

青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用比较研究

林 芳¹, 钱之玉^{1*}, 薛红卫², 丁健³, 林莉萍³

(1. 中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009; 2. 中国科学院上海植物生理生态研究所 分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; 3. 中国科学院上海药物研究所 肿瘤药理组, 上海 200032)

摘要:目的 对比研究青蒿素及其衍生物青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响并探讨其作用机制。方法 采用体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 利用 SRB 法测定青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 细胞增殖的影响, FCM 法测定细胞周期的变化, 亚 G₀+G₁ 期含量测定和 DAPI 荧光染色法观察细胞凋亡。结果 10⁻⁶ mol/L 青蒿素和 1⁻⁶ mol/L 青蒿琥酯能明显改变 MCF-7 细胞的细胞周期, 使 S 期细胞显著减少, G₀+G₁ 期细胞明显增加。青蒿素对 MCF-7 细胞增殖仅有微弱抑制作用, 但其衍生物青蒿琥酯却有显著的抑制作用, IC₅₀ 为 0.31⁻⁶ mol/L。同样, 1⁻⁶ mol/L 青蒿琥酯引起 MCF-7 细胞的凋亡和直接的细胞毒作用明显强于 10⁻⁶ mol/L 青蒿素的作用。结论 体外研究表明, 对肿瘤细胞增殖的抑制青蒿琥酯比青蒿素作用强。

关键词: 青蒿素; 青蒿琥酯; MCF-7 细胞

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)04-0347-03

Comparison of inhibitory effects between artemisinin and artemisunate on proliferation of MCF-7 cells *in vitro*LIN Fang¹, QIAN Zhi-yu¹, XUE Hong-wei², DING Jian³, LIN Li-ping³

(1. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute of Plant Physiology, CAS, Shanghai 200032, China;

3. Shanghai Institute of Materia Medica, CAS, Shanghai 200032, China)

Abstract **Object** To study the effects of artemisinin and its analogue artemisunate on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cell line, as well as their mechanism comparatively. **Methods** The inhibition of cell proliferation was determined by SRB method. Cell cycle was determined by flow cytometry (FCM) analysis. Apoptosis was confirmed by sub-G₁ cells content and DAPI method. **Results** The cell cycle of MCF-7 was changed greatly when treated 24 h with either 10⁻⁶ mol/L artemisinin or 1⁻⁶ mol/L artemisunate, the distribution of MCF-7 cells among S phase was reduced greatly, while increased during G₀+G₁. However, artemisinin had weaker effect on the proliferation of MCF-7 cell, while artemisunate effectively inhibited the proliferation of MCF-7, the IC₅₀ was 0.31⁻⁶ mol/L. Apoptosis induced by 1⁻⁶ mol/L artemisunate was stronger than that by 10⁻⁶ mol/L artemisinin, too. **Conclusion** The inhibitory effect of artemisunate on the proliferation of tumor cell is stronger than that of artemisinin *in vitro*.

Key words artemisinin; artemisunate; MCF-7 cell line

青蒿为菊科一年生草本植物。黄花蒿 *Artemisia annua* L., 20 世纪 70 年代初, 我国青蒿素研究协作小组首次从黄花蒿分离出抗疟有效单体青蒿素 (artemisinin)^[1], 一种非生物碱倍半萜内酯, 具有独特的过氧桥结构, 后合成了很多青蒿素的衍生物, 如青蒿素琥珀酸酯 (青蒿琥酯, artemisunate), 二氢青蒿素 (dihydroartemisinin), 蒿甲醚 (artemether) 等, 在临床上对抢救和治疗脑型疟疾和恶性疟疾等疗效显著^[2]。20 世纪 90 年代以来有报道发现青蒿

琥酯对人类肿瘤细胞在体外有杀伤作用, 对杂种小鼠 3 种移植性肿瘤和裸鼠移植人鼻咽癌亦有一定的抑制作用^[3]。为了扩大临床应用范围, 本研究比较了青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制活性, 并对其抑瘤机制做了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂: RPMI-1640 培养液 (美国 Gibco 公司), 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), 磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B, SRB) (美

