

丹皮酚对乳腺癌细胞的生长抑制作用

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

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

摘要: [目的] 研究丹皮酚(Pae)对人乳腺癌细胞的作用及机制。[方法] 采用 MTT 法检测 Pae 对乳腺癌 Bcap37、MDA-MB-453 细胞的增殖抑制作用, 流式细胞仪检测 Pae 对 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞凋亡和周期分布的影响, Western Blot 检测相关蛋白表达。[结果] Pae 对乳腺癌 Bcap37 及 MDA-MB-453 细胞均具有增殖抑制作用, 并呈时间和剂量依赖性; 流式细胞仪分析细胞凋亡率呈浓度依赖性, 细胞周期分析显示 Pae 阻滞 Bcap37 及 MDA-MB-453 细胞在 G₁ 期; Western Blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase 7、Caspase 3 和 PARP 表达减少, 而 PTEN 蛋白表达增加。[结论] Pae 对乳腺癌细胞系具有增殖抑制作用, 其机制可能与促进细胞凋亡及引起细胞周期阻滞, PTEN 表达上调有关。

关键词: 丹皮酚; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)04-0276-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.04.B003

Effects of Paeonol on Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells

TANG Hai-biao, CAI Jing-wei, LIU Wei-guo, et al.

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Pae on proliferation of human breast cancer cells and its possible influencing mechanism. [Methods] MTT assay was used to measure the effect of Pae on proliferation of breast cancer cells Bcap37 and MDA-MB-453. Apoptosis and cell cycle were measured by flow cytometry. Western Blot was used for detection of protein expression. [Results] Pae showed inhibitory effect on Bcap37 and MDA-MB-453 breast cancer cells in time- and dose-dependent. Bcap-37 and MDA-MB-453 cells treated by Pae were blocked in G₁ phase. The apoptosis rate appeared in dose-dependent. Western Blot showed that the expressions of Caspase 3, Caspase 7 and PARP decreased and the expression of PTEN increased. [Conclusion] Pae can inhibit the growth of breast cancer cells, which is possibly contribute to apoptosis inducing and cell cycle arrest.

Subject words: Paeonol; breast neoplasms; cell proliferation; apoptosis

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着全世界女性的身心健康, 在美国乳腺癌位居肿瘤发病率的首位, 据美国癌症协会(ACS)估计 2012 年预计有 226 870 例新发乳腺癌病例, 死亡 39 620 例^[1]。乳腺癌的治疗包括手术、放疗、化疗、分子靶向治疗、内分泌治疗等。然而, 目前最常用的化疗药物缺乏对肿瘤细胞的特异性, 而且化疗药物的临床疗效受到

副作用、毒性和耐药性的限制。因此, 从来源广泛的中草药和植物中寻找新的更有效的抗癌药物成为了目前肿瘤研究的热点。

丹皮酚(Paeonol, Pae)是从牡丹花的根皮中提取出来的中药单体^[2]。研究表明, 丹皮酚具有一定的抗肿瘤活性, 在体内外对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用^[3-9]。然而, 丹皮酚对乳腺癌的作用很少被报道。本研究旨在探讨丹皮酚对乳腺癌细胞株 Bcap-37 及 MDA-MB-453 的增殖抑制和凋亡诱导作用, 及其对乳腺癌细胞周期分布的影响, 为乳腺癌患者的有效干预提供理论依据。

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, 主任医师, 硕士生导师, 博士; 浙江省肿瘤医院肿瘤内科, 浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号(310022); E-mail: wxiaojia0803@163.com

收稿日期: 2014-02-25; **修回日期:** 2014-03-20

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

Pae(分子式为 $C_9H_{10}O_3$, 分子量 166.18) 购自 Sigma 公司, 纯度大于 99%, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解成浓度为 100mg/ml 贮存液, 以滤器滤过除菌, 4℃保存, 使用时加入无双抗的 DMEM, 配成终浓度, 并使 DMSO 的终浓度小于 1%。MTT 和碘化丙啶(propidium iodide, PI) 购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC kit 购自 BD 公司; anti-GAPDH、Caspase 3、Caspase 7、PARP、PTEN 及兔二抗购自 CST 公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞购自中国科学院上海细胞库, 传代培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100μg/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养液中, 于 5% CO_2 、37℃、饱和湿度条件下培养, 实验时采用对数生长期细胞。

