

蒲公英-丝瓜络提取物对小鼠乳腺癌4T1细胞增殖与凋亡作用的影响的体外试验研究[※]

王卓冉 王文义 钟玉环 谢丽芳 许文 吴水生[▲]

摘要 目的:研究蒲公英-丝瓜络(PS)提取物对小鼠乳腺癌4T1细胞增殖和凋亡作用的影响。**方法:**将不同浓度的PS提取物作用于乳腺癌4T1细胞,通过CCK8法和集落形成实验检测PS提取物对细胞增殖的影响;通过Hoechst 33258细胞核染色法和Annexin V-FITC/PI染色法观察细胞凋亡情况;通过Western blot检测Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、CDK2、Cyclin A2蛋白表达,评估PS提取物对乳腺癌4T1细胞周期与凋亡相关蛋白表达的影响。**结果:**CCK8结果显示PS提取物各剂量组作用24、48、72 h后细胞存活率下降;不同浓度PS提取物处理4T1细胞后,细胞集落形成能力减弱;细胞周期检测结果表明PS提取物能阻滞细胞周期于S期;Hoechst 33258染色实验观察到细胞核固缩和出现明显的凋亡小体,Annexin V-FITC/PI染色流式细胞仪检测发现细胞凋亡率增加;Western blot结果显示PS提取物可使Bcl-2、周期蛋白Cyclin A2及CDK2表达降低,Bax、Cleaved caspase-3表达增加。**结论:**PS提取物具有抑制乳腺癌4T1细胞增殖的作用,该作用可能与诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞有关。

关键词 蒲公英;丝瓜络;乳腺癌;增殖;凋亡

目前,乳腺癌(Breast Cancer)为全球影响女性死亡第二大原因的恶性肿瘤之一^[1],其治疗手段主要为手术治疗协同放化疗药物,但此方法存在不良反应大、预后差、易耐药等弊端,严重影响了患者的生存质量和临床效果^[2-3]。近年来随着中医药事业的发展,中医治疗在乳腺癌方面逐渐显现出独特的优势和特色,已然成为乳腺癌有效的辅助疗法之一^[4]。为了提高肿瘤的疗效,临床常联合使用中药,不仅可以减轻放化疗所引起的不良反应,还可以使患者生活质量明显提高,甚至可能使癌症患者的生存时间得到延长。

乳腺癌,又称“乳岩”,属“络病”范畴,起病于半表半里之间,与经络息息相关,其中,与肝、胃二经关系最为密切,治疗上宜着重从经络入手,使得由经络所成的结块从经络而散^[5]。蒲公英、丝瓜络均为药食两用的中药。丝瓜络归肺、胃、肝经,具有祛风、通络和活血之效;蒲公英归肝、胃经,具有清热解毒,消肿散结和利尿通淋之功效。两者同用,具有通经络、解毒

散结之效,临床常用于乳腺疾病的治疗。研究表明,蒲公英瓜络汤对哺乳期乳腺疾病具有很好的临床疗效^[6];丝瓜络与蒲公英联合使用对乳腺增生等疾病疗效明显^[7];陈建萍教授也将蒲公英、丝瓜络作为乳腺癌治疗的常用中药^[8],但其作用机理尚不清晰。基于此,本文开展关于蒲公英-丝瓜络提取物对小鼠乳腺癌4T1细胞增殖和凋亡的影响的体外试验研究,旨在为乳腺癌临床用药提供参考价值 and 实验依据。

1 材料

1.1 仪器设备 多功能酶标仪(瑞士TECAN公司)、LGC-12真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)、流式细胞仪(美国BD公司)、荧光倒置显微镜(德国Leica公司)、超高灵敏度化学发光成像系统(美国伯乐生命科学有限公司)、小型垂直电泳槽(美国伯乐生命科学有限公司)等。

1.2 药物 丝瓜络(批号为B20121904-01,产地为湖北),购自河北楚风中药饮片有限公司;蒲公英(批号为210901,产地为安徽亳州),购自北京本草方源(亳州)药业科技有限公司。经福建中医药大学黄泽豪教授鉴定,分别为葫芦科植物正品丝瓜络和菊科植物正品蒲公英,且符合《中国药典》标准。

1.3 试剂 胎牛血清(批号:F8687)购自美国 sigma

※基金项目 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(No. 国中医药人教函[2022]226号)

▲通信作者 吴水生,男,教授。主要从事中药药理与临床应用。E-mail: wushuishengwss@163.com.

