

• 实验研究 •

青蒿琥酯对乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖功能及形态结构的影响

赵小波 幸天勇 吴凯南

【摘要】 目的 探讨青蒿琥酯(Artesunate, ART)对乳腺癌 MCF-7 细胞株的增殖、分化功能及细胞形态和结构的影响。方法 ART 作用乳腺癌 MCF-7 细胞后,采用 MTT (四唑盐)比色法检测细胞增殖功能,观察细胞形态和结构的改变,流式细胞仪分析细胞周期相分布及细胞凋亡率。统计学分析采用重复测量设计资料的方差分析。结果 ART 对乳腺癌细胞 MCF-7 有抑制作用,随浓度增加和时间延长抑制作用增强($P < 0.05$),呈浓度依赖及时间依赖,并可导致细胞形态和结构的改变,抑制 MCF-7 细胞增殖,阻滞 MCF-7 细胞于 S 期和 G2/M 期。6 $\mu\text{mol/L}$ 和 8 $\mu\text{mol/L}$ ART 诱导 MCF-7 细胞的凋亡率分别为 3.15% 和 8.43%。结论 ART 可导致 MCF-7 细胞形态的改变,抑制 MCF-7 细胞增殖和生长,阻滞 MCF-7 细胞于 S 期和 G2/M 期,并有诱导细胞凋亡的作用。

【关键词】 青蒿琥酯,乳腺肿瘤,细胞周期,凋亡

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Effect of artesunate on proliferation and morphology of MCF-7 breast cancer cell lines ZHAO Xiaobo, XING Tian-yong, WU Kai-nan. Third Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of North-Sichuan Medical Collage, Nanchong 637000, China

Corresponding author: XING Tian-yong, E-mail: X-tianyong@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of artesunate(ART) on proliferation and morphology of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** After MCF-7 cells were treated with ART, MTT-assay was performed to examine the proliferation of MCF-7 cells and observe their morphological changes, and FCM (flow cytometry) assay was used to analyze the distributions of cell cycles and cell apoptosis. Statistical analysis was done using repeated measures analysis of variance. **Results** ART had suppressive effect on MCF-cells and with increase of the concentration and time, the suppressive effect was enhanced ($P < 0.05$), showing dose- and time-dependent. ART could inhibit the proliferation of MCF-7 cells, change the morphological structure of MCF-7 cells, and arrest MCF-7 cells in the S and G2/M phases of cell cycle. ART of 6 $\mu\text{mol/L}$ and 8 $\mu\text{mol/L}$ could cause 3.15% and 8.43% apoptosis of MCF-7 cells, respectively. **Conclusions** ART has the capability of changing morphological structure, inhibiting proliferation of MCF-7 cells and arresting MCF-7 cells in S and G2/M phases in cell cycle. It also induces apoptosis of MCF-7 cells.

【Key words】 artesunate; breast neoplasms; cell cycle; apoptosis

乳腺癌是一种全身性疾病,近年,中药在提高癌症患者的生存质量和延长生存期等方面为乳腺癌治疗的发展带来了新的契机。青蒿琥酯(Artesunate,

ART)是青蒿素衍生物,是我国研制的抗疟药,体内外实验证实对肝癌细胞有诱导凋亡的作用^[1-2],对结肠癌、白血病、口腔癌等 55 种细胞株均有细胞毒作用^[3],并有抗血管生成的作用^[4]。国内少见 ART 对人乳腺癌细胞影响的系统相关报道。本实验采用雌激素受体(ER)阳性的乳腺癌细胞株 MCF-7 为研究对象,探讨 ART 对乳腺癌细胞增殖、分化的影响,为进一步研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 药物、试剂及其配置

ART(中国广西桂林第二制药厂)60 mg 与 5%碳酸氢钠 1 ml 配制成储备液,-20 °C 冰箱保存,实验用 1640 液稀释至所需浓度,碳酸氢钠的终浓度小于 0.09%。

试剂包括 RPMI-1640(购于美国 Hyclone 公司)、10%小牛血清(购于杭州四季青生物工程材料有限公司)、80 mg/L 青霉素及 120 mg/L 链霉素(购于重庆医科大学附属一院药房)、噻唑蓝(MTT)(购于 Sigma 公司)。

