

· 药理与临床 ·

小檗碱抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及其与
过氧化物酶体增植物激活受体 γ 的关系章 涛^{1,2}, 李苌清¹, 杨俊卿¹, 刘颖菊¹, 万敬员¹, 周岐新^{1*}(1. 重庆医科大学药学院 药理学教研室, 重庆 400016; 2. 遵义医学院附属医院
贵州省细胞工程重点实验室, 贵州 遵义 563003)

摘要:目的 探讨小檗碱对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外生长的影响及其与过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ) 的关系, 以评价其在乳腺癌治疗中的应用潜力。方法 采用 MTT 法检测小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制效应; TUNEL 法检测细胞凋亡; 联合 PPAR γ 拮抗剂 GW9662, 分析小檗碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响与 PPAR γ 受体的关系; 实验同时采用罗格列酮作为阳性药进行平行比较分析。结果 小檗碱呈量-效和时-效关系抑制 MDA-MB-231 细胞生长, 24 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.21 μ mol/L; 小檗碱诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡作用随药物浓度的增加而增强; PPAR γ 受体拮抗剂不能逆转小檗碱对细胞增殖的抑制作用。结论 小檗碱可明显抑制 MDA-MB-231 细胞生长, 但与罗格列酮不同, 其作用不通过 PPAR γ 受体介导; 小檗碱诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的效应较罗格列酮更为显著; 小檗碱可望成为治疗乳腺癌的有效药物。

关键词: 小檗碱; MDA-MB-231 细胞; 抗肿瘤效应; 过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ)

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)02-0244-04

Anti-proliferation of berberine on human breast cancer cell line MDA-MB-231
and its relationship to PPAR γ ZHANG Tao^{1,2}, LI Chang-qing¹, YANG Jun-qing¹, LIU Ying-ju¹, WAN Jing-yuan¹, ZHOU Qi-xin¹(1. Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Chongqing Medical University,
Chongqing 400016, China; 2. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province,
Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract : Objective To investigate the anti-tumor effects and its relationship to peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) of berberine on human breast cancer cell line MDA-MB-231 in order to evaluate the potential application value of berberine for breast cancer therapy. **Methods** Cytostatic effects of berberine on MDA-MB-231 cells were measured by MTT assay. Apoptotic cells were determined by Tunel assay. MDA-MB-231 Cells were treated with berberine alone or in combination with PPAR γ antagonist GW9662 to investigate the effects of berberine on the cells proliferation and its relationship to PPAR γ . **Results** MTT Analysis detected that berberine could inhibit the growth of MDA-MB-231 cells in a concentration and time-dependent manner with IC₅₀ values of 0.21 μ mol/L at 24 h after the drug added into the culture. Apparent apoptosis of MDA-MB-231 cells induced by berberine was observed and the apoptotic rates could be going up with the concentration of berberine increased. The inhibitory effect of berberine on cell proliferation could not be reversed by PPAR γ selective antagonist GW9662. **Conclusion** In addition to inhibiting of MDA-MB-231 cells growth which was independent of PPAR γ , berberine can also induce the cells' apoptosis which suggests that berberine might be an effective and promising agent for the treatment of breast cancer.

Key words: berberine; MDA-MB-231 cells; anti-tumor effect; peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)

乳腺癌现已跃居我国女性恶性肿瘤发病数的首位,但是目前为止,对于一些类型的乳腺癌还缺乏有

* 收稿日期: 2008-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572353)

