

丹酚酸乙对乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制及诱导凋亡研究

卢振铎, 刘真真, 王修身, 焦得闯, 乔江华, 宋珂, 崔树德
(河南省肿瘤医院, 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450008)

摘要: [目的] 观察丹酚酸乙对乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用。[方法] MTT 法观察丹酚酸乙对体外培养 MCF-7 细胞的增殖抑制作用; Hoechst33258 荧光染色法观察细胞凋亡的形态学变化; 流式细胞仪检测丹酚酸乙作用于 MCF-7 细胞 48h 后细胞凋亡率和细胞周期的变化; Western Blot 检测 caspase-3 蛋白表达的变化。[结果] 丹酚酸乙能明显抑制 MCF-7 细胞的生长, 呈剂量和时间依赖性; 荧光染色结果显示, 丹酚酸乙与 MCF-7 细胞共培养 24、48 和 72h 后, 细胞呈现明显的核固缩、碎裂以及凋亡小体形成等细胞凋亡现象; 流式细胞仪检测结果显示, 不同浓度的丹酚酸乙处理 MCF-7 细胞 48h 后, 细胞凋亡率和 S 期细胞的比例逐渐升高; Western Blot 显示, 随着丹酚酸乙浓度的增加, MCF-7 细胞 caspase-3 蛋白表达水平逐渐升高。[结论] 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞具有明显的生长抑制和促凋亡作用, 这种作用可能与上调 caspase-3 表达以及阻滞细胞于 S 期有关。

关键词: 丹酚酸乙; MCF-7 细胞; 凋亡; caspase-3; 乳腺肿瘤

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)07-0508-04

The Effect of Salvianolic Acid B on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Breast Cancer MCF-7 Cells

LU Zhen-duo, LIU Zhen-zhen, WANG Xiu-shen, et al.

(Henan Provincial Cancer Hospital, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: [Purpose] To observe the effect of salvianolic acid B on growth inhibition and apoptosis induction in breast cancer MCF-7 cells. [Methods] The effect of salvianolic acid B on inhibition of MCF-7 cell proliferation was detected by MTT assay, and the cellular morphologic apoptosis was observed by Hoechst33258 staining. Cell flow cytometry was utilized to observe the apoptosis rate and cell cycle of MCF-7 cells incubated with salvianolic acid B for 48h. Expression of caspase-3 was detected by Western Blot. [Results] Salvianolic acid B obviously inhibited the growth of MCF-7 cells in a time- and dose-dependent manner. Fluorescence staining indicated that the MCF-7 cells showed some obvious apoptosis characteristics such as, nuclear condensation, fragmentation, chromatin condensation and apoptotic body formation, when the cells cultured with salvianolic acid B (0.7mg/ml) for 24, 48 and 72h. FCM assay indicated that apoptosis rate and percentages of MCF-7 cells in S phase gradually increased after incubated with salvianolic acid B for 48h. Western Blot showed that the expression level of caspase-3 protein gradually rose with the increase of salvianolic acid B concentration. [Conclusion] Salvianolic acid B can inhibit cell growth and induce cell apoptosis, which might relate to S stage arrested and upregulation of caspase-3 expression in MCF-7 cells.

Subject words: salvianolic acid B; MCF-7 cell; apoptosis; caspase-3; breast neoplasms

丹酚酸乙是由 3 分子丹参素和 1 分子咖啡酸缩合而成的酚酸类化合物^[1]。有文献报道, 丹酚酸乙具有清除自由基、抑制脂质过氧化反应等功效。近年亦有研究证实, 丹酚酸乙具有诱导细胞凋亡抗肿瘤的作用^[2-4]。本研究以人乳腺癌细胞系 MCF-7 为模型, 观察丹酚酸乙对 MCF-7 细胞的凋亡诱导效应, 并通

过检测凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达变化, 探讨丹酚酸乙对 MCF-7 细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系来源

人乳腺癌细胞系 MCF-7 引自中国科学院细胞研究所。

通讯作者: 刘真真, 主任医师, 博士; 郑州大学附属肿瘤医院乳腺病诊疗中心, 河南省郑州市东明路 127 号(450008); E-mail: liuzhenzhen@medmail.com.cn.

