

鳖甲-莪术药对含药血清对 MCF-7 人乳腺癌细胞的影响

胡雅清¹, 陈腾祥¹, 张金娟¹, 谢青², 张晨宇¹, 朱曼荆¹, 谢甦^{2*}
(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: **目的** 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨鳖甲-莪术药对含药血清对乳腺癌细胞增殖的抑制作用。**方法** 细胞悬液加入不同剂量的鳖甲含药血清、莪术含药血清、鳖甲-莪术药对含药血清孵育 48、72 h 后, 用 MTT 法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞周期, Western blot 法检测 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达。**结果** 与空白血清组比较, 各含药血清组处理 48、72 h 均可抑制细胞增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$); 处理 48 h 后, 其 G0/G1 期细胞比例增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)、S 期细胞比例降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 各组含药血清对 MCF-7 细胞的增殖均有抑制作用。此外, 鳖甲-莪术药对抑制作用高于单独用药, 其抗乳腺癌的机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 的表达, 下调 β -catenin 以及 β -catenin 下游靶基因 cyclin D1、c-Myc 蛋白表达有关。

关键词: 鳖甲; 莪术; 药对; 含药血清; 乳腺癌; MCF-7 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2599-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.011

Effects of serum medicated with *Trionycis Carapax-Zedoary Turmeric* drug pair on MCF-7 human breast cancer cells

HU Ya-qing¹, CHEN Teng-xiang¹, ZHANG Jin-juan¹, XIE Qing², ZHANG Chen-yu¹, ZHU Man-jing¹, XIE Su^{2*}
(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. The Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: AIM The investigation on the inhibitory effect of *Trionycis Carapax-Zedoary Turmeric* drug pair to the proliferation of breast cancer cells was carried out via Wnt/ β -catenin signaling pathway. **METHODS** Upon cell suspensions incubated with different doses of serum containing *Trionycis Carapax*, serum containing *Zedoary Turmeric*, and serum containing *Trionycis Carapax-Zedoary Turmeric* drug pair for 48 hours and 72 hours, MTT assay was used to determine their inhibition rate on cell proliferation, flow cytometry was performed to detect the cell cycle, and Western blot was used to detect the protein expression of β -Catenin, c-Myc, and cyclin D1. **RESULTS** Compared with the blank serum group, all groups treated with medicinal agents found their inhibition on cell proliferation after 48 and 72 h treatment ($P<0.05$, $P<0.01$). After 48 h incubation, we observed an increase in the proportion of G0/G1 phase cells ($P<0.05$, $P<0.01$), a decrease in the proportion of S-phase cells ($P<0.05$, $P<0.01$), and reduced protein expression of β -Catenin, c-Myc, and cyclin D1 protein ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Each group under treatment of medicated serum displays proliferation inhibition of the MCF-7 cells. In addition, an overall higher inhibitory effect on breast cancer can be observed in the group intervened with serum treated with *Trionycis Carapax-Zedoary Turmeric* drug pair other than the groups dosed with the

收稿日期: 2019-11-19

基金项目: 贵州省中医药管理局项目 (QZYY2017-005); 贵阳市科技计划项目 (筑科合同 [2017] 30-39)

作者简介: 胡雅清 (1994—), 女, 硕士生, 从事中医药防治恶性肿瘤的基础及临床研究。E-mail: 543003482@qq.com

* 通信作者: 谢甦 (1969—), 女, 博士, 教授, 主任医师, 从事中医药防治恶性肿瘤的基础及临床研究。E-mail: 972254428@qq.com

网络出版日期: 2020-01-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200116.1407.002.html>

single raw materia medica. The anti-breast cancer mechanism may lie in the inhibition of β -catenin expression in Wnt/ β -catenin signaling pathway, and the down-regulation of β -catenin and β -catenin downstream target gene protein expression cyclin D1 and cMyc.

