

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)07-0658-04

白藜芦醇联合 5-FU 对人乳腺癌细胞系 MCF7 的促凋亡作用

李 燕¹ 邢克飞¹ 李福洋¹ 汪 云² 药立波¹ 刘新平¹(¹ 第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033 ; ² 西安绿康天然药物研究所 陕西 西安 710075)

Apoptosis-promoting effect of resveratrol combined with 5-FU on human breast cancer cell line MCF7

LI Yan¹, XING Ke-Fei¹, LI Fu-Yang¹, WANG Yun², YAO Li-Bo¹, LIU Xin-Ping¹¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Xi'an Greenpharma Natural Medicine Lab, Xi'an 710075, China

【Abstract】 AIM: To investigate whether 5-FU in combination with resveratrol can accelerate the apoptosis of human breast cancer cell line MCF7 *in vitro*. **METHODS:** Four breast cancer cell lines (MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 and Bcap-37) were incubated with different concentrations of resveratrol or/and 5-FU for 48 h, then cell survival rate was measured by MTT assay and cell morphological change was observed by phase contrast microscope. Apoptosis was detected by flow cytometry (Annexin V/PI staining) analysis and Hoechst33258 staining. **RESULTS:** Resveratrol could inhibit the growth of MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 and Bcap-37 to different extents. The IC₅₀ values of resveratrol in MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 and Bcap-37 cells were 65, 207, 139 and 213 μmol/L, respectively. The IC₅₀ value of 5-FU in MCF7 cells was 13 μmol/L. When 5-FU and 65 μmol/L resveratrol were combined, the IC₅₀ value of 5-FU in MCF7 cells was decreased to 9 μmol/L. Compared with the treatment with 13 μmol/L 5-FU or 65 μmol/L resveratrol alone, the percentage of Annexin V(+)PI(-) MCF7 cells increased when these 2 drugs were used in combination. The number of apoptotic MCF7 cells calculated with flow cytometry was accordant with the result got with Hoechst33258 staining. **CONCLUSION:** Resveratrol interacts synergistically with 5-FU to induce the apoptosis of MCF7 cells, which suggests that resveratrol is a secondary chemotherapeutic medicine for treating breast cancer.

收稿日期 2005-09-08; 接受日期 2005-11-15

基金项目 国家自然科学基金(30170465) 军队科研基金(01Z081)

通讯作者 刘新平. Tel (029) 84774516 Ext. 20 Email xinpingliu@fmmu.edu.cn

作者简介 李 燕. 硕士生(导师刘新平 药立波). Tel (029)

84774516 Ext. 17 Email liyann@fmmu.edu.cn

【Keywords】 resveratrol; chemotherapy; apoptosis; breast neoplasms

【摘要】目的 研究白藜芦醇联合 5-FU 促进人乳腺癌细胞 MCF7 凋亡的作用. 方法 4 种人乳腺癌细胞系(MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37)与不同浓度的白藜芦醇或/和 5-FU 共孵育 48 h, MTT 法检测细胞存活率,并用相差显微镜观察细胞形态学改变. 用流式细胞术(检测细胞凋亡相关指标 Annexin V/PI)和 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡. 结果:白藜芦醇能够不同程度地抑制 4 种人乳腺癌细胞系(MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37)的生长. 白藜芦醇对 MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37 细胞的 IC₅₀(半数抑制浓度)分别为 65, 207, 139 和 213 μmol/L. 单用 5-FU 对 MCF7 细胞的 IC₅₀为 13 μmol/L. 联合使用 5-FU 和白藜芦醇的 IC₅₀分别为 9 μmol/L 和 3 μmol/L. 与单用组相比, 65 μmol/L 白藜芦醇和 13 μmol/L 5-FU 联合使用后, MCF7 细胞 Annexin V 水平升高. Hoechst33258 荧光染色和流式细胞术分析 MCF7 细胞的结果一致. 结论:白藜芦醇与 5-FU 合用可协同促进 MCF7 细胞凋亡,提示白藜芦醇可能用作治疗乳腺癌的二线化疗药.