• 作者单位 福建中医药大学药学院(福建 福州 350122)

公司;PBS磷酸盐缓冲液(批号:ISEQ00010)购自美国Hyclone公司;RMPI 1640培养基(批号:C11875500 BT)、0.25% EDTA 胰蛋白酶(批号:25200-056)均购自美国Gibco公司;胰蛋白酶(不含EDTA,批号:17H05A65)购自武汉博士德生物工程有限公司;青霉素/链霉素双抗溶液(100×,批号:C100C5)购自APExBIO;CCK-8试剂盒(批号:K1018)购自APExBIO;细胞周期与凋亡检测试剂盒(批号:C1052)、Hoechst 33258染色液(批号:C1018)均购自碧云天生物技术公司;Annexin FITC/PI凋亡检测试剂盒(批号:MA0220)购自大连美仑生物技术有限公司。 β -actin抗体(货号:HRP-60008)、Bax抗体(货号:50599-1-1g)、Bcl-2抗体(货号:12789-1-AP)、CDK2(货号:10122-1-AP)、Cyclin A2(货号:66391-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;Cleaved caspase-3抗体(货号:9661S)购自美国CST有限公司。

1.4 细胞 小鼠乳腺癌4T1细胞(下文简称“4T1细胞”)购自武汉普诺赛生物科技有限公司,货号:CL-0007。

2 实验方法

2.1 药物的制备

2.1.1 蒲公英-丝瓜络提取物的制备 称取100 g蒲公英与100 g丝瓜络中药饮片,浸泡30 min后,加入20倍蒸馏水煎煮30 min,过滤,重复两次,合并滤液,蒸发浓缩,冻干成粉末,取出称重,得率约为3.44%,放置于-20℃冰箱备用。

2.1.2 母液的配置 称取蒲公英-丝瓜络提取物(以下简称“PS提取物”)冻干粉适量,用RMPI 1640完全培养基溶液配置成浓度为192 μ g/mL的母液,放置于-20℃冰箱备用。

2.2 细胞的培养 4T1细胞在含有10%胎牛血清、1%青-链霉素的RPMI 1640完全培养基中,在37℃、5% CO₂培养条件下培养。

2.3 CCK8检测PS提取物对4T1细胞抑制率的影响 取对数生长期的4T1细胞,每孔100 μ L(含5000个细胞),铺板至96孔板,并设置空白对照组(只含细胞的培养液),等到细胞贴壁。分别用0、12、24、48、96、192 μ g/mL浓度的PS提取物处理24 h、48 h和72 h后,将CCK8工作液10 μ L加至每个孔,在37℃下进行避光孵育2 h,用酶标仪测定450 nm下的吸收(A_{450nm}),并计算出不同浓度下的抑制率。细胞抑制率(%)=(空白组-给药组)/(空白组-对照组)×100%。

2.4 细胞集落形成实验观察PS提取物对4T1细胞

增殖的影响 4T1细胞以1×10⁵个/mL,每孔2 mL,铺板至6孔板,等到细胞贴壁,分别用0、50、100、200 μ g/mL浓度的PS提取物处理48 h(下同)。撤药处理后培养7 d,之后在室温下添加4%多聚甲醛固定30 min,结晶紫进行染色15 min,肉眼观察4T1细胞集落形成的状况,并用Image J软件对克隆团进行计数。相对克隆数(%)=(给药组集落形成率/空白对照组集落形成率)×100%。

