

• 论 著 •

二氢杨梅素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡的影响*

李 明, 张卫星, 袁 璐

(深圳市福田区人民医院/中山大学附属第八医院肝胆甲乳外科, 广东深圳 518000)

摘 要:目的 研究二氢杨梅素(DMY)对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡的影响。方法 2014 年 3 月至 2015 年 2 月,该院采用 99%纯度的 DMY 为抑制剂,以乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象,采用 MTT 法、流式细胞术法和免疫细胞化学来分析乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡的情况。结果 当使用浓度大于 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 处理细胞时,出现了抑制效果,但效果不佳;当用 40 与 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 时,明显地抑制了乳腺癌细胞 MCF-6 的增殖,且有不同程度的敏感性。当 DMY 为 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,其 IC_{50} 为 226.9 $\mu\text{g/mL}$ 。抑制率和 IC_{50} 分别与 0 $\mu\text{g/mL}$ DMY 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。40 与 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 处理乳腺癌细胞 MCF-6 可以诱导其周期阻滞在 G_2/M 期($P<0.01$),并表现出明显的细胞凋亡现象,同时, G_0/G_1 期也受到阻滞,S 期细胞比例降低明显,差异有统计学意义($P<0.05$);当使用浓度大于 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 时,PCNA 阳性率有所下降,当浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 时,乳腺癌细胞 MCF-6 的 PCNA 阳性率明显下降($P<0.01$),尤其浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 时,阳性率为 10.00%。与 0 $\mu\text{g/mL}$ DMY 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 对乳腺癌患者采用 DMY 可以有效抑制癌细胞快速增殖,加速器凋亡,减缓患者病情,疗效突出。

关键词:二氢杨梅素; 乳腺癌细胞 MCF-7; 增殖; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)13-1762-03

Effect of dihydromyricetin on proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells*

LI Ming, ZHANG Weixing, YUAN Lu

(Department of Hepatic-Biliary-Thyroid-Breast Surgery, Futian District Shenzhen People's Hospital/the Eighth Hospital Affiliated to Zhongshan University, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of dihydromyricetin on proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** From March 2014 to February 2015, breast cancer MCF-7 cells were treated with 99% pure DMY as an inhibitor. MTT assay, flow cytometry and immunocytochemistry were used to analyze the proliferation, apoptosis and protein expression of breast cancer cell MCF-7. **Results** When the DMY concentration was higher than 20 $\mu\text{g/mL}$, the inhibitory effect appeared, but not good. When 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$ DMY were used, the proliferation of MCF-6 cells were significantly inhibited, and have different degrees of sensitivity to it. When DMY was 80 $\mu\text{g/mL}$, the IC_{50} was 226.9 $\mu\text{g/mL}$. The inhibition rate and IC_{50} were compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ DMY, there was significant difference ($P<0.05$). Indicating that the relatively high concentration of DMY could significantly improve the patient's condition of breast cancer; MCF-6 cells treated with 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$ DMY could induce G_2/M phase arrest in DMY with concentration greater than 20 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.01$), and showed significant cell apoptosis death phenomenon. At the same time, G_0/G_1 phase was also blocked and S phase cells decreased significantly, the difference was significant ($P<0.05$). The positive rate of PCNA in breast cancer MCF-6 cells significantly decreased ($P<0.01$) when the DMY concentration was higher than 50 $\mu\text{g/mL}$, the positive rate was $> 50\%$, especially in DMY with 80 $\mu\text{g/mL}$, the positive rate was 10.00%. Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ DMY, the difference was significant ($P<0.05$). **Conclusion** The use of dihydromyricetin in breast cancer patients can effectively inhibit the rapid increase of cancer cells, accelerate apoptosis, slow down the patient's condition, the effect is outstanding.

Key words: dihydromyricetin; breast cancer cell MCF-7; proliferation; apoptosis

乳腺癌是目前发病率较高的恶性肿瘤,是女性比较常见的疾病。临床上使用的化疗药物,作用的组织特异性较差,并发症严重,乳腺癌细胞的转移导致患者病死率逐年上升。故需开发一种可抑制癌细胞转移、特异性强、低毒、高效的新型药物^[1-2]。二氢杨梅素(DMY)可以提高人体免疫力,具有镇痛、安全、低毒、氧化、广谱抑菌等多效作用^[3-4]。在体外试验中,DMY 对人乳腺癌 MCF-7 细胞、白细胞 HL-60 等有好的抑制效果。目前,关于 DMY 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡研究报道较少^[5]。为此,本院采用体外乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象,分析了 DMY 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡的影