【关键词】 白藜芦醇; 化疗; 细胞凋亡; 乳腺癌

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

0 引言

中药植物的提取物与化疗药物的合理配伍,可大大提高肿瘤治疗的疗效. 白藜芦醇(resveratrol)化学名称为芪三酚,化学结构为 3,5,4'-三羟基二苯乙烯(3,5,4'-trihydroxystilbene),分子式 C₁₄H₁₂O₃, M_r 128.25,属非黄酮类多酚化合物,白藜芦醇可拮抗消化、血液、呼吸、生殖等多个系统来源的多种肿瘤细胞的增殖^[1-4]对肿瘤细胞的发生、促进、发展 3 个阶段均有抑制作用^[1]. 本研究将白藜芦醇与临床常用化疗药 5-FU 联合应用,观察其对 5-FU 在促进细胞凋亡中的增效作用.

1 材料和方法

1.1 材料 四种人乳腺癌细胞系 MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37 均为本室保存细胞;白藜芦醇(纯度大于 99%,溶于 500 g/L 的丙二醇)由西安绿康天然药物研究所提供,用时用含 10% 小牛血清

的 RPMI 1640 细胞培养液稀释至工作浓度, 5-FU 购于第四军医大学附属一院西药房, RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品, 小牛血清购自杭州四季青生物材料工程有限公司, 四氮唑溴盐 (MTT), Annexin V/PI 双标试剂盒和 Hoechst33258 购自美国 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯。BX-60 荧光显微镜和倒置相差显微镜及照像系统为日本 Olympus 产品, 遥控酶标分析仪为奥地利 TECAN 公司产品, FACS Calibur 流式细胞仪为美国 B-D 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定细胞存活率

参考 Yamaue 等^[5]的方法采用对数生长期的细胞, 倾出其培养液, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加适量的胰蛋白酶消化并细胞计数后, 将细胞按 $4 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ /孔 (不同种类细胞接种密度不同) 分组加入 96 孔培养板, 每孔 200 μ L。按细胞系、化疗药品种及药物浓度分组, 白藜芦醇实验组分为 6 个浓度组, 2, 20, 40, 80, 200 和 400 μ mol/L; 5-FU 实验组参照其在人体的血浆高峰浓度, 选择其最高峰值浓度的 0.1 ~ 20 倍范围, 分为 6 组, 8, 80, 160, 320, 800 和 1600 μ mol/L。联合用药实验组分为 6 组, 分别是 8, 80, 160, 320, 800 和 1600 μ mol/L 5-FU 与 65 μ mol/L 白藜芦醇联用。每种药物浓度接种 5 复孔, 每组设阴性对照组 (培养液中只有细胞, 无药物) 和空白对照组 (培养液中只有等量的药物, 无细胞)。细胞常规培养 24 h 后, 将培养液换成含不同浓度药物的培养液, 培养板置于 CO₂ 培养箱, 在 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 条件下继续培养 48 h, 倒置相差显微镜观察细胞生长状态并拍照。然后取出全部培养板, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ L, 再继续培养 4 h, 小心吸出培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 使沉淀充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定光密度, 计算肿瘤细胞存活率。计算公式为: 细胞存活率 = (实验组光密度 - 空白对照组光密度) / (阴性对照组光密度 - 空白对照组光密度) \times 100%。

1.2.2 流式细胞仪分析细胞凋亡

根据 Annexin V/PI 双标试剂盒说明, 用双蒸水 1:4 稀释结合缓冲液, PBS 洗涤样品细胞后, 以稀释的结合缓冲液重悬细胞, 并调整细胞浓度为 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /mL。取 195 μ L 细胞悬液, 加入 5 μ L Annexin V 混匀, 室温反应 10 min, PBS 洗细胞一次, 再以 190 μ L 稀释的结合缓冲液重悬, 加 10 μ L (20 μ g/mL) PI, 用流式细胞仪分析。每样本收集 1×10^4 个细胞荧光信号, 采用 Cellquest 软件分析结果。

1.2.3 Hoechst33258 荧光染料染色观察细胞核形态的改变

药物处理后的细胞用 PBS 洗涤并重悬, 加

入浓度为 5 μ g/mL 的 Hoechst33258 荧光染料反应 10 min, 于荧光显微镜下观察并拍摄图像。观察细胞核形态, 以细胞萎缩、核固缩、染色质凝聚和荧光强度增强等作为凋亡细胞指征。

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 8.0 统计软件进行分析。行多个独立样本两两比较的 Nemenyi 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 实验检测细胞存活率