1.3 细胞活性检测

取对数生长期细胞, 消化计数, 制成细胞悬液, 以 3 000 个细胞/100μl/孔接种于 96 孔板, 贴壁 24h, 吸去培养液, 加入不同浓度的实验用药, 药物终浓度为 0、100、200、400、800μg/ml, 每组浓度设 5 个复孔, 细胞培养 24、48、72h 后, 加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl, 继续培养 4h, 吸去上液, 每孔加入 DMSO 150μl, 用酶标仪先震荡 5min, 检测 490nm 处各孔吸光值 OD_{490} , 计算各组存活率, 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})×100%, 实验重复 3 次。

1.4 细胞凋亡检测

对数生长期的 Bcap37、MDA-MB-453 细胞每孔接种细胞 3×10^5 个至 6 孔板中, 分别设 Pae 0、200、400μg/ml 组, 贴壁 24h 后吸去培养液, 加入实验用药, 培养 48h 后用 PBS 液清洗 2 次, 胰酶消化, 1 000r/min 离心 5min, 收集细胞。吸去上液, 将各组细胞经 PBS 液漂洗 2 次, Annexin/PI 双标法检测细胞凋亡, 各组细胞去上液, 加入 1×Binding Buffer 液 100μl, 重悬细胞悬液, 取 1×10^5 个细胞, 加入 Annexin V-FITC 试剂 5μl, PI 试剂 10μl, 轻轻摇晃均匀, 避光放置 15min, 加入 1×Binding Buffer 液 400μl, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 发射光为氩离子激光器。

1.5 细胞周期检测

取对数生长期的 Bcap-37 和 MDA-MB-453 细胞每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, 贴壁 24h 后分别予以 Pae (0、400μg/ml) 处理, 培养 48h 后胰酶消化, 1 000r/min 离心 5min, 收集细胞, 将细胞经 PBS 液漂洗 2 次去上液, 继续缓慢加入 70% 冰冻酒精固定, 置 4℃冰箱过夜, 用 PBS 液漂洗 2 次, PI 染色细胞避光 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, 计算细胞 DNA 含量和各周期时相(G_0/G_1 、S、 G_2/M)细胞百分比。

1.6 Western Blot 检测

取 Bcap-37 及 MDA-MB-453 细胞每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, 细胞贴壁 24h 后, 按照 0、200、400μg/ml 药物处理 48h, 中止培养后, 用 4℃预冷的 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 洗涤细胞 3 次, 每孔加入 80μl 含 PMSF 和磷酸酶抑制剂的裂解液, 置冰上裂解后收集转移至 1.5ml 离心管中, 于 4℃、12 000r/min 离心 10min, 将离心后的上清分装至干净 EP 管中备用, 用 Nanodrop 2000 蛋白浓度定量, 于 100℃水浴 5min, -80℃保存备用。本实验选择 10% 和 12% 的 SDS-PAGE 分离胶及 4% 的浓缩胶; 选择恒压 80V/120V, 待溴酚蓝至分离胶底部时, 停止电泳。将活化的 PVDF 膜和胶置入转膜装置, 恒流 250mA 转膜 2h, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1h, 一抗结合 4℃过夜, TBST 室温下脱色摇床上洗 2 次, 每次 10min; 再用 TBS 洗 1 次, 10min 二抗(羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗工作浓度均为 1:5 000) 室温孵育 2h, 再用 TBST 洗脱, 加 ECL 避光孵育 5min, 化学发光荧光影像分析仪进行显影, 保存图像、分析。

1.7 统计学处理

每组实验重复 3 次, 各组数据均使用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析, 数据以均数±标准差表示, 多组比较采用单因素方差分析, 样本均数采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pae 对两种乳腺癌细胞增殖的抑制作用

Pae 对乳腺癌 Bcap37、MDA-MB-453 细胞的增殖均具有抑制作用, 并呈时间和剂量依赖性 (Table 1、2,

Figure 1),随着 Pae 浓度的增大,2 种乳腺癌细胞的

Table 1 Paeonol impact on Bcap37 cell proliferation (%)

Groups (μg/ml)	24h	48h	72h
0	100.09±10.12	100.00±1.83	100.00±2.58
100	89.58±4.53	82.74±2.14	76.69±3.28
200	68.84±4.43	61.65±4.72	54.06±1.34
400	54.60±4.96	36.98±5.79	33.10±1.73
800	25.39±1.76	10.30±6.20	-0.18±0.84

