

阳和汤血清增强阿霉素对 MCF-7 肿瘤细胞抑制作用机制的研究

康红钰¹, 王雁梅¹, 杜钢军^{2*}, 林海红²

(1. 漯河医学高等专科学校药理教研室, 河南 漯河 462002;

2. 河南大学药学院药理教研室, 河南 开封 475001)

[摘要] 目的: 研究小鼠阳和汤血清增强阿霉素对 MCF-7 肿瘤细胞抑制作用的机制。方法: 用 $1.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阳和汤按小鼠体重 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续 ig 7 d, 末次给药 1 h 采血, 分离得含阳和汤 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血清 (YHDS)。用 SMY 培养细胞 24 h, 5-溴脱氧尿核苷 (BrdU) 掺入法检测细胞增殖, 软琼脂克隆形成法检测细胞分化, Western blotting 检测 Bax/Bcl-2 表达, 原位末端标记检测细胞凋亡, 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位。结果: 小鼠阳和汤血清能促进阿霉素引起的 MCF-7 细胞生长抑制 (抑制率为 $61.25\% \pm 1.66\%$, $P < 0.05$), 上调 MCF-7 细胞 Bax/Bcl-2 表达比率, 增加细胞凋亡。小鼠阳和汤血清对 MCF-7 细胞有诱导分化作用 (与对照组比较克隆数减少了 68.4% , $P < 0.05$)。结论: 阳和汤血清有增强阿霉素对 MCF-7 肿瘤细胞抑制作用, 其机制与易化肿瘤细胞凋亡和诱导肿瘤细胞分化有关。

[关键词] 阳和汤血清; 阿霉素; MCF-7 细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0196-04

Promotion of Yanghe Decoction-containing Serum for Inhibitory Effect of Doxorubicin on MCF-7 Cell and the Related Mechanism

KANG Hong-yu¹, WANG Yan-mei¹, DU Gang-jun^{2*}, LIN Hai-hong²

(1. Department of Pharmacology, Luohe Medical College, Luohe 462002, China;

2. Department of Pharmacology, Pharmacy College of Henan University, Kaifeng 475001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the promotion mechanism of Yanghe decoction-containing serum (YHDS) for inhibitory effect of doxorubicin on MCF-7 cell. **Method:** Yanghe decoction ($1.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was administrated orally to 20 mice at a volume of $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($21.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 7 days. For the control mouse, water was administered in the same way. Blood samples were collected for all the mice by carotid artery cut at 1 hour after the last administration, and YHDS ($1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was obtained. Cells proliferation was tested by incorporation of BrdU, cell differentiation was assayed by colonogenic potential in soft agar, the Bax/Bcl-2 expression were assessed by western blotting, Cell apoptosis was examined by TUNEL and the mitochondrial membrane potential was examined by flow cytometry. **Result:** YHDS could obviously induce promotion for growth inhibition ($61.25\% \pm 1.66\%$, $P < 0.05$) and drop the mitochondrial membrane potential induced by doxorubicin in MCF-7 cells, up-regulate ratio of Bax/Bcl-2 expression, and increase cell apoptosis. In addition, YHDS could induce MCF-7 cell differentiation (clones reduced 68.4% compared to normal cell group, $P < 0.05$). **Conclusion:** YHDS is able to promote inhibitory effect of doxorubicin on MCF-7 cells, its mechanism could be associated with sensitization of apoptosis and

[收稿日期] 20101231(008)

[基金项目] 河南大学省部共建项目(SBGJ090704)

[第一作者] 康红钰, 硕士, 副教授, 从事药理学教学及中药药理学研究, Tel:13939588852, E-mail:khyxm@126.com

[通讯作者] * 杜钢军, 博士后, 教授, 从事中药药理学与肿瘤药理学研究, Tel:0378-5956970, E-mail:dugangjun@henu.edu.cn

differentiation induced by YHDS.

[**Key words**] Yanghe decoction-containing serum; doxorubicin; MCF-7 cells; apoptosis

阳和汤由熟地黄、鹿角胶、白介子、肉桂、麻黄、炮姜、甘草组成,是清代名医王洪绪所创,具有温阳补血、散寒通滞之功,主治阴疽病症。近来研究报道阳和汤有抗肿瘤作用,可以抑制小鼠 S180 及 HepA 实体瘤的生长^[1],临床上对骨肿瘤和肿瘤骨转移性疼痛有治疗作用^[2-3]。为给阳和汤在治疗肿瘤方面提供充分依据,我们采用中药血清药理学方法,对阳和汤的诱导肿瘤细胞分化、联合化疗药物增效减毒作用进行了实验研究。