作者简介: 章 涛 (1969—), 男, 浙江省湖州市人, 副教授, 医学博士, 主要从事分子药理学和肿瘤生物治疗研究。

Tel: (0852) 8608806 E-mail: oceanzt@163.com

* 通讯作者 周岐新 E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

效的治疗方法,如雌激素受体阴性乳腺癌细胞对于激素治疗不敏感,而表达乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)的乳腺癌具有多药耐药性,化疗药物治疗效果差^[1]。寻找新的治疗途径和药物以提高尤其是特殊类型乳腺癌的治疗效果,是现阶段需要重点研究和解决的问题之一。目前,以小檗碱为主要成分的黄连生物碱(*Coptidis rhizoma* alkaloid)防治肿瘤方面的研究令人瞩目,但其药效学特点和价值仍有待于评价。本研究从细胞增殖和凋亡等方面探讨了小檗碱对雌激素受体阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外生物学效应的影响,并对其抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 的关系进行了初步探讨,为今后小檗碱临床应用于乳腺癌治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自中国科学院上海细胞库。小檗碱、MTT、PPAR γ 受体拮抗剂 GW9662 为 Sigma 公司产品;罗格列酮购自重庆康尔威药业公司(批号 2005-1);TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒为南京凯基生物公司产品;RPMI 1640 培养基、小牛血清购自 HyClone 公司;其他试剂均为分析纯。主要仪器:Coulter counter 细胞计数仪(Beckman Coulter 公司);Safire 全波长酶标仪(TECAN 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)。由于小檗碱、罗格列酮和 GW9662 难溶于水,和二甲基亚砜(DMSO)配制成 0.1 mol/L 的母液,-20℃冰箱保存备用,临用时用培养基按照所需要的终浓度稀释后使用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,常规添加青霉素(1×10^5 U/L)与链霉素(100 mg/L),于 37℃、5% CO₂ 全湿环境下培养。

1.2.2 细胞增殖抑制的 MTT 检测:取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,计数并调整密度为 1.2×10^3 /L,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中培养,15 h 后更换培养基,设置 0.1% DMSO 对照组和不同浓度小檗碱药物组(1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L),每组设 8 个复孔。继续培养 24 h 后,加入 10 μ L MTT (5 g/L) 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 100 μ L DMSO,振荡 10 min 待结晶溶解,于酶标仪上测定 570 nm 波长的吸光度(A_{570})

值,计算不同浓度小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制率[生长抑制率 = (1 - 药物组 A_{570} / 对照组 A_{570}) $\times 100\%$]。将药物浓度的对数值和抑制率拟合后计算出半数抑制浓度(IC₅₀)。根据上述实验的量-效关系结果,选择合适的小檗碱浓度,作为时-效关系分析的药物浓度,分别设置药物作用 8、16、24、48、72 h 共 5 个干预时间段,同上法进行 MTT 检测。

1.2.3 细胞增殖影响与 PPAR γ 受体关系:取对数生长期细胞,细胞计数并调整密度为 5×10^7 /L,以每孔 1 mL 接种于 6 孔板中培养。第 2 天更换含不同药物组合的新鲜培养基,包括 0.1% DMSO、1 μ mol/L 小檗碱、5 μ mol/L GW9662 以及 1 μ mol/L 小檗碱与 5 μ mol/L GW9662 联用共 4 个组,另外设 0.1% DMSO、1.0 μ mol/L 罗格列酮、5 μ mol/L GW9662 以及 1.0 μ mol/L 罗格列酮与 5 μ mol/L GW9662 联用 4 个组作为阳性对照。分别于用药后第 2、4、6 天收集细胞计数,每组计 3 个复孔,求其平均值。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡:将预铺多聚赖氨酸的盖玻片放入 6 孔培养板中,每孔接种 3×10^5 个细胞,第 2 天更换为含 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L 3 种不同浓度小檗碱的新鲜培养基。药物作用 36 h 后弃培养液,PBS 洗 1 次,4% 多聚甲醛室温固定 25 min,按照原位检测试剂盒说明操作,最后以 DAB 显色、甲基绿衬染,每个浓度作 2 个复孔。在高倍镜($\times 200$)视野下,随机选取 10 个视野,以凋亡细胞在全部细胞中所占的比例计算凋亡率。

1.2.5 统计学处理:以上实验均重复 3 次,并以罗格列酮作为阳性对照药进行平行比较分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行方差分析。