* 收稿日期: 2002-06-03

作者简介: 林 芳 (1973-), 女, 福建人, 中国药科大学 1998 级药理专业博士生, 研究方向为中药药理及新药研究开发。

E-mail linfo929@sohu.com

* 通讯作者 Tel (025) 3271322

国 Sigma 公司),二甲基亚砷 (DMSO)。青蒿素和青蒿琥酯由中国科学院药物所李英研究员惠赠。配制方法如下:青蒿素以少量 DMSO 溶解,配成浓度为 0.2 mol/L 的母液,超声助溶,4℃ 保存。实验前用 PBS (pH7.4) 稀释至所需浓度 (DMSO 终浓度 < 0.1%)。青蒿琥酯实验前配制,用 3% NaHCO₃ 溶解配成浓度为 0.2 mol/L 的母液,再用 PBS 稀释至所需浓度。

1.2 细胞培养:人乳腺癌细胞 MCF-7 由中国科学院上海药物研究所肿瘤药理组提供。在含 15% (体积分数) 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置 37℃ 含 5% CO₂ 孵箱中培养,每 3~4 天传代 1 次。加药实验用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养细胞。

1.3 细胞毒性测定 (SRB 法):取对数生长期细胞制备成单细胞悬液,台盼蓝染色进行活细胞计数。以 2×10^5 /mL 的细胞密度均匀接种至 96 孔板中,90 μ L/孔,培养 24 h 后,加 10 μ L 各受试药物混匀。每个药物剂量至少设 4 个复孔,对照组加等容积 PBS。置 37℃,5% CO₂ 条件下孵育 72 h。倾去培养液,用 10% 冷 TCA 固定细胞,4℃ 放置 1 h,蒸馏水洗涤 5 次,空气中自然干燥。每孔加由 1% 冰醋酸配制的 SRB 4 mg/mL 溶液 100 μ L,室温染色 15 min。去上清,1% 冰醋酸洗涤 5 次,空气干燥。每孔加入 150 μ L Tris 溶液 (pH7.4),在平板震荡器上充分溶解 SRB 蛋白复合物。以空白管调零,于酶标仪 (VERSAM AX) 测定 A₅₄₀ 值。

抑瘤率 = (无药细胞对照孔 A 值 - 用药孔 A 值) / 无药细胞对照孔 A 值 \times 100%

1.4 荧光显微镜术:将青蒿素和青蒿琥酯分别作用于 MCF-7 细胞 24 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,用 3% 多聚甲醛 (pH7.4, PBS) 室温固定 30 min, PBS 洗涤后加入 1% Triton X-100,作用 4 min, PBS 洗涤后再用 DNA 荧光染料二氨基苯基吡啶 (DAPI, 0.15 μ g/mL, pH7.4) 避光染色 60 min,荧光显微镜观察细胞形态并拍照。

1.5 流式细胞术:将处于对数生长期的细胞分为 3 组,对照组、青蒿素和青蒿琥酯用药组,对照组用 PBS (pH7.4) 代替药液,CO₂ 孵箱内继续培养 24 和 48 h。0.25% 胰酶消化后制成细胞悬液。PBS 洗两次,70% 乙醇固定 12 h;再用 PBS 洗涤 1 次,用含 50 μ g/mL RNase, 0.5% Triton X-100 和 0.1% 柠檬酸三钠的碘化丙啶 (PI, 50 μ g/mL) 避光染色 30 min,用流式细胞仪 (Becton-Dickinson Co.) 检

测细胞周期和凋亡率。

2 结果

2.1 青蒿素和青蒿琥酯对肿瘤细胞 MCF-7 增殖的影响:正常 MCF-7 细胞排列密集呈梭形,细胞与细胞之间界限不明显,青蒿琥酯处理 24 h 后细胞排列疏松,呈分离状态,48~72 h 细胞逐渐变圆,折光性增强,漂浮细胞增加。

SRB 法测定青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 细胞生长的影响:青蒿素从浓度 0.17, 0.33, 0.66, 6.6, 11 到 110 μ mol/L 对 MCF 细胞生长抑制约在 20%~35%。青蒿琥酯能强烈抑制 MCF-7 细胞的增殖,其 IC₅₀ 为 (0.3 \pm 0.016) μ mol/L (IC₅₀ 的计算用“IC₅₀ 计算软件”进行)。

