

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.001

柴桂龙牡汤含药血清对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用及对雌激素受体 α 表达的影响*

蔡琳琳¹, 姚明江^{2,3}, 郭全¹, 吴显文¹, 朱尧武¹, 许云^{1,△}

(1. 中国中医科学院西苑医院肿瘤科, 北京 100091; 2. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091; 3. 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

摘要:目的 观察柴桂龙牡汤(CGLM)含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞体外生长的抑制作用及对雌激素受体 α (ER α)表达的影响。方法 将人乳腺癌 MCF-7 细胞株细胞分别加入相应(含药)培养基, 对照组合有 10% 空白大鼠血清, 给药组分别含有柴桂龙牡汤低、中、高剂量的 10% 含药血清。加药后, 置 37 °C 及 5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。噻唑蓝(MTT)法检测柴桂龙牡汤各组合药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。将 10% 的含药血清培养基加入 MCF-7 细胞中, 孵育 48 h, 提取细胞总 mRNA 及蛋白, 反转录合成 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测各组细胞中 ER α mRNA 的表达水平, 采用 Western blot 方法检测各组 ER α 蛋白表达水平。结果 MTT 法检测结果显示, 与对照组相比, 低、中、高剂量柴桂龙牡汤均可抑制 MCF-7 细胞体外增殖, 中、高剂量组的差异有统计学意义($P < 0.01$); PCR 法检测结果显示, 与对照组相比, 柴桂龙牡汤低、中、高剂量组中 ER α mRNA 均有升高, 其中高剂量组有显著差异($P < 0.01$); Western blot 法检测结果显示, 与对照组相比, 低、中、高剂量柴桂龙牡汤均使 ER α 蛋白表达水平升高, 中、高剂量组有显著差异($P < 0.01$)。结论 柴桂龙牡汤对 MCF-7 细胞的体外生长有抑制作用, 并与剂量浓度呈正相关, 其机制可能与提高 ER α mRNA 含量、上调 ER α 蛋白的表达水平有关。

关键词:柴桂龙牡汤; 乳腺癌; 人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞株; 雌激素受体 α

中图分类号: R285.6; R273

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)12-0001-04

Effect of Serum Containing Chaiguilongmu Decoction on the Growth Inhibition of Human Breast Cancer MCF-7 Cell and Expression of Estrogen Receptor α

Cai Linlin¹, Yao Mingjiang^{2,3}, Guo Quan¹, Wu Xianwen¹, Zhu Yaowu¹, Xu Yun¹

(1. Department of Oncology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China 100091; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China 100091; 3. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing, China 100091)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of the serum containing Chaiguilongmu(CGLM) Decoction on the growth inhibition of human breast cancer MCF-7 cell and expression of Estrogen receptor α (ER α). **Methods** The human breast cancer MCF-7 cell lines were respectively added into the corresponding(drug-containing) culture medium, in which the control group contained 10% empty rat serum, the administration group contained 10% of the CGLM serum of low, medium and high dosage group, respectively. After administration, they would be at 37 °C and 5% CO₂ incubator for continuing to develop in 48 h. MTT assay was used to detect the inhibitory effect of CGLM serum of low, medium and high dosage group on human breast cancer MCF-7 cell proliferation. The serum medium containing 10% CGLM was added into MCF-7 cells, incubation after 48 h, the total mRNA and protein from the cells were extracted, and cDNA was synthesized by reverse transcription. The expression level of ER α mRNA in each group was detected by real-time fluorescence quantitative(PCR) method. The expression level of ER α protein in each group was detected by Western blot method. **Results** MTT results showed that compared with the control group, the CGLM low, medium and high dose group could inhibit the proliferation *in vitro* of MCF-7 cells, the difference between the medium and high dose groups was statistically significant($P < 0.01$). PCR results showed that compared with the control group, the levels of ER α mRNA in the CGLM low, medium and high dose group were increased, among which the high-dose group was significantly different($P < 0.01$). Western blot results showed that compared with the control group, the expression levels of ER α protein in the CGLM low, medium and high dose groups were increased, the difference between the medium and high dose groups was statistically significant($P < 0.01$). **Conclusion** CGLM Decoction has a inhibitory effect on the growth of MCF-7 cells and is positively correlated with the dose concentration, and its mechanism may be related to the increase of the content of ER α mRNA and the up-regulated expression of ER α protein.