收稿日期: 2012-06-04; **修回日期:** 2012-07-06

1.1.2 药物与试剂

RPMI 1640 培养基为美国 Hyclone 公司产品,胎牛血清购自杭州四季青生物材料工程有限公司,噻唑蓝(MTT)、丹酚酸乙、Annexin V/PI 双标试剂盒、兔抗人 caspase-3 单克隆抗体和 Hoechst33258 购自美国 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

TE300 多功能倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);DC200 图像采集系统和图像分析软件(德国 Leica 公司);Model 550 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Facs Calibur 流式细胞仪[美国 Becton Dickinson (BD)公司];CO₂ 培养箱(美国 Napco 公司);Western Blot 转移装置(美国 Bio-Rad 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清、100U/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 MCF-7 细胞,每 24h 换液传代。随机选取对数期生长的 MCF-7 细胞分成 5 份,其中 4 份分别加入 CO₂ 培养箱中孵育 MCF-7 细胞,每 24h 换液传代。

1.2.2 MTT 比色法测定细胞增殖抑制率

将对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔培养板,每孔加入细胞悬液 100 μ l。培养 12h 后弃去孔内液体,分别加入终浓度为 0.1mg/ml、0.4mg/ml、0.7mg/ml 和 1.0mg/ml 的无菌丹酚酸乙,以不加丹酚酸乙的细胞作为对照组。分别培养 24、48 和 72h 后,向各孔加入质量浓度为 5mg/ml 的 MTT 20 μ l,培养 4h 后弃去孔内液体,加入 150 μ l DMSO,振荡 10min,在酶标仪上测定波长 490nm 处的吸光度值(A),按下式计算丹酚酸乙作用 24、48 和 72h 时的细胞增殖抑制率。每组设 6 个平行复孔,实验重复 3 次。细胞增殖抑制率(%)=(对照组 A 值-实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。

1.2.3 Hoechst33258 荧光染料染色观察细胞核形态

用 0.7mg/ml 的丹酚酸乙分别作用 MCF-7 细胞 24、48 和 72h 后,将不同时间点的细胞用 PBS 洗涤并重悬,加入 5mg/L 的 Hoechst33258 荧光染料,室温避光反应 10min,荧光显微镜下观察细胞核形态的变化并拍摄图像,同时设未加药的对照组。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡率

取对数生长期 MCF-7 细胞,消化传代后待细胞

长到 70%满度时,吸弃旧培养液,加入含有丹酚酸乙不同浓度的培养液继续培养 48h。行流式细胞仪检测。丹酚酸乙处理的 MCF-7 细胞为实验组,不加药的 MCF-7 细胞为对照组,1 000r/min 离心 5min 收集细胞,70%冰乙醇固定 2h,离心后每样品管中加 0.5ml 碘化丙啶(PI)染液,4℃避光染色 30min,上机检测细胞周期与凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.5 Western Blot 印迹法检测 caspase-3 蛋白的表达

取对数生长期 MCF-7 细胞,消化传代后待细胞长到 70%满度时吸弃旧培养液,加入含有丹酚酸乙 0.7mg/ml 的培养液继续培养 48h 后,细胞裂解液提取细胞总蛋白,定量后取等量样本,进行 SDS-PAGE 电泳分离,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上。将膜在封闭液中封闭 2h,与 caspase-3 以及 β -actin 的一抗于 4℃孵育过夜。洗膜后,再与二抗室温孵育 1h,化学发光检测试剂检测 1min 后显像,成像。蛋白的相对表达量为目的蛋白的灰度值与内参 β -actin 的灰度值之比。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

用 SPSS11.0 软件完成统计学处理,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间分析比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞增殖抑制作用

用 MTT 法检测丹酚酸乙对 MCF-7 细胞增殖抑制作用,结果发现丹酚酸乙能明显抑制 MCF-7 细胞的增殖,其抑制作用呈现出剂量—时间依赖性,见图 1。

2.2 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞凋亡形态学的影响

Hoechst33258 荧光染色结果显示,对照组 MCF-

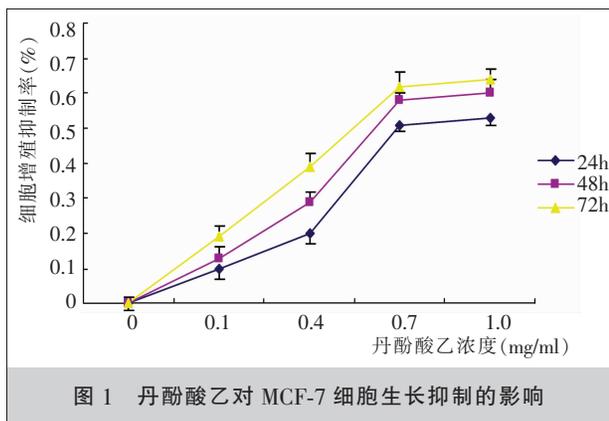


图 1 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞生长抑制的影响

7 细胞染色质均匀,核形态规则。0.7mg/ml 丹酚酸乙分别作用 24h、48h 以及 72h 后, 均可见凋亡细胞, 即细胞体积缩小, 细胞内出现空泡、染色质凝集和碎裂等凋亡特征(图 2)。

