

文章编号 1006-8147(2014)01-0014-04

论著

塞来昔布与茶多酚合用对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响

王旭, 强兆艳, 王翔, 何景华

(天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 研究塞来昔布与茶多酚合用对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡的影响。方法: MTT 比色法检测塞来昔布、茶多酚单药及两者联合用药对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响。Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态学改变。流式细胞术 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率。结果: MTT 结果显示塞来昔布(10 $\mu\text{mol/L}$)与不同浓度茶多酚(6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)单用及合用均对 MDA-MB-231 细胞产生增殖抑制作用, 且联合用药组的抑制率高于各单用组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Hoechst33258 荧光染色结果显示塞来昔布(10 $\mu\text{mol/L}$)与茶多酚(50、100 $\mu\text{g/mL}$)合用组的凋亡细胞较单用组明显增加, 出现典型凋亡形态学特征。流式细胞术进一步证明两药合用使凋亡率显著增加。结论: 塞来昔布与茶多酚合用具有显著抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖, 诱导细胞凋亡的作用。

关键词 塞来昔布; 茶多酚; 三阴乳腺癌; 细胞凋亡

中图分类号 R969

文献标志码 A

Effects of celecoxib combined with tea polyphenols on the proliferation and apoptosis of breast cancer cell

WANG Xu, QIANG Zhao-yan, WANG Xiang, HE Jing-hua

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of celecoxib combined with tea polyphenols on the proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231. **Methods:** MTT assay was adopted to detect the effects of celecoxib, tea polyphenols and celecoxib combined with tea polyphenols on the proliferation of breast cancer cell MDA-MB-231. Hoechst33258 staining was used to observe the morphologic changes. Cell apoptosis was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining. **Results:** MTT assay showed that celecoxib (10 $\mu\text{mol/L}$) and tea polyphenols (6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) alone and in combination inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells. The inhibition rate of the combination groups was higher than single drug groups and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Hoechst33258 staining showed that the number of apoptotic cells in combination groups composed by celecoxib (10 $\mu\text{mol/L}$) and tea polyphenols (50, 100 $\mu\text{g/mL}$) significantly increased compared with single drug groups and the typical morphological characteristics of apoptosis could be observed. Flow cytometry was further evidence that the apoptosis rate significantly increased by celecoxib and tea polyphenols combined. **Conclusion:** Celecoxib in combination with tea polyphenols can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231.

Key words celecoxib; tea polyphenols; triple-negative breast cancer cell; apoptosis

三阴乳腺癌指雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone, PR) 及人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 均为阴性的乳腺癌亚型, 具有侵袭性强、易局部复发、易远处转移及预后差的特点^[1]。目前尚无特效治疗方法, 仍以放、化疗为术后治疗的主要手段。而很多单一药物治疗的不良反应严重且容易产生耐药性, 因此, 药物联合应用以达到治疗效果成为当今研究热点。茶多酚 (tea polyphenols, TPs) 是从茶叶中分离得到的具有抗氧化、抗肿瘤、抗突变等作用的活性物质, 近年流行病学及基础研究表明, 茶多酚能有效抑制多种肿瘤细胞的生长^[2], 且与多种化疗药物合用可起到增效作用^[3]。研究发现, 在多

种实体瘤包括乳腺癌中均存在环氧酶-2 (COX-2) 过表达现象^[4], 塞来昔布 (celecoxib, CE) 是一种选择性的 COX-2 抑制剂, 已有研究表明 COX-2 抑制剂能有效抑制多种肿瘤的发生发展, 但其长期大剂量应用会引起胃肠道出血等不良反应。塞来昔布与茶多酚两种非细胞毒性药物抗肿瘤的机制不同, 两药合用能否增强单药对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用, 提高疗效, 尚少见报道。本实验旨在研究低剂量的塞来昔布与天然药物茶多酚合用对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡的影响, 为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞由本实验室冻存。

作者简介 王旭 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤免疫药理;
通信作者: 何景华, E-mail: hejinghuacn@163.com。

1.1.2 药品与试剂 茶多酚由香港大学医学院药理室赠予;塞来昔布(辉瑞制药股份有限公司);RP-MI-1640 培养基(hyclone 公司);胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Amresco 公司);二甲基亚砷(天津致远化学试剂有限公司);Hoechst33258 染料(南京凯基生物科技发展有限公司);AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(嘉美生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备 恒温 CO₂ 培养箱(美国 NAPCOseries5400);净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);5417 型低温离心机(Eppendorf 公司);荧光显微镜(日本 NIKON 公司);酶标仪(美国 BioTek 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MDA-MB-231 细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置 37℃,5%CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 MTT 比色法检测细胞活性,设实验组(塞来昔布组、茶多酚组、联合用药组)、阴性对照组和不含细胞的空白对照组。取对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,置 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,弃上清,实验组每孔加入 200 μ L 含药培养液(塞来昔布终浓度为 10 μ mol/L,茶多酚终浓度为 6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL),阴性对照组和空白对照组分别加入 200 μ L 不含药培养液。每组设 3 个复孔,继续培养 24、48 h 后每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μ L,4 h 后吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡 10 min 待结晶充分溶解,于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光度(OD)值,计算细胞生长抑制率:抑制率(%)=[1-(实验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)] \times 100%。

