

• 实验研究 •

黄芪注射液对 basal-like 型乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株增殖和凋亡的影响

刘鹏熙 周瑞芳 谭敏

【摘要】 目的 探讨黄芪注射液作用于 basal-like 型乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株后对其增殖和凋亡的影响。**方法** 将实验细胞分为对照组和 5 种不同剂量的黄芪注射液作用组。用 MTT 法检测细胞增殖,流式细胞仪分析细胞周期,碘化丙啶染色检测细胞凋亡率。黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 和 72 h 的 OD 值采用多个均数比较的方差分析;48 h 时细胞周期各阶段细胞比率的比较用 χ^2 检验。**结果** 作用 48 h 时,各剂量组均可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖($P < 0.01$),其效应呈质量浓度依赖性。作用 48 h 时,高剂量组($2 \times 10^{-1} \sim 2 \times 10^{-2}$ g/ml)黄芪注射液还可促进细胞凋亡($\chi^2 = 8.01, P = 0.00$);作用 72 h 时,高剂量组仍呈抑制作用,但随质量浓度的降低,抑制作用减少,低剂量黄芪组($2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-5}$ g/ml)有促进增殖作用($P < 0.01$);中高剂量组(2×10^{-3} g/ml)可改变细胞周期的分布。**结论** 黄芪注射液可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,并诱导其凋亡,可能为 basal-like 乳腺癌的治疗带来益处。

【关键词】 黄芪注射液; 乳腺肿瘤; MDA-MB-231 细胞

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effects of Astragalus injection on proliferation and apoptosis of basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231 LIU Peng-xi, ZHOU Rui-fang, TAN Min. Breast Department, Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Astragalus injection on proliferation and apoptosis of basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231.

基金项目:广东省科技计划项目资助(2006 B35604012)

作者单位:510120 广州,广州中医药大学附二院(广东省中医院)乳腺科(刘鹏熙、周瑞芳),病理科(谭敏)

Methods There were six groups used in this study: one control group (cell culture without Astragalus injection) and five experimental groups in which MDA-MB-231 cells were cultured with Astragalus injection at doses of (2×10^{-1} g/ml), (2×10^{-2} g/ml), (2×10^{-3} g/ml), (2×10^{-4} g/ml), and (2×10^{-5} g/ml), respectively. Proliferation of MDA-MB-231 cells were evaluated with MTT assay, and cell apoptotic rate and cell cycle were measured with flow cytometry. The OD values of Astragalus injection acting on MDA-MB-231 cells for 48 and 72 hours were determined using variance analysis; chi-square test was used for the comparison of cell proportion in each cell cycle phase at 48 hours among all groups. **Results** At 48 hour coculture, in all the experimental groups the cell proliferation was inhibited ($P < 0.01$), which showed a dose dependence; and cell apoptosis was accelerated at the high dosage group ($2 \times 10^{-1} \sim 2 \times 10^{-2}$ g/ml) ($\chi^2 = 8.01, P = 0.00$). At 72 hour coculture, the inhibiting effect of Astragalus injection still maintained at the high dosage group, but reduced with the concentration degrade; MDA-MB-231 cell proliferation was increased at the low dosage group ($2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-5}$ g/ml) ($P < 0.01$). **Conclusion** Astragalus injection can inhibit MDA-MB-231 cell growth and accelerate its apoptosis. It may benefit basal-like breast cancer patients.

【Key words】 Astragalus injection; Breast carcinoma; MDA-MB-231 cell

在乳腺癌的生物学特性中,细胞基底样乳腺癌(basal-like)的基因相对封闭,类似于临床上的“三阴性”(雌激素受体阴性、孕激素受体阴性、HER-2 表达阴性)乳腺癌。此型乳腺癌容易发生转移,预后较差,又缺乏有效的治疗手段,是目前治疗的难点之一^[1-2]。本研究应用中药黄芪注射液进行研究,观察其对代表basal-like型的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响,旨在为 basal-like 型乳腺癌的治疗提供新的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

MDA-MB-231 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 试剂

小牛血清、RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司);0.25%胰蛋白酶,磷酸盐缓冲液(PBS,广州展晨生物科技有限公司);青霉素、链霉素(广州天心制药厂);黄芪注射液(批号:060806,上海禾丰制药有限公司);噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)均购于 Sigma 公司。