Key words: Chaiguilongmu Decoction; breast cancer; human breast cancer MCF-7 cell line; estrogen receptor α

*基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目[81202838]; 中国中医科学院西苑医院苗圃课题[XYKY-MP(2013)-13]。

第一作者: 蔡琳琳(1983-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为中西医结合治疗肿瘤, (电话)010-62835437(电子信箱) linda831228@163.com。

△通信作者: 许云(1978-), 女, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为中西医结合治疗肿瘤, (电话)010-62835436(电子信箱) xuyunxiao78@163.com。

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,发病率逐年上升^[1]。根据分子分型制订相应临床决策,可使乳腺癌的治疗一直处于精准医疗的前列。雌激素受体(estrogen receptor, ER)和(或)孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性的乳腺癌定义为激素依赖型乳腺癌,我国此类患者占乳腺癌患者总人数的50%~60%^[2],可通过内分泌治疗抑制机体雌激素的分泌,从而降低复发和转移风险。同时,内分泌治疗可导致患者下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱,诱发月经紊乱、面红潮热、抑郁、骨质疏松等类似围绝经期综合征的临床症状^[3]。随着内分泌治疗时间的延长,不良反应的加重,严重影响患者生活质量和治疗依从性,导致停药或换药,影响患者生存期,而现代医学尚无有效的治疗手段及药物^[4]。近年来,随着对经方辨证及用药研究的不断深入,其在治疗肿瘤方面也起到了重要作用。课题组临床多年使用自拟柴桂龙牡汤治疗乳腺癌,发现其可缓解乳腺癌内分泌的不良反应,故本研究选用ER阳性的人乳腺癌细胞系MCF-7细胞株进行相关试验。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雌性SD大鼠20只,体质量(200±20)g,由军事科学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK-(军)2012-0004。饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级动物中心,饲养环境温度22~25℃,相对湿度40%~70%,照明/黑暗各12h。

1.1.2 药物

柴桂龙牡汤颗粒剂,由北京康仁堂药业有限公司提供,药材生产批号分别为,柴胡15022761,桂枝15019001,芍药15015641,半夏15026182,黄芩15010742,生龙骨15016901,生牡蛎15019522,郁金15020881,伸筋草15013951,生甘草15013951,川牛膝15021231,厚朴15019231。

1.1.3 细胞

MCF-7人乳腺癌细胞株,购于武汉普诺赛生命科技有限公司(产品编号为CL-0149)。

1.1.4 试剂与仪器

DMEM高糖培养基(Gibco公司,批号为8116362);胎牛血清(Biowest公司,批号为S1435S1820);青-链霉素PS(Solarbio公司,批号为20150626);0.25%胰蛋白酶(Solarbio公司,批号为20150605);MTT试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号为C1310);ER α 引物、GAPDH引物(广州易锦生物技术有限公司);ER α 兔多克隆抗体(ABclonal公司,批号为A0296); β -actin兔多克隆抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号为

WL-01845);辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔IgG(CST公司,批号为7074P2)。凝胶成像仪(Bio-Rad Chemi Doc XRS+);SMA-1000型超微量分光光度计(Meriton公司);T-GRADIENT型温度梯度PCR仪(美国Biometra公司);Step One Plus型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠给药剂量及含药血清制备

按体表面积折算大鼠给药剂量,将柴桂龙牡汤(CGLM)分为低(L)、中(M)、高(H)剂量组,剂量分别为1.2,2.4,4.8g(颗粒)/kg(体质量)。蒸馏水配制不同浓度药物混悬液,相当于每10mL含药材颗粒1.2,2.4,4.8g。大鼠灌胃体积为每100g体质量1mL。空白对照组给予等量蒸馏水连续灌胃7d,末次灌胃后1h,腹主动脉取血,分离血清,56℃,30min热灭活处理,0.22 μ m滤膜滤过、分装,-20℃冰箱冻存。

