

· 药理 ·

红豆杉提取物对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡的影响

王健¹, 陈荣昌², 孙桂波², 杨骅力³, 张强², 孙晓波^{2*}

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076;

2. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094;

3. 安徽天马红豆杉科技有限公司, 安徽 六安 237343)

[摘要] 目的:探讨红豆杉提取物对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡的影响。方法:以乳腺癌 T47D 细胞为研究对象,实验设空白组、不同质量浓度红豆杉提取物组(200,100,50,25 mg·L⁻¹)和阿霉素组(3 μmol·L⁻¹),各给药组处理乳腺癌 T47D 细胞 24 h,MTT 法检测 T47D 细胞增殖,试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)及半胱天冬酶-3(Caspase-3)活性,Hoest33342 荧光染色检测细胞凋亡,Western blot 法检测 T47D 细胞凋亡相关蛋白 Bax,Bcl-2,Caspase-3 的表达。结果:与空白组比较,红豆杉提取物明显抑制乳腺癌 T47D 细胞的增殖,增加 LDH 及 Caspase-3 活性,诱导细胞凋亡及上调促凋亡蛋白 Bax 的水平,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平,均具有明显的统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),且具有浓度依赖性。结论:红豆杉提取物对乳腺癌细胞 T47D 增殖具有直接抑制作用,并且具有浓度依赖性,其作用机制与促进细胞凋亡有关。

[关键词] 红豆杉提取物; 乳腺癌; T47D; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0088-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150088

Effect of Extracts from *Taxus chinensis* on Cell Growth and Apoptosis of Breast Cancer Cells T47D

WANG Jian¹, CHEN Rong-chang², SUN Gui-bo², YANG Hua-li³, ZHANG Qiang², SUN Xiao-bo^{2*} (1. Life Science and Environment Science Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Medicinal Plant Research Institute, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100094, China; 3. Anhui Tianma Taxus Technology Co. Ltd., Liuan 237343, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of extracts from *Taxus chinensis* on cell growth and apoptosis of breast cancer cells T47D. **Method:** In the experiment, the blank group, different concentrations of *T. chinensis* extracts groups (200, 100, 50, 25 mg·L⁻¹) and the Adriamycin group (3 μmol·L⁻¹) were established to treat breast cancer cells T47D for 24 h. The T47D cell proliferation was determined by MTT method. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) and Caspase-3 were detected by kit. The cell apoptosis was tested by Hoechst33342 fluorescence. The expressions of proteins related to T47D cell apoptosis, such as pro-apoptosis proteins (Bax), anti-apoptotic proteins (Bcl-2) and Caspase-3, were detected by Western blot method. **Result:** Compared with the blank group, extracts from *T. chinensis* significantly inhibited the proliferation of T47D cells, improved the LDH and Caspase-3 activities, induced the apoptosis of T47D, up-regulated the level of Bax and down-regulated the level of Bcl-2, with significantly statistical differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and concentration dependence. **Conclusion:** Extracts from *T. chinensis* have a direct inhibitory effect on breast cancer cells T47D proliferation, with concentration dependence. Its mechanism may be related to the induction of cell apoptosis.

[Key words] extracts from *Taxus chinensis*; breast cancer; T47D; cell proliferation; apoptosis

红豆杉为常绿乔木或灌木植物,民间一般称紫杉,含有多种药用成分,在我国分布广泛^[1-2]。据

[收稿日期] 20140926(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374011);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09501001)

[第一作者] 王健,硕士,从事中药药理毒理研究,Tel:18600466661,E-mail:361043976@qq.com

[通讯作者] *孙晓波,博士,研究员,从事中药药理毒理研究,Tel:01057833013,E-mail:sun-xiaobo@163.com

《本草纲目》记载,红豆杉具有治疗霍乱、伤寒等疗效。研究发现红豆杉提取的多种成分具有抗白血病、抗肿瘤、降血糖、利尿、通经、抑制糖尿病和治疗心脏病的功效^[3-4]。其中从红豆杉的树皮以及树叶中提炼出来的紫杉醇对多种晚期癌症疗效突出,被全球誉为“晚期肿瘤的最后一道防线”^[5]。目前,红豆杉主要作为抗肿瘤药物紫杉醇的野生植物资源。本文旨在进一步证实红豆杉抗肿瘤作用,特别是对乳腺癌的治疗作用,从凋亡角度探索红豆杉提取物对乳腺癌 T47D 细胞增殖的抑制作用,为红豆杉提取物抗乳腺癌作用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 T47D 细胞株由上海典型培养物中心提供。

