

本文引用:李琳霏,杨晓,潘博,谭小宁,罗吉,蒋益兰.疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报, 2018,38(6):645-649.

疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响

李琳霏¹,杨晓²,潘博¹,谭小宁¹,罗吉¹,蒋益兰^{1*}

(1.湖南省中医药研究院附属医院肿瘤科,湖南长沙 410006;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的 研究中药疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响。方法 采用 CCK8 法检测药物干预 12 h、24 h、48 h 后对 MCF-7 细胞增殖的影响(分为空白对照组、阳性药物对照组及不同浓度中药组);采用流式细胞术检测药物干预 36 h 及 48 h 后对细胞晚期凋亡率的影响(分为空白对照组、中药组及阳性药物对照组)。结果 中药组吸光度低于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$),且随药物浓度增高,吸光度逐渐降低;12 h 至 24 h,随着作用时间延长,吸光度亦逐渐降低;24 h 后较高浓度中药组吸光度与阳性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组比较,中药组细胞晚期凋亡率较高,差异有显著统计学意义($P<0.01$),但中药组细胞凋亡率低于阳性对照组,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。结论 疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖有一定的抑制作用,可能通过诱导细胞凋亡实现。

[关键词] 疏肝健脾解毒方;人乳腺癌细胞 MCF-7;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号]R285.5;R273

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.06.008

Effect of Shugan Jianpi Jiedu Decoction on Proliferation and Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7

LI Linpei¹, YANG Xiao², PAN Bo¹, TAN Xiaoning¹, LUO Ji¹, JIANG Yilan^{1*}

(1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Grade 2016 Doctoral Candidate, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Shugan Jianpi Jiedu decoction on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. **Methods** The MCF-7 cells were intervened with drugs for 12 h, 24 h and 48 h (assigned into blank control group, positive drug control group and different concentrations of TCM groups), then MCF-7 cells proliferation was detected by CCK8 method. The apoptosis rate of the cells was measured by flow cytometry after intervention with drugs for 36 h and 48 h. **Results** The absorbance of TCM groups was lower than that of the blank group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The absorbance decreased gradually with the increase of drug concentration, and reduced gradually with the extension of time from 12 h to 24 h, while after 24 h, the absorbance between the high concentration TCM group and the positive control group was not statistically significant ($P>0.05$). The cell apoptosis rate in TCM groups was higher than that in blank group, the difference was statistically significant ($P<0.01$), but was significantly lower than that in positive group ($P<0.01$). **Conclusion** Shugan Jianpi Jiedu decoction exhibits certain inhibitory effect on human breast cancer cell MCF-7 proliferation, and its mechanism maybe through inducing cell apoptosis.

[Keywords] Shugan Jianpi Jiedu decoction; human breast cancer cell line MCF-7; cell proliferation; cell apoptosis

[收稿日期]2017-03-15

[基金项目]湖南自然科学基金项目(2016JJ6082),湖南省中医药管理局重点项目(201634)。

[作者简介]李琳霏,女,硕士,主治医师,从事中医肿瘤临床工作。

[通讯作者]* 蒋益兰,女,主任医师,博士研究生导师,E-mail:tianshangren624@163.com。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。自2008年以来,乳腺癌的发病率增加20%以上,死亡率增加了14%^[1]。乳腺癌的发病率逐年上升,在我国发达城市,特别是在一些大城市及沿海经济发展较快的地区,已占女性恶性肿瘤发病的首位^[2],严重威胁着女性身体健康。“疏肝健脾解毒方”为我院治疗乳腺癌的经验方,经多年临床实践,我们运用该方治疗乳腺癌患者取得良好疗效。为进一步明确其作用机理,我们进行了相关实验研究^[3],本实验进一步探讨疏肝健脾解毒方提取液对人乳腺癌细胞MCF-7的影响,现报道如下。