2.5 流式细胞仪检测PS提取物对4T1细胞周期的影响 4T1细胞以1×10⁵个/mL,每孔2 mL,铺板至6孔板,等到细胞贴壁,给药干预48 h。用无EDTA的胰蛋白酶消化处理细胞后,用1.5 mL的离心管收集消化下来的细胞,1000 r/min离心3 min,用预先冷却的PBS洗涤细胞3次,保留沉淀,加入1 mL的75%乙醇,混匀后于4℃冰箱静置过夜。第二日,用预先冷却的PBS离心洗去75%乙醇,加入适量PI溶液染色,在室温下进行避光孵育30 min。最后上机检测。

2.6 Hoechst 33258染色检测PS提取物对4T1细胞凋亡形态学的影响 4T1细胞以1×10⁵个/mL,每孔2 mL,铺板至6孔板,等到细胞贴壁,给予药物干预48 h。PBS洗涤3次,在室温下添加浓度为4%的多聚甲醛100 μ L,在室温下固定10 min, PBS轻轻洗涤后,用荧光倒置显微镜观察和拍摄。

2.7 Annexin V-FITC/PI染色检测PS提取物对4T1细胞凋亡的影响 4T1细胞以1×10⁵个/mL,每孔2 mL,铺板至6孔板,等到细胞贴壁,给予药物干预48 h。用无EDTA的胰蛋白酶消化处理细胞后,将消化下来的细胞收集到1.5 mL的离心管,1000 r/min离心3 min,用预先冷却的PBS洗涤3次,保留沉淀,然后添加1×Binding buffer缓冲剂,并将其混合均匀,然后添加5 μ L的AnnexinV-FITC和5 μ L的PI染色,在室温下进行避光孵育15 min。最后上机检测。

2.8 Western blot方法检测PS提取物对4T1细胞周期与凋亡相关蛋白表达的影响 4T1细胞以1×10⁵个/mL,每孔2 mL,铺板至6孔板,等到细胞贴壁,药物干预48 h。加入RAPI裂解液与PMSF溶液(二者比例为1:100),提取出4T1细胞中的蛋白质,然后将其收集并离心分离出上清,然后加入4×的上样缓冲液一起震荡混合,置于100℃下10 min,使其中的蛋白变性。PAGE-SDS凝胶电泳后,再将凝胶上相应蛋白指标剪切,转移到硝酸纤维素膜上;使用碧云天封闭液封闭120 min,再将其置入配置好的对应指标的一抗溶剂中,在4℃下冷藏孵育一晚上;第二天,

用TBST对膜进行3次清洗,每次10 min;用二抗稀释液(1:10000)在室温条件下摇床孵育90 min,再用TBST清洗膜3遍,每遍10 min;最后加入ECL化学发光显影剂,在化学发光成像系统中进行蛋白条带的获取,并利用Image Lab软件进行目标蛋白相对表达量的计算。

2.9 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件进行处理,数据用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布则用非参数检验分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 PS提取物对4T1细胞抑制率的影响 PS提取物不同剂量组作用24 h、48 h、72 h后4T1细胞存活率都降低,且随着药物剂量增大及作用时间增长,细胞抑制率增加,具有明显的剂量依赖性及时间依赖性。见图1。

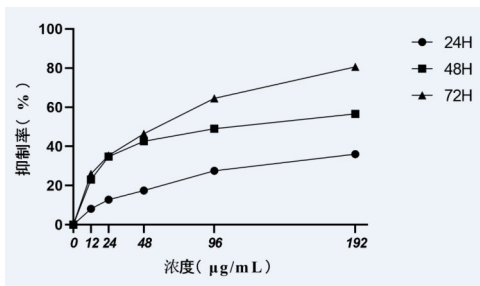
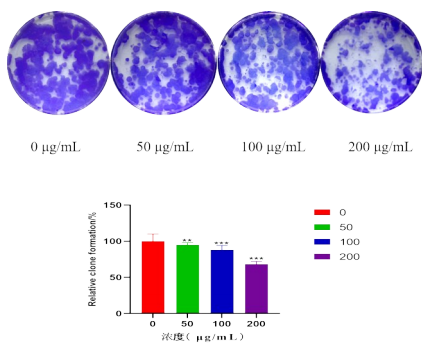