1 材料

1.1 动物 健康雄性昆明小鼠(SPF级)40只,体重22~25g,由河南医学实验中心提供,生产许可证SYXK(豫)2005-0012,在温度(22±2)℃,相对湿度65%~70%,光照周期12h:12h环境中适应饲养1周后实验。

1.2 细胞株 MCF-7细胞,购自上海细胞研究所,河南大学药学院药理教研室传代保存。

1.3 试剂 青霉素(批号S0901714)、链霉素(批号090201,华北制药集团产品);阿霉素(批号051108,上海华联制药有限公司产品),胎牛血清(批号080906,杭州四季青生物工程材料研究所产品);5-溴脱氧尿核苷(BrdU)试剂盒(批号20080512)、羊抗兔IgG-HRP(批号13786448),华美生物技术公司产品;DMEM培养基(批号1280330)、RPMI1640培养基(批号1243098),Gibco公司;抗BrdU单克隆抗体、低熔点琼脂糖、原位末端标记脱氧核苷转移酶介导的地高辛配体(TUNEL,批号KGA702,凯基生物产品)、多聚赖氨酸(批号127k438)、抗地高辛配基荧光素,中杉金桥产品;兔抗Bcl-2单克隆抗体、兔抗Bax单克隆抗体、兔抗β-actin单克隆抗体(批号RSC468),Santa Cruz生物技术产品;宽范围预染蛋白Marker,New England生物技术产品;Western化学发光检测试剂盒(批号SC-2048),Pierce公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.4 阳和汤制备 将熟地黄、鹿角胶、白介子、肉桂、甘草、麻黄、炮姜按20:6:4:2:2:1:1的比例混合,暂时不加入鹿角胶,加4倍量蒸馏水文火煎煮1h,药渣同法再煎煮2次,过滤。将3次煎煮滤液合并浓缩至质量浓度为生药量1.08g·mL⁻¹(浓缩

快完成时,将鹿角胶加入烊化),将浓缩液通过0.25μm微孔滤膜过滤除菌,分装于10mL离心管中,-20℃冷冻保存备用。

1.5 阳和物含药血清(YHDS)的制备 小鼠40只,分为对照组和阳和汤给药组,每组20只。给药组ig给予阳和汤20mL·kg⁻¹(21.6g·kg⁻¹),对照组ig给予等容量的生理盐水,每日1次,连续7d。末次给药1h后,乙醚麻醉、颈动脉采血,4℃冰箱放置1h,使血细胞沉淀析出血清,3000r·min⁻¹离心10min,分离血清,将每组的血清样品振荡混匀,经56℃灭活30min,0.22μm微孔滤膜过滤除菌,分装在1.5mLEP管内,-20℃保存备用。

2 方法

2.1 细胞培养 按照文献[4]的方法,人类乳腺癌细胞MCF-7培养于含体积分数为10%的胎牛血清的DMEM培养基(含青霉素100U·mL⁻¹,链霉素100μg·mL⁻¹),置于37℃,5%CO₂的培养箱内常规传代培养。

2.2 BrdU掺入法检测细胞增殖 参照文献[5],取对数生长期的MCF-7细胞,调细胞数5×10³个/mL,接种于96孔板中培养24h。更换含YHDS(100mg·L⁻¹,血清终浓度为1%) and不同质量浓度的阿霉素(1800,600,200,100,50μg·L⁻¹),每个药物浓度3个复孔,全自动酶标仪(450nm)测吸光度,计算生长抑制率,用BrdU含量减少表示。

2.3 Bax/Bcl-2表达检测 将MCF-7细胞数调为1×10⁶个/mL,加入6孔板每孔2.4mL,补充不同情况的培养基每孔0.6mL,每组3个复孔,5%CO₂培养箱内37℃培养48h。收集细胞,用冷PBS洗细胞3次,加200μL细胞裂解液^[6]冰上裂解5min,将裂解液于100℃煮沸10min,10000r·min⁻¹离心5min,上清液中的总蛋白浓度以BSA为标准用Lowry法定量。每孔上样50μL进行SDS-15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,4℃过夜电转移至硝酸纤维素膜上。用TBST^[6]室温封闭硝酸纤维素膜1h,除去封闭液,加入一抗室温孵育1h,洗膜3次,加二抗室温孵育1h,洗膜3次,加入酶化学发光底物成像。

2.4 原位末端标记检测细胞凋亡 细胞早期凋亡可以通过TUNEL(原位末端标记脱氧核苷转移酶介

导的地高辛配体) 检测 DNA 断裂碎片, MCF-7 人乳腺癌细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于细胞培养瓶中 3 mL/瓶, 培养 24 h, 更换新的培养基含不同质量浓度的 YHDS ($125, 250, 500, 1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 48 h 后, 收集细胞, DNA 断裂碎片利用荧光显微镜检测 FITC 标记的绿色荧光。