Table 2 Paeonol impact on MDA-MB-453 cell proliferation (%)

Groups (μg/ml)	24h	48h	72h
0	100.00±9.03	100.00±0.70	100.00±4.77
100	87.39±1.78	78.99±3.21	60.55±2.96
200	68.55±1.01	58.98±0.70	47.62±3.56
400	59.17±1.63	50.72±0.50	32.72±1.54
800	26.47±6.07	16.29±9.77	1.10±2.62

活性降低。Bcap37 及 MDA-MB-453 在 24h 的 IC₅₀ 分别为 404.0、428.0μg/ml,48h 分别为 268.5、303.7μg/ml,72h 分别为 219.6、165.6μg/ml。

2.2 Pae 对 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡,结果 Pae 在 0、200、400μg/ml 处理 48h 后 Bcap37 细胞诱导的凋亡率分别为 3.11±0.10、6.98±0.23、12.00±0.37,MDA-MB-453 细胞的凋亡率分别为 3.08±0.11、7.00±0.30、18.93±0.23,组间差异有统计学意义(P<0.05)(Figure 2)。

2.3 Pae 对 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞周期的影响

以 Pae 400μg/ml 处理 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞后,Bcap37 及 MDA-MB-453 细胞周期分别发生明显改变,表现为 Bcap37 的 G₁ 期细胞比例由 59.14±0.49 增加至 65.84±0.38,MDA-MB-453 的 G₁

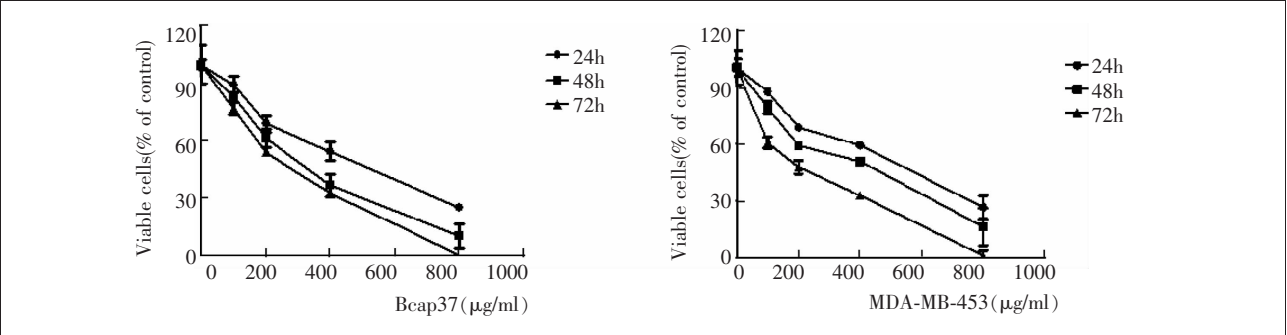


Figure 1 Proliferation inhibition of Paeonol on Bcap-37 and MDA-MB-453 cell lines

