

芦荟大黄素联用顺铂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响

陶毅明^{1*}, 洪雪², 马义丽¹, 廖朝亮¹

(1. 桂林医学院 生物技术学院, 广西 桂林 541004; 2. 广东省肾脏病研究所, 广州 510515)

[摘要] 目的:探讨芦荟大黄素(AE)单用或联用顺铂(CP)对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖和凋亡的影响。方法:以MDA-MB-231细胞为研究对象,用5,10,20,30,40,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AE,2,4,8,12,24,36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CP,或不同浓度AE联用CP处理乳腺癌MDA-MB-231细胞48h,另设空白组,MTT法检测细胞增殖;Annexin V FITC/PI双染和流式细胞术检测细胞凋亡与细胞周期;Western blot分析Bcl-2相关X蛋白(Bax),B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和Bcl-xL蛋白表达的变化。结果:与空白组比较,AE单用显著抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖,半数抑制浓度(IC₅₀)为22.21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与CP联用时IC₅₀为9.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。联用指数CI₅₀<1,表明两药物有协同作用;AE单用使细胞周期阻滞在G₁期,并诱导细胞凋亡,联用CP则增强阻滞,凋亡率明显增加;两药联用显著抑制Bcl-2和Bcl-xL的表达,并上调Bax的表达,与空白组比较均具有明显的统计学差异(P<0.05,P<0.01)。结论:芦荟大黄素抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖,使细胞周期阻滞在G₁期,并通过上调促凋亡蛋白和下调抗凋亡蛋白,诱导凋亡。与顺铂联用能增强其促凋亡作用,两药存在协同作用。

[关键词] 芦荟大黄素;乳腺癌;MDA-MB-231细胞;凋亡;顺铂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0127-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200127

Effects of Aloe Emodin Alone and in Combination with Cisplatin on Cell Proliferation and Apoptosis of Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 TAO Yi-ming^{1*}, HONG Xue², MA Yi-li¹, LIAO Chao-liang¹
(1. Guilin Medical University, College of Biotechnology, Guilin 541004, China; 2. Guangdong Provincial Institute of Nephropathy, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-proliferation and apoptosis effects of aloe emodin (AE) alone and in combination with cisplatin (AE-CP) on breast cancer cell MDA-MB-231. **Method:** MDA-MB-231 cells were treated for 48 h with 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AE, 2, 4, 8, 12, 24, 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CP or various concentrations of AE-CP. Cell proliferation was detected by MTT. Apoptosis and cell cycle were detected by Annexin V FITC/PI double-staining and flow cytometer. The protein levels of Bax, Bcl-2 and Bcl-xL were analyzed by Western blot. **Result:** AE alone significantly inhibited cell proliferation, with an IC₅₀ of 22.21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. IC₅₀ decreased to 9.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ when it was used in combination with CP. The combination index CI₅₀<1, indicating a synergistic effect. AE alone arrested cell cycle in G₁ phase and induced apoptosis. The arrest was accentuated when CP was given simultaneously, accompanied by a marked increment of apoptosis rate. AE-CP significantly inhibited the protein levels of Bcl-2 and Bcl-xL, but increased Bax. **Conclusion:** AE could inhibit the cell proliferation of MDA-MB-231, arrest the cell cycle in G₁ phase, and induce apoptosis by increasing apoptosis proteins and decreasing anti-apoptosis proteins. AE shows a synergistic effect of apoptosis when combined with CP.

[Key words] aloe emodin; breast cancer; MDA-MB-231 cell; apoptosis; cisplatin

芦荟大黄素(aloe emodin, AE)是从传统中药植物包括芦荟、大黄等提取的一种蒽醌化合物,化学名为1,8-二羟基-3-羟甲基蒽醌,具有抗菌、抗病毒、抗

炎和护肝等作用。近10年来,研究表明AE具有抗多种肿瘤细胞的作用,且毒副作用小,安全性比化疗药物高,与其他化疗药物联用可增强疗效,逆转癌细

[收稿日期] 20140910(020)

[基金项目] 2012年度“广西高等学校优秀人才资助计划”项目(桂教人(2012)41号)

