

◇ 药学研究 ◇

黄连素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响

张亚军^{1,2}, 钱立庭¹, 陈昌杰³

摘要 目的 研究黄连素对人乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖和凋亡的影响以及机制。方法 用不同浓度的黄连素 (0、10、20、40) g/ml 处理人乳腺癌细胞株 MCF-7, 细胞培养 72 h 后, MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖抑制率; 流式细胞术检测 MCF-7 细胞凋亡的影响; Western blot 法检测 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、Bax、Bcl-2、Cleavage-PARP 和 Cleavage-Caspase3 表达。结果 黄连素呈浓度依赖性地诱导 MCF-7 细胞的增殖抑制和凋亡, 上调 Bax、Cleavage-PARP 和 Cleavage-Caspase3 表达, 下调 p-JAK2、p-STAT3 和 Bcl-2, 对 JAK2 和 STAT3 表达无明显影响。但高表达 p-STAT3 的 MCF-7 细胞可以抑制黄连素的减少增殖和促进凋亡作用。结论 黄连素诱导 MCF-7 细胞增殖抑制和凋亡的机制可能是通过调节 JAK2/STAT3 信号通路。

关键词 黄连素; MCF-7; 增殖; 凋亡; JAK2/STAT3

中图分类号 R 739.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1276-05

乳腺癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 严重影响女性健康^[1]。目前乳腺癌主要选择手术、放疗和化疗等, 但治疗创伤大且并发症多^[2-3]。因此寻找有效、低毒、副作用小的治疗乳腺癌的方案成为紧迫而现实的问题。传统中国草本药物有广泛的生物和药用价值, 已经应用数千年, 具有有效、安全性高、易获取、低价格等特性, 所以近 20 年来寻求传统中药用于肿瘤治疗和预防的研究成为热点。黄连素是从黄连、黄柏、血红小檗等植物的根茎中分离提取出来的天然生物碱, 有抗氧化效应和多种药理特性。研究^[4-7]表明(包括体内和体外研究), 黄连素对骨肉瘤、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、白血病都有一定的抗肿瘤作用, 而且研究^[8]显示黄连素对人体正常细胞没有毒性。黄连素抗肿瘤

的机制主要与抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生长和延迟肿瘤细胞的转移有关^[9]。而乳腺癌的发病机制是增殖过度和凋亡受阻^[10-12]。该研究以人乳腺癌细胞株 MCF-7 为靶细胞, 探讨黄连素对乳腺癌细胞株 MCF-7 作用及机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自美国组织培养库(ATCC); 黄连素购自陕西赛德高科技生物股份公司, 经高效液相色谱仪(HPLC)鉴定纯度超过 95%, 分子式为 $C_{20}H_{18}ClNO_4$; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自美国 Abcam 公司; RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司; 小牛血清购自中国浙江天杭生物科技公司; 12 孔培养板购自美国 BD 法康公司; β -actin 抗体购自中国艾比玛特公司; Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Cleavage-PARP、Cleavage-Caspase3 购自美国 Santa Cruz 公司; JAK2 抗体、p-JAK2 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体购自美国 CST 公司; 人 p-STAT3 小干扰 RNA (siRNA) 和对照组 siRNA 均购自美国 Santa Cruz 公司; Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 蛋白裂解液 RIPA、BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉碧云公司; cocktail 蛋白酶抑制剂及 Western blot 凝胶配制试剂盒购自中国谷歌生物科技公司。

1.2 细胞培养 以适量浓度的 MCF-7 细胞分别接种于含有 10% 小牛血清 RPMI 1640 细胞培养液中, 再加入浓度为 100 U/ml 的青霉素和浓度为 100 U/ml 的链霉素; 在 37 °C 恒温、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。高表达 p-STAT3 的 MCF-7 细胞是用包含 pRC/CMV- β -galactosidase 或 pRC/CMV-STAT3C-标记的质粒利用 Lipofectamine 2000 转染获得。

1.3 仪器 二氧化碳细胞培养箱和酶标仪均购自美国赛默飞世尔科技公司; 倒置显微镜、激光扫描共聚焦荧光显微镜均购自日本 Olympus 公司; PVDF 膜购自美国罗氏公司; ECL 试剂盒购自美国 Bi- β -tech 公司; 胶片及化学发光仪购自美国 Kodak 公司。

2015-05-18 接收

基金项目: 安徽高校省级科学研究项目(编号: KJ2013A184)