2.2 青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 的细胞周期改变:流式细胞检定 (FCM) 结果显示 1 μ mol/L 青蒿琥酯和 10 μ mol/L 青蒿素能明显改变 MCF-7 的细胞周期:不加药组 (对照组) 体现了肿瘤细胞的特性,处于 S 期的细胞多达 51.79%。青蒿琥酯和青蒿素使 S 期细胞明显减少,细胞的生长被滞留在 G₀+G₁ 期。说明青蒿琥酯和青蒿素阻止了基因组 DNA 的合成,从而抑制了细胞的分裂增殖速度。并且随着药物作用时间的延长,这种抑制作用有所增强 (见表 1)。

表 1 青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 细胞周期的影响

Table 1 Effect of artemisinin and artemisunate on cell cycles of MCF-7 cells

组别	G ₀ + G ₁ /%	S /%	G ₂ + M /%
对照	39.14	51.79	9.07
青蒿素 24 h	62.77	26.11	11.12
青蒿素 48 h	63.23	23.43	13.33
青蒿琥酯 24 h	65.33	26.29	8.38
青蒿琥酯 48 h	66.24	22.58	11.17

2.3 青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用:10 μ mol/L 青蒿素和 1 μ mol/L 青蒿琥酯分别作用于 MCF-7 细胞 24 h 后,用 DNA 荧光染料二氨基苯基吡啶 (DAPI) 对细胞进行染色,荧光显微镜观察到一些细胞核皱缩,聚集于核膜边缘,呈境界分明的块状或半月状的凋亡小体 (apoptotic body)。其中,青蒿琥酯作用后形成的凋亡小体明显高于青蒿素的作用。

由于凋亡细胞内 DNA 裂解成小片段,从细胞内漏出,因而 DNA 含量直方图上, G 峰左侧出现非整倍体 DNA 的峰型,此峰的百分比即为凋亡细胞的含量。MCF-7 细胞对照组凋亡细胞占 5.93%, 10 μ mol/L 青蒿素作用后凋亡细胞占 6.00%,即几乎

未形成凋亡峰,而经 $1\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯处理后凋亡细胞占 14.62%,形成一小的凋亡峰

DAPI染色结果与 FCM 结果都显示青蒿琥酯比青蒿素诱导 MCF-7 细胞凋亡的能力强得多。

2.4 青蒿素和青蒿琥酯作用后死细胞增多:用台盼蓝拒染色法计数 1000 个细胞中台盼蓝染色阳性即死细胞的数量。结果显示对照组死细胞在 1%~3%, $10\mu\text{mol/L}$ 的青蒿素作用 48 h 后,使得细胞死亡率增高,达到 10.40%; $1\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用 48 h 后,死细胞增至 43.60%。

3 讨论

已有研究证明青蒿琥酯对人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞的 IC_{50} 为 $37\mu\text{g/mL}$,而对人涎腺样癌细胞 SACC-83 的 IC_{50} 为 $30\mu\text{g/mL}$ ^[4],青蒿琥酯对体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞、人低分化鳞状上皮鼻咽癌 CNE2 和 SUNE-1 细胞的 IC_{50} 分别为 42.7, 101.6, $1.29\mu\text{g/mL}$ ^[3]。对人肝癌 BEL-7402 细胞的 IC_{50} 为 $21.4\mu\text{g/mL}$ ($52.5\mu\text{mol/L}$)^[5]。本实验中青蒿琥酯对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 为 $0.31\mu\text{mol/L}$ ($0.12\mu\text{g/mL}$)。上述实验结果说明青蒿琥酯对 MCF-7 细胞有选择性杀伤作用。

在研究抗疟原虫机制中,通过比较青蒿素及其衍生物的构效关系发现青蒿素结构中的过氧基是产生抗疟作用的必需基团,内酯环的羰基(第 12 位上)还原成羟基以及增长该羟基链时可增效^[6]。本实验结果对青蒿素骨架上 12-C 上内酯环的羰基(第 12 位上)进行衍生化处理后的青蒿琥酯,对肿瘤细胞的抑制作用比青蒿素明显增强。