[通讯作者] *陶毅明,博士,副教授,从事生物化学研究,Tel:0773-3680722,E-mail:yiming_tao@yahoo.com

胞由于化疗引起的耐药性^[1-2]。AE 抗肿瘤的分子机制也得到初步阐明,包括细胞周期阻滞、活性氧簇 ROS 升高、线粒体凋亡途径、Caspase 酶激活、Fas 死亡受体表达增强等。但对于不同的细胞株,其作用机制不尽相同^[2-4]。AE 对乳腺癌细胞的抑制研究尚未见报道。

凋亡是细胞的程序性死亡,通过凋亡,机体内的异常细胞得以清除。使用药物去诱导癌细胞凋亡是一种重要的治疗方式。凋亡受到诸多蛋白质的调控,包括促凋亡因子 Bax, Bid 和 Bad 等及抗凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-xL 等^[5]。本文初步探讨了 AE 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制及诱导凋亡作用,并分析药物处理前后凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达变化情况,为其在中西医结合治疗乳腺癌的应用提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞株 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购于中国科学院上海细胞库。

1.2 药物及试剂 芦荟大黄素(纯度 > 95%, 上海生工生物工程公司, 批号 LC1121S2011Z), 顺铂(山东德州德药, 批号 111203), ECL 发光液(美国 Thermo 公司, 批号 NJ175924), 胎牛血清(美国 Hyclone 公司, 批号 NXA0544), 细胞裂解液(南京碧云天公司, 批号 POO13B), DMEM 培养液(美国 Gibco 公司, 批号 8114129), Bax 抗体(批号 2104742), Bcl-2 抗体(批号 2209630), Bcl-xL 抗体(批号 2299725), HRP 标记羊抗鼠二抗(批号 106386) 和 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(批号 3223842) 均为美国 BD 公司, RNA 酶(批号 011M7028V), 胰酶(批号 1408168) 均为美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 3111 型 CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo 公司), 1510 型酶标仪为(美国 Thermo 公司), BSC-1500IIA2 型生物安全柜(美国 Biobase 公司), BD FACS Aria III 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 °C, 5% CO₂。

2.2 药物配制 AE 用 DMSO 溶解配成 80 mmol·L⁻¹ 母液后, 于 -20 °C 保存。临用时用培养液稀释。最高浓度为 50 μmol·L⁻¹ AE 的培养液中含 0.06% DMSO, 对细胞生长无影响。

2.3 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞, 接种在 96 孔板上, 每孔 5 × 10³ 个, 每组 6 个重

复。培养 24 h 后, 加入 100 μL AE 或 CP, 终浓度分别为 5, 10, 20, 30, 40, 50 μmol·L⁻¹ AE, 或 2, 4, 8, 12, 24, 36 μmol·L⁻¹ CP, 或不同浓度的 AE 与 CP 联用。再培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL 5 g·L⁻¹ MTT, 孵育 4 h, 弃 MTT 后加入 150 μL DMSO 振荡充分溶解后在酶标仪波长 490 nm 处测吸光度 A。抑制率 = (A_{空白组} - A_{药物组}) / A_{空白组} × 100%。IC₅₀ 由 SPSS 12.0 回归分析得出。药物联用指数(CI)按 Chou-Talalay 公式计算^[6], CI_x = A_{联x} / A_{单x} + B_{联x} / B_{单x}, 式中 CI_x 为抑制率为 x% 时的联用指数; A_{联x} 和 B_{联x} 分别为抑制率为 x% 时, 药物联用中 A 和 B 的浓度; A_{单x} 和 B_{单x} 分别为抑制率为 x% 时, 单用药物 A 和 B 的浓度。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 取对数生长期的细胞, 接种在 6 孔板上, 每孔 2 × 10⁵ 个。培养 24 h 后, 加入 AE 或 CP, 终浓度分别为 30 μmol·L⁻¹ AE, 12 μmol·L⁻¹ CP, 30 μmol·L⁻¹ AE + 12 μmol·L⁻¹ CP, 处理细胞 24 h(早期凋亡检测)或 48 h(周期检测), 用 0.25% 胰酶消化, 收集细胞, 离心弃上清, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 再离心弃上清, 加入 500 μL binding buffer 重悬细胞, 最后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 50 mg·L⁻¹ PI, 室温避光反应 15 min 后在流式细胞仪上检测凋亡率和细胞周期。每组 3 个重复。

