

红参含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和细胞周期的影响

谢长生¹, 徐丽君²

(1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: [目的] 研究红参含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和细胞周期的影响。[方法] 采用 MTT 法观察红参含药血清对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖活性。流式细胞术检测人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期、细胞凋亡率。[结果] 红参低剂量含药血清对 MCF-7 细胞有促增殖作用, 24、48、72h 时增殖率分别为 105.9%、115.9% 和 121.5%。而高剂量对 MCF-7 细胞表现为抑制作用。红参低剂量组使 MCF-7 细胞 S 期 DNA 含量比例明显增多, 高剂量组使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 并能够诱导细胞凋亡, 凋亡率达 26.86%。[结论] 红参含药血清在高剂量时抑制 MCF-7 细胞生长, 低剂量时对细胞具有促增殖作用。

关键词: 红参; MCF-7 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)04-0291-04

Effect of Serum Containing Radix Ginseng Rubra on Cell Proliferation and Cell Cycle in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7

XIE Chang-sheng¹, XU Li-jun²

(1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of serum containing Radix Ginseng Rubra on cell proliferation and cell cycle in human breast cancer cell line MCF-7. [Methods] The cell proliferation of serum containing different concentrations of Chinese medicine "Radix Ginseng Rubra" on human breast cancer cell line MCF-7 in vitro were detected by MTT method, and cell cycle of human breast cancer cell line MCF-7 were examined by flow cytometry. [Results] Serum containing Radix Ginseng Rubra with lower concentration could make a proliferative effect in MCF-7 cell with proliferation rate 105.9%, 115.9%, 121.5%, at 24, 48, 72h respectively, but serum containing Radix Ginseng Rubra with higher concentration inhibited the growth of MCF-7 cells; serum containing Radix Ginseng Rubra with lower concentration could increase DNA percentage in S phase of cell cycle. Serum containing Radix Ginseng Rubra with higher concentration could increase the number of cells in G₀/G₁ phase and induce cell apoptosis with apoptosis rate of 26.86%. [Conclusion] Serum containing Radix Ginseng Rubra with lower concentration could make a proliferative effect in MCF-7 cell, and which with higher concentration could inhibit the growth and induce cell apoptosis in MCF-7 cell.

Key words: Radix Ginseng Rubra; MCF-7 cells; apoptosis; cell cycle

乳腺癌是世界范围内严重危害妇女健康的恶性肿瘤, 近年呈现年轻化和逐年上升的趋势^[1]。近年来随着对植物雌激素 (phytoestrogen, PE) 研究的深入, 有学者发现 PE 是一类天然存在于植物中、与雌激素结构相似的非甾体类化合物。PE 主要包括异黄酮类、木脂素类和香豆雌酚 3 类^[2]。在传统中药中, 不少方、药存在 PE 效应, 而 PE 对 ER 阳性的乳腺

癌有何影响尚存争论。本实验通过研究不同剂量红参含药血清对 MCF-7 细胞体外增殖及细胞周期、细胞凋亡的影响, 初步探讨红参的植物雌激素效应及其与乳腺癌关系。

1 材料与方法

1.1 实验仪器和材料

实验仪器: CL31R 台式冷冻多用离心机 (美国

收稿日期: 2012-10-05; 修回日期: 2012-12-26
E-mail: xiecs@hotmail.com

Thermo Forma 公司),3111 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Forma 公司),ELX-808 型酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tek 公司),XDS-1B 倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司),COULTER EPICS XL 型流式细胞仪 (美国 BECKMAN COULTER 公司)。

实验材料:成年雌性 SD 大鼠 36 只,体重 200 ± 20 g,清洁级,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供。人乳腺癌 MCF-7 细胞株由浙江省中医院中心实验室惠赠。红参购自浙江省胡庆余堂,编号 0000675。雌二醇片:拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 156A13。他莫昔芬片:扬子江药业集团有限公司,批号 09082401。RPMI-1640:吉诺生物医药技术有限公司;胎牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所;噻唑蓝(MTT):华美生物工程公司;Annexin V/碘化丙啉 PI 双染试剂盒:北京宝赛公司。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清的制备

