

解毒祛瘀方对 MCF-7 人乳腺癌细胞侵袭能力的影响及机制探讨

钱钧强, 王斌, 闫祝辰, 于冶灏, 王冬*
(天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心,
天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060)

[摘要] **目的:**研究解毒祛瘀方对人乳腺癌细胞侵袭能力的影响及机制。**方法:**以人乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象, 预培养后分为空白组, 解毒祛瘀方低、中、高剂量组 ($0.625, 1.25, 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 阳性药组 (5-氟尿嘧啶, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别用 $0.625, 1.25, 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的解毒祛瘀方及 5-氟尿嘧啶处理人乳腺癌 MCF-7 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞黏附率, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, RT-PCR 法检测肿瘤细胞 CD44, E-钙黏蛋白及 N-钙黏蛋白基因的表达, Western blot 法检测肿瘤细胞 CD44, E-钙黏蛋白, N-钙黏蛋白, 磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 及磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 蛋白的表达。**结果:**与空白组比较, 解毒祛瘀方低、中、高剂量组可明显抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的黏附和侵袭能力; 且使 CD44 及 E-钙黏蛋白基因及蛋白表达上调, N-钙黏蛋白表达下调, 并可以抑制 PI3K/Akt 及 MEK/ERK 信号通路的激活 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**解毒祛瘀方可抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞体外侵袭能力, 其机制可能与抑制相关异质黏附蛋白的表达、抑制上皮间质转化及调节肿瘤相关信号通路有关。

[关键词] 解毒祛瘀方; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; 侵袭能力; 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0118-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210118

Role and Mechanism of Jiedu Quyu Decoction on Invasion of Breast Cancer Cell QIAN Jun-qiang, WANG Bin, YAN Zhu-chen, YU Zhi-hao, WANG Dong* (Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To research Jiedu Quyu decoction effects on human breast cancer cell of invasion ability and mechanism. **Method:** Respectively, $0.625, 1.25, 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Jiedu Quyu decoction were treated with human breast cancer MCF-7 cell, adhesion assay and transwell assay was performed to test the adhesion ability and invasion ability. RT-PCR and Western blot were used to analyze the expression changes of genes and proteins, including E-cadherin, N-cadherin, CD44, extracellular signal-regulated kinase (ERK), protein kinase B (Akt). **Result:** Compared with the blank group, treated with $0.625, 1.25, 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Jiedu Quyu decoction, the adhesion and invasion ability of MCF-7 can be inhibited obviously. The expression of CD44 and E-cadherin were up-regulated, while the N-cadherin were down-regulated. And the signaling pathway of PI3K/Akt and MEK/ERK were inhibited ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Jiedu Quyu decoction could inhibit the invasion of MCF-7. Its mechanism may be correlated with inhibition of heterogeneous adhesion protein expression, and inhibition of epithelial-mesenchymal transition and regulation of signaling pathway.

[Key words] Jiedu Quyu decoction; human breast cancer MCF-7; invasion; signal pathway

中医理论认为乳腺癌的病因为忧思郁怒,嗜食肥甘,导致肝脾两伤,无形之气与有形之痰浊交结乳中

而致血瘀,瘀血日久蕴毒,瘀毒、痰浊、气滞内结而成岩^[1]。故瘀毒为乳腺癌的重要病因和病理因素。解

[收稿日期] 20150217(001)

[基金项目] 天津市中医药管理局中西医结合科研课题项目(13140)

[第一作者] 钱钧强,副主任药师,从事医院药学研究, Tel: 022-23340123-5104, E-mail: mjtlyqjq@163.com

[通讯作者] *王冬,硕士,主管药师,从事中药药理研究, Tel:022-23340123-5104, E-mail: lvn1314@126.com

毒祛瘀方是天津医科大学肿瘤医院多年治疗乳腺癌的经验方,在临床应用中疗效显著。通过总结近年上千例乳腺癌患者的治疗经验,发现解毒祛瘀方具有良好的增效减毒作用,能明显改善患者中医证候评分,提高患者生存质量和免疫功能,减轻化疗的毒副作用。该方是以白花蛇舌草、马勃、姜黄为主方,其中姜黄破血行气^[2-3],马勃、白花蛇舌草清热解毒^[4-5]。诸药合用,破除有形实邪,清解无形热毒,共奏抗癌解毒之功。本实验研究解毒祛瘀方对人乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭能力的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞系 MCF-7 购自美国标准生物制品收藏中心,保存于本实验室。

