

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.024

积雪草甙对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 VEGF、bFGF 蛋白表达水平的影响*

刘晨旭¹ 秦思达² 徐涛¹ 张珣¹ 潘龙毅¹

(1 西安市中心医院 心胸外科 陕西 西安 710003; 2 西安交通大学第一附属医院 胸外二科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨积雪草甙对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 VEGF、bFGF 蛋白表达水平的影响。**方法:**选取人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞系进行体外培养后,根据是否进行积雪草甙干预而分为两组,应用积雪草甙进行干预后,HE 染色后用光学显微镜法观察细胞形态学变化,干预后的 24h、48h 以及 72h 时,应用 TUNEL 技术对细胞凋亡情况进行检测,同时应用免疫荧光法检测血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达。**结果:**① 与对照组相比较,积雪草甙干预的乳腺癌 MCF-7 细胞出现空泡、胞质外溢以及胞核皱缩等细胞凋亡现象,大量癌 MCF-7 细胞发生破碎死亡;② TUNEL 技术法检测结果证实积雪草甙能够提高人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡率,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),且呈时间依赖性;③ 积雪草甙干预的 MCF-7 细胞 VEGF 阳性表达和 bFGF 阳性表达显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),积雪草甙的抑制作用且呈时间依赖性。**结论:**积雪草甙不仅能够促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡,而且能够降低 VEGF 和 bFGF 表达。

关键词:积雪草甙;乳腺癌;MCF-7;血管内皮细胞生长因子;碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1314-04

Effects of Asiaticoside on the Apoptosis and Expressions of VEGF and bFGF in MCF-7 Cells*

LIU Chen-xu¹, QIN Si-da², XU Tao¹, ZHANG Xun¹, PAN Long-yi¹

(1 Department of cardiothoracic surgery, Xi'an Central Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

2 The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, the two Department of thoracic surgery, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of asiaticoside on apoptosis and expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in MCF-7 cells during the treatment of the Mammary cancer. **Methods:** Human breast cancer MCF-7 cell lines were cultivated in vitro and then divided into control and treatment groups based on whether application of asiaticoside intervention. After the application of asiaticoside intervention, cell morphological changes were stained by HE staining method and observed by optical microscopy. TUNEL method was used to detect the cell apoptosis and immuno fluorescence method was used to detect the expression levels of VEGF and bFGF after the intervention 24 h, 48 h and 72 h by asiaticoside. **Results:** (1) Compared with control group, breast cancer MCF-7 cells presented vacuoles, cytoplasm spillover, nucleus shrinkage, cell broken and so on apoptosis phenomenons in the treatment group. (2) The TUNEL assay confirmed the asiaticoside treatment could improve human breast cancer cell apoptosis rate, and the rate presented time-dependent relations. Besides, the rate was significantly higher than that in control group ($P<0.05$); (3) The positive expression of VEGF and bFGF in cells after asiaticoside intervention were time-dependent and significantly lower than that in the control group ($P<0.05$); **Conclusion:** The asiaticoside could not only significantly promote the apoptosis of breast cancer cells, but also could reduce the expression of VEGF and bFGF.

Key words: Asiaticoside; Breast cancer; MCF-7 cell line; VEGF ; bFGF

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1314-04

前言

乳腺癌为临床最常见的妇女恶性肿瘤之一,近年来其发病率逐渐上升,并且呈年轻化趋势^[1]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)为体内血管生成相

关的重要正性调控因子,在多种实体肿瘤中均呈高表达^[2,3],而且研究显示其表达水平与肿瘤的恶性度以及预后具有密切关系^[4]。本研究通过对乳腺癌细胞的形态学变化、凋亡情况以及 VEGF 和 bFGF 蛋白表达进行观察分析,来探究积雪草甙对于乳腺癌细胞凋亡的影响,现将结果报道如下。

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2003C2053)

作者简介:刘晨旭(1980-),男,硕士,主治医师,研究方向:食管癌、肺癌的综合治疗,电话:13572225682, E-mail: luningys2222@163.com

(收稿日期:2017-05-23 接受日期:2017-06-18)

1 资料与方法

1.1 细胞来源

本实验中所应用的 MCF-7 人乳腺癌细胞株均有南方医科大学实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养液(生产单位为 Hyclone 公司);EDTA- 胰蛋白酶(生产单位为 Gibco 公司);细胞凋亡检测试剂盒(生产单位为 武汉博士德生物工程有限公司);鼠抗人 VEGF 多克隆抗体(生产单位为 Santa Cruz 公司);兔抗人 bFGF 多克隆抗体(生产单位为 Santa Cruz 公司);冷冻离心机(德国 Hermle 生产的 ZK-380)以及培养板(生产单位为 Gibco 公司)。积雪草甙(南京军区福州总医院药理科植化室提供)。

