

·方药研究·

本文引用:熊家青,吴世婷,李 逵,刘丽芳.黄芪解毒汤对乳腺癌细胞 Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白表达影响的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):145-149.

黄芪解毒汤对乳腺癌细胞 Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白表达影响的研究

熊家青¹,吴世婷²,李 逵²,刘丽芳^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨黄芪解毒汤抑制乳腺癌复发转移的机制是否与其干预 Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白在人乳腺癌 MCF-7 细胞中的表达有关。**方法** 采用 SPF 级 SD 大鼠灌胃法制备黄芪解毒汤组、阿霉素组、参一胶囊组、生理盐水组的含药血清。运用细胞培养技术,MTT 法检测发现最佳抑制浓度;以最佳抑菌浓度即 20%浓度的含药血清干预人乳腺癌细胞,RT-PCR 检测 Jag1 基因,Western-blot 检测 CyclinD1 蛋白的表达。**结果** 各组与生理盐水血清组比较,Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白表达均明显降低($P<0.01$);与其他各组比较阿霉素血清组抑制作用最强($P<0.01$);黄芪解毒汤血清组与参一胶囊血清组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 黄芪解毒汤可显著降低 MCF-7 细胞 Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白表达,该结果可为黄芪解毒汤在乳腺癌术后治疗中的作用提供实验依据。

[关键词] MCF-7;Jag1;CyclinD1;黄芪解毒汤

[中图分类号]R285.5;R393;R737.9

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.007

Effect of Huangqi Jiedu Decoction on Expression of Jag1 and CyclinD1 in Breast Cancer Cells

XIONG Jiaqing¹, WU Shiting², LI Kui², LIU Lifang^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Chansha, Hunan 410208 China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Huangqi Jiedu decoction on the expression of Jag1 gene and CyclinD1 protein in MCF-7 cells of human breast cancer and to reveal its possible mechanism of inhibiting the recurrence and metastasis of breast cancer. **Methods** Drug-containing serum of Huangqi Jiedu decoction group, doxorubicin group, Shenyi capsule group and normal saline serum group were built by using the method of gavage in SPF SD rats. The optimal concentration of cell inhibition routine culture of cells was detected by MTT. The breast cancer was intervened with 20% drug containing serum. The expression of JAG1 protein was detected by real-time quantitative PCR and CyclinD1 protein was determined by Western-blot. **Results** Compared with the normal saline group, the expression of Jag1 and CyclinD1 protein in the other serum groups significantly decreased ($P<0.01$). The inhibitory effect of the adriamycin serum group was the strongest ($P<0.01$). There was no significant difference between the serum group of Huangqi Jiedu decoction group and Shenyi

[收稿日期]2017-04-03

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

[作者简介]熊家青,女,在读博士研究生,主要研究方向为乳腺病临床研究。

[通讯作者]* 刘丽芳,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:liuliff@126.com。

capsule group ($P > 0.05$). **Conclusion** Huangqi Jiedu decoction could significantly prohibit the expression of Jag1 and CyclinD1, and provide the experimental evidence for Huangqi Jiedu Decoction in the treatment of breast cancer after surgery.

[**Keywords**] MCF-7; Jag1; CyclinD1; Huangqi Jiedu decoction

乳腺癌目前是威胁女性健康的最常见的肿瘤之一,其发病率也逐年升高,乳腺癌的治疗方法也越来越丰富,应用中医药的综合治疗是目前的重要方式^[1]。中医药特色治疗逐渐受到国内外肿瘤临床界的重视。黄芪解毒汤是导师刘丽芳教授的经验方,在对治疗乳腺癌术后恢复及抗复发转移的疗效中经过了临床考证^[2],且能干预癌基因的表达^[3]。而 Jag1 基因在判断乳腺癌的发展和预后中起着重要作用;CyclinD1 蛋白是目前公认的癌基因,且乳腺癌组织中 CyclinD1 蛋白有过度表达的现象^[4],本实验通过 RT-PCR 检测 Jag1 基因,Western-blot 法检测 CyclinD1 蛋白表达的影响,为黄芪解毒汤应用于乳腺癌复发转移提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