1 材料

1.1 细胞株及药物

人乳腺癌细胞MCF-7由中南大学湘雅医学院国家重点肿瘤研究所赠送;疏肝健脾解毒方由柴胡10g,郁金10g,茯苓10g,白术10g,白花蛇舌草30g,半枝莲30g,蒲公英30g组成。由湖南省中医药研究院附属医院中药房提供;阳性对照药注射用盐酸吡柔比星购自深圳万乐药业有限公司,规格:10mg/瓶,国药准字:H0930105,产品批号:1605C8。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM高糖培养基(Gibco,批号:8116293);胎牛血清(PAN,批号:P160704);0.25%胰蛋白酶(Gibco,批号:8252000);CCK8(七海生物有限公司,批号20161106);青霉素-链霉素混合液(Hyclone,批号:J160002);磷酸盐缓冲液(Hyclone,批号:AB218110)。细胞培养箱(Thermo,型号:HERAcell 2401);超净工作台(法国JouanMSC12);高速离心机(湖南赛特湘仪,TG16-WS);全自动酶标仪(BioTek,型号:EIX808U);流式细胞分析仪(美国BD,型号:BD FACSCalibur)。

2 方法

2.1 药物制备

疏肝健脾解毒方由柴胡10g,郁金10g,茯苓10g,白术10g,白花蛇舌草30g,半枝莲30g,蒲公英30g组成。取以上中药处方剂,用10倍温水浸泡0.5h,大火加热煎煮,水开后继续煎煮0.5h,趁热过滤。药渣再加8倍水煎煮2次,每次0.5h,趁

热过滤。将3次水煎液混合、过滤,减压浓缩为浓度为1g/mL的溶液,在超净工作台内以0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌后,分装于1.5mL无菌EP管内,4 $^{\circ}$ C保存备用。注射用盐酸吡柔比星于生物安全柜内用注射用无菌生理盐水配制成1mg/mL的溶液,分装于1mL无菌EP管内,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。将中药及阳性对照药溶液均于临用前加入DMEM培养基配成所需浓度,并检测配制液pH值及渗透压,确保其pH值及渗透压均保持在正常培养基的可波动范围(pH7.2~7.4、渗透压280~320m \cdot sm/kg),必要时用无菌HCL和NaOH调整溶液pH值,以无菌NaCl调整溶液渗透压。

2.2 人乳腺癌细胞培养

人乳腺癌细胞MCF-7,用含10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM高糖培养基培养于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱中培养。细胞铺满培养瓶底80%~90%时予以胰蛋白酶消化、传代,约2~3d传代1次。

2.3 CCK8法检测人乳腺癌细胞MCF-7增殖情况

取对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化后收集,用完全培养基调整细胞浓度为 3×10^4 /mL。从96孔板第2行第2列培养孔开始,每列取5孔,取8列,每1列为1组,分别设为空白对照组、中药A组(5mg/mL)、中药B组(10mg/mL)、中药C组(15mg/mL)、中药D组(20mg/mL)、中药E组(25mg/mL)、中药F组(30mg/mL)及阳性对照组(注射用盐酸吡柔比星,参考相关文献^[4-5]及预实验结果,浓度设为10mg/L)。向每孔中加入100 μ L上述细胞悬液,4周培养孔均加入100 μ L磷酸盐缓冲液,以防边缘效应。将96孔板放于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中继续培养。共接种96孔板3板,分别用于给药后12、24、48h检测细胞增殖情况。

24h后取出培养板,吸除培养孔中的培养液,并按照分组情况向相应列的6个培养孔加入含相应浓度药物的培养基100 μ L,最下方不含细胞的培养孔作为该组的调零孔,以排除药液中色素等对检测结果的影响。

给药后12、24、48h分别取1块96孔板,分别向各实验孔加入CCK8溶液10 μ L,轻轻震荡,使CCK8溶液与培养液混匀,放回培养箱继续培养2h后,用酶标仪于570nm波长下检测各孔吸光值

(OD 值),计算各孔细胞生长抑制率(IR)。IR(%)=[(空白组 OD 值-空白调零孔 OD 值)-(给药组 OD 值-给药组调零孔 OD 值)]/(空白组 OD 值-空白调零孔 OD 值)×100%。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

取对数生长期的细胞,调整浓度为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$,取 6 孔板 2 块,每孔加入上述细胞悬液 2 mL,分别设为空白组、中药组(为保证给药后有足够细胞数用于流式检测,结合增殖抑制情况,中药浓度定为半数抑制率对应浓度:16 mg/mL)及阳性对照组(注射用盐酸吡柔比星,因 10 mg/L 时,细胞增殖抑制率过高,为保证给药后有足够细胞数可用于流式检测,此处浓度设为 5 mg/L),每组 2 孔。细胞铺板完成后将 6 孔板置于培养箱继续培养。