1.3 细胞培养方法

MCF-7 细胞株放置在 RPMI-1640 培养液中 (内含浓度为 10%新鲜小牛血清和 100 U/mL 的青 - 链霉素)进行培养,培养箱条件为 5 % CO₂,37 °C 恒温。每 48 小时 -72 小时进行 1 次培养液更换,应用 EDTA- 胰蛋白酶消化后进行传代培养。

1.4 HE 染色以及细胞形态观察

将 MCF-7 细胞转移到 6 孔板中,每孔按照 5×10^5 个进行细胞接种,每孔 5 mL,设立空白对照组和试验组各 3 孔,空白对照组仅添加培养液,试验组在此基础上给予经过倍比法稀释积雪草甙稀释液(浓度为 12 mmol/L)。在干预后的 24 h、48 h 以及 72 h 时,常规进行 HE 染色,利用光学显微镜进行细胞形态学观察。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

选用对数生长期 MCF-7 细胞,经胰蛋白酶消化后接种在 96 孔板上,放置培养箱中进行细胞培养。将积雪草甙进行倍比稀释获得终浓度为 12 mmol/L 的稀释液。甚至调零孔、对照孔以及实验孔,每组设 3 个复孔。实验孔每孔添加 100 μ L 积雪草

甙稀释液。对照孔仅添加培养液,分别培养,在培养 24 h、48 h、72 h 后,分别去除培养液,添加 TUNEL 反应液后,继续培养 1 小时后,添加转换液在进行温育 30 min,添加 DAB 显色剂,利用光学显微镜对细胞凋亡情况进行观察。凋亡细胞可见细胞核中出现棕黄色颗粒者。计数 1000 个细胞,凋亡细胞阳性率=(凋亡细胞数目 $\div$ 1000) $\times$ 100%。

1.6 免疫荧光法检测 VEGF 和 bFGF 蛋白表达

MCF-7 细胞经过常规培养后,添加积雪草甙稀释液,再向细胞中加入鼠抗人 VEGF 或兔抗人 bFGF 多抗(稀释比例为 1:200),放置在 4 °C 湿盒内孵育过夜;取出恢复到室温,加入荧光标记二抗(稀释比例为 1:500),封片剂进行封片后,利用荧光显微镜下进行表达结果观察。每张片子随即选取 5 个视野进行蛋白阳性表达率计算。阴性对照为未添加一抗者。根据文献 bFGF 蛋白阳性主要集中在细胞质之中,细胞膜表面偶见少量表达,阳性表达标准为可见棕黄色颗粒;VEGF 阳性表达主要位于细胞质,呈棕黄色颗粒。

1.7 统计学方法

实验数据统计学分析采用 SPSS.19.0 软件,组间计量资料比较使用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 积雪草甙对乳腺癌细胞形态的影响

对照组细胞外观呈不规则形态,多为铺路石状、菱形以及三角形(图 1)。试验组细胞在干预 24 h 时,多数细胞可见密集型空泡出现,部分细胞成为死亡细胞,细胞膜出现扩张,细胞质向外扩散(图 1);干预 48 h 时,大部分细胞失去不规则形态,细胞膜消失,细胞质扩散,细胞核和细胞质发生融合;干预 72 h 时,细胞核消失,细胞无完整形态,形成凋亡小体(图 2);以上变化符合细胞凋亡的形态特点,属于典型性凋亡效应。

