

银杏叶提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、 凋亡及 Caspase-3 表达的影响

赵晶丽^{1*}, 史琳²

(1. 吉林工业职业技术学院, 吉林 132013; 2. 吉林省科学技术信息研究所, 长春 130021)

[摘要] 目的:探讨银杏叶提取物(EGB)对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及半胱氨酸蛋白酶(Caspases)-3 表达的影响。方法:将质量浓度为 0, 10, 20, 40, 80, 160 mg·L⁻¹ 的 EGB 作用于体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞上, 培养 24 h 或 48 h, 然后应用四甲基偶氮唑蓝染色法(MTT 法)检测细胞增殖; Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 Caspases-3 蛋白表达。结果:EGB 对 MCF-7 细胞的体外增殖具有抑制作用, 量效关系显著, 与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$), 半数抑制浓度(IC₅₀)为 83.65 mg·L⁻¹。经流式细胞仪检测表明, EGB 能使 MCF-7 细胞 G₀-G₁ 期逐渐增加, G₂-M 期和 S 期逐渐减少, 并且随着质量浓度的增加, MCF-7 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EGB 能增强 MCF-7 细胞 Caspases-3 蛋白的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈浓度依赖性。结论:EGB 能有效抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspases-3 蛋白表达, 诱导 MCF-7 细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖。

[关键词] 银杏叶提取物; 乳腺癌; 增殖; 凋亡; 半胱氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0262-04

[doi] 10.11653/syfy2013170262

Effects of *Ginkgo biloba* Extract on Proliferation, Apoptosis and Caspase-3 Expression in Human Breast Cancer MCF-7 Cells

ZHAO Jing-li^{1*}, SHI Lin²

(1. Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China;
2. Institute of Scientific and Technical Information of Jilin, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Ginkgo biloba* extract (EGB) on proliferation, apoptosis and Caspase-3 expression in human breast cancer MCF-7 cells. **Method:** The human breast cancer MCF-7 cells cultivated *in vitro* were treated with 0, 10, 20, 40, 80, 160 mg·L⁻¹ of EGB, cultured for 24 h or 48 h. The 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to measure the cell proliferative effect. The annexin V/PI double staining analysis by flow cytometry was used to evaluate apoptotic

[收稿日期] 20130120(002)

[通讯作者] * 赵晶丽, 讲师, 硕士, 从事中药相关教学与研究, Tel: 0432-64644341, E-mail: jinglizhao2005@126.com

- [5] 郭敏, 李佃贵. 化解毒含药血清对大鼠肝星状细胞增殖及细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 263.
- [6] 李佃贵, 李刚, 刘金里, 等. 以浊毒立论治疗肝硬化[J]. 四川中医, 2006, 24(2): 35.
- [7] Shen X H, Chen W F, Li H H, et al. Effects of dietary supplementation with vitamin E and selenium on rat hepatic stellates cell apoptosis [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(32): 4975.
- [8] 陈月圆, 李典鹏, 黄永林, 等. 醉草鱼苷 IV 对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 203.
- [9] 史红阳, 许君望, 任晓侠. 木黄酮对培养肝星状细胞增殖及脂质过氧化的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(11): 2066.
- [10] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 实验动物, 2010, 5: 52.

[责任编辑] 聂淑琴

rate and the cell cycle. The expression of Caspases-3 protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** EGB could inhibit the proliferation of MCF-7 cells *in vitro*, and concentration-effect relationship was significant ($P < 0.01$). 50% inhibition concentration (IC_{50}) of MCF-7 was $83.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The flow cytometry test indicated that EGB could make MCF-7 cells G_0 - G_1 phase gradually increasing, G_2 -M period and S phase reduce gradually and with the increase of the concentration, MCF-7 cell apoptosis rate increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). EGB could enhance MCF-7 cells Caspases-3 protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and with the concentration dependent. **Conclusion:** EGB could effectively restrain human breast cancer MCF-7 cells Caspases-3 protein expression, induction MCF-7 cell apoptosis, inhibiting tumor cell proliferation.