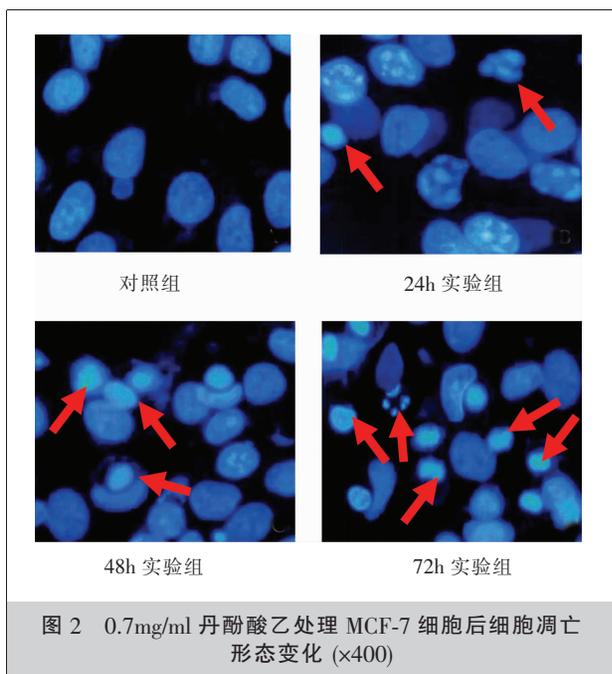


图 2 0.7mg/ml 丹酚酸乙处理 MCF-7 细胞后细胞凋亡形态变化 (×400)

2.3 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞凋亡和细胞周期的影响

MCF-7 细胞经过不同浓度的丹酚酸乙处理 48h 后, 流式细胞仪测得的典型亚二倍体凋亡峰随药物剂量的增大而逐渐升高, 其中 0.4mg/ml、0.7mg/ml 和 1.0mg/ml 的丹酚酸乙处理细胞的凋亡率明显高于对照组 ($P<0.05$), 见表 1; 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞周期分布的影响见表 1 和图 3, 与对照组 S 期细胞 22.83% 相比, 丹酚酸乙处理组随着药物浓度的提高, S 期细胞比例明显增高, 分别为 29.14%、33.48%、41.02%、43.51% ($P<0.05$), 而 G_2/M 期、 G_0/G_1 期细胞呈相对平稳和逐步下降趋势, 提示丹酚酸乙处理可导致 MCF-7 细胞的 S 期阻滞。

表 1 丹酚酸乙对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响

组别	细胞周期(%)			凋亡率 (%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
对照组	60.26±1.26	22.83 ±1.45	15.26±2.05	2.79±0.32
0.1mg/ml 实验组	56.19±2.01	29.14±1.68*	13.42±1.95	3.78±1.12
0.4mg/ml 实验组	49.76±2.24	33.48±2.13*	15.68±1.45	6.29±0.75*
0.7mg/ml 实验组	41.27±1.97	41.02±2.04*	16.14±1.37	8.80±1.85*
1.0mg/ml 实验组	40.40±1.56	43.51±1.76*	15.07±1.42	9.02±1.54*

