

甘草查尔酮 B 对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

刘瑛¹, 王艳明¹, 阎新燕¹, 司玲玲¹, 高彩霞², 于丽娜², 郑秋生^{1,3*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;
2. 滨州医学院中西医结合学院, 山东烟台 264003; 3. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

[摘要] 目的:研究甘草查尔酮 B(licochalcone B, LCB)对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用,并初步探讨其作用机制。方法:取对数生长期 MCF-7 细胞按 6×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,台盼蓝拒染法检测 MCF-7 细胞的生长曲线并计算细胞倍增时间;取对数生长期 MCF-7 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,噻唑蓝(MTT)法检测甘草查尔酮 B(0, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24, 48, 72 h 后,对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用;取对数生长期 MCF-7 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,LCB(0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 48 h 后,显微镜下观察细胞形态;取对数生长期 MCF-7 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,LCB(0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 48 h 后,Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡形态;取对数生长期 MCF-7 细胞按 9×10^5 个/瓶接种于细胞培养瓶中,LCB(0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 48 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡率,实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测与凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax), Bcl-XL, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), Caspase-9 转录水平的变化。结果:与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LCB 组比较,LCB 能够以时间和浓度依赖性方式有效的抑制 MCF-7 细胞增殖,经 LCB 处理后的 MCF-7 细胞呈现出染色体倍增、核浓缩、核碎裂等典型凋亡形态学特征,细胞凋亡率随着 LCB 浓度的增加而升高,且 LCB 能明显下调 Bcl-XL, 上调 Bax, Caspase-3, Caspase-9 的表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:LCB 在体外能显著抑制 MCF-7 细胞增殖,具有诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用,其机制可能与药物上调 Bax, 下调 Bcl-XL, 激活由 Caspase-3, Caspase-9 介导的线粒体凋亡信号通路有关。

[关键词] 甘草查尔酮 B; 抑制增殖; 抗肿瘤; 人乳腺癌; MCF-7 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0106-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150106

Anti-proliferation Effects of Licochalcone B on Human Breast Cancer MCF-7 Cells

LIU Ying¹, WANG Yan-ming¹, YAN Xin-yan¹, SI Ling-ling¹,
GAO Cai-xia², YU Li-na², ZHENG Qiu-sheng^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education,
School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. College of Chinese Medicine and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

3. School of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-proliferation effect of licochalcone B (LCB) on the breast cancer MCF-7 cells, and discuss its action mechanism. **Method:** MCF-7 cells in logarithmic growth phase were inoculated into 6-well plates at a density of 6×10^4 cells/well; then Trypan blue staining was performed to obtain the cell growth curve and calculate cell doubling time. MCF-7 cells in logarithmic growth phase were inoculated into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well; then MTT assay was used to detect the anti-proliferation effect of LCB (0, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) after treatment for 24, 48, 72 h. MCF-7 cells in logarithmic growth phase were inoculated into 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well; then the morphological changes of MCF-

[收稿日期] 20150813(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471338)

[第一作者] 刘瑛, 硕士, 从事肿瘤药理研究, Tel:15886938336, E-mail:Ly302223@163.com

[通讯作者] * 郑秋生, 博士, 教授, 从事肿瘤药理研究, Tel:13999328286, E-mail:zqsyt@sohu.com

7 cells were observed under microscope after 48 h treatment by LCB (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). MCF-7 cells in logarithmic growth phase were inoculated into 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well; then the morphology of apoptosis was observed by Hoechst 33258 staining method. MCF-7 cells in logarithmic growth phase were inoculated into cell culture flask at a density of 9×10^5 cells/flask; then after 48 h treatment by LCB (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), apoptosis rate was determined by flow cytometry, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method was used to detect the changes in Bcl-XL, Bax, Caspase-3 and Caspase-9 transcriptional levels. **Result:** As compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, LCB effectively inhibited MCF-7 cell lines proliferation in a concentration-dependent and time-dependent manner; LCB treatment increased apoptosis rate of MCF-7 with obvious morphological changes, exhibiting chromosomes margination, nuclear condensation, nuclear fragmentation and other morphological features. Cell apoptosis induced by licochalcone B exhibited a concentration-dependent manner; licochalcone B significantly down-regulated the expression levels of Bcl-XL and up-regulated the expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** LCB could significantly inhibit proliferation and induce apoptosis of breast cancer MCF-7 cells, and the mechanism may be associated with up-regulating Bax, down-regulating Bcl-XL expression levels, and activating Caspase-3/Caspase-9-mediated mitochondrial apoptosis signaling pathways.