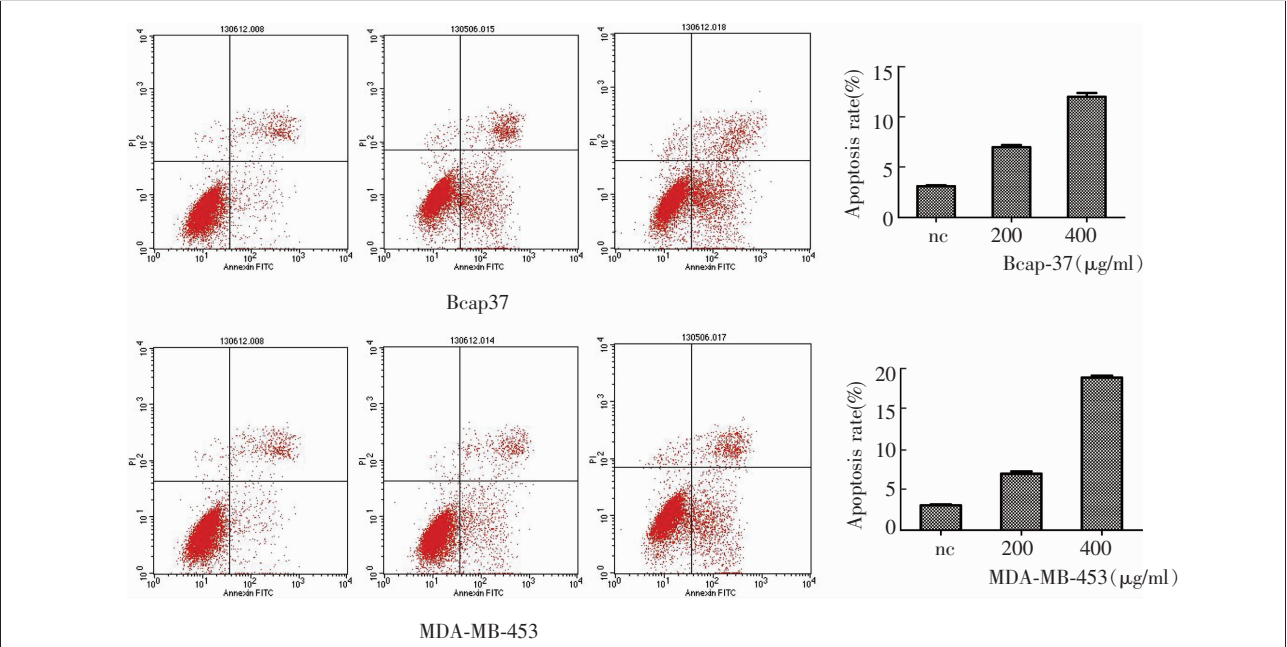


Figure 2 The effect of Paeonol on the cell apoptosis of Bcap-37 and MDA-MB-453

期细胞由 45.65 ± 2.33 增加至 60.81 ± 0.72 , 细胞周期的差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (Table 3, Figure 3)。

2.4 Western Blot 检测凋亡相关蛋白的表达

经 Western Blot 检测发现, Pae (0、200、400 $\mu\text{g/ml}$) 处理 48h 后的乳腺癌 Bcap37 和 MDA-MB-453 细胞中 Caspase 3、Caspase 7 表达减少; PARP 被降解减少, PTEN 蛋白表达增多, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (Table 4, Figure 4)。

3 讨论

丹皮酚具有镇痛、抗炎、解热和抑制变态反应的作用, 在临床上已经用于治疗湿疹、皮炎、发热、各种疼痛、风湿、类风湿性关节炎等。在体内外可以抑制多种肿瘤细胞的增殖, 但具体机制尚不清楚, 可能与诱导细胞凋亡、抑制 DNA 合成和影响细胞信号通路等有关。如 Lei 等^[5]发现丹皮酚通过抑制 PI3K/AKT (磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B) 的途径和下调 COX-2 (环氧合酶-2) 和生存素表达的激活来抑制细胞的增殖。Yin 等^[6]发现丹皮酚可以通过激活 Caspase 3 和下调生存素诱导卵巢癌细胞凋亡。

在本研究中, 我们发现丹皮酚在体外能够明显抑制人乳腺癌 Bcap37 及 MDA-MB-453 细胞的增殖, 且呈时间和剂量依赖方式, 具体表现为随着作用浓度和时间的增加, 细胞的增殖抑制率升高, 这与丹皮酚在其他肿瘤细胞中结果相似。此外本研究, 观察丹皮酚对凋亡的影响, 通过 Annexin V-FITC/PI 双标