[**Key words**] *Ginkgo biloba* extract; breast cancer; proliferation; apoptosis; Caspases-3

银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba*, EGB)是从我国传统名贵中药材银杏中提取的有效活性成分,起初用于治疗心、脑血管疾病广泛应用于临床,随着对其研究的不断深入,现已证明,其对肿瘤细胞的增殖有抑制作用,能诱导多种肿瘤细胞凋亡,并能增强化疗药物的抑瘤作用^[1-3],但其对乳腺癌的抑制作用及其机制研究国内尚未见报道。半胱氨酸蛋白酶(Caspases)家族的激活是肿瘤细胞凋亡发生的重要环节之一,其中 Caspases-3 是该家族中最关键的效应分子,被认为是凋亡的执行者,其与乳腺癌的发生、发展及患者预后密切相关^[4-5]。本研究通过观察 EGB 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及 Caspase-3 表达的影响,探讨 EGB 可能的抗肿瘤作用机制,为其进一步临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 银杏叶提取物(EGB761,商品名金纳多,德国威玛舒培博士药厂生产,批号1710711)。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(批号100806,购自北京宝赛生物技术有限公司),RPMI-1640 培养液(批号110310)、胎牛血清(批号110316,美国 Gibco 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,批号110210)、二甲基亚砜(批号20101214)、琼脂糖(批号100915,美国 Amresco 公司),碘化丙啶(PI,批号100619,美国 Sigma 公司),Caspases-3 酶联免疫检测试剂盒(批号101024,美国 Promeg 公司)。

1.2 细胞株 乳腺癌 MCF-7 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。用含 10% 胎牛血清、2% 的谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C,5% CO_2 ,饱和湿度条件下培养。

1.3 仪器设备 NAPCO 8000DH 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司); IX-70 型倒置显微镜(Olympus); Forma Class II A2 型生物安全柜(美国

Thermo 公司);FACSIO1 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); 128C-400 型酶标仪(奥地利 CliniBi 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞制成 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL ,培养 24 h。然后加入 EGB 100 μL ,使其终浓度分别为 0,10,20,40,80,160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设对照孔和调零孔,每组 6 个复孔。继续培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),再培养 4 h 后吸去全部上清液,然后每孔加入 200 μL 二甲基亚砜,振荡摇匀终止反应,使用酶标仪在 490 nm 处测吸光度(A)。计算增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 A} - \text{药物组 A}) / \text{对照组 A} \times 100\%$$

2.2 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 MCF-7 细胞制成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 12 孔培养板中,每孔 2 mL,加入 EGB 使其终浓度分别为 0,10,40,160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养 48 h 后,调整待测细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 1 mL 细胞悬液,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 °C 离心 10 min 弃上清,加入 1 mL 冷 PBS 重悬细胞,再重复离心,弃上清,加入 200 μL 结合缓冲液重悬,再加入 10 μL Annexin V-FITC,5 μL PI,混匀,室温避光孵育 15 min,加入 300 μL 结合缓冲液,立即用流式细胞仪进行检测细胞凋亡率并分析细胞周期。

2.3 Caspases-3 蛋白表达检测 取对数生长期的 MCF-7 细胞制成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL 。加入 EGB 100 μL ,使其终浓度分别为 0,10,40,160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设对照孔,每组 6 个复孔,培养 24 h。然后每孔加入混合后的 Caspases-3 试剂 100 μL ,再孵育 3 h。使用酶标仪在 405 nm 处测 A,空白孔作对照,确定 Caspases-3 蛋白表达程度。

2.4 统计学方法 用 SPSS 15.0 软件进行统计学

处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验或单因素方差分析, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 EGB 不同浓度对 MCF-7 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用, 并且随着 EGB 浓度的增高, 抑制作用也在增强, 量效关系显著。各剂量组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$); 经 Logit 方法计算 EGB 与 MCF-7 细胞作用 48 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $83.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 EGB 与 MCF-7 细胞作用 48 h 对细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 /%
对照	-	0.815 ± 0.047	-
EGB	10	$0.623 \pm 0.026^{2)}$	23.56
	20	$0.541 \pm 0.028^{2)}$	33.62
	40	$0.437 \pm 0.030^{2)}$	46.38
	80	$0.405 \pm 0.031^{2)}$	50.31
	160	$0.372 \pm 0.029^{2)}$	54.36

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响 EGB 使 MCF-7 细胞 G_0 - G_1 期逐渐增加, G_2 -M 期和 S 期逐渐减少, 并且随着质量浓度的增加, MCF-7 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 EGB 与 MCF-7 细胞作用 48 h 对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0 - G_1 期/%	G_2 -M 期/%	S 期 /%	凋亡率 /%
对照	-	47.47	8.01	44.52	9.68
EGB	10	54.07	7.05	38.88	19.96
	40	57.78	5.83	36.39	22.72 ¹⁾
	160	62.48	4.49	34.03	25.53 ²⁾

3.3 对 MCF-7 细胞 Caspases-3 蛋白表达的影响 EGB 不同浓度均能增强 MCF-7 细胞 Caspases-3 蛋白的表达, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性。见表 3。

4 讨论

乳腺癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,

表 3 EGB 与 MCF-7 细胞作用 24 h 对 Caspases-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspases-3 / $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	22.98 ± 1.06
EGB	10	$24.87 \pm 1.45^{1)}$
	40	$25.46 \pm 1.32^{2)}$
	160	$30.89 \pm 1.68^{2)}$