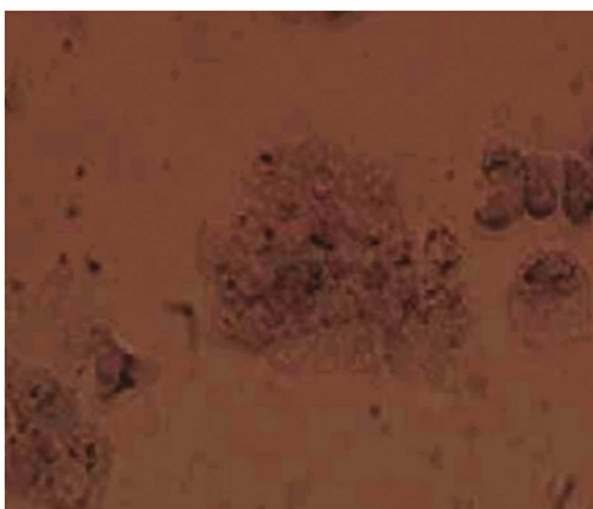


图 1 MCF-7 细胞出现空泡

Fig.1 Cavitation in MCF-7 cell

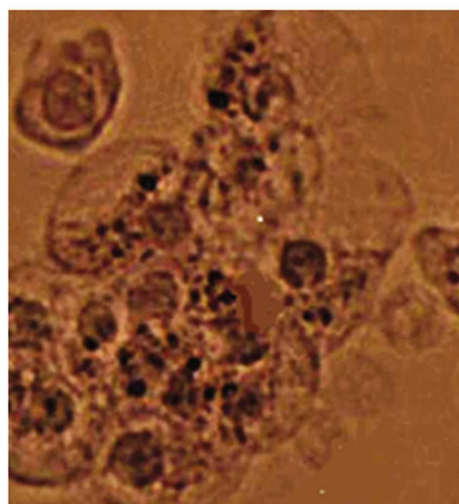


图 2 MCF-7 细胞可见凋亡小体

Fig.2 The apoptotic body in MCF-7 cell

2.2 两组 MCF-7 细胞凋亡率的比较

在相同时间点,试验组的细胞凋亡率均显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。方差分析结果显示积雪草甙

能够促进肿瘤 MCF-7 细胞凋亡,而且其促进 MCF-7 细胞凋亡的效果与作用时间呈正比关系 ($P < 0.05$),即作用时间越长,MCF-7 细胞凋亡率越高。详见表 1。

表 1 两组 MCF-7 细胞凋亡率情况比较

Table 1 Comparisons of MCF-7 cell apoptosis rate between two groups

Groups	24 h(%)	48 h(%)	72 h(%)
Experimental group	15.68± 2.35*	21.4± 3.58*	32.63± 5.87* [#]
Control group	2.27± 0.61	2.44± 0.57	2.67± 0.84

注: * 与对照组比较 P<0.05; [#] 与培养 24 h 相比 P<0.05; * 与培养 48 h 相比 P<0.05。

Note: * Compared with the control group P<0.05; [#] Compared with values at incubation 24 h P<0.05; * Compared with values at incubation 48 h P<0.05.

2.3 两组 MCF-7 细胞 VEGF 和 bFGF 表达比较

本实验中, VEGF 和 bFGF 阳性表达主要为细胞质内可见棕黄色颗粒。与对照组相比, 试验组 MCF-7 细胞内 VEGF 和

bFGF 蛋白阳性表达率显著降低。方差分析结果显示 VEGF 和 bFGF 阳性表达量随着干预时间延长, 表达率持续明显降低, 差异具有统计学意义(P<0.05)。详见表 2、表 3。

表 2 两组 MCF-7 细胞 VEGF 蛋白表达阳性率的比较

Table 2 Comparison of the positive rate VEGF protein expression between two group

Groups	24 h(%)	48 h(%)	72 h(%)
Experimental group	58.27± 10.17*	34.85± 8.24* [#]	21.88± 7.53* [#]
Control group	92.47± 15.84	91.28± 18.83	93.26± 17.62

注: 与对照组比较, *P<0.05; [#] 与培养 24 h 相比 P<0.05; * 与培养 48h 相比 P<0.05。

Note: Compared with the control group, *P<0.05; [#] Compared with values at incubation 24 h P<0.05; * Compared with values at incubation 48 h P<0.05.

表 3 两组 MCF-7 细胞 bFGF 蛋白表达阳性率的比较

Table 3 Comparison of the positive rate bFGF protein expression between two group

Groups	24 h(%)	48 h(%)	72 h(%)
Experimental group	56.21± 9.65*	38.29± 6.64*	21.26± 6.78* [#]
Control group	84.71± 10.63	87.28± 12.68	82.97± 11.69

注: 与对照组比较, *P<0.05; [#] 与培养 24 h 相比 P<0.05; * 与培养 48h 相比 P<0.05。

Note: Compared with the control group, *P<0.05; [#] Compared with values at incubation 24 h P<0.05; * Compared with values at incubation 48 h P<0.05.

