

黄芩提取物抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长的研究

赵瑞刚¹, 苏依拉其木格^{2*}

(1. 内蒙古自治区人民医院 乳腺肿瘤外科, 内蒙古 呼和浩特 010017;
2. 内蒙古医科大学附属医院 临床医学研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 探讨黄芩提取物(scutellaria baicalensis georgi extract, SBGE)对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡和周期的影响, 进一步明确 SBGE 的抗肿瘤机制。方法 体外分别培养 MCF-7 细胞, 通过细胞苏木精-伊红(HE)染色、Annexin-V/PI 染色、流式细胞术(FCM)技术检测细胞形态、细胞膜结构、细胞凋亡和细胞周期的改变; 应用 Western-Blot 方法检测 Caspase-3 和 Cyclin D1 蛋白表达变化。结果 SBGE 组处理细胞 48h 后, 细胞 HE 染色显示: 细胞形态出现明显的凋亡特征, 如细胞核变小、染色质浓缩、出现凋亡小体等。FCM 检测发现, Annexin-V/PI 双染结果显示, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞发生的凋亡率较对照组增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。FCM 分析各组细胞周期变化显示, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期的变化。Western-Blot 检测发现, 与对照组比较, SBGE 处理细胞 48h 后, 乳腺癌细胞 Caspase-3 蛋白表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Cyclin D1 蛋白表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 本研究证实 SBGE 可能抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞, 诱导其细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, 从而在乳腺癌细胞中产生抗肿瘤的作用。

【关键词】黄芩提取物、人乳腺癌 MCF-7 细胞、细胞凋亡

中图分类号: R73.34

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)05-0534-04

乳腺癌是女性常见的恶性疾病, 发病率居于全球女性恶性肿瘤的首位, 随着人们年龄增加和生活方式的改变, 我国乳腺癌的发病率在过去十年里急剧增加, 且发病人群呈明显年轻化趋势。尽管乳腺癌诊疗方法比几年前有了很大进步, 但患者的后期生存质量仍被复发和转移所困扰。因此, 积极寻找乳腺癌侵袭及转移的潜在机制对乳腺癌的治疗有很大帮助。当前治疗乳腺癌方案多种多样, 效果显著, 但是困扰复发、转移的因素还很多, 需要在控制肿瘤的发生、发展方面进一步努力。有效的途径之一就是诱导细胞凋亡^[1]。传统中药(TCM)已被用于治疗各种癌症。黄芩(SBG)是一种著名的中药, 传统上被描述为具有“清热、燥湿、泻火、解毒和止血”的特性。在现代, 它已被证明具有多种特性, 包括抗氧化和抗炎作用, 并通过细胞凋亡途径抑制几种肿瘤的增殖。例如, SBG 通过 ROS 依赖性激活 Caspase 通路诱导人膀胱癌细胞凋亡, 通过使 PI3K/Akt 通路抑制 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞的扩散, 通过抑制 p38/MAPK 通路抑制卵巢癌细胞的增殖^[2]。因此, 本研究探讨黄芩提取物是否能够阻碍乳腺癌细胞生长、诱导乳腺癌细胞凋亡、降低乳腺癌细胞的侵袭能力。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

黄芩提取物(成都迈特生物科技有限公司, 编号 NAT-019); 人乳腺癌 MCF-7 细胞(北大肿瘤医院); DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶和 PBS(Hyclon, 美国); 流式细胞周期试剂盒(BD, 美国); 流式 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(BD, 美国); Caspase-3 和 Cyclin D β -actin antibody(Sigma 公司, 美国); 数码凝胶成像系统 Odyssey 近红外荧光成像系统扫描膜及计算机图像分析仪(MewImage 软件, Gene 公司, 美国); C6 流式细胞仪(BD 公司, 美国)。

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 细胞培养与分组

将处于对数生长期的 MCF-7 细胞用 0.25% 胰酶消化, 接种于孔内放置无菌盖玻片的 6 孔板内, 每孔加入 2 mL 浓度为 1×10^4 细胞/mL 的细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱内, 待细胞生长进入对数生长期后, 弃去旧培养液, 分为 3 组, 即对照组、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SBGE 组和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SBGE 组, 每组设 3 个复孔, 各孔加入含药培养液 2 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱内, 培养 48 h 后取出盖玻片, 以 $1 \times$ PBS

