

# 白毛藤多糖联合阿霉素对 乳腺癌细胞凋亡的影响<sup>※</sup>

● 杨旭东<sup>1\*</sup> 张杰<sup>1▲</sup> 杨清东<sup>1</sup> 杨骄霞<sup>2</sup> 王桂云<sup>1</sup> 崔荣军<sup>1</sup> 刘洪凤<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨白毛藤多糖(Solamum lyratum Thunb polysaccharide, SLTP)联合阿霉素(Adriamycin, ADM)对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响及其分子机制。方法:实验分为空白对照组、ADM 组、ADM + 低剂量 SLTP 组, ADM + 中剂量 SLTP 组, ADM + 高剂量 SLTP 组。通过 RT-PCR 检测各组 Bcl-2、Fas 基因表达量的变化,同时应用荧光显微镜观察人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞凋亡情况。结果:与空白对照组比较,ADM 组及 ADM + 高中低剂量 SLTP 组细胞凋亡率增加,并且上调 Fas 和降低 Bcl-2 表达。结论:阿霉素及阿霉素联合白毛藤多糖促进其 MCF-7 细胞凋亡,其机制可能与激活 Fas、抑制 Bcl-2 的基因表达有关。

**关键词** 白毛藤多糖 阿霉素 乳腺癌 Fas Bcl-2

乳腺癌即乳腺恶性肿瘤,是女性常见的恶性肿瘤之一,治疗方式以手术治疗为主。对于无法手术治疗的患者,如何一方面保证化疗药物的疗效,一方面减少化疗药物的毒副作用,一直是临床上恶性肿瘤化疗过程中亟待解决的问题。白毛藤(Solamum lyratum Thunb)是茄科植物白英的全草,传统中医认为其有清热、利湿、解毒、消肿之功用<sup>[1]</sup>。本课题组前期实验表明,白毛藤对多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用<sup>[2-3]</sup>,本研究进一步观察白毛藤多糖(Solamum lyratum Thunb polysaccharide, SLTP)联合阿霉素(Adriamycin, ADM)对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响及其分子机制,为 SLTP 应用于乳腺癌的辅助化疗,降低化疗药物的毒副作用提供实验依据。

**※基金项目** 黑龙江省中医药管理局中医药科研项目(No. ZHY10-W71);牡丹江医学院科学技术研究项目(No. ZS201314)

**\*作者简介** 杨旭东,男,副教授。主要从事中药的药理与毒理研究。

**▲通讯作者** 张杰,女,硕士。主要从事中药的药理与毒理研究。E-mail:zhangjie03mdj@126.com

**•作者单位** 1.黑龙江省牡丹江医学院(157011);2.黑龙江省牡丹江医学院附属红旗医院(157011)

## 1 材料

1.1 乳腺癌细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株购于武汉中美科技有限公司,按细胞库要求培养细胞。

1.2 主要试剂 RT-PCR 试剂盒及相关试剂购于大连宝生物有限公司(批号:DRR019A);胰酶(批号:1606137)、引物购于上海生工生物工程公司;DMEM 培养基(批号:12491013)、胎牛血清(批号:1527494)、Trizol(批号 15596-026)购于美国 Gibco 公司,4℃保存;MTT 细胞增殖分析试剂盒购于 Sigma 公司(批号:PB11058)。

## 2 方法

2.1 药物的制备 白毛藤清洗匀浆、醇提、沉淀,留取沉淀再溶解、再沉淀、离心分离。蒸馏水溶解固体部分,加入等体积氯仿/正丁醇混合液(4:1),振荡混匀 20min,沉淀,取上清,去除蛋白,重复操作 3 次。取上清,再醇析(4 倍乙醇),取沉淀用乙醚、丙酮依次洗涤,冷冻干燥,即得 SLTP。

2.2 细胞培养与分组 精确称取适量 SLTP 溶解于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中配置成 16mg · mL<sup>-1</sup> SLTP 的母液,4℃ 储存,应用时按比例稀释。MCF-7 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