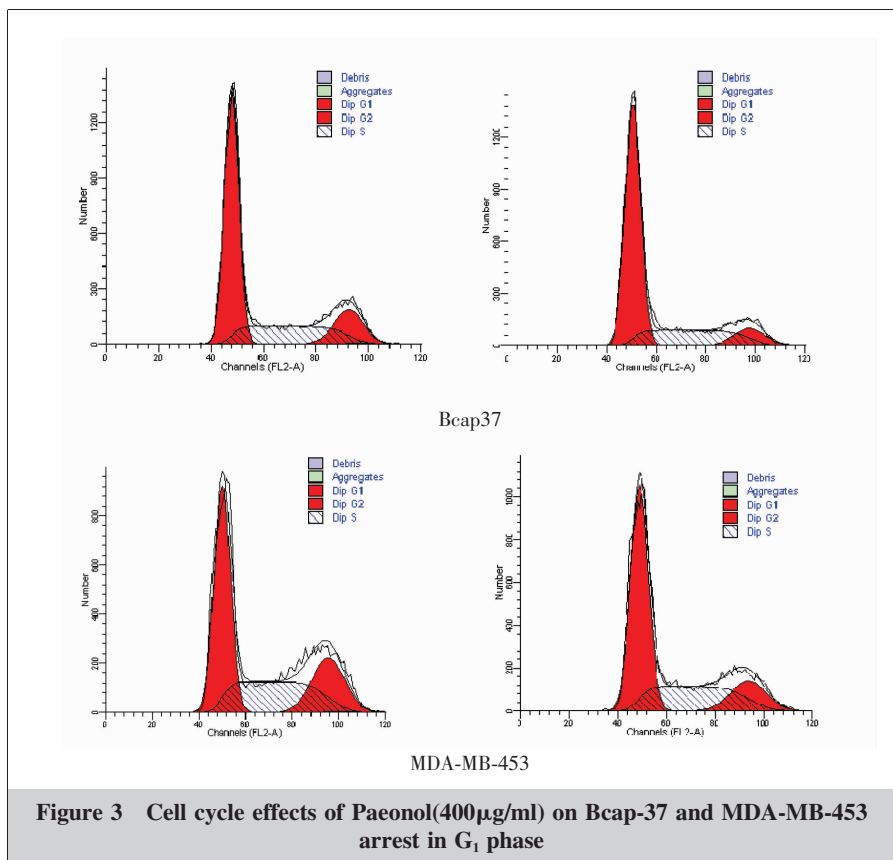


Figure 3 Cell cycle effects of Paeonol (400 $\mu\text{g/ml}$) on Bcap-37 and MDA-MB-453 arrest in G_1 phase

Table 3 Effect of Paeonol on cell cycle of Bcap37 and MDA-MB-453 cell lines ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group ($\mu\text{g/ml}$)		$G_0/G_1(\%)$	$S(\%)$	$G_2/M(\%)$
Bcap37	0	59.14 ± 0.49	24.95 ± 0.40	15.51 ± 0.25
	400	65.84 ± 0.38	24.29 ± 0.36	9.87 ± 0.31
MDA-MB-453	0	45.65 ± 2.33	33.34 ± 2.07	21.02 ± 1.85
	400	60.81 ± 0.72	25.52 ± 2.53	13.67 ± 1.34

Table 4 Quantitative analysis of PTEN, Caspase 3, Caspase 7, PARP and PTEN expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group ($\mu\text{g/ml}$)		PTEN	Caspase 7	Caspase 3	PARP
Bcap37	0	0.28 ± 0.14	0.72 ± 0.23	0.45 ± 0.19	0.72 ± 0.23
	200	0.36 ± 0.19	0.46 ± 0.17	0.32 ± 0.12	0.53 ± 0.19
	400	0.54 ± 0.25	0.33 ± 0.13	0.23 ± 0.07	0.38 ± 0.16
MDA-MB-453	0	0.32 ± 0.09	0.58 ± 0.22	0.56 ± 0.25	0.64 ± 0.24
	200	0.43 ± 0.21	0.49 ± 0.18	0.31 ± 0.17	0.49 ± 0.22
	400	0.67 ± 0.20	0.24 ± 0.13	0.13 ± 0.08	0.31 ± 0.14

法检测细胞凋亡, 结果提示丹皮酚可以诱导两种乳腺癌细胞的凋亡。200、400 $\mu\text{g/ml}$ 剂量对凋亡有影响, 且差异有统计学意义。我们进一步研究了凋亡相关蛋白的表达, 在细胞凋亡过程中 Caspase 3、Caspase 7 受上游的影响被活化后, 这两种蛋白酶可以剪切底物使凋亡得以进行, 它们都可以剪切 PARP,