收稿日期: 2021-12-23; 修回日期: 2022-11-14

第一作者: 赵瑞刚(1978-), 男, 博士, 副主任医师。研究方向: 抗肿瘤药物的机制研究。E-mail: 1938602318@qq.com

*通信作者: 苏依拉其木格, 女, 硕士, 副研究员。研究方向: 抗肿瘤药物的机制研究。E-mail: 799104792@qq.com

清洗2次,预冷95%乙醇固定30 min, 1 × PBS浸泡5 min, 2次,苏木精染色15 min,自来水浸洗,伊红染液,染色6 min,自来水浸洗,经80%酒精10 s、100%酒精5 min,2次,逐级脱水,二甲苯透明5 min × 2,细胞面向下,中性树脂封片后采集和分析图象。

1.2.2 细胞凋亡的检测

将处于对数生长期的MCF-7细胞用0.25%胰酶消化,接种于75 cm²的培养瓶内,每瓶加入1 × 10⁴个细胞/mL的细胞悬液5 mL,置于37 °C、5%的CO₂培养箱内,待细胞生长进入对数生长期后,弃去旧培养液,分为3组,即对照组、10 μg/mL SBGE组和20 μg/mL SBGE组,每组设3个复孔,加入含药培养液5 mL/瓶,置于37 °C、5% CO₂培养箱内,培养48 h后收集细胞,调整细胞浓度为1 × 10⁶个细胞/mL,移入1.5 mL的EP管中,1000 rpm/min离心5 min,弃上清,用预冷1 × PBS洗2次,每管加500 μL的Binding Buffer悬浮细胞;加入5 μL Annexin V-FITC混匀后,加入20 μL Propidium Iodide (PI),混匀;室温避光,反应15 min,进行FCM观察和检测细胞凋亡率。

1.2.3 细胞周期的检测

收集药物作用后的MCF-7细胞,调整细胞浓度为1 × 10⁶个细胞/mL,移入1.5 mL的EP管中,1000 rpm/min离心5 min,弃上清,用预冷1 × PBS洗2次,加入100 μg/mL RNase 15 μL,振荡混合均匀,4 °C避光放置15 min,加入含50 μg/mL PI的PBS共500 μL,4 °C避光孵育30 min,FCM检测细胞周期3个时相的分布情况。

1.2.4 Western-Blot 检测 SBGE 对乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3 和 Cyclin D 蛋白的影响

收集药物作用后的MCF-7细胞,加入适量预冷的RIPA蛋白裂解液,将EP管冰浴30 min,4 °C条件12000 rpm/min离心15 min后收集上清于新EP管内,BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白电泳结束后,分离凝胶浸泡于转膜缓冲液中,依次按转膜夹黑面、转膜棉、三层滤纸、胶块、NC膜、三层滤纸、转膜棉、夹子面的顺序摆放后夹住放入转膜槽中,进行半干转膜,将NC膜完全浸入装有封闭液的玻璃皿中,脱色摇床上摇动,室温封闭1 h后,将NC膜放入装有Caspase-3、Cyclin D1和β-actin抗体(以5%脱脂牛奶1:300稀释)的50 mL离心管中,摇床摇动,4 °C过夜。用TBST在脱色摇床上将NC膜室温震荡洗涤3次,每次5 min,将NC膜放入装有二抗(以二抗稀释液1:1500稀释)的50 mL离心管中,室温摇床摇动1 h,避光条件下用

TBST在脱色摇床上将NC膜室温震荡洗涤3次,每次5 min,Odyssey 双色红外荧光扫描及灰度分析。

1.3 统计学处理

所有实验计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 19.0 统计学软件进行统计学处理。组间比较采用方差分析,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2.1 结果

2.1.1 SBGE对乳腺癌MCF-7细胞细胞形态的影响(HE染色)

乳腺癌MCF-7细胞核可见多个核仁,核明显,呈畸形、染色质明显,核深染,呈蓝紫色似墨滴状,细胞质深染,核胞质比失调,细胞间结构紧密,相邻细胞融合成片,呈典型的肿瘤细胞无限性生长状态(如图1-A)。SBGE作用于MCF-7细胞后,细胞体积极缩小,细胞胞核与胞浆浓缩而使细胞呈圆形,胞浆红染,胞核呈蓝紫色,细胞核染色质聚集成团块状,镜下可见核固缩、新月体形、环形和片状分裂以及形成凋亡小体等典型细胞凋亡形态(如图1-B、C)。