1.2 药物及试剂 解毒祛瘀方:主要药物为姜黄 20 g,马勃 10 g,白花蛇舌草 20 g 等,采用水煎醇提法制备生药,由江阴天江药业有限公司提供原料,天津市肿瘤医院制备,Matrigel Invasion Chamber 试剂盒(美国 BD 公司,批号 3331727),Trizol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026),逆转录试剂盒(批号 AK3101)及 Sybgreen 实时定量 PCR 试剂盒(批号 AK3303)均购自美国 Ambion 公司,CD44(批号 11567),E-钙黏蛋白(E-CAD,批号 10319),N-钙黏蛋白(N-CAD,批号 12674),磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK,批号 A3697),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt,批号 E3107)抗体,均购自美国 Abcam 公司,MTT(美国 Promega 公司,批号 2035B358)。

1.3 仪器 3110 型水套系列 CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司),PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ 公司),FACScaliber 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司),ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),PowerPac Basic 电泳仪,PowerPac HC 转膜电泳仪,ChemiDocXRS 凝胶成像系统(美国 Bio Rad 公司),GloMax20/20 型生物化学发光测量仪(美国 Promega 公司),TE300 型显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将常规方法复苏冻存的 MCF-7 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在饱和湿度,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中常规传代培养,按 1:3 比例传代扩增,每 2~3 d 换液 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞黏附实验 将 5 组预培养 MCF-7 细胞分为空白组,低、中、高剂量解毒祛瘀方组(0.625,1.25,2.5 g·L⁻¹),阳性药组(5-氟尿嘧啶,10 mg·L⁻¹),采用解毒祛瘀方低、中、高剂量组

及 5-氟尿嘧啶组处理 MCF-7 细胞 24 h,按 1 × 10⁵/孔密度接种于铺有 Matrigel 胶的 96 孔板中,每组 5 个复孔,在饱和湿度,37 ℃,5% CO₂ 孵育 1 h,吸出上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)孵育 4 h,弃去孔内培养液,加入 DMSO 200 μL,振荡 10 min,490 nm 波长下测定吸光度 A,计算细胞黏附率。

$$\text{细胞黏附率} = [1 - (A_{\text{未黏壁细胞值}} / A_{\text{接种细胞总数}})] \times 100\%$$

2.3 Transwell 法检测细胞侵袭能力 首先将 -20 ℃ 保存的 Matrigel Invasion Chamber 小室在室温下放置 30 min,下室每孔加入 500 μL 含 20% 胎牛血清的培养基,再将 5 组(同 2.2 项分组)细胞悬液分别注入上室,每孔加入 500 μL(约含 2.5 × 10⁴ 个细胞),置于孵箱培养 12 h 后,甲醇固定并进行 HE 染色,蒸馏水漂洗 3 次,风干后,用刀片切下聚碳酸酯膜,置载玻片上,中性树脂固定,随机选取上、下、左、右、中 5 个视野(×100)计算迁移细胞数,结果取细胞计数的平均值。

2.4 RT-PCR 法检测乳腺癌细胞相关基因表达 将 5 组(同 2.2 项分组)处于对数生长期的细胞用 PBS 清洗 3 次,再加入 1 mL Trizol 试剂,按说明书提取总 RNA,通过 A_{260/280} 判断所提取总 RNA 纯度。进行逆转录,反应总体积为 20 μL,包括 1 μL 总 RNA,2.5 μL 10 × RTmix (Mg²⁺ 游离),2 μL dNTP (2.5 mmol·L⁻¹),0.5 μL 上、下游引物(10 mmol·L⁻¹),0.25 μL Taq DNA 聚合酶,2.5 μL 10 × Sybgreen I。PCR 反应条件:55 ℃ 温浴 2 min,96 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,65 ℃ 退火延伸 1 min,40 个循环。计算各样本待测基因的 C_t 值与 GAPDH 的 C_t 值的差,即 ΔC_t,2^{-ΔC_t} 为该样本中待测基因相对于 GAPDH 基因的表达量。引物由上海生工合成并纯化,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

