

文章编号 1006-8147(2014)01-0011-03

论著

小白菊内酯对人乳腺癌细胞株增殖敏感性的影响

徐惠君¹, 贾勇圣¹, 陈悦², 佟仲生¹

(1. 天津医科大学肿瘤医院乳腺内科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2. 南开大学药学院, 天津 300071)

摘要 目的: 观察小白菊内酯(PN)单独及联合顺铂(DDP)对人乳腺癌细胞株 BT549 生长的影响, 并探讨其作用机制。方法: 体外培养人乳腺癌 BT549 细胞株, 分别加入不同浓度的 PN、DDP 及 PN+DDP 至细胞中, 作用 48 h 后, 分别采用 CCK8 细胞增殖实验检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞周期。结果: 随着 PN 工作液浓度的升高, BT549 细胞 48 h 的细胞存活率逐渐降低。同样, 随着 DDP 工作浓度的升高, BT549 细胞 48 h 的细胞存活率也逐渐下降。并且相应浓度的 PN 和 DDP 联合作用于 BT549 细胞 48 h 的存活率降低更加明显, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。流式细胞仪测细胞周期实验发现, 这两种药物主要通过阻滞细胞周期 G1/S 期的转化。结论: PN 单用及联合 DDP 作用均可抑制 BT549 细胞的增殖, 且呈浓度-剂量依赖性, 两药联合应用对细胞增殖的抑制作用更加明显, 表明这两种药物具有协同作用。

关键词 小白菊内酯; 顺铂; 乳腺癌细胞; 细胞周期

中图分类号 R969

文献标志码 A

Inhibition effect of parthenolide on the human breast cancer BT549 cells

XU Hui-jun¹, JIA Yong-sheng¹, CHEN Yue², TONG Zhong-sheng¹

(1. Department of Breast Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China; 2. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Objective: To observe the effect of parthenolide (PN) alone and in combination with cis-platinum (DDP) on the growth of human breast cancer cells BT549 and explore its mechanism. **Methods:** Human breast cancer BT549 cells were cultured *in vitro*. Different concentrations of PN, DDP and PN combined with DDP were added to BT549 cells. After 48 h, the cell viability rate was detected by CCK8 assay. Cell cycle distribution was tested by flow cell cycle experiment. **Results:** The cell viability rate declined after different concentrations of PN were added to BT549 cells in 48 h. And the cell viability rate decreased after different concentrations of DDP were added to BT549 cells in 48 h, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The cell viability rate sharply reduced after corresponding concentrations of PN combined with DDP were added to BT549 cells in 48 h. Cell cycle G1/S transition was mainly blocked by the two drugs. **Conclusion:** PN alone and in combination with DDP can both inhibit the proliferation of BTB49 cells in concentration-dose dependant. And the drugs also show synergistic effect.

Key words parthenolide; cis-platinum; breast cancer cells; cell cycle

小白菊内酯(parthenolide, PN)是倍半萜烯内酯的主要成分, 传统上主要用来治疗偏头痛、发热和类风湿性关节炎等^[1]。近年来研究发现 PN 可通过多种机制对多种肿瘤发挥抗癌重要作用, 成为抗肿瘤药物研究的热点之一。顺铂(cis-platinum, DDP)是晚期乳腺癌化疗的一线药物, 但乳腺癌病人对 DDP 的耐药成为乳腺癌化疗失败的原因之一。因此提高乳腺癌细胞对 DDP 作用的敏感性, 减少 DDP 化疗引起的副反应具有重要临床意义。PN 可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[2]。本文通过研究 PN、

DDP 单独及联合作用对人乳腺癌细胞株 BT549 生长作用的影响, 进一步探讨 PN 和 DDP 协同作用的抗肿瘤作用机制, 为将来的临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 BT549 由乳腺癌防治教育部重点实验室提供, PN 由南开大学药学院提供, 用 DMSO 配成 100 mmol/L 的储存液。顺铂注射液、CCK8 试剂购自美国 Sigma 公司。细胞周期流式检测试剂盒购于 BD 生物科技公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 BT549 生长于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 DMEM(赛默飞世尔科技), 在含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C

基金项目 天津市重大课题专项基金资助项目(12ZCDZSY16200)

作者简介 徐惠君(1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 乳腺癌的综合治疗; 通信作者: 佟仲生, E-mail: Tonghang@medmail.com.cn。

饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 PN、DDP对细胞增殖的影响 取对数生长期BT549细胞按 5×10^3 /孔细胞数接种96孔板,待细胞贴壁12 h后,分别加入PN和DDP,浓度均为:0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 。于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养48 h后,每孔加入10 μL CCK8,1 h后在全自动酶标仪上检测490 nm光密度值(OD值),计算细胞增殖抑制率($\%$)=(1-OD实验组/OD对照组) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.3 细胞周期检测 BT549细胞接种在6 cm培养瓶中,孵育12 h,加入 IC_{50} 时浓度为12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的PN和DDP,24 h后收集细胞。PBS洗两遍,用70%乙醇固定。分析结果前用PBS洗一遍,重悬于PI/RNase染色缓冲液中。室温孵育15 min,流式细胞仪检测细胞周期。通过ModFit LT 3.3软件分析处于细胞各周期的细胞比例。

1.3 统计学处理 采用SPSS17.0统计软件。实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PN、DDP联合作用对BT549细胞株增殖的影响 PN不同工作液浓度(0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$)作用于BT549细胞48 h的细胞存活率分别为(100.03 \pm 2.37)%、(72.13 \pm 2.04)%、(65.17 \pm 2.21)%、(50.23 \pm 1.98)%、(48.25 \pm 1.71)%、(40.24 \pm 2.28)%。0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的DDP作用于BT549细胞48 h的细胞存活率分别为(100.00 \pm 1.91)%、(87.14 \pm 1.83)%、(85.23 \pm 1.72)%、(62.12 \pm 1.82)%、(57.22 \pm 1.92)%、(45.24 \pm 2.14)%。浓度为0、6.25、12.5、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的PN联合相应浓度(0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00

$\mu\text{mol/L}$)的DDP作用于BT549细胞后的存活率分别为(100.24 \pm 2.13)%、(57.19 \pm 1.68)%、(37.23 \pm 2.07)%、(31.28 \pm 2.18)%、(28.14 \pm 2.21)%、(13.16 \pm 2.27)%。图1结果表明PN联合DDP对BT549细胞增殖具有协同抑制作用,且呈浓度-剂量依赖性,两者联合应用较单独用药产生更大的细胞毒杀伤作用。

2.2 PN和DDP对BT549细胞株周期的影响 分别取 IC_{50} 时的PN和DDP作用于BT549细胞,48 h后收集细胞,用流式细胞仪检测细胞周期的变化。随PN浓度的增加,G1/S期细胞数逐渐增多。与对照组相比,实验组差异具有统计学意义($P < 0.05$) (图2A,图2B)。表明PN使BT549细胞阻滞在G1期向S期的过渡。与对照组相比,联合用药组中BT549细胞的G1期细胞数明显多于单独用药组,而S期细胞数明显少于单独用药组(图2)。表明PN联合DDP对细胞周期的阻滞作用强于单独用药组。

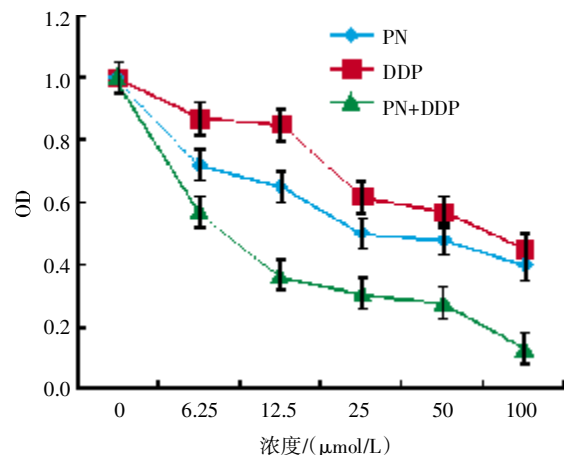
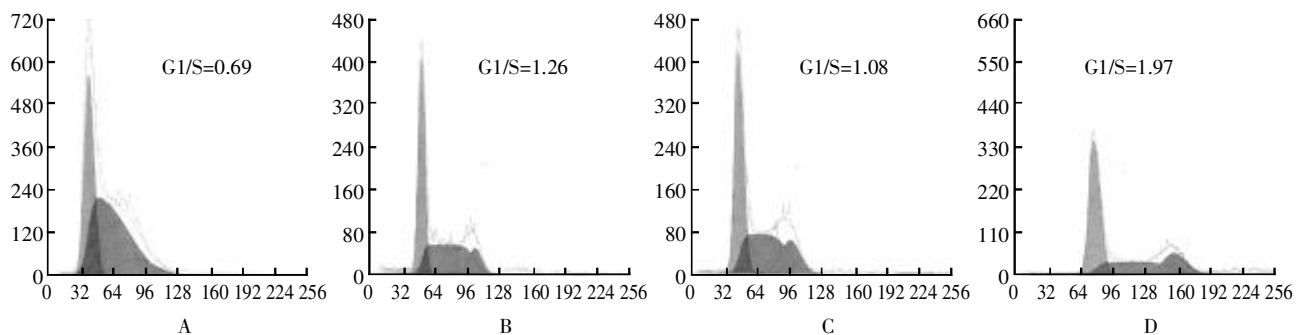


