

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110524. 1326. 001

## 舒肝凉血方对 MCF-7 和 T47D 细胞增殖及 硫酸酯酶活性和表达的影响

付雪松, 李萍萍\*

(北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所中西医结合科,  
恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142)

**[摘要]** 目的:观察舒肝凉血方对雌激素受体阳性乳腺癌 MCF-7 和 T47D 细胞增殖的影响,并检测舒肝凉血方对两个细胞系中硫酸酯酶的活性及其 mRNA 表达的影响。方法:培养雌激素受体阳性的乳腺癌细胞 MCF-7 和 T47D,给予不同浓度的舒肝凉血方处理 24 h 后,MTT 法检测复方对 MCF-7 和 T47D 细胞增殖的影响;RT-PCR 检测舒肝凉血方对硫酸酯酶 mRNA 表达的影响。培养 MCF-7 和 T47D 细胞,转染萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶质粒,给予不同浓度的舒肝凉血方处理 24 h 后,双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测复方对两个细胞系中硫酸酯酶活性的影响。结果:舒肝凉血方显著抑制了 MCF-7 和 T47D 细胞的增殖,并呈现出剂量依赖关系,半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别是  $46.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $22.98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;低浓度的舒肝凉血方对硫酸酯酶 mRNA 的表达无明显影响,高浓度时则显著下调了硫酸酯酶 mRNA 的表达;舒肝凉血方显著降低了 MCF-7 和 T47D 细胞中硫酸酯酶的活性,且呈现出剂量依赖性。结论:舒肝凉血方能显著抑制 MCF-7 和 T47D 细胞的增殖,此作用可能与该方降低硫酸酯酶活性以及下调硫酸酯酶 mRNA 的表达有关。

**[关键词]** 舒肝凉血方;硫酸酯酶;乳腺癌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0144-04

## Effects of Shugan Liangxue Decoction on MCF-7 and T47D Cells Proliferation, Enzymatic Activity and mRNA Expression of Steroid Sulfatase

FU Xue-song, LI Ping-ping\*

(Key Laboratory of Carcinogenesis and Traditional Research Under Ministry of Education, Department  
of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Peking University School of Oncology,  
Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Shugan Liangxue decoction (SGLXD) on MCF-7 and T47D cells proliferation, and evaluate the effects of SGLXD on the enzymatic activity and mRNA expression of steroid sulfatase (STS). **Method:** Estrogen receptor positive breast cancer MCF-7 and T47D cells were cultured and treated with different concentrations of SGLXD for 24 h. Cell proliferation was evaluated by MTT assay, and the mRNA expression of STS was investigated by RT-PCR. After transient co-transfection with plasmid pERE-TK-Luc and pRL-TK in MCF-7 and T47D cells, and treated with different concentrations of SGLXD for 24 h, we evaluated the enzymatic activity of STS by dual-luciferase reporter assay (DLR). **Result:** By MTT assay, SGLXD inhibited

**[收稿日期]** 20110218(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(200930973906)

**[第一作者]** 付雪松,医学硕士,主要从事中医药防治肿瘤的作用机制的研究, Tel: 010-88196707, E-mail: xuesong850625@163.com

**[通讯作者]** \*李萍萍,教授,博士生导师,长期从事中医药防治肿瘤的研究工作, Tel: 010-88196069, E-mail: lppma123@yahoo.com.cn

**[网络出版时间]** 2011-05-24 13:26

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1326.001.html>

the cell proliferation of MCF-7 and T47D dose-dependently, the  $IC_{50}$  values were  $46.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $22.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . SGLXD down-regulated the expression of STS mRNA at higher concentrations significantly. In MCF-7 and T47D cells, the enzymatic activity of STS was significantly inhibited by SGLXD dose-dependently. **Conclusion:** SGLXD can inhibit the cell proliferation of MCF-7 and T47D, this effect may be associated with the inhibitory effects of SGLXD on the enzymatic activity of STS and the expression of STS mRNA.

