

本文引用:吴世婷,刘丽芳,熊家青,丁玲,曾叶,肖洒.黄芪解毒汤诱导乳腺癌细胞凋亡及对 $\beta$ -catenin、C-myc基因表达影响的研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(4):357-360.

## 黄芪解毒汤诱导乳腺癌细胞凋亡及对 $\beta$ -catenin、C-myc基因表达影响的研究

吴世婷<sup>1</sup>,刘丽芳<sup>1\*</sup>,熊家青<sup>2</sup>,丁玲<sup>3</sup>,曾叶<sup>2</sup>,肖洒<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院乳腺外科,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学研究生院,湖南长沙410208;  
3.湖南航天医院,湖南长沙410205)

**[摘要]** **目的** 探讨黄芪解毒汤体外干预人乳腺癌细胞MCF-7凋亡及对 $\beta$ -catenin、C-myc基因表达的影响,及该方抑制乳腺癌复发转移的可能机制。**方法** 培养MCF-7细胞并将其分为黄芪解毒汤组、阿霉素组及空白对照组。以黄芪解毒汤浓缩液、阿霉素液及细胞培养液分别干预各组MCF-7细胞24h后,以流式细胞仪检测其对MCF-7乳腺癌细胞凋亡的影响,实时荧光定量PCR检测其对 $\beta$ -catenin、C-myc基因表达的影响。**结果** 与空白对照组比较,黄芪解毒汤组、阿霉素组可明显诱导MCF-7细胞的凋亡( $P<0.01$ );黄芪解毒汤组及阿霉素组 $\beta$ -catenin、C-myc表达量明显低于空白对照组( $P<0.01$ )。**结论** 黄芪解毒汤可诱导乳腺癌细胞MCF-7凋亡,显著降低 $\beta$ -catenin、C-myc基因表达,该结果为黄芪解毒汤在乳腺癌术后治疗中的应用提供实验依据。

**[关键词]** MCF-7; $\beta$ -catenin,C-myc;细胞凋亡;黄芪解毒汤

**[中图分类号]**R285.5;R655.8 **[文献标识码]**B **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.04.003

### Effects of Huangqi Jiedu Decoction on Inducing Apoptosis of Breast Cancer Cells and Gene Expression of $\beta$ -catenin and C-myc

WU Shiting<sup>1</sup>, LIU Lifang<sup>1\*</sup>, XIONG Jiaqing<sup>2</sup>, DING Ling<sup>3</sup>, ZENG Ye<sup>2</sup>, XIAO Sa<sup>2</sup>

(1. Department of Breast Cancer, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Aerospace Hospital, Changsha, Hunan 410205, China.)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of Huangqi Jiedu decoction on the inducing apoptosis of MCF-7 and expression of  $\beta$ -catenin, C-myc of human breast cancer cells in vitro and to reveal its mechanism of inhibiting recurrence and metastasis of breast cancer. **Methods** The cultured MCF-7 cells were assigned into Huangqi Jiedu decoction group, doxorubicin group and control group. After intervention for 24 h by Huangqi Jiedu decoction, doxorubicin and cell cultured filed, the apoptosis of breast cancer cell MCF-7 was determined by flow cytometry. The expression of  $\beta$ -catenin, C-myc genes was detected by Real Time Quantitative-PCR. **Results** Compared with the control group, Huangqi Jiedu decoction and doxorubicin groups had the more obvious effect on inducing the apoptosis of breast cancer cell MCF-7 ( $P<0.01$ ). The expressions of  $\beta$ -catenin and C-myc protein in Huangqi Jiedu decoction and doxorubicin groups were significantly lower than those in control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Huangqi Jiedu decoction could induce the apoptosis of MCF-7 breast cancer cell, and significantly prohibit the expression of  $\beta$ -catenin and C-myc genes, which provide the experimental evidence for Huangqijiedu decoction in the treatment for postoperation breast cancer.

