

# 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷水平的影响

俞发荣<sup>1</sup>, 张诗爽<sup>1</sup>, 张璟<sup>2</sup>, 连秀珍<sup>1</sup>, 谢明仁<sup>1</sup>, 李登楼<sup>1</sup>, 杨博<sup>1</sup>

1. 甘肃政法学院 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省疾病预防控制中心, 甘肃 兰州 730000

**摘要:** **目的** 观察十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 增殖及其环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)水平的影响。**方法** 选用甘肃地产猫儿眼(*Euphorbia kansui* L.),经提取分离制得十二碳烯酸。人乳腺癌细胞株 BT-20 传代培养后,分别给予 0.2、0.6、1.8 mg/L 3 个浓度的十二碳烯酸培养 48 h 作为实验 1、2、3 组;每孔加 5-Fu (10 mg/L,PBS 液配制)20  $\mu$ l 培养 48 h 作为 5-Fu 组;加等量 PBS 液培养 48 h 作为空白对照组。用 MTT 法检测各组细胞的增殖抑制率,用放射免疫法检测各组细胞的 cAMP、cGMP 含量,观察十二碳烯酸对人 BT-20 细胞 cAMP、cGMP 水平的影响。**结果** 经给予不同液体培养 48 h 后,与对照组(细胞增殖抑制率为 0)比较,实验 1、2、3 组和 5-Fu 组人乳腺癌细胞株 BT-20 的增殖抑制率分别为 57.15%、75.87%、88.78% 和 81.73% ( $P$  均  $< 0.01$ );cAMP 含量分别增加了 13.23%、25.96%、47.59% 和 34.39% ( $P$  均  $< 0.01$ );cGMP 含量分别降低了 12.59%、19.29%、33.49% 和 22.47% ( $P < 0.05, P < 0.01$ );cAMP/cGMP 比值分别增加了 29.32%、55.77%、121.55% 和 72.59% ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** 十二碳烯酸具有抑制人乳腺癌细胞株 BT-20 增殖和升高 cAMP/cGMP 比值的作用。

**关键词:** 甘肃地产猫儿眼; 十二碳烯酸; 人乳腺癌细胞株 BT-20; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷; 细胞毒活性

**中图分类号:** R 931 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)04-0482-03

## Effect of dodecenoic acid on cAMP and cGMP levels in human breast cancer cell line BT-20

YU Fa-rong\*, ZHANG Shi-shuang, ZHANG Jing, LIAN Xiu-zhen, XIE Ming-ren, LI Deng-lou, YANG Bo

\* Gansu Institute of Political Science and Law, Key Laboratory of Evidence of Science and

Technology Research and Application, Lanzhou, Gansu 730070, China

Corresponding author: ZHANG Jing, E-mail: tim9898@163.com

**Abstract: Objective** To study the effect of dodecenoic acid on cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in human breast cancer cell line BT-20. **Methods** The dodecenoic acid was prepared by abstracting and isolating from Gansu real estate *Euphorbia kansui* L. After being passage-cultured, BT-20 cells were inoculated into 96-well culture plate and divided into 5 groups: experiment 1, 2, 3 groups (BT-20 cells were cultured together with 0.2, 0.6, and 1.8 mg/L of dodecenoic acid for 48 hours), 5-Fu group [20  $\mu$ l solution containing 5-Fu (10 mg/L of 5-Fu prepared with PBS solution) was added into each well for culturing for 48 hours] and control group (equal amounts of PBS solution was added for culturing for 48 hours). MTT method was used to detect the cell proliferation inhibition rate. Radioimmunoassay was used to detect the contents of cAMP and cGMP. The influence of dodecenoic acid on the levels of cAMP and cGMP in BT-20 cells was observed. **Results** After culturing with different fluids for 48 hours, in experiment 1, 2, 3 groups, 5-Fu group and control group, the cell proliferation inhibition rates of BT-20 cells were 57.15%, 75.87%, 88.78%, 81.73% and 0%, respectively (all  $P < 0.01$ ); in experiment 1, 2, 3 groups and 5-Fu group, cAMP levels increased by 13.23%, 25.96%, 47.59% and 34.39%, respectively (all  $P < 0.01$ ); cGMP levels decreased by 12.59%, 19.29%, 33.49% and 22.47%, respectively ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); the ratios of cAMP to cGMP increased by 29.32%, 55.77%, 121.55% and 72.59%, respectively ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion** Dodecenoic acid has an

effect inhibiting BT-20 cell proliferation and increasing the ratio of cAMP to cGMP.