响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养基 2014 年 3 月至 2015 年 2 月本院采用暨南大学馈赠的乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象和华南理工大学自制的 99%纯度的 DMY 为抑制剂,应用二甲基亚砜(DMSO)为溶剂配成 32 mg/mL 溶液,在实验过程中使用杜尔伯科极限必需培养基(DMEM)稀释。Mosmann 四唑盐(MTT)、DMSO、明胶都购自 Sigma 公司,DMEM、胎牛血清均购自 Hyclone 公司,培养瓶与培养板购自 Corning 公司。

1.2 MTT 法分析癌细胞 MCF-7 的增殖 将每孔密度为 $5 \times$

* 基金项目:2015 年深圳市福田区卫生公益性科研项目(FTWS2015007)。

作者简介:李明,男,主治医师,主要从事医学基础方面的研究。

10³ 的接种在含 10 % FBS 培养液的 DMEM 内,进行培养 24 h,吸出样品培养液,每孔再加入不同浓度(0、20、40、80 μg/mL)150 μl DMY 液,每 6 个孔设一个浓度。另外,设置一组空白对照组。完毕后,将其置于 37 ℃培养箱 48 h 后分别加入 20 μl 的 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,去掉上清液,然后每孔加入 100 μL DMSO,震荡摇匀。采用波长为 570 nm 酶标仪(参考波长 630 nm),检测每孔吸光度,分别计算 MCF-7 生长抑制率。其中,抑制率=(对照组值-样品组值)/对照组值×100%。

1.3 流式细胞术法检测癌细胞 MCF-7 周期及凋亡情况 采样 DMY 作用 48 h 后不同浓度的细胞,在 6 孔培养板制成细胞悬液,使用碘化丙啶染色,采用波长 488 nm 的流式细胞仪(生产厂家:Becton Dickinson 公司,型号:FACS Calibur)上机测定细胞周期及凋亡率,利用本机系统至少重复 3 次分析结果。

1.4 免疫细胞化学检测癌细胞 MCF-7 的增殖细胞核抗原 增殖细胞核抗原(PCNA)处于细胞核中,其内有较强的棕黄色颗粒或弥散着色呈阳性。采用至少 3 个细胞密集区检测,平均计算每 100 个细胞呈现阳性数量比例。++为阳性率>50%,+为阳性率 10%~50%,-为阳性率<10%。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 程序对资料统计学研究,均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据用 *t* 检验,计数资料用 χ^2 ,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DMY 对乳腺癌细胞 MCF 的敏感性 当使用浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,出现了抑制效果,但效果不理想;当用 40 与 80 μg/mL 的 DMY 时,明显地抑制了乳腺癌细胞 MCF-6 的增殖,且细胞有不同程度的敏感性。当 DMY 为 80 μg/mL 时,其 IC₅₀ 为 226.9 μg/mL。抑制率和 IC₅₀ 分别与 0 μg/mL DMY 对比,差异有统计学意义(*P*<0.05)。说明相对高浓度的 DMY 可以显著改善患者的乳腺癌的病情。见表 1。

表 1 DMY 对乳腺癌细胞 MCF 的敏感性

DMY(μg/mL)	抑制率(%)	IC ₅₀ (μg/mL)
0	0	43.5
20	14.6±2.2*	73.1*
40	37.5±2.7**	109.4**
80	61.8±4.3**	226.9**

注:分别与 0 μg/mL DMY 比较,***P*<0.01,**P*<0.05。

表 2 DMY 对乳腺癌细胞 MCF 的周期及凋亡率的分析对比

DMY(μg/mL)	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)	凋亡(%)
0	54.9±1.3	35.7±1.8	8.7±1.1	2.7
20	54.6±2.2	36.8±1.3	8.2±0.7	2.1
40	47.5±1.4*	37.1±1.5	14.7±0.2**	4.6**
80	41.8±2.6**	35.4±2.2	22.4±0.1**	9.9**

注:分别与 0 μg/mL DMY 对比,***P*<0.01,**P*<0.05。

2.2 DMY 对乳腺癌细胞 MCF 的周期及凋亡率的分析对比 当用浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,40 与 80 μg/mL 的 DMY 处理乳腺癌细胞 MCF-6 可以诱导其周期阻滞在 G₂/M 期(*P*<0.01),并表现出明显的细胞凋亡现象。同时,G₀/G₁ 期也受到阻滞,S 期细胞降低明显,差异有统计学意义(*P*<

0.05)。见表 2。
2.3 免疫细胞化学检测癌细胞 MCF-7 的 PCNA 对比分析 当使用浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,阳性率有所下降;当使用浓度为 40 μg/mL 的 DMY 时,乳腺癌细胞 MCF-6 的 PCNA 阳性率明显下降(*P*<0.01),尤其浓度为 80 μg/mL 的 DMY 时,阳性率为 10.00%。与 0 μg/mL DMY 比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 免疫细胞化学检测癌细胞 MCF-7 的 PCNA 对比分析

