

丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的影响

李然¹, 杜娜², 刘立萍¹, 潘嘉祥³, 李雪峰¹, 李海波^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847;

2. 中国方圆标志认证委员会辽宁审核中心, 沈阳 110032;

3. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847)

[摘要] 目的: 观察丹栀逍遥散含药血清通过诱导自噬对乳腺癌细胞 MCF-7 的影响。方法: 大鼠 ig 8.99 $g \cdot kg^{-1}$ 丹栀逍遥散, 制备含药血清, 取对数生长期 MCF-7 细胞, 以 1×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 分为空白血清组和含药血清组, 每组设 3 个复孔, 分别作用 12, 24, 48, 72 h, 噻唑蓝 (MTT) 法测定其对 MCF-7 细胞生长的抑制作用, 单丹磺酰戊二胺 (MDC) 荧光染色观察细胞自噬泡的形成情况, 免疫印迹法 (Western blotting) 检测自噬蛋白 (Beclin1) 的表达。结果: 与空白血清组比较, 15% 丹栀逍遥散含药血清具有显著抑制 MCF-7 细胞生长的作用, 确定其最佳作用时间为 48 h。丹栀逍遥散含药血清作用细胞 48 h 后能够增强 MDC 染色荧光强度, 增加自噬泡的形成并显著上调 Beclin1 的表达。结论: 丹栀逍遥散含药血清能够显著抑制 MCF-7 的细胞生长, 诱导细胞自噬性死亡可能是其抗乳腺癌的机制之一。

[关键词] 丹栀逍遥散; 自噬; 乳腺癌; MCF-7 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0098-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030098

Effect of Containing Serum of Danzhi Xiaoyao Powder on Autophagy of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7

LI Ran¹, DU Na², LIU Li-ping¹, PAN Jia-xiang³, LI Xue-feng¹, LI Hai-bo^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of

Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. Liaoning Audit Center of China Fangyuan Mark Certification Committee, Shenyang 110032, China;

3. The First Clinical College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the containing serum of Danzhi Xiaoyao powder on human breast cancer cell line MCF-7 by regulation of autophagy. **Method:** Rats were intragastrically given with 8.99 $g \cdot kg^{-1}$ Danzhi Xiaoyao powder to prepare the containing serum. The exponential phase MCF-7 cells were treated with containing serum of Danzhi Xiaoyao powder was inoculated on 96-well plates with the density of 1×10^5 cells/mL, 100 μL per well. The cells were divided into blank serum group and containing serum group, with 3 double-wells in each group. They were treated for 12, 24, 48, 72 h respectively, and then methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to measure its inhibitory effects on the growth of MCF-7 cells; the formation of autophagic vacuoles was detected using monodansylcadaverine (MDC) fluorescence microscope, and the expression of Beclin1 protein was detected using Western blotting. **Result:** Compared with the blank serum group, the growth of MCF-7 cells was significantly inhibited by 15% Danzhi Xiaoyao powder's containing serum, and the optimal

[收稿日期] 20150525(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202640);中国博士后科学基金面上项目(2013M530944);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2015073);辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201210162020)

[第一作者] 李然, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事方剂配伍与作用机制研究, Tel:024-31207085, E-mail:lnliran@163.com

[通讯作者] *李海波, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药抗肿瘤、抗氧化研究, Tel:024-31207308, E-mail:lnlhb@hotmail.com

condition was achieved after treatment for 48 h. At this time point, MDC staining fluorescence intensity and the formation of autophagic vacuoles were increased; at the same time, the expression of Beclin1 in MCF-7 cells was significantly up-regulated. **Conclusion:** Containing serum of Danzhi Xiaoyao powder could significantly inhibit MCF-7 breast cancer cells proliferation and induce autophagic death of cells. This may be one of the important mechanisms of its anti-breast cancer.

[**Key words**] Danzhi Xiaoyao powder; autophagy; breast cancer; MCF-7 cells

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,在我国其发病率为28/10万,占全身肿瘤的10%左右,在妇女肿瘤中仅次于宫颈癌^[1]。乳腺癌的病因和病机是肝郁气滞,所愿不遂导致体内气血失调,脏腑功能紊乱,最终使得邪毒内蕴,痰瘀交结,滞于乳中而发病,裴郑学教授以扶正固本为其治疗大法^[2],吴煜教授认为乳腺癌辨证当以肝郁血虚为要^[3]。丹栀逍遥散出自明代薛己编撰的《内科摘要》,是在《太平惠民和剂局方》所载“逍遥散”基础上加入丹皮、栀子2药组成,多用于肝郁脾弱,血虚而偏于火旺之证。该方在临床上有治疗乳腺癌及乳腺增生^[4-5]的相关报道,但实验研究较少。本实验通过研究丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响,探讨丹栀逍遥散治疗乳腺癌的机制。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌细胞 MCF-7,购自中国科学院上海细胞库。