**Key words:** Gansu real estate Euphorbia kansui L; Dodecenoic acid; Human breast cancer cell line BT-20; Cyclic adenosine monophosphate; Cyclic guanosine monophosphate; Cytotoxic activity

近年来的研究发现,环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)是细胞功能的重要调节物质,与细胞代谢及细胞的增殖和分化有关。为探索甘肃猫儿眼脂类的细胞毒活性及其作用机制,选用甘肃地产猫儿眼(*Euphorbia kansui* L.),经提取分离制得十二碳烯酸,给予人乳腺癌细胞株 BT-20 进行培养,观察其对 cAMP、cGMP 水平的影响,为十二碳烯酸的开发研究和临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 药物与仪器** 十二碳烯酸由兰州大学化工学院天然植物研究所提供。5-氟尿嘧啶(5-Fu)由上海旭东海普药业生产(批号 20140409)。噻唑蓝(MTT)由上海生工生物工程技术提供。人乳腺癌细胞株 BT-20 由兰州军区总医院药局实验室惠赠。

**1.2 细胞培养** 将复苏的人乳腺癌细胞株 BT-20 置于内含 10% 的胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、 $1 \times 10^5$  U/L 链霉素的 RPMI1640 培养液,5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 饱和湿度条件中传代培养。

**1.3 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 增殖的影响** 取人乳腺癌细胞株 BT-20 浓度为  $2 \times 10^7$  个/L, 接种于 96 孔培养板, 每孔 180  $\mu$ l。设 3 个浓度(0.2、0.6、1.8 mg/L, PBS 液配制)的十二碳烯酸液, 每孔加 20  $\mu$ l 为实验 1、2、3 组; 每孔加 5-Fu (5-Fu 10 mg/L, PBS 液配制) 20  $\mu$ l 为 5-Fu 组; 加等量 PBS 液为对照组。各组设 4 个重复孔。培养 48 h, 加 MTT (5 g/L, PBS 液配制) 每孔 10  $\mu$ l, 孵育 4 h, 每孔加 DMSO 100  $\mu$ l, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测其 OD 值, 计算细胞增殖抑制率。

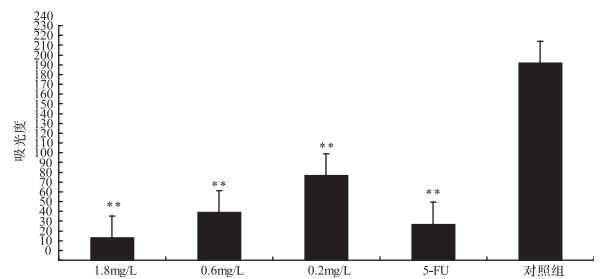
**1.4 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 cAMP、cGMP 水平的影响** 取 10 ml 培养瓶 5 个, 每瓶加入 RPMI1640 培养液 3 ml, 加入 BT-20 细胞液 1 ml (细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个/L), 实验 1、2、3 组和 5-Fu 组分别加入 0.2、0.6、1.8 mg/L 十二碳烯酸和 10 mg/L 5-Fu 各 0.5 ml; 空白对照组加等量的 PBS, 培养 48 h 后, 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 用放射免疫法检测 cAMP、cGMP 的含量。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计数资料采用百分率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 并绘制直条图。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

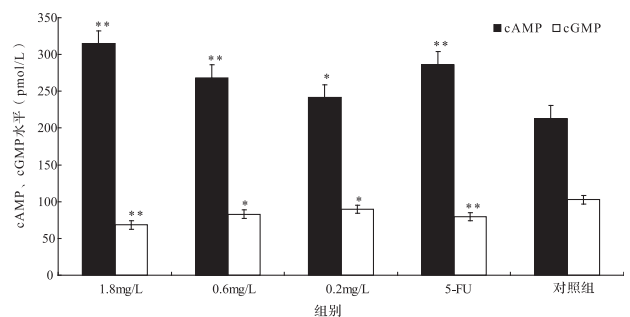
**2.1 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 增殖的抑制作用** 分别对人乳腺癌细胞株 BT-20 给予十二碳烯酸(0.2、0.6、1.8 mg/L)、5-Fu(10 mg/L)、PBS 培养 48 h, 用 MTT 法测定结果显示, 实验 1、2、3 组和 5-Fu 组人乳腺癌细胞株 BT-20 的增殖抑制率分别为 57.15%、75.87%、88.78% 和 81.73%, 与对照组(细胞增殖抑制率为 0)比较, 差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。见图 1。

**2.2 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 cAMP、cGMP 水平的影响** 分别加入十二碳烯酸 0.2、0.6、1.8 mg/L、5-Fu、PBS 培养 48 h 后测定, 与对照组比较, 实验 1、2、3 组、5-Fu 组细胞 cAMP 含量分别增加了 13.23%、25.96%、47.59% 和 34.39% ( $P$  均  $< 0.01$ ); cGMP 含量分别降低了 12.59%、19.29%、33.49% 和 22.47% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), cAMP/cGMP 比值分别增加了 29.32%、55.77%、121.55% 和 72.59% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2。



