

莪术油对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响

杨丽华 厦门大学医学院 厦门 361005

姜杰 福建省厦门市卫生局

摘要 目的: 观察中药提取物莪术油(zedoray turmeric oil) 对人乳腺癌(human breast cancer) 细胞系 MCF-7 的凋亡诱导作用。方法: 用不同浓度的莪术油对体外培养的 MCF-7 细胞进行干预。分别采用 MTT、细胞免疫组织化学染色、流式细胞仪检测等方法, 观察其对 MCF-7 细胞增殖的抑制和凋亡诱导作用, 并对凋亡相关 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达变化进行定性检测。结果: 经不同浓度的莪术油处理后的 MCF-7 细胞, 其生长受到明显的抑制, 细胞凋亡指数随药物浓度增加而明显增加; 莪术油作用后, 细胞中 Bax 蛋白表达明显高于对照组。结论: 一定浓度的莪术油能抑制 MCF-7 细胞增殖, 促进其凋亡; 其机制可能与调控 Bcl-2、Bax 表达有关。

关键词 乳腺癌 莪术油 MCF-7 细胞 Bcl-2 Bax

Influence of Zedoray Turmeric Oil on Expression of Bcl-2/Bax in Human Breast Cancer MCF-7 Cells YANG Li Hua, JIANG Jie. *Medical College of Xiamen University, Xiamen(361005), China*

Abstract Objective: To investigate the effects of Zedoray Turmeric Oil on inducing apoptosis of MCF-7 cells and to explore the possible mechanism of its action. **Methods:** Different concentrations of Zedoray Turmeric Oil were used in the culture system of MCF-7 cells. Proliferation and apoptosis of MCF-7 cells were observed by ways of MTT, immunocytochemistry and flow cytometry quantitative analysis. The expression of Bcl-2 and Bax protein was determined by qualitative analysis. **Results:** Proliferation of MCF-7 cells was inhibited effectively after being treated by different concentrations of Zedoray Turmeric Oil. The rate of apoptosis increased as the increase in the concentration of Zedoray Turmeric Oil. The expression of Bcl-2 was decreased in the experimental groups, while the expression of Bax protein was significantly higher than that the control group. **Conclusion:** Zedoray Turmeric Oil can effectively inhibit proliferation of and promote apoptosis of MCF-7 cells; the mechanism may be correlated to the up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2.

Key words breast cancer Zedoray Turmeric Oil MCF-7 Bcl-2 Bax

莪术是我国传统中药之一, 是姜科草本植物莪术、郁金香的根茎, 味辛、苦, 性温, 归肝、脾经, 具有行气破血、消积止痛的功效。莪术油(zedoray turmeric oil) 是莪术中提取的挥发油, 含有多种抗肿瘤有效成分。对多种实体肿瘤(如子宫内膜癌、宫颈癌、白血病、肺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌等) 有较强的抑制作用^[1], 而且具有抗血栓、抗病毒、抗菌

和增强免疫等功能^[2-4]。张瑾峰等^[5]发现, 莪术与三棱联合应用具有诱导乳腺癌细胞凋亡的作用。本研究通过一定浓度的莪术油作用乳腺癌细胞系 MCF-7 后, 观察其对 MCF-7 细胞的凋亡诱导效应, 并通过对与凋亡相关的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达变化的检测, 探讨莪术油对 MCF-7 细胞凋亡诱导的作用机制。

(上接第 740 页)

of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen [J]. *J Immunol* 2003, 170(6): 2912-2922.

[6] 田启龙. 穿刺置疣术治疗尖锐湿疣 97 例对比观察 [J]. *中国艾滋病性病* 2009, 15(1): 77.

[7] Hung CF, Monie A, Alvarez RD, et al. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6): 679-689.

[8] Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines [J]. *J Clin Invest* 2006, 116(5): 1167-1173.

