

异乌药内酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制作用及其机制研究

刘自尧^{1,3}, 杨芳¹, 赵崇妍¹, 杨鹏硕¹, 连增林^{3*}, 史新元^{1,2*}

1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

3. 北京亦创生物技术产业研究院, 北京 101111

摘要: 目的 研究异乌药内酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长的抑制作用及其作用机制。方法 体外培养 MCF-7 细胞, 分为对照组及不同浓度异乌药内酯处理组。采用 MTT 实验检测异乌药内酯对 MCF-7 细胞增殖的影响; 采用流式细胞术和 TUNEL 染色法检测异乌药内酯对 MCF-7 细胞周期、线粒体膜电位及细胞凋亡的影响; 采用 Western blotting 法检测与细胞凋亡密切相关的蛋白表达情况。结果 异乌药内酯以时间和剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞增殖、促进细胞凋亡; 能够将 MCF-7 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 诱导线粒体膜电位去极化; 上调 cleaved Caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 表达, 抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 诱导 MCF-7 细胞的凋亡。结论 异乌药内酯对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用呈剂量和时间依赖性, 其作用机制可能是通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

关键词: 异乌药内酯; MCF-7 细胞; 增殖抑制; 凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12-2922-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.026

Inhibitory effect of isolinderalactone on growth of human breast cancer MCF-7 cells and its mechanism

LIU Zi-yao^{1,3}, YANG Fang¹, ZHAO Chong-yan¹, YANG Peng-shuo¹, LIAN Zeng-lin³, SHI Xin-yuan^{1,2}

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. Yichuang Biotechnology Industry Research Institute, Beijing 101111, China

Abstract: **Objective** To study the effects and the mechanism of isolinderalactone on inhibiting the growth of human breast cancer MCF-7 cells. **Methods** Human breast cancer MCF-7 cells were cultured *in vitro* and treated respectively with indicated concentrations of isolinderalactone by cell culture technique. The proliferation rate was detected by MTT method; Flow cytometry and TUNEL assay were used to observe the effects of isolinderalactone on cell cycle, mitochondrial membrane potential and apoptosis in MCF-7 cells; The apoptosis related protein expression levels were determined by Western blotting. **Results** Isolinderalactone significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells by inducing cell apoptosis in a time and concentration dependent manner and induced cell cycle arrest at G₂/M phases. The mitochondrial membrane potential was depolarized; And isolinderalactone up-regulated the expressions of apoptosis related proteins Bax and cleaved Caspase-3 and down-regulated the expressions of apoptosis related proteins Bcl-2. **Conclusion** Isolinderalactone shows obvious anti-cancer activities by inducing cell apoptosis. The mechanism of inducing apoptosis may be associated with the reduction of mitochondrial membrane potential and activation of caspase pathway.

Key words: isolinderalactone; MCF-7 cells; proliferation inhibition; apoptosis; mitochondrial membrane potential

乳腺癌是全球最常见的恶性肿瘤, 是导致癌症死亡的第 2 大原因^[1]。尽管在乳腺癌治疗方面取得了重大进展, 如激素治疗、化疗、放疗和手术, 但

由于乳腺癌的耐药性和转移, 该疾病的发病率和死亡率仍在持续上升^[2-3]。此外, 乳腺癌对化疗有很强的抵抗力。因此, 迫切需要寻求新的治疗策略并开

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473364); 北京市科委科技新星交叉学科项目 (xxhz201210)

作者简介: 刘自尧 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为抗肿瘤药理学。E-mail: 993460669@qq.com

*通信作者 史新元, 女, 博士生导师, 研究方向为中药发酵生物技术研究。E-mail: xyshi@126.com
连增林, 男, 研究员, 研究方向为中药学。E-mail: zenglinlian@yahoo.com.cn

发具有低毒性的新型药物以预防和治疗乳腺癌。近年来研究发现,许多传统中药有效成分均有明显的抗肿瘤活性^[4]。因此,从中药中寻找有效的乳腺癌防治药物迫在眉睫,特别是高效、低毒的天然产物更具应用价值。

