

川楝素对乳腺癌细胞的生长抑制作用

蔡锦威¹, 汤海标¹, 邵喜英², 金洪传³, 毛伟敏^{2,4}, 王晓稼^{2,4}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 3. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310003; 4. 浙江省中西医结合肿瘤学重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨川楝素对人乳腺癌 MDA-MB-453 细胞作用及其机制。[方法] 取对数生长期的 MDA-MB-453 细胞, 0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 nmol/L 川楝素处理, 绘制生长曲线。川楝素 0、12.5、50 nmol/L 处理 72h 后, MTS 法检测川楝素对乳腺癌细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测川楝素对乳腺癌细胞凋亡和细胞周期的影响。[结果] 川楝素对乳腺癌细胞有增殖抑制作用, 并呈时间剂量依赖性 ($P < 0.01$)。MDA-MB-453 细胞 48h、72h、96h 的 IC_{50} 分别为 17.25、22.20 和 135.69 nmol/L。流式细胞分析表明, 川楝素诱导乳腺癌细胞的凋亡呈浓度依赖性 ($P < 0.01$), 且阻滞细胞在 S 期 ($P < 0.01$), 以 0、12.50、50.00 nmol/L 川楝素处理乳腺癌细胞 72h 后, MDA-MB-453 细胞早期凋亡率分别为 3.21%、9.64% 和 20.19%, MDA-MB-453 细胞处于细胞周期 S 期细胞占 20.98%、35.92% 和 45.02%。[结论] 川楝素对乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖具有抑制作用, 其作用机制可能与诱导细胞凋亡和引起 S 期阻滞有关。

关键词: 川楝素; 乳腺癌; MDA-MB-453; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)04-0342-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.04.A015

Effects of Toosendanin on Growth Inhibition in Human Breast Cancer Cells

CAI Jin-wei¹, TANG Hai-biao¹, SHAO Xi-ying², et al.

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of toosendanin on proliferation in human breast cancer MDA-MB-453 cells and its possible mechanism. [Methods] Logarithmic growth phase of MDA-MB-453 cells were selected. The growth curve was made with 0, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 nmol/L toosendanin treated. After toosendanin 0, 12.5, 50 nmol/L for 72h, cell proliferation in breast cancer cells was measured by MTS assay, cell apoptosis and cell cycle was detected by flow cytometry, the expression of Caspase3 and PARP were detected with Western blot assay. [Results] Toosendanin showed an inhibitory effect with a time-dose-dependent manner in breast cancer MDA-MB-453 cells ($P < 0.01$). The IC_{50} of MDA-MB-453 at 48h, 72h, 96h was 17.25, 22.20, 135.69 nmol/L. Flow cytometric analysis showed that toosendanin induced apoptosis of breast cancer cell in a dose-dependent manner ($P < 0.01$) and arrested the cell in S phase ($P < 0.01$). After 0, 12.50, 50.00 nmol/L toosendanin treated for 72h, early apoptosis rate was 3.21%, 9.64%, and 20.19% in MDA-MB-453 cell respectively. S phase of the cell cycle accounted for 20.98%, 35.92% and 40.05% in MDA-MB-453 cell. [Conclusion] Toosendanin may play an important effect of inhibiting the growth of MDA-MB-453 cell, the mechanism might be related to inducing apoptosis and arresting S-phase cell cycle.

Key words: toosendanin; breast cancer; MDA-MB-453; cell proliferation; apoptosis

川楝素(Toosendanin)是一种从楝科植物川楝的根皮中提取三萜类化合物^[1,2]。研究表明, 川楝素能有效抑制多种肿瘤细胞增殖, 其抗肿瘤机制是通过

线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡, 并与胞内 Ca^{2+} 超载有关^[3]。施玉樑等^[4]研究表明, 川楝素对乳腺癌细胞株 MDA-MB-486 有增殖抑制效应, 但川楝素抑制乳腺癌细胞增殖的剂量-效应关系及抑制增殖的机制仍然不明。我们预实验表明, 川楝素对乳腺癌 MDA-MB-453 细胞(ER 阴性, PR 阴性, Her-2 阳性)较为敏

收稿日期: 2013-12-25; 修回日期: 2014-01-21

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y2101312); 浙江省医药卫生科技计划(2010QNA006)

通讯作者: 王晓稼, E-mail: wxiaojia0803@163.com

感,且当川楝素浓度大于 100.00nmol/L 时,乳腺癌细胞生长曲线逐渐趋于平台期。本研究以 MDA-MB-453 细胞为研究对象,研究川楝素对人乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖的抑制作用,以及川楝素对 MDA-MB-453 细胞周期和细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与细胞