给药 36 h 及 48 h 后分别取出 1 块 6 孔板,收集各实验孔中的培养液于 15 mL 离心管中,以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞后,用磷酸盐缓冲液吹打、收集细胞,移入离心管,将各组培养液及细胞悬液均以 1 000 r/min 转速离心 5 min,弃上清。用 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液清洗细胞沉淀 2 次,并合并同组培养液及细胞悬液离心所得细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 70% 冰乙醇固定 24 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,磷酸盐缓冲液洗涤 1 次,每组加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液,缓慢并充分重悬细胞沉淀,于 37 °C 避光温浴 30 min。染色完成后 24 h 内(期间可以置于 4 °C 或冰浴避光存放)用流式细胞仪在激光波长 488 nm 波长处检测荧光强度及散射情况。

重复上述步骤 3 次,取平均值。

2.5 统计方法

采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据符合正态分布及方差齐性时,两组间比较采用独立样本 *T* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 *LSD* 法;数据符合正态分布但方差不齐时,两组间比较用 *Satterthwaite* 近似 *T* 检验,多组间比较采用近似 *T* 检验 *Welch* 法;数据不符合正态分布,则采用非参数检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 疏肝健脾解毒方对 MCF-7 细胞增殖的影响

疏肝健脾解毒方对 MCF-7 增殖具有一定的抑制作用,抑制作用具有明显的浓度依赖性;且 12 h 至 24 h,随着作用时间延长,抑制作用明显增强,但 24 h 至 48 h,时间依赖性不明显,提示中药疏肝健脾解毒方对 MCF-7 增殖的抑制作用在 24 h 左右可接近峰值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。较高浓度中药对 MCF-7 增殖抑制作用与阳性对照药(注射用盐酸吡柔比星 10 mg/L)相当($P > 0.05$)。结果见表 1、图 1。

3.2 疏肝健脾解毒方对 MCF-7 细胞凋亡的影响

与空白组比较,中药组(16 mg/mL)MCF-7 细胞晚期凋亡率较高,且差异有显著统计学意义($P < 0.01$),提示中药疏肝健脾解毒方对 MCF-7 细胞具有诱导凋亡的作用;但中药组 MCF-7 细胞晚期凋亡率低于阳性对照组,且差异有显著统计学意义($P < 0.01$),提示中药疏肝健脾解毒方对 MCF-7 的诱导凋亡作用不及阳性对照药(注射用盐酸吡柔比星 5 mg/L);同组

表 1 疏肝健脾解毒方对 MCF-7 增殖的影响

($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	12 h		24 h		48 h	
	OD	IR/%	OD	IR/%	OD	IR/%
空白组	0.510±0.057	0	0.625±0.036	0	0.905±0.044	0
中药 A 组	0.456±0.049 ^{##}	10.60	0.490±0.127 ^{##}	20.44	0.732±0.193 ^{##}	19.14
中药 B 组	0.415±0.025 ^{**##}	18.61	0.494±0.141 ^{##}	21.05	0.657±0.127 ^{##}	27.43
中药 C 组	0.405±0.060 ^{**##}	20.51	0.403±0.091 ^{**##}	32.87	0.624±0.238 ^{**##}	31.10
中药 D 组	0.259±0.047 ^{**}	49.17	0.225±0.158 ^{**}	60.46	0.329±0.140 ^{**##}	63.70
中药 E 组	0.202±0.022 ^{**}	60.35	0.072±0.018 ^{**}	89.05	0.074±0.052 ^{**}	91.82
中药 F 组	0.139±0.050 ^{**##}	72.72	0.016±0.004 ^{**}	97.72	0.025±0.012 ^{**}	97.21
阳性对照组	0.259±0.014 ^{**}	49.17	0.118±0.020 ^{**}	78.97	0.004±0.001 ^{**}	99.59
<i>F</i> 值	18.25		16.77		20.12	