乌药为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的块根,具有行气止痛、温肾散寒作用,是临床常用中药之一。异乌药内酯是从乌药中提取出的主要有效成分。现代药理学研究表明,异乌药内酯具有增强机体免疫、抗病毒及抗肿瘤等多种生物活性^[5-6]。研究报道,异乌药内酯对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用^[7-8],但其具体作用机制尚不明确。本研究选择人乳腺癌 MCF-7 细胞,研究异乌药内酯对其生长的影响及可能的机制。

1 材料

1.1 药品

异乌药内酯购自上海生物科技有限公司(批号 R25S8F44642,质量分数为 98%),使用时用二甲基亚砜(DMSO)溶解,并使 DMSO 终浓度 $\leq 0.1\%$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2 细胞与试剂

MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自杭州四季青公司;MEM 培养基购自 Gibco-BLR 公司;青霉素、链霉素、二甲基亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)均购自于北京索莱宝生物科技有限公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、一步法 TUNEL 凋亡检测试剂盒和 DAPI 染色液均购自于上海碧云天生物技术有限公司;抗体 Bax、Bcl-2、和 cleaved Caspase-3 均购于 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器

ACEA Novocyte 流式细胞仪(美国艾森生物科学公司);Leica DMI4000B 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);Thermo Fisher Multiskan FC 酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);Mini protean Tetra system 型蛋白电泳槽、Power Pac Basic 型电转装置、ChemiDoc MP 全能型成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

MCF-7 细胞培养于含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液的 MEM 培养液中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,每 48 h 传代 1 次。将对

数生长期 MCF-7 细胞消化,调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,设空白组、对照组和异乌药内酯不同浓度(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000 $\mu\text{mol/L}$)组,每组均设 4 个复孔。待细胞贴壁后,空白组不接种细胞只加入完全培养基,对照组接种细胞并加入等体积溶媒(0.1% DMSO),药物组分别加入不同浓度异乌药内酯处理。分别培养 24、48、72 h 后加入 10 μL 的 MTT 试剂,孵育 3 h 后,酶标仪 570 nm 测定吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的 MCF-7 细胞,以 2.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板内。待贴壁后加入含不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)异乌药内酯的完全培养基 2 mL 作用 48 h,收集细胞,加入预冷的 70%乙醇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定约 4 h。收集细胞,加入 PI, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,将处理好的细胞用流式细胞仪检测,结果用 NovoExpress 软件分析。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 MCF-7 细胞,按照 2.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板中。待贴壁后加入含不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)异乌药内酯的完全培养基 2 mL 作用 48 h。药物作用结束后,用 0.25%胰蛋白酶(不含 EDTA)消化细胞,并离心收集后用预冷的 PBS 清洗;然后以 $1\times$ Binding Buffer 100 μL 重悬细胞。各组加入 FITC Annexin V 5 μL 轻轻混匀,然后加入 10 μL 的 PI 染色液,室温避光孵育约 20 min。置于冰浴,流式细胞仪检测,结果用 NovoExpress 软件分析。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

对数生长期的 MCF-7 细胞按照 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞长到 70%~80%时,加入含异乌药内酯 40 $\mu\text{mol/L}$ 的完全培养基 2 mL 处理细胞,孵育 48 h 后, PBS 洗涤 2 次,4%多聚甲醛固定细胞 30 min,使用 0.3% Triton X-100 透化 5 min,每孔加入 50 μL 的 TUNEL 检测液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h 后,使用 DAPI 染色液室温避光孵育 5 min,将处理好的细胞用荧光显微镜拍照。

2.5 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位

将对数生长期的 MCF-7 细胞按照 2.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板中。待贴壁后加入含不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)异乌药内酯的完全培养基 2 mL 作用 48 h,药物作用结束后,用 0.25%胰蛋白酶消化

细胞,并离心收集后用预冷的 PBS 清洗,0.5 mL 细胞培养液重悬细胞。各组加入 JC-1 染色液,颠倒数次混匀,细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min。孵育结束后用 JC-1 染色缓冲液重悬细胞,将处理好的细胞用流式细胞仪检测,结果用 Novo Express 软件分析。

2.6 Western blotting 法检测蛋白表达

收集处于对数期生长的 MCF-7 细胞重悬,以 3×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中。以含不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 异乌药内酯的完全培养基 2 mL 处理细胞,培养 48 h,向培养皿中加入 150 μL RIPA 裂解液 (含 1% PMSF),用细胞刮收集细胞裂解物至预冷 EP 管内,4 °C、12 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度,制备上样样品,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后,转膜,封闭 2 h。加入一抗 Bcl-2 (1:3 000)、Bax (1:3 000) 及 cleaved Caspase-3 (1:3 000),4 °C 反应过夜。次日,洗膜后加入二抗 (1:5 000),室温反应 1 h,化学发光法显影。