图1 PS提取物对4T1细胞抑制率的影响($n=5$)

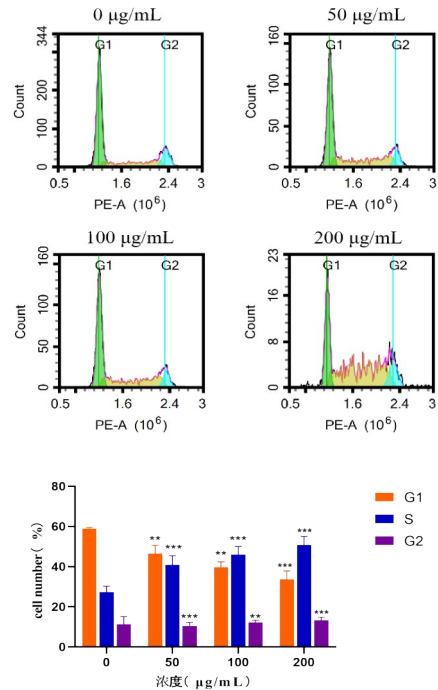
3.2 PS提取物对4T1细胞集落形成的影响 与对照组相比,不同浓度PS提取物干预后4T1细胞集落数均降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。见图2。



与空白对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图2 PS提取物对4T1细胞集落形成的影响($n=3$)

3.3 PS提取物对4T1细胞周期的影响 与空白对照组相比,不同浓度PS提取物干预细胞后,细胞周期G1期细胞数均显著减少($P < 0.01$),S期细胞数目显著增加($P < 0.01$),G2期无显著变化。见图3。

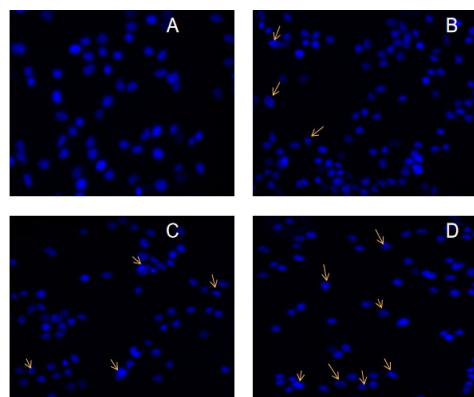


与空白对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图3 PS提取物对4T1细胞周期的影响($n=3$)

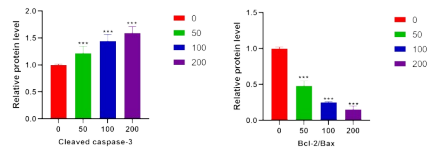
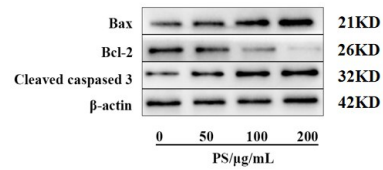
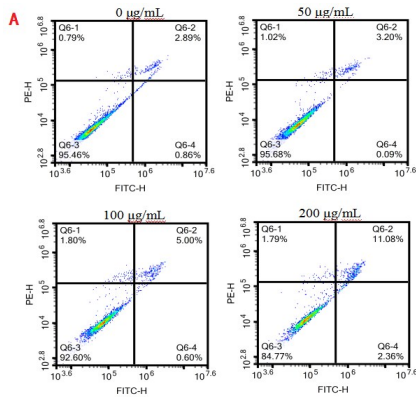
3.4 PS提取物对4T1细胞凋亡的影响 不同浓度PS提取物干预4T1细胞48 h后,Hoechst 33258染色观察到空白对照组细胞的细胞核呈椭圆形,且颜色均匀,无明显凋亡小体产生;而不同剂量组中的细胞核均观察到不同程度的固缩、破碎、形状不一和明显的凋亡小体出现,且随着给药浓度的增加,凋亡小体也逐步增加,细胞的数量也逐渐降低。见图4。