2 方法

2.1 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞体外生长抑制作用:MDA-MB-231 抑制作用随小檗碱浓度增加而加剧,呈明显的量-效关系(图 1,图 2-A),小檗碱干预细胞 24 h 的 IC₅₀ 为 0.21 μ mol/L。随着小檗碱(1×10^{-6} mol/L)作用时间的延长,MDA-MB-231 细胞的抑制效应相应增强,时-效关系明显(图 2-B)。

2.2 小檗碱抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与 PPAR γ 受体的关系:小檗碱(1 μ mol/L)给药后第 2、4、6 天的细胞计数分别为 $(1.38 \pm 0.12) \times 10^5$ 、 $(11.20 \pm 1.31) \times 10^5$ 、 $(15.07 \pm 1.60) \times 10^5$ 个/孔,

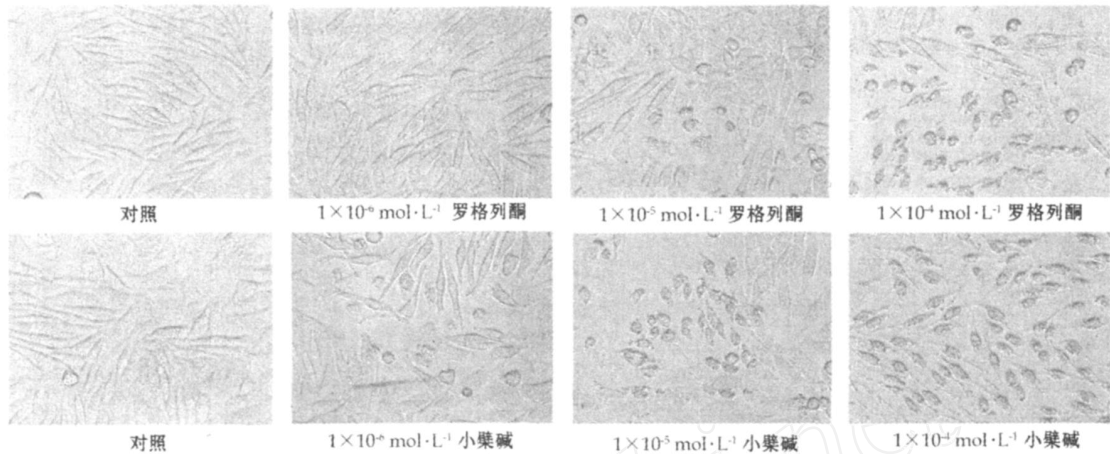
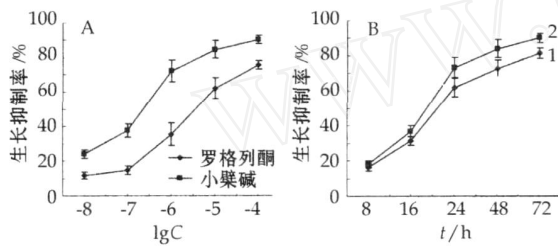


图 1 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞体外生长形态改变的影响

Fig. 1 Effect of berberine on morphological change of MDA-MB-231 cells growth in vitro



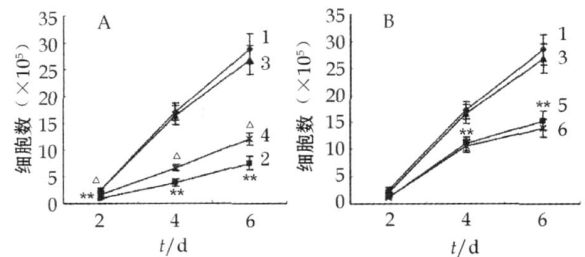
A-量-效关系 B-时-效关系 1-罗格列酮 ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2-小檗碱 ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

A-dose-dependent manner B-time-dependent manner 1-rosiglitazone ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2-berberine ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 2 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的体外增殖抑制效应 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)Fig. 2 Inhibition of berberine on proliferation of MDA-MB-231 cells in vitro ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