1.2 细胞培养与处理

MCF-7 细胞(购于中科院上海生物研究所细胞库)用含 10%小牛血清的 1640 培养基在 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 孵箱中常规培养传代。细胞长至瓶底的 80%~90%时处于对数生长期,用 0.05%胰酶、0.02%乙二胺四乙酸消化后,离心半径 15.49 cm,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,1640 培养基制成单细胞悬液备用。

1.3 MTT 比色法检测细胞增殖功能

实验分为九组:空白对照组(与试验平行不加细胞只加培养液的空白对照。其他试验步骤保持一致,最后比色以空白调零),细胞对照组(与试验平行只加细胞和培养液的对照。其他试验步骤保持一致),溶剂对照组(细胞对照组+0.09% NaHCO₃,其他试验步骤保持一致),药物组(6 个浓度组,细胞对照组+ART,ART 浓度分别为 2、4、6、8、10、20 μmol/L,其他试验步骤保持一致)。

将 5.0×10^4 /ml 浓度细胞加入 96 孔板中,200 μl/孔,培养 24 h 后,细胞贴壁,分别加入不同试验处理因素。每组设 8 个平行孔,分别于 24 h、48 h、72 h 取出培养板,吸去各孔培养液,换上 200 μl 无血清 1640 并加入 20 μl 的 MTT(5 mg/ml),轻振培养板,放回 CO₂ 孵箱中再培养 4 h 后,离心半径 15.49 cm,4000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加二甲基亚砜(DMSO) 200 μl/孔,在振荡器上振荡 5~10 min,以空白组吸光度值调零,在微量板读数仪中测出每孔中 600 nm 处的吸光度[D(600)]值,并计算出 ART 对乳腺癌细胞的抑制率,每组实验均重复 3 次。

$$\text{乳腺癌细胞存活率} = \frac{\text{抗癌药物组吸光度值}}{\text{抗癌药物组吸光度值}} \times 100\%$$

$$\text{乳腺癌细胞抑制率} = 1 - \text{乳腺癌细胞存活率}$$

1.4 形态学观察

细胞用 $2 \mu\text{mol/L}$ ART 处理 3 d, 部分细胞经苏木素伊红(HE)染色后在光学显微镜下观察并照相, 另一部分细胞用 3% 戊二醛固定, 石蜡包埋, 超薄切片, 透射电镜观察细胞超微结构变化。由于细胞的抑制作用同 ART 剂量成正比, 故选择最低剂量处理细胞。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期分布和凋亡率

由于预实验中发现 MCF-7 细胞在培养皿中培养 72 h 是生长最为旺盛, 细胞的抑制作用同 ART 剂量成正比, 所以选择 3 个低剂量组, 观察 ART 在细胞生长最为旺盛时对细胞的抑制作用。取 MCF-7 细胞以 $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ 浓度接种 20 ml 于 50 ml 培养瓶中培养 24 h, 取对照组和 2、6、8 $\mu\text{mol/L}$ 4 组, 作用 72 h, 用 0.1% 胰-0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA) 混合液消化, 离心半径 15.49 cm, 1000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 少量磷酸盐缓冲液(PBS) 洗 2 次, 转入 1.5 ml 离心管, 离心半径 15.49 cm, 2000 r/min 离心 2 min, 吸尽上清液, 加入 75% 的预冷乙醇固定细胞团块, 4°C 过夜。以不少于 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 送检流式细胞仪(FACSscan Becton Dickinson 美国)。取细胞悬液, PBS 洗 2 次, 离心半径 15.49 cm, 2000 r/min 离心 5 min, 去上清, 碘化丙啶染液 1.0 ml 染 30 min, 混合液过 300 目尼龙网除去杂质, 用 488 nm 激发波长测定样品, 分析细胞周期和凋亡率。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件包, 数据结果采用重复测量资料的方差分析法进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 比色法结果

