

桦褐孔菌醇诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的分子机制研究

王李俊¹, 杨 琴¹, 王 飞², 朱 盼¹

1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

2. 南昌大学抚州医学院, 江西 抚州 344000

摘 要: **目的** 研究真菌桦褐孔菌中的代表化合物桦褐孔菌醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞的作用, 为桦褐孔菌及桦褐孔菌醇在抗肿瘤方面的临床应用提供新的依据。**方法** 桦褐孔菌醇由传统植物化学方法从桦褐孔菌中提取分离得到。乳腺癌细胞系 MCF-7 与不同浓度的桦褐孔菌醇共孵育, 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞存活率; 流式细胞术 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡; Western blotting 法检测半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和多聚 ADP-核糖聚合酶 (Poly ADP ribose polymerase, PARP) 蛋白表达情况。**结果** 桦褐孔菌醇能够抑制 MCF-7 细胞的生长, 并可诱导 MCF-7 细胞产生凋亡。浓度为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的桦褐孔菌醇作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率显著增加至 28.62%、39.45%、53.18%, 明显高于对照组凋亡率 (3.21%); 经过 50 $\mu\text{mol/L}$ 桦褐孔菌醇分别处理 12、24、48 h 后, MCF-7 细胞 Caspase-3 的活性形式 cleaved Caspase-3 表达量显著增加; 凋亡蛋白标志物 PARP 裂解量升高, 且呈时间依赖性。**结论** 桦褐孔菌醇能抑制 MCF-7 细胞的增殖并诱导其凋亡, 其作用机制推测与激活细胞 Caspase-3 和 PARP 有关。

关键词: 桦褐孔菌醇; 桦褐孔菌; 乳腺癌; 凋亡; 半胱氨酸蛋白酶 3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)06-0970-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.019

Induction of human MCF-7 breast cancer cell apoptosis by *Inonotus obliquus* and study on its mechanism

WANG Li-jun¹, YANG Qin¹, WANG Fei², ZHU Pan¹

1. JiangXi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

2. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000, China

Abstract: **Objective** To study the induction of human MCF-7 breast cancer cell apoptosis by inotodiol isolated from *Inonotus obliquus*, a traditional Chinese medicinal fungi. **Methods** Inotodiol was isolated from the crude ethanol extract of *I. obliquus* and purified. Inotodiol at different concentration and human breast cancer MCF-7 cell line were co-incubated. Relative cell viabilities were determined by MTT method; apoptosis was analyzed by Annexin V/PI dual staining with flow cytometry; The protein expression levels of Caspase-3 and Poly ADP ribose polymerase (PARP) were detected by Western blotting. **Results** Inotodiol reduced the viability of MCF-7 cells dose- and time-dependently. Moreover, inotodiol induced the apoptosis in MCF-7 cells. The data of Western blotting showed that inotodiol up-regulated the expression levels of cleaved Caspase-3 and PARP, in a time-dependent manner. **Conclusion** Inotodiol could induce apoptosis in human breast cancer cells, which provides novel information for clinical application of inotodiol and its preparations for the breast cancer patients.

Key words: inotodiol; *Inonotus obliquus* (Fr.) Pila; breast cancer; apoptosis; Caspase-3

乳腺癌是女性最常见的癌症之一。虽然临床上有多重化学合成药物如他莫昔芬、雷洛昔芬、托瑞米芬等已被广泛用于乳腺癌患者的治疗^[1], 但是由于这些药物具有毒性大、容易耐药等问题, 临床效果不理想, 目前临床上仍然亟需高效、低毒、特异

性的乳腺癌治疗药物。

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pila 又名白桦茸, 生于白桦、银桦、榆树、赤杨等的树皮或活立木的树皮或砍伐后树木的枯干上。现代植物化学研究发现, 桦褐孔菌中的主要化学成分为三萜类、甾

收稿日期: 2015-12-15

作者简介: 王李俊 (1981—), 男, 江西东乡人, 硕士, 讲师, 主管中药师, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (0794)8228608 E-mail: www736@163.com

体、多酚、多糖等^[2-3]。近年国内外学者研究发现桦褐孔菌提取物具有多种生物学活性,包括抗衰老、降血糖、降血压、抗肿瘤等,特别是其抗肿瘤活性受到很大的关注^[4],且并未表现出明显的生理毒性^[5]。但是具体作用机制尚不清楚。本研究以人乳腺癌细胞系为研究对象,研究桦褐孔菌中量最多的三萜类化合物桦褐孔菌醇对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖与凋亡的影响,拟揭示其抗乳腺癌的作用机制。