2.7 数据分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图并进行统计分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用单因素方差分析法 (ANOVA) 进行组间比较。

3 结果

3.1 异乌药内酯对细胞增殖的影响

与对照组比较,异乌药内酯能显著抑制 MCF-7 细胞生长,且随着药物浓度和处理时间的增加,抑制作用增强,具有明显的时间及剂量依赖性,见图 1。异乌药内酯作用 24、48、72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 31.08、25.61、17.86 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 异乌药内酯对 MCF-7 细胞周期的影响

与对照组比较,异乌药内酯 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 后,细胞主要被阻滞在 G_2/M 期,其比例

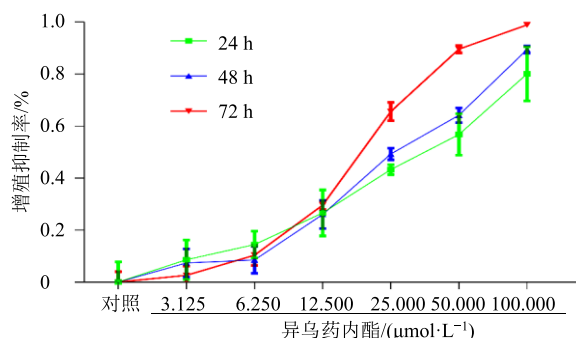


图 1 异乌药内酯对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of isolinderalactone on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分别增加了 5.39%、19.22%、19.97%。结果表明一定浓度的异乌药内酯能将 MCF-7 细胞阻滞于 G_2/M 期,从而抑制细胞增殖。结果见图 2 和表 1。

3.3 异乌药内酯对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果如图 3 和表 2 所示,异乌药内酯可浓度依赖性地诱导 MCF-7 细胞凋亡。与对照组比较,异乌药内酯 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF-7 细胞 48 h,细胞早期率、晚期凋亡率和总凋亡率均随着异乌药内酯的浓度升高而显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001)。异乌药内酯 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 48 h 主要引起晚期凋亡 ($P < 0.01$)。

TUNEL 染色结果如图 3 所示,与对照组比较,异乌药内酯 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理的 MCF-7 细胞中 DAPI 染色显示出更多较为明亮的蓝色以及核固缩、核边集等形态学改变。TUNEL 标记后产生绿色荧光的凋亡细胞亦明显增多。

3.4 异乌药内酯对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位的下降是细胞凋亡的标志性事件。与对照组比较,异乌药内酯 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF-7 细胞 48 h 后,线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001),见图 4。

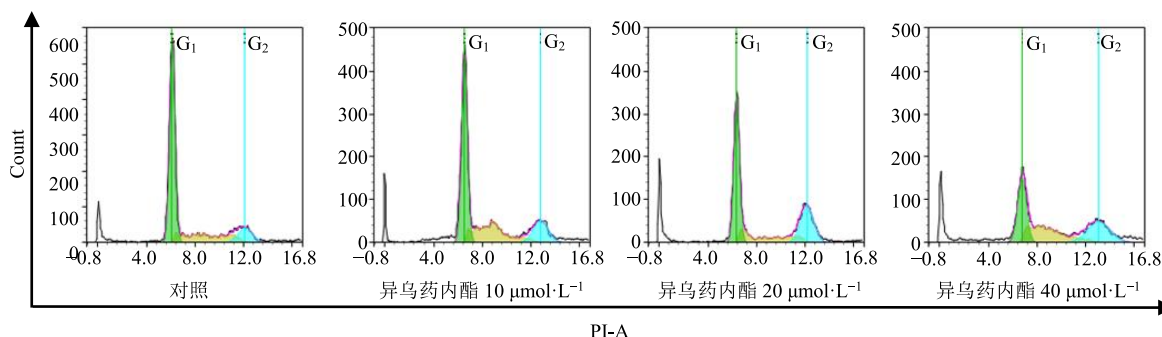


图 2 异乌药内酯对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of isolinderalactone on cell cycle of MCF-7 cells