① 白藜芦醇对 4 种乳腺癌细胞生长的抑制作用: MTT 实验检测细胞存活率并绘制细胞生存曲线, 曲线表明白藜芦醇能抑制 4 种乳腺癌细胞的生长, 测得白藜芦醇对 MCF7 细胞的 IC₅₀ (半数抑制浓度) 为 65 μ mol/L, 对 MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37 细胞的 IC₅₀ 分别为 207, 139 和 213 μ mol/L (图 1)。② 5-FU 和白藜芦醇联用对 MCF7 细胞生长的影响: MTT 实验测得 5-FU 单独作用于 MCF7 细胞的 IC₅₀ 为 13 μ mol/L, 5-FU 和 65 μ mol/L 白藜芦醇联合使用作用于 MCF7 的 IC₅₀ 降低到 9 μ mol/L。

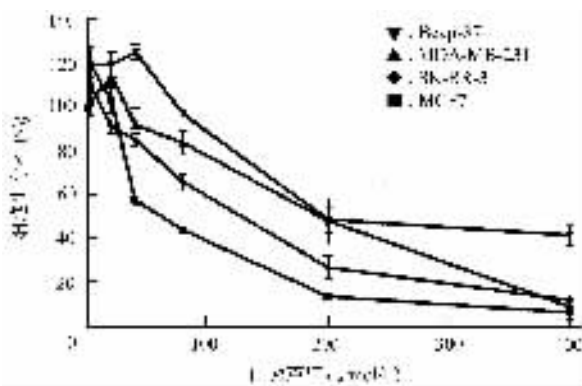


图 1 白藜芦醇对人乳腺癌细胞系 MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 和 Bcap-37 生长的抑制作用

2.2 倒置相差显微镜下观察细胞形态

随着药物浓度的增加, 与阴性对照组相比, 白藜芦醇实验组中 MCF7 细胞数量逐渐减少, 细胞形态发生明显改变。5-FU 实验组与阴性对照组相比, 在较低的药物浓度下, 细胞的数量和形态就有明显变化, 但很快进入平台期, 随药物浓度的增加, 细胞的数量和形态变化不明显。联用 5-FU 和白藜芦醇于 MCF7 细胞, 与阴性对照组相比, 48 h 后镜下可见到, 随着药物浓度的增加, 细胞数量逐渐减少, 细胞形态发生明显改变, 没有出现平台期 (图 2)。且上述细胞形态学改变与 MTT 实验结果具有相同的趋势。

2.3 Annexin V/PI 检测细胞凋亡

凋亡早期, 细胞

内膜的磷脂酰丝氨酸移位到细胞外膜, 荧光标记的 Annexin V 极易与细胞外膜的磷脂酰丝氨酸结合从而使其染色. MCF7 细胞经 $65 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇联合 $13 \mu\text{mol/L}$ 5-FU 处理 48 h, 细胞凋亡率明显高于两药分别单用 ($n=3, P<0.05$), 其中联用组细胞凋亡率为 $(81.6 \pm 4.3)\%$, 而 $65 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇、 $13 \mu\text{mol/L}$ 5-FU 和对照组分别为 $(14.1 \pm 2.8)\%$ 、 $(41.3 \pm 3.5)\%$ 、 $(0.3 \pm 0.2)\%$.

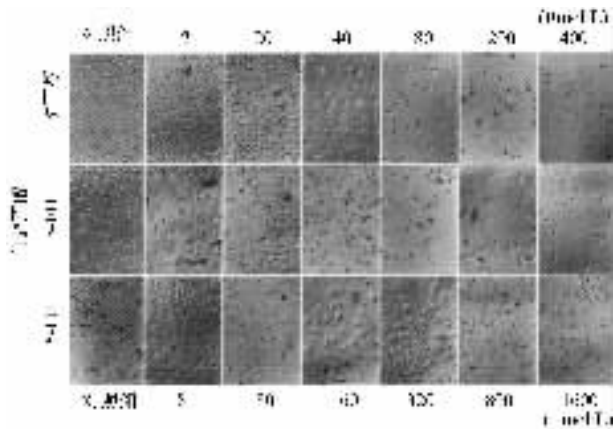


图2 单用白藜芦醇、5-FU 和联用 5-FU 加白藜芦醇 ($65 \mu\text{mol/L}$) 48 h 后 MCF7 细胞的形态学改变 $\times 200$