液中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。调零组:不含细胞的培养液;空白对照组:用含 MCF-7 细胞的培养液;ADM 组:1mg·L<sup>-1</sup> ADM;ADM + 低剂量 SLTP 组:1mg·L<sup>-1</sup> ADM + 0.4mg·mL<sup>-1</sup> SLTP;ADM + 中剂量 SLTP 组:1mg·L<sup>-1</sup> ADM + 0.8mg·mL<sup>-1</sup> SLTP;ADM + 高剂量 SLTP 组:1mg·L<sup>-1</sup> ADM + 1.6mg·mL<sup>-1</sup> SLTP。

**2.3 MTT 方法检测细胞的药物敏感性** 以每孔 150μL 将密度为 1×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的 MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板中。分别加入不同浓度药物 20μL, 每组设 5 个复孔,另外设不加药物的空白对照组。细胞培养 12、24、48h 后,除调零组外各组分别加入 20μL MTT (5g·L<sup>-1</sup>);培养 4h 后,弃去 MTT 液,加 DMSO 150μL/孔,全自动酶标仪 490nm 波长,测定光密度值(OD 值)。计算肿瘤细胞抑制率(inhibition rate, IR)。IR = (对照组 OD - 实验组 OD)/(对照组 OD - 空白组 OD) × 100%。

**2.4 细胞凋亡检测** MCF-7 细胞以 3×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> 的浓度,接种于 6 孔培养板中,1mL/孔。CO<sub>2</sub> 培养箱孵育细胞 24h 后,加入相应药物,对照组加相同体积新鲜培养液。48h 后胰酶消化细胞制成细胞悬液,0.01mol·L<sup>-1</sup> PBS 漂洗 3 遍,固定液 4℃ 固定细胞 10min,弃固定液,0.01mol·L<sup>-1</sup> PBS 漂洗细胞 3 次,5min/次,干燥后,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,用 5mg·L<sup>-1</sup> Hoechst33258 染色液染色 15 min,取出盖玻片,用甘油与 PBS 比例为 1:9 的混合性封片剂封片,荧光显微镜观察。计算细胞凋亡率,细胞凋亡率 = [凋亡细胞/(凋亡细胞 + 正常细胞)] × 100%。

**2.5 RT-PCR 检测** 总 RNA 的提取,将各组细胞中加入 1mL Trizol,用移液管吹打混匀,移入 Ep 管,15~30℃ 放置 5min。每管加入 0.2ml 氯仿,震荡混匀,室

温放置 3min。12000 r·min<sup>-1</sup>、4℃,离心 15min,上清移入新 Ep 管,加 0.5mL 异丙醇,混匀,静置 10min。12000r·min<sup>-1</sup>、4℃、离心 5min,弃上清液,加入 1mL 4℃ 75% 乙醇(DEPC 水配制),震荡使 RNA 沉淀重新悬浮。7500r·min<sup>-1</sup>、4℃,离心 5min,弃上清,静置 10min,加入 DEPC 水 20μL 混匀、溶解 RNA,分光光度计测定 A260/A280 为 1.8-2.0, RNA 产物置于 -80℃ 冰箱保存。PCR 扩增引物如下:Fas 上游引物序列为:5' - CGCCTATGGTTGTTGTTGACC - 3'; Fas 下游引物序列为:5' - CCTCTGTTACGACCTC - 3', 扩增产物 Fas 的长度为 477bp。Bcl-2 上游引物序列为:5' - GACTTCTCGTCGCTACCGTC - 3'; Bcl-2 下游引物序列:5' - ACATGCACCTACCCAGCCTCCGTTATC - 3', 扩增产物 Bcl-2 长度为 296bp。β-actin 上游引物序列为:5' - ATGTGGCACCACACCTTCTA - 3', β-actin 下游引物序列为:5' - CGTCATACTCCTGCTTGCTG - 3', 扩增产物 β-actin 片段为 838bp。PCR 反应条件:94℃、5min,预变性,1 个循环;94℃、5min,变性,54℃、50s,退火,72℃、90s,延伸,35 个循环;72℃、10min,延伸,1 个循环。琼脂糖凝胶电泳后拍照,软件分析 Bcl-2、Fas mRNA 的相对表达量。

**2.6 统计学分析** 数据用以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 11.5 统计学软件进行数据分析,进行 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 MTT 实验测定药物敏感性** 实验结果显示,高中低剂量的 SLTP 分别与 ADM 合用对乳腺癌细胞都有明显的抑制增殖作用,其作用效果比单用 ADM 效果明显。见表 1。