Annexin V-FITC/PI染色结果如图5A所示。与空白组相比,不同剂量干预细胞48 h后,随给药浓度的增大,细胞凋亡比率呈递增趋势,见图5B。



A. 空白对照组(0 μg/mL);B. PS提取物(50 μg/mL);C. PS提取物(100 μg/mL);D. PS提取物(200 μg/mL)

图4 PS提取物对4T1细胞凋亡的影响(200×)

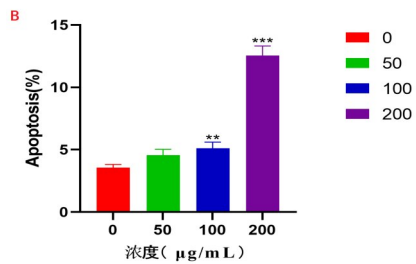


与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图7 PS提取物对4T1细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

瘀、湿毒等邪气会在经脉中积聚,造成经脉淤积^[10]。瘤毒阻络是瘤毒致病后的常态,同时瘀滞的病络又是乳腺癌瘤体获取气血等营养物质、侵袭及转移的通道,是乳腺癌疾病进展的重要条件,故治疗时要注意兼顾瘤毒与瘀滞的病络^[11]。蒲公英解郁散结,丝瓜络通病络,二者联用可增强消肿散结、通经活络之功效。

癌细胞的一个重要标志是具有无限增殖的能力,乳腺癌的发生受多种因素的影响,细胞增殖与凋亡的失控为其重要的影响因素。本研究通过CCK8检测及细胞集落形成实验发现,PS提取物对乳腺癌4T1细胞具有显著抑制作用,呈时间剂量依赖性,并可显著抑制细胞集落的形成,可知PS提取物具有抑制4T1乳腺癌细胞增殖的作用。癌症的发生与细胞周期之间的关系成为目前研究者们关注的重点,近几年来研究发现,可通过靶向调节细胞周期信号传导途径中的相关蛋白的方法进而调节细胞周期的进程。本研究采用流式细胞仪检测发现,用不同剂量的PS提取物处理4T1细胞48 h后,G1期细胞数显著减少($P < 0.01$),S期细胞数目显著增加($P < 0.01$),G2期无显著变化,提示PS提取物可能是通过阻滞细胞周期的S期,从而影响4T1细胞增殖能力。S期是负责DNA复制和合成的重要阶段。S期停滞导致DNA复制^[12]、有丝分裂^[13]、细胞生长和增殖^[14]失败。若细胞周期S期受阻,细胞周期相关蛋白及其相关依赖性激酶将会发生变化,并激活相关信号通路,引发一系列细胞联带死亡级联反应,从而使肿瘤细胞的增殖受到抑制^[15-16]。CyclinA2和CDK2对S期有重要作用,Cyclin A2能促进G1期到S期的转化,缩短细胞周期,从而促进细胞的生长^[17]。CDK2与相应的Cyclin A2结合后形成复合物才具有活性,使细胞通过G1/S周期检验点并进入S期,若表达降低,则会导致S期进程受阻。本研究发现,不同

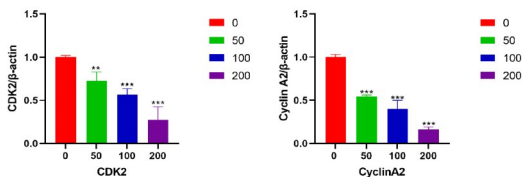
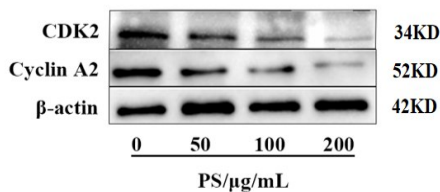