KEY WORDS: *Trionycis Carapax*; *Zedoary Turmeric*; drug pair; drug-containing serum; breast cancer; MCF-7 cells

如今癌症已成为威胁人类生存和社会发展的主要疾病之一,在不同地域不同人群中,乳腺癌也都是备受关注的主要癌症。在全球著名学术刊物《CA: A Cancer Journal for Clinicians》发布的美国 2018 年癌症统计报告中显示,女性新发癌症病例的 30% 都是乳腺癌,远远超过其他癌症,同时我国国家癌症中心发布的癌症负担最新结果表明,乳腺癌也位居女性癌症发病率首位^[1]。鳖甲-莪术药对是国医大师刘尚义治疗恶性肿瘤的常用组合,使用频次最多,达 1 201 次,已有十余年临床应用实践,但尚缺乏分子水平药理学研究^[2-4]。鳖甲味咸、性微寒,归肝肾经,能滋阴潜阳、退热除蒸、善于软坚散结^[5];莪术味辛、苦,性温,归肝、脾经,有行气破血、消积止痛之功效^[6];鳖甲味咸而补益属阴,莪术味辛而走散属阳;鳖甲滋阴散结,莪术行气破血,两药合用,一补一攻、寒温相宜、阴阳相适、为消积聚癥瘕之要药^[7]。本实验基于 Wnt/ β -catenin 信号通路,探讨鳖甲-莪术药对含药血清对乳腺癌细胞增殖的抑制作用。

1 材料

1.1 细胞株 MCF-7 人乳腺癌细胞株,由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 55 只,体质量 220~260 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)2014-0011,动物质量合格证号 43006700016478。

1.3 药物 醋鳖甲颗粒剂(批号 8127093)、莪术颗粒剂(批号 8071933)均购自广东一方制药有限公司。

1.4 试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,货号 8119234);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,货号 19080505);BD Pharmingen 流式周期试剂盒(美国 Sigma 公司,货号 9039585);噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,货号 725c056);胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,货号 2046777);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,货号 J190003);5-氟尿嘧啶 MB1273

(大连美仑生物有限公司,货号 s0808a);Anti-Cyclin D1 抗体(英国 Abcam 公司,货号 GR3212345-11,稀释倍数 1/10 000);Anti-c-Myc 抗体(英国 Abcam 公司,货号 GR3232703-2,稀释倍数 1/1 000);Anti-beta Catenin 抗体(英国 Abcam 公司,货号 GR184212-61,稀释倍数 1/5 000)。

1.5 仪器 SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州净化设备有限公司);Model 310 恒温 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);16K 台式自动离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);Allegra 64R Centrifuge 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);EPICL XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);ChemiDoc MP 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);MiniVE 电泳仪(美国 GE 公司);全自动雪花制冰机 IMS-40(常熟市雪科电器有限公司);MDF-382E 超低温冰箱(日本 SANYO 公司);KS130B 脱色摇床(德国 IKA 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 培养人乳腺癌细胞株 MCF-7 于含 10% 胎牛血清的 DME 培养基中,再将其置于 5% CO₂、37 ℃、饱和湿度细胞培养箱中培养,次日换液,倒置显微镜下观察细胞生长情况。当细胞生长到 70%~80% 时,可进行消化传代或用于实验。

2.2 药物血清制备 将大鼠随机分鳖甲组、莪术组、鳖甲-莪术药对组各 10 只,空白组 25 只,以给药剂量为其等效剂量的 20 倍计算,确定鳖甲给药剂量为 3 g/kg,莪术给药剂量为 1.5 g/kg,鳖甲-莪术药对给药剂量为 4.5 g/kg,每天 2 次,连续 7 d。最后 1 次给药前大鼠禁食不禁水 12 h,给药后 2 h 水合氯醛麻醉,心尖取血,2 000 r/min 离心 15 min 取血清,同组混合以消除个体差异,56 ℃ 下灭活 30 min,0.22 μ m 过滤除菌,-80 ℃ 下保存备用。