[**Key words**] Shugan Liangxue decoction; steroid sulfatase; breast cancer

乳腺癌是危害中国女性健康的三大恶性肿瘤之一。目前,普遍认为雌二醇( $E_2$ )在乳腺癌的发生发展中起了非常重要的作用,硫酸酯酶(STS)作为主要的雌二醇合成酶,在维持肿瘤组织中高水平的雌二醇上起着很重要的作用<sup>[1]</sup>。

舒肝凉血方是李萍萍教授的临床经验方,主要用于乳腺癌患者服用三苯氧胺后出现的潮热症状的治疗。研究证实,舒肝凉血方能抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖<sup>[2]</sup>,与三苯氧胺联合应用可增强三苯氧胺的抑瘤作用<sup>[3]</sup>。我们选用了雌激素受体阳性的 MCF-7 和 T47D 细胞系,观察舒肝凉血方对 MCF-7 和 T47D 细胞增殖及硫酸酯酶活性和表达的影响。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人乳腺癌细胞 MCF-7 购买于美国典型物种保藏中心(ATCC),人乳腺癌细胞 T47D 由北京大学基础医学院生物化学与分子生物学系尚永峰院士惠赠。

**1.2 药物与试剂** 舒肝凉血方由柴胡、紫草、郁金、牡丹皮、白芍、五味子等 7 味药物组成,7 味药物购买于北京白塔寺药店。雌二醇和雌酮硫酸盐(Sigma-Aldrich 公司);DMEM 培养基和 RPMI-1640 培养基(天津百若克公司);胎牛血清(Gibco 公司,批号 505985);胰蛋白酶(Gibco 公司);MTT(Sigma-Aldrich 公司);Trizol(Invitrogen 公司,批号 14105);Transcript Two Step RT-PCR Super Mix kit(批号 E10119),质粒小提试剂盒(批号 E80919)全式金公司;TransLipid Transfection Reagent(批号 E10817);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega 公司,批号 312201)。

**1.3 仪器**  $CO_2$  培养箱(Thermo Fisher 公司);KS12 型超净工作台(Thermo 公司);680 型酶标仪(Bio-Rad 公司);Ultrospec 3300 型紫外分光光度计(Amersham Pharmacia Biotech 公司);chemilmager<sup>TM</sup> 5500 型 UVP 凝胶成像仪(Alpha Innotech 公司);化学发光检测仪 LMax II(Molecular Devices 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** MCF-7 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养,T47D 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中培养。2 种培养基均含有  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  非必需氨基酸、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙酮酸钠、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素。细胞在含 5%  $CO_2$  的  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中培养。用于硫酸酯酶活性检测的细胞,用含 10% 胎牛血清、不含抗生素的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基培养。对于所有实验,保持适当的细胞生长密度后进行严格的细胞传代,并在细胞复苏后传代不超过 20 代。

**2.2 舒肝凉血方的制备** 每剂按比例混匀,共 100 g,煎煮前用去离子水浸泡 30 min,按传统方法进行煎煮。以 800 mL 的水武火煎煮 30 min,再以文火煎煮 30 min,倒出药液;再加 500 mL 水,重复煎煮 1 次,倒出药液;将 2 次煎煮药液混合后继续煎煮,浓缩成生药终浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液。以孔径为  $0.22 \mu\text{m}$  的微孔滤器对药液进行过滤除菌。分装,保存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱备用<sup>[4]</sup>。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基将  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的舒肝凉血方药液调整到不同浓度,用于实验。