与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图5 PS提取物对4T1细胞凋亡的影响(n=3)

3.5 PS提取物对4T1细胞增殖与凋亡相关蛋白表达的影响

4T1细胞经PS提取物处理48 h后,Cyclin A2和CDK2在4T1细胞上的水平明显降低($P < 0.05$),见图6。不同剂量组Bcl-2在4T1细胞中的表达逐渐下降,Bax的表达逐渐增加,Cleaved caspase-3表达逐渐升高。见图7。



与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图6 PS提取物对4T1细胞周期相关蛋白表达的影响

4 讨论

一般来讲,经脉可以贯通气血、沟通表里、贯通营卫等^[9]。但当肿瘤形成的时候,病络也会随之生成,瘀

浓度的PS提取物干预4T1细胞后,细胞中Cyclin A2与CDK2蛋白表达均会减少,进一步提示PS提取物具有阻滞细胞周期S期进程的作用,说明PS提取物可能是通过调控周期蛋白CyclinA2、CDK2的表达而抑制乳腺癌细胞增殖。

细胞凋亡与细胞增殖有着密切的相关性,也是细胞增殖的重要影响因素之一,肿瘤可以通过诱导细胞凋亡的方式来进行治疗。细胞凋亡为多细胞生物为维持机体内稳态而形成的一种非炎症性的、主动死亡的过程,其受到多种基因和蛋白的表达和调控^[18-19],癌症的重要标志之一就是细胞凋亡的抵抗,在细胞凋亡过程中,细胞形态学会发生明显变化^[20-21]。其中细胞出泡形成的凋亡小体是凋亡形态的标志^[22]。本研究通过Hosechst 33258染色,显微镜看到染色后细胞核发生了变化,发现给药组细胞核形状不一,出现不同程度的固缩、碎裂和凋亡小体,随着给药剂量的增加,凋亡小体逐渐增加,4T1细胞的数目也有所减少,表明其可诱导细胞的凋亡,进一步用流式细胞仪检测,发现其凋亡比例明显增加。在众多调控凋亡蛋白的基因中,促凋亡蛋白(Bax)和抑制凋亡蛋白(Bcl-2)作为凋亡作用过程中的两个关键调控指标,现已成为很多抗肿瘤药物研发的热门^[23-24]。线粒体凋亡是细胞凋亡最主要的途径之一,凋亡信号产生后,开放了线粒体的通透性转换孔,下降了线粒体的跨膜电位,进而导致线粒体的膜的功能发生故障,使半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)激活,并使其表达增加,使caspase家族发生一系列的反应,最终使细胞发生凋亡^[25]。本研究在分子水平上,用Western blot法,证实PS提取物可以降低4T1细胞Bcl-2表达,增加Bax、Cleaved caspase-3的表达,且具有剂量依赖性,进一步提示PS提取物具有诱导4T1乳腺癌细胞凋亡的作用。

综上,PS提取物可能通过诱导小鼠乳腺癌4T1细胞凋亡和细胞周期S期阻滞,发挥抑制4T1细胞增殖的作用。此研究可为蒲公英-丝瓜络治疗乳腺癌提供重要的实验基础,也可为蒲公英-丝瓜络作用机制的研究及其开发利用提供新思路。

参考文献

[1]田艳涛,康文哲.全球癌症发病情况研究新进展[J].中国医药,2021,16(10):1446-1447.
 [2]王晋慧,吕邵娃,李孟,等.中药有效成分体外抗乳腺癌作用机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(17):197-203.
 [3]郝晓鹏,江泽飞.三阴性乳腺癌新辅助治疗的机遇与挑战[J].中华外科杂志,2021,59(2):101-103.
 [4]王冬,谈瑶,于海洋,等.中药多靶点抗乳腺癌的研究进展[J].中