收稿日期: 2010-07-22

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器 人乳腺癌 MCF-7 细胞株(厦 门 大 学 生 命 科 学 学 院 提 供)。 莪 术 油 注 射 液 (徐 州 莱 恩 药 业 有 限 公 司 , 国 药 准 字 : H20067076) , 配 制 为 20g/L 的 无 菌 溶 液 备 用。 RPMI 1640、 二 甲 基 亚 砷 (DMSO)、 胎 牛 血 清、 胰 蛋 白 酶、 四 甲 基 偶 氮 唑 蓝 (MTT) (北 京 中 杉 金 桥 生 物 技 术 有 限 公 司)。 鼠 抗 人 Bcl-2、 Bax 单 克 隆 抗 体 及 SP 免 疫 组 化 试 剂 盒 (福 州 迈 新 生 物 技 术 开 发 有 限 公 司)。 流 式 细 胞 仪 (美 国 GENE 公 司)。 实 验 时 选 用 对 数 生 长 期 细 胞。

1.2 MTT 法 生 长 曲 线 测 定 取 对 数 生 长 期 的 MCF-7 细 胞 , 消 化 后 制 成 细 胞 悬 液 , 调 整 细 胞 浓 度 为 1×10^4 个 /ml , 接 种 于 96 孔 培 养 板 上 , 每 孔 加 200 μ l 细 胞 悬 液 , 培 养 24 小 时 后 , 加 入 不 同 浓 度 的 莪 术 油 (0.15、 0.25、 0.35、 0.50、 1.0mg/ml) , 另 设 对 照 组 (不 加 莪 术 油) 和 空 白 对 照 组 (只 加 培 养 基) , 每 组 设 7 个 复 孔 , 分 别 于 加 药 后 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8 和 9 天 时 加 MTT (5mg/ml) 20 μ l , 孵 育 4 小 时 后 , 加 入 二 甲 基 亚 砷 200 μ l , 避 光 振 荡 10min , 酶 标 仪 在 570nm 处 测 定 各 孔 吸 光 度 (OD) 值 , 取 平 均 值 , 以 时 间 为 横 坐 标 , OD 值 为 纵 坐 标 , 绘 制 细 胞 生 长 曲 线。

1.3 流 式 细 胞 仪 检 测 凋 亡 不 同 浓 度 的 莪 术 油 (0.15、 0.25、 0.35、 0.50、 1.0mg/ml) 分 别 作 用 于 贴 壁 生 长 的 MCF-7 细 胞 72 小 时 后 , 胰 酶 消 化 , 吹 打 脱 落 , 使 细 胞 分 散 良 好 , 1500r/min 离 心 5min , 弃 上 清 , 加 $1 \times$ 缓 冲 液 200 μ l。 各 管 中 分 别 加 入 AnxinV 4 μ l 和 PI 5 μ l , 用 $1 \times$ 缓 冲 液 将 终 体 积 配 成 250 μ l , 冰 浴 , 上 机 检 查。 以 不 加 莪 术 油 培 养 72 小 时 的 MCF-7 细 胞 作 为 阴 性 对 照。

1.4 免 疫 细 胞 化 学 染 色 将 对 数 生 长 期 的 MCF-7 细 胞 6 瓶 (细 胞 数 $> 1 \times 10^5$ / 瓶) 随 机 分 为 对 照 组 和 实 验 组 , 每 组 3 瓶。 实 验 组 用 含 0.35mg/ml 莪 术 油 的 培 养 基 培 养 , 对 照 组 正 常 培 养 , 48 小 时 后 终 止 培 养。 随 机 从 对 照 组 和 实 验 组 各 取 1 瓶 细 胞 , 用 0.2% 胰 酶 消 化 后 收 集 细 胞 , 做 细 胞 涂 片。 4 $^{\circ}$ C 丙 酮 固 定 20min , 1XPBS 洗 3 次 , 每 次 5min。 自 然 干 燥 后 , 按 PV-9000 试 剂 盒 要 求 行 Bcl-2 和 Bax 免 疫 细 胞 化 学 染 色 , 并 分 别 设 立 阴 性 与 阳 性 对 照。 结 果 判 定 : Bcl-2 和 Bax 阳 性 细 胞 为 胞 质 染 为 黄 色 或 棕 黄 色 , 阴 性 细 胞 均 不 着 色。 通 过 染 色 强 弱 , 观 察 两 种 蛋 白 表 达 改 变 的 趋 势。

1.5 统 计 学 方 法 应 用 SPSS18.0 统 计 软 件 , 计 量 资 料 用 ($\bar{x} \pm s$) 表 示 , t 检 验 , $P < 0.05$ 为 显 著 性 检 验 水 准。

2 结 果

2.1 莪 术 油 对 MCF-7 细 胞 形 态 变 化 的 影 响 实 验 组 细 胞 在 加 药 后 24 小 时 , 倒 置 显 微 镜 下 观 察 , 可 见 大 部 分 细 胞 由 梭 形 变 为 不 规 则 形 , 胞 体 增 大 , 胞 内 可 见 大 小 不 等 的 空 泡 样 结 构 , 细 胞 核 边 移 , 但 大 部 分 细 胞 膜 尚 完 整 , 尤 以 1.0mg/ml 组 细 胞 形 态 变 化 最 明 显 , 并 且 细 胞 数 量 与 对 照 组 比 较 明 显 减 少 , 同 时 有 许 多 细 胞 漂 浮 , 不 贴 壁。

