

水飞蓟素对乳腺癌细胞系的作用及其机制研究

韩月恒, 韩炯, 李莹, 刘新平, 药立波*

(第四军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: 目的 研究水飞蓟素在体外对不同乳腺癌细胞系的作用, 并进一步探讨其作用机制。方法 MTT实验测定水飞蓟素对乳腺癌细胞系 MCF-7和 SK-BR-3的半数抑制浓度 (IC_{50}); 软琼脂克隆形成试验检测加药后两种细胞在软琼脂内的增殖能力。在此基础上, 用 Her-2抑制剂 AG825进行干预, 对水飞蓟素的作用机制进行初步探讨。结果 水飞蓟素对两种乳腺癌细胞有不同程度的抑制作用, 其中对 MCF-7细胞的作用较强, $IC_{50} \leq 0.02\%$, 而对 SK-BR-3的作用较弱。Her-2抑制剂 AG825可增加 SK-BR-3细胞对药物的敏感性, 抑制了水飞蓟素作用后该细胞在软琼脂中集落的形成。结论 水飞蓟素在体外对 MCF-7细胞具有明显的抑制作用, 而 AG825可增强 SK-BR-3细胞对药物的敏感性。因此, SK-BR-3细胞中 Her-2的高表达可能是该细胞对水飞蓟素敏感性差的原因, 而水飞蓟素也可能通过 Her-2调节某个或某几个下游分子起作用。

关键词: 水飞蓟素; 乳腺癌; Her-2 AG825

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0238-04

Inhibitory effect of silymarin on different breast cancer cell lines and associated molecular mechanism

HAN Yue-heng, HAN Jiong, LI Ying, LIU Xin-ping, YAO Li-bo

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract **Object** To investigate the anticancer effect of silymarin on different breast cancer cell lines, and approach the molecular mechanism. **Methods** Two breast cancer cell lines were cultured to study the effect of silymarin on cell growth and proliferation. Firstly, MTT assay was used to evaluate the IC_{50} of silymarin on the two cell lines, MCF-7 and SK-BR-3. Secondly, through soft agar assay, the ability of cell proliferation, when exposed to silymarin at various dosages, was detected. Finally, AG825, inhibitor of the protein tyrosine kinase Her-2 was used to intervene the effect of silymarin on SK-BR-3 cells. **Results** Silymarin could inhibit the growth of MCF-7 and SK-BR-3 cells in varied degrees. MCF-7 cells were very sensitive to the agent, $IC_{50} \leq 0.02\%$; while SK-BR-3 cells were less sensitive. Her-2 inhibitor AG825 increased the sensitivity of SK-BR-3 cells to silymarin and inhibited the growth of the cells in soft agar. **Conclusion** From the above, it could be concluded that silymarin has the cancer chemopreventive and anticancer effects on breast cancer cell lines. It could completely inhibit the growth of MCF-7 cells, and partly of SK-BR-3 cells. AG825 could improve the sensitivity of SK-BR-3 cells to silymarin. Overexpression of Her-2 on the surface of SK-BR-3 cells may be owed to the lower sensitivity to silymarin and silymarin may be possible to affect cell growth through one or more downstream molecules regulated by Her-2.

Key words silymarin; breast cancer; Her-2; AG825

水飞蓟素是从植物水飞蓟中提取的一种黄酮类抗氧化剂, 在欧洲和亚洲的一些国家被用于治疗肝纤维化。该药物具有较强的肝脏保护作用, 可使机体抵御 CCl₄等引起的脂质过氧化作用及肝脏毒性, 并能捕获自由基, 是一种很强的抗氧化剂^[1,2]。国内外的研究发现, 水飞蓟素在体外对某些上皮组织的肿瘤

细胞, 如前列腺癌、皮肤癌、结肠癌等有抑制作用但目前对其抗肿瘤的机制尚无统一认识^[3,4]。我们研究了水飞蓟素对乳腺癌细胞系 MCF-7及 SK-BR-3的作用, 并进一步探讨了其抑制肿瘤细胞的机制。