1.3 仪器

ELITE ESP 型流式细胞仪(美国 BECKMAN COUTER 公司);Olympus PM-6 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);ELX800 酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司);生物洁净工作台(AIRTEK 公司),医用超净工作台(吴江市净化设备总厂);CO₂细胞恒温培养箱(美国 Thermo Forma 公司)。

1.4 细胞培养

MDA-MB-231 细胞均采用开放式单层贴壁培养,培养液为 RPMI1640 (10%小牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)。培养条件:恒温 37 °C,5%CO₂,相对饱和湿度。每日观察生长情况,贴壁 2~5 d 传代一次。实验时取对数生长期细胞。

1.5 实验分组

对照组:仅为细胞培养,不加处理因素。实验组按黄芪注射液作用于细胞的质量浓度分为 5 组:黄芪 1 组(2×10^{-1} g/ml)、黄芪 2 组(2×10^{-2} g/ml)、黄芪 3 组(2×10^{-3} g/ml)、黄芪 4 组(2×10^{-4} g/ml)、黄芪 5 组(2×10^{-5} g/ml)。

1.6 观察指标

1.6.1 细胞存活率观察:采用 MTT 法检测细胞存活率。选用对数生长期 MDA-MB-231 细胞,以细胞数 2×10^4 /ml 接种于 96 孔板,每孔加入 200 μl,培养 24 h 后分别加入 2×10^{-1} 、 2×10^{-2} 、 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} g/ml 的黄芪注射液,继续培养,之后每隔 24 h,避光环境下每孔加入 MTT(5 mg/ml)溶液 20 μl,37 °C、5%CO₂培养箱内继续培养 4 h,吸取上清液,每孔加入 200 μl 的 DMSO,使结晶物充分溶解。重复 3 次。用 MTT 比色法测定吸光度(A)值,分别记录各种质量浓度药物作用于 MDA-MB-231 细胞的质量浓度效应数据和时间效应数据,用下列公式计算药物对细胞生长的抑制率:抑制率%=[(对照孔测定的平均 A 值-加药组测定的平均 A 值)/对照孔测定的平均 A 值]×100%

1.6.2 细胞周期和凋亡率的检测:按各质量浓度的黄芪注射液对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞处理 48 h,收集 1×10^6 个细胞,PBS 液洗涤,1300 r/min 离心 5 min(离心机半径 16 cm),弃上清液,加入-20 °C 预冷的 70%乙醇,于 4 °C 固定并过夜,取固定好的细胞用 4 °C PBS 洗 2 次,然后用 500 μl/孔的碘化丙啶 4 °C 避光染色 30 min,上机前将细胞悬液混匀,过 200 目尼龙网,然后用流式细胞仪进行检测,应用 CellQuest 软件获取细胞 10 000 个,以 ModiFit 软件进行凋亡峰拟合及细胞周期分析并绘制 DNA 分布图,G₁期前的 G₁亚峰(A_p峰)即为凋亡峰,同时计算出凋亡率。

1.7 统计学处理

实验数据用 SPSS13.0 统计软件包进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 和 72 h 的 A 值计量资料采用多个均数比较的单因素方差分析;48 h 各细胞周期比率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖

黄芪注射液作用 48 h 时,各剂量组 A 值均小于细胞对照组,抑制率分别为 81.9%、70.0%、46.5%、14.9%、16.3%,差异均有统计学意义($P < 0.01$),且其效应呈质量浓度依赖性。作用 72 h 时,黄芪 1、2 高剂量组(2×10^{-1} 、 2×10^{-2} g/ml)对 MDA-MB-231 细胞生长有抑制作用($P < 0.01$),抑制率分别为 48.3%、31.8%;黄芪 3 组(2×10^{-3} g/ml)对 MDA-MB-231 细胞的生长无影响;黄芪 4、5 低剂量组(2×10^{-4} 、 2×10^{-5} g/ml)可促进 MDA-MB-231 细胞的增殖($P < 0.01$),促增殖率分别为 38%、53.1%(表 1)。