[**Key words**] licochalcone B; proliferation; antitumor; human breast cancer; MCF-7 cells

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一,发病率占各种恶性肿瘤的 7% ~ 10%, 每年约 50 万人死于乳腺癌^[1]。最新统计数据显示,美国女性患乳腺癌的比率占女性新发恶性肿瘤的 30%, 排名女性恶性肿瘤发病率第一位^[2], 在我国乳腺癌的发病率也呈逐年上升趋势, 已被列为我国肿瘤防治的重点之一^[3]。由此可见, 无论是国内还是国外, 乳腺癌的发病率都呈现出居高不下的现象。乳腺癌的发病机制目前仍不清楚, 有文献报道, 乳腺癌的发生发展是一个多因素、多步骤共同参与的过程, 既与外界因素有关, 也与患者机体内部因素有关, 如癌基因的激活或抑癌基因的失活等^[4]。甘草查尔酮是新发现的一种雌激素黄酮, 又可分为多种不同类型^[5]。而甘草查尔酮 B 是从甘草属植物^[6]中得到的一种查尔酮类化合物, 具有广泛的药理活性。如抗 HIV 病毒^[7]、清除氧自由基和抗氧化作用^[8]、抗炎活性^[9]、抗肿瘤^[10]等。其抗肿瘤生物活性日益受到人们重视, 但其具体抗肿瘤机制仍有待研究。本研究将探讨甘草查尔酮 B 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌细胞 MCF-7 中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物及试剂 甘草查尔酮 B (纯度 > 98%, 上海丽臣生物有限公司, 批号 20140318), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 1342967), 胰蛋白酶和二甲基亚砜 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 1030E048,

51596BPV), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司, 批号 140130), 总 RNA 快速抽提试剂盒 (上海生工生物技术有限公司, 批号 13112605Y), cDNA 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 00170212), 实时荧光定量 SYBR Green 扩增试剂盒 (德国凯杰公司, 批号 148041276), 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 3131 型二氧化碳细胞培养箱和 3001 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), BDS200-PH 型普通生物倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司), MIC00266 型倒置荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司), AR-2140 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 5424R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司), C1000 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 台盼蓝拒染法^[11]绘制细胞生长曲线 收集对数生长期细胞, 计数并调整细胞悬液的密度为 6×10^4 个/mL, 每孔 1 mL 接种于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养, 每天取 3 个孔, 分别收集其细胞, 经 0.4% 台盼蓝染色后, 显微镜下计活细胞和死细胞的数目, 求平均数。以时间为横坐标以活细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线, 并计算细胞倍增时间 T 。

$$T = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$$

式中 t 为计数时间间隔, N_t 为 t 时间的细胞数, N_0 为初期细胞数

2.2 噻唑蓝 (MTT) 法测定细胞抑制率 收集对数

生长期细胞,计数并调整细胞悬液密度为 1×10^5 个/mL,每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中,置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。次日加不同浓度(0,10,20,40,60,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的甘草查尔酮 B,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草查尔酮 B 为空白组,每组设 5 个平行孔,用添加完全培养液的 5 个无细胞孔作为本底空白组,置于 CO_2 培养箱中继续培养 24,48,72 h 后,每孔轻轻地加入 MTT 20 μL ,继续培养 4 h,弃培养基,每孔加 DMSO 150 μL ,摇床低速振荡 10 min,使结晶完全溶解,酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度 $A^{[12]}$ 。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{给药组 } A - \text{空白组 } A}{\text{对照组 } A - \text{空白组 } A} \times 100\%$$

2.3 细胞形态的观察 收集对数生长期细胞,计数并调整细胞悬液密度为 2×10^5 个/mL,每孔 1 mL 接种于 6 孔板中,置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。培养 24 h 后,加甘草查尔酮 B 使其终浓度为 0,20,40,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,药物作用 48 h 后,在倒置显微镜下观察其形态变化并拍照。