SPF 级 SD 大鼠,雌性,15 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物使用许可证 SCXK(京)2012-0001,体质量 180~220 g,人乳腺癌细胞株 MCF-7 由北京协和医学院细胞资源中心提供。

1.2 实验药物及试剂

黄芪解毒汤浓缩液由湖南中医药大学第一附属医院提供。药物组成包括黄芪 30 g,白术 10 g,半枝莲 30 g,白花蛇舌草 30 g,薏苡仁 30 g,太子参 15 g,茯苓 10 g,玄参 15 g,女贞子 15 g,麦冬 10 g,龙葵 15 g,山慈菇 10 g,浙贝母 10 g,甘草 6 g。制备方法参照文献^[5],药物浓度为 4.32 g/mL;阿霉素液:阿霉素 10 mg/支,购于深圳万乐药业有限公司,批号:1307E1,配制为 5 倍常用量(0.7 mg/mL);参一胶囊液:购于吉林亚泰制药有限公司,批号:20140903,配制为 5 倍常用量(0.33 mg/mL);PBS 磷酸缓冲盐溶液(500 mL,北京索莱宝);DMEM 高糖培养基(500 mL,美国 Hyclone 公司);胎牛血清(500 mL:美国 Gibco);0.25%胰蛋白酶消化液及双抗(100 mL,中国医学科学院生物医学工程研究所);二甲基亚砷 DMSO(100mL,北京索莱宝);Anti

Rabbit IgG/HRP (SANTA, sc-2030); Goat Anti Mouse IgG/HRP(ZYMED, 62-64201); FITC Annexin V Apoptosis Detection 试剂套装(美国 BD 公司); Trizol (Invitrogen);Rabbit Cyclin D1 antibody Goat (CST);Mouse GAPDH antibody(SANTA)。

1.3 仪器设备

1-13 高速离心机,美国 SIGMA;DG-III 电泳仪,北京鼎国生物技术发展中心;7900 型 Realtime-PCR 仪,美国 ABI;电泳仪及附件:美国 BIO-RAD;电转仪及附件:美国 BIO-RAD;JY-SPC 水平电泳槽,北京君意东方仪器公司。

1.4 含药血清的制备^[6]

雌性 SD 大鼠适应性喂养 3 d^[7]。3 d 后将动物称质量,按照随机数字表分为 4 组,分别为黄芪解毒汤组、阿霉素组、参一胶囊组、生理盐水组。各组大鼠均用相应的药物浓缩液进行灌胃,每次 5 mL,每天固定时间点给药 2 次,共连续灌胃 3 d^[7]于第 3 天灌胃结束后禁食,正常给水(禁食超过 12 h)。生理盐水组以等量的生理盐水灌胃。于第 4 天各组大鼠均采用 10%水合氯醛麻醉,用腹主动脉取血的方式采血,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过除菌,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 细胞培养

将人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育。待细胞生长旺盛,处于对数生长期,加入各组含药血清进行干预。

1.6 MTT 法检测药物对 MCF-7 细胞增殖的影响^[8]

将 MCF-7 细胞以 1.25×10^5 个/mL 接种于培养瓶中,用 DMEM 吹打成细胞悬液并调整细胞浓度为 4×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL 。实验分为 4 组,每组设置 6 个浓度(5%、10%、15%、20%、25%、30%):生理盐水血清组、黄芪解毒汤血清组、阿霉素血清组、参一胶囊血清组。每组的每种浓度设置 3 个复孔,同时设置调零孔。均加 20 μL 浓度为 5 g/L 的 MTT,置于培养箱中继续培养 4 h,待细胞贴壁后,小心将上清液吸弃,PBS 磷酸缓冲液将细胞