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

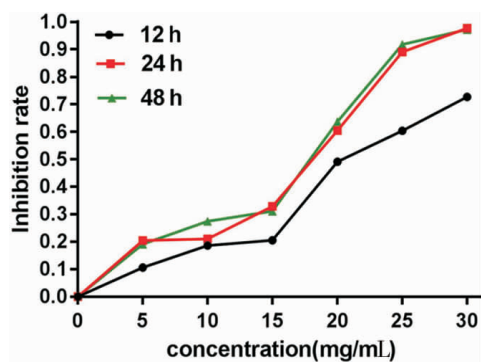


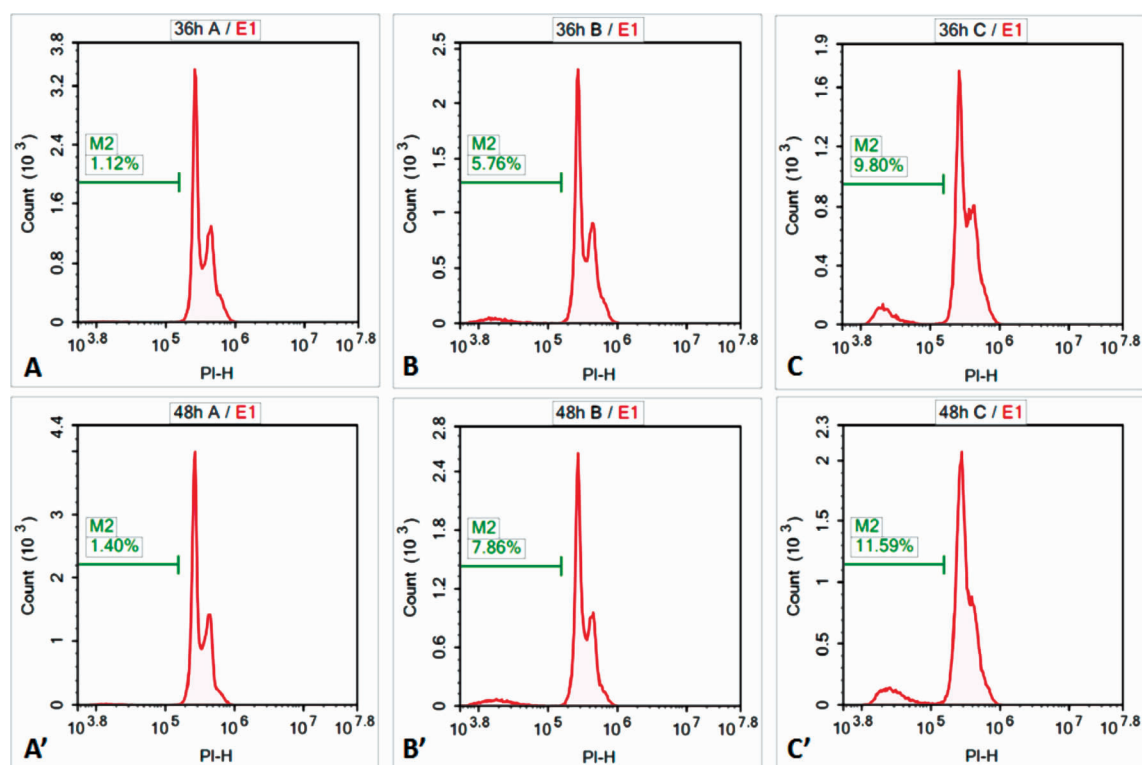
图1 中药剂量与细胞增殖抑制率关系

药物作用后 48 h 与 36 h 比较,细胞凋亡率增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 2,图 2。

表 2 疏肝健脾解毒方对 MCF-7 晚期凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

组别	36 h 凋亡率	48 h 凋亡率
空白组	1.137±0.057	1.447±0.099
中药组	5.707±0.129***	7.817±0.140***
阳性对照组	9.813±0.041**	11.483±0.895**
<i>t</i>	4.430	4.692
<i>P</i>	0.002	0.002

注:与空白组比较, ** $P<0.01$;与阳性对照组, ## $P<0.01$ 。



注:A:空白组(36 h);B:中药组(36 h);C:阳性对照组(36 h);A':空白组(48 h);B':中药组(48 h);C':阳性对照组(48 h)。