24、48、72 h 3 个不同时间段细胞对照组与溶剂对照组的吸光度值之间无差异, 说明实验中作为溶剂的 NaHCO_3 液对 MCF-7 细胞的生长无影响。可看出 ART 对 MCF-7 细胞有抑制作用, 随 ART 作用浓度和作用时间的增加, 药物的抑制作用加强 ($P < 0.05$), 显示有剂量依赖和时间依赖(表 1)。

2.2 形态学观察结果

2.2.1 光学显微镜观察结果: 光镜下, HE 染色的 MCF-7 细胞胞核蓝色, 细胞浆红色。细胞贴壁形态为三角型居多, 分化较好, 多核细胞少见。细胞之间

表 1 MTT 法检测不同浓度 ART 作用不同时间对 MCF-7 细胞的影响

组别	24 h		48 h		72 h	
	[D(600)]值	抑制率(%)	[D(600)]值	抑制率(%)	[D(600)]值	抑制率(%)
细胞对照组	0.283±0.027	0.00	0.602±0.017	0.00	0.738±0.008	0.00
NaHCO ₃ 组	0.279±0.004	0.00	0.594±0.022	0.00	0.741±0.012	0.00
2 μmol/L	0.275±0.015	2.83	0.544±0.012	9.63	0.684±0.127	7.32
4 μmol/L	0.268±0.037	5.30	0.478±0.104	25.10	0.573±0.102 ^a	22.36
6 μmol/L	0.254±0.012	10.24	0.424±0.024 ^{ab}	29.57	0.403±0.032 ^{ab}	45.39
8 μmol/L	0.242±0.021	14.49	0.401±0.080 ^{ab}	33.39	0.352±0.021 ^{abc}	52.30
10 μmol/L	0.219±0.018 ^{ab}	22.62	0.354±0.015 ^{abc}	41.20	0.257±0.014 ^{abc}	65.18
20 μmol/L	0.212±0.011 ^{ab}	25.09	0.242±0.013 ^{abc}	59.80	0.196±0.073 ^{abc}	73.44

满足“球对称”假设($P>0.05$); a: $P<0.05$, 与细胞对照组比较; b: $P<0.05$, 与 2 μmol/L 比较; c: $P<0.05$, 与 4 μmol/L 比较

首尾相接,有形成腺腔样结构的趋势(图 1)。2 μmol/L ART 作用 3 d 后,细胞正常结构改变,细胞间排列疏松,呈分离状态,逐渐变圆,漂浮细胞增加,可见到细胞死亡典型的形态学改变:细胞皱缩、胞质浓缩、核固缩、凝聚、呈深蓝染;胞膜破裂,胞浆内容物外溢,呈现模糊的颗粒状无结构红染物质(图 2)。

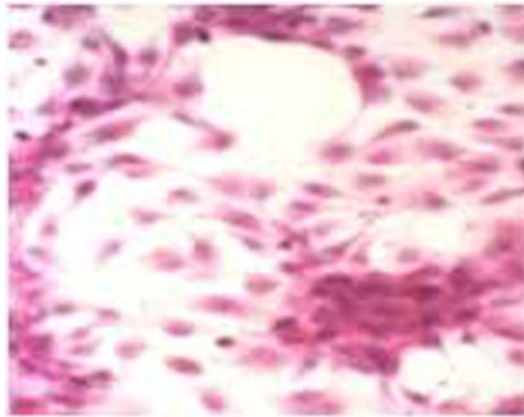


图 1 MCF-7 细胞形态(光镜, HE 染色 ×200)

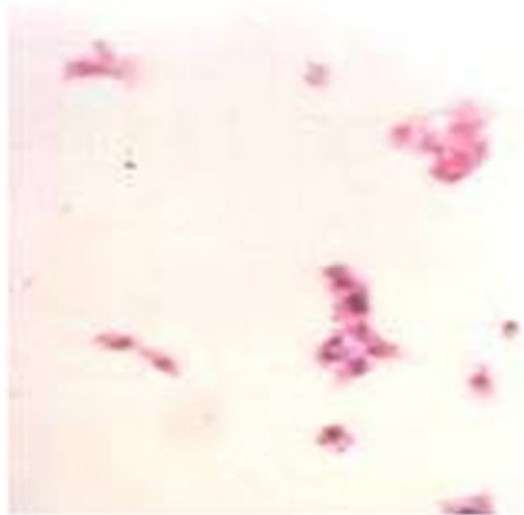


图 2 2 μmol/L 青蒿琥酯处理 MCF-7 细胞 3 d 时细胞形态的变化(光镜, HE 染色 ×200)