2.5 Western blot 检测 取对数生长期的细胞, 接种在 50 mL 培养瓶内, 每瓶 5 × 10⁶ 个细胞。培养 24 h 后, 加入 AE 或 CP, 终浓度分别为 30 μmol·L⁻¹ AE, 12 μmol·L⁻¹ CP, 30 μmol·L⁻¹ AE + 12 μmol·L⁻¹ CP, 处理细胞 48 h, 细胞经裂解液作用后, 离心收集蛋白上清液, BCA 法测定蛋白质浓度后进行 SDS-PAGE 电泳。每孔蛋白上样量为 40 μg。分离胶浓度为 10%。电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭过夜。次日加入一抗, 室温孵育 2 h, 用 TBST 洗涤后, 加入二抗。室温孵育 2 h。暗室中用 ECL 发光, 压片。以 β-actin 为参照, 对蛋白条带灰度进行定量。每组 3 个重复。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 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 AE 单用或联用 CP 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用 不同浓度的 AE 和 CP 单独作用细胞 48 h 后, 抑制率随药物浓度的增加而增大,

AE 单用时 IC_{50} 为 $22.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CP 单用时 IC_{50} 为 $11.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。20 ~ 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 与 12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CP 的抑制效果相当。联用时 AE 的 IC_{50} 为 $9.51 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 是单用的 42.8% (9.51/

22.21); CP 的 IC_{50} 为 $3.96 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 是单用的 35.8% (3.96/11.05)。50% 抑制率的联用指数 $CI_{50} = 0.428 + 0.358 = 0.786 < 1$, 表明药物 AE 和 CP 间有协同作用。见表 1。

表 1 AE 单用或联用 CP 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of AE and CP on proliferation of MDA-MB-231 cell line ($\bar{x} \pm s, n=6$)

CP/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%	AE/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%	AE + CP/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
2	5.12 ± 1.8 ¹⁾	5	16.67 ± 1.8 ²⁾	2.5 + 1	17.72 ± 3.3 ²⁾
4	11.42 ± 5.4 ²⁾	10	45.32 ± 3.3 ²⁾	5 + 2	43.68 ± 4.8 ²⁾
8	32.63 ± 6.7 ²⁾	20	52.14 ± 4.1 ²⁾	10 + 4	52.67 ± 6.7 ²⁾
12	54.02 ± 7.9 ²⁾	30	55.32 ± 4.2 ²⁾	20 + 8	60.78 ± 5.9 ²⁾
24	80.20 ± 9.3 ²⁾	40	57.84 ± 3.8 ²⁾	30 + 12	67.89 ± 8.8 ²⁾
36	90.89 ± 6.8 ²⁾	50	62.12 ± 3.9 ²⁾	40 + 24	89.23 ± 7.7 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3,图 1 同)。

3.2 AE 单用或联用 CP 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期的影响 采用 PI 标记流式细胞术检测细胞周期的变化,经药物处理 48 h 后,30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 和 12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CP 处理组 G_1 细胞的比例从 57.71% 分别增加至 62.14% 和 68.85%,与空白相比差异显著($P < 0.05$)。联合用药则使 G_1 期的细胞数目比例大大增加,达到了 86.16%,S 期和 G_2 期的细胞数目比例大大减少,与空白相比差异均极显著($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 AE 单用或联用 CP 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of AE and CP on cell cycle of MDA-MB-231 cell line ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0 - G_1 /%	S/%	G_2 -M/%
空白	-	57.71 ± 8.8	30.67 ± 4.5	11.62 ± 3.2
AE	30	62.14 ± 8.6 ¹⁾	26.05 ± 3.7	11.21 ± 3.8
CP	12	68.85 ± 7.4 ²⁾	27.04 ± 3.0	4.31 ± 1.0 ²⁾
AE + CP	30 + 12	86.16 ± 9.1 ²⁾	7.39 ± 1.1 ²⁾	6.45 ± 1.4 ²⁾