**[Keywords]** MCF-7;  $\beta$ -catenin; C-myc; apoptosis; Huangqi Jiedu decoction

**[收稿日期]**2016-08-02

**[基金项目]**湖南省科技厅(2012SK3137),湖南省教育厅(13A071)。

**[作者简介]**吴世婷,女,在读硕士研究生,从事乳腺病临床研究。

**[通讯作者]**\*刘丽芳,女,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:282379223@qq.com。

乳腺癌在中医学中称为“乳岩”,其特点是乳房肿块质地坚硬、凹凸不平、边界不清、推之不移、按之不痛等,是女性最常见的恶性肿瘤之一。它的发生和发展与 Wnt 信号通路功能的失调有密切的关系,其中  $\beta$ -catenin 是 Wnt 信号转导通路中的关键调节因子,当  $\beta$ -catenin 与 E-cadherin 形成的粘附复合体中脱离,丧失了介导同种细胞之间的粘附作用,并进一步被转运至细胞核中,通过与淋巴细胞增强因子(LEF)、转运因子 T 细胞因子(TCF)及协同激活因子相结合激活多种靶基因的转录,导致 Wnt 信号通路的异常激活<sup>[1]</sup>。同时,在多种人类肿瘤中均发现  $\beta$ -catenin 异常表达和  $\beta$ -catenin 基因突变。C-myc 是 Wnt 信号转导通路非常重要的靶基因,研究显示,抑癌基因失活和癌基因的激活可异常激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, $\beta$ -catenin 降解障碍,可导致 C-myc 等靶基因激活,细胞周期调控出现异常,从而导致乳腺癌的发生<sup>[2]</sup>。本实验依据前期艾萍等<sup>[3]</sup>证实 IC<sub>50</sub> 黄芪解毒汤浓缩液为生药量 1.467 g/mL,阿霉素液为 0.316  $\mu$ g/mL。故本实验以生药量 1.467 g/mL 黄芪解毒汤浓缩液、0.316  $\mu$ g/mL 阿霉素液干预 MCF-7 细胞。并以流式细胞仪及实时荧光定量 PCR 的手段,从分子生物学角度研究黄芪解毒汤对诱导 MCF-7 细胞凋亡及  $\beta$ -catenin 和 C-myc 基因表达的影响。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于北京协和医学院细胞资源中心。

### 1.2 药物

黄芪解毒汤:黄芪、太子参、茯苓、白术、薏苡仁、女贞子、半枝莲、白花蛇舌草、龙葵、浙贝母、山慈菇、玄参、麦冬、甘草等,购于湖南中医药大学第一附属医院。常规煎煮,以旋转蒸发器上定容至生药量 1.467 g/mL,将药液以 2 000 转/min 离心,取上清液以微孔滤膜(0.22  $\mu$ m)滤过,备用。阿霉素(10 mg/瓶):深圳万乐药业有限公司,批号:1307E1,以双蒸水配制为 1 mg/mL。

### 1.3 试剂

DMEM 高糖培养基(500 mL):美国 Hyclone 公司;PBS 磷酸缓冲盐溶液:北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(500 mL):美国 Gibco 公司;FITC Annexin V Apoptosis Detection 试剂套装:美国 BD 公司;0.25%胰蛋白酶消化液(100 mL)及双抗

(100 mL):中国医学科学院生物医学工程研究所;Trizol:Invitrogen;RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit: Fermentas;Deoxyribonuclease I (DNase I): Fermentas;RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor: Fermentas;SYBR Green-PCR Master Mix: ABI,批号:4309155。

### 1.4 仪器设备

1-13 高速离心机:SIGMA;SW-CJ-2FD 超净工作台:苏州净化设备厂;CO<sub>2</sub> 培养箱:Heracell,德国贺利氏公司;XDS-1B 倒置生物显微镜:上海光学仪器公司;RE-52C 型旋转蒸发器:巩义市予华仪器有限责任公司;7900 型 Realtime-PCR 仪:ABI;JY-SPC 型水平电泳槽:北京君意东方仪器公司;DG-III 双稳数显电泳仪:北京鼎国生物技术发展中心。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及分组

依据文献<sup>[4-7]</sup>,取对数生长期的 MCF-7,以 1.25 $\times$ 10<sup>5</sup> mL/L 密度接种于培养瓶中,置于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 24 h。细胞瓶中细胞长满单层时,分为 3 组:黄芪解毒汤组、阿霉素组及空白对照组,在镜下观察取处于对数生长期的 MCF-7,以 1.25 $\times$ 10<sup>5</sup> mL/L 密度接种于培养瓶中,置于培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后,吸弃旧液,空白对照组加入 4 mL 培养液培养,黄芪解毒汤组加入黄芪解毒汤含药培养基(1.467 g/mL),阿霉素组加入阿霉素含药培养基(0.316  $\mu$ g/mL),置于培养箱中孵育 24 h 后,常规收获细胞,进行相关指标分析。