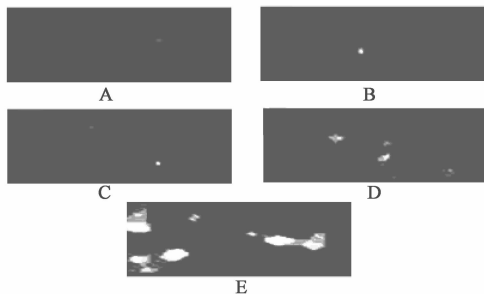
2.5 对细胞线粒体膜电位的影响 参照文献[7]将 MCF-7 细胞数调为 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$, 加入 24 孔板每孔 0.8 mL, 按细胞增殖试验方案补充不同情况的培养基每组 4 个复孔。培养 48 h, 将细胞悬浮于 $1 \text{ mL } 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ } ^{123}\text{Rh}$ 的 PBS 中, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗去未结合的 ^{123}Rh 。流式细胞仪测量分析。每个样至少采集 20 000 个细胞, 线粒体膜电位以 ^{123}Rh 的荧光密度表示。

2.6 软琼脂克隆形成法检测细胞分化 按 2.2 培养细胞, 加入不同浓度药物培养 48 h 后, 调细胞数为 $1 \times 10^4/\text{mL}$, 活细胞数用台盼蓝拒染法计算。将制备好的 0.6% 底层琼脂加入 6 孔板中每个孔 1.0 mL, 温室凝固; 每孔加 1 mL 0.3% 的上层琼脂和 100 μL 单细胞悬液 (约 1 000 cell/well), 混匀, 室温凝固。培养 2 周, 计数含 50 个细胞以上的克隆, 计算细胞集落形成率。

2.7 数据分析 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 SPSS 11.0 单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对阿霉素抑制 MCF-7 细胞增殖的影响 YHDS 在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 MCF-7 细胞增殖无明显影响 (抑制率仅 2.3%), 但对 MCF-7 细胞凋亡呈剂量依赖性 (图 1); 并能增强阿霉素对 MCF-7 细胞的抑制作用, 使阿霉素对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 由 0.42



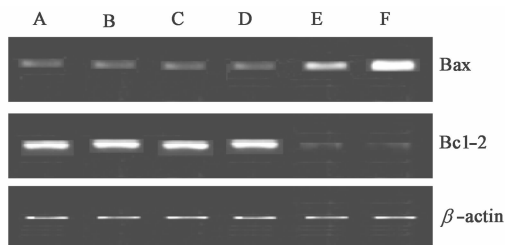
A. 未处理的正常细胞; B. $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ YHDS 处理;
C. $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ YHDS 处理; D. $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ YHDS 处理; E. $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ YHDS 处理

图 1 TUNEL 检测 MCF-7 细胞凋亡

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对阿霉素诱导的 MCF-7 细胞凋亡信号的影响

YHDS 能上调阿霉素诱导的 Bax/Bcl-2 (见图 2), 进一步降低阿霉素诱导的 MCF-7 细胞线粒体膜电位下降 (表 1)、增加阿霉素诱导的 MCF-7 细胞凋亡 (表 2)。



A. 未经药物处理的对照细胞; B. 经 YHDS $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞; C. 经阿霉素 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞;
D. 经阿霉素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞;
E. 经 YHDS $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 阿霉素 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞;
F. 经 YHDS $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 阿霉素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞。

图 2 阳和汤对阿霉素诱导 MCF-7 细胞 Bax/Bcl-2 表达的影响

表 1 1% YHDS 对阿霉素诱导的 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞膜电位 (荧光密度)
正常对照	-	752.3 ± 27.6
YHDS	100	713.5 ± 28.4
阿霉素	0.2	$542.1 \pm 31.2^{(1)}$
阿霉素	0.5	$418.7 \pm 33.8^{(1)}$
YHDS + 阿霉素	100 + 0.2	$294.8 \pm 35.1^{(1,2)}$
YHDS + 阿霉素	100 + 0.5	$187.4 \pm 24.7^{(1,2)}$

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与阿霉素单独处理组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 1% YHDS 对阿霉素诱导的 MCF-7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡 (荧光密度)
正常对照	-	28.4 ± 3.2
YHDS	100	33.7 ± 4.1
阿霉素	0.2	$138.3 \pm 18.6^{(1)}$
阿霉素	0.5	$261.2 \pm 35.7^{(1)}$
YHDS + 阿霉素	100 + 0.2	$318.4 \pm 42.3^{(1,2)}$
YHDS + 阿霉素	100 + 0.5	$485.2 \pm 51.5^{(1,2)}$