2.2 莪 术 油 对 MCF-7 细 胞 生 长 的 影 响 根 据 酶 标 仪 所 测 的 不 同 时 间 及 不 同 浓 度 莪 术 油 作 用 后 的 OD 值 绘 制 MCF-7 细 胞 生 长 曲 线。 从 该 生 长 曲 线 可 见 , MCF-7 细 胞 经 5 种 不 同 浓 度 的 莪 术 油 处 理 后 , 细 胞 生 长 受 到 不 同 程 度 的 抑 制 , 以 1.0mg/ml 组 的 抑 制 作 用 最 强 , 见 图 1。

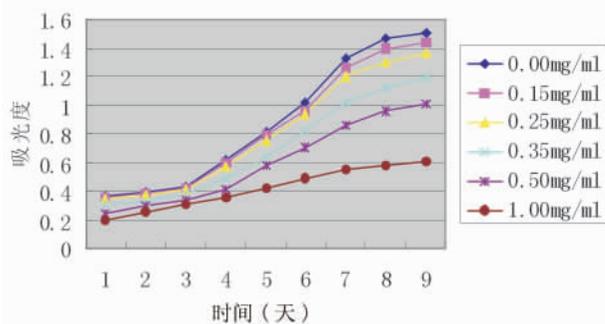


图 1 MCF-7 细 胞 生 长 曲 线

2.3 对 细 胞 凋 亡 率 的 影 响 不 同 浓 度 (0.15、 0.25、 0.35、 0.50、 1.0mg/ml) 的 莪 术 油 作 用 于 MCF-7 细 胞 72 小 时 后 , 上 机 检 测 , 流 式 细 胞 仪 作 出 细 胞 DNA 含 量 分 布 图 , 计 算 机 软 件 自 动 拟 合 出 凋 亡 指 数 (%)。 对 照 组 凋 亡 指 数 为 4.53% , 实 验 组 分 别 为 10.17%、 17.10%、 23.15%、 26.43% 和 30.12%。 随 药 物 浓 度 增 加 , 细 胞 凋 亡 指 数 呈 上 升 趋 势。

2.4 细 胞 免 疫 组 织 化 学 染 色 结 果 Bcl-2 染 色 显 示 , 对 照 组 细 胞 浆 浓 染 呈 棕 黄 色 , 实 验 组 细 胞 浆 着 色 明 显 减 弱 , 呈 淡 黄 色 , 个 别 细 胞 甚 至 呈 阴 性。 Bax 染 色 显 示 , 对 照 组 细 胞 浆 染 色 呈 淡 黄 色 , 实 验 组 细 胞 浆 着 色 则 明 显 增 强 , 尤 以 核 周 明 显 , 黄 染 加 重。

3 讨 论

文 献 报 道^[1] , 一 定 浓 度 的 莪 术 油 在 体 外 可 诱 导 人 子 宫 内 膜 癌 RL-95-2 细 胞 , 肝 癌 SMMC-7721 细 胞、 胃 癌 NKM45 细 胞、 肺 癌 SPC-A4 细 胞 和 肝 癌 细 胞 HepG2 细 胞 凋 亡 , 且 其 诱 导 凋 亡 的 作 用 随 莪 术 油 的 浓 度 增 加 而 增 加。 蒲 磊 等^[6] 研 究 表 明 , 莪 术 油 可 抑 制 乳 腺 癌 MCF-7 细 胞 增 殖 , 促 进 细 胞 凋 亡 , 其 机 制 可 能 与 上 调 Fas 蛋 白、 下 调 FasL 蛋 白 表 达 有 关。