**2.3 MTT 法检测细胞增殖** 将 MCF-7 的细胞密度调整为  $5 \times 10^4/\text{mL}$ ,T47D 的细胞密度调整为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ ,分别接种于 96 孔板,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 。  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$  培养箱中孵育 24 h 使细胞贴壁。24 h 后将培养基吸除,分别加入不含或含有不同浓度舒肝凉血方(MCF-7: 10, 20, 30, 40, 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  或 T47D: 5, 10, 15, 20, 25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的完全培养基,每组含有 6 个复孔,继续孵育 24 h。24 h 后吸除上清,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  MTT 溶液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),孵育 4 h,然后吸除 MTT 溶液,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO)进行显色,室温下避光水平摇动 15 min,在酶标仪上以单波 570 nm 波长检测各孔吸光度(A)。进行 3 次独立实验。以未处理的细胞(阴性对照)作为分析基

线(100%),计算公式:细胞活性率 = 药物组  $A_{570\text{ nm}}$  / 阴性对照组  $A_{570\text{ nm}} \times 100\%$ 。

**2.4 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备** MCF-7 和 T47D 细胞分别进行铺皿,24 h 后加入不含或含有不同浓度舒肝凉血方的完全培养基,继续培养 24 h,然后按照 Invitrogen 公司的 Trizol 操作指南提取总 RNA。通过紫外分光光度计对 RNA 样品的含量和纯度进行测定,通过甲醛变性电泳检测 RNA 样品的完整性。按照全式金公司的 TransScript Two Step RT-PCR Super Mix kit 的操作指南将 RNA 逆转录为 cDNA,20  $\mu\text{L}$  体系中含有 1  $\mu\text{g}$  RNA,42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,然后 80  $^{\circ}\text{C}$  10 min,灭活逆转录酶。-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.5 聚合酶链反应 (PCR)** 使用 the program Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,由北京奥科生物科技公司合成。STS, $\beta$ -actin 的引物分别为:5'-ACAGCGGAACACTGAGAC-3' (上游), 5'-TGTC AAGTAGATGAGGGTAT-3' (下游)<sup>[4]</sup>; 5'-CATGCC ATCCTGCGTCTGGAC-3' (上游) and 5'-CACGGAG TACTTGGCGCTCAGGAGG-3' (下游)。配置 25  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系,其中含有 cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,12.5  $\mu\text{L}$  2  $\times$  TransTaq HiFi PCR Super Mix II 和 10.5  $\mu\text{L}$  双蒸水。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(1.5%),电泳结束后 UV 下观察。

**2.6 质粒提取** 质粒 pERE-TK-Luc 以萤火虫荧光素酶质粒 pGL4.10[luc2](GenBank/EMBL 登录号:AY738222)为载体构建,为氨苄青霉素抗性(Amp<sup>r</sup>)。带有 2 段串联的雌激素反应元件(Estrogen Responsive Elements, EREs)序列,位于 TK 启动子的上游,有在雌激素-受体复合物转录激活后可以表达萤火虫荧光素酶的基因序列。质粒 pRL-TK(GenBank/EMBL 登录号:AF025846),为氨苄青霉素抗性(Amp<sup>r</sup>),用于标准化萤火虫荧光素酶的表达。质粒下游含有 TK 启动子操纵表达的人源化海肾荧光素酶基因序列 Rluc。使用全式金公司(TransGen Biotech)的质粒小提试剂盒提取质粒,置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.7 瞬时转染** 转染前,细胞在无雌激素的条件下培养。瞬时转染前 1 d,将 MCF-7 或 T47D 细胞以  $2.0 \times 10^5/\text{mL}$  的密度接种于 24 孔培养板,使其在转染当日的细胞汇壁率为 90%~95%,细胞培养后在含血清、不含抗生素的 500  $\mu\text{L}/$ 孔的正常培养基中培养。转染时使用 TransLipid Transfection Reagent(TransGen

Biotech)按照说明书进行 2 种质粒的共同转染。转染后 24 h 分别更换新鲜培养基,培养基中不含或含有雌二醇(E<sub>2</sub>)或底物雌酮硫酸盐(E1S)以及不同浓度药物,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h。