表 1 异乌药内酯对 MCF-7 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of isolinderalactone on cell cycle rate of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞占比/%		
		G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	63.98 ± 5.85	24.86 ± 0.90	11.16 ± 0.24
异乌药内酯	10	54.93 ± 1.33	28.51 ± 0.63*	16.55 ± 1.31*
	20	47.11 ± 2.32*	22.51 ± 1.32	30.38 ± 0.54***
	40	38.15 ± 0.34*	30.72 ± 1.77*	31.13 ± 0.30***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 表 2 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as table 2

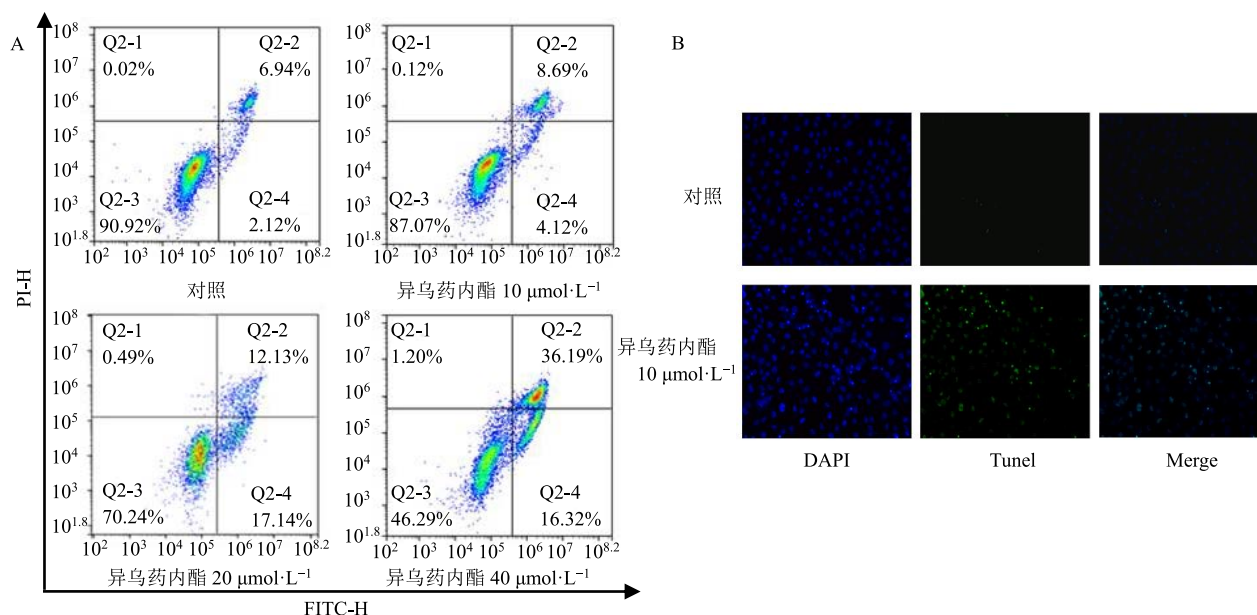


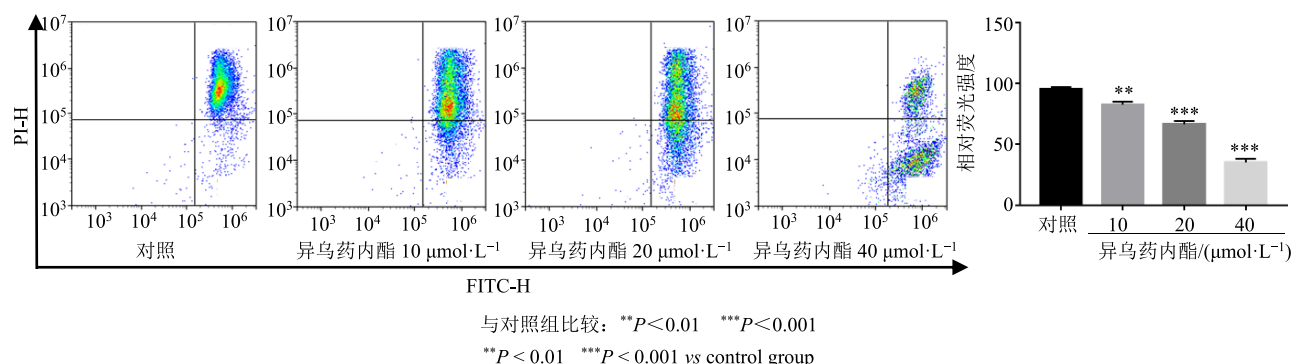
图 3 流式细胞术 (A) 与 TUNEL 染色 (B) 检测异乌药内酯对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of isolinderalactone on cell apoptosis of MCF-7 cells detected by flow cytometry (A) and TUNEL assay (B)