1.2 药物及试剂 红豆杉提取物液体来自于红豆杉茎和叶,由安徽天马红豆杉科技有限公司提供。高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 12430-054),胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 16000-044),0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号 SV30031.01),二甲基亚砜(美国 Sigma 公司,批号 D5879),MTT(美国 Sigma 公司,批号 M2128),半胱天冬酶-3(Caspase-3)活力检测试剂盒(美国 Sigma 公司,批号 K106),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成公司,批号 5340216),Bax, Bcl-2, Caspase-3, β -actin 一抗(美国 Santa 公司,批号为 SC-20067, SC-492, SC-65496, SC-1616),阿霉素(深圳万乐药业有限公司,批号 H44024359)。其他试剂均为分析纯(北京化工厂)。

1.3 仪器 DMIL HC 型倒置相差显微镜和荧光显微镜(德国 Leica 公司),UV-2000 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药品配制及细胞培养 药品用无血清培养基按一定质量浓度配制成 200, 100, 50, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.22 μm 微孔滤膜过滤,储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。T47D 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 相对饱和湿度下培养。

2.2 分组 实验设空白组、红豆杉提取物不同剂量组和阳性药组,实验组分为不同浓度的单药组,其中红豆杉提取物按质量浓度不同分为 200, 100, 50, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。阳性药为阿霉素,浓度为 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 MTT 法检测细胞增殖 细胞点于 96 孔板,每孔 100 μL ,细胞密度为 1×10^5 个/孔。置于细胞培养箱

中培养 36 h 后,吸去上清培养基,每孔加药 100 μL 。继续置于细胞培养箱中培养 24 h 后,弃上清液,每孔加 100 μL 的 DMEM 培养液和 20 μL , 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT,再次置于培养箱中作用 4 h。弃上清液,加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min,在 570 nm 酶标仪下检测各孔的吸光度 A 。按下式求得细胞的存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4 LDH 活力检测 细胞点于 96 孔板,每孔 100 μL ,细胞密度为 1×10^5 个/孔。置于细胞培养箱中培养 36 h 后,吸去上清培养基,每孔加药 100 μL 。继续置于细胞培养箱中培养 24 h 后,吸取清液,按照 LDH 检测试剂盒说明书进行操作。

2.5 Caspase-3 活力检测 用胰酶消化贴壁细胞,并收集至备用的细胞培养液中。3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞,吸除上清,同时确保尽量没有细胞被吸除,用 PBS 洗涤 1 次。同前吸尽上清后,加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 ~ 15 min。把上清转移到冰浴预冷的离心管中。立即按照试剂盒说明书测定 Caspase-3 的活性。

2.6 Hoechst33342 荧光染色法检测细胞凋亡 Hoechst 33342 染色用于定性分析凋亡细胞。乳腺癌细胞 T47D 爬片培养在 24 孔板上,培养 36 h。如前药物处理后,弃去上清, PBS 洗 2 次,加入 PBS 配制的 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst33342 在黑暗处孵育 15 min, PBS 洗 2 次,将玻片扣在载玻片上,用荧光显微镜观察。

2.7 Western bolt 检测 将药物处理的乳腺癌细胞 T47D 细胞胰酶消化, PBS 洗 2 次,加裂解液于冰上裂解 30 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液,用 BCA 法蛋白定量,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。蛋白经煮沸处理后各组取等量蛋白样品,经 10% SDS-PAGE 电泳分离,蛋白转移至 NC 膜上,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入二抗,室温孵育 1 h;以 TBST 摇床洗膜 3 次,每次 10 min,用化学发光法检测目的蛋白,显影定影结束胶片扫描后用 Image J 软件测定其吸光度值,并计算各组的相对吸光度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,各组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 T47D 细胞增殖的影响 MTT 法检测实验

结果显示,与空白组比较,红豆杉提取物在 200, 100, 50 mg·L⁻¹ 对 T47D 细胞增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 细胞存活率分别为 49.52%, 58.65%, 62.98%。其抑制作用具有浓度依赖性,呈现出显著地剂量-效应关系,在 200 mg·L⁻¹, 其抑制作用强于阿霉素。但与空白组比较, 25 mg·L⁻¹ 红豆杉提取物对 T47D 抑制作用无统计学意义。见表 1。

表 1 红豆杉提取物对 T47D 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effects of extract of *Taxus chinensis* on cell viability of T47D ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	100.00 ± 9.23
红豆杉提取物	25	87.21 ± 7.55
	50	62.98 ± 7.28 ²⁾
	100	58.65 ± 6.61 ²⁾
	200	49.52 ± 7.14 ²⁾
阿霉素	3 ³⁾	61.25 ± 5.65 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 表示阿霉素的单位是 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2~3, 图 1 同)。

3.2 对 T47D 细胞中 LDH 活力的影响 与空白组比较,红豆杉提取物在 200, 100, 50, 25 mg·L⁻¹ 显著增加 T47D 细胞培养液中 LDH 的活力 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随着作用剂量的提高呈现出剂量-效应关系,其中 200 mg·L⁻¹ 时 LDH 活力高于阿霉素组。见表 2。