1 材料

1.1 真菌原料

桦褐孔菌采自黑龙江省牡丹江市镜泊湖火山口桦树的树干,由江西省科学院生物资源研究所金志农研究员鉴定为 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pila 子实体

1.2 细胞与试剂

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; RPMI 1640 培养液购自北京四季青生物材料研究所; 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司; 胎牛血清购自 Invitrogen 公司; AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于 Bender 公司; 细胞浆蛋白抽提试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂 (分析纯) 购于北京试剂厂。

1.3 实验仪器

UV-3600Plus 分光光度计 (岛津企业管理有限公司); DYY-6D 三恒电泳仪 (北京市六一仪器厂); YQX-II 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); BD FACSCanto II 流式细胞仪 (上海碧迪医疗器械有限公司); DW-86L30 超低温冰箱 (杭州艾普仪器设备有限公司); METTLER XS205 微量分析天平 (南京皓海科学仪器仪表有限公司); HNY-200B 台式全温度恒温高速培养摇床 (北京傲松欣实验室设备有限公司); Eppendorf-5424 小型高速离心机 (北京东南仪诚实验室设备有限公司); MLS-3751L 高压蒸汽灭菌锅 (松下健康医疗器械株式会社); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 桦褐孔菌醇的制备

桦褐孔菌子实体经加热回流提取法制备桦褐孔菌醇。取 40 g 桦褐孔菌子实体,加 95%乙醇 3.0 L 加热回流提取 3 次,每次 30 min,合并提取液后滤过除渣,制成桦褐孔菌粗提物溶液,减压浓缩至干。再通过硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮为洗脱剂梯度洗脱,分段收集,再经过重结晶,得到纯品桦褐孔菌

醇 (质量分数 99%, HPLC),以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解,用 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养

将 MCF-7 细胞培养于 RPMI 1640 培养液 (含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内,取对数生长期细胞用于实验。

2.3 细胞增殖抑制实验

取 1×10^5 /mL 对数生长期的 MCF-7 细胞,分别接种于 96 孔板 (200 μ L/孔),细胞贴壁后每孔加入终浓度为 0、25、50、100 μ mol/L 的桦褐孔菌醇。各浓度均设 5 个复孔,分别继续培养 24、48、72 h,以同体积 RPMI 1640 培养液为空白对照。于各组实验结束前 4 h 加入 MTT 试剂 20 μ L/孔,继续孵育 4 h,吸弃上清,加入 DMSO 150 μ L/孔,摇床上振荡 10 min,待结晶完全溶解后酶标仪上检测 570 nm 处的吸光度 (*A*) 值,计算细胞存活率。

细胞存活率 = 实验组平均 *A* 值 / 对照组平均 *A* 值

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 MCF-7 细胞,以 1×10^6 /mL 浓度接种于 6 孔培养板内,待细胞贴壁后分别加入终浓度为 0、25、50、100 μ mol/L 的桦褐孔菌醇培养液,培养 48 h 后,收集细胞,离心固定后加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光染色。筛网滤过后送流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。

2.5 Western blotting 法检测蛋白表达量的变化

细胞分别以 50 μ mol/L 的桦褐孔菌醇处理 12、24、48 h 后收集细胞,参照试剂盒说明书进行细胞浆蛋白抽提操作,提取细胞总蛋白并测定浓度,蛋白样品加入 1/5 体积的 5 $\times$ 上样缓冲液,沸水煮沸 5 min,根据蛋白浓度以 20 μ g/孔上样,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,分别加入 1:1 000 稀释的半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 蛋白,4 $^{\circ}$ C 过夜。 β -actin 作为内参, TBST 洗膜 3 次,加入 1:1 000 稀释的辣根酶标记的兔抗山羊 IgG,室温孵育 2 h,同样洗膜 3 次, ECL 发光液显色,观察各条带深浅变化。

2.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对乳腺癌细胞活力的影响

如图 1 所示, 桦褐孔菌醇分别处理 24、48、72 h, 在 25~100 $\mu\text{mol/L}$ 均可不同程度抑制 MCF-7 细胞活力, 且随着桦褐孔菌醇浓度的升高和处理时间的延长, 抑制细胞活力的作用也逐渐增强, 呈浓度和时间依赖效应。