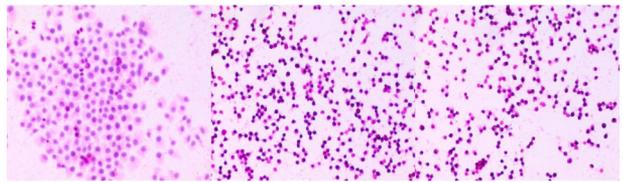


图1 SBGE对乳腺癌MCF-7细胞细胞形态的影响(HE染色)
A:乳腺癌MCF-7细胞(x100); B:10 μg/mL SBGE组(x100);
C:20 μg/mL SBGE组(x100)。

2.1.2 SBGE对乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响

SBGE作用于MCF-7细胞48 h后,利用FCM检测Annexin-V/PI结果显示,对照组、10 μg/mL和20 μg/mL组细胞凋亡率分别为0.51%、0.65%和1.59%,与对照组比较,10 μg/mL组细胞凋亡率增加,差异有统计学意义($P<0.05$);20 μg/mL组细胞凋亡率则显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$)(如图2)。

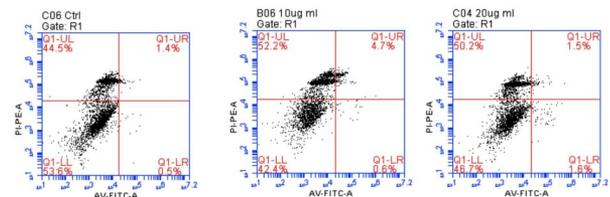


图2 SBGE对乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响(FCM)
A:乳腺癌MCF-7细胞对照组; B:10 μg/mL SBGE组;
C:20 μg/mL SBGE组。

2.1.3 SBGE对乳腺癌MCF-7细胞周期的影响

FCM检测的细胞周期结果显示,SBGE作用于

MCF-7 细胞 48 h 后, 对照组、10 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组和 20 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组 G₀/G₁ 期时相分别为 48.77%、57.15% 和 66.26%; S 期时相分别为 37.13%、31.06% 和 22.29%; G₂/M 期时相分别为 14.11%、11.80% 和 14.64%, 与对照组比较, 10 $\mu\text{g/mL}$ 组 G₀/G₁ 期增加 ($P < 0.05$); 20 $\mu\text{g/mL}$ 组 G₀/G₁ 期则显著增加 ($P < 0.01$) (如图 3)。

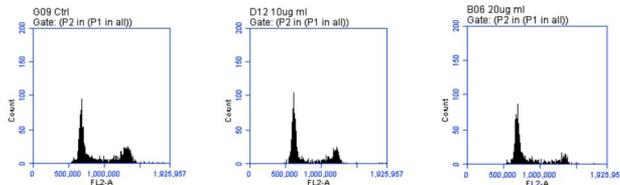


图 3 SBGE 对乳腺癌 MCF-7 细胞周期的影响 (FCM)
A: 乳腺癌 MCF-7 细胞对照组; B: 10 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组;
C: 20 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组。

2.1.4 SBGE 对乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3 和 Cyclin D1 蛋白的影响

Western - Blot 电泳结果显示, SBGE 作用于 MCF-7 细胞后, 细胞 Caspase-3 蛋白条带颜色变深, 对照组、10 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组和 20 $\mu\text{g/mL}$ SBGE 组灰度值分别为 0.56、0.88 和 0.91, 与对照组比较, 10 $\mu\text{g/mL}$ 组灰度值增加 ($P < 0.05$); 20 $\mu\text{g/mL}$ 组灰度值则显著增加 ($P < 0.01$)。细胞 Cyclin D1 蛋白条带颜色变浅, 对照组、10 $\mu\text{g/mL}$ 组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 组灰度值分别为 0.92、0.75 和 0.43, 与对照组比较, 10 $\mu\text{g/mL}$ 灰度值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 20 $\mu\text{g/mL}$ 组灰度值显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (如图 4, 表 1)。

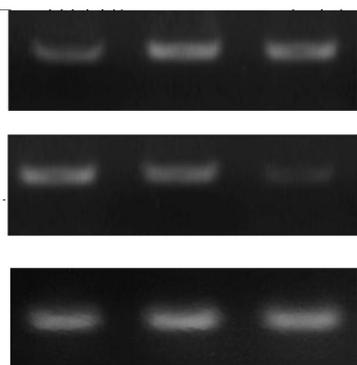


图 4 SBG 对乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3 和 Cyclin D 蛋白的影响