表 2 红豆杉提取物对 T47D 细胞 LDH 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of extract of *Taxus chinensis* on LDH activity of T47D ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹
空白	-	243.59 ± 32.09
红豆杉提取物	25	467.81 ± 35.57 ¹⁾
	50	552.13 ± 76.03 ²⁾
	100	654.36 ± 56.88 ²⁾
	200	835.71 ± 56.87 ²⁾
阿霉素	3 ³⁾	687.56 ± 61.23 ²⁾

3.3 对 T47D 细胞中 Caspase-3 活性的影响 与空白组比较,红豆杉提取物在 200, 100, 50, 25 mg·L⁻¹ 明显增加细胞中 Caspase-3 活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 具有浓度依赖性。见表 3。

3.4 对 T47D 细胞凋亡及对凋亡相关蛋白表达的影响 通过 Hoest33342 染色, 荧光强度均匀、细胞核为椭圆形的细胞为正常的乳腺癌 T47D 细胞, 不均匀的荧光强度以及异构和染色质凝集为凋亡细

表 3 红豆杉提取物对 T47D 细胞 Caspase-3 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of extract of *Taxus chinensis* on Caspase-3 activity of T47D ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

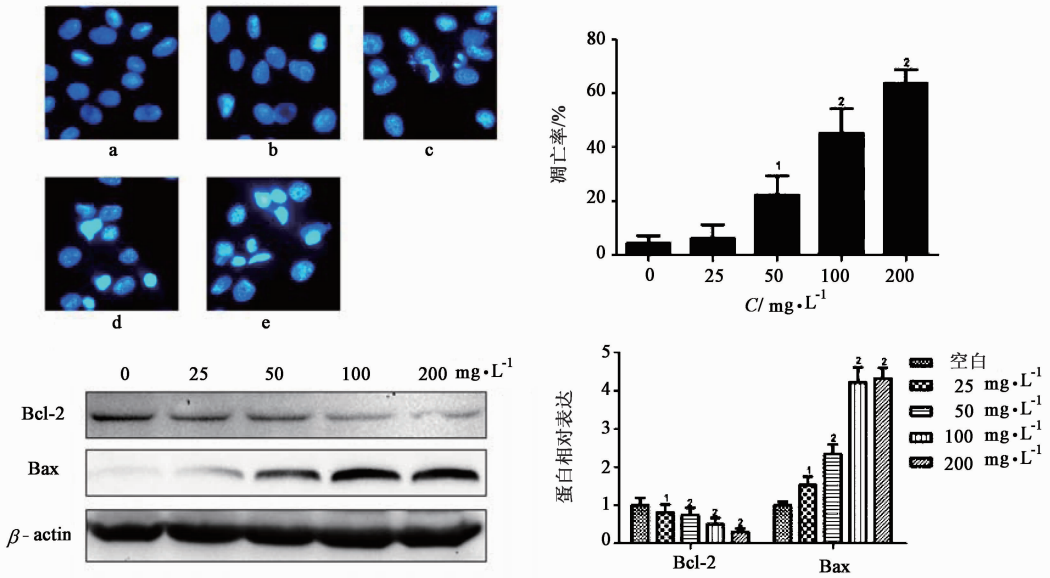
组别	剂量/mg·L ⁻¹	Caspase-3
空白	-	1.00 ± 0.17
红豆杉提取物	25	1.63 ± 0.19 ¹⁾
	50	3.48 ± 0.17 ²⁾
	100	3.59 ± 0.38 ²⁾
	200	3.63 ± 0.28 ²⁾
阿霉素	3 ³⁾	3.56 ± 0.16 ²⁾

胞。见图 1。与空白组比较,红豆杉提取物可以诱导乳腺癌 T47D 细胞凋亡,随浓度增高,凋亡细胞也会增加。Western bolt 检测凋亡相关蛋白表达显示,红豆杉提取物诱导 T47D 细胞凋亡过程中伴随着抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,但同时导致了促凋亡蛋白 Bax 表达增加。见图 1。

4 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,对女性身心健康有严重影响,甚至威胁生命^[6]。中药在乳腺癌的治疗过程中起着重要的作用,不但可以缓解化疗给患者带来的不良反应,提高化疗的效果,对于已发生转移或不适宜再次手术的患者还可以减轻疼痛,延长生存时间和提高生存质量^[7]。红豆杉在我国医学中早有记载,《本草纲目》就记载有红豆杉治疗霍乱、伤寒等疗效;在现代《中药大辞典》、《东北药植志》、《吉林中草药》、《本草推陈》等医药书中还有进一步的记载。国际上,从红豆杉树皮和嫩叶中提取的紫杉醇,是继阿霉素和顺铂之后被公认最好的广谱天然抗癌药。临床试验结果表明,紫杉醇对多种癌症疗效显著,主要用于治疗晚期乳腺癌、肺癌、卵巢癌及头颈部癌、软组织癌和消化道癌等^[8]。本文主要研究红豆杉提取物对乳腺癌细胞 T-47D 的增殖抑制作用,并对其机制进行初步的探讨。