冲洗2次,逐孔加入150 μL 的DMSO,再恒温振荡器上震荡10 min,使DMSO充分溶解紫蓝色结晶,置于酶标免疫检测仪上检测,测波长为490 nm下的A值(OD值),按照公式计算细胞抑制率。抑制率为正值表示有抑制细胞生长增殖作用,负值表示有促进细胞增殖作用。实验共重复3次,选定最佳抑制浓度的含药血清浓度进行下一步的实验。

细胞抑制率(%)=(1-药物血清组A值/生理盐水组A值) \times 100%。

1.7 细胞悬液制备

选取最佳抑制浓度后将实验分为四组,黄芪解毒汤血清组、阿霉素血清组、参一胶囊血清组及生理盐水血清组,取对数生长期的人乳腺癌MCF-7细胞,以 1.25×10^5 个/mL密度接种于培养瓶中,实验组均加入20%浓度^[3]的含药血清5 mL,均培养24 h后,以0.25%胰蛋白酶吹打细胞制备成单细胞悬液,并用DMEM培养液将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL。

1.8 实时荧光定量PCR检测Jag1基因表达

提取细胞悬液中细胞样本RNA:加入Trizol 0.8 mL消化;将消化后的匀浆静置5 min,加入0.2倍体积的氯仿;4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min,离心10 min;离心后将上层无色水相吸出;并向其加入0.5倍体积的异丙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$,静置10 min;4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min,离心10 min;弃上清,下层沉淀用以1 mL 75%乙醇洗涤,混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$,7 500 r/min,离心5 min,弃上清。室温条件下干燥10 min,在沉淀中加入适量无RNase的水,使RNA完全溶解。2 000 r/min,离心20 s。以A260/A280法检测RNA纯度及浓度;琼脂糖电泳检测RNA完整性。设计内参 β -actin和Jag1基因的PCR引物,根据RT-PCR试剂盒说明书进行,反应体系25 μL 。扩增条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,变性、退火和延伸共35次循环,接着72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止。反应后在凝胶成像仪分析系统下拍照并测得其灰度值。引物序列见表1。实时荧光定量PCR是比较CT值法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法), $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值越小,说明对Jag1基因的相对含量越低,抑制作用越明显。

1.9 Western-blot 检测CyclinD1蛋白表达

表1 Jag1及 β -actin的引物序列

引物	序列	扩增长度
Jag1	Forward 5'-CTCATCAGCCGTGTCTCAAC-3'	(234 bp)
	Reverse 5'-GGCACACACTTAAATCCG-3'	
β -actin	Forward 5'-GAGCGGAAATCGTCCGTGACATT-3'	(234 bp)
	Reverse 5'-GATCGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'	

制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。收集细胞,以BCA法测蛋白浓度后点样。按预定顺序加样。恒流300 mA电泳70 min转移后。置于5%的脱脂奶粉中封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。PBS漂洗2~3次,加入一抗Rabbit Cyclin D1 antibody。室温下于摇床孵育2 h后,弃去一抗,加2~3 mL PBST,摇床洗涤5~10 min,反复4次。加入二抗Goat Anti Rabbit IgG/HRP,室温下摇床孵育1 h。加2~3 mL PBST,摇床洗涤5~10 min,反复4次。将膜风干,贴在玻璃纸上,加底物,做化学发光,得到胶片。将背景较高的底片片放入PIERCE公司X光片背景去除液中,观察到理想的结果时,终止反应,用水清洗以去除不需要的背景。用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值,将所得数据用CyclinD1/GAPDH比值的方法表示CyclinD1蛋白表达。

1.10 统计学处理

统计学应用SPSS 19.0统计软件分析数据。数据用均数“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,实验数据组间比较采用方差分析和 t 检验,两两比较用LSD检验,不符合正态分布用秩和检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义, $P<0.01$ 认为差异有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组MTT结果