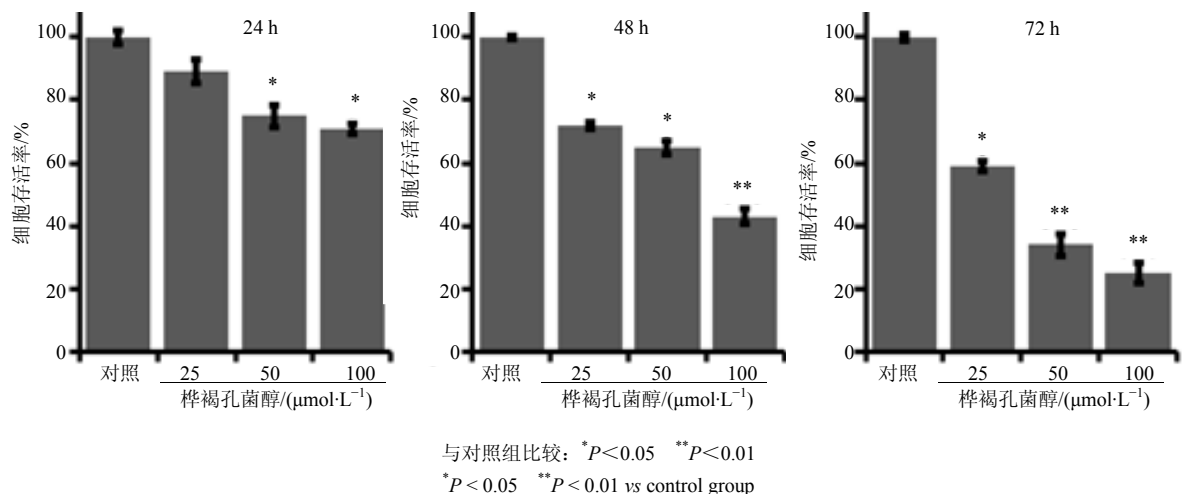


图 1 桦褐孔菌醇对 MCF-7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effect of inotodiol on cell viability of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

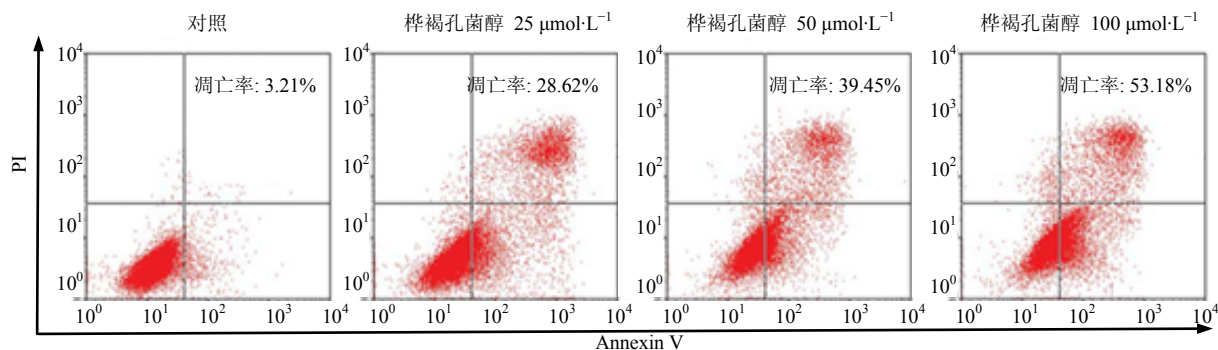


图 2 桦褐孔菌醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of inotodiol on cell apoptosis of MCF-7 cells

3.3 对 MCF-7 细胞内的蛋白表达量的影响

通过 Western blotting 测定, 发现未用桦褐孔菌醇处理的 MCF-7 细胞中 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 几乎没有表达。桦褐孔菌醇 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 MCF-7 细胞 12、24、48 h 后, MCF-7 细胞 cleaved Caspase-3、cleaved PARP 表达量浓度依赖地增加 (图 3)。

4 讨论

全球乳腺癌患者发病率一直呈上升趋势。中国虽不是乳腺癌的高发国家, 但近年乳腺癌发病率的增长速度很快。全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率已

3.2 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, 桦褐孔菌醇能诱导 MCF-7 细胞凋亡。如图 2 所示, 桦褐孔菌醇 (终浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞凋亡 (早期凋亡+晚期凋亡) 率分别为 28.62%、39.45%、53.18%, 明显高于对照组凋亡率 (3.21%), 且其作用具有明显剂量依赖性。

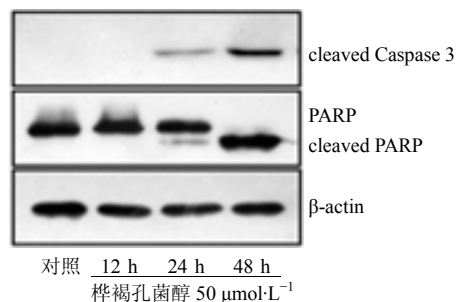


图 3 桦褐孔菌醇对 MCF-7 细胞中 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of inotodiol on protein expression of cleaved Caspase-3 and PARP in MCF-7 cells