**2.8 硫酸酯酶活性检测** 通过化学发光检测仪 LMax II (Molecular Devices)对荧光素酶的生物荧光进行检测。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega),按照说明书裂解处理细胞后,对同一标本中获取的裂解液在同一检测孔中分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。数据结果以标准化为 1.0 的阴性对照的平均倍数来表示。

**2.9 统计分析** 数据分析采用 SPSS 16.0 软件进行处理。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  来表示。各组间的统计学差异使用单因素方差分析。 $P < 0.05$  有统计学显著差异。

### 3 结果

**3.1 对 MCF-7 和 T47D 细胞增殖的影响** 与阴性对照组相比,细胞增殖均被舒肝凉血方显著抑制,且呈现出剂量依赖关系。最低浓度组中,MCF-7(10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 T47D(5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )细胞的活性率分别为 86.22% 和 93.73%。而最高浓度组中,MCF-7(50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 T47D(25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的细胞活性率则分别为 38.65% ( $P < 0.001$ )和 42.77% ( $P < 0.001$ )。舒肝凉血方对 MCF-7 和 T47D 细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别是 46.08,22.98  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.2 对硫酸酯酶 mRNA 表达的影响** 与阴性对照组相比,低、中浓度舒肝凉血方处理后的 MCF-7 和 T47D 细胞中,STS mRNA 的表达均无明显变化,而高浓度组中,2 个细胞系中 STS mRNA 的表达均被舒肝凉血方显著抑制。在 2 个细胞系中,与阴性对照组相比,各浓度舒肝凉血方对管家基因  $\beta$ -actin 的表达并没有影响。见图 1。

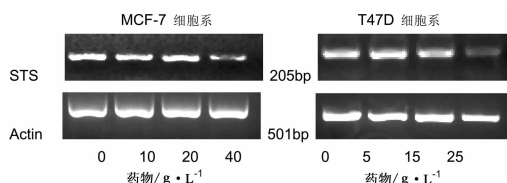


图 1 不同浓度舒肝凉血方处理 24 h 对 MCF-7 和 T47D 细胞中 STS, $\beta$ -actin mRNA 表达的影响

**3.3 对硫酸酯酶活性的影响** 在 MCF-7 和 T47D 细胞中,E<sub>2</sub> 组和 E1S 组( $P < 0.05$ )的雌激素活性均明显高于阴性对照组。与 E1S 组相比,不同浓度舒肝凉血

方处理 24 h 后的 MCF-7 和 T47D 细胞中的硫酸酯酶活性被显著抑制,且呈现出剂量依赖趋势。舒肝凉血方(10, 20, 40 g·L<sup>-1</sup>)对 MCF-7 细胞中硫酸酯酶活性的抑制率分别为 5.89%, 19.93%, 40.31%。舒肝凉血方(5, 15, 25 g·L<sup>-1</sup>)对 T47D 细胞中硫酸酯酶活性的抑制率分别为 7.85%, 14.64%, 21.49%。舒肝凉血方对 MCF-7 和 T47D 细胞中硫酸酯酶活性的 IC<sub>50</sub> 分别是 51.21 g·L<sup>-1</sup> 和 206.09 g·L<sup>-1</sup>。

#### 4 讨论

大约 1/3 的乳腺癌患者是雌激素依赖性的,而在绝经后的乳腺癌患者中,这个比例则占到了 2/3,这些雌激素依赖性的患者体内存在雌激素受体(ER)并且需要雌激素来维持肿瘤的生长<sup>[5]</sup>。乳腺正常和肿瘤组织中均含有能在组织中将血中的前体转化为雌激素所必须的所有相关酶<sup>[6]</sup>。雌激素主要通过芳香化酶和硫酸酯酶途径合成,雄烯二酮和雌酮硫酸盐分别在芳香化酶和硫酸酯酶的作用下转化为雌二醇<sup>[7]</sup>。