### 2.2 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞凋亡

取药物干预 24 h 后的细胞悬液 1 mL,于室温下 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集细胞。加入 1 mL 预冷的 PBS,轻轻震荡,于室温 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重复两次。将 100  $\mu$ L 细胞悬液移入 5 mL 试管,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI,轻轻震荡混匀,避光室温反应 15 min。加入 400  $\mu$ L Binding Buffer 缓冲液,并于 1 h 内以流式细胞仪检测。

### 2.3 实时荧光定量 PCR 检测 $\beta$ -catenin 及 C-myc 基因表达

提取细胞样本 RNA:加入 0.8 mL Trizol 试剂消化。室温下静置 5 min、加入 0.2 倍体积的三氯甲烷,剧烈摇动 15 s。12 000 r/min 于 4  $^{\circ}$ C 下离心 10 min。吸上层无色水相,转移至干净的试管,加入 0.5 倍体积的异丙醇,-20  $^{\circ}$ C 下静置 10 min,于 4  $^{\circ}$ C 下 12

000 r/min 离心 10 min。弃上清,将下层 RNA 沉淀用 1 mL 75%乙醇洗涤,在震荡器上混匀后 4 ℃下 7 500 r/min 离心 5 min,弃上清。用滤纸小心吸取残留液体,室温干燥 5~10 min,将沉淀加入适量无 RNase 的水,完全溶解 RNA。以 2 000 r/min,离心 20 s。以 A260/A280 法检测 RNA 纯度及浓度示无严重 DNA 污染;RNA 纯度较高;28 S 与 18 S IOD 比值约为 2:1;样本没有出现严重 RNA 降解,满足试验要求;琼脂糖电泳检测 RNA 完整性并去除基因组 DNA。进行实时荧光定量 PCR 程序,其结果以目的基因 mRNA 相对含量为  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (RQ), $2^{-\Delta\Delta C_T}$  值越大,说明基因相对含量越高。引物由 primer3.0 软件设计,并由远泰生物协助合成,GAPDH 内参:上游-CAATGACCCCTTCATTG ACC, 下游-GACAAGCTTCCC GTTCTCAG; $\beta$ -catenin 上游-ATGAC TCGAGCTCAGAGGGT, 下游-ATTG CACGTGTGGCAAGTTC; C-myc: 上游-CGTCCTCG-GATTCTCTGCTC, 下游-GCTGCGTAGTTGTGCT-GATG。

2.4 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件分析数据。数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,实验数据采用 one-way ANOVA 检验, $P<0.05$

为差异有统计学意义; $P<0.01$  为差异有显著统计学意义。

3 结果与分析

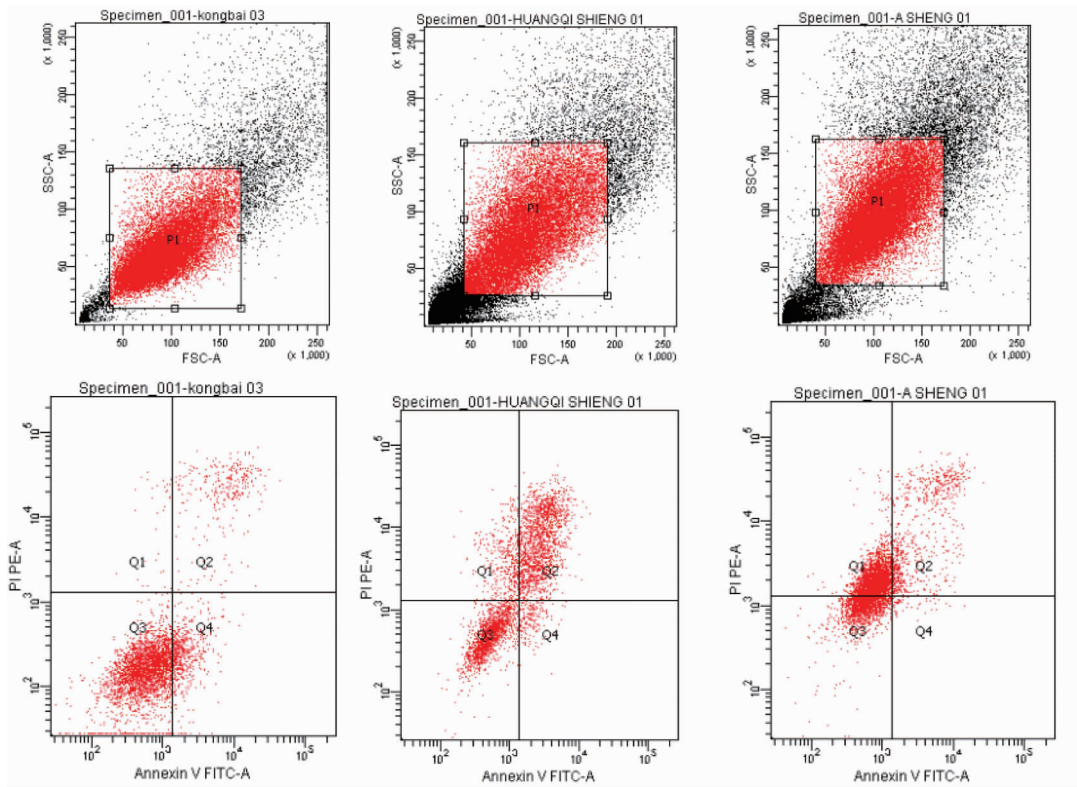
3.1 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞凋亡