作者单位: ¹安徽医科大学附属医院肿瘤放疗科, 合肥 230001

²蚌埠医学院第一附属医院肿瘤放疗科, 蚌埠 233004

³蚌埠医学院生化与分子生物学教研室, 蚌埠 233030

作者简介: 张亚军, 男, 副主任医师;

钱立庭, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: money2004@sina.com

1.4 MTT 检测细胞增殖 将处于对数生长期 MCF-7 细胞,以浓度为 1×10^5 /ml 加入 12 孔板内,每孔 90 μ l;加入黄连素 0、10、20、40 g/ml,剂量参考文献^[9],每个浓度设 3 个复孔。置 12 孔板于恒温 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 48 h,每孔加入 MTT 溶液 20 μ l;继续在培养箱中培养 4 h,终止培养,然后每孔加入三联裂解液 100 μ l 溶解,避光放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育过夜。用酶标仪在波长为 570 nm 处测定吸光度(optical density, OD)值,试验重复 3 次;根据 OD 值计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = (对照孔 OD 值 - 实验孔 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) $\times$ 100%。

1.5 Annexin-V 双染法检测细胞凋亡 将处于对数生长期的细胞以浓度 1×10^5 /ml 加入 6 孔板中,细胞培养 24 h 后;收集各组所有悬浮细胞,调整细胞密度 1×10^5 /ml,每孔 90 μ l。加入黄连素(0、10、20、40 g/ml),收集 1 ml 细胞悬液,转入离心管,1 000 r/min 离心 5 min;弃去培养基,加 RNA 酶,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;放入冰浴,然后分别加入碘化丙啶(PI)及 Annexin V,轻轻摇匀后避光放置。随即进行流式细胞仪检测细胞凋亡情况,分析软件采用 CELLQUEST。

1.6 Western blot 检测各组细胞 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、Bax、Bcl-2、Cleavage-PARP 和 Cleavage-Caspase3 表达 将各浓度组收集的细胞用预冷的 PBS 清洗后,根据蛋白裂解液 RIPA 操作说明书进行蛋白质提取。采用 BCA 法进行蛋白质定量测定,将各组蛋白浓度调成一致,煮沸 5 min 使蛋白质变性后待用。取各组细胞总蛋白样品 80 μ g,以样品中的 β -actin 为内参,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜。转膜结束后,将膜取出后进行标记,然后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 2 h 分别加入适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释 JAK2 抗体(1 : 1 000),p-JAK2(1 : 500),STAT3(1 : 1 000),p-STAT3(1 : 500),Bax(1 : 500),Bcl-2(1 : 500),Cleavage-PARP(1 : 500)和 Cleavage-Caspase3(1 : 500),表达 β -actin(1 : 3 000)抗体,4 $^{\circ}$ C 避光过夜孵育,结束后用 PBS 冲洗膜 3 次,每次 10 min。根据一抗来源的不同,然后再加入含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG(1 : 500)、HRP 标记羊抗鼠 IgG(1 : 5 000)室温下摇床孵育 2 h,结束后用 PBS 冲洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 发光试剂盒化学发光显色、压片、显影、定影、胶片拍照扫描保存。用 Ge-I Pro Analy zer(Ver 3.0)软件测定蛋白

条带灰度值,分析计算 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、Bax、Bcl-2、cleavage-PARP 和 cleavage-Caspase3 与 β -actin 内参条带灰度值的比值,将上述蛋白表达量化。

1.7 质粒转染和干扰 MCF-7 细胞利用质粒和 LipofectamineTM 2000,转染高表达激活形式的 p-STAT3,使 MCF-7 细胞高表达 p-STAT3;在转染 24 h 后,将高表达 p-STAT3 的 MCF-7 细胞分别用黄连素和培养基。72 h 后利用 MTT 和凋亡试剂盒测增值和凋亡。MCF-7 利用 siRNA STAT3 和 LipofectamineTM 2000,沉默 STAT3,使 MCF-7 细胞低表达 STAT3,在转染 24 h 后,将低表达 p-TAT3 的 MCF-7 细胞分别用黄连素和培养基,72 h 后利用 MTT 和凋亡试剂盒测增值和凋亡。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两样本均数比较采用 t 检验,多组间数据比较采用方差分析。

2 结果

2.1 黄连素对 MCF-7 细胞增殖的影响 MTT 检测实验结果显示,黄连素可以呈浓度依赖性抑制 MCF-7 细胞增殖,在 40 μ g/ml 达到最大抑制率($P < 0.05$)。见图 1。