*: 与对照组比较 $P<0.05$ 。

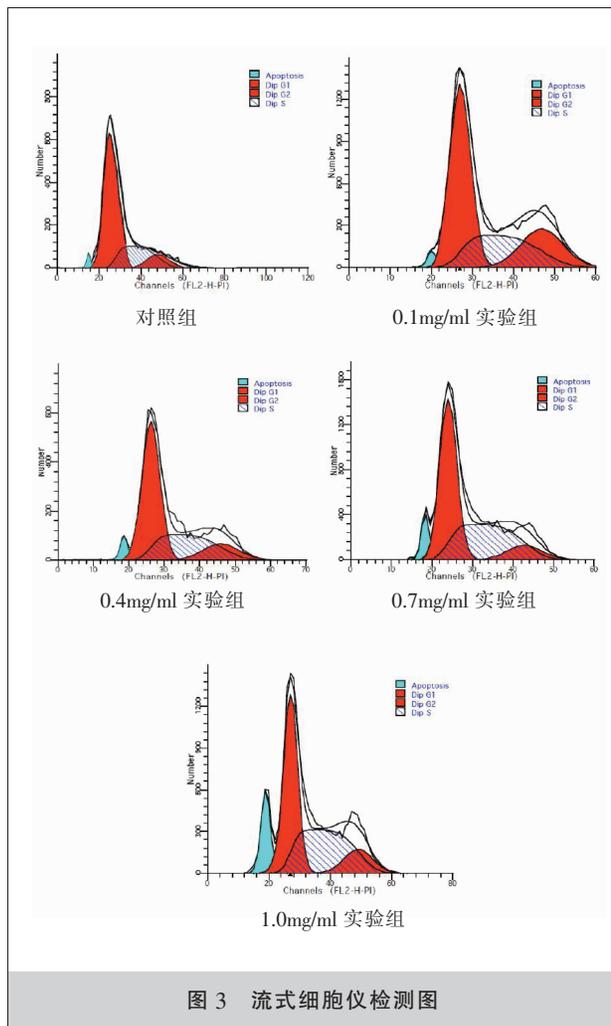


图 3 流式细胞仪检测图

2.4 Western Blot 法检测丹酚酸乙作用前后 MCF-7 细胞内 caspase-3 蛋白表达

不同浓度丹酚酸乙作用 MCF-7 细胞 48h 后结果显示, 随着丹酚酸乙作用浓度的升高, 细胞总 caspase-3 蛋白的表达量明显增高, 见图 4。

3 讨论

研究发现, 肿瘤的发生发展与自由基反应密切相关, 尤其与活性氧联系紧密, 体内适当的自由基对人体有益, 但肿瘤内氧自由基显著增加可导致肿瘤增殖分化, 丹酚酸乙可通过抑制活性氧的产生而抑制肿瘤细胞的增殖和分化, 也是其抗肿瘤的机制之一^[5]。其次, 丹酚酸乙可通过抑制肿瘤细胞从宿主细胞中提取核酸的“补救途径”来

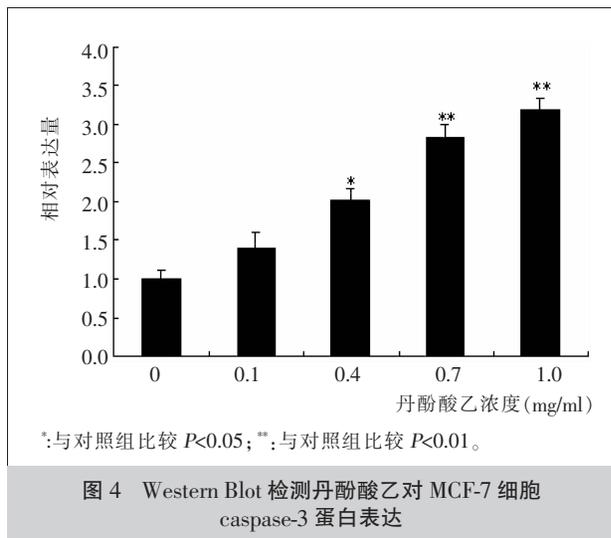


图4 Western Blot 检测丹酚酸乙对 MCF-7 细胞 caspase-3 蛋白表达

抑制肿瘤细胞生长^[6]。

本研究结果显示,不同浓度的丹酚酸乙能有效地抑制 MCF-7 细胞增殖,并随丹酚酸乙浓度的增加和作用时间的延长,细胞增殖抑制率也增加。细胞增殖是通过细胞周期的运转来实现的,其中 G_1/S 期和 G_2/M 期是细胞周期中两个重要调控点。在本实验中,不同浓度的丹酚酸乙处理 MCF-7 细胞 48h 后,经流式细胞仪检测发现,实验组 S 期细胞逐渐增多,呈剂量依赖性。这表明,丹酚酸乙能使 MCF-7 细胞的细胞周期阻滞于 S 期,使细胞不能进入 G_2 期最终导致细胞生长抑制和死亡,机制可能与其抑制肿瘤细胞利用氧自由基与核酸合成有关。