DMY(μg/mL)	++	+	-	阳性率(%)
0	5	2	3	70.00
20	4	2	4	60.00
40	1**	1	8**	20.00**
80	0**	1	9**	10.00**

注:分别与使用 0 μg/mL DMY 时比较,***P*<0.05。

3 讨 论

目前,临床上需要新型的抗癌药物来弥补现有治疗手段的不足^[6-7]。DMY 具有广谱抑菌、保肝疗效、镇痛、提高机体免疫力、止咳等药理活性,最大特点是安全、低毒^[8-9]。目前,DMY 对乳腺癌细胞 MCF-7 系列研究报道较少。从体外细胞毒抑制实验结果分析,DMY 对人乳腺癌 MCF-7 细胞有良好的抑制效果^[10]。同时,由于其可以有效扩张冠脉、改善血管通透性、降血脂作用,在临床上也用来治疗心血管疾病广泛应用^[11]。

癌细胞的主要特点是发生快速增殖,控制癌症发展的最有效方法就是抑制其快速增殖。大量研究结果显示,DMY 对多种癌细胞有明显抑制其增殖速度,而癌细胞增殖阶段也是其周期循环阶段,故抑制其增殖,则很大程度上是阻滞其周期循环^[12-13]。本研究表明,当浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,出现了抑制效果,但不佳,当 40 与 80 μg/mL 的 DMY 时,明显地抑制乳腺癌细胞 MCF-6 的增殖,且浓度越大其敏感性越高。当 DMY 为 80 μg/mL 时,其 IC₅₀ 为 226.9 μg/mL。抑制率和 IC₅₀ 分别与 0 μg/mL DMY 效果对比分析,说明相对高浓度的 DMY 可以显著改善患者的乳腺癌的病情。这是由于 DMY 对癌细胞 MCF-6 增殖过程产生一定抑制的敏感性,也抑制其侵袭转移过程,表明 DMY 有巨大前景作为抑制癌细胞 MCF-6 转移辅助药物。

另外,本研究发现,当浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,40 与 80 μg/mL 的 DMY 处理乳腺癌细胞 MCF-6 可以诱导其周期阻滞在 G₂/M 期,并表现出明显的细胞凋亡现象。同时,G₀/G₁ 期也阻滞和 S 期细胞降低明显。这是由于 G₂/M 期发生阻滞能够提高修复损伤 DNA、降低染色体畸变。这表明 DMY 可以特异性选择与细胞 MCF-6 的 G₂/M 期发生作用,也在参与调控其细胞循环周期。在结肠癌细胞、白血病细胞等其他类型癌细胞的系列研究发现,DMY 对其有诱导 G₂/M 期细胞周期停滞活性^[14-15]。对于 20 μg/mL DMY 处理细胞 MCF-6 未检测到轻微的细胞周期阻滞、凋亡现象,但可以明显抑制细胞增殖,暗示抑制细胞 MCF-6 的增殖效应,还可能其他的机理,需深入研究。

有报道显示,不同类型的癌细胞增殖抑制活性可能与其选择性和活性的降低相关,则暗示 DMY 对乳腺癌细胞的侵袭转移有抑制作用^[16]。本研究显示,当浓度大于 20 μg/mL 的 DMY 时,阳性率有所下降,当浓度为 40 μg/mL 的 DMY 时,乳腺癌细胞 MCF-6 的 PCNA 阳性率明显下降(*P*<0.01),尤其

浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 时,阳性率为 10.00%。这是由于 PCNA 是细胞增殖的指标之一,在 S 期合成量较多,说明 DMY 可减缓 PCNA 蛋白质表达过程从而阻碍癌细胞 DNA 快速生长,达到抑制其快速增殖^[17]。

综上所述,对乳腺癌患者采用 DMY 可以有效抑制癌细胞快速增殖,加速器凋亡,减缓患者病情,疗效突出。

参考文献

[1] 李军林,杨星,李美婷,等. Twist 表达增强乳腺癌 MCF-7 细胞的多药耐药性[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013,34(1):89-92.

[2] Barzegar E, Fouladdel S, Movahhed TK, et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines [J]. Iran J Basic Med Sci, 2015,18(4):334-342.

[3] 湛海燕,陈信义. 粉防己碱抗人乳腺癌细胞 MCF-7/TAM 对三苯氧胺的耐药性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013,33(4):488-491.