将 36 只大鼠按体重随机分成 6 组,每组 6 只:正常对照组、雌二醇组(E₂组)、他莫昔芬组(TAM 组)、红参低剂量组(低剂量组)、红参中剂量组(中剂量组)和红参高剂量组(高剂量组)。参阅文献^[3],按通法^[4]方案制备含药血清,每日 2 次灌胃,每次 10ml/kg,给药均持续 3d。红参低、中、高剂量组分别以 0.833g/kg、1.667g/kg、5g/kg 给药;雌二醇组以临床日用量 10 倍(0.167mg/kg)给药;他莫昔芬组以临床日用量的 10 倍给药(3.333mg/kg);正常对照组以等体积生理盐水灌胃。于末次给药后 1h (灌胃前禁食 12h),以 20%乌拉坦,10ml/kg 腹腔注射麻醉,在无菌条件下自腹主动脉采血,室温静置 4h,待析出上清液后,吸出上清离心,3 000r/min 离心 10min,分离血清,经 56℃、30min 灭活处理后,0.22μm 微孔滤膜过滤除菌;经培养实验证实无微生物污染后,置 -80℃保存备用。

1.2.2 MTT 法测定含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响^[3,5]

选取经无酚红 RPMI-1640(含 10%胎牛血清)培养 4d 后的对数生长期 MCF-7 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,吹打成单细胞悬液,计数后以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔培养板,每孔加入无血清无酚红 RPMI-1640 培养液 200μl,共接种 3 块板。置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育 24h 使细胞同步

化后,小心吸出各孔内培养液,每组均设 6 个平行孔。分别培养 24h、48h、72h 后,每孔加 MTT 溶液(5mg/ml)20μl,37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱内继续培养 4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150μl 二甲基亚砷(DMSO),置摇床上低速振荡 10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490nm 处测定各孔光吸收值(OD 值),计算平均 OD 值和增殖率(proliferation rate,PR)。实验重复 3 次。

$PR = \text{实验组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值} \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布和细胞凋亡

1.2.3.1 流式细胞仪检测细胞周期

取经无酚红 RPMI-1640(含 10%胎牛血清)培养 4d 后的对数生长期 MCF-7 细胞,加入无血清无酚红 RPMI-1640 培养液,接种于 50ml 培养瓶中,孵育 24h 使细胞同步化后,换含 20%含药血清的无酚红 RPMI-1640 培养液,实验分 6 组,即正常对照组、雌二醇组(E₂组)、他莫昔芬组(TAM 组)、红参低剂量组(低剂量组)、红参中剂量组(中剂量组)、红参高剂量组(高剂量组)。置恒温培养箱中继续培养,孵育 48h 终止培养^[5]。胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,用流式细胞仪测定细胞周期分布百分比,计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)。每个实验对象重复 3 次。

$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$

1.2.3.2 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

细胞处理同细胞周期测定,按照凋亡检测试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪检测细胞凋亡。每个实验对象重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理,采用完全随机设计的单因素方差分析进行比较,并用 LSD 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红参含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

不同剂量红参含药血清对 MCF-7 细胞作用趋势不同:低剂量组在 24h、48h、72h 时的 OD 值均高于同一时间正常对照组,促进细胞生长,增殖率分别为 105.9%,115.9%,121.5%,提示低剂量组可促进 MCF-7 细胞增殖,并且呈时间依赖性;中剂量组各时

Table 1 Cell proliferation of serum containing Radix Ginseng Rubra on human breast cancer cell line MCF-7 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Group	24h		48h		72h	
	OD value	PR(%)	OD value	PR(%)	OD value	PR(%)
Blank control	0.239±0.005	—	0.271±0.004	—	0.307±0.005	—
E ₂	0.262±0.005▲●	109.6	0.320±0.003▲●	118.1	0.380±0.005▲●	123.8
TAM	0.207±0.007▲★	86.6	0.225±0.004▲★	83	0.252±0.006▲★	82.1
Serum containing Radix Ginseng Rubra						
Low-dose	0.253±0.007▲★●	105.9	0.314±0.003▲★●	115.9	0.373±0.008▲★●	121.5
Media-dose	0.242±0.004★●	101.3	0.274±0.003★●	101.1	0.312±0.003★●	101.6
High-dose	0.215±0.003▲★○	90.0	0.231±0.004▲★○	85.2	0.260±0.005▲★○	84.7

Note: ▲ Compare to control group at same time, $P<0.01$, △ $P<0.05$; ★ Compare to E₂ group at same time, $P<0.01$, ☆ $P<0.05$;
● Compare to TAM group at same time, $P<0.01$, ○ $P<0.05$.