药物干预 24 h 后的细胞见图 1,黄芪解毒汤及阿霉素组与空白对照组间差异有显著统计学意义( $P<0.01$ ),黄芪解毒汤组与阿霉素组组间无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。由数据分析得出,在未药物干预的 MCF-7 中凋亡细胞较少,而经过药物干预后的 MCF-7 人乳腺癌细胞凋亡率有不同程度的增高。

表 1 不同药物对 MCF-7 细胞诱导凋亡作用 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	凋亡率(%)
空白对照组	22.2±0.96
黄芪解毒汤组	51.1±1.15 <sup>△</sup>
阿霉素组	53.0±4.14 <sup>△</sup>
F	112
P	0.000

注:与空白对照组比较 $\Delta P<0.01$ 。



注:上下二列从左至右分别为空白组,黄芪解毒汤组和阿霉素组

图 1 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞凋亡图

3.2 实时荧光定量 PCR 检测  $\beta$ -catenin 及 C-myc 基因表达

图 2 为  $\beta$ -catenin 及 C-myc 基因熔点曲线图,

结果所有图片均显示只有一个峰值,没有出现杂峰,提示无非特异性荧光信号,目的基因扩增产物单一,有利于结果分析。表 2 结果显示,与空白对照组相

比,被药物组干预的细胞中  $\beta$ -catenin 及 C-myc 基因表达明显降低且有显著统计学意义 ( $P<0.05$  或  $P<$

0.01);且阿霉素组表达最低,其次为黄芪解毒汤组,两组比较差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。

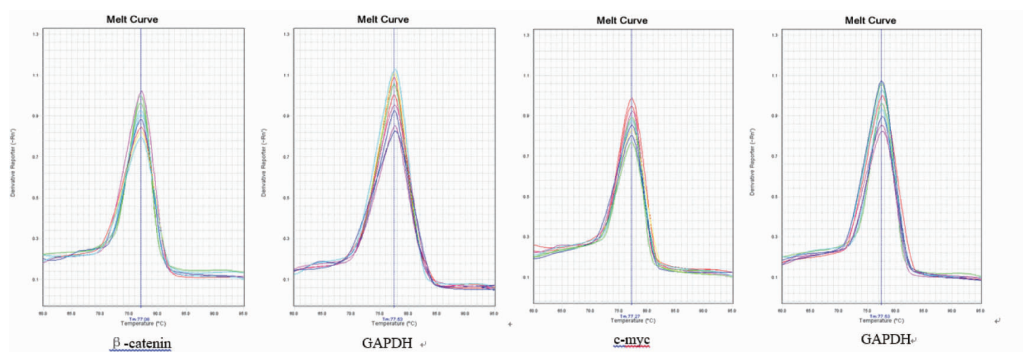


图 2  $\beta$ -catenin 及 C-myc 基因熔点曲线图

表 2 不同药物组中  $\beta$ -catenin 及 C-myc 的相对含量 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