1 材料

1.1 乳腺癌细胞系 MCF-7, SK-BR-3均为本室冻存

* 收稿日期: 2002-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170465); 全军医学科研“十五”计划重点课题 (01Z081)

作者简介: 韩月恒 (1974-), 女, 第四军医大学生化教研室博士研究生, 主要从事肿瘤细胞的信号转导方面的研究。

Tel (029) 3374516-11 E-mail alex.han2000@sohu.com

1.2 主要试剂: RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,小牛血清为北京元亨圣马生物技术公司产品,胰蛋白酶、MTT 购自华美公司,水飞蓟素 (纯度 > 80%, HPLC 法) 由西安天行健科技发展有限公司提供,细胞培养用琼脂粉、二甲基亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品。

2 实验方法

2.1 水飞蓟素对 MCF-7, SK-BR-3 细胞的作用

2.1.1 细胞培养: MCF-7 细胞和 SK-BR-3 细胞均为贴壁细胞,用含 10% 热灭活 (55℃, 30 min) 小牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。

2.1.2 MTT 试验: 用 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA 0.02%) 消化单层培养细胞,用含有 5% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1.0×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μ L。24 h 后加入溶于 DMSO 的水飞蓟素至终浓度分别为 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.05%; 对照组加等体积的 DMSO。每组设 6 个复孔,并设空白孔调零。在上述条件下培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L, 37℃, 继续培养 4 h 终止培养,小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 150 μ L DMSO,放入酶标仪中,测量前振荡 3 min,使结晶充分溶解。选择 570 nm 滤光片,记录各孔吸光度值。以药物浓度为横坐标,细胞存活率 (试验组吸光度值 / 对照组吸光度值 \times 100%) 为纵坐标绘制生长曲线。

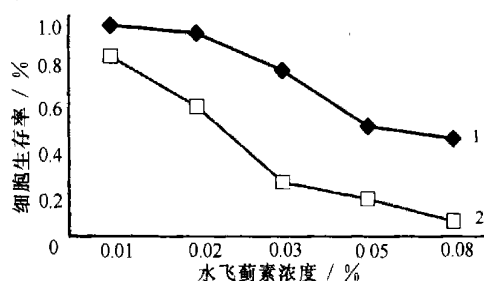
2.1.3 软琼脂克隆形成试验: 取对数生长期的 MCF-7 细胞和 SK-BR-3 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA 0.02%) 消化使之分散成为单个细胞,细胞计数,调整细胞浓度至 1×10^4 /mL。在 12 孔板中加入 0.5% 的底层琼脂 2 mL,室温静置 1 h。取 400 μ L 调整好的细胞悬液与 600 μ L 0.5% 琼脂混合均匀,制成顶层琼脂。制备过程中,保持琼脂温度为 42℃。两种细胞的悬液中分别含有 0.01%, 0.03%, 0.05% 水飞蓟素,及与溶剂等量的 DMSO 作为对照,各组设 3 个复孔。置 37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 2~3 周,倒置显微镜下观察,计数克隆形成数。

2.2 AG825 干预下水飞蓟素对 SK-BR-3 细胞的作用: 取对数生长期的 SK-BR-3 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA 0.02%) 消化使之分散成为单个细胞,细胞计数,调整细胞密度至 1×10^4 /mL。制备底层琼脂与顶层琼脂的过程同上。细胞悬液中间

别含有 1) 水飞蓟素 0.03%; 2) 水飞蓟素 0.03% + AG825 10μ mol/L; 3) 水飞蓟素 0.03% + AG825 30μ mol/L; 4) AG825 10μ mol/L; 5) AG825 30μ mol/L; 6) 与溶剂等量的 DMSO 作为对照,各组设 3 个复孔。置 37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 3 周,倒置显微镜下观察,计数克隆形成数。