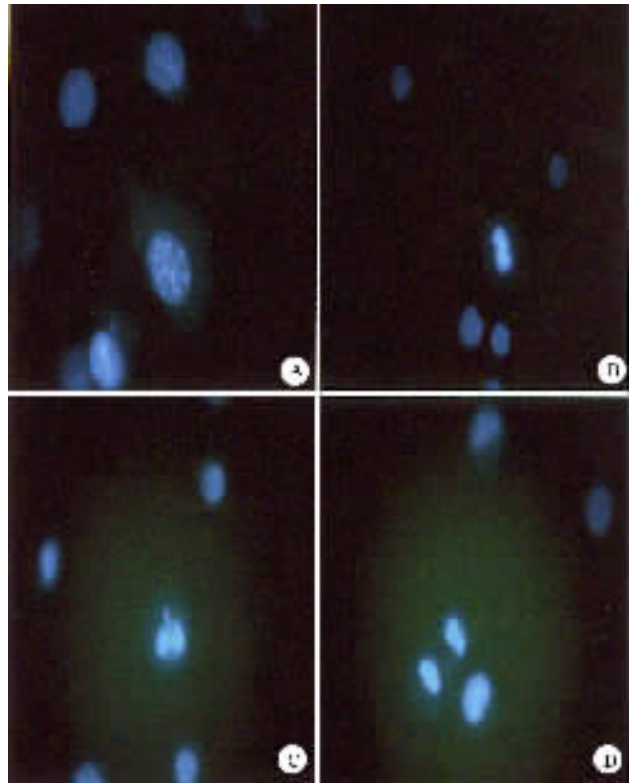
2.4 凋亡细胞的形态学 经 Hoechst33258 荧光染料染色, 荧光显微镜下, 正常细胞染色质均匀, 核形态规则 (图 3A)。 $65 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇或 $13 \mu\text{mol/L}$ 5-FU 作用 48 h 后, 凋亡细胞即可出现, 呈现细胞体积缩小, 核固缩, 染色质凝集、碎裂, 两种药物联用后, 凋亡细胞数进一步增加, 形态学特征更加典型 (图 3B~D)。

3 讨论

白藜芦醇能通过降低血液中胆固醇、抑制脂质过氧化而减少动脉粥样硬化、高血脂症的发生, 能抑制血小板聚集从而阻止血栓形成, 还有抑制自由基生成等作用^[6-7]。白藜芦醇抑制心血管疾病的广泛作用已经有不少研究。新近实验证明, 白藜芦醇能抑制乳腺上皮癌细胞的恶性生长、小鼠肝癌细胞恶变^[1], 具有抗炎作用^[8]。这些实验结果已引起广泛关注。

本实验结果表明, 白藜芦醇能在体外抑制 4 种人乳腺癌细胞系的生长, 且随着剂量的增加, 细胞生存率显著降低。我们发现不同浓度白藜芦醇对细胞生长的影响不同, $2 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇促进细胞的生长, 细胞生存率 $>100\%$; 大于 $40 \mu\text{mol/L}$ 浓度时, 细胞生存率随药物浓度的增加而降低, 这可能是“毒物兴奋效应”^[9]。相差显微镜下可见, 不同药物组

干预后, MCF7 细胞数量和形态的改变与 MTT 实验结果一致。



A 阴性对照; B: $65 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇; C: $13 \mu\text{mol/L}$ 5-FU; D: $65 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + $13 \mu\text{mol/L}$ 5-FU.

图3 单用白藜芦醇、5-FU 和联用 5-FU 加白藜芦醇诱导 MCF7 细胞凋亡的荧光染色 $\times 1000$

动物实验表明 5-FU 抑瘤率较高, 同时其毒性反应也较重, 主要表现为厌食、腹胀、精神萎靡、消瘦等症状, 而白藜芦醇单用时无此类症状, 和 5-FU 联用时症状较轻, 厌食、腹胀及消瘦不明显, 说明白藜芦醇可减少化疗药物 5-FU 对机体的毒性反应^[10]。本实验以 MCF7 细胞为主要研究对象, 联用 5-FU 和白藜芦醇后, MCF7 细胞的生存曲线较单用 5-FU 的生存曲线明显向左下方偏移, 说明白藜芦醇能明显增强化疗药物 5-FU 的抑癌效果。 $65 \mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇与 $13 \mu\text{mol/L}$ 的 5-FU 表现出明显的协同效应, 两药联合应用后, 凋亡细胞比例明显比单用任一种时升高。Hoechst33258 荧光染色的实验结果也表明白藜芦醇可以促进 5-FU 对 MCF7 细胞的促凋亡作用。因此, 白藜芦醇作为治疗乳腺癌的二线化疗药具有广阔的应用前景, 这对于临床上提高抗癌化疗药物的治疗指数、降低毒副反应及延长患者的寿命, 具有重要的意义。

【参考文献】

- [1] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(5297): 218-220.
- [2] Gautam SC, Xu YX, Dumaguin M, et al. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: A prospective agent for *ex vivo* bone marrow purging [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(6): 639-645.
- [3] Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249(1): 109-115.
- [4] 李莹, 药立波, 王立峰, 等. 虎仗提取物白藜芦醇诱导胃癌细胞 HGC27 凋亡 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(19): 1797-1799.
- [5] Yamaue H, Tanimura H, Nakamori M, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay [J]. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39(4): 416-422.