1.2 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重(250 ± 10) g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)2010-0001。

1.3 药物 丹栀逍遥散方药:柴胡 15 g,白芍 15 g,当归 15 g,茯苓 15 g,炒白术 15 g,牡丹皮 7.5 g,炒山栀 7.5 g,炙甘草 7.5 g,上述药材均购于辽宁中医药大学附属医院,药物常规煎煮水提,加水浸泡 30 min,煎煮 30 min,煎好后过滤药物,收集药液,取过滤后药物再次煎煮 30 min,将 2 次煎煮后的药液混合浓缩,含生药 0.75 g·mL⁻¹,4 °C 冰箱内保存备用。

1.4 试剂 噻唑蓝(MTT, Genview 公司,批号 298-93-1),单丹磺酰戊二胺(MDC, Sigma 公司,批号 10121-81-2),抗 Beclin1 抗体(Abcam 公司,批号 GR66384-1)。

1.5 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),TS100 型倒置生物显微镜(日本 Nikon 公司),IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),iMark 型酶标仪,PowerPac Universal 电泳通用型电源,Trans-Blot SD 半干转印系统(美国 Bio-Rad 公司),FluorChem Q 蛋白质印迹成像系统(美国

Proteinsimple 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 MCF-7 细胞,3 ~ 5 d 传代 1 次。

2.2 含药血清制备 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,随机分为空白组、丹栀逍遥散组(药物按人与大鼠体表面积比换算给药等效剂量,大鼠 *ig* 8.99 g·kg⁻¹),空白组 *ig* 等量蒸馏水。每日 2 次,各组连续给药 7 d。在末次 *ig* 1 h 后,麻醉,腹主动脉取血,室温静置 2 h,离心后分离血清,同组血清合并,水浴 56 °C 灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装,-80 °C 冰箱保存备用。

2.3 分组 细胞分为 10% 空白血清组,10% 含药血清组;15% 空白血清组,15% 含药血清组;20% 空白血清组,20% 含药血清组。

2.4 细胞增殖检测及形态变化观察 取对数生长期 MCF-7 细胞,以 1 × 10⁵ 个/mL 密度 100 μL 分别接种于 4 块 96 孔培养板中,每组 3 个复孔。24 h 后分别加入 100 μL 不同浓度的空白血清和含药血清,在培养箱中分别培养 12, 24, 48, 72 h。相应时间点 在 96 孔板中每孔加入 MTT 溶液 25 μL,在培养箱中继续培养 4 h 后,吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μL,37 °C 振荡 10 min,使甲臜充分溶解,酶标仪上 490 nm 测定吸光度 *A*,倒置显微镜下观察细胞形态改变并采图。

2.5 观察细胞自噬泡的变化 将 1 × 10⁵ 个/mL 密度的细胞接种于 24 孔板中,每孔 400 μL,24 h 后加入空白血清和含药血清,作用 48 h 后,加入 50 μmol·L⁻¹ MDC 溶液 400 μL,在 37 °C 下作用 30 min,去除染液,用 PBS 洗 2 次,荧光显微镜观察并采图。

2.6 自噬蛋白 Beclin1 检测 将 MCF-7 细胞以 1 × 10⁵ 个/mL 接种于 25 cm² 培养瓶,24 h 后加入空白血清或含药血清 5 mL,培养 48 h,用总蛋白提取试剂提取总蛋白,离心取上清液,-80 °C 冰箱中保存。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,用蒸馏水调整到统一浓度,提取液中加入 5 × SDS 上

样缓冲液, 100 °C 变性 10 min, 蛋白上样每孔含 20 μL, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜 1 h, 2% BSA 室温封闭 2 h。一抗室温孵育 2 h, 4 °C 过夜, TBST 10 min/次洗膜 (3 次), 山羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 10 min 次洗膜 (3 次)。ECL 发光, Fluor Chem Q 蛋白质印迹, 成像系统显色并采图。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 进行统计分析,