基因名称	引物序列	片段长度
		/bp
E-钙黏蛋白	上游 5'-CGACCCAACCCAAGAATCTA-3'	202
	下游 5'-AATGGCAGGAATTTGCAATC-3'	
N-钙黏蛋白	上游 5'-CCACGCCGAGCCCCAGTATC-3'	232
	下游 5'-CCCCAGTCGTTTCAGGTAATCA-3'	
CD44	上游 5'-CCCTGCTACCAGAGAC-3'	398
	下游 5'-GGATCTTCATGAGGTACT-3'	
GAPDH	上游 5'-GGAAACTGTGGCGTGAT-3'	342
	下游 5'-GTGCTCGTTGATTCAAT-3'	

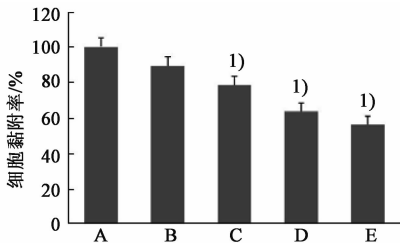
2.5 Western blot 法检测乳腺癌细胞相关蛋白表达 收集提取好的各组(同 2.2 项分组)细胞的蛋白,

以每泳道 40 μg 蛋白的量,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 3 h,完毕后蛋白转移至 PVDF 膜上。用封闭液(5% 脱脂奶粉)室温孵育 60 min,加入相应一抗,4℃孵育过夜。TBST 洗涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000),室温孵育 60 min。TBST 再洗涤后用 ECL 化学发光试剂孵育 1~2 min,显色,曝光 X 射线胶片。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据数据处理的不同方法,选用方差分析或 *t* 检验进行组间差异分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对乳腺癌细胞黏附能力的影响 与空白组比较,0.625,1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方组及 5-氟尿嘧啶组使 MCF-7 细胞黏附能力分别下降 10.8%,21.7%,36.7%,44.3% ($P < 0.05$)。见图 1。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2~5)

A. 空白组; B. 解毒祛瘀方 0.625 g·L⁻¹组; C. 解毒祛瘀方 1.25 g·L⁻¹组; D. 解毒祛瘀方 2.5 g·L⁻¹组; E. 5-FU 组(图 2~5 同)

图 1 解毒祛瘀方对乳腺癌 MCF-7 细胞黏附能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Effect of Jiedu Quyu decoction on adhesion potential in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响 与空白组比较,0.625,1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方组及 5-氟尿嘧啶组使 MCF-7 细胞侵袭能力分别下降 36.1%,39.4%,52.2%,55.4% ($P < 0.05$)。见图 2。

3.3 对乳腺癌细胞相关基因表达的影响 与空白组相比,RT-PCR 检测结果显示,MCF-7 细胞分别经 0.625,1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方及 5-Fu (10 mg·L⁻¹) 处理后,CD44 基因表达分别下调 22.3%,31.5%,42.8%,56.5% ($P < 0.01$),N-钙黏蛋白的基因表达分别下调 31.1%,45.8%,53.0%,71.0% ($P < 0.01$),E-钙黏蛋白的基因表达分别上调 34.4%,47.8%,56.5%,54.9% ($P < 0.01$)。见图 3。

3.4 对乳腺癌细胞相关蛋白表达的影响 与空白组比较,经 0.625,1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方及 5-Fu (10 mg·L⁻¹) 处理后,E-CAD 表达呈现上调趋势,CD44 及 N-CAD 蛋白表达均下调显著 ($P < 0.05$,