细胞凋亡是受基因调控的、主动的细胞死亡过程。本实验中,Hoechst33258 荧光染色结果表明,随着药物浓度的增高,MCF-7 细胞凋亡数目也增多,同时细胞出现皱缩、胞核固缩且碎裂、凋亡小体形成,以及核分裂相随浓度增高而明显减少等现象。而流式细胞术检测也表明,经丹酚酸乙处理 48h 后,MCF-7 细胞的凋亡率明显增加,而且药物浓度越高,细胞的凋亡率增加越明显,这表明丹酚酸乙有促进 MCF-7 细胞凋亡的作用,其机制可能与丹酚酸乙提高乳腺癌细胞 S 期比例,使细胞周期阻滞在 S 期,进一步引起细胞程序性凋亡有关。

细胞凋亡的发生和调控是一个极其复杂的系统,其机制尚未完全清楚。但已证明受多个基因的调控,其中 caspase-3 基因及其表达的 caspase-3 蛋白在凋亡的调控中具有重要的作用。

正常情况下胞质中的 caspase-3 以无活性的酶

原形式存在,当细胞接受凋亡刺激时,它被系列反应激活,进而诱导细胞发生凋亡^[7]。众多研究证实,caspase-3 蛋白在不同的癌细胞中表达率是不一样的,如在前列腺癌中 caspase-3 蛋白表达是缺失的^[8],在胃癌组织和原发性肝癌中表达量远低于癌旁和正常组织^[9,10]。同样在乳腺癌组织中 caspase-3 的表达与乳腺良性病变的表达比较也呈显著下调,并与乳腺癌组织学分级呈负相关^[11]。本实验证实,caspase-3 蛋白在乳腺癌 MCF-7 细胞中阳性表达率非常低。caspase-3 作为凋亡的核心蛋白酶,其表达下调和缺失,可能使恶性肿瘤在形成过程中逃避集体细胞凋亡的自我调节,得以不断增殖,最终形成恶性肿瘤。本实验通过 Western Blot 法检测丹酚酸乙作用前后 MCF-7 细胞内 caspase-3 蛋白表达情况,结果显示,经丹酚酸乙作用的 MCF-7 细胞 caspase-3 蛋白表达显著增加,呈剂量依赖性。这表明,丹酚酸乙能上调 MCF-7 细胞内 caspase-3 蛋白表达量,进而诱导 MCF-7 细胞凋亡。

总而言之,丹酚酸乙能抑制 MCF-7 细胞的生长,其机制可能与上调细胞内 caspase-3 表达量、阻滞细胞周期于 S 期、诱导细胞凋亡,进而抑制肿瘤细胞增殖有关。

参考文献:

- [1] Ai CB, Li LN. Stereostructure of salvianolic acid-B and isolation of salvianolic acid-C from salvia-miltiorrhiza[J]. J Nat Products, 1988, 51(1):145-149.
- [2] Liu J, Shen HM, Ong CN. Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. Cancer Lett, 2000, 153(1-2):85-93.
- [3] 宋晓冬, 杨军厚, 谭秀华. 丹酚酸乙抗前列腺肿瘤的作用[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(1):11-12.
- [4] Hao Y, Xie T, Korotcov A, et al. Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways [J]. Int J Cancer, 2009, 124 (9) : 2200-2209.
- [5] 田允鸿, 陈卫国, 谢国柱, 等. 乳腺癌干细胞中活性氧簇水平的研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(5): 417-419.
- [6] 张胜华, 粟俭, 甄永苏. 丹酚酸 A 抑制核甘转运并增强化疗药物的抗肿瘤作用[J]. 药学学报, 2004, 39(7) : 496-499.
- [7] Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma[J]. Acta Oncol, 2000, 39(2): 151-156.
- [8] Winter RN, Kramer A, Borkowaki A, et al. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 1227-1232.
- [9] Hoshi T, Sasano H, Kato K, et al. Immunohistochemistry of caspase-3 /CPP32 in human stomach cancer and its correlation with cell proliferation and apoptosis [J]. Anticancer Res, 1998, 18(6A):4347-4353.
- [10] 孙宝华, 张俊, 王宝菊, 等. caspase-3 基因表达与原发性肝癌细胞凋亡无关[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(1):39-41.
- [11] 马兆生, 戴岳楚, 谢伯剑, 等. HIF-1 α 与 Caspase-3 在乳腺癌中的表达及临床病理意义[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(11):2216-2219.