川楝素(分子式为 $C_{30}H_{38}O_{11}$, 分子量为 574) 购自上海源叶生物科技有限公司,纯度大于 98%,用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解成浓度为 $10^5\mu\text{mol/L}$ 的贮存液,滤过除菌,等量分装,放置 -20°C 保存。使用时用无双抗的 DMEM 配成终浓度,并使 DMSO 的终浓度小于 0.1%。

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 细胞购自于中国科学院上海细胞库,传代培养于含 10%胎牛血清(fetal bovineserum, FBS) 和 100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养液中, $5\%\text{CO}_2$, 37°C , 饱和湿度条件下培养。

1.2 细胞活性检测

取对数生长期的 MDA-MB-453 细胞, 消化计数,制成细胞悬液,以每孔 3000 个细胞/ $100\mu\text{l}$ 接种于 96 孔板,贴壁 24h,吸去培养液,分别加入含川楝素的无抗培养基 $200\mu\text{l}$, 药物终浓度为 0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00nmol/L, 每个浓度设 3 个复孔。重复铺 3 块板。细胞分别培养 48、72、96h 后,吸出培养基,加入含 10%MTS 的无抗 DMEM 溶液 $100\mu\text{l}$, 在 3 个空白孔内也加入含 10%MTS 的无抗 DMEM 溶液 $100\mu\text{l}$ 。继续培养,直至空白对照组 OD_{490} 为 0.80~0.90。测量时用酶标仪先震荡 5min,检测 490nm 时各孔吸光值 OD_{490} 。设含川楝素组为实验组, 0nmol/L 组为对照组,空白孔组为空白组,细胞存活率 = (实验组 OD_{490} - 空白组 OD_{490}) / (对照组 OD_{490} - 空白组 OD_{490}) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.3 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的 MDA-MB-453 细胞, 消化计数,制成细胞悬液,接种于 6 孔板中,设川楝素 0、12.5、50nmol/L 3 组,每孔接种细胞 2×10^5 个,待贴壁 24h,分别予以 0、12.5、50nmol/L 川楝素处理,继续培养 72h,倒去培养液,用 PBS 液清洗 1 次,胰酶消化,

800r/min 离心 5min,收集细胞,去上液,将细胞用 PBS 液漂洗 2 次,去上液。用 $100\mu\text{l}$ 预冷的 PBS 液重悬细胞,将悬液缓慢加入 1ml 的 75%冰冻酒精固定,置 4°C 冰箱过夜。用 PBS 液漂洗 2 次,去上液,避光 30min,上流式细胞仪检测细胞周期时相。发射光为氩离子激光器,每管测定 10 000 个细胞。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期 MDA-MB-453 细胞, 消化计数,制成细胞悬液,接种于 6 孔板中,设川楝素 0、12.5、50nmol/L 3 组,每孔接种细胞 2×10^5 个,待贴壁 24h,分别予以 0、12.5、50nmol/L 川楝素处理。继续培养 72h,将培养液吸入离心管中,贴壁细胞用胰酶消化,也吸入离心管中,800r/min 离心 5min,收集细胞,去上液。将各组细胞用 PBS 液漂洗 2 次,去上液,用 Annexine/PI 双标法检测细胞凋亡,各组细胞加入 $1\times$ Binding Buffer 液 $400\mu\text{l}$,重悬细胞,取 $100\mu\text{l}$,约 1×10^5 个细胞,加入 AnnexinV-FITC 试剂 $5\mu\text{l}$,PI 试剂 $5\mu\text{l}$,轻轻摇晃均匀,避光 15min,加入 $1\times$ Binding-Buffer 液 $400\mu\text{l}$,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

各组数据均使用 SPSS16.0 统计软件包进行统计分析,多组均数间的比较采用方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 川楝素对乳腺癌细胞增殖抑制作用

川楝素对乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖具有抑制作用,并呈时间和剂量依赖性($P<0.01$)。生长曲线见 Figure 1。6.25、12.50、25.00、50.00、100.00nmol/L

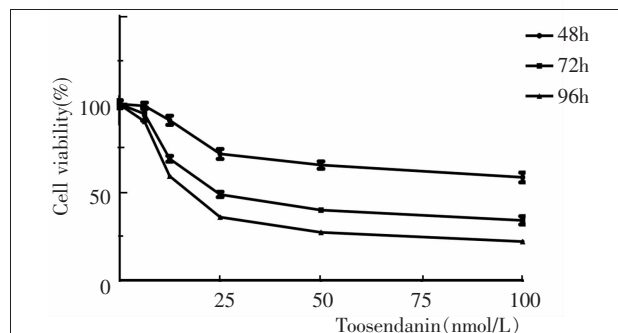


Figure 1 Growth cure of toosendanin on growth in MDA-MB-453 cell

Table 1 Effects of toosendanin on the proliferation in MDA-MB-453 cells

Toosendanin (nmol/L)	Cell viability(%)		
	48h	72h	96h
0	100.00±2.00	100.00±0.51	100.00±2.24
6.25	99.09±1.78	94.44±3.78	90.32±1.14
12.50	90.91±2.59	69.03±1.67	59.07±0.54
25.00	71.82±2.85	48.75±1.52	35.98±0.86
50.00	65.45±2.15	39.83±1.20	27.17±0.76
100.00	58.46±2.78	34.06±2.32	22.03±1.27