- [6] Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects [J]. *Clin Chim Acta*, 1996, 246(1-2): 163-182.
- [7] Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins [J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53(9): 1347-1355.
- [8] 李怡棠, 钟森, 邓永江, 等. IV型变态反应中白细胞介素6的表达及白藜芦醇的抑制作用 [J]. *药学报*, 1999, 34(3): 189-191.
- [9] Calabrese EJ. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences [J]. *Environ Pollut*, 2005, 138(3): 379-411.
- [10] 刘红山, 潘承恩, 齐咏, 等. 白藜芦醇合用5-FU对小鼠移植肝癌 H22 生长的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(1): 32-35.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)07-0661-01

超声检查在女性体检中的应用价值

黄枢, 闫建平

(解放军第174医院特诊科, 福建 厦门 361003)

【关键词】超声检查, 女性, 健康体检

【中图分类号】R714.5 【文献标识码】B

1 临床资料 2004年以来我院进行女性体检3280例, 年龄22~68(平均34.6)岁。检查者膀胱充盈, 取仰卧位, 暴露检查部位。采用西门子 Adara-LC型超声诊断仪, GE-LOGIR400B/W电子凸阵探头, 频率均为3.5 MHz。体检结果正常人数2121例, 占64.7%; 异常人数1159例, 占35.3%。结果说明, 女性以宫颈囊肿、子宫肌瘤、盆腔积液为高发病种。主要疾病与年龄无明显差异, 以子宫肌瘤的发病平均年龄最高(表1)。

2 讨论 3280例女性体检中发现各种妇科疾病, 妇科常见病患病率高, 定期体检可早期发现各种生殖系统疾病并得到早期治疗。从体检结果看妇科患病最高的是宫颈囊肿占19.1%, 平均年龄39.1岁, 其主要原因与宫颈炎症有关, 文献报道^[1]宫颈炎症可以产生宫颈囊肿。子宫肌瘤占本组8.1%, 位居第2, 是育龄期妇女多发病, 占妇科疾病的20%~35%, 子宫肌瘤是一种激素依赖性肿瘤, 青春期前少见, 绝经后肌瘤

停止生长逐渐萎缩, 甚至消失。大部分患者没有临床症状, 可定期B超体检观察, 必要时手术治疗。卵巢囊肿患病率为1.3%, 文献报道^[2]有10%的卵巢囊肿会发生卵巢囊肿蒂扭转, 约3%卵巢囊肿会产生破裂, 患者可因并发出血而产生出血性休克。所以进行定期B超检查, 可以防止不必要危险。盆腔积液是盆腔炎症一种直接征象。在排卵期和其它生理因素, 许多妇女B超体检时在子宫直肠窝见液性暗区前后径在1 cm以下, 且无症状, 应属正常, 不应轻易诊断盆腔积液, 以免误导临床医生。

表1 女性体检异常3280例结果

疾病种类	检出数(n)	患病率(%)	年龄段(岁)
宫颈囊肿	627	19.1	30~53(39.1)
子宫肌瘤	263	8.1	27~68(46.6)
卵巢囊肿	43	1.3	24~42(31.4)
子宫腺肌症	28	0.8	36~48(44.2)
内膜异位	14	0.4	29~38(33.7)
节育环下移	19	0.6	31~52(40.2)
妊娠	6	0.2	27~36(30.4)
盆腔积液	159	4.8	22~44(34.6)

【参考文献】

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1208-1210.
- [2] 徐增祥, 杨辛, 盛韵姑. 妇产科急症学[M]. 2版. 北京: 人民军医出版社, 2004: 465-466.

编辑 许昌泰

收稿日期 2006-02-17; 接受日期 2006-03-13

作者简介 黄枢, 硕士, 科主任. Tel (0592) 2535561 Email: hs@xm.gov.cn