经位居女性恶性肿瘤的第1位。乳腺癌患者最佳治疗手段的选择依然面临很大的挑战^[6]。天然药物(包括中医药和民族医药)是用来防治疾病的有力武器,与化学药品相比,天然药物除了有着来源广泛、价格低廉和毒副作用低等优点外,在减轻癌症患者临床症状,提高生存质量,提高免疫力,增强放、化疗敏感性,减轻放、化疗不良反应等很多方面都具有优势。近年来中药及其有效部位或成分抗癌研究工作取得了一系列的成果,已成为肿瘤医学的研究热点之一^[7]。

近年来,从真菌的药用植物次生代谢产物中已分离出许多活性较高的生物活性物质,这表明药用植物内生真菌已成为药物开发的重要资源。目前,从植物内生菌尤其是药用植物细菌中发现了很多具有开发前景的抗肿瘤活性成分,这为寻找高活性的抗肿瘤化合物具有重要意义。

桦褐孔菌主要分布于俄罗斯、芬兰、波兰、日本北海道等地区 and 我国黑龙江与吉林一带。在民间,桦褐孔菌应用于防止癌细胞转移、复发,增强免疫能力,配合恶性肿瘤患者的放疗、化疗,增强病人的耐受性,减轻毒副作用^[4,8-9],但是具体的作用机制尚不明确。本研究选择人乳腺癌细胞为研究对象,检测桦褐孔菌中的代表性化合物桦褐孔菌醇的抗肿瘤作用,旨在揭示桦褐孔菌在乳腺癌治疗中的作用机制。通过MTT实验,发现桦褐孔菌醇可显著降低MCF-7细胞活力(呈时间及剂量依赖性)。进而通过流式细胞术发现桦褐孔菌醇可以诱导MCF-7细胞凋亡。

Caspase家族蛋白的激活在细胞凋亡过程中起关键性作用,被认为是诱发凋亡的直接效应物^[10]。已发现的Caspase家族有10余种,其中Caspase-3是该家族的重要成员,是细胞凋亡过程中的关键酶。PARP是Caspase的切割底物,在DNA损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用^[11]。本研究通过Western blotting实验发现,桦褐孔菌醇呈时间依赖性地增加MCF-7细胞中Caspase-3的活性形式cleaved Caspase 3和cleaved PARP的表达量。提示桦褐孔菌醇可能是通过增强细胞Caspase活性从而促进细胞凋亡。

综上所述,桦褐孔菌醇具有抗肿瘤作用。本研究为临床应用药用真菌制品治疗乳腺癌患者提供了一定的参考,也为更合理使用桦褐孔菌及其制剂提供了新的依据。

参考文献

- [1] Makki J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance [J]. *Clin Med Insights Pathol*, 2015, 8(1): 23-31.
- [2] Zhao F Q, Mai Q Q, Ma J H, *et al.* Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101(1): 34-40.
- [3] 张仕瑾, 谢运飞, 谭玉柱, 等. 桦褐孔菌三萜类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(16): 2355-2360.
- [4] Ma L, Chen H, Dong P, *et al.* Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* [J]. *Food Chem*, 2013, 139(1/4): 503-508.
- [5] 束庆玉, 杨开, 郭安琪, 等. 桦褐孔菌水提物的安全性评价研究 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(3): 238-245.
- [6] Zhou Z R, Mei X, Chen X X, *et al.* Systematic review and meta-analysis comparing hypofractionated with conventional fraction radiotherapy in treatment of early breast cancer [J]. *Surg Oncol*, 2015, 24(3): 200-211.
- [7] Ye L, Jia Y N, Ji K, *et al.* Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1240-1250.
- [8] Chen Y Y, Huang Y R, Cui Z M, *et al.* Purification, characterization and biological activity of a novel polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79(1): 587-594.
- [9] Nagajyothi P C, Sreekanth T V M, Lee J I, *et al.* Mycosynthesis: antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of silver nanoparticles synthesized from *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) extract [J]. *J Phytochem Phyto Biol B*, 2014, 130(1): 299-304.
- [10] Chen H, Yang X, Feng Z, *et al.* Prognostic value of Caspase-3 expression in cancers of digestive tract: a meta-analysis and systematic review [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 10225-10234.
- [11] O'Connor M J. Targeting the DNA damage response in cancer [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 547-560.