2.4 Hoechst 33258 荧光法观察细胞凋亡形态 收集对数生长期细胞,计数并调整细胞悬液密度为 2×10^5 个/mL,每孔 1 mL 接种于 6 孔板中,置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。培养 24 h 后,加甘草查尔酮 B 使其终浓度为 0,20,40,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,制作涂片,用 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min

后,按常规方法进行 Hoechst 33258 标记^[13],荧光显微镜下观察细胞凋亡并拍照。

2.5 流式细胞技术检测细胞的凋亡率 收集对数生长期细胞,计数并调整细胞悬液密度为 3×10^5 个/mL,每 3 mL 接种于细胞培养瓶中,置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。培养 24 h 后,加甘草查尔酮 B 使其终浓度为 0,20,40,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。1 000 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞样品,收集经不同甘草查尔酮 B 浓度处理 48 h 后的细胞,用预冷 PBS 洗 1 遍后置 0 $^\circ\text{C}$ 水浴中,加 490 μL 结合缓冲液后再加 Annexin V 和 PI 各 5 μL ,轻轻混匀细胞,15 min 后进行流式细胞仪检测^[14]。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测 mRNA 水平上的表达差异 分别提取总 RNA,定量后进行逆转录聚合酶链反应式反应,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,每组目的基因及内参基因各设 3 个复孔,加入 PCR 反应液总体积 25 μL 。于 PCR 仪上进行反应,参数设置为 95 $^\circ\text{C}$ 5 min,预变性;95 $^\circ\text{C}$ 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 30 s,共 40 个循环,再 72 $^\circ\text{C}$ 终末延伸 5 min。反应结束后计算循环阈值(C_t),采用比较 $\Delta\Delta C_t$ 值法, $C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}} = \Delta C_t$; $\Delta C_{t\text{处理样本}} - \Delta C_{t\text{对照样本}} = \Delta\Delta C_t$; 计算 A 值 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$,A 值为实验组与空白组比较,mRNA 相对变化倍数,按空白组比例为 100% 计算实验组中两者比值。引物合成均由上海生工生物工程有限公司完成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primer

目的基因	上游	下游
GAPDH	5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
Bcl-XL	5'-GCATATCAGAGCTTTGAACAGGT-3'	5'-TAGGTGCTCATTACAGTAAAGTGG-3'
Bax	5'-ACGAAGTGGACAGTAACATGGAG-3'	5'-CAGTTTGCTGGCAAAGTAGAAAAG-3'
Caspase-3	5'-CTGGACTGTGGCATTGAGAC-3'	5'-ACAAAGCGACTGGATGAACC-3'
Caspase-9	5'-AGGCTCGCTAATGCTGTTTC-3'	5'-GCAAGATAAGCGAGGTTGAG-3'

2.7 统计学分析 所有实验设 3 个平行组或重复 3 次,实验数据采用 SPSS 19.0 软件和 Orginpro 8.0 软件分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 台盼蓝拒染法绘制细胞生长曲线 MCF-7 细胞在培养 24,48,72,96,120,144,168,192 h 后进行台盼蓝染色后进行细胞计数,结果显示,细胞在培养 48 h 后进入对数期,96 h 后进入稳定期。根据细胞倍增时间公式,其中 N_t 取培养 120 h 时的细胞数 101.9×10^4 个/mL, N_0 取培养 24 h 时的细胞数

12.15×10^4 个/mL,由此得出 $T = 31$ h,即 MCF-7 细胞的倍增时间为 31 h。见图 1。

3.2 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 培养细胞进入对数生长期后,分别加入不同浓度甘草查尔酮 B (0,10,20,40,60,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)继续培养 24,48,72 h,抑制率见图 2。结果与空白组比较,随着甘草查尔酮 B 浓度的增加和时间的延长,MCF-7 细胞抑制率逐渐升高,且具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.3 细胞形态学变化