本文通过实验研究发现,红豆杉提取物在 50 mg·L⁻¹ 就可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖,并且该作用具有浓度依赖性。乳酸脱氢酶 (LDH) 在胞浆内含量丰富,正常时不能通过细胞膜,当细胞受损伤或死亡时可释放到细胞外,此时细胞培养液中 LDH 活性与细胞死亡数目成正比。笔者通过 LDH 活力检测证明了红豆杉提取物可以增加细胞培养液中 LDH 活力,引起乳腺癌细胞损伤。此外,红豆杉提取物可以显著提高 T-47D 细胞中 Caspase-3 活力, Caspase 半胱氨酸蛋白酶家族引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,其激活主要包括线粒体依



a. 空白组; b. 红豆杉提取物 25 mg·L⁻¹组; c. 红豆杉提取物 50 mg·L⁻¹组; d. 红豆杉提取物 100 mg·L⁻¹组; e. 红豆杉提取物 200 mg·L⁻¹组

图 1 红豆杉提取物对 T47D 细胞凋亡及对凋亡相关蛋白表达的影响
Fig. 1 Effects of extract of *Taxus chinensis* on apoptosis of T47D cell

赖途径和死亡受体介导的信号转导途径,激活后的下游 Caspase 通过切割特异性底物,导致细胞凋亡^[9]。因此笔者认为红豆杉提取物对 T-47D 细胞的抑制作用可能与诱导凋亡有关。

细胞凋亡是受基因调控也受外界其他因素影响和制约的细胞主动死亡过程。随着肿瘤分子生物学研究的深入,人们认识到肿瘤的发生和发展不仅与肿瘤细胞的增殖分化异常有关,而且同细胞凋亡的调控失常有关^[10]。因此,设法诱导肿瘤细胞的凋亡已成为一种新的治疗方向。Hoest33342 染色结果表明,红豆杉提取物处理乳腺癌 T47D 细胞后,细胞呈现明显的凋亡形态,细胞凋亡显著增加。Bcl-2 家族是影响细胞凋亡比较重要的信号途径,Bcl-2 家族蛋白最终通过作用于细胞生物膜特别是线粒体膜,调节线粒体膜的通透性,传导细胞的生死信号。Bcl-2 家族成员间的动态平衡可能是决定细胞命运的核心机制之一,尤其这一家族的两个代表性成员 Bcl-2 和 Bax,分别代表凋亡抑制和促进,它们的比率决定着细胞的存亡^[11]。本研究发现红豆杉提取物降低 Bcl-2 水平,增加 Bax 表达,这些都表明红豆杉提取物的抗 T47D 增殖作用与诱导细胞凋亡有关。本课题组将进一步研究红豆杉提取物的抗肿瘤作用机制,为综合利用红豆杉药材资源提供有价值的资料。

[参考文献]

[1] 王亚飞,王强,阮晓,等. 红豆杉属植物资源的研究现

状与开发利用对策[J]. 林业科学,2012,48(5): 116-125.

[2] 张雪莲,康真,刘藕莲,等. 南方红豆杉繁殖技术研究进展[J]. 林业科学,2014,25(7):76-77.

[3] 张学玉,曲玮,梁敬钰. 红豆杉属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2011,23(6):5-9.

[4] 王红萍,段红梅. 红豆杉的价值与开发利用研究进展[J]. 北方园艺,2013,12:191-195.

[5] 赵丁,秦葵,曹聪梅,等. 南方红豆杉和东北红豆杉中的单体化合物对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:635-638.

[6] 徐波. 多西他赛联合表阿霉素治疗 67 例晚期乳腺癌的临床观察与护理[J]. 医护论坛,2010,7(33): 153-154.

[7] 孙放,郭淳,孙行云,等. 乳腺癌的中医药治疗进展[J]. 广西中医药大学学报,2014,17(2):87-89.

[8] 张静. 植物红豆杉的抗癌药用价值研究[J]. 中国药业,2014,23(1):1-3.

[9] 赵瑞杰,李引乾,王会,等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.

[10] 刘晓婷,王延让,张明,等. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J]. 环境与健康杂志,2013,30(2):182-185.

[11] 孙峥,敖再勇,于甜甜,等. 透骨草提取物通过 Bcl-2 和 Bax 蛋白诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡[J]. 中国药物与临床,2013,13(12):1536-1538.

[责任编辑 周冰冰]