表 1 SBGE 对 MCF-7 细胞 Caspase-3 和 Cyclin D1 蛋白灰度值的影响 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

分组	n	Caspase-3	Cyclin D1
对照组	3	0.56 \pm 0.012	0.92 \pm 0.014
10 $\mu\text{g/mL}$	3	0.88 \pm 0.035*	0.75 \pm 0.023*
20 $\mu\text{g/mL}$	3	0.91 \pm 0.003**	0.43 \pm 0.016**

注: 与对照组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

3 讨论

人类对恶性肿瘤的研究, 已经存在几世纪。目前其被认为是一种复杂的疾病, 乳腺癌是常见的肿瘤类型之一。此疾病主要是由于调控细胞分裂的反馈机制失效引起的, 这会导致体内细胞不受控制并无限限制的恶性增长。在我国, 乳腺癌居女性发病率和病死率首位, 发病呈现出逐渐年轻化的特征。当前, 乳腺癌相关的临床治疗, 常采用切乳、保乳手术, 放疗化疗手术, 或根据疾病类型采用手术、药物等联合治疗等, 以达到治疗效果, 提高寿命。而对于当前的治疗策略, 有效解决癌症的耐药性、转移及复发等问题仍旧是棘手问题。人们试图开展崭新的, 与生物治疗模式相关途径, 进行基础、临床实验研究, 以进一步探索靶向治疗癌症的有效策略。其中, 中药在肿瘤的治疗方面突飞猛进, 多个研究证实中药能够阻止恶性肿瘤进展, 为未来的恶性肿瘤治疗找到了新的路径^[3,4]。

黄芩提取物 (scutellaria baicalensis georgi extract, SBGE) 是从黄芩 (scutellaria baicalensis georgi, SBG) 的根茎中提炼出来, SBGE 属于黄酮类化合物, 具有多种药理活性, 包括抗氧化、抗凋亡、抗过敏和抗炎作用^[5]。此外, 黄芩及其类黄酮已被证明在各种类型的癌细胞中表现出抗癌作用^[6-8]。尽管有报道, SBG 在体外抑制几种癌细胞系的增殖^[9,10], 但其在人乳腺癌 MCF-7 细胞中的抗癌活性和相关机制仍不清楚。

这些年肿瘤细胞凋亡是研究热点。细胞凋亡就是外部和内部信号作用于细胞, 诱发细胞死亡, 同时有关的基因会推动这个过程, 导致细胞按一定程序走向死亡。细胞凋亡可通过半胱天冬酶 (cysteiny asparatate specific proteinases, Caspase) 的蛋白酶家族介导的外源性或内源性途径触发; Caspases 是细胞凋亡机制的核心, 因为它们既是细胞死亡的起始物 (Caspases 2、Caspases 8、Caspases 9 和 Caspases 10, 主要负责凋亡途径的开始) 和执行者 (Caspases 3、Caspases 6 和 Caspases 7, 负责细胞成分的明确分裂)。Caspase 在正常情况下以无活性的前体形式合成与贮存, 一旦被激活, 启动 Caspases 就会切断执行体 Caspases, 执行特定细胞底物的关键性分裂, 最终导致细胞凋亡。两种凋亡途径融合激活效应器是 Caspase 3, 激活导致细胞的形态学和生化改变等细胞凋亡特征, 最终使细胞凋亡。研究表明^[7], Caspase 可调控细胞凋亡并在乳腺癌治疗中

发挥重要作用,提高活化的 Caspase-3 蛋白表达量可诱导乳腺癌细胞凋亡^[11]。同时,在过去的几年中,关于乳腺癌细胞生物学行为的研究大多集中在针对治疗药物敏感性的基因调控上。在许多肿瘤中发现了细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)的扩增,影响了细胞周期调控、扰乱细胞周期、促进生长和癌变。Cyclin D1 是恶性肿瘤生物学行为的关键因素,促进肿瘤的侵袭性和高增殖活性。Cyclin D1 的主要功能是促进细胞增殖。Cyclin D1 通过结合并激活 G1 时期特有的周期蛋白依赖性激酶 CDK4, G1 期周期抑制蛋白(Rb)被磷酸化,磷酸化的 Rb 蛋白从其所结合的 E2F 转录因子上解离, E2F 转录因子起始转录活细胞周期的基因,从而推动细胞周期由 G1 时期进入到 S 时期。Cyclin D1 基因的调控解除可能是导致癌变过程中细胞周期失去正常控制的原因之一^[12]。小鼠模型中已经证实 Cyclin D1 可以促进正常乳腺和乳腺肿瘤的发展。Cyclin D1 在 20% 的人类乳腺癌病例中出现基因扩增,在 50% 以上的乳腺肿瘤中蛋白质过度表达。在 61 份乳腺癌组织中, Cyclin D1 呈高表达 28 份,高表达率为 45.90% (28/61),表明 Cyclin D1 在乳腺癌组织中有较高的过表达率^[13]。