3 讨论

目前, 临床治疗乳腺癌尚无特效的根治性方法, 主要原则是控制肿瘤侵袭和转移, 防止病情进一步恶化^[5]。有研究认为乳腺癌的发生发展与基因调控、细胞凋亡以及血管生成具有密切关联^[6]。VEGF 对于血管生成具有促进作用, 在病理情况下, 由于巨噬细胞以及肿瘤细胞等刺激作用, VEGF 表达水平显著上升, 其通过以相应受体进行结合, 能够对肿瘤细胞的增殖、转移以及新生血管形成起到促进作用, 同时显著提高血管通透性, 为肿瘤细胞的远处转移, 提供有利条件^[11-14]。bFGF 作为体内重要的细胞因子之一, 能够与细胞膜特异性受体相结合, 对于细胞的生长过程起到干预作用^[7,15]。相关研究发现当机体发生恶性肿瘤时, 肿瘤细胞能够诱导生成过量的 bFGF, 通过其血管诱导作用以及抑制丝裂原和凋亡的功效, 从而降低肿瘤细胞凋亡率, 促进肿瘤转移^[16]。VEGF 和 bFGF 在多种实体肿瘤中均呈高表达, 且与肿瘤的生长转移以及浸润具有重要关联^[17]。

中药积雪草属于伞形科植物, 在《神农本草经》中被列为中品, 其具有清热解毒、消肿散结的作用^[18]。积雪草甙作为积雪草的有效成分之一, 不仅能够促进创面愈合、抑制瘢痕形成, 而且能够保护神经功能, 最近相关研究发现积雪草苷具有强效抗肿瘤作用能够对肿瘤细胞的增殖和凋亡进行干预^[19,20]。本实验中, 与未经干预处理的对照组细胞相比, 积雪草甙能够促进肿瘤 MCF-7 细胞凋亡。良渚的 MCF-7 细胞凋亡率比较显示: 与对照组 MCF-7 细胞相比, 经过积雪草甙处理的 MCF-7 细胞凋亡率显

著上升, 在相同的观察时间点, 试验组 MCF-7 细胞凋亡率显著高于对照组, 提示积雪草甙能够提高肿瘤 MCF-7 细胞凋亡率。此外, 积雪草甙处理后的乳腺癌细胞其 VEGF 蛋白阳性表达率和 bFGF 蛋白阳性表达率显著低于对照组, 提示积雪草甙能够抑制乳腺癌 MCF-7 细胞 VEGF 和 bFGF 表达, 可能对于肿瘤新生血管形成具有显著的抑制作用。

综上所述, 积雪草甙不仅能够促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡, 而且能够降低 VEGF 和 bFGF 表达, 可能抑制乳腺癌血管新生, 有望成为乳腺癌治疗的新方法。

参考文献(References)

- [1] 邹晓, 李振凤, 程广, 等. 乳腺癌易感基因 BRCA1 与 BRCA2 的研究进展[J]. 青岛医药卫生, 2011, 43(4): 286-289
Zou Xiao, Li Zhen-feng, Cheng Guang, et al. Susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 in breast cancer research progress [J]. Qingdao medicine, 2011, 43(4): 286-289
- [2] 宋长城, 吕祥, 程彬彬, 等. 蜂毒素对人肝癌 BEL-7402 细胞裸鼠皮下移植瘤生长及肿瘤血管生成的影响 [J]. 中国肿瘤杂志, 2007, 26(12): 1315-1322
Song Chang-cheng, Lu Xiang, Cheng Bin-bin, et al. Effects of bee venom on the growth and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells in nude mice[J]. Chinese Journal of Cancer, 2007, 26(12): 1315-1322
- [3] 周红凤, 吴瑾, 陈桂云, 等. 乳腺癌组织和血清中 VEGF、bFGF 的表达和微血管密度的关系 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(3): 248-252