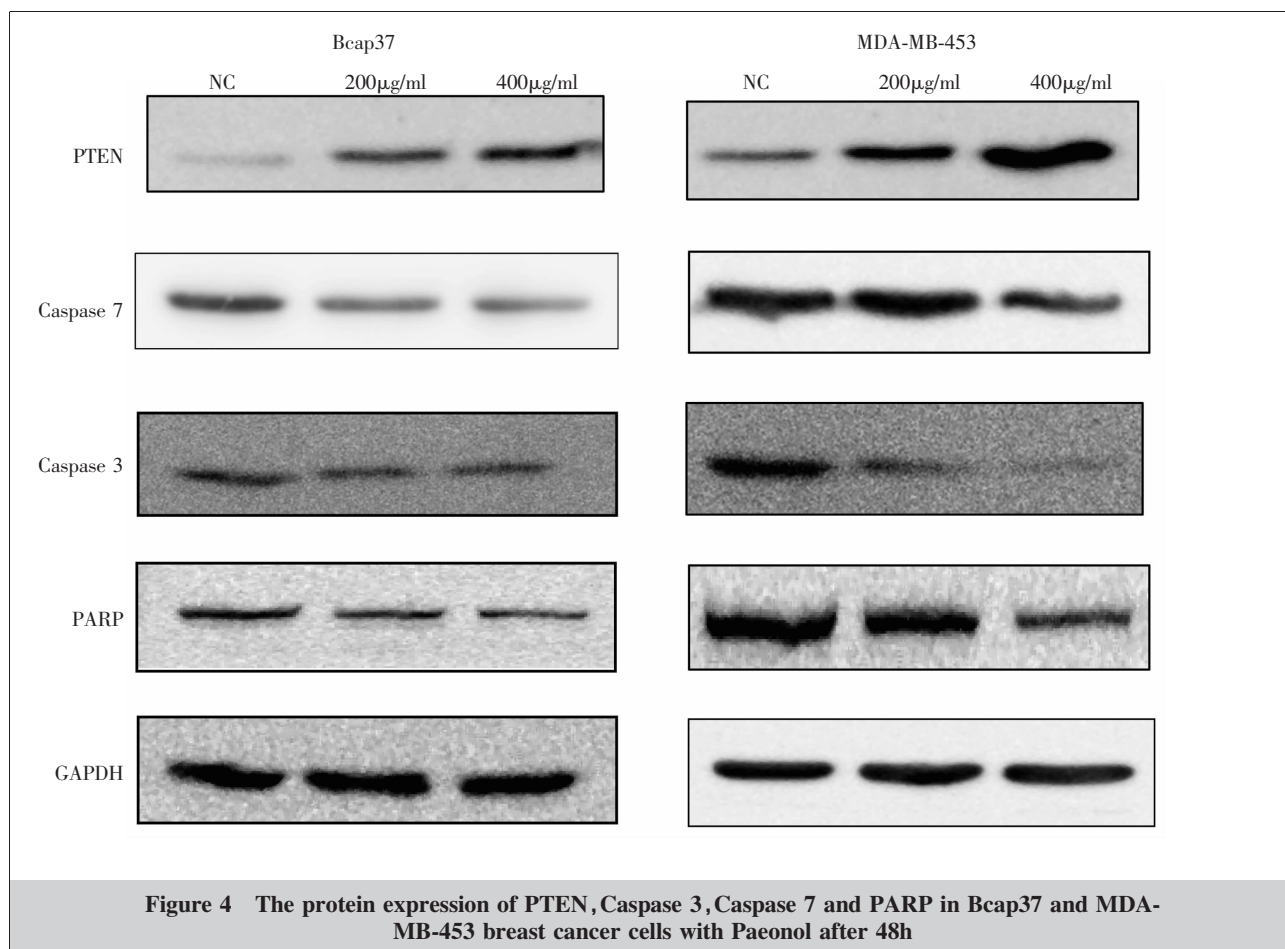


Figure 4 The protein expression of PTEN, Caspase 3, Caspase 7 and PARP in Bcap37 and MDA-MB-453 breast cancer cells with Paeonol after 48h

从而引起 DNA 的降解。PARP 作为 DNA 修复酶,是最具特征性的蛋白酶解底物,是化疗药物诱导早期凋亡的主要标志物^[11]。在本研究中发现, Caspase 3 及 Caspase 7 表达水平下调,表明其活化后剪切,进而引起 PARP 的剪切。在分子水平上证明丹皮酚能够促进 Bcap 37 及 MDA-MB-453 乳腺癌细胞的凋亡。