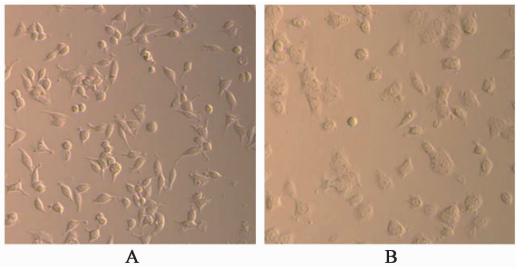
表 1 丹栀逍遥散含药血清对 MCF-7 细胞增殖 A 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Danzhi Xiaoyao powder containing serum on MCF-7 cells proliferation A ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清体积分数/%	12 h	24 h	48 h	72 h
空白血清	10	0.335 ± 0.019	0.403 ± 0.004	0.676 ± 0.046	0.463 ± 0.013
	15	0.401 ± 0.017	0.469 ± 0.014	0.790 ± 0.032	0.511 ± 0.012
	20	0.355 ± 0.049	0.411 ± 0.073	0.640 ± 0.108	0.518 ± 0.022
丹栀逍遥散含药血清	10	0.346 ± 0.015	0.393 ± 0.020	0.594 ± 0.096	0.409 ± 0.016
	15	0.333 ± 0.026 ¹⁾	0.388 ± 0.024 ¹⁾	0.516 ± 0.037 ¹⁾	0.438 ± 0.015 ¹⁾
	20	0.339 ± 0.016	0.378 ± 0.059	0.584 ± 0.073	0.484 ± 0.008

注: 与同浓度空白血清组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 含药血清处理对 MCF-7 细胞形态的影响 倒置显微镜下观察细胞, 与空白血清组比较, 丹栀逍遥散含药血清组处理后, MCF-7 细胞明显变圆, 萎缩, 表面有较多粗糙颗粒物。见图 1。



A. 15% 空白血清组; B. 丹栀逍遥散 15% 含药血清组 (图 2~3 同)

图 1 丹栀逍遥散含药血清对 MCF-7 细胞形态变化的影响 ($\times 100$)

Fig. 1 Effect of Danzhi Xiaoyao powder containing serum on morphologic changes of MCF-7 cells ($\times 100$)

3.3 对 MCF-7 细胞自噬泡的影响 与空白血清组比较, 丹栀逍遥散含药血清组诱导 MDC 标记的荧光明显增强, 说明含药血清组能够促进细胞自噬。见图 2。

3.4 对 MCF-7 细胞自噬蛋白 Beclin1 表达的影响 与空白血清组比较, 丹栀逍遥散含药血清组明显上调自噬蛋白 Beclin1 的表达。见图 3。

4 讨论

细胞自噬又称为 II 型程序性细胞死亡, 是细胞内蛋白降解和循环利用的主要途径。它首先在细

胞质内将细胞器和胞质包裹在膜内形成囊泡状结构, 即自噬小体, 自噬小体移向溶酶体并与其融合, 在溶酶体内自噬小体内成分被酶降解, 并且被细胞再利用。在细胞压力下, 自噬可能诱导促进细胞死亡或作为细胞生存的一个机制^[6-7]。研究表明自噬在肿瘤的发生发展过程中起到了促进和抑制的双重

3 结果

3.1 对 MCF-7 细胞增殖的影响 与空白血清组比较, 丹栀逍遥散 15% 含药血清在不同时间点对细胞增殖具有不同程度的抑制作用 ($P < 0.01$), 其中 15% 含药血清作用 48 h 抑制细胞生长最为显著, 后续实验选取 15% 含药血清为研究对象。见表 1。

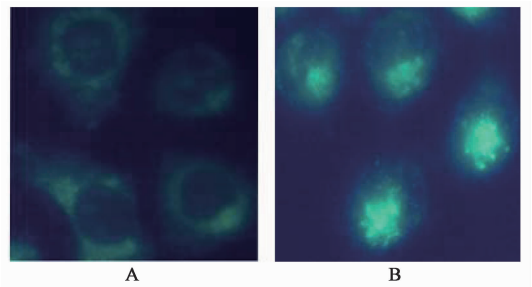


图 2 丹栀逍遥散含药血清对 MCF-7 细胞自噬泡的影响 (MDC, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Danzhi Xiaoyao powder containing serum on autophagic vacuoles of MCF-7 cells (MDC, $\times 400$)

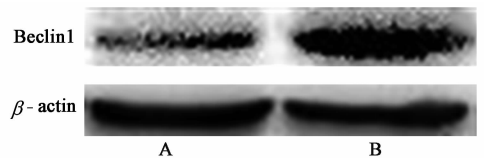


图 3 丹栀逍遥散含药血清对 MCF-7 细胞自噬蛋白 Beclin1 表达的影响

Fig. 3 Effect of Danzhi Xiaoyao powder containing serum on expression of Beclin1 in MCF-7 cells

胞质内将细胞器和胞质包裹在膜内形成囊泡状结构, 即自噬小体, 自噬小体移向溶酶体并与其融合, 在溶酶体内自噬小体内成分被酶降解, 并且被细胞再利用。在细胞压力下, 自噬可能诱导促进细胞死亡或作为细胞生存的一个机制^[6-7]。研究表明自噬在肿瘤的发生发展过程中起到了促进和抑制的双重

作用,在某些情况下可以互相转化^[8]。一方面,自噬通过对细胞内大分子物质和细胞器的再循环,发挥维持肿瘤细胞自身能量平衡的重要功能;另一方面,有潜在抑制肿瘤细胞生长的作用。但更多的研究表明自噬在多种肿瘤细胞中发挥着抗癌作用^[9]。