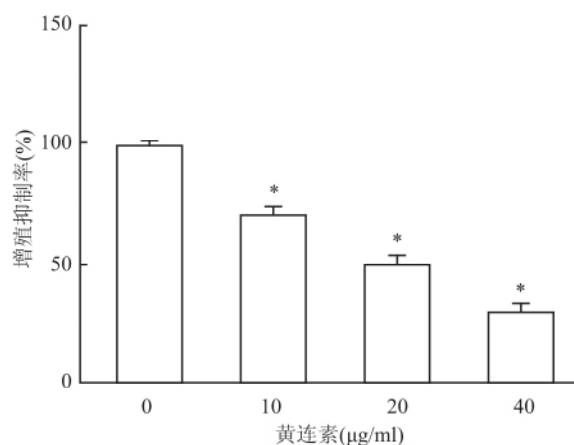


图1 MTT 检测黄连素对 MCF-7 细胞增殖的影响($n = 6$)
与 0 μ g/ml 黄连素比较: * $P < 0.05$

2.2 黄连素对 MCF-7 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测实验结果显示,黄连素可以呈浓度依赖性促进 MCF-7 细胞凋亡($F = 165, P < 0.05$)。Western blot 显示,黄连素可以促进 Bcl-2 的降解($F = 109, P < 0.05$)和上调 Bax、Cleavage-Caspase3 和 Cleavage-PARP 的表达($F = 143, 126, 109, P < 0.05$)。见图 2、3。

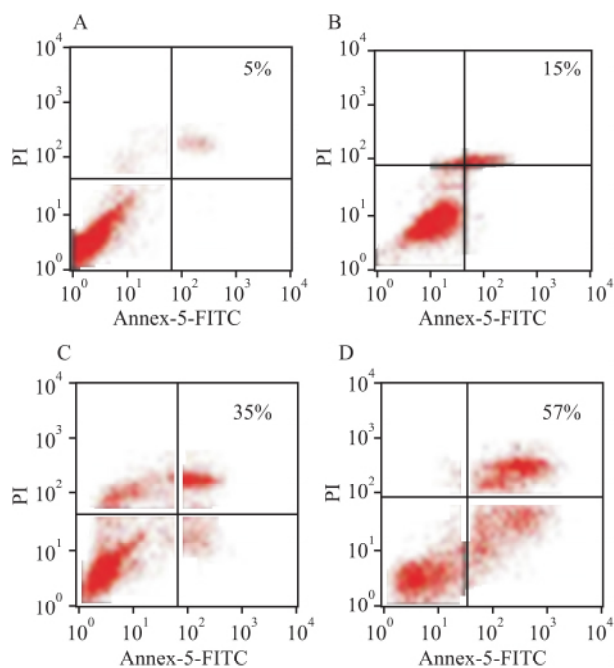


图2 流式细胞术检测黄连素对 MCF-7 细胞凋亡的影响

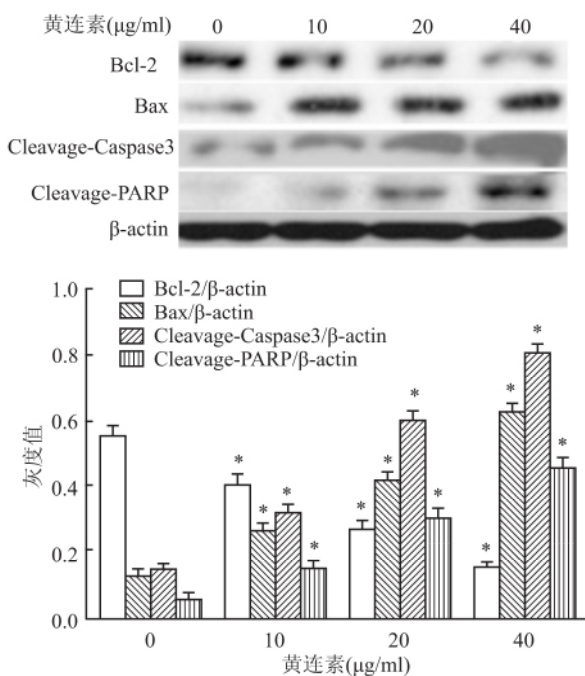


图3 Western blot 检测黄连素对 Bax、Bcl-2、Cleavage-PARP 和 Cleavage-Caspase3 表达的影响
与 0 g/ml 黄连素比较: * $P < 0.05$