本研究观察了 SBGE 对 MCF-7 细胞作用的潜在机制,通过不同浓度 SBGE 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后,对乳腺癌细胞进行细胞凋亡和周期分析,然后进行相关蛋白 Caspase-3 和 Cyclin D1 的检测,研究结果显示, SBGE 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 48h 后可诱导肿瘤细胞产生凋亡,促进凋亡关键蛋白 Caspase-3 的表达,同时阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期,减少 Cyclin D1 的表达,阻断肿瘤细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期的过程,从而我们通过人乳腺癌细胞中的 Caspase-3 和 Cyclin D1 途径确定了 SBGE 诱导凋亡和阻滞细胞周期的作用,初步揭示 SBGE 抑制肿瘤生长的作用机制。

肿瘤学家对从中医中寻找抗癌药物有相当大的兴趣。过去的临床数据表明某些草药具有抗癌特性^[14];然而,由于缺乏科学证据,有些科学家怀疑中医的有效性。最近,实验表明中药成分可能具有抗癌作用,临床试验表明中药可以提高生存率,增加肿瘤反应、改善生活质量和降低化疗毒性^[15]。本研究表明, SBGE 诱导 Cyclin D1 蛋白下调和 Caspase-3 蛋白上调,诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期。因此, SBGE 可能通过人乳腺癌 MCF-7 细胞的内在途径导致细胞死亡。这些发现提示 SBGE 可以作为一种潜在的抗癌剂。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3):209-249
- [2] Shien T, Iwata H. Jpn adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2020, **50**(3):225-229
- [3] Kushwaha PP, Singh AK, Kumar S, et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells by naphthylisoquinoline alkaloids[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, **409**:115297
- [4] Fasoulakis Z, Koutras A, Kontomanolis EN, et al. Breast cancer apoptosis and the therapeutic role of luteolin[J]. *Chirurgia (Bucur)*, 2021, **116**(2):170-177
- [5] 马瑞莲, 王毅. MAPK 信号通路在乳腺癌中的研究进展[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2021, **43**(S1):162-165
- [6] Loibl S, Poortmans P, Curigliano G, et al. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2021, **397**(10286):1750-1769
- [7] Traves KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment[J]. *Am Fam Physician*, 2021, **104**(2):171-178
- [8] Ugras SK, Layeequr RR. Hormone replacement therapy after breast cancer: yes, no or maybe[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, **525**:e111180
- [9] Park S, Lim W, Song G. Chrysophanol selectively represses breast cancer cell growth by inducing reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress via AKT and mitogen-activated protein kinase signal pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, **360**:201-211
- [10] Liu Y, Xiong M, Jia Y, et al. Effect of baicalin on gestational hypertension-induced vascular endothelial cell damage[J]. *J Int Med Res*, 2020, **48**(10):e3000605
- [11] Song JW, Long JY, Li XF, et al. Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics, toxicity of *Scutellaria baicalensis* Georgi, and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review[J]. *Chin Med*, 2020, **15**:102
- [12] Choi EO, Hwang HJ, Choi YH. Induction of apoptosis scutellaria baicalensis georgi root extract by inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in human leukemia U937 cells[J]. *J Cancer Prev*, 2019, **24**(1):11-19
- [13] Tsai CL, Tsai CW, Bau DT, et al. Protective effects of baicalin on arsenic trioxide-induced oxidative damage and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *In Vivo*, 2021, **35**(1):155-162
- [14] Lee MH, Hong SH, Choi YH, et al. Hwang-heuk-san induces apoptosis in HCT116 human colorectal cancer cells through the ROS-mediated activation of caspases and the inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, **36**(1):205-214
- [15] Le CC, Lazrek Y, Dubreuil O, et al. ITCN-dependent proteasomal degradation of c-FLIP induced by the anti-HER3 antibody 9F7-F11 promotes DR5/caspase 8-mediated apoptosis of tumor cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, **17**(1):106