1.2.2 人乳腺癌MCF-7细胞株细胞培养

人乳腺癌MCF-7细胞株培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置CO₂培养箱内,恒温37℃,5%CO₂。进行细胞传代时,先弃去培养液,随后用PBS液洗2次,然后加入适量0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化,补加适量培养基,制备单细胞悬液,细胞计数后,配制成密度为5×10⁴个/mL的细胞悬液,传代培养或铺板用于试验。

1.2.3 人乳腺癌MCF-7细胞增殖抑制试验(MTT法)

96孔细胞培养板中,每孔加入100 μ L细胞培养悬液(每孔5×10³个细胞),将细胞培养板置37℃及5%CO₂培养箱中培养24h。弃去培养基,PBS液清洗2次,每孔加入200 μ L相应含药培养基,其中空白对照组含有10%空白大鼠血清,给药组分别含有柴桂龙牡汤低、中、高剂量10%含药血清。试验时用含10%空白大鼠血清DMEM培养基稀释至所需要的浓度。加药后再将96孔细胞培养板置37℃及5%CO₂培养箱中继续培养48h。按说明书方法进行MTT染色, λ =570nm,测定光密度(OD)值,计算各给药组抑制率。

试验组抑制率(%)=(空白对照组OD值-给药组OD值)/空白对照组OD值×100%

1.2.4 ER α mRNA表达检测(qPCR法)

取对数生长期人乳腺癌MCF-7细胞株细胞,经消化、计数,配制成密度为5×10⁴个/mL的细胞悬液,接种于6孔细胞培养板中,24h后更换含药培养基,将细胞培养板置37℃及5%CO₂培养箱中培养24h,吸弃培养基Trizol裂解细胞,提取总RNA,采用PCR法反转录合成cDNA。取cDNA进行实时荧光定量PCR检测。反应体系总体积50 μ L,ER α 及GAPDH上下游引

物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L。

ER α 引物: 上游引物 5' - GCCCAGCTCCTCCT-CATCCTCT - 3'; 下游引物 5' - GCTCTCAGACTGTG-GCAGGAAAC - 3', 扩增片段 281 bp。GAPDH 引物: 上游引物 5' - AAGTGCTCGTTGAGGGCAATG - 3', 下游引物 5' - CTGGGCTACTGAGCACC - 3'。

扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后, 9 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 最后采用荧光定量 PCR 仪自带程序进行溶解曲线分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行目的基因的相对定量。

1. 2. 5 ER α 蛋白表达检测 (Western blot 法)

对数生长期细胞经胰酶消化后接种于 10 cm 平皿中, 细胞数为 1×10^6 个/平皿, 培养 24 h, 按对照组和试验用药组更换含药培养基, 继续孵育 48 h, 吸出培养基, 冷 PBS 液洗 2 次, 用冰冻裂解液溶解细胞, 将内容物移入离心管, 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min, 离心 15 min, 上清液置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。BCA 法测定蛋白质浓度。

样品进行 SDS - PAGE 后, 电转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST (含 0.5% Tween - 20 的 PBS 溶液) 室温封闭 1 h, 弃溶液, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 稀释的一抗 (一抗: ER = 1 : 1 000), 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 稀释的辣根过氧化物酶偶联的二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 显色液, 使用 Bio - Rad 凝胶成像分析系统扫描拍照, 并测定目的条带的密度值。将上述膜用膜再生液室温洗脱 20 min, 加入 β - actin (作为内参) 抗体 (1 : 5 000 稀释) 反应并检测。计算目的蛋白条带密度/ β - actin 条带密度的相对值, 以测定蛋白表达水平。

1. 2. 6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见图 1 至图 3。由图 1 可见, 对照组抑制率为 (99.99 \pm 9.77)%, 低剂量组为 (93.44 \pm 14.14)%, 与对照组比较, 无显著性差异 (P = 0.159 > 0.05); 中剂量组为 (84.87 \pm 20.30)%, 与对照组比较, 有显著性差异 (P = 0.004 < 0.01); 高剂量组为 (80.00 \pm 16.93)%, 与对照组比较, 有显著性差异 (P < 0.01)。由图 2 可见, 对照组中 ER α mRNA 表达为 1.00 \pm 0.11, 低剂量组为 1.09 \pm 0.71, 与对照组比较, 差异无统计学意义 (P = 0.36 > 0.05); 中剂量组为 1.21 \pm 0.11, 与对照组比较, 差异无统计学意义 (P = 0.38 > 0.05); 高剂量组为 1.36 \pm 0.19, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P = 0.002 < 0.01)。由图 3 可见, 对照组 ER α 蛋白表达为