2.3 细胞分组 正常 MCF-7 细胞分为空白血清组(10% 空白血清+90% DMEM 培养基培养)、鳖甲低剂量组(2.5% 鳖甲血清+7.5% 空白血清+90%

DMEM 培养基培养)、鳖甲中剂量组 (5% 鳖甲血清+5%空白血清+90% DMEM 培养基培养)、鳖甲高剂量组 (10% 鳖甲血清+90% DMEM 培养基培养)、莪术低剂量组 (2.5% 莪术血清+7.5% 空白血清+90% DMEM 培养基培养)、莪术中剂量组 (5% 莪术血清+5% 空白血清+90% DMEM 培养基培养)、莪术高剂量组 (10% 莪术血清+90% DMEM 培养基培养)、鳖甲-莪术药对低剂量组 (2.5% 鳖甲-莪术药对血清+7.5% 空白血清+90% DMEM 培养基培养)、鳖甲-莪术药对中剂量组 (5% 鳖甲-莪术药对血清+5% 空白血清+90% DMEM 培养基培养)、鳖甲-莪术药对高剂量组 (10% 鳖甲-莪术药对血清+90% DMEM 培养基培养)、阳性对照组 (10% 空白血清+90% DMEM 培养基培养+10 mg/mL 氟尿嘧啶)。

2.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞,取 100 μL 浓度为 1×10^5 /mL 者接种于 96 孔培养板中,每组 5 个复孔,1 d 后加入饥饿培养液饥饿 24 h 使细胞同步化,换不同剂量 10% 空白血清培养基、鳖甲血清培养基、莪术血清培养基、鳖甲-莪术药对血清培养基和含 10 mg/mL 阳性药的空白血清培养基,在培养箱中分别培养 48、72 h。培养结束后,于相应时间点 在 96 孔板中加入 MTT 溶液 20 μL,在培养箱中继续培养 4 h 后,吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲基亚砷 (DM-SO) 150 μL,37 ℃ 下振荡 10 min,使结晶充分溶解,于 490 nm 波长处测定光密度 (OD),计算细胞增殖抑制率,公式为抑制率 = $(1 - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$,重复 3 次。

2.5 流式细胞术检测 MCF-7 细胞周期 取对数生长期的 MCF-7 细胞,取 1 mL 浓度为 1×10^5 /mL 者接种于 6 孔培养板中,1 d 后加入饥饿培养液饥饿 24 h 使细胞同步化,换不同剂量 10% 的空白血清培养基、鳖甲血清培养基、莪术血清培养基、鳖甲-莪术药对血清培养基和含 10 mg/mL 阳性药的空白血清培养基作用 48 h,根据细胞周期检测试剂盒说明书进行操作。

2.6 Western blot 检测 β-Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达 取对数生长期的 MCF-7 细胞,取 1 mL 浓度为 1×10^5 /mL 者胞接种于 6 孔培养板中,1 d 后加入饥饿培养液饥饿 24 h 使细胞同步化,换不同剂量 10% 空白血清培养基、鳖甲血清培养基、莪术血清培养基、药对血清培养基和含 10 mg/mL 阳性药的空白血清培养基作用 48 h,弃上清,PBS

冲洗 3 次,加入适量细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃、15 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法对所提总蛋白进行定量,规定上样量为 30 μg,加入 Loading Buffer 煮沸变性,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜,一抗 4 ℃ 下孵育过夜,二抗室温下孵育 2 h,ECL 化学发光液孵育。凝胶成像系统扫描,并定量分析条带光密度值。

2.7 统计学分析 运用 SPSS 20.0 统计软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组含药血清对 MCF-7 细胞增殖的影响 与空白血清组比较,各含药血清组作用 48、72 h 后均能抑制 MCF-7 细胞增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同一中药不同剂量的抑制率依次为高剂量组>中剂量组>低剂量组,而同一剂量不同中药抑制率依次为药对鳖甲-莪术含药血清组>莪术含药血清组>鳖甲含药血清组。见表 1。