2.2.2 透射电镜观察细胞的超微结构:电镜下可见细胞对照组中癌细胞生长活跃,胞膜呈微绒毛状,胞质无空泡,线粒体丰富、完整、嵴清晰,内质网无扩张,胞核大,核膜完整,核浆比例失调,常染色质较多,异染色质少(图3)。经 $2\ \mu\text{mol/L}$ ART 处理的细胞大量坏死,细胞碎片多,形态不规则,核膜连续性破坏,但未发现凋亡小体(图4)。

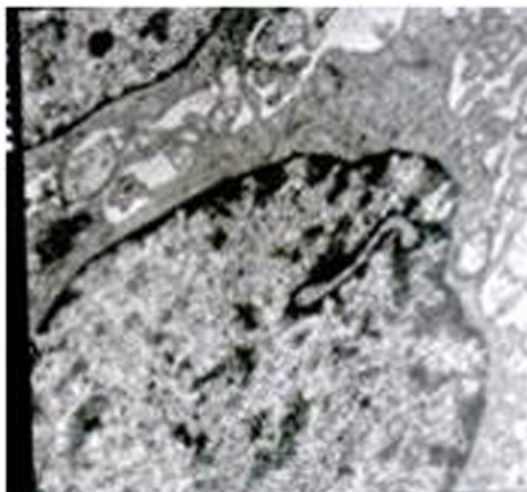


图3 MCF-7 细胞的超微结构(电镜, $\times 12\ 000$)



图4 $2\ \mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯处理 MCF-7 细胞 3 d 时细胞的超微结构变化(电镜, $\times 4000$)

2.3 流式细胞仪分析凋亡率和细胞周期分布

用流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布, MCF-7 细胞在 $6\ \mu\text{mol/L}$ 及 $8\ \mu\text{mol/L}$ ART 作用 72 h 后分别显示典型的凋亡细胞群,呈特征性的亚二倍峰(凋亡峰)。凋亡率分别为 3.15% 和 8.43%, 随浓度增加凋亡率有所增加。在流式细胞仪分析结果中显示出 ART 作用后 MCF-7 细胞的周期分布,3 个药物组 ($2, 6, 8\ \mu\text{mol/L}$) 较细胞对照组出现了 DNA 合成期(S)和间隙 2 期及有丝分裂期(G2/M)的阻滞(表 2),未出现静止期及间隙 1 期(G0/G1)的阻滞。

表2 流式细胞仪检测 ART 作用 72 h 后 MCF-7 细胞凋亡率和细胞周期分布 (%)

组别	凋亡率	G0/G1	S	G2/M
细胞对照组	0.00	66.61	19.87	13.52
2 $\mu\text{mol/L}$	0.00	51.35	16.34	32.31
6 $\mu\text{mol/L}$	3.15	39.33	36.75	23.92
8 $\mu\text{mol/L}$	8.43	39.84	42.08	18.08

G0/G1: 静止期及间隙1期; S: DNA 合成期; G2/M: 间隙2期及有丝分裂期

3 讨论

青蒿素系一种具有过氧基团的新型倍半萜内酯,是高效、速效抗疟药,ART 则是其衍生物。青蒿素控制疟疾的机制在于它能够与疟原虫体内的高浓度铁离子发生反应,产生自由基活性代谢物,损伤机体细胞膜结构和烷化生物大分子。肿瘤细胞分裂时需要大量铁离子才能复制 DNA,故肿瘤细胞的铁含量明显高于正常细胞,因此可引入 ART 有选择地杀死癌细胞^[5]。Singh 等^[6]用全铁转运蛋白与双氢青蒿素共同处理人白血病细胞株 molt-4 及淋巴瘤细胞。Woerdenbag 等^[7]及国内学者^[8]分别用青蒿素类药物处理艾氏腹水瘤细胞及肝癌细胞,发现 ART 对这些体外肿瘤细胞均有一定的抑制增殖作用。本实验观察到 ART 对 MCF-7 细胞具有直接杀伤作用。本实验显示 ART 对 ER 受体阳性乳腺癌细胞株 MCF-7 有较强的杀伤及抑制增殖的作用,可能是由于激素受体阳性的乳腺癌细胞株对 ART 敏感性更强,ART 下调 ER- α 受体水平,从而抑制 MCF-7 细胞增殖所致^[9]。表 1 显示,ART 随浓度的增加对细胞的抑制率呈现增长的趋势,随着培养时间的延长,抑制率也呈现增长的趋势,说明 ART 对细胞具有抑制作用,并呈时间-剂量依赖方式,进一步证实了青蒿琥酯的抗肿瘤作用。