3 结果

3.1 水飞蓟素对两种乳腺癌细胞的抑制作用: 药物对 MCF-7 细胞作用较强,而对 SK-BR-3 细胞只有部分抑制作用。MTT 实验测得水飞蓟素对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 约为 0.02%; 但药物浓度达到一定水平后,SK-BR-3 细胞的存活率不再随着药物浓度的增加而降低,说明水飞蓟素只能部分抑制 SK-BR-3 细胞的增殖,不能完全将细胞杀死 (图 1)。软琼脂克隆形成试验与上述 MTT 实验结果较为一致,水飞蓟素可显著抑制 MCF-7 细胞在软琼脂中形成克隆,但 SK-BR-3 细胞在药物浓度达到 0.05% 时还会有少量体积较小的细胞团出现 (图 2)。



1-SK-BR-3 2-MCF-7

图 1 水飞蓟素对乳腺癌细胞系 MCF-7, SK-BR-3 增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of silymarin in proliferation of breast cancer cell lines MCF-7 and SK-BR-3 at different degrees

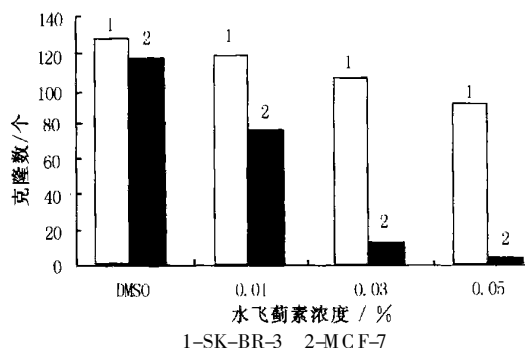
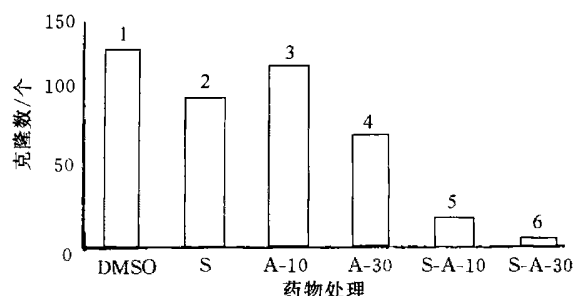


图 2 水飞蓟素对乳腺癌细胞系 MCF-7, SK-BR-3 在软琼脂中克隆形成的作用

Fig. 2 Inhibition of silymarin in colony formation of breast cancer cell lines MCF-7 and SK-BR-3 in soft agar

3.2 AG825干预下水飞蓟素对 SK-BR-3细胞的抑制作用:在 0.03% 水飞蓟素时,体系中加入不同浓度的 AG825均可导致软琼脂中 SK-BR-3细胞形成克隆数的减少,且细胞团的体积也明显减小。特别是当 AG825浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 时,其本身并不足以影响 SK-BR-3细胞在软琼脂中的生长,却可使细胞对水飞蓟素的敏感性增高。当 AG825浓度为 $30\mu\text{mol/L}$, AG825对 SK-BR-3细胞在软琼脂中的生长有一定抑制,但抑制程度也远小于水飞蓟素与相同浓度 AG825同时存在的作用。说明体系中加入 AG825对 SK-BR-3细胞产生的抑制作用不是由 AG825独自引起的,而是 AG825与水飞蓟素共同作用的结果(图 3)



1-DMSO对照组 2-水飞蓟素 (0.03%) 3-AG825 ($10\mu\text{mol/L}$)
 4-AG825 ($30\mu\text{mol/L}$) 5-水飞蓟素 (0.03%) + AG825
 ($10\mu\text{mol/L}$) 6-水飞蓟素 (0.03%) + AG825 ($30\mu\text{mol/L}$)
 1-DMSO control 2-silymarin (0.03%) 3-AG825 ($10\mu\text{mol/L}$)
 4-AG825 ($30\mu\text{mol/L}$) 5-silymarin (0.03%) + AG825
 ($10\mu\text{mol/L}$) 6-silymarin (0.03%) + AG825 ($30\mu\text{mol/L}$)