3.3.1 相差显微镜下观察细胞 显微镜下观察可

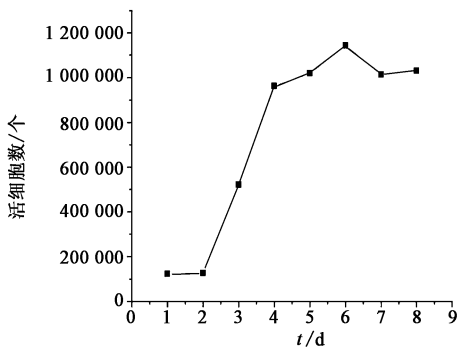


图 1 台盼蓝拒染法绘制 MCF-7 细胞生长曲线
Fig. 1 Trypan blue staining draws cell growth curve

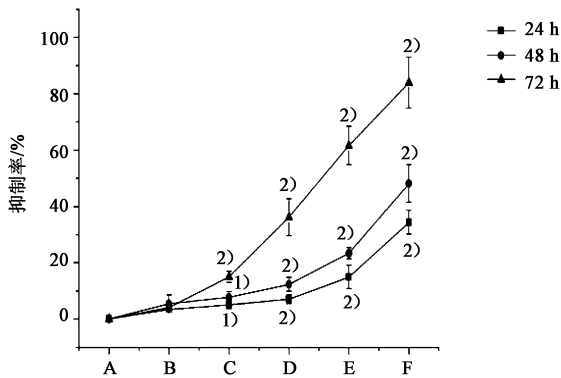


图 2 甘草查尔酮 B 在不同时间下对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)
A. 空白组; B. 甘草查尔酮 B $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 甘草查尔酮 B $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 甘草查尔酮 B $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 甘草查尔酮 B $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. 甘草查尔酮 B $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 2 甘草查尔酮 B 在不同时间下对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of licochalcone B (LCB) on inhibition of proliferation in MCF-7 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

见,空白组细胞呈多边形,体积较大,胞体明亮,细胞间排列紧密,贴壁数量多;给药组细胞逐渐皱缩,形态不规则,细胞间隙增大,体积变圆,细胞逐渐漂浮,细胞数量骤减,最后可见大量的细胞碎片和漂浮的死亡细胞。见图 3。

3.3.2 Hoechst 33258 荧光法观察细胞 荧光显微镜下观察,空白组细胞染色质均匀,核形态规则,为圆形或椭圆形,呈弥散均匀的蓝色荧光。给药组细胞形态随之发生变化,染色质分布不均匀,部分细胞可见凋亡特征性改变,逐渐出现细胞核固缩,边缘化,染色体边集在核膜内侧显新月体形、核碎裂。与 MTT 实验结果较为一致。见图 4。

3.4 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响 AnnexinV/PI 双染法结果显示,不同浓度甘草查尔酮 B($20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞总凋亡率分别为 $(6.57 \pm 3.90)\%$, $(54.80 \pm 5.03)\%$,

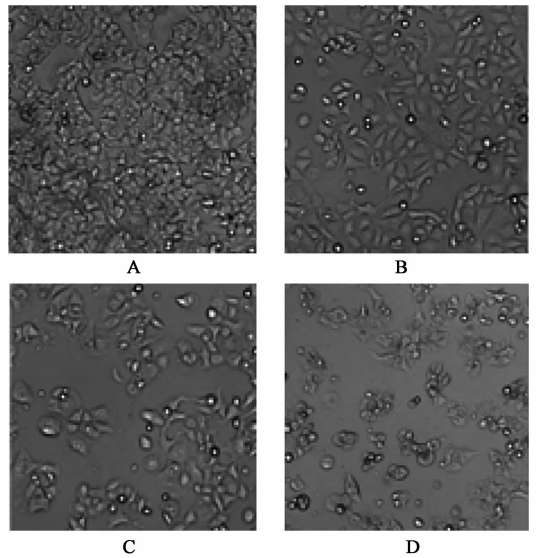


图 3 甘草查尔酮 B 处理 48 h 后 MCF-7 细胞的形态变化($\times 100$)
A. 空白组; B. 甘草查尔酮 B $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 甘草查尔酮 B $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 甘草查尔酮 B $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 4~6 同)

图 3 甘草查尔酮 B 处理 48 h 后 MCF-7 细胞的形态变化($\times 100$)
Fig. 3 Apoptotic effect of LCB on MCF-7 cells($\times 100$)