发现黄芪解毒汤血清组、参一胶囊血清组、阿霉素血清组除5%浓度外其他浓度OD值均低于生理盐水组($P<0.05$)。且有一定的量效关系,抑制作用随血清浓度的升高而增强,但浓度达到20%以后,抑制效果趋于平稳,提示20%含药血清对MCF-7细胞生长抑制效用较好。故后续实验以20%含药血清浓度干预检测。

2.2 实时荧光定量PCR检测Jag1基因表达

实时荧光定量PCR是比较CT值法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法),各实验组的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值见表2。与生理盐水血清

组比较,其他各含药血清组Jag1表达均明显降低($P<0.05$);与其他各血清组比较,阿霉素血清组抑制作用最明显($P<0.05$),黄芪解毒汤血清组与参一胶囊血清组比较无统计学意义($P>0.05$),提示黄芪解毒汤对Jag1基因抑制作用明显。Jag1基因的熔解曲线及扩增曲线如图1、2,曲线显示只有一个峰值,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 不同组中Jag1及CyclinD1蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	mRNA(Jag1)	CyclinD1/GAPDH值
生理盐水血清组	4.159±0.189	0.790±0.163
黄芪解毒汤血清组	1.908±0.025*#	0.578±0.057*#
参一胶囊血清组	2.143±0.214*#	0.606±0.285*#
阿霉素血清组	1.104±0.171*	0.257±0.152*
F值	181.9	80.15
P值	0.000	0.000

注:与生理盐水血清组比较,* $P<0.05$;与阿霉素血清组比较,# $P<0.05$ 。

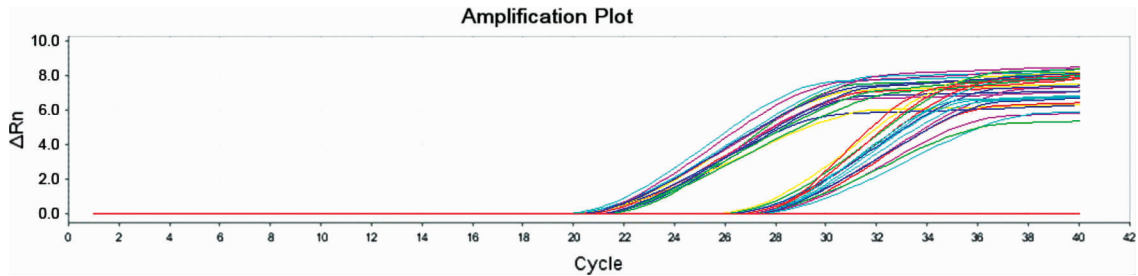
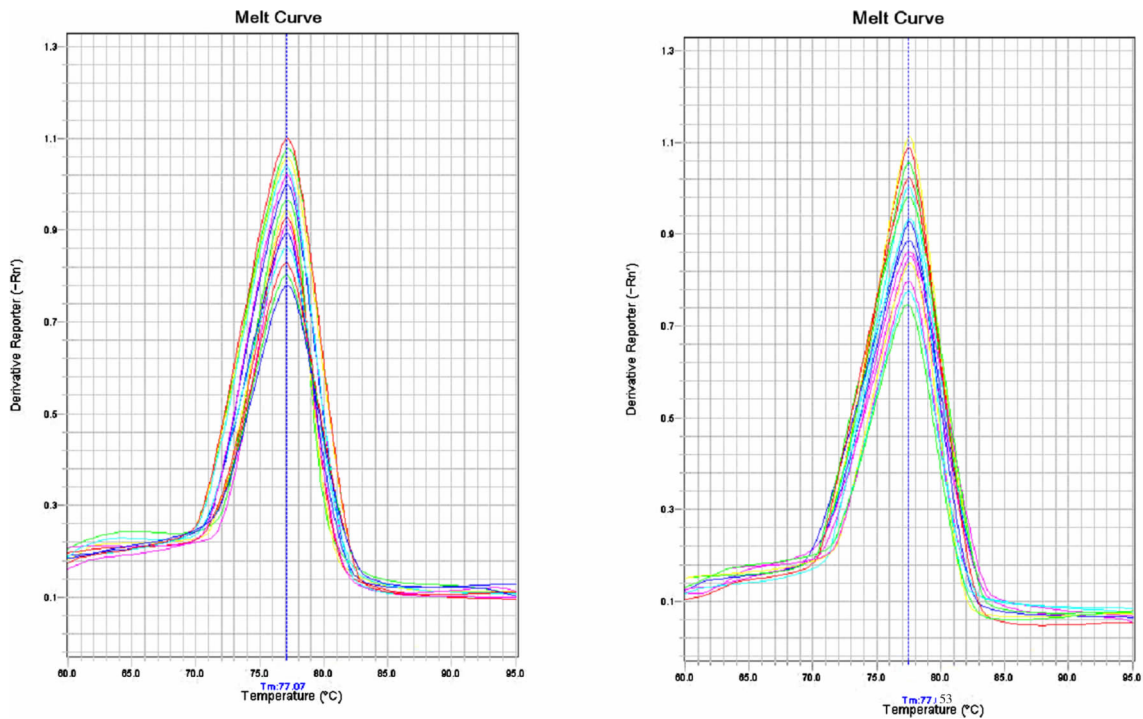