表 1 含药血清对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab.1 Effect of medicated serum on the proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	抑制率/%	
	48 h	72 h
空白血清组	0	0
鳖甲低剂量组	7.96±0.04 *	8.31±0.00 **
鳖甲中剂量组	11.16±0.05 *	17.25±0.02 **
鳖甲高剂量组	13.47±0.07 *	20.83±0.03 **
莪术低剂量组	8.67±0.02 **	9.00±0.01 **
莪术中剂量组	11.67±0.04 *	18.31±0.03 **
莪术高剂量组	14.06±0.04 **	22.01±0.04 **
鳖甲-莪术药对低剂量组	8.71±0.03 *	9.35±0.03 **
鳖甲-莪术药对中剂量组	12.22±0.04 *	20.81±0.02 **
鳖甲-莪术药对高剂量组	16.41±0.02 **	24.86±0.04 **
阳性对照组	29.76±0.04 **	37.16±0.00 **

注:与空白血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
3.2 含药血清对 MCF-7 细胞周期的影响 与空白血清组比较,各含药血清组作用 48 h 后 G0/G1 期细胞比例增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),S 期细胞比例减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明各组含药血清作用 MCF-7 细胞后均可阻止 G1/G0 期的细胞顺利进入 S 期及 G2 期,从而使 MCF-7 细胞的有丝分裂过程受到干扰,导致其增殖受到抑制,且趋势与 MTT 一致。见图 1、表 2。

