

龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响

季宇彬^{1,2*}, 刘家源^{1,2}, 高世勇^{1,2}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响。方法 MTT 法检测龙葵碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞仪分析龙葵碱对 MCF-7 细胞周期的影响以及细胞内 α -微管蛋白及微管相关蛋白 (MAP-2) 的变化。结果 龙葵碱对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 为 22.08 $\mu\text{g/mL}$, 能够将 MCF-7 细胞阻滞于 S 期; 能够增加 MCF-7 细胞内 α -微管蛋白和 MAP-2 的量。结论 龙葵碱通过升高 MCF-7 细胞内的微管蛋白及 MAP-2 的表达, 将 MCF-7 细胞阻滞于 S 期, 从而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的生长。

关键词: 龙葵碱; 乳腺癌 MCF-7 细胞; 细胞周期; 微管蛋白; 细胞增殖

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0111-04

Effects of solanine on microtubules system of human breast cancer MCF-7 cells

Ji Yu-bin^{1,2}, Liu Jia-yuan^{1,2}, Gao Shi-yong^{1,2}

1. Research Center of Life Science and Environmental Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Research Center of Natural Anticancer Drugs Engineering, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of solanine on microtubular system in MCF-7 cell line. **Methods** Proliferation inhibition of MCF-7 cell line was evaluated by MTT assay. Cell cycle of MCF-7 cells was analyzed and the changes of α -tubulin protein and microtubule-associated protein 2 (MAP-2) protein were detected by flow cytometry. **Results** The IC_{50} of MCF-7 cells was 22.08 $\mu\text{g/mL}$. Solanine could induce MCF-7 cells arrested in S phase and increase the levels of α -tubulin and MAP-2 in MCF-7 cell line. **Conclusion** Solanine could inhibit the MCF-7 cell proliferation by increasing α -tubulin and MAP-2 expression and inducing MCF-7 cells arrested in S phase.

Key words: solanine; breast cancer MCF-7 cells; cell cycle; tubulin; cell proliferation

龙葵碱 (solanine) 主要存在于茄科植物马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 块茎及龙葵 *S. nigrum* L. 全草中, 具有抗肿瘤作用。有研究显示, 龙葵碱抗肿瘤作用与其损伤肿瘤细胞线粒体和调控某些蛋白表达^[1-2]、影响肿瘤细胞膜的流动性、肿瘤细胞膜上的蛋白水平、肿瘤细胞膜唾液酸水平和肿瘤细胞膜封闭度有关^[3-4]; 也与降低某些荷瘤 (如 S_{180} 和 H_{22}) 小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值有关^[5]。本课题组前期研究显示, 龙葵碱通过线粒体途径诱导 HepG2 细胞凋亡^[6-8]。此外, 龙葵碱对消化系统^[9-11]、循环系统、神经系统^[12]、泌尿系统^[13]疾病都有一定的作用。本实验研究龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微

管系统的影响, 以探讨龙葵碱抑制肿瘤细胞生长的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

龙葵碱, 质量分数 99%, 黑龙江省药品检验所提供; 碘化丙啶 (PI), Sigma 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 天津博迪化工股份有限公司; 阿霉素, 批号: 9QL0141, 辉瑞制药有限公司; 胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 微管蛋白抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), 碧云天生物技术有限公司; 微管相关蛋白 2 (MAP-2) 抗体, 武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清, 杭州四季青

收稿日期: 2011-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400591); 教育部博士点基金项目 (200802400001); 黑龙江省博士后资助项目 (LBHZ09094); 黑龙江省研究生创新基金项目 (YJSCX2011-199HSD)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 教授, 博士 (后), 博士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物研究。E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

*通讯作者 季宇彬 E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

生物工程公司; MTT, Molecular Probe 公司。

1.2 细胞株

人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 由哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所博士后科研工作站传代保种。

1.3 主要仪器

CO—150 型二氧化碳细胞培养箱, 美国 NBS 公司; DL—CJ—1N 型超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; EPICS—XL 型流式细胞仪, 美国 Beckman-Coulter 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 人乳腺癌细胞以适量浓度接种于培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C 恒温、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养, 细胞贴壁生长, 每 2~3 d 传代 1 次, 传代时首先倒出培养液, PBS 洗 3 次, 胰酶消化后, 加入新鲜的培养液吹打均匀, 调整细胞浓度至适当, 移至新的培养瓶中, 添加培养液至适量。

2.2 MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞浓度至 2×10^4 /mL, 接种于 96 孔培养板, 24 h 后加入龙葵碱, 使终质量浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL, 阴性对照组仅加入含 RPMI 1640 全培养基, 阳性对照组加入阿霉素(终质量浓度分别为 0.25、1、4、16、64 μ g/mL), 每一质量浓度设 6 个平行孔。培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 200 μ L, 37 °C 孵育 4 h, 弃上清液, 加 DMSO 150 μ L 溶解后, 于 570 nm 测定吸光度 (*A*) 值。