与 0.1% DMSO 对照组 (2.46 ± 0.44) $\times 10^5$ 、(17.10 ± 1.69) $\times 10^5$ 、(28.82 ± 2.79) $\times 10^5$ 个/孔比较,两组差异显著 ($P < 0.01$),说明小檗碱能明显抑制 MDA-MB-231 细胞增殖;而与 PPAR γ 受体拮抗剂 GW9662 ($5 \mu\text{mol/L}$) 和小檗碱 ($1 \mu\text{mol/L}$) 联用组的细胞计数 [分别为 (1.58 ± 0.19) $\times 10^5$ 、(10.81 ± 1.10) $\times 10^5$ 、(13.90 ± 1.43) $\times 10^5$ 个/孔] 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3-B),说明小檗碱抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与激活 PPAR γ 受体无关。而 GW9662 ($5 \mu\text{mol/L}$) 与罗格列酮 ($1 \mu\text{mol/L}$) 联用组的细胞计数高于罗格列酮组的细胞计数 ($P < 0.05$),说明罗格列酮抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与激活 PPAR γ 受体有关 (图 3-A)。

2.3 小檗碱诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡: TUNEL 法检测不同浓度罗格列酮作用 MDA-MB-231 细胞 36 h 后,仅 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度下即可明



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与罗格列酮组比较: $P < 0.05$

1-对照 (0.1% DMSO) 2-罗格列酮 ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3-GW9662 ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4-罗格列酮 + GW9662 5-小檗碱 ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 6-小檗碱 + GW9662

** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.05$ vs rosiglitazone group

A-control (0.1% DMSO) 2-rosiglitazone ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3-GW9662 ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4-rosiglitazone + GW9662

5-berberine ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 6-berberine + GW9662

图 3 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用与 PPAR γ 关系 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)Fig. 3 Inhibition of berberine on proliferation of MDA-MB-231 cells and its relationship to PPAR γ ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

显检测到凋亡细胞,其形态皱圆、细胞核呈棕黄色,细胞凋亡发生率为 (18 ± 3) %; 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 小檗碱干预 MDA-MB-231 细胞 36 h 后的凋亡发生率分别为 (18 ± 3) %、(60 ± 5) %、(90 ± 6) %,其致 MDA-MB-231 细胞凋亡作用显著 (图 4)。

3 讨论

迄今为止,有关中草药使用的安全性和有效性的争议,极大地限制了包括黄连在内的中药材在临床上的科学合理使用。因此,围绕中药材有效成分及药理作用机制的研究显得尤为紧迫。现有研究表明,黄连 *Coptidis rhizoma* 的有效成分是生物碱,其中小檗碱约占黄连总生物碱的 90% 左右。研究

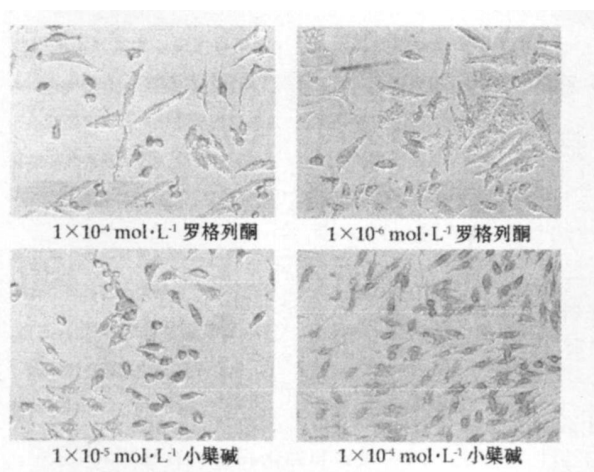


图 4 小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的凋亡作用

Fig. 4 Apoptosis of MDA-MB-231 cells induced by berberine at various concentration

显示,黄连生物碱及以黄连为主药的复方制剂具有清除自由基、降血糖和逆转糖尿病大鼠胰腺组织的病理损害、调节脂质代谢、抗消化性溃疡、阻遏神经元退行性变、防治肿瘤等作用^[2~4]。