2.3 黄连素对 MCF-7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 表达的影响 Western blot 显示, 黄连素可以呈浓度依赖性促进 p-JAK2、p-STAT3 表达下调 ($F = 113, 102, P < 0.05$), 但对 JAK2、STAT3 表达无明显影响 ($F = 6.0, 3.2$)。显示黄连素可以

抑制 MCF-7 细胞 JAK2/STAT3 的激活。见图 4。

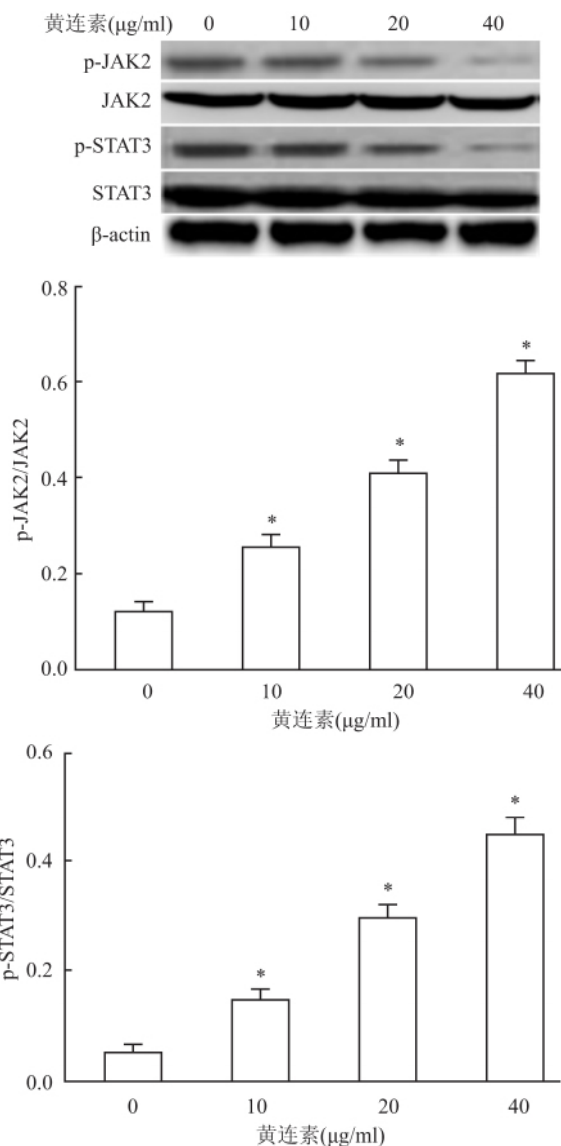


图4 Western blot 检测黄连素对 MCF-7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 表达的影响
与 0 μg/ml 黄连素比较: * $P < 0.05$

2.4 黄连素通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路诱导 MCF-7 增殖抑制和凋亡 在 MCF-7 细胞利用质粒高表达 p-STAT3 可以抑制黄连素对 MCF-7 细胞的增殖抑制和凋亡 ($F = 108, 156, P < 0.05$)。在 MCF-7 细胞利用 siRNA 沉默 STAT3 表达, 可以增强黄连素对 MCF-7 细胞的增殖抑制和凋亡 ($F = 117, 128, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

