现。

2.2 土贝母皂苷对 MDA-MB-231 (GFP)、MCF-7 (GFP) 细胞增殖的影响

土贝母皂苷对 MDA-MB-231 (GFP) 细胞的 IC₅₀ 为 (17.03 ± 3.22) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。土贝母皂苷对 MCF-7 (GFP) 细胞的 IC₅₀ 为 (27.96 ± 0.34) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3 讨论

中医学认为, 情志失调、肝气郁结日久引起气血脏腑功能失调, 气滞血瘀, 痰浊邪毒内蕴于乳房, 发为乳岩^[4]。痰毒积聚是乳岩的主要病机, 痰毒流注、痰毒损络是乳腺癌侵袭转移的病机演变过程。西医学对乳腺癌研究不断发展, 分子分型已经成为判断预后及治疗决策的重要依据。根据雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 表达分为四型, 激素受体阳性的 LuminalA 型、LuminalB 型、Her-2 过度表达型和三阴性乳腺癌; 其中激素受体阳性乳腺癌对内分泌治疗有效, 预后较好, 而三阴性乳腺癌组织学分级高、细胞分化差、恶性程度高, 内分泌治疗无效, 容易出现早期复发、内脏转移等, 预后较差^[5]。

本实验采用的两种细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7 分别代表这两类生物学特性不同的乳腺癌类型。MDA-MB-231 为乳腺上皮细胞癌, 激素受体阴性, 侵袭性转移性强。MCF-7 是最常用的乳腺癌细胞, ER (+), PR (+), Her (-), 雌二醇均可促进该肿瘤细胞生长, 呈激素依赖型, 侵袭

转移性弱。本实验中, 经土贝母皂苷作用后, 两种细胞均呈现出细胞凋亡的形态特征, 说明土贝母皂苷对雌激素受体阴性的高侵袭性细胞株和雌激素受体阳性的低侵袭性细胞株均有诱导凋亡、抑制增殖作用。同时不用浓度土贝母皂苷对两种乳腺癌细胞的生长抑制, 呈浓度依赖性。两者 IC₅₀ 相近, 其药物敏感程度相近, 提示其作用可能是影响激素受体以外的因素。

中药土贝母具有解毒、散结、消肿功效。以往针对多种肿瘤细胞体外试验研究, 显示了土贝母广谱抗肿瘤、低毒性^[6]的特点。本研究中土贝母皂苷作用于两种荧光蛋白基因转染乳腺癌细胞后, 观察到细胞肿胀、变形、大小不一致, 胞质空泡化明显, 表现出细胞凋亡典型特征, 证实了土贝母具有抑制乳腺癌的作用。

本研究采用转染绿色荧光基因的乳腺癌细胞株, 无需染色, 可直接在倒置光学显微镜下观察到土贝母皂苷作用后乳腺癌细胞形态学变化, 避免了染色剂对细胞的影响, 结果发现土贝母皂苷能诱导人乳腺癌细胞发生细胞凋亡改变, 且这种绿色荧光蛋白基因转染乳腺癌细胞株子代仍表达荧光蛋白, 移植于裸鼠可动态观察显示绿色荧光的肿瘤大小和转移情况^[7], 利于体内实时观察及中药持续作用的长期研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 祝东升, 赵立娜, 钟馨, 等. 益气生血汤防治乳腺癌化疗期间骨髓抑制 35 例[J]. 中医杂志, 2011, 52(2): 159-160.
- [3] 杨国旺, 唐武军, 王笑民. 乳腺癌中医研究若干问题思考及策略[J]. 北京中医药, 2011, 30(11): 824-826.
- [4] 张青, 胡凤山. 郁仁存治疗三阴性乳腺癌经验[J]. 中医杂志, 2013, 54(9): 737-739.
- [5] Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2009, 9(Suppl 2): 73-81.
- [6] Yu L, Ma R, Wang Y, et al. Potent anti-tumor activity and low toxicity of tubeimoside 1 isolated from *Bolbostemma paniculatum*[J]. Planta Med, 1994, 60(3): 204-208.
- [7] 安超, 杨萌, 胡明昕, 等. 土贝母提取物对人乳腺癌 MDA-MB-231-GFP 裸鼠模型的抗肿瘤作用评价[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 390-393.