图1 不同浓度的PN和DDP单独及联合作用对BT549细胞增殖的影响

Fig 1 The effect of different concentrations of PN and DDP alone or in combination on BT549 cell proliferation



A. 不加任何药物时BT549细胞周期中,G1/S期细胞数的比值;B. 单用PN时BT549细胞周期中,G1/S期细胞数的比值;C. 单用DDP时BT549细胞周期中,G1/S期细胞数的比值;D. PN和DDP联合用药时,BT549细胞周期中,G1/S期细胞数的比值

图2 流式检测细胞周期

Fig 2 Flow cytometry cell cycle

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。DDP 在乳腺癌的化疗中发挥着重要的作用,但乳腺癌细胞对 DDP 的耐药、化疗的毒副作用,成为 DDP 在临床上治疗乳腺癌的限制。因此,在乳腺癌的化疗中,大家期待对肿瘤细胞敏感、化疗反应小的化疗药物。PN 是从艾菊中提取出来的倍半萜内酯,近年来,其在抗肿瘤作用的机制得到广泛研究。此外,PN 可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,如肝癌、结肠癌等^[2-3]。但 PN 对乳腺癌细胞影响的研究较少。

笔者的研究表明,PN 和 DDP 单独及联合作用于乳腺癌细胞株 BT549 均可引起细胞凋亡,且具有浓度-剂量依赖性。当两种药物联合使用时,对细胞的抑制作用明显增强。近年来研究发现,PN 通过多种作用机制发挥抗肿瘤作用,主要有调节 P21 使细胞周期阻滞在 G1/S 期^[4-5],调节 Bcl 家族^[6]及抑制 NF- κ B^[7]等信号通路促进细胞凋亡。研究表明,DDP 抗肿瘤作用机制主要是通过促进细胞周期阻滞和导致细胞凋亡实现的^[8]。这主要是由于细胞蛋白 P53 和 P73 呈现 DDP 对 DNA 损伤的反应,从而引起细胞周期阻滞或细胞凋亡。这种反应可诱导两种平行的死亡反应通路,即依赖 P53 和依赖 P73 两条通路。此外 Bcl 家族蛋白也是促进 DDP 诱导细胞凋亡的机制之一^[9]。

本研究同样证实了 PN 和 DDP 都使细胞周期阻滞在 G1/S 期,从而协同达到抑制细胞增殖的作

用。此外两种药物可能通过调节 Bcl 家族达到抗肿瘤作用,这有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Kishida Y, Yoshikawa H, Myoui A. Parthenolide, a natural inhibitor of Nuclear Factor- κ B, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (1): 59
- [2] 王秀英,冷水龙.小白菊内酯增强肝癌细胞对顺铂敏感性的实验研究[J]. *实用医学杂志*, 2011(272): 177
- [3] 余南荣,李昌宾,纪术峰,等.小白菊内酯及顺铂对人结肠癌细胞 SW620 凋亡和增殖的作用[J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(4): 277
- [4] Gopal Y N, Arora T S, Van Dyke M W. Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated[J]. *Chem Biol*, 2007, 14 (7): 813
- [5] Kim J H, Liu L, Lee S O, et al. Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (14): 6312
- [6] Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008, 46 (2): 129
- [7] Zhang D, Qiu L, Jin X, et al. Nuclear factor- κ B inhibition by parthenolide potentiates the efficacy of Taxol in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7 (7): 1139
- [8] Allday M J, Inman G J, Crawford D H, et al. DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective[J]. *EMBO J*, 1995, 14 (20): 4994
- [9] Levy D T, Ross H, Powell L, et al. The role of public policies in reducing smoking prevalence and deaths caused by smoking in Arizona: results from the Arizona tobacco policy simulation model[J]. *J Public Health Manag Pract*, 2007, 13 (1): 59

(2013-09-13 收稿)

(上接第 10 页)

慢性炎症与肿瘤进展中的调节作用,并为以 IL-23 作为新的生物治疗靶点应用于临床提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2): 114
- [2] Teng M W, von Scheidt B, Duret H, et al. Anti-IL-23 monoclonal antibody synergizes in combination with targeted therapies or IL-2 to suppress tumor growth and metastases[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2077
- [3] Langowski J L, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 461
- [4] Li J, Zhang L, Zhang J, et al. Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3): 658

- [5] Li J, Lau G, Chen L, et al. Interleukin 23 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinase 9 expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46264
- [6] 房东亮,马跃美,赵秀兰,等.慢性炎症对小鼠黑色素瘤血管生成的影响[J]. *天津医药*, 2013, 3: 230
- [7] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52
- [8] Li J, Lau G K, Chen L, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21816
- [9] Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(7): 1073
- [10] Grivennikov S I, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 11

(2013-10-15 收稿)