[4] 刘敏,陈昌国,马聪,等. CEA, CA153, CA199, CYFR21-1 联合检测在乳腺癌诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014,35(3):320-321.

[5] 王林,曹红,庞雪利,等. 瘦素对人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭的影响及其机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013,29(12):1272-1276.

[6] 刘虹,马艳,邵荣光. 磷酸化蛋白 EBP50 通过降低 ERK1/2 活性抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力[J]. 中国药理学通报, 2015,31(1):55-59.

[7] Ye X, Yuan L, Zhang L, et al. Garcinol, an acetyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of breast cancer cell line MCF-7 promoted by 17 beta-Estradiol[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(12):5001-5007.

[8] 庞雪利,李矿发,魏兰,等. IL-8 通过上调 Bcl-2 的表达和

下调 caspase-3 的表达抑制 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015,31(3):307-311.

[9] 陈晔. CA125, CA19-9 和 TSGF 联合检测在乳腺癌临床诊断中的价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014,35(2):235-236.

[10] 季恒,葛如意,王德全,等. 西地那非同系物逆转人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞的耐药性研究[J]. 医学研究生学报, 2014,27(3):245-249.

[11] 赵琳琳,郭珏函,夏雪,等. 利拉鲁肽对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖影响的体外研究[J]. 医学研究生学报, 2014,27(5):482-486.

[12] 顾卓珺,王萌,方琼艳,等. 载阿霉素普朗尼克化聚酰胺-胺树状聚合物对乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/ADR 的抑制作用[J]. 药学学报, 2014,49(8):1188-1193.

[13] Hou J, Li F, Li X, et al. Lily polysaccharide 1 enhances the effect of metformin on proliferation and apoptosis of human breast carcinoma cells[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2016,32(6):780-783.

[14] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬[J]. 中国药理学通报, 2013,29(2):194-198.

[15] 赵晶丽,史琳. 银杏叶提取物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,凋亡及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(17):262-265.

[16] 白倩,谢琦,彭晓莉,等. 二氢杨梅素通过抑制甲基转移酶诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞 PTEN 基因去甲基化[J]. 第三军医大学学报, 2014,36(1):20-24.

[17] 柳燕贞,曾国驱,葛李晨,等. 双酚 A 诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质化的研究[J]. 环境科学学报, 2015,35(2):608-612.

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-06)

(上接第 1761 页)

芪四君子汤对妊娠期糖尿病患者妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(6):1317-1319.

[5] 王恒,吴建涛. 黄芪四君子汤治疗妊娠糖尿病疗效及对血清 C 反应蛋白, Mg^{2+} , 脂联素水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2015,24(26):2927-2929.

[6] 王晶,左小霞,张晔. 妊娠糖尿病营养治疗效果分析[J]. 现代预防医学, 2013,40(3):452-453.

[7] Wang F, Wang J, Ao D, et al. Influence of pre-pregnancy obesity on the development of macrosomia and large for gestational age in women with or without gestational diabetes mellitus in Chinese population[J]. J Perinatol, 2015,35(12):985-990.

[8] 高峻,郭玲. 妊娠糖尿病脂联素、炎性因子与胰岛素抵抗关系临床研究[J]. 海南医学院学报, 2014,20(4):525-527.

[9] 卢芷兰,高峻,程湘. 妊娠糖尿病血糖水平对孕妇及胎儿影响的研究[J]. 河北医学, 2014,20(8):1237-1240.

[10] 张萍,宋瑞雪. 妊娠糖尿病病人营养干预效果分析[J]. 肠外与肠内营养, 2013,20(6):356-357.

[11] Schoenaker DA, Soedamah-Muthu SS, Callaway LK, et al. Pre-pregnancy dietary patterns and risk of gestational diabetes mellitus: results from an Australian population-based prospective cohort study[J]. Diabetologia, 2015,58(12):2726-2735.

[12] 陈勇霞,田耕,苗润,等. 早期饮食运动干预对妊娠糖尿病高危因素孕妇的胰岛素抵抗和妊娠预后的影响[J]. 新医学, 2013,44(4):231-234.

[13] 石玉芬,姚力,王琪,等. 诺和锐特充联合黄芪四君子汤治疗妊娠糖尿病患者的疗效及对妊娠结局的影响[J]. 内科, 2015,10(6):793-795.

[14] 胡志庚,谭荣韶,金迪,等. 低血糖生成指数配方主食对妊娠糖尿病餐后血糖的影响[J]. 广东医学, 2013,34(20):3127-3129.

[15] 孟红娟,贺漪,高雪梅,等. 黄芪四君子汤为主治疗气阴两虚证妊娠期糖尿病的有效性研究[J]. 陕西中医, 2016,37(8):1023-1024.

(收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-04-20)