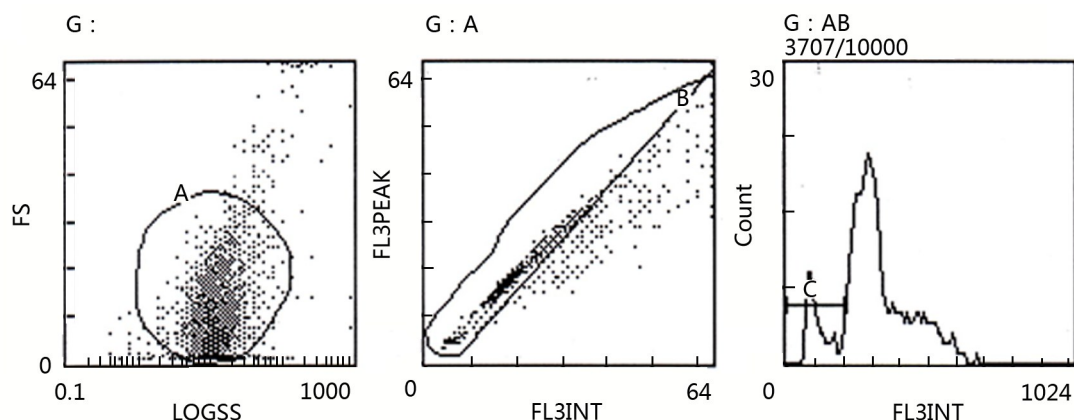
表 1 黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48h、72h 的 A 值

组别	质量浓度 (g/ml)	48 h		72 h	
		A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
对照组	—	2.094 ± 0.079	—	0.627 ± 0.064	—
黄芪 1 组	2×10^{-1}	0.377 ± 0.035^a	81.9	0.324 ± 0.025^a	48.3
黄芪 2 组	2×10^{-2}	0.628 ± 0.027^a	70.0	0.427 ± 0.046^a	31.8
黄芪 3 组	2×10^{-3}	1.119 ± 0.051^a	46.5	0.641 ± 0.074	-2.1
黄芪 4 组	2×10^{-4}	1.780 ± 0.139^a	14.9	0.865 ± 0.083^a	-38.0
黄芪 5 组	2×10^{-5}	1.752 ± 0.129^a	16.3	0.960 ± 0.091^a	-53.1

a: $P < 0.01$,与对照组比较

2.2 细胞凋亡

黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h,黄芪 1 组(2×10^{-1} g/ml)的凋亡率为 15.5%,并出现典型的凋亡细胞群,呈特征性的亚二倍峰(凋亡峰),在 24 h 和 72 h 未见明显凋亡(图 1、表 2)。



A:通过前向散射(FS)和侧向散射(LOGSS)所见的细胞数(占 90.2%)。

B:通过荧光参数(FL3PAK;荧光 3 峰值,FL3INT:荧光 3)去除粘连细胞后所见的细胞数(占 79.3%)。

C:凋亡峰(Count:计数,FL3INT:荧光 3)。

图 1 2×10^{-1} g/ml 黄芪作用 48 h 后 MDA-MB-231 细胞的凋亡率

2.3 细胞周期

黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h, 黄芪 2 组(2×10^{-2} g/ml), MDA-MB-231 细胞 G₀/G₁ 期细胞 DNA 含量下降, S 期细胞 DNA 含量增高 ($P < 0.05$), 但 G₂~M 期各组均为 0 (表 2)。

表 2 黄芪注射液作用于 MDA-MB-231 细胞 48h 的
凋亡率及细胞周期情况

组别	质量浓度 (g/ml)	凋亡率 (%)	各期细胞百分率(%)		
			G1 期	S 期	G2~M 期
对照组	—	5.4	58.3	41.7	0
黄芪 1 组	2×10^{-1}	15.5	59.9	40.1	0
黄芪 2 组	2×10^{-2}	8.2	37.6	62.4 ^a	0
黄芪 3 组	2×10^{-3}	6.2	60.9	39.1	0
黄芪 4 组	2×10^{-4}	4.4	57.6	42.4	0
黄芪 5 组	2×10^{-5}	8.0	57.6	42.4	0

a: $\chi^2 = 8.01, P = 0.00$, 与对照组比较

3 讨论

Basal-like 型约占全部乳腺癌的 15%~20%^[3], 其基因相对封闭, 分子特征为 ER 和 HER-2 阴性, p53、表皮生长因子受体(EGFR)和 Cyclin E 阳性及表达 basal 细胞角蛋白等, 并有细胞有丝分裂旺盛和增殖率高等特点^[4], 类似于临床上“三阴性”乳腺癌。目前许多研究将“三阴性”乳腺癌与 basal-like 型相联系^[5], 因为二者在基因和 mRNA 表达水平上有较高的相似性。但是, “三阴性”乳腺癌不全表达 basal 细胞角蛋白, basal-like 型乳腺癌也不完全是“三阴性”, 两者肿瘤的分子表达谱也不完全相同。近年来, 针对 basal-like 和“三阴性”乳腺癌的研究逐渐增多, 但主要集中在分子分型、预后判断、临床检测和流行病学研究方面, 涉及治疗的研究仍然较少。由于这类患者均易发生转移, 预后较差, 又缺少治疗的选择, 无法从目前较为成熟的内分泌治疗和靶向治疗中获益。因此, 寻找有效的治疗方法对改善其预后非常重要。