南药学,2019,17(10):1600-1607.
 [5]叶凯,杨小娟,黄芊,等.乳腺癌之经络观[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(2):168-169.
 [6]殷飞,倪毅,刘伟,等.蒲公英瓜络汤治疗哺乳期乳腺炎临床观察[J].光明中医,2022,37(15):2694-2696.
 [7]杨花,高昂,赵兵,等.丝瓜络药理学研究概况[J].安徽农业科学,2011,39(34):20990-20991.
 [8]游杰舒,刘焕兰,陈建萍.陈建萍从肝论治乳腺癌思路与经验[J].新中医,2018,50(9):250-252.
 [9]王凝.《黄帝内经》络脉理论研究概况[J].河西学院学报,2020,36(2):59-63.
 [10]李平.对肿瘤病因、致病特点的再认识[J].中国中西医结合杂志,2018,38(2):160-162.
 [11]季圆圆,李平.李平教授运用疏肝理气解毒通络法治疗乳腺癌经验[J].中国中医药现代远程教育,2021,19(3):80-82.
 [12]LI Y, GAN X, ZHU R, et al. Anticancer activity of platinum(ii) complex with 2-benzoylpyridine by induction of DNA damage, s-phase arrest, and apoptosis[J]. Anticancer Agents Med Chem,2020,20(4):504-517.
 [13]SOZMEN M,TUNCA R,DAG ERGINSOY S.Cyclin A expression is associated with apoptosis and mitosis in murine 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcomas[J].Exp Toxicol Pathol,2009,61(1):41-49.
 [14]HE K,HE J,WANG S,et al.hSHIP induces S-phase arrest and growth inhibition in cervicalcancer HeLa cells[J].J Genet Genomics,2010,37(4):249-255.
 [15]JIN X, TANG S, CHEN Q, et al. Furazolidone induced oxidative DNA damage via up-regulating ROS that caused cell cycle arrest in human hepatoma G2 cells[J]. Toxicol Lett, 2011, 201(3):205-212.
 [16]王超,刘玉,安然,等. Roscovitine对TNF-α诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及细胞周期的影响[J].中国药理学通报,2019,35(3):376-381.
 [17]陈肖,龙潇鸿,廖渝,等.石蒜碱通过下调细胞周期蛋白D1表达抑制SGC-7901胃癌细胞增殖并促进其凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2018,34(4):70-74.
 [18]SAULER M,BAZAN I S,LEE P J. Cell death in the lung:the apoptosis-necroptosis axis[J]. Annu Rev Physiol,2019,81(1):375-402.
 [19]ZAMARAEV A V,KOPEINA G S,PROKHOROVA E A, et al. Post-translational modification of caspases:the other side of apoptosis regulation[J]. Trends Cell Biol, 2017,27(5):322-339.
 [20]NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2018,36(1):489-517.
 [21]JORGENSEN I, RAYAMAJHI M, MIAO E A. Programmed cell death as a defence against infection [J]. Nat Rev Immunol,2017,17(3):151-164.
 [22]XU X,LAI Y,HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep,2019,39(1):1-17.
 [23]周瑶瑶,陈凤云,屠文骆.棕榈酸在体外通过促进凋亡作用抑制宫颈癌Hela细胞增殖的研究[J].实用肿瘤学杂志,2019,33(5):402-406.
 [24]陈彦洁,柳传毅,吕满霞,等.鱼藤素诱导肺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞的分子机制[J].中国药理学通报,2019,35(8):1109-1114.
 [25]BHAGYA K P, ASWATHY R J, RADHAKRISHNAN K, et al. Autoimmune regulator enhanced the expression of caspase-3 and did not induce massive germ cell apoptosis in GC1-Spg cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2020,54(1):40-52.

(收稿日期:2022-08-23)

(本文编辑:蒋艺芬)