其发病机制及治疗一直是临床亟待解决的重要课题, 虽经多年研究, 目前仍未找到有效的治疗手段。由于中药具有多途径、多靶点、毒副作用低等优点, 运用中药防治肿瘤越来越受到广大临床医师和患者的青睐, 从中药中寻找抗乳腺癌药物也成为研究热点之一。EGB 是从银杏叶中分离纯化的有效组分, 主要含有黄酮和内酯类化合物, 临床主要用于心、脑血管及外周循环障碍性疾病^[6]。近年来, 有研究证明 EGB 具有一定的抗肿瘤活性, 对胃癌^[7]、肝癌^[8]、卵巢癌^[9]等均有一定的杀伤作用, 但其抗肿瘤作用的确切机制尚不十分明确。本研究通过体外实验观察了 EGB 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用, 结果表明 EGB 不同浓度对 MCF-7 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用, 并且量效关系显著 ($P < 0.01$), IC_{50} 为 $83.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

有研究表明肿瘤的发生、发展不仅与细胞的增殖分化异常有关, 还与其凋亡障碍有关^[10]。本研究采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测发现, EGB 促进 MCF-7 细胞凋亡的同时, 也使 MCF-7 细胞周期分布发生明显改变。EGB 作用 48 h 后, 停滞于 G_0 - G_1 期的细胞比例明显增加, 而进入 S 期的细胞比例明显下降, 并且这种阻滞效应具有一定的剂量依赖性。提示 EGB 对乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用可能是由于 EGB 改变了细胞周期的分布, 使多数细胞停滞于细胞分化期即 G_1 期, 阻止细胞向 S 期转化, 从而减少了 DNA 合成和有丝分裂并促进其分化。

Caspases-3 是 Caspases 家族的重要成员, 对凋亡标记物的降解活性最强, 是细胞凋亡的最关键效应分子, 被认为是凋亡的执行人, 当细胞接受凋亡信息时, 经过一系列反应激活 Caspases-3, 活化的 Caspases-3 通过激活、破坏某些酶, 或破坏细胞骨架蛋白等方式, 最终导致特征性 DNA 断裂, 从而介导肿瘤细胞发生凋亡。有研究表明 Caspases-3 表达下调或缺失可能是乳腺癌发生和耐药的重要机制^[11]。

但 EGB 是否能够通过抑制 Caspases-3 活性实现抗乳腺癌作用目前报道不多。本研究显示,EGB 能增强 MCF-7 细胞 Caspases-3 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并呈剂量依赖性,推测这可能是 EGB 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的机制和抗肿瘤作用的分子基础。

综上所述,EGB 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖有明显的抑制作用,对其凋亡有明显的促进作用,同时能明显改变 MCF-7 细胞周期分布,推测其原因,可能与 Caspases-3 表达下调有关。由于时间和财力所限,本项目只对 EGB 体外抗乳腺癌活性和简单机制进行了初步研究,更复杂的作用机制及其安全性(治疗指数等)评价还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Kang J W, Kim J H, Song K, et al. Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (1):S77.
- [2] Chen X H, Miao Y X, Wang X J, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract EGb761 on human colon adenocarcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 27(3/4):227.
- [3] 潘洪平. 银杏叶制剂药理作用和临床应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(2):93.
- [4] 马兆生,戴岳楚,谢伯剑,等. HIF-1 α 与 Caspase-3 在乳腺癌中的表达及临床病理意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(11):2216.
- [5] 王亚利,王中卫,王西京,等. Livin、Survivin 在乳腺癌中的表达及其与 Caspase-3 和临床病理的相关性 [J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2009, 30 (4):466.
- [6] Rodriguez M, Ringstad L, Schafer P, et al. Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb761) in cardiovascular high risk patients [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 192(2):438.
- [7] Agha A M, El-Fattah A A, Al-Zuhair H H, et al. Chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* extract against benzo (a) pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2001, 20 (1):39.
- [8] Dias M C, Rodrigues M A, Reimberg M C, et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 173 (1):32.
- [9] 姜伟,徐丛剑,丛青,等. 银杏内酯 B 下调切除修复交叉互补基因 1 表达及增加耐药卵巢癌细胞对顺铂敏感性体外研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (3):615.
- [10] Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, et al. Adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in lu-65 human lung cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(1):210.
- [11] 黑静雅,黄凌燕,张建中. Caspase-3、bcl-2 蛋白在乳腺癌中表达的临床病理研究 [J]. *宁夏医学杂志*, 2010, 32(1):17.

[责任编辑 聂淑琴]