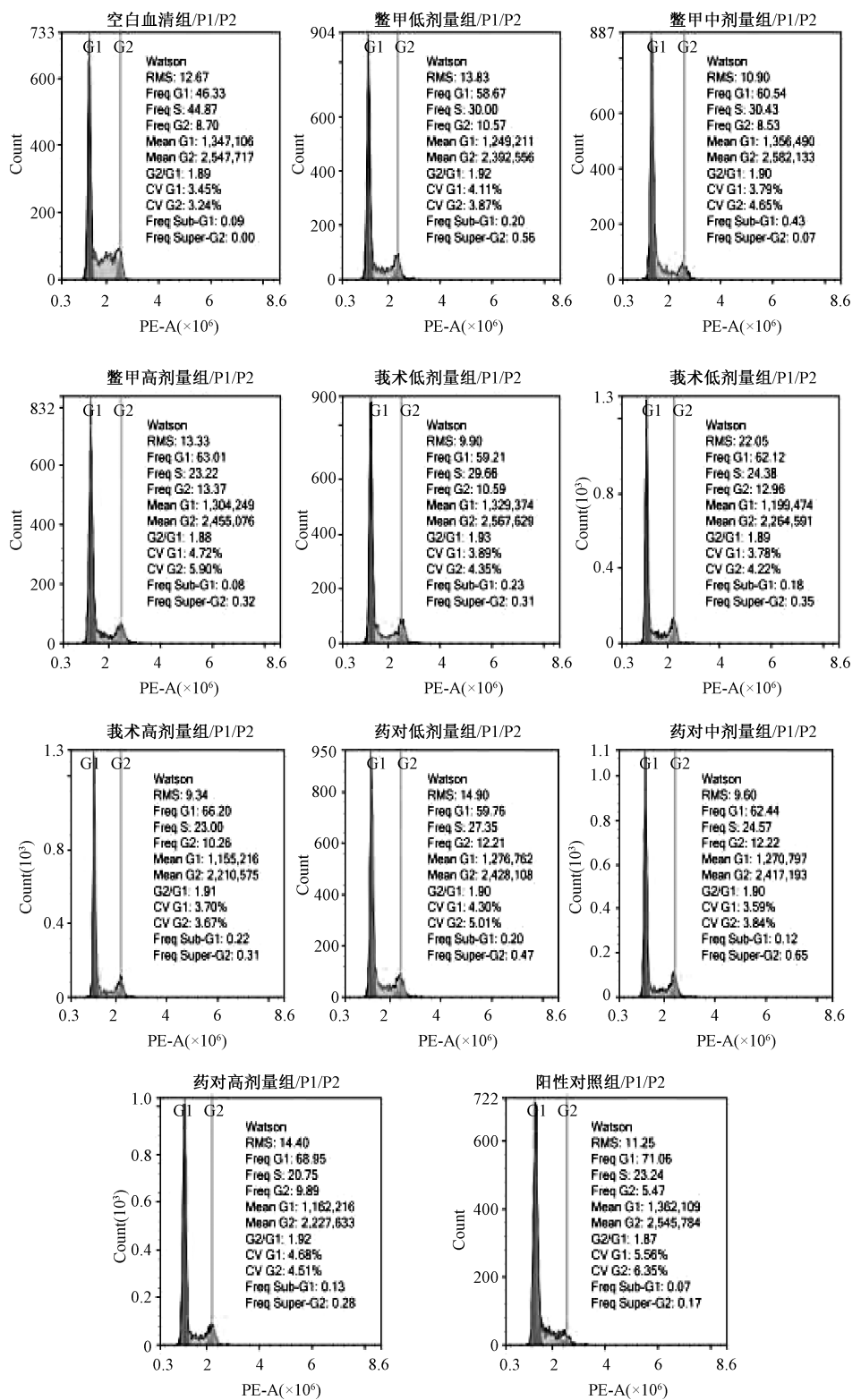


图 1 含药血清对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig.1 Effect of medicated serum on the cell cycle of MCF-7 cells

3.3 含药血清对 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响 与空白血清组比较, 各含药血清组作用 48 h 后 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明含药血清可抑制

Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 的表达, 下调靶基因 cyclinD1, c-Myc 的表达, 从而抑制 MCF-7 细胞增殖。见表 3~6、图 2。

表 2 含药血清对 MCF-7 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.2 Effect of medicated serum on the cell cycle of MCF-7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	细胞周期/%		
	G0/G1	S	G2
空白血清组	46.51±0.17	44.81±0.24	8.50±0.27
鳖甲低剂量组	53.85±4.22 *	37.74±6.71	7.93±2.41
鳖甲中剂量组	57.26±3.05 **	35.24±4.17 *	6.81±1.67
鳖甲高剂量组	60.68±3.93 **	32.18±7.90 *	6.78±5.98
莪术低剂量组	54.49±4.41 *	34.23±5.79 *	10.65±2.24
莪术中剂量组	59.02±3.27 **	31.73±7.43 *	8.75±4.16
莪术高剂量组	63.16±4.72 **	30.77±6.81 *	5.61±4.87
鳖甲-莪术药对低剂量组	55.25±4.26 *	35.35±7.04	8.86±2.92
鳖甲-莪术药对中剂量组	59.69±3.62 **	30.08±6.83 *	9.80±3.16
鳖甲-莪术药对高剂量组	65.50±2.92 **	26.10±4.92 **	7.27±4.29
阳性对照组	74.32±2.83 **	21.94±1.52 **	2.13±2.90 *

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 鳖甲含药血清对 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.3 Effects of serum medicated with *Trionycis Carapax* on the protein expressions of β -Catenin, c-Myc and cyclin D1 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	β -Catenin	c-Myc	cyclin D1
空白血清组	1.064 2±0.039 4	1.129 4±0.091 5	1.012 7±0.053 9
鳖甲低剂量组	1.003 7±0.062 9	0.970 9±0.060 5	0.921 6±0.031 2
鳖甲中剂量组	0.916 2±0.033 9 **	0.836 3±0.050 2 **	0.852 8±0.046 8 **
鳖甲高剂量组	0.854 5±0.054 7 **	0.813 0±0.050 5 **	0.835 6±0.045 0 **
阳性对照组	0.632 5±0.037 7 **	0.685 2±0.099 6 **	0.616 8±0.093 8 **