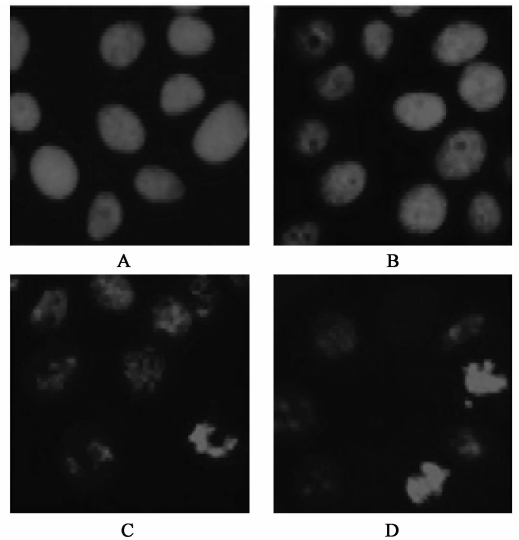
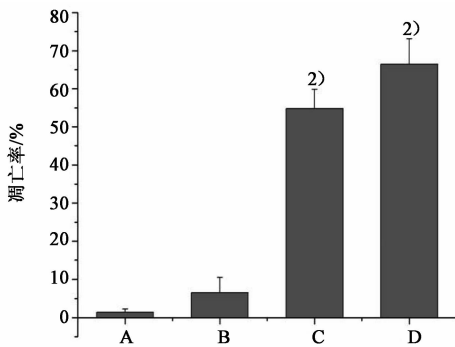


图 4 甘草查尔酮 B 处理 48 h 后 MCF-7 细胞的形态变化
(Hoechst, $\times 400$)

Fig. 4 Apoptotic effect of LCB on MCF-7 cells(Hoechst, $\times 400$)

$(66.47 \pm 6.60)\%$, 和空白组 $(1.35 \pm 0.86)\%$ 比较呈明显浓度依赖性,上述结果与荧光显微镜和相差显微镜下观察到的结果相一致,即不同浓度甘草查尔酮 B($0, 20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于 MCF-7 细胞 48 h 后,随着浓度增高凋亡细胞数目增加,呈明显浓度的依赖性,这也就解释了本研究所述甘草查尔酮 B 抗增殖效果的原因。见图 5。

3.5 对 MCF-7 细胞 Bcl-XL, Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达的影响 MCF-7 细胞经甘草查尔酮 B ($0, 20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞 48 h



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 6 同)

图 5 甘草查尔酮 B 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of LCB on apoptotic rates in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

后,实时荧光定量 PCR 测定凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-XL, Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。与空白组比较, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草查尔酮 B 可显著抑制抗凋亡蛋白 Bcl-XL mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 并上调 Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 6。

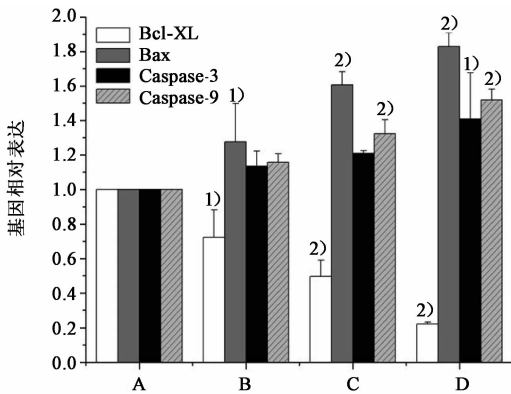


图 6 甘草查尔酮 B 对 MCF-7 细胞 Bcl-XL, Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of LCB on Bcl-XL, Bax, Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

随着现代医学技术的发展及肿瘤治疗理念的不断更新,使得以根治性手术为传统的乳腺癌治疗模式发生了根本性的变革,从以往单纯手术治疗改变为多学科的合理综合治疗。临床上治疗乳腺癌主要包括手术治疗、内分泌治疗,分子靶向治疗等。其中分子靶向治疗日益受到重视,成为研究热点。多靶点是中药的特点之一,且从中药中寻找发高效、低毒、多靶点的抗癌药物成为近年来国内外研究热点之一^[15]。从甘草属中提取分离出的甘草查尔酮 B, 对人膀胱癌、人宫颈癌、高转移性小鼠黑色素瘤和小鼠黑色素瘤等多种肿瘤细胞具有显著的增殖抑制作用,呈现出一定的抗肿瘤效应^[16-17]。冉芳等^[18]研究