3.3 YHDS 对 MCF-7 细胞的诱导分化作用 YHDS 能明显呈剂量依赖性减少 MCF-7 细胞的软琼脂克隆数 (表 3), 有诱导 MCF-7 细胞分化作用。

表 3 YHDS 对 MCF-7 细胞软琼脂克隆数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	软琼脂克隆数/个
正常对照	-	50 ± 5.2
YHDS	1 000	$12 \pm 2.9^{1)}$
	500	$18 \pm 3.8^{1)}$
	250	31 ± 3.4
	125	45 ± 4.8

4 讨论

癌症已成为威胁人类生命健康最严重的疾病之一。正常细胞的增殖、分化是受到极其精细调控的基本生命现象。与此相反,肿瘤细胞表现为细胞增殖失控和分化受阻^[4]。诱导肿瘤细胞分化治疗是肿瘤治疗研究的新途径,即通过诱导分化,使肿瘤细胞向正常细胞转化,从而使肿瘤得到彻底治疗。中药有效单体或复方在特定的条件下可使肿瘤细胞向正常方向逆转而成为较成熟的细胞,使之自然死亡,避免了药物直接杀伤作用对正常细胞尤其是造血细胞的损害^[8]。

现代医学研究显示阳和汤有治疗肿瘤作用^[9],但其机制不明。本研究结果表明,体外 YHDS 能够抑制 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖、并呈剂量依赖性促进其分化,与阳和汤治疗癌症的报道一致;同时我们采用中药血清药理学研究方法观察阳和汤对肿瘤化疗药阿霉素是否有增效减毒作用,结果显示,YHDS 能够与阿霉素产生协同抗肿瘤作用,且呈剂量依赖性减轻阿霉素的细胞毒作用;YHDS 呈剂量依赖性促进阿霉素诱导的 MCF-7 细胞线粒体膜电位降低,表明 YHDS 可诱导 MCF-7 人乳腺癌细胞凋亡;同时 YHDS 上调 bax/bcl-2 表达比率,进一步降低阿霉素诱导的 MCF-7 细胞线粒体膜电位下降、增加阿霉素诱导的 MCF-7 细胞凋亡。

综上所述,YHDS 对肿瘤细胞有选择性诱导肿瘤细胞分化作用,其抑制肿瘤生长的机制是通过调节细胞增殖与分化失调、使肿瘤细胞发育成为成熟

细胞,使肿瘤细胞丧失其恶性;激活肿瘤细胞凋亡通路可能是其化疗增敏的主要机制,也可能是阳和汤在细胞水平上治疗肿瘤的基础。

本研究虽然仅限于 MCF-7 人乳腺癌肿瘤细胞,但也为阳和汤的临床应用提供了更好的依据,是否对其他肿瘤细胞也有调节增殖与分化失调的作用及其对化疗药增敏作用可能的机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 黄立中,张晓明,左亚杰,等. 阳和汤对小鼠移植性肿瘤抑制作用的实验研究[J]. 湖南中医学院学报, 2002, 22(1): 33.
- [2] 郑翠娥,王晓红. 阳和汤加减治疗骨肿瘤[J]. 山东中医杂志,1998, 17(2): 62.
- [3] 黄立中,肖雅,王大安,等. 阳和汤对移植 S180A 小鼠抑瘤及体内诱生干扰素作用的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(5): 22.
- [4] 杜钢军,林海红,谢松强. 小鼠阳和汤血清对细胞的诱导分化作用[J]. 中药材, 2008, 31(1): 82.
- [5] 尹婵,姜浩,曹建国,等. 黄荆子乙酸乙酯提取物对人乳癌细胞体内外实验的研究[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(9): 1.
- [6] Makoto Kawatani, Madoka Uchi, Siro Simizu, et al. Transmembrane domain of Bcl-2 is required for inhibition of ceramide synthesis, but not cytochrome c release in the pathway of inostamycin-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2003, 286 (1): 57.
- [7] Hu Y P, Moraes C T, Savaraj N, et al. A model for studying whether mitochondria are targets for rhodamine 123, doxorubicin, and other drugs [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 60(1): 1897.
- [8] 张蓓,胡丕丽. 中西医结合治疗肿瘤患者生存质量的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(3): 302.
- [9] 高永翔,沈欣,宗桂珍,等. 阳和汤对裸鼠人癌移植瘤的抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 57.

[责任编辑 聂淑琴]