图1 Jag1的扩增曲线



注:左.Jag;右.GAPDH

图2 Jag1的熔解曲线

2.3 Western-blot 检测 CyclinD1 蛋白表达

各组的CyclinD1/GAPDH值如表2,各组CyclinD1蛋白表达的电泳图如图3。表2示与生理盐水血清组相比,含药血清干预后的细胞中CyclinD1蛋白表达减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与其他各血清组比较,阿霉素血清组对CyclinD1蛋白表

达的抑制最强($P<0.05$),黄芪解毒汤血清组与参一胶囊血清组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

乳腺癌是临床上发生于女性的最常见的恶性肿瘤,据世界卫生组织国际癌症研究中心发布的数据,



图3 不同血清干预 CyclinD1 蛋白表达的电泳图

全球新增乳腺癌病例 170 万例,占女性恶性肿瘤发病的 25%,同时其死亡率占全部女性恶性肿瘤死亡的 15%^[9]。国内外诸多研究^[10-11]显示 Jag1 基因的表达在乳腺癌的癌组织明显高于癌旁正常乳腺组织;而 CyclinD1 蛋白过表达者的生存率较低表达者低。Reedijk Michael^[12]发现高表达的 Jag1 基因的患者其无病生存率低于低表达的 Jag1 的患者,由此可知, Jag1 基因在判断乳腺癌的发展和预后起着重要作用。CyclinD1 蛋白是目前公认的癌基因,乳腺癌组织中 CyclinD1 蛋白有过度表达的现象^[4]。国内研究^[13]也发现 CyclinD1 蛋白的过度表达可做作为判断乳腺癌预后的重要指标。黄芪解毒汤是导师刘丽芳教授的经验用方,前期实验研究证明其能干预乳腺癌的发展^[3,14-16]。方中以黄芪为君药益气健脾,太子参为臣药解毒养阴,君臣药配合以扶正;辅以白术、茯苓健脾益气;薏苡仁渗淡利湿、健脾益气;玄参、麦冬养阴;白花蛇舌草、半枝莲清热解毒抗癌;女贞子补肝肾滋阴;浙贝母清热散结,龙葵散结消肿;甘草调和诸药为使药。全方配伍共奏益气养阴扶正解毒之效,对乳腺癌术后及放化疗后正气不足,体质虚弱有明显的提高正气之效^[2]。