注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 的增殖抑制作用



注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 单核苷酸水平的影响

## 3 讨论

有研究报道,不饱和脂肪酸对肿瘤的发生、生长和转移存在潜在的抑制作用<sup>[1]</sup>,对人肾癌细胞具有

明显的抑制作用<sup>[2]</sup>,能抑制肺腺癌干细胞荷瘤裸鼠原发肿瘤和转移灶的生长<sup>[3]</sup>,诱导细胞分化<sup>[4]</sup>,通过改变磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路<sup>[5]</sup>,抑制细胞生长、增殖<sup>[6-7]</sup>,诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>。cAMP 作为信号转导系统的成分,具有抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>、诱导分化作用<sup>[10]</sup>。因此,凡能使细胞内 cAMP 含量升高的因素均能降低细胞的生长速度,抑制细胞的增殖,促进细胞的分化。本实验结果显示,给予人乳腺癌细胞株 BT-20 不同浓度十二碳烯酸培养 48 h,细胞中 cAMP 含量显著升高,cGMP 明显降低,cAMP/cGMP 比值增加,细胞增殖抑制率升高,与对照组比,差异有统计学意义。提示,十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 具有显著毒性作用,其机制可能与 cAMP 升高、cGMP 降低,cAMP/cGMP 比值升高有关。

#### 参考文献

- [1] 李世伟,杨守梅,李苏宜.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对改善肿瘤病人临床结局的研究进展[J]. 肠外与肠内营养,2014,21(5):313-316.
- [2] 俞发荣,连秀珍,张红梅,等. 十八烯酸对人 A498 细胞毒性作用

的实验研究[J]. 中国临床研究,2014,27(4):398-400.

- [3] 胡振东,尹荣,许林,等. 鱼油组分共轭亚油酸抑制肺腺癌干细胞成瘤的体内研究[J]. 肠外与肠内营养,2014,21(5):301-304,308.
- [4] 耿丽晶,曲兴源,孙竹萍,等. 海洋多不饱和脂肪酸 DHA 抑制肿瘤机制的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(22):385.
- [5] 曾田,陆晓媛. 多不饱和脂肪酸对恶性肿瘤作用机制的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(18):3318-3320.
- [6] 汪成芬,崔玉兰,马鑫,等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对卵巢癌细胞生长作用的实验研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(4):20.
- [7] 王曙逢,赵志浩,刘竹君,等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对人胃腺癌细胞系 AGS 的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):190-194.
- [8] 方仕,龙健婷,张冰,等. 结肠癌干细胞样细胞的体外培养、鉴定及 n-3 多不饱和脂肪酸对结肠癌干细胞样细胞的抗增殖作用[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(12):2135-2141.
- [9] 叶华,吴琼,郭蒙,等. 半边旗活性成分 5F 对 C26 结肠癌细胞 cAMP 水平的影响[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(11):2150-2152.
- [10] 胡晨旭,张晶蓉,黄丽华,等. 环磷酸腺苷在肿瘤临床治疗中的应用研究进展[J]. 天津药学,2013,25(6):49-52.

收稿日期:2015-11-29 修回日期:2015-12-20 编辑:王国品

(上接第 481 页)

OPN 和 HMGB1 是对异位内膜发挥较大黏附及侵袭促进作用的指标<sup>[12]</sup>,临床对其研究也可见,但是对其细致的研究不足。本实验就 EM 大鼠的血清变化进行分析,发现其较无 EM 大鼠表现出明显升高状态。因此,推测其临床检测价值及意义均较高。

本实验采用更为简单且有效的逆流法建立 EM 模型,实验结果表明模型组异位内膜增生,产生局部粘连,提示造模成功,实验组(载药输卵管节育器合化瘀止痛散)和对照组 1(载药输卵管节育器组)、对照组 2(化瘀止痛散组)均不同程度抑制异位内膜的增生,使其萎缩、凋亡,提示载药输卵管节育器和化瘀止痛散均对大鼠 EM 有明显的改善作用,而两种方法合用效果明显好于任何单一方法。

#### 参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,1996:345.
- [2] Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis[J]. N Engl J Med,1993,328(24):1759-1769.
- [3] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:325.
- [4] 王哲,路芳,陈佃红,等. 可逆性输卵管节育器干预大鼠子宫内异位症的实验研究[J]. 国际妇产科学杂志,2015,42(1):54.

- [5] 金仙玉,文晓燕,张海珍. 子宫内异位症动物模型建立及应用的研究[J]. 大连医科大学学报,2007,29(5):506-508,514.
- [6] Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression[J]. Br J Cancer,2004,90(10):1877-1881.
- [7] Kim JH, Skates SJ, Uede T, et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer[J]. JAMA,2002,287(13):1671.
- [8] 朱耀魁,屈洋,夏明翰,等. 骨桥蛋白在子宫颈癌及子宫内膜癌组织中的表达[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(12):2414-2417.
- [9] 朱耀魁,夏明翰,王晓玉,等. 骨桥蛋白在子宫内异位症患者异位和在位内膜中的表达[J]. 中华妇产科杂志,2006,41(5):343-344.
- [10] Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia,2001,6(4):419-429.
- [11] Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma[J]. Cancer,2003,98(1):119-127.
- [12] Braza-Boils A, Mari-Alexandre J, Gilabert J, et al. Micro RNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors[J]. Hum Reprod,2014,29(5):978-988.

收稿日期:2015-11-10 修回日期:2015-12-23 编辑:王娜娜