2.3 流式细胞术检测 MCF-7 细胞周期

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞浓度至 2×10^5 /mL, 接种于 6 孔板中, CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入龙葵碱, 使终质量浓度分别为 2、4、8 μ g/mL, 阴性对照组加入含 RPMI 1640 全培养基, 阳性对照组加入阿霉素 5 μ g/mL。培养 24 h 后, 弃上清液, 胰酶消化后于 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS 洗 1 次, 加 70% 冰乙醇固定过夜, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入配制好的含 RNA 酶的 PI 染液, 染色 30 min 后流式细胞仪检测, 计数 1×10^4 个细胞。

2.4 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞 α -微管蛋白表达

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 以 2×10^5 /mL

接种 6 孔板中, 24 h 后加入龙葵碱, 使终质量浓度分别为 1、2、4 μ g/mL, 作用 24 h 后吸出培养板中培养液, PBS 洗 3 次, 胰酶消化后, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 吸出固定液, PBS 洗 3 次后加入含 0.1% TritonX-100 和 1% BSA 的 PBS 封闭液, 37 °C 湿盒孵育 30 min; 吸去封闭液, 加入 1:500 稀释的 α -微管蛋白鼠抗人单克隆抗体, 4 °C 湿盒孵育过夜, 吸出一抗工作液, PBS 洗 3 次后加入 1:200 稀释的山羊抗小鼠 IgG-FITC, 37 °C 湿盒避光孵育 60 min, 吸出二抗工作液, PBS 避光洗 3 次, 加 PBS 1 mL 重悬于流式管中, 上机检测, 计数 1×10^4 个细胞。

2.5 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞 MAP-2 蛋白表达

细胞封闭完成后, 加入 1:200 稀释的 MAP-2 鼠抗人单克隆抗体, 其他方法同“2.4”项。

2.6 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验对数据进行统计学分析。

3 结果

3.1 对 MCF-7 细胞增殖的影响

龙葵碱对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 为 22.08 μ g/mL, 阿霉素的 IC₅₀ 为 4.87 μ g/mL, 表明龙葵碱对 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖具有较好的抑制作用。结果见图 1。

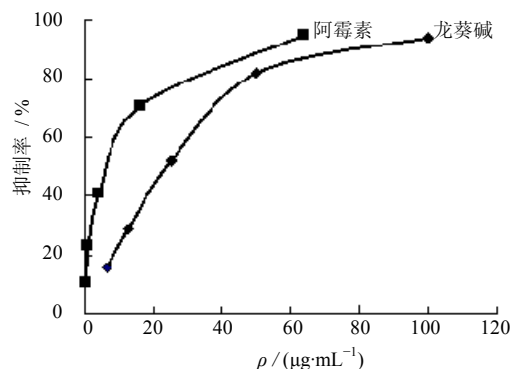


图 1 龙葵碱对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of solanine on cell proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 对 MCF-7 细胞周期的影响

流式细胞仪分析结果显示, 不同质量浓度的龙葵碱分别作用于 MCF-7 细胞 24 h 后, G₀/G₁ 期的细胞明显减少, S 期细胞明显增多并与药物质量浓度呈正相关。结果见表 1。

3.3 对乳腺癌 MCF-7 细胞 α -微管蛋白的影响

3.3.1 对乳腺癌 MCF-7 细胞 α -微管蛋白表达的影响

表 1 龙葵碱对 MCF-7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Effects of solanine on cell cycle of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞周期分布 / %		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	50.20±0.39	28.99±0.56	20.81±0.17
龙葵碱	2	0.83±0.30	63.79±3.02**	36.05±2.79
	4	1.23±0.15	65.28±2.10**	33.49±1.98
	8	1.11±0.13	75.10±2.58**	23.78±2.65
阿霉素	5	10.66±1.06	52.90±3.47**	36.44±2.71

与对照组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

龙葵碱 1、2、4 $\mu\text{g/mL}$ 作用于 MCF-7 细胞 24 h 后, α -微管蛋白的表达随药物质量浓度的升高而增加, 见表 2。

3.3.2 对乳腺癌 MCF-7 细胞 MAP-2 蛋白表达的影响 龙葵碱 1、2、4 $\mu\text{g/mL}$ 作用于 MCF-7 细胞 24 h 后, MAP-2 蛋白的表达随药物质量浓度的升高而增加, 见表 2。

表 2 龙葵碱对 MCF-7 细胞 α -微管蛋白和 MAP-2 表达的影响Table 2 Effect of solanine on expression of α -tubulin and MAP-2 in MCF-7 cells

组 别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	α -微管蛋白 / %	MAP-2 / %
对照	—	46.1	29.5
龙葵碱	1	51.4	33.5
	2	52.9	38.2
	4	71.8	43.3
阿霉素	5	48.6	27.8

4 讨论

龙葵碱对人肝癌有较好的抑制作用^[7,14-15], 而有关龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞的研究还较少, 作用机制也不明确。本实验选用乳腺癌 MCF-7 细胞, 从细胞周期及微管蛋白角度研究龙葵碱对乳腺癌增殖的抑制作用及其机制。