细胞周期的控制是细胞增殖的主要调节机制,通过相关基因的严格监视和调控而使细胞周期有序运行,大多数细胞毒性药物或 DNA 损伤性药物都能将细胞周期阻滞于 G₁/S 期或 G₂/M 期,进而抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡^[11]。本实验结果表明 Pae 阻滞 Bcap37 及 MDA-MB-453 在 G₁ 期,与其抑制细胞增殖的趋势相符,提示细胞周期阻滞是丹皮酚引起细胞增殖抑制的重要原因之一。但对于丹皮酚调控乳腺癌细胞阻滞的机制还未加以深入研究。

PTEN 是最早发现具有磷酸酶活性的抑癌基因,其能够维持正常的物质代谢和内环境的自稳态, PTEN 的缺失或低表达与肿瘤进展及不良预后密切

相关^[12]。一些研究报道认为丹皮酚通过上调 PTEN 从而抑制肿瘤细胞增殖。如张春虎等^[9]研究发现丹皮酚通过上调 PTEN 的表达,减少 AKT1 和 AKT2 mRNA 的表达,通过 PTEN 调控 PI3K/AKT 通路引起肝癌 BEL-7404 细胞的增殖抑制。在我们的研究中,观察到丹皮酚增强 PTEN 蛋白的表达,而丹皮酚对乳腺癌细胞是否通过 PTEN 调控 PI3K/AKT 通路引起细胞增殖的变化需要进一步的实验验证。

综上所述,丹皮酚是一种有潜力的抗乳腺癌药物,我们的研究证明丹皮酚能明显抑制多种乳腺癌细胞的增殖,其机制可能跟诱导细胞凋亡、引起周期阻滞及上调 PTEN 有关,而 Pae 抑制肿瘤的具体作用机制仍未清楚,有待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Mao QQ, Ip SP, Xian YF, et al. Anti-depressant-like effect of

- peony:a mini-review[J]. Pharm Biol,2012,50(1):72-77.
- [3] Li N,Fan LL,Sun GP,et al. Paeonol inhibits tumor growth in gastric cancer in vitro and in vivo[J]. World J Gastroenterol, 2010,16(35):4483-4490.
- [4] Sun GP,Wan X,Xu SP,et al.Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines[J]. Dis Esophagus,2008,21(8):723-729.
- [5] Lei Y,Li HX,Jin WS,et al. The radiosensitizing effect of Paeonol on lung adenocarcinoma by augmentation of radiation-induced apoptosis and inhibition of the PI3K/Akt pathway[J]. Int J Radiat Biol,2013,89(12):1079-1086.
- [6] Yin J,Wu N,Zeng F,et al. Paeonol induces apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. Acta Histochem,2013,115(8):835-839.
- [7] Fan L,Song B,Sun G,et al. Endoplasmic reticulum stress-induced resistance to doxorubicin is reversed by paeonoltreatment in human hepatocellular carcinoma cells [J]. PLoS One,2013,8(5):e62627.
- [8] Li M,Tan SY,Zhang J,et al. Effects of paeonol on intracellular calcium concentration and expression of RUNX3 in LoVo human colon cancer cells[J].Mol Med Rep,2013,7(5):1425-1430.
- [9] Zhang CH,Hu SY,Li YH,et al.Anti-effect and mechanism of Paeonal on the hepatocellular carcinoma cell line Bel-7404[J]. Journal of Central South University(Medical Sciences),2006,31(5):682-685.[张春虎,胡随瑜,李云辉,等. 丹皮酚对人肝癌 Bel-7404 的抑瘤效应及其机制[J]. 中南大学学报(医学版),2006,31(5):682-685.]
- [10] Chen J,Hou R,Zhang X,et al. Calycosin suppresses breast cancer cell growth via ER β -dependent regulation of IGF-1R,p38 mAPK and PI3K/Akt pathways[J]. PLoS One, 2014,9(3):e91245.
- [11] Vundru SS,Kale RK,Singh RP. β -Sitosterol induces G₁ arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells [J].BMC Complement Altern Med,2013,13:280.
- [12] Xie M,He G,Wang R,et al.Matrine-induced apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via in vitro vascular endothelial growth factor-A/extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway inactivation[J]. Horm Metab Res, 2014.[Epub ahead of print]
- [13] Ming M,He YY.PTEN in DNA damage repair [J]. Cancer Lett,2012,319(2):125-129.

关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须在“作者登录”中先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将稿件处理费20元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到稿件处理费和上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《肿瘤学杂志》网址:<http://www.chinaoncology.cn>。

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。

《肿瘤学杂志》编辑部