表 1 细胞生长抑制率(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	12 h	24 h	48 h
空白对照组	—	—	—
ADM 组	5.460.03	7.430.21	13.611.31
ADM + 低剂量 SLTP 组	9.180.04*	10.790.52*	18.471.44*
ADM + 中剂量 SLTP 组	15.070.13*	23.610.84**	26.641.71**
ADM + 高剂量 SLTP 组	19.730.21**	27.060.53**	31.141.87**

注:与 ADM 组比较,\*\*P < 0.01,\*P < 0.05。

**3.2 细胞凋亡情况** 荧光显微镜下可见空白对照组细胞核形态完整。不同浓度药物作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 48 h 后,荧光标记的凋亡细胞,细胞核呈蓝

色深染、细胞核碎裂等情况。各组细胞的凋亡率各不相同,与空白对照组凋亡率(3.76%)比较,ADM 组凋亡率(6.37%)明显升高,说明 ADM 可以诱导乳腺癌

MCF-7 细胞凋亡;ADM + 低剂量 SLTP 组凋亡率为 9.03%,ADM + 中剂量 SLTP 组凋亡率为 11.41%,ADM + 高剂量 SLTP 组凋亡率为 15.43%,与空白对照组比较,ADM + 高剂量 SLTP 组肿瘤细胞的凋亡率升高最明显( $P < 0.01$ )。

### 3.3 ADM 联合 SLTP 对 Bcl-2 和 Fas 基因表达影响

肿瘤细胞中抑制细胞凋亡的 Bcl-2 基因的表达情况(见图 1 及表 2):与空白对照组比较,药物作用 48h 后,ADM 组 Bcl-2 基因表达减少( $P < 0.05$ ),ADM + 低剂量 SLTP 组、ADM + 中剂量 SLTP 组、ADM + 高剂量 SLTP 组 Bcl-2 基因表达降低,效果更显著( $P < 0.01$ );肿瘤细胞中促进细胞凋亡的 Fas 基因的表达情况(见图 2 及表 2):与空白对照组比较,药物作用 48h 后,

ADM 组 Fas 基因表达增加( $P < 0.05$ ),ADM + 低剂量 SLTP 组、ADM + 中剂量 SLTP 组、ADM + 高剂量 SLTP 组 Fas 基因表达增加,效果更显著( $P < 0.01$ )。

表 2 ADM 联合 SLTP 对 Bcl-2 和 Fas 基因表达影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2/ $\beta$ -Actin	Fas/ $\beta$ -Actin
空白对照组	0.63 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01
ADM 组	0.46 $\pm$ 0.03*	0.29 $\pm$ 0.02*
ADM + 低剂量 SLTP 组	0.32 $\pm$ 0.03**	0.37 $\pm$ 0.02**
ADM + 中剂量 SLTP 组	0.28 $\pm$ 0.02**	0.42 $\pm$ 0.03**
ADM + 高剂量 SLTP 组	0.21 $\pm$ 0.01**	0.56 $\pm$ 0.04**