1.00 \pm 0.00, 低剂量组为 1.05 \pm 0.64, 与对照组比较, 差异无统计学意义 (P = 0.60 > 0.05); 中剂量组为 1.39 \pm 0.59, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 高剂量组为 1.44 \pm 0.80, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。

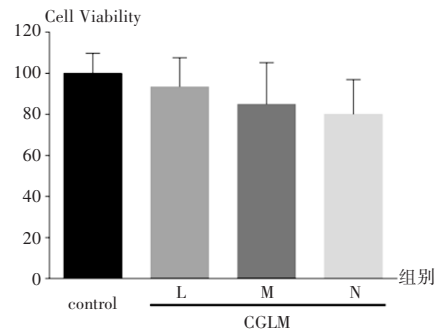


图 1 柴桂龙牡汤含药血清对 MCF - 7 细胞的抑制作用

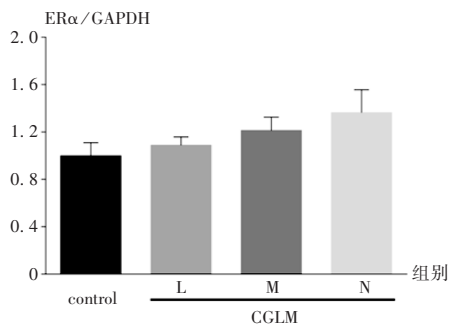


图 2 qPCR 法检测各组 ER α mRNA 表达

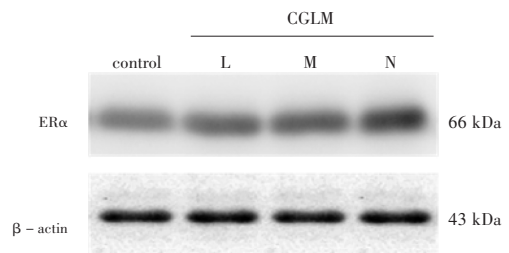


图 3 Western blot 方法检测各组 ER α 蛋白表达

3 讨论

乳腺癌的内分泌治疗多从雌激素受体入手, 最主要的作用点即是 ER 拮抗剂, 以他莫昔芬为例, 其抗肿瘤转移复发作用主要是通过 ER α 介导, 可稳定 ER α , 使 ER α 蛋白积聚, 上调其表达^[5-7]。ER α 表达的程度是预测三苯氧胺良好应答的指标, ER α 的表达缺失已被假设为他莫昔芬耐药的主要因素。据报道, ER α 的重新表达可以逆转 MCF - 7 细胞对他莫昔芬的耐药^[8]。

乳腺癌内分泌治疗的不良反应, 中医并无相应病名, 根据临床症状, 属“郁证”“汗证”“百合病”“不寐”“脏躁”“绝经前后诸证”等范畴。中医认为, 乳腺癌的内分泌治疗引起肾 - 天癸 - 冲任 - 子宫轴的平衡失调, 导致肝、脾、肾三脏失和, 冲任二脉也随之衰少而引发诸症。

因本病病因复杂,症状繁多,隶属中医相关病名较多,临床多以辨证论治为主,各医家临证各有不同,学术理念各有侧重,综合多篇报道,多从补益肝肾^[9-11],健脾化湿^[12-13]为法立方,均获得一定临床疗效,但对其作用机制研究甚少。

自拟柴桂龙牡汤组方为柴胡、桂枝、芍药、清半夏、黄芩、生龙骨、生牡蛎等,全方以太阳少阳同治、调肝和胃为法,奏燮理阴阳、营卫同调为主。本中药复方主要用药均有抗肿瘤作用,柴胡^[14]1 h 和 2 h 的含药血清对乳腺癌细胞 MCF-7 生长均有明显的抑制作用,尤以 1 h 的含药血清抑制最明显;桂枝^[15]比其主要成分肉桂酸抗肿瘤效果更强,其 60% 乙醇提取物能显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长,表明桂枝有其他成分同时起抗肿瘤作用。Yang 等^[16]采用 MTT 法筛选出郁金有较强的逆转人乳腺癌 MCF-7 细胞株的多药耐药性的能力。有研究发现,赤芍总苷可通过影响细胞凋亡周期的基因、阻滞细胞增殖周期等诱导肿瘤细胞凋亡,从而起到抗肿瘤作用^[17]。