3.3 AE 单用或联用 CP 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 用 AnnexinV-FTIC 双染法检测细胞凋亡。30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 或 12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CP 单独作用 MDA-MB-231 细胞 24 h 后细胞早期凋亡率分别为 8.2% 和 5.5%,与空白(0.6%)相比差异显著($P < 0.05$);两药联用则可诱导 17.7% 细胞早期凋亡,与空白相比差异极显著($P < 0.01$)。与空白或两药单用对比,联用引起的晚期凋亡和坏死细胞比例(3.8%)也明显增加($P < 0.05$)。见表 3。

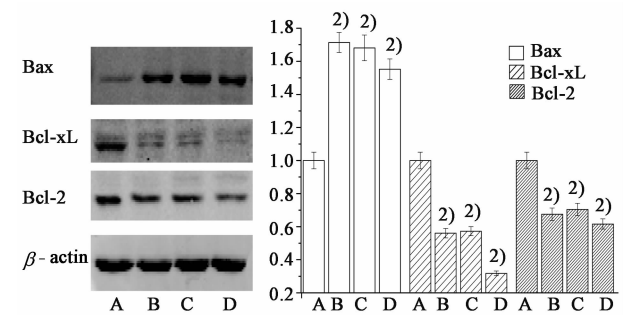
3.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达的变化 单用 AE 或联用 CP 处理细胞 48 h 后,促凋亡蛋白 Bax,抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达。与空白组

表 3 AE 单用或联用 CP 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of AE and CP on apoptosis of MDA-MB-231 cell line ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	活细胞/%	早凋/%	晚凋和坏死/%
空白	-	96.9 ± 1.7	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1
AE	30	91.3 ± 3.9 ¹⁾	8.2 ± 2.6 ²⁾	0.8 ± 0.2 ¹⁾
CP	12	92.6 ± 3.8 ¹⁾	5.5 ± 2.0 ²⁾	1.3 ± 1.1 ²⁾
AE + CP	30 + 12	79.2 ± 6.7 ²⁾	17.7 ± 5.9 ²⁾	3.8 ± 1.9 ²⁾

相比较,AE 单用显著抑制 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达,表达量分别为空白的 0.675 和 0.561;AE 联用 CP,表达量下降为空白的 0.616 和 0.318。AE 单用或联用 CP 则显著上调 Bax 的表达,降低 Bcl-2/Bax 的比例。见图 1。



A. 空白组;B. AE 组;C. CP 组;D. AE + CP 组

图 1 AE 和 CP 对 MDA-MB-231 凋亡蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.1 Effects of AE and CP on levels of apoptosis related proteins in MDA-MB-231 cell line ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

我国传统医学认为,芦荟大黄素具有抗病毒、护肝等功效,且毒副作用小。目前国内外有关芦荟大黄素药效的研究非常活跃,已经从抗菌、消炎等领

域,逐步扩展到肿瘤治疗领域。探究其诱导肿瘤细胞凋亡的机制,正在成为一个重要的研究方向。Chiu 等^[7]的研究表明,芦荟大黄素通过激活 Caspase 家族蛋白诱导舌癌细胞 SCC-4 凋亡;Chen 等^[8]和 Liu 等^[9]的实验证明,芦荟大黄素通过内源性线粒体途径诱导细胞凋亡,并抑制 NF-kappa B 途径来提高胰腺癌对化疗药物的敏感性。王耀先等^[10]认为大黄素诱导宫颈癌 Hela 细胞的凋亡可能与死亡受体的表达增强有关。本文通过 MTT 法、流式细胞术,Western blot 等方法初步探讨了芦荟大黄素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡的影响。

