

青藤碱对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及 COX-2 和 VEGF 表达的影响

郑建¹, 班丽英², 洪成雨¹, 李菲¹, 高红¹

1. 辽宁省肿瘤医院内三科, 辽宁 沈阳 110042;

2. 大连医科大学附属第一医院肿瘤科, 辽宁 大连 116023

摘要: **目的** 探讨青藤碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞系增殖的抑制作用及其对环氧合酶-2 (COX-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。**方法** 以四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法观察不同浓度青藤碱 (0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响; 以实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 分析青藤碱 (0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 COX-2 和 VEGF mRNA 表达的影响; 以酶联免疫 (ELISA) 方法分析青藤碱 (0.5、1.0、2.5 mmol/L) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞上清 VEGF 含量的影响。**结果** (1) 将对照组定义为 100%, 青藤碱浓度在 0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L 时, 出现剂量依赖性的 MCF-7 细胞增殖率降低 (78%、68%、53%、35%、17%, P 均 < 0.05)。 (2) 将对照组定义为 1, 0.25、1.0、2.5 mmol/L 青藤碱组使 MCF-7 细胞 COX-2 mRNA 相对表达值依次递降至 0.75 ± 0.12 、 0.64 ± 0.15 、 0.35 ± 0.14 ; VEGF mRNA 相对表达值依次递降为 0.88 ± 0.08 、 0.67 ± 0.13 、 0.46 ± 0.11 , 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。 (3) MCF-7 细胞上清 VEGF 含量按对照组、青藤碱 0.25、1.0、2.5 mmol/L 组之序 [(90.3 ± 8.2) 、 (76.6 ± 9.7) 、 (55.7 ± 7.2) 、 (31.2 ± 5.2) pg/ml] 依次降低 ($P < 0.05$)。**结论** 青藤碱能够抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 其作用机制可能是通过抑制 COX-2 表达, 从而影响 VEGF 的表达和释放。

关键词: 青藤碱; MCF-7 细胞; 环氧合酶-2; 血管内皮生长因子; 乳腺癌

中图分类号: R 737.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)01-0042-03

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 且其发病率和病死率均呈现上升趋势。据世界卫生组织国际癌症研究中心统计, 全球乳腺癌年新发病例达 138 万, 因乳腺癌死亡病例达 46 万^[1]。尤其是 50 岁以上的女性, 随着年龄的增长乳腺癌的发病率迅速增高。定期体检和人口筛查能够在一定程度上早期发现乳腺癌, 及时采取治疗措施能降低其死亡率。但在一些医疗条件欠发达地区, 乳腺癌的发病率居高不下, 仍是一个有待解决的重要公共卫生问题^[2]。青藤碱 (Sinomenine) 是从中药青风藤中提取的生物碱单体, 临床应用于治疗风湿性关节炎, 并取得较好疗效^[3]。同时, 研究表明青藤碱对肿瘤细胞的增殖有一定的抑制作用^[4], 环氧合酶-2 (COX-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 在多种恶性肿瘤中表达升高^[5]。但青藤碱对乳腺癌增殖的影响及机制仍不清楚。本研究拟探讨青藤碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用, 同时检测其 COX-2 和 VEGF 的表达和释放情况。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞系 (MCF-7) 购自中科院上海细胞库, 青藤碱购自美国 Abcam 公司, DMEM、胎牛血清、胰酶、双抗和 Trizol 购自美国 Hyclone 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自江苏碧云天生物公司, 逆转录试剂盒和 SYBR 荧光定量试剂购自北京天根生物公司, 人 VEGF 酶联免疫 (ELISA) 检测试剂盒购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞培养于含 10% 胎牛血清、双抗 (100 IU 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素) 的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养。根据细胞增殖情况, 每 2~3 天利用胰酶消化传代培养。

1.2.2 细胞增殖率检测 将 MCF-7 细胞传代至对数生长期, 接种于 96 孔板中, 设对照组和不同剂量青藤碱组 (0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L), 处理 24 h, 各组设 6 个复孔, 加入 MTT 试剂, 利用酶标仪检测 630 nm 吸光度值, 计算细胞增殖情况: 细胞增殖率 (%) = 青藤碱组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞上清液 VEGF 含量及细胞 COX-2、VEGF

mRNA 表达水平检测 将 MCF-7 细胞传代至对数生长期,接种于 24 孔板中,设对照组和不同剂量青藤碱组(0.5、1.0、2.5 mmol/L),各组设 6 个复孔,处理 24 h,收集细胞培养上清,通过酶链免疫(ELISA)法检测 VEGF 含量;同时收集细胞,利用 Trizol 法提取细胞总 RNA,并通过实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测在青藤碱 0.5、1.0、2.5 mmol/L 浓度时其 COX-2 和 VEGF mRNA 的相对表达值。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用方差分析,各组与对照组的比较采用 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