Li 等^[10]采用青蒿素的衍生物作用于小鼠的白血病细胞株 P388,结果发现 P388 被阻滞在细胞周期的 G0/G1 期,并诱导其凋亡。本实验观察到 3 种浓度的 ART 作用于 MCF-7 细胞 72 h 后,药物处理组(2、6、8 $\mu\text{mol/L}$ 药物组)细胞较细胞对照组出现了 S 期和 G2/M 期的阻滞,从表 2 可以看出,阻滞于 G2/M 期的细胞主要来源于 G0/G1 期,是由于细胞出 G1 期后经 S 期、G2 期,累积于 M 期,不能进入细胞周期的下一个循环的缘故。说明 ART 抑制 MCF-7 细胞增殖的机制之一可能是阻断肿瘤细胞的生长周期。不同肿瘤细胞株被 ART 阻滞在不同细胞周期的机制还有待进一步研究。

因为 MCF-7 细胞缺乏 caspase3 蛋白,细胞凋亡进程受阻,但是 ART 6 $\mu\text{mol/L}$ 及 8 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度作用 MCF-7 细胞时显示典型的凋亡细胞群,呈特征性的亚二倍峰(凋亡峰),凋亡率分别为 3.15% 和 8.43%,表明 ART 抑制肿瘤细胞增殖的作用机制可能与促进细胞凋亡有关。但是通过透射电镜观察两种细胞的超微结构,可观察到坏死细胞的形态结构:细胞碎片多、形态不规则、核膜连续性破坏、胞质内有大量空泡、内质网肿胀,但未发现有凋亡小体的存在。这

可能与电镜切片技术有一定的关系。关于 ART 抑制 MCF-7 细胞增殖、诱导凋亡的分子机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wu LM, Huang ZY, Lei WW, et al. Electro microscopic observation on the artemisinin induced apoptosis [J]. New J Traditional Chin Med, 2002,34(3):76-77.
- [2] Chen ZT, Huang ZY, Wu LM, et al. Experimental investigation of apoptosis of hepatoma mediated by artemisinin [J]. Chin J Integrated Tradit West Med Liver Diseases, 2000, 10(5):23-25.
- [3] Nam W, Tak J, Ryu JK, et al. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells [J]. Head Neck, 2007,29(4):335-340.
- [4] 陈欢欢,周慧君. 青蒿琥酯的抗血管生成作用 [J]. 药学学报, 2004,39(1):29-33.
- [5] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer [J]. Int J Oncol, 2001,18(4):767-773.
- [6] Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells [J]. Life Sci, 2001,70(1):49-56.
- [7] Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, et al. Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells [J]. J Nat Prod, 1993,56(6):849-856.
- [8] 张星,杨小平. 青蒿琥酯钠抗人肝癌(BEL-7402)与诱导凋亡 [J]. 中草药,1998,29(7):467-469.
- [9] Sundar SN, Marconett CN, Doan VB, et al. Artemisinin selectively decreases functional levels of estrogen receptor-alpha and ablates estrogen-induced proliferation in human breast cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2008,29(12):2252-2258.
- [10] Li Y, Shan F, Wu JM, et al. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2001,11(1):5-8.

(收稿日期:2009-12-02)

(本文编辑:范林军)

赵小波,幸天勇,吴凯南,等. 青蒿琥酯对乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖功能及形态结构的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(1):58-64.