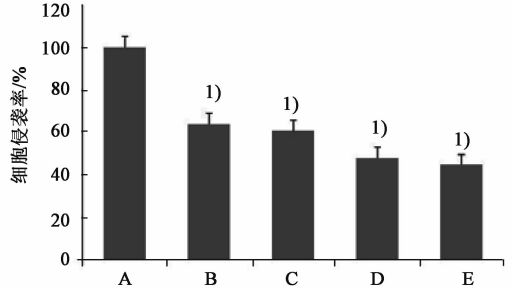
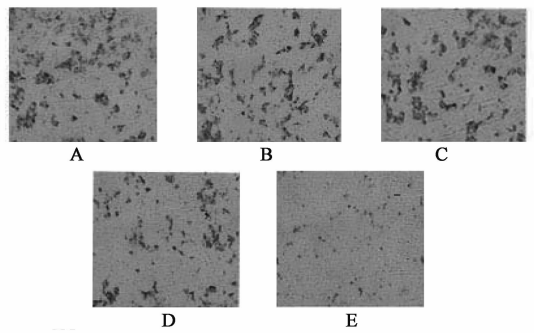


图 2 解毒祛瘀方对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of Jiedu Quyu decoction on invasion potential in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

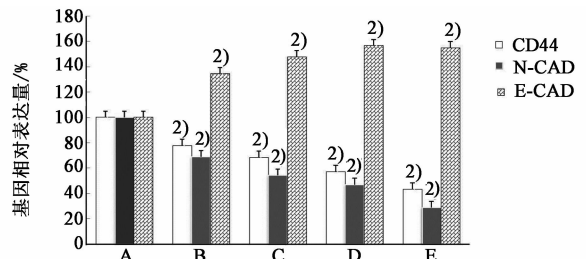


图 3 解毒祛瘀方对乳腺癌 MCF-7 细胞相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of Jiedu Quyu decoction on mRNA expression of relative gene in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$P < 0.01$)。见图 4。p-ERK,p-Akt 蛋白表达均呈下调趋势 ($P < 0.05, P < 0.01$),表明解毒祛瘀方可抑制 MEK/ERK 及 PI3K/Akt 通路的活化。见图 5。

4 讨论

近十几年来我国乳腺癌发病率逐年上升,已成为国内女性最常罹患的恶性肿瘤,而转移性乳腺癌又成为乳腺癌患者的首要致死原因。解毒祛瘀方是我院临床治疗乳腺癌的主要解毒祛瘀方之一,化疗同时佐以该方,有增效减毒的作用,能明显改善患者中医证候评分。本研究结果表明,解毒祛瘀方可以降低乳腺癌细胞异质黏附能力及转移侵袭能力,其机制可能与抑制肿瘤细胞异质黏附相关蛋白的表达、抑制细胞上皮间质转化(EMT)及调节相关信号通路传导有关。

EMT 其主要的特征为细胞黏附分子(如 E-钙黏

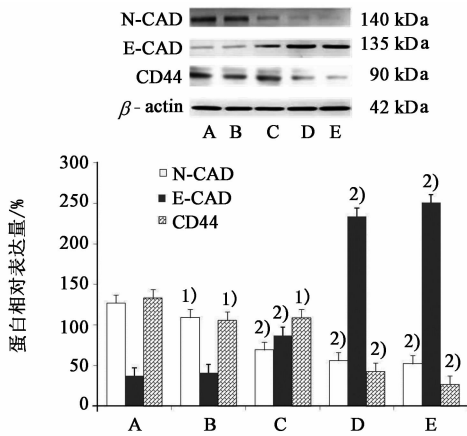


图 4 解毒祛瘀方对乳腺癌 CD44, E-CAD 及 N-CAD 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Jiedu Quyu decoction on protein expression of CD44, E-CAD, N-CAD in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