1.2.3 Hoechst33258 染色观察细胞形态 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,每孔 500 μ L 接种于 24 孔板,待细胞贴壁后进行处理。阴性对照组加入不含药培养液,实验组加入新鲜含药培养液。实验组中塞来昔布(终浓度 10 μ mol/L)与茶多酚(终浓度 50、100 μ g/mL)单独应用及联合应用处理细胞 24 h 后,弃上清,PBS 洗 2 遍,每孔加 Hoechst 染料(5 μ g/mL)100 μ L,37℃避光孵育 15 min,

荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,以每孔 2 mL 接种于 6 孔板,培养 24 h 待细胞贴壁后给予药物处理。实验组分别加入塞来昔布(终浓度 10 μ mol/L),茶多酚(终浓度 50、100 μ g/mL)及两药混合液(1:1),阴性对照组加入不含药培养液,每孔 1 mL。37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,收集细胞,预冷 PBS 洗 2 次,收集 1×10^5 个细胞,加入 300 μ L 的 1 \times Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μ L AnnexinV-FITC 混匀,避光,室温孵育 15 min,上机前 5 min 加入 5 μ L 的 PI 染液并补加 200 μ L 的 1 \times Binding Buffer。流式细胞仪进行检测。每份样品检测 1×10^4 个细胞,待用 Cellquest 软件采集样本后,用 WinMDI2.9 软件进行凋亡率分析。

1.3 统计学处理 实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS16.0 统计软件处理。多组间均值比较采用单因素方差分析(Oneway-ANOVA),两两比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 塞来昔布与茶多酚单用及合用对细胞增殖的抑制作用 MTT 法检测的数据(表 1)表明,塞来昔布(10 μ mol/L)、茶多酚(6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL)及两药合用均对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用,且两药联合使用的增殖抑制作用优于两药单用,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 塞来昔布联合茶多酚对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 The effects of celecoxib combined with tea polyphenols on the inhibition rate of breast cancer cell MDA-MB-231 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	抑制率/%	
	24 h	48 h
阴性对照组	0	0
塞来昔布 10 μ mol/L	2.08 \pm 0.10*	5.78 \pm 0.36*
茶多酚 6.25 μ g/mL	1.66 \pm 0.51*	4.49 \pm 0.67*
12.5 μ g/mL	7.25 \pm 0.69*	7.48 \pm 0.23*
25 μ g/mL	11.26 \pm 1.11*	12.36 \pm 1.13*
50 μ g/mL	23.17 \pm 0.39*	50.87 \pm 0.85*
100 μ g/mL	55.73 \pm 0.51*	74.82 \pm 0.24*
塞来昔布+茶多酚 10 μ mol/L+6.25 μ g/mL	9.45 \pm 0.47* Δ	10.32 \pm 0.13* Δ
10 μ mol/L+12.5 μ g/mL	11.97 \pm 0.44* Δ	13.87 \pm 0.08* Δ
10 μ mol/L+25 μ g/mL	15.30 \pm 0.10* Δ	20.29 \pm 0.30* Δ
10 μ mol/L+50 μ g/mL	25.67 \pm 0.82* Δ	60.36 \pm 0.37* Δ
10 μ mol/L+100 μ g/mL	67.86 \pm 3.51* Δ	79.73 \pm 0.26* Δ