图2 MCF-7 晚期凋亡检测结果

4 讨论

乳腺癌,中医称之为“乳岩”“恶疮”“失荣”等^[6]。肝主疏泄,喜条达而恶抑郁,而乳腺癌患者多为中老年女性,更年期患者多见,常为肝郁体质^[7]。众多医家认为,乳腺癌多由郁怒伤肝、肝郁气滞,又因思虑伤脾、脾失健运^[8],如明代《外科正宗》中所言:“忧郁伤肝,思虑伤脾,积虑在心,所愿不得者,致经络痞塞,积聚成核”。故其发病的关键是情志不遂,肝郁脾虚。肝失疏泄贯穿于乳腺癌发生发展的全过程^[9-11]。健脾疏肝法成为治疗乳腺癌及其相关并发症的重要

治则^[12]。我们根据多年经验,认为肝郁脾虚是乳腺癌发病的重要原因之一,乳腺与肝、脾、肾及冲任二脉关系密切,并将乳腺癌的发生、发展归纳为“瘀、毒、虚”,即:正气亏虚,瘀毒互结^[13]。“疏肝健脾解毒方”是我院治疗乳腺癌的经验方,方由柴胡、郁金、茯苓、白术、半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英组成。该方以柴胡、郁金、茯苓、白术疏肝健脾,白花蛇舌草、半枝莲、蒲公英清热解毒。全方药物配伍精要,疏肝健脾、清热解毒、扶正抗癌,标本兼治。

本研究用 CCK8 法验证了疏肝健脾解毒方提取液对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用,发现其对

MCF-7 细胞的增殖抑制作用较强,且药物浓度、作用时间均与细胞增殖抑制率相关。较高浓度中药对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用与化疗药物(注射用盐酸吡柔比星 10 mg/L)相当。同时用流式细胞术检测了疏肝健脾解毒方提取液对 MCF-7 细胞凋亡的影响。与空白组比较,疏肝健脾解毒方组 MCF-7 细胞晚期凋亡率较高,且差异有显著统计学意义($P<0.01$),提示中药疏肝健脾解毒方对 MCF-7 细胞具有诱导凋亡的作用。因此疏肝健脾解毒方可能通过诱导细胞凋亡的方式抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖。本研究不但可佐证疏肝健脾解毒方的临床疗效确切,也为其在抗乳腺癌作用机制中的应用提供一定的科学依据。

参考文献:

- [1] 张厚云.乳腺癌内分泌治疗研究进展[J].中国普通外科杂志,2014,23(5):680-683
- [2] 张静,杨光,单保恩,等.香加皮杠柳苷对 MCF-7 细胞周期及 P21WAF1/CIP1 表达的影响[J].肿瘤防治研究,2010,37(8):864-868.
- [3] 李琳霏,杨晓,潘博,等.疏肝解毒方对乳腺癌癌前病变肝郁证模型大鼠血清性激素水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1200-1203.
- [4] 路选,陈飞,王颖,等.miR-7 对乳腺癌细胞阿霉素耐药性的逆转作用及机制[J].山东医药,2016,56(13):20-22.
- [5] 全军利,贺文兴,吴斯敏,等.STAT3 基因沉默对乳腺癌阿霉素耐药性的影响[J].实用医学杂志,2015,31(11):1748-1751.
- [6] 章慧,董丽花.黎月恒教授分期论治乳腺癌临床经验总结[J].中医药导报,2016,22(13):75-77.
- [7] 贺大智,马建伟.马建伟治疗乳腺癌经验[J].湖南中医杂志,2017,33(2):19-21.
- [8] 许炜茹,张青,富琦,等.疏肝健脾法联合化疗治疗晚期乳腺癌临床研究[J].世界中西医结合杂志,2016,11(6):815-818.
- [9] 吕雨桐,李杰.从肝郁角度探讨乳腺癌发病机理及中医药干预的分子机制[J].辽宁中医杂志,2013,40(9):1815-1817
- [10] 陈汉锐.林丽珠教授运用疏肝养肝法治疗乳腺癌经验介绍[J].新中医,2010,42(6):136-137.
- [11] 周萍.乳腺癌的病因病机探讨[J].实用中医药杂志,2010,26(5):339.
- [12] 念家云,于明薇,王笑民.健脾疏肝法治疗乳腺癌的临床研究概况[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2472-2474.
- [13] 李琳霏,潘博,杜小艳,等.潘敏求教授从“瘀、毒、虚”论治乳腺癌经验[J].湖南中医药大学学报,2016,36(4):38-41

(本文编辑 杨瑛)