间点也对细胞增殖略有促进作用，但对 MCF-7 细胞的生长无明显影响 ($P>0.05$)；而高剂量组各时间段的 OD 值均低于正常对照组，抑制细胞生长，但抑制作用比 TAM 弱，其抑制作用也有一定时间依赖性 (P 均 <0.05) (Table 1)。

Table 2 Cell cycle of serum containing Radix Ginseng Rubra on human breast cancer cell line MCF-7 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Group	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)	PI(%)
Blank control	40.30±1.78	43.80±1.15	15.90±1.16	59.70±1.78
E ₂	26.47±3.35	48.33±2.12	25.20±1.25	73.53±3.35
TAM	56.40±2.44	28.96±1.88	14.64±1.70	43.60±2.44
Serum containing Radix Ginseng Rubra				
Low-dose	35.76±1.68△★●	47.72±1.72△●	16.52±2.42★	64.24±1.68△★●
Media-dose	43.83±1.70★●	42.22±1.33★●	13.95±2.04★	56.17±1.70★●
High-dose	51.91±3.54▲★	26.01±1.80▲★	22.07±1.76▲●	48.09±3.54▲★

Note: ▲ Compare to control group at same time, $P<0.01$, △ $P<0.05$;
★ Compare to E₂ group at same time, $P<0.01$, ☆ $P<0.05$;
● Compare to TAM group at same time, $P<0.01$.

2.2 含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响

2.2.1 含药血清对细胞周期影响

与正常对照组相比，低剂量组 MCF-7 细胞 S 期细胞比例上升，提示低剂量含药血清可促进 DNA 合成，与 E₂ 类似；高剂量组与正常对照组相比，G₀/G₁ 期细胞所占比例明显上升，S 期细胞比例显著下降，且增殖指数也显著性降低 ($P<0.01$) (Table 2)，表明高剂量组含药血清可抑制 DNA 合成并使细胞周期被阻滞于 G₀/G₁ 期，其作用与 TAM 类似。

2.2.2 含药血清对细胞凋亡影响

低剂量组 MCF-7 细胞凋亡率较正常对照组显著降低，抑制细胞凋亡，作用与 E₂ 相似。高剂量组与 TAM 组类似，MCF-7 细胞凋亡率明显升高 (Table 3)，提示红参高剂量含药血清可诱导 MCF-7 细胞凋亡。

Table 3 Cell apoptosis of serum containing Radix Ginseng Rubra on human breast cancer cell line MCF-7 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Group	Apoptosis rate(%)
Blank control	5.50±0.79
E ₂	2.00±0.26▲●
TAM	42.48±0.74▲★
Low-dose	3.07±0.43▲★●
Media-dose	4.53±0.66★●
High-dose	26.86±0.45▲★●

Note: ▲ Compare to control group, $P<0.01$, △ $P<0.05$;
★ Compare to E₂ group, $P<0.01$, ☆ $P<0.05$;
● Compare to TAM group, $P<0.01$.

素相似的植物源性物质。有关植物雌激素(尤其是大豆) 流行病学研究显示大豆摄入高的国家乳腺癌发生率低。为此，人们在致力于寻求雌激素替代物过程中，发现植物雌激素可减轻绝经期症状却不具有上述雌激素的副反应，引起了广泛关注。

研究发现患乳腺癌的风险随激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT) 时间延长而增加^[6]，HRT 治疗 5 年后相对风险增加 1.5~2.4 倍。植物雌激素结构与雌激素相似，理论上认为摄入过量植物雌