祖国医学博大精深, 从祖国医学宝库中挖掘出可以抑制乳腺癌恶性增殖的方法是研发高效低毒抗癌药的有效途径之一。黄连素是一种从许多药用植

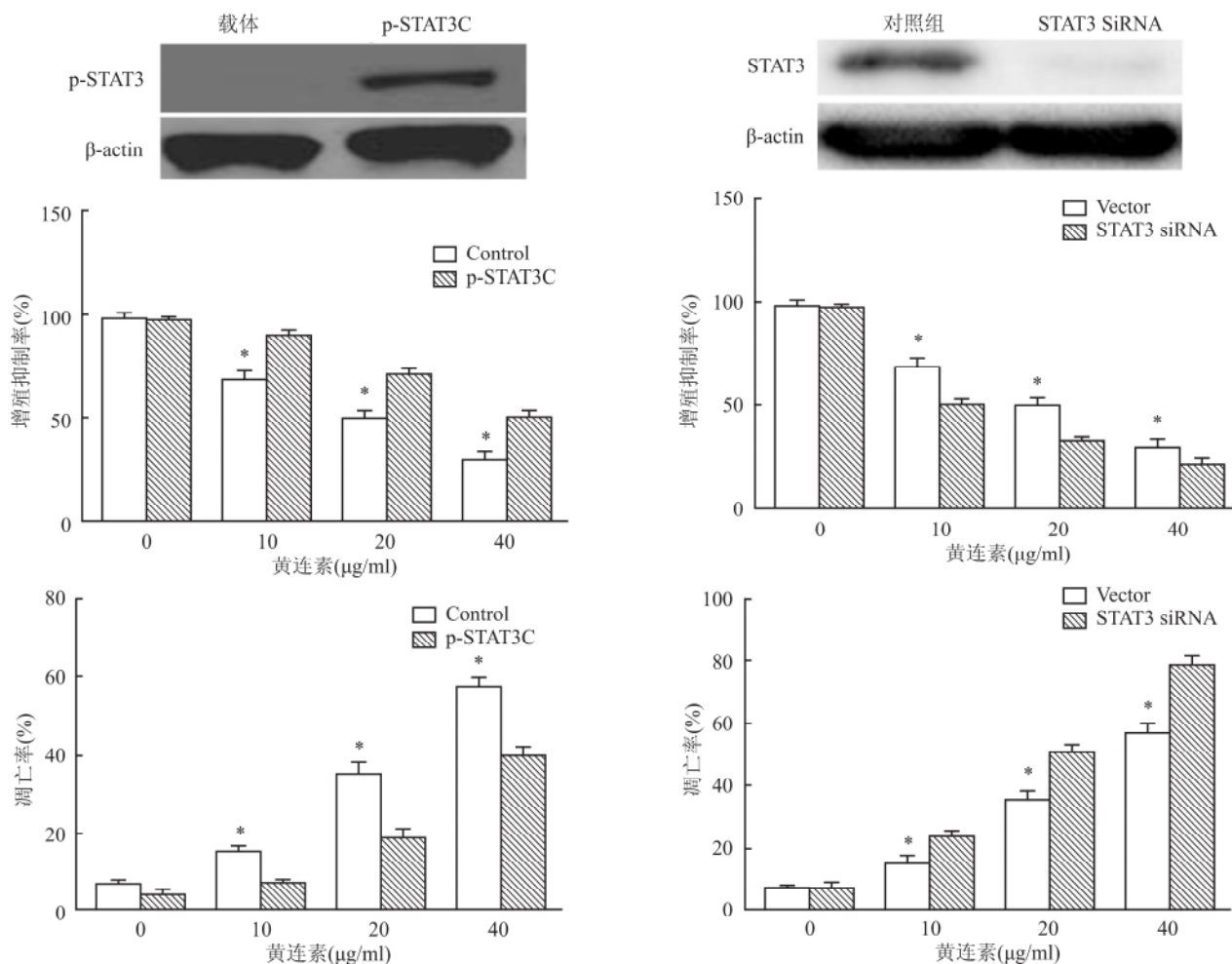


图5 Western blot 检测黄连素对 STAT3 高表达和低表达的 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响
与 0 μg/ml 黄连素比较: * $P < 0.05$

物中分离出来的异喹啉类生物碱,其具有抗氧化作用及多种药理学特性,临床上一直用于清热解暑和治疗腹泻^[8]。黄连素诱导细胞凋亡并抑制细胞增殖的作用在乳腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌来源的多种细胞系中都得到了证明^[10-12]。黄连素同时也调节一些信号传导途径,细胞因子刺激信号可以通过多条细胞通路传入到细胞内,引导细胞对环境刺激做出反应,然后协调和适应; JAK-STAT 信号通路是在信号传导中起着重要作用,与免疫调节、细胞生长、增殖、分化和凋亡密切相关^[13-14]。目前研究^[15-16]表明 JAK-STAT 信号通路在乳腺癌细胞增殖和凋亡调控方面扮演着十分重要的角色。

本试验显示黄连素可以呈浓度依赖性的诱导 MCF-7 细胞的增殖抑制和凋亡,上调 Bax、cleavage-PARP 和 cleavage-Caspase3 的表达,下调 p-JAK2、p-STAT3 和 Bcl-2,但对 JAK2 和 STAT3 表达无明显影响。为了进一步证实黄连素诱导乳腺癌细胞增殖抑