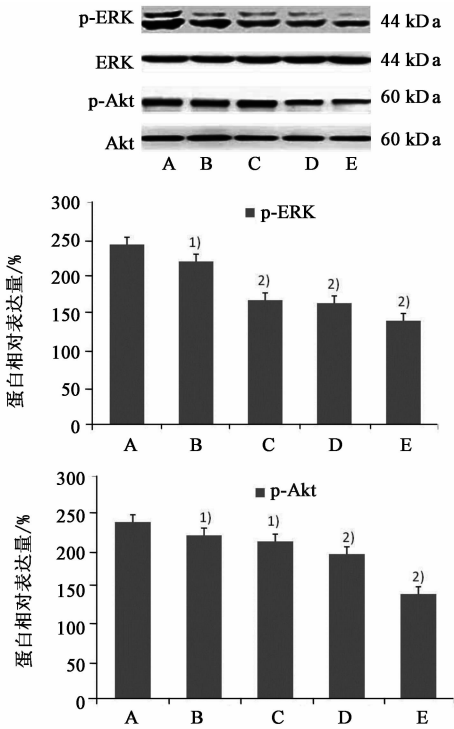


图 5 解毒祛瘀方对乳腺癌 p-ERK, p-Akt, ERK 和 Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Jiedu Quyu decoction on protein expression of p-ERK, p-Akt, ERK, Akt in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋白, CD44 等)表达的减少、细胞角蛋白 (CKs) 骨架转化为波形蛋白 (Vimentin) 为主的细胞骨架等。通过 EMT, 上皮细胞失去了细胞极性及与基底膜的连接等上皮表型, 获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型^[6]。肿瘤细胞的 EMT 过程受多条信号通路的调控, 其中主要包括 5 条信号通路: 酪氨酸激酶受体通路、整合素通路、

Wnts 通路、核因子 κ B (NF- κ B) 通路和转化生长因子 β (TGF- β) 通路 (TGF- β /Smad 和 TGF- β /PI3K-Akt 通路^[7])。有研究表明 ERK 和 Akt 的持续性表达及不断活化也会诱导肿瘤细胞侵袭及 EMT 的发生^[8-9]。同时 MEK/ERK 及 PI3K/Akt 信号通路在肿瘤细胞的增殖、分化、转移及凋亡等过程中也都发挥着十分重要的作用^[10]。本研究结果显示解毒祛瘀方可下调乳腺癌细胞 ERK 和 Akt 磷酸化程度, 表明其可能通过抑制相关信号通路, 从而影响肿瘤细胞侵袭能力。

由此可知, 解毒祛瘀方对人乳腺癌细胞的侵袭能力具有抑制作用, 其作用机制可能与其抑制细胞异质黏附相关蛋白的表达、抑制肿瘤细胞的 EMT 及调节相关信号通路的传导相关。但更确切的抗乳腺癌细胞侵袭转移机制还需结合体内动物模型实验和临床样本分析等, 进行更加多元化且深入的研究。

[参考文献]

[1] 姜开远, 马骥. 中医药治疗乳腺癌研究集锦[J]. 中医药学刊, 2003, 21(3): 431-432.
 [2] 李霞. 姜黄的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2003, 21(5): 298-301.
 [3] 杨甫文. 姜黄素抗肿瘤机制研究进展[J]. 福州总医院学报, 2006, 13(4): 248-251.
 [4] 崔磊, 宋淑亮, 孙隆儒. 脱皮马勃化学成分研究及抗肿瘤活性的初筛[J]. 中药材, 2006, 29(7): 703-705.
 [5] 杨培民. 白花蛇舌草抗肿瘤有效部位黄酮和多糖的纯化及其脂质体复合物的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
 [6] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1434.
 [7] Wallin J J, Guan J, Edgar K A, et al. Active pi3k Pathway causes an invasive phenotype which can be reversed or promoted by blocking the pathway at divergent nodes [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36402.
 [8] Grille S J, Bellacosa A, Upson J, et al. The protein kinase akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines [J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2172-2178.
 [9] Li J, Zhou B P. Activation of beta-catenin and akt pathways by twist are critical for the maintenance of emt associated cancer stem cell-like characters [J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 49-56.
 [10] Cheng S P, Yin P H, Hsu Y C, et al. Leptin enhances migration of human papillary thyroid cancer cells through the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways [J]. Oncol Rep, 2011, 26(5): 1265-1269.

[责任编辑 周冰冰]