与阴性对照组比较 * $P < 0.05$;与同浓度茶多酚组比较 $\Delta P < 0.05$;与塞来昔布组比较 $\Delta P < 0.01$

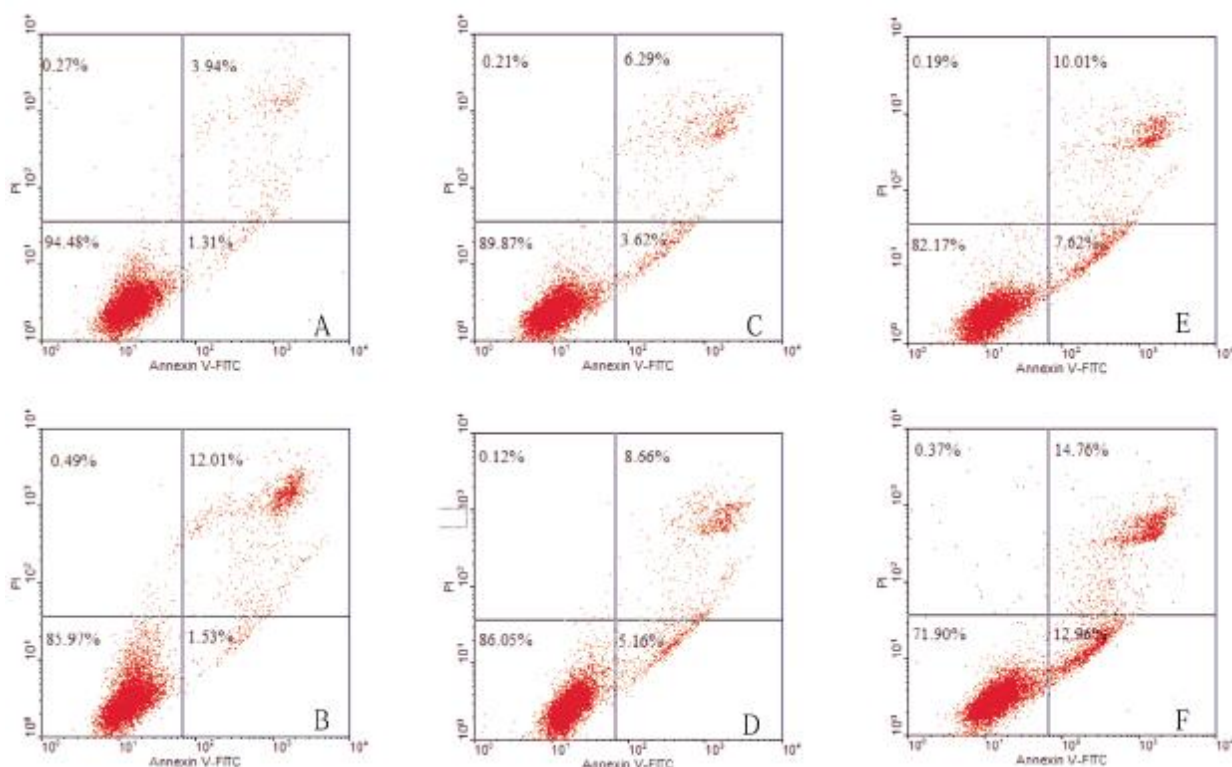
药物作用 24、48 h 后, 茶多酚对细胞的半数抑制浓度 IC_{50} 分别由单用时的 98.67 $\mu\text{g/mL}$ 和 54.36 $\mu\text{g/mL}$ 降低到联合用药时的 81.58 $\mu\text{g/mL}$ 和 42.22 $\mu\text{g/mL}$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Hoechst33258 染色观察凋亡细胞形态学特征

Hoechst33258 染色观察, 阴性对照组细胞核形态规则整齐, 细胞呈现均匀弥散样淡蓝色荧光。不同浓度药物处理 24 h 后, 部分细胞呈致密浓染, 出现细胞核皱缩、染色质凝聚的典型凋亡特征。塞来昔布与茶多酚联合用药组和各单药组比较, 凋亡细胞明显增多。形态学结果显示, 塞来昔布与茶多酚合用能增强单药诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的作用。

2.3 塞来昔布与茶多酚合用对细胞凋亡的影响 将

AnnexinV 与 PI 匹配使用, 通过流式细胞仪检测, 可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。在双变量流式散点图中, 左上象限表示机械损伤细胞 (Annexin-FITC-/PI⁺), 左下象限表示正常活细胞 (Annexin-FITC-/PI⁻), 右上象限表示凋亡中晚期细胞 (Annexin-FITC+/PI⁺), 右下象限表示早期凋亡细胞 (Annexin-FITC+/PI⁻)。凋亡率为右上象限与右下象限细胞占总细胞数的比例。结果如图 1 所示, 单用塞来昔布 10 $\mu\text{mol/L}$ 和茶多酚 (50、100 $\mu\text{g/mL}$) 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h, 细胞凋亡率分别为 13.54%、9.91% 和 17.63%, 均高于阴性对照组。塞来昔布与茶多酚 (50、100 $\mu\text{g/mL}$) 合用时的凋亡率增至 13.82% 和 27.72%。结果表明, 塞来昔布与茶多酚均能诱导细胞凋亡, 两者联合使用可使凋亡率增加。



A: 阴性对照组; B: 塞来昔布 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组; C: 茶多酚 (50 $\mu\text{g/mL}$) 组; D: 茶多酚 (50 $\mu\text{g/mL}$) + 塞来昔布 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组; E: 茶多酚 (100 $\mu\text{g/mL}$) 组; F: 茶多酚 (100 $\mu\text{g/mL}$) + 塞来昔布 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组

图 1 塞来昔布联合茶多酚对 MDA-MB-231 细胞凋亡率的影响

Fig 1 The effects of celecoxib combined with tea polyphenols on the apoptosis rate of breast cancer cell MDA-MB-231