表 2 异乌药内酯对 MCF-7 细胞凋亡的影响 (流式细胞术, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of isolinderalactone on cell apoptosis of MCF-7 cells (flow cytometry, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照	0	2.09 ± 1.20	6.50 ± 0.83	8.59 ± 2.03
异乌药内酯	10	3.26 ± 0.82	8.92 ± 0.62**	12.18 ± 1.44
	20	14.33 ± 2.20**	15.39 ± 1.82**	29.72 ± 4.02**
	40	17.91 ± 0.75***	36.00 ± 0.68***	53.91 ± 1.42***



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 4 异乌药内酯对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of isolinderalactone on mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 异乌药内酯对 MCF-7 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

由图 5 可见, 与对照组比较, 异乌药内酯 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞中 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、

0.01)。异乌药内酯 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞中 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

全球乳腺癌发病率自 20 世纪 70 年代末开始一直呈上升趋势。近年来我国乳腺癌发病率的增长速

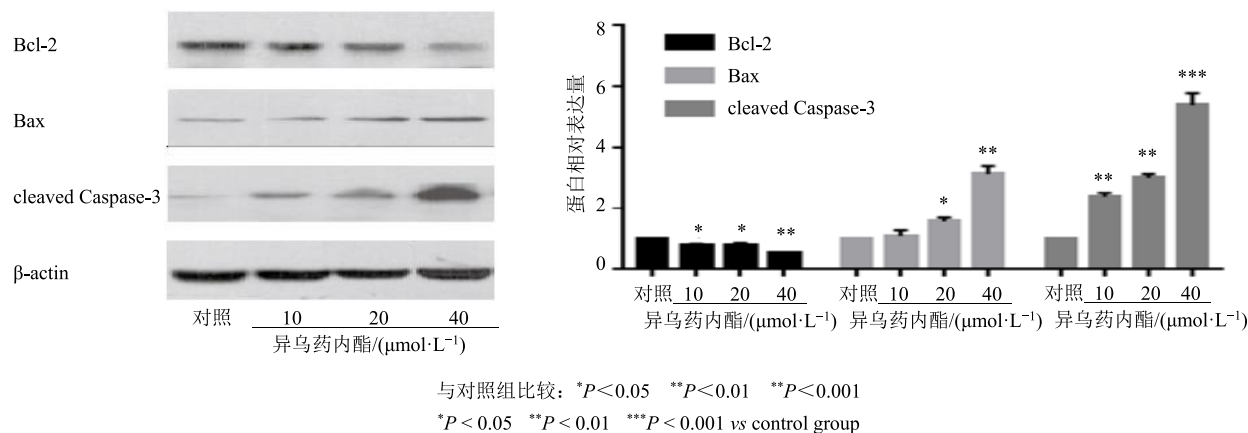


图 5 异乌药内酯对 MCF-7 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of isolinderalactone on expression of apoptosis-related protein in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

度高出发达国家 1%~2%, 其发病率位居女性恶性肿瘤第 1 位^[9]。随着对乳腺癌生物学行为认识的不断深入以及治疗理念的转变与更新, 乳腺癌的治疗进入了综合治疗时代, 形成了乳腺癌局部治疗与全身治疗并重的治疗模式^[10]。虽然在乳腺癌治疗方面取得了重大进展, 如激素治疗、化疗、放疗和手术, 但由于耐药性和转移, 该病的发病率和死亡率仍在持续上升。因此, 迫切需要寻求新的治疗策略并开发具有低毒性的新型药物以预防和治疗乳腺癌。近年来研究发现, 许多传统中药有效成分均有明显的抗肿瘤活性。因此, 从中药中寻找有效的防治乳腺癌药物迫在眉睫, 特别是其中高效低毒的天然产物更具应用价值。异乌药内酯为乌药中的倍半萜成分, 研究表明, 异乌药内酯对多种恶性肿瘤具有良好的抗肿瘤活性。但其对抗乳腺癌的作用及机制尚未阐明, 值得深入研究。