本 研 究 用 0.15 ~ 1.0mg/L 的 莪 术 油 作 用 乳 腺

癌细胞株(MCF-7) 1~8 天后,细胞生长受到不同程度的抑制。从 MTT 的实验结果看,0.15mg/ml 浓度的莪术油对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用不明显,而 0.35mg/ml 及更高浓度的莪术油则可使细胞增殖受到明显抑制,且随着作用浓度的增高和作用时间的延长,细胞增殖受抑制更为明显,提示莪术油对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用,而且呈时间和浓度依赖性。用不同浓度的莪术油分别作用 MCF-7 细胞 72 小时后,细胞凋亡率检测发现,在药物浓度为 0.35mg/L,即有明显的细胞凋亡发生,随药物浓度的增加,细胞凋亡率呈上升趋势;并且在药物浓度为 0.35mg/L 时,凋亡率已达 23.15%。由此提示,莪术油在体外具有抑制 MCF-7 细胞生长增殖、诱导凋亡的作用,且这一作用随药物作用的浓度增加而增加。根据生长曲线计算,莪术油对 MCF-7 细胞的半数有效量在 0.325mg/L 左右。研究结果显示,莪术油能下调 MCF-7 细胞的 Bcl-2 表达,同时上调 Bax 的表达,两种蛋白比例发生明显变化。结合细胞凋亡率检测结果推测,莪术油诱导 MCF-7 细胞凋亡可能与其改变凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的表达有关。

以上结果提示,莪术油在体外对 MCF-7 的生长

增殖有明显抑制作用,同时诱导该细胞凋亡,有可能是一种有希望的抗肿瘤中药。其作用机制可能与莪术油调控 MCF-7 细胞的凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 的表达有关,而不是单纯的细胞毒性坏死。

参考文献

- [1] 方刚,肖夏清. 莪术油抗肿瘤的临床应用及实验研究进展[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(01): 61-63.
- [2] 叶寿山,盛晓蓉. 莪术油软胶囊抗病毒作用研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(3): 20-22.
- [3] 徐立春,边可君. 天然药物莪术醇抑制肿瘤细胞生长及 RNA 合成影响的初步研究[J]. 肿瘤, 2005, 25(6): 570-572.
- [4] 曾建红,陈旭. 莪术醇的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(1): 168-169.
- [5] 张瑾峰,王喆,刘欣,等. 莪术、三棱和白介素-6 对人乳腺癌细胞凋亡的诱导作用[J]. 首都医科大学学报, 2006, 27(4): 492-493.
- [6] 蒲磊,赵树鹏. 莪术油对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 5(28): 376-379.

收稿日期: 2010-07-02

· 病例报道 ·

疏肝健脾汤治疗功能性消化不良 38 例

孙大伟

浙江省青田县第二中学医务室 青田 323900

关键词 功能性消化不良 疏肝健脾汤 中医药疗法

2007 年 6 月—2009 年 12 月笔者应用自拟疏肝健脾汤治疗功能性消化不良患者 38 例,疗效满意,现报道如下。

1 临床资料

68 例随机分为治疗组 38 例,男 27 例,女 11 例,年龄 21~70 岁,平均 38.5 岁;病程 4 个月~6 年,平均 5.1 年;伴焦虑、忧郁、失眠 25 例。对照组 30 例,男 21 例,女 9 例,年龄 22~73 岁,平均 37.2 岁;病程 3 个月~5 年,平均 4.6 年;伴焦虑、忧郁、失眠 22 例。两组的性别、年龄、病程等资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。68 例均有不同程度的上腹痛、上腹饱胀感、暖气、恶心、呕吐等症

状,经临床体检及肝功能、胃镜、B 超检查,排除器质性病变。68 例均符合功能性消化不良罗马 III 诊断标准。

2 治疗方法

治疗组给予疏肝健脾汤,组方:党参、茯苓、枳壳各 15g,柴胡 9g,香附 10g,川芎 6g,姜半夏、白术、白芍各 12g,甘草、陈皮各 6g。腹胀明显加厚朴 10g,木香 6g;腹痛甚加延胡索 12g;纳差加焦三仙 12g;反酸加海螵蛸 15g;脾胃虚寒加吴茱萸 5g,高良姜 15g;恶心呕吐加旋覆花(包煎) 10g,代赭石(先煎) 15g。1 天 1 剂,水煎分 2 次服。对照组给予西沙必利片 10mg,1 天 3 次,于餐前 15~30 min 口服;奥美拉唑胶囊 20mg,1 天 2 次;谷维素片 20mg,1 天 3 次;有精神神经症状者加阿普唑仑片。两组均 4 周为 1 个疗程,治疗期间,停用其他治疗功能性消化不良的中西药,同时结合饮食和精神调理等疗法,共治疗 2 个疗程。

3 治疗结果

3.1 疗效标准^[1] 治愈:症状消失,或兼异常指标基本恢复正常,且疗效较为巩固者;好转:症状消失或减轻,异常指标改善或稍有改善;未愈:症状、异常指标均未改善。(下转第 746 页)