图 3 水飞蓟素与 AG825 共同作用对乳腺癌细胞系 SK-BR-3 在软琼脂中克隆的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of silymarin combined with AG825 in colony formation of breast cancer cell lines SK-BR-3 in soft agar

4 讨论

从天然植物中提取抗肿瘤药物既是中医药现代化的重要组成部分,也是基础临床医学研究的一个热点。水飞蓟素是一种黄酮类抗氧化剂,用于治疗酒精性肝硬化等肝脏疾病有确切的疗效,在体外对于某些上皮来源的肿瘤细胞如前列腺癌、皮肤癌、结肠癌等有明确的抑制作用,但其作用机制尚不清楚。有研究认为水飞蓟素是通过影响周期蛋白及相关激酶的活性起作用^[5];亦有研究认为水飞蓟素抑制 NF- κ B 的活性^[6];此外,还有研究表明,水飞蓟素的作用是通过调控 ERK1/2 信号通路完成的^[7]。

本研究在观察水飞蓟素对两种乳腺癌细胞的作用时发现, MCF-7 和 SK-BR-3 细胞对水飞蓟素的

敏感性有十分明显的差异。水飞蓟素在很低的浓度下即可对 MCF-7 细胞有很强的抑制作用,而对 SK-BR-3 细胞只有部分抑制作用,因此考虑从两种细胞蛋白表达的不同入手,研究水飞蓟素的作用机制。在这两种乳腺癌细胞中,已知表达差异的分子有很多种,其中比较重要的信号分子有 Her-2, JAK1, Rak, BRK, Syk 等^[8]。而 Her-2 分子的高表达是 SK-BR-3 细胞不同于 MCF-7 细胞的显著特征之一。Her-2, 又称 ErbB-2 为生长因子受体家族的蛋白酪氨酸激酶,是由癌基因 c-erbB 编码的,相对分子质量为 1.85×10^5 的跨膜蛋白。在临床上,乳腺癌细胞中 Her-2 的高表达与肿瘤耐药、预后较差及容易复发密切相关,因而 Her-2 的表达水平被认为是乳腺癌恶性程度及判断预后的一个重要指标^[9,10], AG825 是一种化学合成的 Her-2 抑制剂,可特异地结合于 Her-2 的底物结合位点,并能抑制 Her-2 的自身磷酸化,而对 EGFR 作用非常弱。AG825 在体外试验中对 Her-2 的 IC_{50} 为 $0.35\mu\text{mol/L}$,但由于在活细胞体系中,外来物质会受到一定的加工,因此 AG825 用于软琼脂试验的浓度是先经过 MTT 试验的初步测定(实验数据在文中未显示)。 $10\mu\text{mol/L}$ 为对 SK-BR-3 细胞无明显抑制作用的剂量, $30\mu\text{mol/L}$ 略低于 AG825 对活细胞的 IC_{50} 。AG825 与 Her-2 的持续结合降低了 Her-2 的磷酸化程度,进而减弱了其激酶活性^[11]。不同浓度 AG825 的存在可以增加 SK-BR-3 细胞对水飞蓟素的敏感性,抑制其在软琼脂中形成克隆的能力。这说明, Her-2 分子活性的改变可导致 SK-BR-3 细胞增殖能力以及对水飞蓟素敏感性的改变。

水飞蓟素对表达水平不同的乳腺癌细胞的作用有着明显的差异, MCF-7 细胞中 Her-2 分子只有基础表达量,对药物敏感, IC_{50} 可低于 0.02%; SK-BR-3 细胞高表达该分子,对药物敏感性差,虽其增殖能力可受到部分抑制,但在药物浓度很高的情况下仍有一半以上的细胞存活。而当 Her-2 的激酶活性通过 AG825 的干预减弱后, SK-BR-3 细胞对药物敏感性显著提高。因此可以推测, Her-2 分子的高表达可能是 SK-BR-3 细胞对水飞蓟素敏感性差的原因,而水飞蓟素也可能通过调节某个或某几个下游分子起作用。

References

- [1] Bosio E, Benelli C, Pirola O. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes [J]. *Pharmacol Res*, 1992, 25: 147-154.