制和凋亡受阻是通过 JAK2/STAT3 信号通路,利用质粒和小干扰 RNA 分别高表达和低表达 p-STAT3 和 STAT3,实验结果显示高表达 p-STAT3 的 MCF-7 细胞与未转染的 MCF-7 细胞相比,黄连素诱导的增殖抑制和凋亡明显减少;低表达 STAT3 的 MCF-7 细胞与未干扰的 MCF-7 细胞相比,黄连素诱导的增殖抑制和凋亡明显增强,这显示黄连素诱导 MCF-7 细胞增殖抑制和凋亡的机制可能是通过调节 JAK2/STAT3 信号通路。

综上所述,黄连素诱导 MCF-7 细胞增殖抑制和凋亡的机制可能是通过调节 JAK2/STAT3 信号通路。但是黄连素作用机制仍不清楚,可能系直接作用于 JAK2 信号分子或者通过调节其上游激酶和/或信号分子而发挥着间接作用。黄连素在乳腺癌中的定义、潜在应用及作用靶点仍然是一个重要的问题。更好地理解黄连素调控的细胞通路,无疑将能更好地理解其在乳腺癌的发病机理和治疗方面的应

作用,将会进行进一步更深入的研究,探讨是否其他信号通路调控黄连素诱导 MCF-7 细胞增殖抑制和凋亡。

参考文献

- [1] Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2014, 6: 423 – 30.
- [2] Larsen M J, Thomassen M, Gerdes A M, et al. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics [J]. *Breast Cancer(Auckl)*, 2014, 8: 145 – 55.
- [3] Cai Y, Xia Q, Luo R, et al. Berberine inhibits the growth of human colorectal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(1): 53 – 62.
- [4] Yan K, Zhang C, Feng J, et al. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 661(1 – 3): 1 – 7.
- [5] Serafim T L, Oliveira P J, Sardao V A, et al. Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(6): 1007 – 18.
- [6] Patil J B, Kim J, Jayaprakasha G K. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1 – 3): 70 – 8.
- [7] He W, Wang B, Zhuang Y, et al. Berberine inhibits growth and induces G1 arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma QBC939 cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 119(4): 341 – 8.
- [8] Taraphdar A, Roy M, Bhattacharya R, et al. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention [J]. *Curr Sci*, 2001, 80: 1387 – 96.
- [9] Ortiz L M, Lombardi P, Tillhon M, et al. Berberine, an epiphany against cancer [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12349 – 67.
- [10] Cardonick E. Pregnancy-associated breast cancer: optimal treatment options [J]. *Int J Womens Health*, 2014, 6: 935 – 43.
- [11] Xie J, Xu Y, Huang X, et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 1279 – 88.
- [12] Tan W, Li N, Tan R, et al. Berberine Interfered with breast cancer cells metabolism, balancing energy homeostasis [J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2014, 15(1): 66 – 78.
- [13] Zeng L, Tang W J, Yin J J, et al. Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini – review [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(7): 1624 – 31.
- [14] Chiba T, Yamada M, Aiso S. Targeting the JAK2/STAT3 axis in Alzheimer's disease [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(10): 1155 – 67.
- [15] Giordano C, Vizza D, Panza S, et al. Leptin increases HER2 protein levels through a STAT3-mediated up-regulation of Hsp90 in breast cancer cells [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(3): 379 – 91.
- [16] Guo W, Wu S, Wang L, et al. Antitumor activity of a novel oncrasin analogue is mediated by JNK activation and STAT3 inhibition [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28487.

Effect of berberine on proliferation and apoptosis of MCF-7 cells

Zhang Yajun^{1,2}, Qian Liting¹, Chen Changjie³

(¹Dept of Radiation Oncology, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004;

³Dept of Biochemistry & Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanisms of the Berberine on the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. **Methods** MTT method was used to evaluate the proliferation effect of MCF-7 and the percentage of apoptotic cells were determined by flow cytometric analysis. The expressions of JAK2, p-JAK2, p-STAT3, STAT3, Bax, Bcl-2, Cleavage-PARP and Cleavage-Caspase3 were detected by Western blotting. **Results**

The results showed that BBR treatment decreased the activation of JAK2/STAT3 signal pathway and up-regulated the expression of Bax, Caspase3 and PARP activation with the decrease of the expression of Bcl-2. Wherefore, expression of the constitutively active form of STAT3 could attenuate the effect of BBR on the MCF-7 cell. **Conclusion**

Berberine can induces apoptosis and proliferation inhibition of breast adenocarcinoma cell lines of MCF-7 through inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words berberine; MCF-7; proliferation; apoptosis; JAK2/STAT3