注:与空白对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\* $P < 0.05$ 。

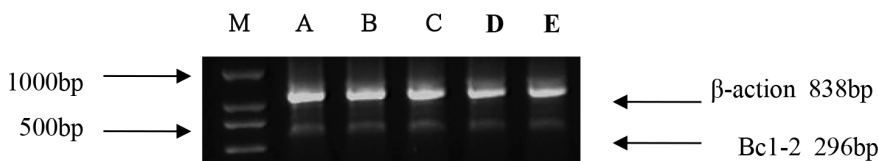


图 1 ADM 联合 SLTP 对 Bcl-2 基因表达影响

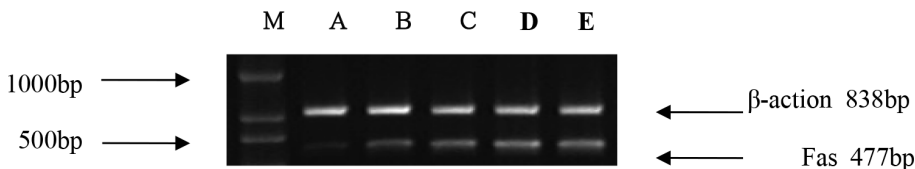


图 2 ADM 联合 SLTP 对 Fas 基因表达影响

M. DNA Marker;A. 空白对照组;B. ADM 组;C. ADM + 低剂量 SLTP 组;D. ADM + 中剂量 SLTP 组;E. ADM + 高剂量 SLTP 组

## 4 讨论

乳腺癌是发生在乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤,目前已成为威胁女性健康的常见肿瘤之一<sup>[4,5]</sup>。大多患者通过乳腺癌根治术治疗,但由于乳腺癌细胞之间连接松散,易脱落,可随血液或淋巴液播散全身,形成转移,危及生命。对于无法采用手术治疗的患者或术后恢复的患者往往辅助化疗治疗肿瘤。化疗药物在杀灭肿瘤细胞同时损伤正常组织细胞,因此提高化疗药物的敏感性至关重要,在保证治疗效果的同时又降低了化疗药物毒

副作用。细胞的无限制生长可导致肿瘤的发生,其原因是细胞的过度增殖和细胞凋亡的减少,因此调控抗凋亡基因及凋亡基因的表达成为了肿瘤治疗中的一个潜在的靶点。Bcl-2 基因最早在研究 B 细胞淋巴瘤中发现的,其位于 18q21,具有明显的抑制细胞凋亡的作用,是 Bcl-2 家族中最具代表的抗凋亡蛋白。其通过调控线粒体途径、影响细胞膜跨膜转运、激活谷氨酰胺转移酶、改变钙离子分布等机制调控凋亡,因此,Bcl-2 蛋白的表达情况可以在一定程度上反映细胞凋亡的程度<sup>[6-8]</sup>。

实验研究表明 Bcl-2 等凋亡相关基因的异常表达是导致肿瘤化疗耐受的重要原因之一<sup>[9-10]</sup>。因此药物是否能有效抑制 Bcl-2 等凋亡相关基因的异常表达,将能提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,降低化疗的抵抗。Fas 蛋白是一种细胞膜表面受体蛋白,在细胞凋亡中起重要的作用,分子量为 45kd,位于人染色体的 10q24.1,与活化的 T 淋巴细胞表面的配体 Fas-L 蛋白结合,向细胞膜内传递死亡信号,诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

本研究结果显示:高中低剂量 (下转第 12 页)

以半夏泻心汤益气清热散寒;以百合地黄汤滋补阴津;加天花粉清热生津;生川乌温阳逐寒;生麦芽消食和胃;大黄通泻热结。

**2.2 慢性胃炎、抑郁症案** 崔某,女,33岁,郑州人,有6年慢性胃炎病史,5年前又有抑郁症,近因病证加重前来诊治。刻诊:胃脘满痛怕冷,饮食不佳,倦怠乏力,心胸烦闷,心神不安,冥思苦想,口苦,舌质红,苔薄黄,脉沉弱。辨为脾胃寒热夹杂证与心气郁证相兼。给予半夏泻心汤与枳实薤白桂枝汤合方加味。药用:枳实 4g,厚朴 12g,薤白 24g,全瓜蒌 15g,桂枝 3g,红参 10g,大枣 12枚,姜半夏 12g,黄芩 10g,干姜 10g,黄连 3g,生麦芽 24g,炙甘草 10g。6剂,第1次煎35分钟,第2次煎30分钟,合并药液,每日1剂,每天分3服。二诊:心胸烦闷好转,以前方6剂。三诊:胃脘怕冷减轻,以前方6剂。四诊:冥思苦想好转,以前方6剂。五诊:饮食转佳,口苦止,以前方6剂。六诊:诸证明显减轻,以前方