本研究选择代表 basal-like 的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株作为研究对象, 采用黄芪注射液作为治疗药物, 观察其对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响。结果显示, 在作用 48 h 时, 各种剂量的黄芪注射液均可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 且其效应呈质量浓度依赖性。在 72 h 时, 黄芪 1、2 高剂量组(2×10^{-1} 、 2×10^{-2} g/ml)组仍有明显的细胞抑制作用($P < 0.01$), 但随着质量浓度的降低, 抑制作用减弱, 而在低剂量黄芪 4、5 组(2×10^{-4} 、 2×10^{-5} g/ml)却有促增殖作用。此现象可能是经过一定作用时间后, 黄芪的药效逐渐减弱, 低剂量不能继续抑制细胞增殖所致, 从而出现抑制解除后的“反跳”现象。有作者^[6-7]在研究黄芪对乳腺癌细胞生长的影响时采用了类似的另两株 ER(-) 人乳腺癌 MDA-MB-435、MDA-MB-468 细胞, 结果发现黄芪

的作用呈时效和量效变化,48 h 后其抑制增殖的作用随药物质量浓度的降低而减弱,在质量浓度 0.1~0.01 g/ml 时已无抑制作用,作用时间更长时也见有促进细胞增殖作用,与本实验结果相似。由于黄芪注射液中存在多种含量不等的有效成分,实验中各成分发挥的效应有所不同,有效工作浓度也有差异,因此出现因作用时间和浓度不同导致实验结果不一样的情况,甚至出现相反的结果^[7]。

黄芪抑制乳腺癌细胞生长的作用机制仍不明了。上述作者发现黄芪在抑制 basal-like 型乳腺癌细胞增殖时,下调了 EGFR 和 p53 蛋白的表达^[7]。本研究发现黄芪在抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖时,诱导了细胞凋亡。从 48 h 细胞周期检测可见,中高剂量组 S 期细胞比例增高,提示细胞被阻滞于 S 期的比例较高,但高剂量组细胞周期却无明显变化,其原因尚不明确;且各组 G₂~M 期均为 0,而 MDA-MB-231 细胞的生长周期为 51 h,可能此时检测不利于对细胞周期的判断。黄芪的主要成分蕊异黄酮、黄芪皂苷是具有较弱生物活性的植物雌激素^[8],虽然 MDA-MB-231 细胞 ER 表达阴性,ER 受体亚型 ER- α 无表达,但 ER- β 则表达^[9]。黄芪也可能通过 ER- β 而发挥微弱的类雌激素效应,因而本实验在低质量浓度的黄芪作用 72 h 时可见对 ER(-) 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有促增殖作用,但其机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Finnegan T J, Carey L A. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. *Future Oncol*, 2007, 3: 55-63.
- [2] Ihemelandu C U, Naab T J, Mezgebe H M, *et al.* Treatment and survival outcome for molecular breast cancer subtypes in black women. *Ann Surg*, 2008, 247: 463-469.
- [3] Rakha E A, Reis Filho J S, Ellis I O. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2568-2581.
- [4] Rakha E A, Reis Filho J S, Ellis I O. Impact of Basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology*, 2008, 75: 95-103.
- [5] Reis Filho J S, Tutt A N. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 2008, 52: 108-118.
- [6] 李琼, 刘胜. 黄芪注射液对人类乳腺癌细胞株生长的抑制作用. *中国中医药科技*, 2007, 14: 100-101.
- [7] 叶媚娜, 陈红凤. 黄芪注射液对 basal-like 型乳腺癌细胞株 MDA-MB-486 增殖的影响. *中西医结合学报*, 2008, 6: 399-404.
- [8] 王海彬, 王军舰, 黄辉, 等. 黄芪注射液对雌激素受体的激活作用研究. *时珍国医国药*, 2006, 17: 2113.
- [9] Ostrakhovitch E A, Cherian M G. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423: 351-361.

(收稿日期: 2008-07-22)

(本文编辑: 范林军)

刘鹏熙, 周瑞芳, 谭敏. 黄芪注射液对 basal-like 型乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株增殖和凋亡的影响 [J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3(2): 181-186.