小檗碱是黄连提取物抗细胞增殖活性的主要成分^[5]。以往研究也显示,小檗碱是黄连总碱抗肿瘤作用的主要有效成分,5 mg/L 小檗碱已对人结肠癌细胞株 HCT116 和 SW480 有显著杀伤作用^[6]。Hwang 等^[7]报道,小檗碱诱导肝癌细胞株 Hep G2 凋亡依赖于激活 caspase-8 和 caspase-3,并可明显下调抗凋亡因子 Bcl-XL 的表达。本研究针对雌激素受体阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的研究结果显示,1 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱即可明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖,随着药物浓度的提高,细胞凋亡率上升,100 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱诱导的细胞凋亡率高达 (90 $\pm$ 6) %,其抑制 MDA-MB-231 细胞增殖和诱导细胞凋亡的效应均强于罗格列酮。

近年来研究发现,由罗格列酮、吡格列酮和环格列酮等组成的噻唑烷二酮类 (thiazolidinedione, TZD) 人工合成 PPAR γ 激动剂能够抑制多种组织来源的肿瘤细胞的生长,使得激活 PPAR γ 受体极有希望成为治疗多种恶性肿瘤的新途径^[8,9]。根据小檗碱对染色体的特殊亲和力^[10],提出其抗肿瘤作用机制的靶点很可能在细胞染色体特定区域或基因位点,从而抑制肿瘤细胞生长的观点,这恰好与 PPAR γ 受体激活后结合特定 DNA 序列作用方式

一致,加之目前研究所显示的小檗碱的药理作用与 PPAR γ 配体的作用所涉及范围一致,因此,值得就小檗碱抗肿瘤等作用与 PPAR γ 关系进行研究。本研究采用特异性 PPAR γ 受体拮抗剂 GW9662 的结果显示,联用 PPAR γ 受体拮抗剂并不能逆转小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用,由此可初步确定小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用不经 PPAR γ 受体介导。

综上所述,小檗碱抑制 MDA-MB-231 细胞增殖和诱导其凋亡的效应均强于罗格列酮,但与罗格列酮不同的是,其抑制细胞增殖作用不经 PPAR γ 受体介导。这使得下一步应围绕小檗碱是否为 PPAR γ 激动剂,以及其抗肿瘤作用与另一调节细胞增殖密切相关的核受体—视黄酸受体 (RAR) 的关系等进行研究,这对最终阐明小檗碱的抗肿瘤作用机制和评价其作为治疗包括乳腺癌等肿瘤的应用潜力具有重要意义。

参考文献:

- [1] ESHRE Capri Workshop Group. Hormones and breast cancer [J]. *Hum Reprod Update*, 2004, 10(4): 281-293.
- [2] Tang L Q, Wei W, Chen L M, et al. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(1): 109-115.
- [3] 李 备, 潘永全, 刘华蓉, 等. 黄连总碱对乙醇致大鼠胃粘膜损伤保护作用及其机制研究 (英文) [J]. *中成药*, 2006, 28(1): 72-78.
- [4] Iizuka N, Hazama S, Yoshimura K, et al. Anticachectic effects of the natural herb *Coptidis Rhizoma* and berberine on mice bearing colon 26/clone 20 adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(2): 286-291.
- [5] Hara A, Iizuka N, Hamamoto Y, et al. Molecular dissection of a medicinal herb with anti-tumor activity by oligonucleotide microarray [J]. *Life Sci*, 2005, 77(9): 991-1002.
- [6] 何百成, 康 全, 杨俊卿, 等. 小檗碱抗肿瘤作用与 Wnt/ β catenin 信号转导关系 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(9): 1108-1111.
- [7] Hwang J M, Kuo H C, Tseng T H, et al. Berberine induces apoptosis through a nuncigibdrua/caspases pathway in human hepatoma cells [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(2): 62-73.
- [8] Weng J R, Chen C Y, Pinzone J J, et al. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(2): 401-413.
- [9] 章 涛, 余华荣, 杨贵忠, 等. 罗格列酮对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外抗肿瘤作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(11): 971-974.
- [10] Jung D W, Yoo G S, Choi J K. Detection of DNA in agarose gels using berberine and mordant yellow 3R [J]. *Anal Biochem*, 1999, 272(2): 254-256.