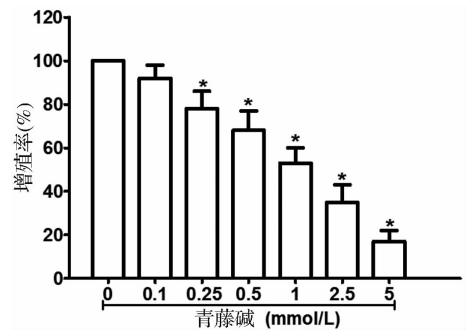
2.1 不同剂量青藤碱对 MCF-7 细胞增殖的影响

当青藤碱浓度为 0.1 mmol/L 时,对 MCF-7 细胞生长无明显抑制作用,当青藤碱浓度在 0.25 ~ 5 mmol/L 时,出现剂量依赖性的 MCF-7 细胞增殖率降低。将对照组定义为 100%,与对照组相比,0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L 青藤碱对 MCF-7 细胞增殖率分别为 78%、68%、53%、35%、17%,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见图 1。

2.2 青藤碱对 MCF-7 细胞 COX-2 和 VEGF mRNA 表达的影响 采用 real-time PCR 分析不同浓度青藤碱对 MCF-7 细胞 COX-2 和 VEGF mRNA 表达的影响,引物序列见表 1。结果显示,将对照组定义为 1,与对照组相比,0.5、1.0、2.5 mmol/L 青藤碱组使得 MCF-7 细胞 COX-2 mRNA 相对表达值降低至 0.75 ± 0.12 、 0.64 ± 0.15 、 0.35 ± 0.14 ;VEGF mRNA 相对表达值降低至 0.88 ± 0.08 、 0.67 ± 0.13 、 0.46 ± 0.11 ,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见图 2。

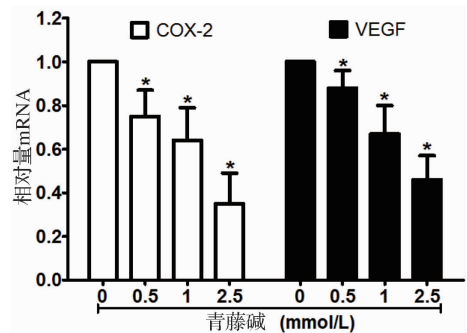
2.3 青藤碱对 MCF-7 细胞上清 VEGF 含量的影响

采用 ELISA 法分析不同浓度青藤碱对 MCF-7 细胞上清 VEGF 水平的影响。结果显示,对照组 MCF-7 细胞上清 VEGF 含量为 (90.3 ± 8.2) pg/ml;青藤碱 0.25、1.0、2.5 mmol/L 组 MCF-7 细胞上清 VEGF 含量分别为 (76.6 ± 9.7) 、 (55.7 ± 7.2) 、 (31.2 ± 5.2) pg/ml,各组与对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见图 3。



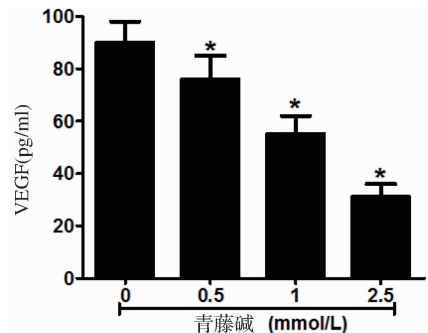
注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 不同剂量的青藤碱对 MCF-7 细胞增殖率的影响



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 青藤碱对 MCF-7 细胞 COX-2 和 VEGF mRNA 表达的影响



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 青藤碱对 MCF-7 细胞上清 VEGF 含量的影响

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
COX-2	GGT GAA ACT CTG GCT AGA C	GCA AAC CGT AGA TGC TCA G
GAPDH	TCT CCT CTG ACT TCA ACA G	CAC CCT GTT GCT GTA GCC A
VEGF	TGC CTT GCT GCT CTA CCT C	GAT GGC AGT AGC TGC GCT G

3 讨论

据统计,我国每年乳腺癌发病约 17 万,是女性最常见的恶性肿瘤^[6],乳腺癌罕见于青春期和育龄期,全球 70% 的乳腺癌发生在 45 岁以上女性。乳腺癌的治疗综合考虑患者的情况,确定其手术方案或化疗方案^[7]。近年来,传统中医药在肿瘤基础和临床治疗中发展迅速、应用广泛^[8]。青藤碱是从中药青风藤中提取的生物碱单体,具有抗炎、免疫调节、镇痛等药理作用^[9],现已有盐酸青藤碱口服与注射剂应