40剂。为了巩固疗效,以前方变汤剂为散剂,每次6g,每日分3服。随访1年,一切尚好。

**按** 根据胃脘满痛怕冷辨为寒;再根据心胸烦闷、心神不安辨为心气郁;因口苦、苔薄黄辨为热;又因倦怠、脉沉弱辨为气虚。以此辨为脾胃寒热夹杂证与心气郁证。方以枳实薤白桂枝汤行气解郁通阳;以半夏泻心汤益气清热散寒;加生麦芽消食和胃,兼以解郁。

**2.3 慢性红斑性胃炎、慢性支气管炎案** 许某,男,64岁,郑州人,有多年慢性红斑性胃炎及慢性支气管炎病史,近因病证加重前来诊治。刻诊:胃脘痞满,时有胃痛,怕冷,饮食不佳,倦怠乏力,咳嗽,受凉加重,胸闷,痰多清稀色白,口苦口干,舌质淡红,苔腻黄白夹杂,脉沉弱。辨为脾胃寒热夹杂证与肺寒证相兼。给予半夏泻心汤与小青龙汤合方加味。药用:黄芩 10g,黄连 3g,红参 10g,大枣 12枚,生半夏 12g,干姜 10g,麻黄 10g,细辛 10g,白芍 10g,五味子 12g,桂枝

10g,生附子 5g,甘草 10g。6剂,第1次煎35分钟,第2次煎30分钟,合并药液,每日1剂,每天分3服。二诊:胃脘痞满减轻,仍然口苦明显,以前方变黄连为6g,6剂。三诊:胃脘怕冷基本消除,以前方变生附子为3g,6剂。四诊:咳嗽减轻,痰多基本消除,以前方6剂。五诊:胃脘痞满基本消除,口苦止,仍有不思饮食,以前方加生山楂 24g,6剂。六诊:诸证基本消除,又以前方治疗30剂,诸证悉除。之后为了巩固疗效,以前方变汤剂为散剂,每次6g,每日分3服。随访1年,一切尚好。

**按** 根据胃脘痞满、怕冷辨为胃寒;再根据咳嗽、痰多清稀色白辨为肺寒夹饮;因口苦、口干辨为郁热;又因倦怠乏力、脉沉弱辨为气虚;更因苔黄白夹杂辨为寒热夹杂。以此辨为脾胃寒热夹杂证与肺寒证。方以小青龙汤温肺宣肺,降逆止咳;以半夏泻心汤益气清热散寒;加生附子温阳散寒。

(上接第66页)

的SLTP分别与ADM合用可明显抑制乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,提高ADM的药物疗效;并且SLTP能明显上调Fas基因表达,下调Bcl-2基因表达,其作用效果比单用ADM效果明显。表明SLTP可能通过调节Bcl-2及Fas基因表达的平衡,增加肿瘤细胞对ADM的敏感性,促进ADM诱导乳腺癌细胞的凋亡。为SLTP应用于乳腺癌的辅助化疗提供实验依据,然而其协同作用机制仍需进一步研究。

**参考文献**

[1]冯洪钱.民间兽医本草[M].北京:科学技术文献出版社,1993:307-308.  
 [2]杨旭东,张杰,杨骄霞.白毛藤对人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响[J].中国现代中药,2010,12(4):34-36.  
 [3]杨旭东,张杰,董凯.白毛藤总苷诱导人食管癌细胞Ec-9706凋亡及其作用机制的研究[J].牡丹江医学院学报,2011,32(1):7-9.  
 [4]黄哲宙,陈万青,吴春晓,等.中国女性乳腺癌的发病和死亡现

状——全国32个肿瘤登记点2003-2007年资料分析报告[J].肿瘤,2012,32:435-439.  
 [5]胡一迪,胡孝渠,李权,等. Survivin, caspase-8在人体乳腺癌增生乳腺癌前病变和乳腺癌中的表达程度分析[J].中国生化药物杂志,2015,13:100-102.  
 [6]Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(9): 1414-1424.  
 [7]Shamas-Din A, Kale J, Leber B, et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(4): 714.  
 [8]Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis; Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92-101.  
 [9]秦绪军,何伟,海春旭. Bcl-2蛋白在肿瘤放疗氧化损伤中的作用[J]. 癌变畸变突变, 2014, 26(5): 361-364.  
 [10]王雪峰,何援利,谭峰. Bcl-2基因对环磷酰胺诱导的大鼠卵巢损伤的保护作用[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(1): 143-147.  
 [11]Martin-villalba A, Llorens-bobadilla E, Wollny D. CD95 in cancer: tool or target [J]. Trends in Molecular Medicine, 2013, 19(6): 329-335.