本研究结果显示, 异乌药内酯对 MCF-7 细胞有较好的增殖抑制作用, 并呈时间剂量依赖性。DAPI 和 TUNEL 染色结果显示, 经异乌药内酯处理后, MCF-7 细胞出现核固缩、核边集等形态学改变, 且凋亡细胞增多。流式细胞术结果显示异乌药内酯能将 MCF-7 细胞周期阻滞在 G_2/M 期, 诱导线粒体膜电位去极化, 促进细胞凋亡。由以上结果推断, 异

乌药内酯对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用主要是通过诱导细胞凋亡实现的。

细胞凋亡是细胞受基因调控的主动的生理性自杀行为, 是一种生理性保护机制, 可以清除体内多余、受损或危险的细胞而不对周围的细胞或组织产生危害。恶性肿瘤的凋亡机制受到抑制, 使机体不能正常清除癌变细胞。对凋亡诱导因子敏感性的降低, 阻断肿瘤细胞的凋亡, 使肿瘤细胞数目增加是多种肿瘤细胞的基本特征。正常细胞主要通过线粒体途径和死亡受体途径发生凋亡。线粒体途径中最重要的调控因子是 Bcl-2 家族蛋白, Bcl-2 和 Bax 分别是该家族最具代表性的抑凋亡和促凋亡蛋白, Bax/Bcl-2 增大引起线粒体损伤, 释放细胞色素 C, 募集 Caspase-9, 活化 Caspase-3, 触发 Caspase 级联反应。外源性途径通过死亡受体与其配体结合, 激活 Caspase-8、Caspase-3, 启动 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡^[11]。本实验结果显示, 异乌药内酯可以上调 cleaved Caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。这些结果提示, 异乌药内酯可能是调控线粒体途径引起 MCF-7 细胞凋亡。综上所述, 本研究表明异乌药内酯对 MCF-7 细胞具有明显的增殖抑制作用, 并且是通过诱导凋亡实现的。其诱导细胞凋亡机制可能与上调

Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达并下调 Bcl-2 蛋白表达有关。此外,本研究采用的是体外实验方法,关于异乌药内酯对乳腺癌的影响和机制尚需体内实验进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] Clarke R, Leonessa F, Trock B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: Review and meta-analysis [J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(S7): 9-15.
- [3] Scully O J, Bay B H, Yip G, *et al.* Breast cancer metastasis [J]. *Cancer Genom Proteom* 2012, 9(5): 311-320.
- [4] Hsiao W L W, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy-from TCM theory to mechanistic insights [J]. *Planta Med*, 2010, 76(11): 1118-1131.
- [5] 谷丽华, 吴 纲, 张紫佳, 等. 应用薄层色谱-生物自显影技术评价乌药等三种中药的抗氧化活性 [J]. *药理学报*, 2006, 41(10): 956-962.
- [6] 刘卫东, 温中京, 郭伟娣, 等. 乌药提取物抗疲劳作用的实验研究 [J]. *浙江中医杂志*, 2006, 41(7): 428-429.
- [7] Chuang H C, Li Y W, Yuen M W, *et al.* Anti-metastatic effects of isolinderalactone via the inhibition of MMP-2 and up regulation of NM23-H1 expression in human lung cancer A549 cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4690-4696.
- [8] Ji Y H, Jung H P, Min J K. Isolinderalactone regulates the BCL-2/caspase-3/PARP pathway and suppresses tumor growth in a human glioblastoma multiforme xenograft mouse model [J]. *Cancer Lett*, 2018, 443(11): 25-33.
- [9] 马丹丹, 刘 坤, 齐晓伟. 2018 年全球癌症统计: 乳腺癌发病和死亡人数统计 [J]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2018, 12(6): 375.
- [10] 宋轶鹏, 姜翠芳. 乳腺癌治疗策略的转变 [J]. *现代医药卫生*, 2006, 22(12): 1827.
- [11] Edinger A L, Thompson C B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 663-669.