本实验采用实时荧光定量 PCR 检测,通过药物干预 Jag1 基因,以及 Western-blot 检测 CyclinD1 蛋白的表达。各组与生理盐水血清组比较,发现 Jag1 基因与 CyclinD1 蛋白表达有均明显的下降($P<0.05$)。在 Jag1 基因和 CyclinD1 蛋白表达中黄芪解毒汤血清组与参一胶囊血清组两组比较差别虽然没有统计学意义($P>0.05$),但实验结果均优于参一胶囊组。以上结果可证实黄芪解毒汤抑制乳腺癌复发转移的作用是通过抑制 Jag1 基因与 CyclinD1 蛋白的表达,其效果差于阿霉素。阿霉素为细胞毒性药物,在临床应用广泛,但是其毒副作用大,对于本来就接受了身体和心理双层打击的患者是严峻的考验。而黄芪解毒汤为传统中药方剂,临床应用无明显毒副作用,在患者术后及放化疗后应用能够明显减轻患者的不良

反应。本实验从分子生物学角度探讨黄芪解毒汤对乳腺癌 MCF-7 细胞的 Jag1 基因及 CyclinD1 的调节机制,为改善患者术后复发转移提供实验依据,也为中医药对乳腺癌的防治提供思路,拓宽乳腺癌的治疗方法,缓解患者在治疗过程中的不适。

参考文献:

- [1] 郭艳静,刘丽芳.中医中药治疗乳腺癌临床研究进展[J].中华中医药学刊,2012,30(8):1774-1777.
- [2] 肖 洒,刘丽芳,丁 玲,等.黄芪解毒汤抗三阴性乳腺癌术后复发转移临床疗效观察[J].四川中医,2017,35(1):153-155.
- [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,2012,30(5):23-26.
- [4] UMEKITA Y, OHI Y, SAGARA Y, et al. Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients[J]. Int J Cancer, 2002,9(3):415-8
- [5] 程薇薇,刘建利,张 宁,等.评价中药寒热药性的实验方法研究[J].中草药,2010,41(7):1122-1126.
- [6] 张君涛,王 平,刘爱峰,等.中药含药血清制备方法的研究概述[J].中华中医药杂志,2015,30(11):4006-4009.
- [7] 柯 玮,朱建华.中药血清药理学方法学的研究概况[J].中国医药指南,2011,9(6):24-25.
- [8] 何雅军,舒建昌,吕 霞,等.Annexin V FITC/PI 流式细胞术检测姜黄素诱导的肝星状细胞凋亡[J].实用医学杂志,2009,25(1):28-30.
- [9] TORRE L A, BRAY, F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(2):87-108.
- [10] 花本林,付欣鸽,尹 亮,等.Notch1 和 JAG1 在乳腺癌和癌旁组织的表达比较[J].临床与实验病理学杂志,2009,25(2):127-131.
- [11] REEDIJK M, ODORCIC S, CHANG L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival [J]. Cancer Res, 2005,65(18):8530-7.
- [12] REEDIJK M, PINNADUWAGE D, DICKSON B C, et al. JAG1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008,111(3):439-48.
- [13] 邓 敏,解瑞飞,王 惠.FGFR-1、cyclinD1 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J].中国现代医生,2016,54(4):1-4.
- [14] 郭艳静,刘丽芳,周 亮,等.黄芪解毒汤对人乳腺癌裸鼠移植瘤抑制效应的实验研究[J].中医药导报,2013,19(2):11-14.
- [15] 丁 玲,刘丽芳,吴世婷,等.黄芪解毒汤含药血清对乳腺癌细胞 MCF-7 中 SHH、PTCH1、SMO、GLI1 基因及 CyclinD1 蛋白表达的影响[J].中医药导报,2016,22(24):23-28.
- [16] 吴世婷,刘丽芳,熊家青,等.黄芪解毒汤诱导乳腺癌细胞凋亡及对 β -Catenin、c-myc 基因表达影响的研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(1):357-360.

(本文编辑 杨 瑛)