有研究证实,在人乳腺组织中,硫酸酯酶的活性比芳香化酶的活性高 10 到 100 倍<sup>[8]</sup>,而且关于人乳腺组织中雌二醇合成的定量分析证实,经硫酸酯酶途径合成的雌二醇比通过雄激素芳香化过程合成的雌二醇多 100 到 500 倍<sup>[9]</sup>,这表明硫酸酯酶途径是乳腺组织中雌二醇合成的主要途径。我们的实验结果证实,舒肝凉血方能显著抑制 MCF-7 和 T47D 细胞系中硫酸酯酶的活性,且均呈现出剂量依赖性。MTT 结果显示,舒肝凉血方显著抑制了 MCF-7 和 T47D 细胞增殖,并呈现出剂量依赖性。上述结果提示,舒肝凉血方可通过抑制硫酸酯酶活性而抑制雌激素依赖性乳腺癌细胞的生长。

在乳腺肿瘤组织中,硫酸酯酶常常是过表达的,硫酸酯酶 mRNA 在肿瘤组织中的含量明显高于正常组织中的含量,而且随着癌症的进展其含量也随之增高,这将导致雌二醇在乳腺组织中积聚,因此促进乳腺肿瘤的生长<sup>[10]</sup>。本研究发现,低、中浓度的舒肝凉血方对 STS mRNA 的表达无明显影响,高浓度的舒肝凉血方则显著抑制了 MCF-7 和 T47D 细胞系中 STS mRNA 的表达。提示舒肝凉血方能下调 STS mRNA 的表达,该作用与浓度相关。STS mRNA 与雌激素受体阳性的绝经后乳腺癌患者的预后是密切相关的,常常预示着预后不良,STS mRNA 已被证实是对相对较短的无复发生存期的独立预测指标,并

且与肿瘤的大小以及淋巴结转移成正相关<sup>[6]</sup>。高浓度的舒肝凉血方能显著下调 STS mRNA 的表达,那么舒肝凉血方在改善乳腺癌患者的预后有待于进一步研究。

舒肝凉血方在临床应用多年,疗效肯定,本实验证实舒肝凉血方能显著抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖,同时对硫酸酯酶的活性及其 mRNA 的表达有显著的抑制作用。在分子水平上初步证实了舒肝凉血方的抑瘤作用机制。

#### [参考文献]

- [1] C Stengel, S P Newman, J M Day, et al. Effects of mutations and glycosylations on STS activity: a site-directed mutagenesis study [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 283 (1/2): 76.
- [2] 孙红,李萍萍,谢涛. 舒肝凉血方与三苯氧胺合用对人乳腺癌细胞 MCF-7 生长及 ER $\alpha$  表达的影响 [J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 14 (9): 607.
- [3] 吴彩霞,李萍萍. 舒肝凉血方联合三苯氧胺对雌激素依赖性乳腺癌的抑瘤作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14 (8): 31.
- [4] Y Zhang, P P Li. Shu-Gan-Liang-Xue Decoction, a Chinese herbal formula, down-regulates the expression of steroid sulfatase genes in human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 620.
- [5] R W Brueggemeier, J A Richards, T A Petrel. Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86 (3/5): 501.
- [6] P Stute, T Szuwart, M Schlueter, et al. Effects of hormone therapy on estrogen synthesis from E1S in the mammary gland of postmenopausal women [J]. *Maturitas*, 2008, 59 (2): 163.
- [7] T Nakata, S Takashima, Y Shiotsu, et al. Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in postmenopausal breast cancer patients [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86 (3/5): 455.
- [8] J R Pasqualini, G Chetrite, B L Nguyen, et al. Estrone sulfate-sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 53 (1/6): 407.
- [9] H Ishida, N Sato, J Hosogi, et al. Inactivation of recombinant human steroid sulfatase by KW-2581 [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 108 (1/2): 17.
- [10] T Suzuki, Y Miki, T Nakata, et al. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86 (3/5): 449.

[责任编辑 聂淑琴]