分组	mRNA( $\beta$ -catenin)	mRNA(C-myc)
空白对照组	4.088 $\pm$ 0.2805	4.262 $\pm$ 0.1635
黄芪解毒汤组	3.344 $\pm$ 0.1897 $\Delta^*$	2.501 $\pm$ 0.2947 $\Delta^*$
阿霉素组	1.091 $\pm$ 0.0917 $\Delta\Delta$	1.123 $\pm$ 0.1849 $\Delta\Delta$
F	178.2	673.7
P	0.000	0.000

注:与空白对照组相比, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ ;与阿霉素组比较, $*P<0.01$ 。

#### 4 讨论

本实验从分子生物学角度探讨黄芪解毒汤治疗乳腺癌复发转移的机制,以黄芪解毒浓缩液及阿霉素液干预 MCF-7 细胞,并以流式细胞仪检测药物干预后 MCF-7 细胞的凋亡率、实时荧光定量 PCR 检测  $\beta$ -catenin、C-myc 基因的表达。其实验结果显示与空白对照组相比,黄芪解毒汤组及阿霉素组中 MCF-7 细胞凋亡率明显升高,且黄芪解毒汤组及阿霉素组中  $\beta$ -catenin、C-myc 基因的表达明显下降 ( $P<0.05$ )。

黄芪解毒汤是湖南中医药大学第一附属医院乳腺科经验方,黄芪为方中君药,取其主健脾补中、升阳举陷、益卫固表、托毒生肌之功效;臣以太子参补气健脾、生津润肺,两者相辅相成,共奏益气健脾养阴之功,主扶正;白术取其温补脾气,茯苓渗湿健脾,苓术同用,加强益气健脾除湿,另外茯苓可补益心神、宁心安神;佐以薏苡仁利水消肿、渗湿健脾,玄参甘苦咸微寒,可清热凉血、泻火解毒、滋阴,麦冬甘微苦寒,养阴生津、润肺清心,用于方中有益气养阴,白花蛇舌草与半枝莲清热解毒、利湿通淋消肿效优;女贞子甘苦凉,滋补肝肾、乌须明目;浙贝母清热,龙葵利水,两者均可散结,共奏清热解毒抗癌功效;甘草为使药以养胃和中。全方主益气养阴解毒。本方

主治乳腺癌术后放化疗后正气不足,体质虚弱,以防止其复发和转移为组方的宗旨。阿霉素为常用乳腺癌化疗药物,其作用早已得到临床及实验的证实。其治疗乳腺癌的作用可能与黄芪解毒汤及阿霉素可促进 MCF-7 细胞的凋亡及抑制  $\beta$ -catenin、C-myc 基因的表达有关。但在临床运用中黄芪解毒汤作为传统的中药汤剂其毒副作用较小,而阿霉素为常见的细胞毒性药物有很大的毒副作用,故在乳腺癌的抗复发转移中黄芪解毒汤值得推广运用。但是黄芪解毒汤作为一种中药煎剂其本身药物组成及成分较多,故还需要更多的体内及体外实验来进一步探讨其在防治乳腺癌复发转移中的机制,更好地指导中医药在临床治疗中的应用。

#### 参考文献:

- [1] Brennan KR, Brown AM. Wnt proteins in mammary development and cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, 9(2): 119-131.
- [2] Khalil S, Tan GA, Giri DD, et al. Activation status of Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in normal and neoplastic breast tissues: relationship to HER2/neu expression in human and mouse [J]. PloS One, 2012, 7(3): e3342.
- [3] 艾萍,刘丽芳,周亮,等.黄芪解毒汤干预癌基因表达抑制乳腺癌复发转移的研究[J].四川中医,2012(5):23-26.
- [4] 张斌,张霞,张改容,等.乳腺癌 MCF-7 细胞体外干细胞培养条件下雌激素受体表达与治疗敏感性初探[J].中华乳腺病杂志(电子版),2012,6(2):36-40.
- [5] 张淑芳,刘大程,孙吉凤,等.FTY720 对体外培养 MCF-7 细胞增殖及凋亡影响的研究[J].中国实验诊断学,2011,15(1):48-50.
- [6] 徐斌,马斌林,白靖平,等.雷帕霉素联合 5-脱氧氮杂胞苷干预乳腺癌 MCF-7 细胞株体外培养效应[J].中国癌症杂志,2009,19(1):43-47.
- [7] 袁磊.1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对乳腺癌 MCF-7 细胞 CYP1B1 表达的作用和 COX-2/PGE<sub>2</sub> 通路机制[D].重庆:重庆医科大学,2012.

(本文编辑 杨 瑛)