本实验表明,青蒿素和青蒿琥酯对 MCF-7 细胞的周期作用相似。青蒿素和青蒿琥酯作用 MCF-7 细胞 24 h 后, S 期细胞明显减少, MCF-7 细胞的生长被滞留在 G_0+ G_1 期。说明青蒿素和青蒿琥酯阻止了 MCF-7 细胞 DNA 的合成,从而抑制了细胞的分裂增殖速度。SRB 法测定细胞增殖水平表明青蒿素对 MCF-7 细胞增殖仅有微弱抑制作用,但其衍生物青蒿琥酯却有非常显著的抑制作用,实验结果表明青蒿素和青蒿琥酯药效有明显差异的原因有二: (1) 青蒿琥酯诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用较强:尽管由于 MCF-7 细胞缺失 caspase3 蛋白,其细胞在

青蒿素和青蒿琥酯作用下发生凋亡的程度较轻,但从亚 G_1 期细胞的含量可看出, $10\mu\text{mol/L}$ 青蒿素几乎没有亚 G_1 期细胞峰,而 $1\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯亚 G_1 期细胞的含量有 14%, DAPI 染色也观察到 $1\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯比 $10\mu\text{mol/L}$ 青蒿素诱导的凋亡细胞数量多,这与张星等认为青蒿琥酯促进人肝癌 BEL-7402 细胞的凋亡结果一致^[5]。(2) 青蒿琥酯直接的细胞毒作用较强。台盼蓝拒染显示 $10\mu\text{mol/L}$ 青蒿素作用 48 h 后,死亡细胞达到 10.4%, $1\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯作用后死细胞达到 43.6%,说明药物作用后细胞膜通透性增加,导致细胞死亡。由于青蒿素类药物抗疟原虫的机制之一就是导致疟原虫膜系损伤^[7,8],那么在青蒿素类药物对肿瘤细胞的直接细胞毒作用是否与其作用于细胞膜、导致膜系损伤和细胞死亡相关,以及这种直接细胞毒作用是否随着青蒿素内酯环第 12 位上的羰基还原成羟基以及增长该羟基链而增效,值得进一步研究。

致谢:感谢中国科学院药物研究所李英研究员对工作的建议!

References

- [1] Qinghaosu Structure Research Group. A new sesquiterpene-artemisinin [J]. *China Sci Bull* (科学通报), 1997, 22 (3): 142.
- [2] Ding D B, Yang J D, Gao X S, *et al.* A comparative study of the therapeutic effects and rate of Qinghaosu and its derivatives artemether and artemisunate on *Plasmodium berghei* [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1994, 18 (4): 245-248.
- [3] Yang X P, Pan Q C, Liang Y J, *et al.* Study on antitumor effect of sodium artemisunate [J]. *Cancer* (癌症), 1997, 16 (3): 186-190.
- [4] Zhang J X, Wang S X, Zhang F G, *et al.* The effect of artemisunate on the proliferation of human cancer cell *in vitro*. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (4): 345-347.
- [5] Zhang X, Yang X P, Pan Q C, *et al.* Studies on the antitumor effect and apoptosis induction in human liver cancer cell line (BEL-7402) by sodium artemisunate [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29 (7): 467-469.
- [6] Li G D, Zhou Q, Zhao C W, *et al.* Study on artemisinin and its derivatives [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33 (7): 385-388.
- [7] Wu W M, Wu Y K, Wu Y L, *et al.* Unified mechanistic framework for the Fe(II)-induced cleavage of Qinghaosu and derivatives/analogues. The first spin-trapping evidence for the previously postulated secondary C-4 radical [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 3316-3325.
- [8] Singh N P, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells [J]. *Life Sci* (生命科学), 2001, 70: 49-56.

通 知

为了便于国际交流,本刊决定从 2003 年第 1 期起,文内的图题、表题、图注、表注及文后的参考文献一律用中、英文两种文字表示。请投稿时按以上要求撰写。

《中草药》杂志编辑部