近年来,中药抗肿瘤越来越受到人们的关注,中药抗肿瘤与自噬的关系,也受到了学者们的重视^[10]。丹栀逍遥散是一首临床上治疗乳腺癌的常用方剂^[11],由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、丹皮和栀子药物组成。方中柴胡疏肝解郁,使肝气调达,为君药;当归、白芍养血柔肝,与柴胡配伍,既利肝之体,又适肝之用,恰适肝“体阴而用阳之性”,为臣药,白术、茯苓健脾益气,扶土抑木,丹皮和栀子清解郁热,具为佐药甘草调和药性,兼可助白术、茯苓健脾,为佐使药。

MDC 染色法是自噬分子水平的一种特异检测方法^[12]。位于自噬囊泡膜上抗胸腺细胞球蛋白(Atg8)与荧光染色剂 MDC 特异性结合,通过荧光显微镜观察,可见核周区域阳性显色。有研究表明 MDC 标识自噬泡,分析标识潜在的机制,发现 MDC 充当溶酶体剂,通过离子障机制集中在酸性的细胞部位,MDC 与酸性的和富含脂质的细胞部位相关,集中起来形成自噬泡^[13-14],MDC 作为极性探针溶剂,通过与细胞膜脂类相互作用,增强相对荧光强度。

作为最早在哺乳动物中发现的调控自噬性死亡的基因,Beclin1 基因是重要的自噬调节基因之一,参与哺乳动物自噬体早期形成的调控,能够介导自噬蛋白定位到前自噬小体^[15]。Beclin1 基因是 PI3K 通路的下游基因,对自噬起正调控作用^[16]。

实验研究结果表明,丹栀逍遥散含药血清作用 MCF-7 细胞后,能够显著抑制细胞增殖。MDC 染色证明了含药血清诱导荧光强度明显增强,初步说明丹栀逍遥散抑制自噬的发生。运用免疫印迹法检测自噬蛋白 Beclin1,丹栀逍遥散能够诱导 Beclin1 自噬蛋白表达显著上调。本实验证实了丹栀逍遥散含药血清诱导乳腺癌 MCF-7 细胞自噬性死亡可能是抑制其生长的主要机制。

[参考文献]

[1] 梁建,邓鑫,董成,等. 肿瘤治疗与进展[M]. 北京:人民军医出版社,2013:172.

[2] 冯雪,芹李松,冯小荣. 裴正学教授治疗乳腺癌经验体会[J]. 中医临床研究,2014,35(6):92-93.

[3] 陶竺娇,安佰平,吴煜. 吴煜教授舒肝养血法治疗乳腺癌经验[J]. 新中医,2014,46(3):26-28.

[4] 周晓. 丹栀逍遥散加减治疗乳腺增生 62 例[J]. 福建中医药,2008,39(5):38.

[5] 何民,王娜梅. 丹栀逍遥散合消瘿丸加减治疗乳腺增生 56 例[J]. 中医研究,2007,20(3):37-39.

[6] Arisan E D, Akkoc Y, Akyuz K G, et al. Polyamines modulate the roscovitine-induced cell death switch decision autophagy vs apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Mol Med Rep,2015,11(6):4532-4540.

[7] Lu J, Sun D, Gao S, et al. Cyclovirobuxine D induces autophagy-associated cell death via the Akt/mTOR pathway in MCF-7 human breast cancer cells [J]. J Pharmacol Sci,2014,125(1):74-82.

[8] Brech A, Ahlquist T, Lothe R A, et al. autophagy in tumour suppression and promotion [J]. Mol Oncol, 2009,3(4):366-375.

[9] Pimkina J, Murphy M E. ARF, autophagy and tumor suppression[J]. Autophagy,2009,5(3):397-399.

[10] 韩笑,李丹,林成仁,等. 自噬研究新进展[J]. 解放军医学杂志,2010,35(10):1267-1269.

[11] 卢雯平,姜翠红. 古方治疗乳腺癌的用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):133-134.

[12] Lepine S, Allegood J C, Park M, et al. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy[J]. Cell Death Differ,2011,18(2):350-361.

[13] Niemann A, Takatsuki A, Elsässer H P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe[J]. J Histochem Cytochem, 2000,48(2):251-258.

[14] Niemann A, Baltés J, Elsässer H P. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine [J]. J Histochem Cytochem, 2001,49(2):177-185.

[15] Lum J J, Bauer D E, Kong M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis[J]. Cell,2005,120(2):237-248.

[16] Clarke P. Control of apoptosis and autophagy by cellular signalling pathways[J]. FEBS J,2009,276(21):6049.

[责任编辑 聂淑琴]