用于临床风湿性关节炎的治疗,并取得较好疗效。除了镇痛抗炎作用外,青藤碱对肿瘤细胞也有较强的抑制作用,可以抑制多种恶性肿瘤细胞的生长^[10],对乳腺癌也有一定的抑制效果^[11],但其具体机制尚不完全明确。

本研究首先观察不同剂量的青藤碱对 MCF-7 细胞增殖的影响,结果显示,当青藤碱浓度 > 0.25 mmol/L 时,青藤碱对 MCF-7 细胞有明显的增殖抑制作用,且呈现浓度依赖性,提示其对乳腺癌细胞的增殖抑制呈现剂量依赖性,与吴镁春、Song 等的报道相似^[11-12]。随后,选择有抑制效果的中等浓度青藤碱(0.5~2.5 mmol/L),观察青藤碱对 MCF-7 细胞 COX-2 和 VEGF mRNA 表达的影响,发现随着浓度的升高,青藤碱能进一步降低 COX-2 和 VEGF mRNA 表达。同时,通过 ELISA 检测 MCF-7 细胞上清中 VEGF 的含量,发现随着浓度的升高,青藤碱能够进一步降低 MCF-7 细胞上清中 VEGF 含量,提示青藤碱能抑制 VEGF 的释放。

COX-2 和 VEGF 的表达在包括乳腺癌在内的多种肿瘤中明显升高^[13],参与了肿瘤的细胞增殖和浸润转移,与肿瘤的发生发展密切相关^[14]。研究表明 COX-2 和 VEGF 高表达的乳腺癌具有更强的侵袭能力,二者在乳腺癌病理生理中具有重要作用^[15]。COX-2 作为花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶,能通过多种途径参与乳腺癌的发生发展,催化前列腺素合成,进而增加 VEGF 的表达。有研究表明,通过抑制 COX-2 能抑制乳腺癌 VEGF 的表达^[16]。COX-2 和 VEGF 有可能为乳腺癌治疗的多靶向靶点提供新的思路。青藤碱作为一种应用于临床的传统中医药,在多种肿瘤的研究中发现其能抑制 COX-2 表达,而在乳腺癌中尚无相关报道。本实验证实了青藤碱对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用,以及对 COX-2 和 VEGF 表达释放的调控。

综上所述,青藤碱能够抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,其作用机制可能是经抑制 COX-2 表达而实现;COX-2 表达下调,从而影响 VEGF 的表达和释放,最终抑制 MCF-7 细胞的增殖。青藤碱可能是值得考虑的乳腺癌临床辅助治疗用药,但仍需进行进一步临床研究证实。

参考文献

- [1] Tao ZQ, Shi A, Lu C, et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 72(2): 333-338.
- [2] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569.
- [3] Xu M, Liu L, Qi C, et al. Sinomenine versus NSAIDs for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Planta Med, 2008, 74(12): 1423-1429.
- [4] 陈伟毅, 秦春宏, 晓刚. 青藤碱抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1902-1904.
- [5] Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis[J]. Surgeon, 2009, 7(3): 174-80.
- [6] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): 279-289.
- [7] 江泽飞. 乳腺癌治疗决策: 从个体化治疗到精准医学[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(7): 697-700.
- [8] 李佩文. 抗肿瘤中成药的应用[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(5): 400.
- [9] Wang Y, Fang Y, Huang W, et al. Effect of sinomenine on cytokine expression of macrophages and synoviocytes in adjuvant arthritis rats[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 98(1/2): 37-43.
- [10] 孙越华, 朱清, 李俊旭. 青藤碱抗炎免疫与抗肿瘤作用研究新进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(8): 1040-1043.
- [11] 吴镁春, 陈迪钊. 盐酸青藤碱对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖影响的初探[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 739-741.
- [12] Song L, Liu D, Zhao Y, et al. Sinomenine inhibits breast cancer cell invasion and migration by suppressing NF- κ B activation mediated by IL-4/miR-324-5p/CUEDC2 axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(3): 705-710.
- [13] 曹桂英, 朱滔, 沈彩糯, 等. 子宫内膜癌患者的 COX-2 蛋白及 VEGF 的表达情况分析[J]. 中华全科医学, 2015, 13(8): 1298-1300.
- [14] Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A, et al. The mRNA expression of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer[J]. Curr Med Res Opin, 2002, 18(4): 237-241.
- [15] Gou HF, Chen XC, Zhu J, et al. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 14.
- [16] Du Y, Shi A, Han B, et al. COX-2 silencing enhances tamoxifen anti-tumor activity in breast cancer in vivo and in vitro[J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1385-1393.

收稿日期: 2016-08-17 修回日期: 2016-09-20 编辑: 王宇