发现,甘草查尔酮 B 能通过降低 B16F0 细胞线粒体膜电势,下调 Bcl-2/Bax,上调 Caspase-3, Caspase-9 的表达诱导 B16F0 细胞凋亡。陈冲等^[11]研究表明,甘草查尔酮 B 能通过诱导 T24 S 期阻滞,降低 S 期相关周期蛋白 (CyclinA) 及蛋白激酶 (CDK1, CDK2) mRNA 的表达,在蛋白水平上下调 Bcl-2,上调 Bax 和 Caspase-3 的表达,裂解 PARP 蛋白;并且在整体动物水平上能够抑制鼠膀胱肿瘤细胞的增殖,诱导其凋亡。除此之外,甘草查尔酮 B 还能抑制 T24 细胞转移,显著降低基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在 mRNA 及蛋白水平的表达,但对 MMP-2 表达无明显影响;能显著抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 表达,但对 AP-1 表达无明显影响^[17]。而甘草查尔酮 B 对人乳腺癌细胞是否有抑制作用,值得进一步深入研究。

本研究采用 MTT 法检测甘草查尔酮 B 对 MCF-7 细胞增殖抑制作用,结果显示甘草查尔酮 B 能够抑制 MCF-7 细胞增殖,具有时间和浓度依赖性。目前监测细胞凋亡的方法很多,但一般认为形态学变化是判断凋亡的基础。通过倒置显微镜和荧光显微镜观察细胞形态,与空白组比较,给药组细胞增殖变慢,细胞间隙增大,脱壁细胞增多并漂浮在培养基中;染色质分布不均匀,部分细胞逐渐出现细胞核固缩,边缘化,染色体边集在核膜内侧显新月体形、核碎裂等凋亡特征。AnnexinV/PI 双染法结果显示随着给药浓度增大,细胞凋亡率增加,呈明显浓度依赖性,这也就解释了本研究所述甘草查尔酮 B 抗增殖效果的原因。除此之外,还检测到甘草查尔酮 B 下调 Bcl-XL,上调 Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 的表达,从而推测,甘草查尔酮 B 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用可能是通过线粒体途径介导细胞凋亡。虽然甘草查尔酮 B 对上游的受体及其他通路的影响还不清楚,但是本研究结果表明,更深入地探讨其诱导细胞凋亡的分子机制是十分有价值的,甘草查尔酮 B 有可能成为治疗恶性肿瘤的候选化合物。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Desantis C, Siegel R, Bandi P, et al. Breast cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(6): 409-418.
- [3] 杨玲,李连弟,陈育德,等. 中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测 [J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 438-440.
- [4] 江慧,刘晓红,曹志新,等. 肝细胞癌中 Wnt-5a、Ror2

- 蛋白的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(6): 652-664.
- [5] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.
- [6] 王巧娥, 任虹, 曹学丽. 甘草研究开发与利用现状[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 290-295.
- [7] Hatano T, Yasuhara T, Fukuda T, et al. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1989, 37(11): 3005-3009.
- [8] Fu Y, Chen J, Li Y J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice[J]. Food Chem, 2013, 141(2): 1063-1071.
- [9] Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, et al. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF-kappaB p65 in LPS signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(4): 499-507.
- [10] Yuan X, Li T, Xiao E, et al. Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 3(65): 242-251.
- [11] 陈冲, 焦宁, 徐瑞荣, 等. 台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J]. 中国医药导报, 2013, 10(12): 24-26.
- [12] Dai Z J, Gao J, Kang H F et al. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) enhances radiosensitivity in pancreatic carcinoma cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 19(7): 149-159.
- [13] Jung J I, Lim S S, Choi H J, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17(10): 689-696.
- [14] Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. Nature, 1990, 348(6299): 334-336.
- [15] 王坚. 秋水仙素对人乳腺癌 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞的影响及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [16] 冉芳, 杨帆, 杨新惠, 等. 甘草查尔酮 B 体外细胞毒作用研究 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2013, 31(3): 355-358.
- [17] Zhao H, Yuan X, Jiang J, et al. Antimetastatic effects of licochalcone B on human bladder carcinoma T24 by inhibition of matrix metalloproteinases-9 and NF-κB activity [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014, 115(6): 527-533.
- [18] 冉芳, 王爱华, 袁萱, 等. 甘草查尔酮 B 诱导小鼠黑色素瘤细胞凋亡作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 220-224.

[责任编辑 周冰冰]