Effects of Tubeimoside on Human Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and MCF-7 Transfected With Green Fluorescent Protein

AN Chao¹, HU Mingxin¹, FU Yanling², HU Kaiwen¹, ZUO Minghuan¹

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 2. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the antitumor activity in vitro of tubeimoside on human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 transfected with green fluorescent protein (GFP). **Methods** The morphological changes of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP) under the action of tubeimoside were observed with inverted microscope. The inhibitory effect of tubeimoside on the growth of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP) were measured by MTT assay. **Results** A typical apoptosis of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP) were shown 24 hours later. MTT assay showed that tubeimoside had a strong inhibitory effect on the growth of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP). The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP) was $(17.03 \pm 3.22) \mu\text{g/ml}$ and $(27.96 \pm 0.34) \mu\text{g/ml}$ respectively 48 hours later. **Conclusion** Tubeimoside has a strong inhibitory effect on the growth of MDA-MB-231 (GFP) and MCF-7 (GFP).

Keywords tubeimoside; green fluorescent protein; MDA-MB-231; MCF-7; apoptosis

(收稿日期: 2013-10-21; 修回日期: 2014-03-15)

[编辑: 洪涛]

2014 年中加扶阳论坛暨扶阳培训班通知

中华中医药学会和加拿大卑诗省中医针灸协会定于 2014 年 9 月 20 日—29 日在加拿大温哥华联合主办“2014 年中加扶阳论坛暨扶阳培训班”，论坛将特别邀请扶阳学派第五代传人张存悌、张雨轩、加拿大极康中医医院卓同年院长等海内外专家、学者做特别报告。欢迎广大学者、专家踊跃报名，前往交流。现将有关事项通知如下：

一、征文内容：扶阳学派源流探讨；扶阳学派学术思想与特色研究；扶阳学派用药经验总结；扶阳学派辨证治疗技巧研究；中医扶阳各家学说学术经验探讨；相关中医药研究等。

二、征文要求：每篇论文 3000 字左右以内，200 字摘要（要求中英文对照）；截稿及报名截止日期：2014 年 8 月 20 日

三、费用：注册报名费 3000 元人民币银行汇款；开户行：中国工商银行北京市分行和平里北街支行；账号：0200004209200015436；户名：中华中医药学会；汇款时请注明“中加扶阳论坛报名费”（汇款请在报名截止日期前办理）；往返国际旅费以及在境外期间费用自理，如需了解相关信息，请与中华中医药学会国际部和加拿大卑诗省中医针灸协会联系。

四、联系方式

（一）中国代表请联系：贾雪晴 010-64206805, 15110101817, 闫铮 010-64206805, 13810568161, 孙永章 010-64206805, 13901230469, 传真：010-64206805, 邮箱：zyyxhgjb@163.com, mailto: syz516@sina.com; 地址：北京市朝阳区樱花园东街甲 4 号（邮编 100029），中华中医药学会国际部；

（二）加拿大及国外代表请联系：John Yang（杨光芳），电话：（604）-428-6226，传真：（604）-428-6227，邮箱：info@atcma.org，网站：http://www.atcma.org，地址：# 810 - 675 West Hastings, Vancouver, BC V6B 1N2 Canada

五、说明

（一）回执请到中华中医药学会网站 www.cacm.org.cn 国际交流栏目和加拿大卑诗省中医针灸协会网站 <http://www.atcma.org> 下载。

（二）为了保证交流培训效果，代表团限额 25 人。务请参会者通过电话、传真、电子邮件、短信等方式通知联系人。