- [2] Muzes G, Deak G, Lang L, *et al.* Effect of the bioflavonoid silymarin on the *in vitro* activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme [J]. *Acta Physiol Hung*, 1991, 78 3-9.
- [3] Zi X, Zhang J, Agarwal R, *et al.* Slibin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 5617-5620.
- [4] Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, *et al.* Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzol peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21 811-816.
- [5] Zi X L, Feyes D K, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB468 induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4 1055-1064.
- [6] Manna S K, Mukhopadhyay A, Van N T, *et al.* Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis [J]. *J Immunol*, 1999, 163 6800-6809.
- [7] Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60 1051-1059.
- [8] Meric F, Lee W P, Sahin A, *et al.* Expression protein of tyrosine kinase in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 361-367.
- [9] Kurokawa H, Lenferink A E G, Simpson J F, *et al.* HER-2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinase enhance tamoxifen action against HER-2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cell [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 5887-5896.
- [10] Ulrich H, Zong C S, Wang L H. ErbB-2-overexpressing human mammary carcinoma cells displays an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth [J]. *Oncogene*, 2001, 20 7551-7562.
- [11] Bowers G, Reardon D, Hewitt T, *et al.* The relative role of ErbB 1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20 1388-1397.

东北鹤虱中香豆素类对兔离体回肠的作用

孟 林,尹勇强,高建华,周 晶
(天津医科大学 药理教研室,天津 300070)

摘要:目的 观察东北鹤虱中香豆素类对兔离体回肠的作用及对钙离子的影响。方法 采用兔离体回肠标本,给予不同剂量香豆素 (CM) 及维拉帕米 (Ver),观察对平滑肌收缩的影响。结果 CM 和 Ver 可剂量依赖性地抑制乙酰胆碱 (Ach) 引起的回肠的收缩,非竞争性拮抗 CaCl_2 所致回肠收缩,并对 Ach 引起的第 1, 2 相收缩均有影响。结论 东北鹤虱中提取的香豆素类具有与 Ver 相似的钙拮抗作用。

关键词: 东北鹤虱;香豆素类;维拉帕米;回肠平滑肌

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0241-03

Effects of coumarin from LEG on contractivity in isolated rabbit ileum

MENG Lin, YIN Yong-qiang, GAO Jian-hua, ZHOU Jing

(Department of Pharmacology, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300070, China)

Abstract **Object** To observe the effects of coumarin (CM) and Verapamil (Ver) on contractivity and its relationship with Ca^{2+} in isolated ileal smooth muscle of the rabbits. **Methods** The effects of CM and Ver were observed in three doses by routine experimental methods in isolated rabbit ileal. **Results** CM and Ver inhibited the contraction of isolated ileal smooth muscle induced by acetylcholine and CaCl_2 . The responses were a concentration-dependent and non-competitive manner. CM and Ver were effective against the initial and sustained peak induced by acetylcholine. **Conclusion** CM has a calcium-antagonistic effect which is similar to that of Ver.

Key words *Lappula echinata* Gilib (LEG); coumarin (CM); Verapamil (Ver); ileal smooth muscle

东北鹤虱 *Lappula echinata* Gilib (LEG) 为紫草科植物东北鹤虱的果实,具有驱虫^[1]、抗炎^[2]、止泻^[3]的作用,本实验采用其果实中提取出的香豆素

类 (coumarin, CM),以兔离体回肠为标本,观察 CM 对生理激动剂乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 及氯化钙所引起的兔回肠平滑肌收缩反应的影响,

* 收稿日期: 2002-06-12

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (003608511)

作者简介: 孟 林,女,副教授,毕业于天津医科大学医学系,从事中药药理研究工作。