3 讨 论

植物雌激素是一种在结构、功能上与人体雌激

激素可能增加乳腺癌的风险,但流行病学资料表明:植物雌激素摄入与乳腺癌发病呈负相关^[7,8],饮食中植物雌激素含量高的国家乳腺癌发病率低^[9]。Wang等发现染料木黄酮对雌激素受体阳性的人乳腺癌细胞的生长有浓度依赖性关系,低浓度的染料木黄酮刺激乳腺细胞 DNA 合成,而高浓度的染料木黄酮却抑制其生长;低浓度的植物雌激素效应是通过 ER 起作用的,但高浓度的植物雌激素作用与 ER 无关。Hsieh 等^[10]在体外实验证实,大豆异黄酮对 ER 阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞在低浓度时表现出雌激素样活性,而在高浓度时表现出抗雌激素样作用。

本实验以雌二醇、三苯氧胺为阳性对照组,通过对红参含药血清对人乳腺癌细胞 MCF-7 体外增殖影响的实验研究显示:红参低剂量含药血清对 MCF-7 细胞生长具有明显促增殖作用,与 E₂ 组结果类似,具有时间依赖性;红参高剂量含药血清对细胞表现出明显的抑制作用,并呈一定的时间依赖性,高剂量作用时将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,并诱导其凋亡。

但由于细胞的生长环境不同,体内生长的肿瘤细胞与体外培养的肿瘤细胞不同,血清药理学实验仍然是一个值得探讨的问题。今后应该在相关动物模型的基础上观察该药物经体内复杂的代谢过程所产生的抗肿瘤作用及其剂量效应,复制乳腺癌的动物模型,用该药进行干预,通过肉眼、光镜以及电镜等手段观察疗效及肿瘤组织的改变;以免疫组化方法观察肿瘤相关基因表达的情况,体内的有效血药浓度及主要是通过哪些途径激活等皆需进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang SW, Chen WQ, Kong LZ, et al. An annual report: cancer incidence in 35 cancer registries in China, 2003[J]. China Cancer, 2007, 16(7): 494-506.[张思维, 陈万青, 孔灵芝, 等. 中国部分市县 2003 年恶性肿瘤发病年度报告[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(7):494-506.]
- [2] Xu XX, Wu YZ, Sun AJ, et al. Phytoestrogen-like effects of herbal saponins[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2011, 15(12):1431-1436.[徐先祥, 吴杨峥, 孙爱静, 等. 中药皂苷的植物雌激素样作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 15(12):1431-1436.]
- [3] Liu YX, Tian J. Study on the effects of inhibiting proliferation of rat's medicament blood serum of YH decoction on human breast cancer cell MCF-7 ER(+) and MDA-MB-231 ER(-)[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2009, 27(2):243-246.[刘亚娟, 田君. 阳和汤含药血清对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(2):243-246.]
- [4] Li YK, Wu JY. The discussion of "ordinary method" of obtaining serum in serum pharmacology method [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 1999, 15(6):569-570.[李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6):569-570.]
- [5] Hao QX, Wang JF, Niu JZ, et al. Effects of the pharmacological serum of Siwu decoction and its ingredient herbs on proliferation and cell cycle of breast cancer cell line MCF-7 cells [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2008, 36(5):10-14.[郝庆秀, 王继峰, 牛建昭, 等. 四物汤及其组方中药的药物血清对 MCF-7 细胞体外增殖和细胞周期的影响[J]. 中医学报, 2008, 36(5):10-14.]
- [6] Hooper L, Madhavan G, Tice JA, et al. Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Hum Reprod Update, 2010, 16(6):745-760.
- [7] Lee SA, Shu XO, Li H, et al. Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(6):1920-1926.
- [8] Goodman MT, Shvetsov YB, Wilkens LR, et al. Urinary phytoestrogen excretion and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study[J]. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2009, 2(10):887-894.
- [9] Hou JF, Feng X. The advance of researches on the intervention of phytoestrogen in breast cancer[J]. Chinese Clinical Oncology, 2010, 15(1):82-85.[侯建峰, 冯笑. 植物雌激素干预乳腺癌的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(1):82-85.]
- [10] Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, et al. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 1998, 58(17):3833-3838.