Table 2 Early apoptosis of breast cancer cells after toosendanin treatment for 72 hours

Toosendanin(nmol/L)	Early apoptosis(%)
0	3.21±0.85
12.50	9.64±2.58
50.00	20.19±1.90

Table 3 Cell cycle distribution of breast cancer cells after toosendanin treatment for 72 hours

Toosendanin(nmol/L)	Ratio of S phase cells(%)
0	20.98±1.63
12.50	35.92±2.14
50.00	45.02±2.96

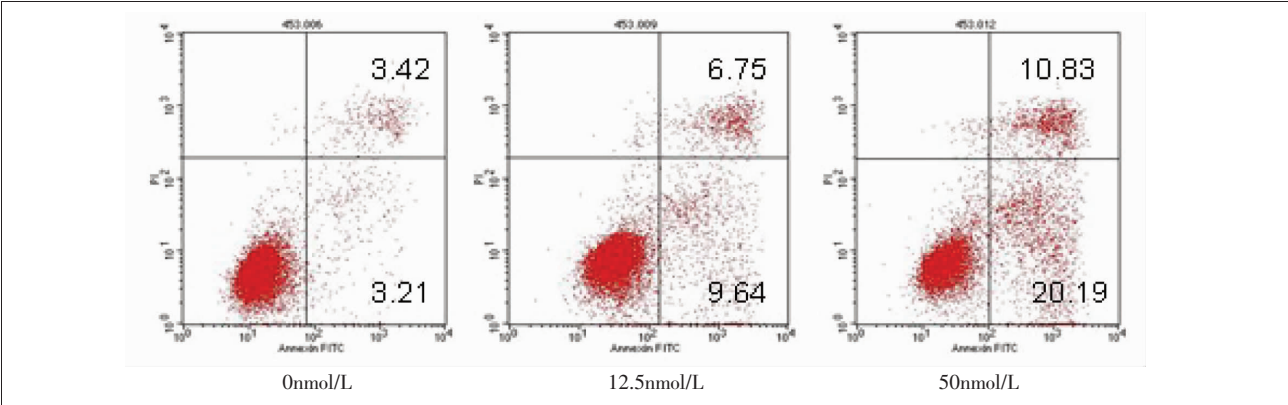


Figure 2 Apoptosis of breast cancer cells after toosendanin treatment for 72 hours

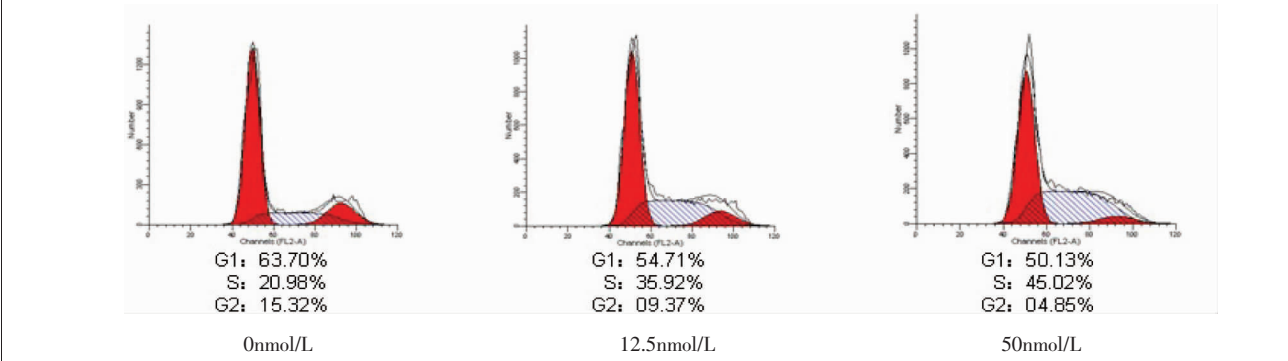


Figure 3 Cell cycle distribution of breast cancer cell after toosendanin treatment for 72 hours