3 讨论

近年来 COX-2 抑制剂的抗肿瘤活性引起了广泛关注。已有研究表明, 在包括乳腺癌在内的多种肿瘤组织中均存在 COX-2 高表达现象, 其与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移及血管生成等密切相关^[5]。选择性的 COX-2 抑制剂塞来昔布通过抑制 COX-2 的表达, 能有效防治乳腺癌、前列腺癌、肺癌等多种癌症^[6-7], 但长期大剂量使用引起的心脏毒性

限制了其临床应用^[8]。茶多酚是从茶叶中分离出来的多羟基酚类化合物的混合物, 体内及体外实验证实茶多酚可通过阻滞细胞周期, 抑制端粒酶活性, 诱导细胞凋亡等途径发挥抗肿瘤作用^[9], 其与多种化疗药物合用可产生协同作用^[10]。

本实验中, 为降低不良反应同时最大限度增加抗肿瘤作用, 选择低浓度塞来昔布 (10 $\mu\text{mol/L}$) 与不同浓度茶多酚 (6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 合用。

结果显示,应用塞来昔布($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)24、48 h 的抑制率分别为 $(2.08\pm 0.10)\%$ 和 $(5.78\pm 0.36)\%$,说明低浓度塞来昔布仅能较弱地抑制细胞生长。茶多酚能够抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖并呈现时间和剂量依赖性,这与茶多酚抗癌效应的报道相符^[1]。两药合用能明显增强单药的细胞增殖抑制作用,差异具有统计学意义($P<0.05$)。值得注意的是塞来昔布与 50 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的茶多酚合用 48 h 后,细胞增殖抑制率达到 $(60.36\pm 0.37)\%$ 和 $(79.73\pm 0.26)\%$,提示低浓度的塞来昔布与高浓度的茶多酚合用能有效抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖。通过 Hoechst33258 荧光染色可直接观察到核固缩,核染质凝聚等典型凋亡形态学特征,且联合用药组的凋亡细胞明显多于各单药组。AnnexinV-FITC/PI 双染结果显示,合用组的细胞凋亡率明显高于各单药组,进一步说明两药均能诱导乳腺癌细胞凋亡,且两药合用具有协同诱导细胞凋亡的作用。以上结果提示,塞来昔布与茶多酚合用引起细胞增殖抑制的方式之一为诱导细胞凋亡。

两种非细胞毒药物合用为乳腺癌的预防和治疗提供了新的思路,但塞来昔布与茶多酚合用抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡的具体机制还不明确,有待进一步地研究,以期为临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 罗湘,史艳侠,李志铭,等.三阴乳腺癌的临床病理特征和预后分析[J].中国癌症杂志,2009,19(7): 517
- [2] Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, et al. Recent advances on tea

- polyphenols[J]. Front Biosci, 2012, 4: 111
- [3] Suganuma M, Saha A, Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs[J]. Cancer Sci, 2011, 102(2): 317
- [4] Glover J A, Hughes C M, Cantwell M M, et al. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 105(1): 13
- [5] 刘美兰,李乐云,于小珍. COX-2 和 mPGES-1 与肿瘤关系的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(14): 1134
- [6] Basu G D, Pathangey L B, Tindler T L, et al. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(4): R422
- [7] Abedinpour P, Baron V T, Welsh J, et al. Regression of prostate tumors upon combination of hormone ablation therapy and celecoxib in vivo[J]. Prostate, 2011, 71(8): 813
- [8] Solomon S D, McMurray J J, Pfeffer M A, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention[J]. N Engl J Med, 2005, 352(11): 1071
- [9] 陈淑珍,甄永苏. 茶多酚的分子作用靶点及其在抗肿瘤药物实验治疗中的作用[J]. 药学报, 2013, 48(1): 1
- [10] Du G J, Wang C Z, Qi L W, et al. The synergistic apoptotic interaction of panaxadiol and epigallocatechin gallate in human colorectal cancer cells[J]. Phytother Res, 2013, 27(2): 272
- [11] Thangapazham R L, Singh A K, Sharma A, et al. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1/2): 232

(2013-09-23 收稿)

+++++

《天津医科大学学报》编辑部网络采编办公系统开通运行通知

各位作者您好!为提高稿件处理和办公效率,《天津医科大学学报》编辑部将从 2014 年 2 月开始使用网络采编办公系统。

作者投稿采用新的网络平台(<http://tyxb.tmu.edu.cn/>),不再使用纸质投稿,特此公告,望作者们予以支持与合作。

在使用网络投稿系统中您有任何疑问、意见和建议,请您电话 022-83336719;022-83336803 或者发邮件到 xuebao@tjmu.edu.cn。

注意:投稿作者请详细阅读网站首页——左侧栏目——作者园地相关说明,谢谢!

(本刊编辑部)