本研究中最初从本复方安全性出发,仅观察对乳腺癌生长密切相关的 ER 等指标,并未涉及与内分泌治疗联合使用的疗效,也未设计绝经后的大鼠模型,未观察对绝经后乳腺癌细胞增殖的影响,以及与芳香化酶抑制剂(AI)的联合作用。现阶段发现,柴桂龙牡汤有与他莫昔芬类似的抗肿瘤机制,提示其与内分泌治疗药物联用或能更好地控制肿瘤转移复发,尤其能为 ER 拮抗剂提供作用靶点,延长其使用时间,或可能逆转内分泌耐药。另外,本研究中也从体外细胞实验层面为临床使用本方提供了安全性评价依据,其对 ER α 的作用也为下阶段进一步研究本方作用靶点,联合内分泌用药的协同性及进一步在临床扩大使用提供了科学依据。

参考文献:

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
[2] Zwiefel K, Janni W. Current standards in the treatment of breast cancer[J]. Med Monatsschr Pharm, 2011, 34(8):280-288.
[3] 付 焯. 黑道遥散及肾四味对乳腺癌他莫昔芬治疗引起的类更年期症状的临床效果分析[J]. 癌症进展, 2016, 14(1):81-83.
[4] Güth UL, Myrick ME, Schötzau A, et al. Drug switch because of

treatment-related adverse side effects in endocrine adjuvant breast cancer therapy: how often and how often does it work[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 129(3):799-807.

[5] Wijayarathne AL, McDonnell DP. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators[J]. J Biol Chem, 2001, 276(38):35684-35692.
[6] Laïos IL, Journe F, Laurent G, et al. Mechanisms governing the accumulation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells treated with hydroxytamoxifen and related antiestrogens[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 87(2-3):207-221.
[7] Journé FL, Body JJ, Leclercq G, et al. Estrogen responsiveness of IBEP-2, a new human cell line derived from breast carcinoma[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(1):39-53.
[8] 于于飞, 胡 晶, 陈雪松. 乳腺癌他莫昔芬耐药机制的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2017, 31(2):160-164.
[9] 朱沛维. 六味地黄汤合丹栀逍遥散加减改善乳腺癌三苯氧胺不良反应患者的效果分析[J]. 临床合理用药, 2017, 10(27):15-16.
[10] 吴继萍, 冯 妮, 李 艺, 等. 乳清汤干预乳腺癌气阴亏虚证性激素水平的试验研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(1):53-56.
[11] 胡灿红, 霍介格, 李灵常. 滋水清肝饮缓解乳腺癌内分泌治疗不良反应 45 例[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(10):827-828.
[12] 王洁婷, 李 威, 仲姗姗, 等. 护肝方治疗乳腺癌术后因服用三苯氧胺所致痰浊阻遏型脂肪肝临床观察[J]. 中成药, 2015, 31(12):2795-2798.
[13] 邹银水. 黄连党参汤配合来曲唑治疗 II 期乳腺癌的临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(5):50-51.
[14] 刘殿菊, 关 霞. 柴胡含药血清的体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(12):76-77.
[15] 赵 光, 李 珺, 杨 捷. 中药砂仁、虎杖及桂枝萃取液对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用[J]. 中国医学装备, 2016, 13(6):94-97.
[16] Yang L, Wei DD, Chen Z, et al. Reversal effects of traditional Chinese herbs on multidrug resistance in cancer cells[J]. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 2011, 25(19):1885-1889.
[17] 湛新兴, 李 艳, 杜紫阳, 等. 赤芍总苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(18):125-126.

(收稿日期:2018-01-17)

中国科技论文统计源期刊
中国科技核心期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿!
欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊发行部办理

网上投稿:<http://www.zhongguoyaoye023.com> 或中国药业在线投稿系统 电话兼传真:(023)86592565