3 讨 论

恶性肿瘤是细胞无限增殖或永生化的结果,抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡是阻止肿瘤生长和消除肿瘤的有效手段。川楝素是一种从楝科植物川楝的根皮中提取三萜类化合物。近几年研究发现,川楝素对鼠嗜铬细胞瘤细胞、人白血病细胞、人肝癌细胞具有明显的增殖抑制作用^[5-9]。我们的研究发现,川楝素对乳腺癌 MDA-MB-453 细胞株也具有明显的增殖抑制作用,并呈时间剂量依赖性。通过 MTS 法测得川楝素对乳腺癌 MDA-MB-453 细胞株 72h 时 IC₅₀ 为 22.20nmol/L,说明了低剂量的川楝素对乳腺癌细胞的增殖具有明显的抑制作用。

凋亡,又称细胞程序性死亡,是机体为维持内环境的稳定,由基因控制的细胞自主的有序死亡。肿瘤细胞的特征之一就是具有抗凋亡的能力^[10]。诱导肿瘤细胞发生凋亡是许多抗肿瘤药物的作用机制^[11]。流式细胞仪通过 AnnexinV-FITC/PI 双标法可检测到早期细胞凋亡的发生。我们研究发现,川楝素能使人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 细胞发生早期凋亡,且具有浓度依赖性。

细胞增殖过程需要细胞周期的精确调控,细胞无限制增殖对个体来说意味着肿瘤发展,不论何种原因造成正常细胞向恶性转化,最终均会表现出细胞分化受阻和细胞周期调控紊乱,从而使细胞过度增殖。细胞周期可分为间期(G₁期、S期、G₂期)和分裂期(M期)。细胞周期的有序运行是通过相关基因的严格监视和调控来实现的。当细胞周期的某个阶段受到外界干扰时,细胞增殖则发生障碍。对乳腺癌细胞周期分布情况的分析,以 0、12.50、50.00nmol/L 川楝素处理乳腺癌细胞 72h 后,MDA-MB-453 细胞处于细胞周期 S 期的细胞分别占 20.98%、35.92%、45.02%,表明川楝素阻滞 MDA-MB-453 细胞在 S 期。

综上所述,川楝素能明显地抑制乳腺癌细胞的增殖,其机制可能与诱导细胞发生凋亡和细胞周期阻滞有关,川楝素是一种有潜力的抗乳腺癌药物。然而川楝素的具体抗肿瘤机制仍然不明,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Zhong CC,Xie JX,Chen SF,et al. The chemical structure of toosendanin[J]. Journal of Chemistry,1975,33(1):397-406.[钟炽昌,谢晶曦,陈淑凤,等. 川楝素的化学结构[J]. 化学学报,1975,33(1):397-406.]
- [2] Shu GX,Liang XT. Modification of chemical structure of toosendanin[J]. Journal of Chemistry,1980,38(2):196-198.[舒国欣,梁晓天.关于川楝素的化学结构的修正[J]. 化学学报,1980,38(2):196-198.]
- [3] Wang XJ,Liu YR,Xiao BK,et al. Research progress on anti-tumor mechanism of toosendanin[J].Science Technology and Engineering,2011,11(2):281-283.[王小娟,刘妍如,肖炳坤,等.川楝素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 科学技术与工程,2011,11(2):281-283.]
- [4] Shi YL,Tang MZ.Cell death and apoptosis-induced effect of toosendanin[J].Chin J Neurosci,2004,20(6):461-464.[施玉樑,汤勉芝.细胞的死亡和川楝素的诱发凋亡作用[J].中国神经科学杂志,2004,20(6):461-464.]
- [5] Tang MZ,Wang ZF,Shi YL. Involvement of cytochrome c release and caspase a -ctivation in toosendanin-induced PC12 cell apoptosis[J]. Toxicology,2004,201(1-3):31-38.
- [6] Tang MZ,Wang ZF,Shi YL. Toosendanin induces out-growth of neuronal processes and apoptosis in PC12 cells[J]. Neurosci Res,2003,45(2):225-231.
- [7] Wang J,Liu XL.Effect of toosendanin on proliferation and apoptosis of K562 cells[J]. J Fourth Mil Univ,2009,30(22):1572-1576.[王进,刘小玲.川楝素对 K562 细胞增殖和凋亡作用的影响[J].第四军医大学学报,2009,30(22):1572-1576.]
- [8] He YJ,Wang J,Liu XL,et al.Toosendanin inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis [J].Planta Med,2010,76(13):1447-1453.
- [9] Ju JM,Qi ZC,Cai XT,et al.Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathway in HL-60 cells[J].Toxicology in Vitro,2013,27(1):232-238.
- [10] Sunil S,Anil V,Danielle A,et al. Prognostic implications of cell cycle,apoptosis,and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res,2005,11(11):3974-3986.
- [11] Viktorsson K,Lewensohn R,Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies [J].Adv Cancer Res,2005,94:143-196.