- Zhou Hong-feng, Wu Jin, Chen Gui-yun, et al. The relationship between the expression of VEGF, bFGF and microvessel density in breast cancer tissues and serum [J]. Journal of Harbin Medical University, 2012, 46 (3): 248-252
- [4] 刘滨,刘威,范海涛,等.HGF 及其受体 C-Met 和 VEGF 与星形细胞肿瘤恶性程度及其血管生成之间的关系[J].山东大学学报:医学版, 2011, 49(2): 109-113
- Liu Bin, Liu Wei, Fan Hai-tao, et al. The relationship between HGF and its receptor C-Met and VEGF in the malignant degree and angiogenesis of astrocytoma [J]. Journal of Shandong University: Medical Edition, 2011, 49 (2): 109-113
- [5] 韦斯军,韦华,李天资,等.多西他赛治疗晚期浸润性转移乳腺癌的临床研究[J].中国医药指南, 2009, 7(10): 61-62
- Wei Si-jun, Wei Hua, Li Tian-zi, Jun, et al. The metastasis of breast cancer invasion and clinical study of docetaxel in patients with advanced [J]. China medical guide, 2009, 7(10): 61-62
- [6] 杨光,李杰,陈云波.COX-2 与乳腺癌的关系研究进展[J].中国实验诊断学, 2009, 13(7): 988-991
- Yang Guang, Li Jie, Chen Yun-bo. Research progress on the relationship between COX-2 and breast cancer [J]. Chinese Journal of laboratory diagnosis, 2009, 13 (7): 988-991
- [7] Kuchenbaecker K B, Ramus S J, Tyrer J, et al. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer [J]. Nature genetics, 2015, 47(2): 164-171
- [8] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials[J]. The Lancet, 2015, 386(10001): 1353-1361
- [9] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. Retraction Notice to: A Pleiotropically Acting MicroRNA, miR-31, Inhibits Breast Cancer Metastasis[J]. Cell, 2015, 161(2): 417
- [10] Sikov W M, Berry D A, Perou C M, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance)[J]. Journal of Clinical Oncology, 2015, 33(1): 13-21
- [11] Chlebowski R T, Rohan T E, Manson J A E, et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin and estrogen alone: analyses of data from 2 women's health initiative randomized clinical trials [J]. JAMA oncology, 2015, 1(3): 296-305
- [12] Yoshioka T, Hosoda M, Yamamoto M, et al. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. Breast cancer, 2015, 22(2): 185-191
- [13] Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, et al. Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12[J]. Annals of Oncology, 2015, 26(2): 313-320
- [14] Burandt E, Grünert M, Lebeau A, et al. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer [J]. Breast Cancer, 2016, 23 (1): 111-119
- [15] Swain S M, Baselga J, Kim S B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(8): 724-734
- [16] Rock C L, Flatt S W, Byers T E, et al. Results of the exercise and nutrition to enhance recovery and good health for you (ENERGY) trial: a behavioral weight loss intervention in overweight or obese breast cancer survivors [J]. Journal of Clinical Oncology, 2015, 33 (28): 3169-3176
- [17] Francis P A, Regan M M, Fleming G F, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer [J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(5): 436-446
- [18] Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 [J]. Annals of oncology, 2015, 26(2): 259-271
- [19] Eirew P, Steif A, Khattra J, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution [J]. Nature, 2015, 518(7539): 422-426
- [20] Wagenblast E, Soto M, Gutiérrez-Ángel S, et al. A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis[J]. Nature, 2015, 520(7547): 358-362
- (上接第 1338 页)
- [10] Yu KH, Levine DA, Zhang H, et al. Predicting Ovarian Cancer Patients' Clinical Response to Platinum-Based Chemotherapy by Their Tumor Proteomic Signatures [J]. J Proteome Res, 2016, 15 (8): 2455-2465
- [11] Feng Z, Wen H, Ju X, et al. Expression of hypothalamic-pituitary-gonadal axis-related hormone receptors in low-grade serous ovarian cancer (LGSC)[J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1): 7
- [12] Chen X, Wang X, Wei X, et al. EphA5 protein, a potential marker for distinguishing histological grade and prognosis in ovarian serous carcinoma[J]. J Ovarian Res, 2016, 9(1): 83
- [13] Kåbel M, Piskorz AM, Lee S, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma[J]. J Pathol Clin Res, 2016, 2(4): 247-258
- [14] Kaldawy A, Segev Y, Lavie O, et al. Low-grade serous ovarian cancer: A review[J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(2): 433-438
- [15] Liang L, Jiang Y, Chen JS, et al. B7-H4 expression in ovarian serous carcinoma: a study of 306 cases[J]. Hum Pathol, 2016, 57: 1-6
- [16] Fu Y, Biglia N, Wang Z, et al. Long non-coding RNAs, ASAP1-IT1, FAM215A, and LINC00472, in epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(3): 642-649
- [17] Ciucci A, Zannoni GF, Buttarelli M, et al. Ovarian low and high grade serous carcinomas: hidden divergent features in the tumor microenvironment[J]. Oncotarget, 2016, 7(42): 68033-68043
- [18] 李晶,黄三钱,钟晶敏,等.ER/PR 阳性和阴性乳腺癌的定量蛋白质组学和生物信息学比较研究[J].现代生物医学进展, 2016, 16(32): 6387-6393
- Li Jing, Huang San-qian, Zhong Jing-min, et al. Comparative Quantitative Proteomic and Bioinformatics Study of ER/PR Positive and Negative Breast Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(32): 6387-6393