微管存在于所有真核细胞中, 是由微管蛋白及少量微管相关蛋白组成的亚稳定态管状细胞器。作为细胞骨架的基本成分之一, 微管参与许多生物学过程, 对细胞形状的维持、细胞信号转导、细胞分裂、细胞运动都具有重要意义。 α -微管蛋白是微管结构中最重要蛋白质之一, 而 MAP-2 也已被证实是维持微管正常结构和稳定微管的重要蛋白质, 无论是正常细胞还是肿瘤细胞都依赖于细胞周期的正常运行, 而有丝分裂进程中微管蛋白和微管相关

蛋白的改变对细胞周期产生影响。大多数以微管为作用靶点的抗肿瘤药物, 如紫杉醇、长春新碱、秋水仙碱等诱导有丝分裂阻滞, 使细胞生长停滞于 G₂/M 期, 而近年来发现一些化合物, 如环状乙基酯系列衍生物和天然产物 artelastin 等亦能使细胞周期阻滞于 S 期^[16-19]。

本实验通过 MTT 法测得龙葵碱对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 为 22.08 $\mu\text{g/mL}$, 表明龙葵碱对 MCF-7 细胞有较好的细胞毒活性; 流式细胞仪检测显示, 龙葵碱作用 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞百分比明显减少, S 期细胞百分比明显增多并呈一定的质量浓度相关性, 因此推断龙葵碱可能引起 MCF-7 细胞阻滞在 S 期。细胞周期阻滞与细胞周期相关蛋白有密切的关系, 其中 α -微管蛋白和 MAP-2 与 S 期阻滞有一定的关系, 因此采用流式细胞术, 经抗体特异性标记 MCF-7 细胞内 α -微管蛋白和 MAP-2, 观察龙葵碱对 MCF-7 细胞这两种相关蛋白的影响, 结果表明经龙葵碱作用后, 细胞内 α -微管蛋白和 MAP-2 的量均增加, 表明龙葵碱能够促进 α -微管蛋白和 MAP-2 的合成, 进而使细胞内微管系统发生紊乱, 最终引起细胞周期阻滞, 发挥其抗肿瘤作用。龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞内微管系统具体的作用机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 高世勇, 徐丽丽, 季宇彬. 龙葵碱调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 caspase-3 活性诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1607-1612.
- [2] 高世勇, 徐丽丽, 季宇彬. 龙葵碱调控还原型谷胱甘肽和活性氧氧化还原体系损伤线粒体 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1779-1784.
- [3] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响 [J]. 中草药, 2005,

- 36(2): 239-241.
- [4] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 79-81.
- [5] 季宇彬, 王宏亮, 高世勇, 等. 龙葵碱对荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1200-1202.
- [6] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and [Ca²⁺]_i in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(21): 3359-3367.
- [7] 季宇彬, 高世勇. 龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的线粒体通路研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(4): 272-275.
- [8] 季宇彬, 吴盼, 朗朗, 等. 龙葵碱对小鼠睾丸生殖细胞线粒体损伤的研究 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 117-120.
- [9] Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, et al. Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* Linn against CCl₄-induced hepatic damage in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(11): 1618-1619.
- [10] Moundipa I F, Dorrmgang F M. Effect of the leafy vegetable *Solanum nigrum* on the activities of liver drug-metabolizing enzymes after aflatoxin B₁ treatment in female rats [J]. *Br J Nutr*, 1991, 65(1): 81-91.
- [11] Akhtar M S, Munir M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 1989, 27(12): 163-176.
- [12] Perez R M, Perez J A, Garcia L M, et al. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit [J]. *J Ethnopharmacol*, 1998, 62(1): 43-48.
- [13] 夏海岩, 宣文虎. 龟板龙葵汤治疗血尿 30 例 [J]. 辽宁中医学院学报, 1999, 3(1): 34-36.
- [14] 季宇彬, 高世勇, 汲晨锋, 等. 龙葵碱对 HepG₂ 人肝癌细胞 NAT 酶动力学常数的影响 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1187-1191.
- [15] 高世勇, 王秋娟, 季宇彬, 等. 龙葵碱对 HepG₂ 细胞内 caspase-3 及 Bcl-2 蛋白含量的影响 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(3): 224-229.
- [16] Davis A, Jiang J D, Middleton K M, et al. Novel suicide ligands of tubulin arrest cancer cells in S-phase [J]. *Neoplasia*, 1999, 1(6): 498-507.
- [17] Jiang J D, Denner L, Ling Y H, et al. Double blockade of cell cycle at G₁-S transition and M phase by 3-iodoacetamido benzoyl ethyl ester, a new type of tubulin ligand [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6080-6088.
- [18] 黄歆, 杨尚金. 与微管作用的抗肿瘤天然产物的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 1-5.
- [19] Pedro M, Ferreira M M, Cidade H, et al. Artelastin is a cytotoxic prenylated flavone that disturbs microtubules and interferes with DNA replication in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(3): 293-311.