本实验首先观察了芦荟大黄素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株的毒性作用,结果显示芦荟大黄素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株的生长有很好的抑制作用,与低浓度顺铂联用时可增强顺铂的抑肿瘤效果。虽然其 IC₅₀是顺铂 IC₅₀的 2 倍,但顺铂可引起严重的消化系统反应且具肾毒性,而芦荟大黄素则副作用小,且两药联用时可降低顺铂的使用浓度。进一步分析细胞周期发现,芦荟大黄素的细胞周期阻滞效应与顺铂相同,两者都使乳腺癌细胞阻滞在 G₀-G₁ 期,阻止了细胞进入 S 期,从而减少了 DNA 复制,于是细胞有丝分裂受阻。两药联用则使得这种阻滞效应更明显。芦荟大黄素处理肝癌细胞 Hep G₂ 后,也表现为细胞周期阻滞在 G₀-G₁ 期,这可能与 p21 和 p53 蛋白的诱导表达相关^[11]。

诱导肿瘤细胞凋亡是一种重要的治疗方案。本研究采用 Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡效应,发现芦荟大黄素作用细胞 24 h 后,早期凋亡细胞的比例增加(8.2%),与顺铂联用则大大增加早期凋亡细胞的比例(17.7%),同时晚期凋亡和坏死细胞的比例也有所增加(3.8%)。Bcl-2 家族蛋白的主要功能是参与细胞凋亡的调控,依其功能可分为抗凋亡因子和促凋亡因子,前者包括 Bcl-2 和 Bcl-xL,后者包括 Bax 和 Bad 等。Bax 可增加线粒体内膜的通透性,导致细胞色素 c 大量释放到细胞质中,从而触发凋亡;而 Bcl-2 和 Bcl-xL 的作用正好相反,它们能与 Bax 相互作用使之失活^[5]。Western blot 的结果提示,芦荟大黄素诱导乳腺癌细胞凋亡与促凋亡蛋白 Bax 上调、抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 下调密切相关。

本实验初步证实了芦荟大黄素能显著抑制雌激素受体阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖,使细胞有丝分裂阻滞在 G₁ 期,并能通过降低 Bcl-2(Bcl-xL)/Bax 的比例诱导细胞凋亡。与顺铂联用能增强

芦荟大黄素诱导凋亡的作用,两药存在协同作用。由于凋亡途径涉及因子诸多,同时芦荟大黄素对于雌激素受体阳性的乳腺癌细胞株的效果如何,这些都有待更深入的研究。

[参考文献]

- [1] 阮志燕,邓向亮,周联,等. 大黄素抑制核转录因子-κB 在结肠癌细胞的活化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(14):155-159.
- [2] 郭立杰,蔡骏. 大黄素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 肿瘤防治研究,2008,35(8):605-608.
- [3] Yu J Q, Bao W, Lei J C. Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells[J]. Phytother Res, 2013,27(2):251-257.
- [4] Huang F J, Hsuu Y D. Characterization of apoptosis induced by emodin and related regulatory mechanisms in human neuroblastoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(10):20139-20156.
- [5] Bhujade A, Gupta G, Talmale S, et al. Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, release of cytochrome c from mitochondria and PARP cleavage[J]. Food Funct, 2013,4(2):338-346.
- [6] 王士群,朱宇珍,郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的应用研究概况[J]. 中国现代应用药学, 2013,30(4):449-453.
- [7] Chiu T H, Lai W W, Hsia T C, et al. Aloe-emodin induces cell death through S-phase arrest and caspase-dependent pathways in human tongue squamous cancer SCC-4 cells [J]. Anticancer Res, 2009, 29(11): 4503-4511.
- [8] Chen H, Wei W T, Guo Y F, et al. Enhanced effect of gemcitabine by emodin against pancreatic cancer *in vivo* via cytochrome C-regulated apoptosis [J]. Oncol Rep, 2011,25(5):1253-1261.
- [9] Liu A, Chen H, Tong H F, et al. Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in pancreatic cancer cells via inhibition of nuclear factor-kappa B [J]. Mol Med Rep, 2011,4(2):221-227.
- [10] 王耀先,郝慧南,陈秀玮,等. 大黄素通过内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡的研究[J]. 中国中医药科技,2013,20(1): 37-40.
- [11] Kuo P L, Lin T C, Lin C C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines[J]. Life Sci, 2002,71(16):1879-1892.

[责任编辑 周冰冰]