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 5 鳖甲-莪术药对含药血清对 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.5 Effects of serum medicated with *Trionycis-Carapax Zedoary Turmeric* on the protein expressions of β -Catenin, c-Myc and cyclin D1 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	β -Catenin	c-Myc	cyclin D1
空白血清组	0.904 0±0.050 0	1.037 7±0.040 4	1.126 7±0.055 1
鳖甲-莪术药对低剂量组	0.839 5±0.038 9	0.978 4±0.023 1	1.081 8±0.053 4
鳖甲-莪术药对中剂量组	0.648 1±0.115 4 *	0.893 8±0.012 3 **	0.960 4±0.032 1 **
鳖甲-莪术药对高剂量组	0.577 8±0.047 0 **	0.771 2±0.036 2 **	0.734 6±0.020 0 **
阳性对照组	0.608 0±0.083 5 **	0.519 8±0.010 0 **	0.628 7±0.075 7 **

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 6 各组高剂量含药血清对 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.6 Effects of each group treated with high-dose medicated serum on the protein expressions of β -Catenin, c-Myc and cyclin D1 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	β -Catenin	c-Myc	cyclin D1
空白血清组	0.851 3±0.029 5	1.010 3±0.019 2	1.193 2±0.033 2
鳖甲高剂量组	0.660 1±0.044 0 *	0.872 7±0.033 7 *	0.950 5±0.048 1 *
莪术高剂量组	0.516 9±0.025 5 **	0.818 5±0.034 7 *	0.910 4±0.023 1 **
鳖甲-莪术药对高剂量组	0.313 9±0.0533 **	0.733 0±0.050 2 **	0.622 2±0.086 1 **
阳性对照组	0.459 4±0.099 4 **	0.584 5±0.016 8 **	0.567 8±0.058 0 **

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

目前,血清药理学是研究中药复方抗肿瘤作用的有效方法,也是从细胞分子水平研究中药药理学

表 4 莪术含药血清对 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.4 Effects of serum medicated with *Zedoary Turmeric* on the protein expressions of β -Catenin, c-Myc and cyclin D1 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	β -Catenin	c-Myc	cyclin D1
空白血清组	1.513 5±0.060 8	1.335 2±0.042 9	1.429 4±0.038 0
莪术低剂量组	1.453 4±0.030 0	1.255 0±0.040 8	1.369 3±0.081 0
莪术中剂量组	1.182 6±0.061 4 **	1.114 8±0.099 0 *	1.059 2±0.059 5 **
莪术高剂量组	1.017 4±0.067 1 **	0.829 8±0.036 7 **	0.958 0±0.028 7 **
阳性对照组	0.610 4±0.057 7 **	0.660 5±0.039 0 **	0.476 9±0.099 4 **

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

4 讨论

西医认为,乳腺癌发病涉及多个因素的影响,该病的发生与生育史、性腺激素刺激、家族遗传史等因素有关;中医认为,正气不足是乳腺癌发病的根本原因,情志因素是乳腺癌发病的重要诱因,正气不足、情志内伤会引发脏腑功能严重异常,由于肝脏、肾脏、脾功能失调使气血运行紊乱,长期如此,痰瘀交阻于乳络,从而导致乳癌的发生^[8-9],癌毒耗损机体正气,日久则导致气阴两虚、痰瘀交阻。针对这一病理机制,刘老提出“阴阳双消、滋阴起亟”的治疗理念,并在此基础上以鳖甲-莪术药对为君药临床治疗乳腺癌上万例,疗效显著,可使患者获得较好的生存质量及较长的生存周期。

的新手段^[10],故本实验以其为理论指导探讨鳖甲-莪术药对含药血清治疗乳腺癌的机制。

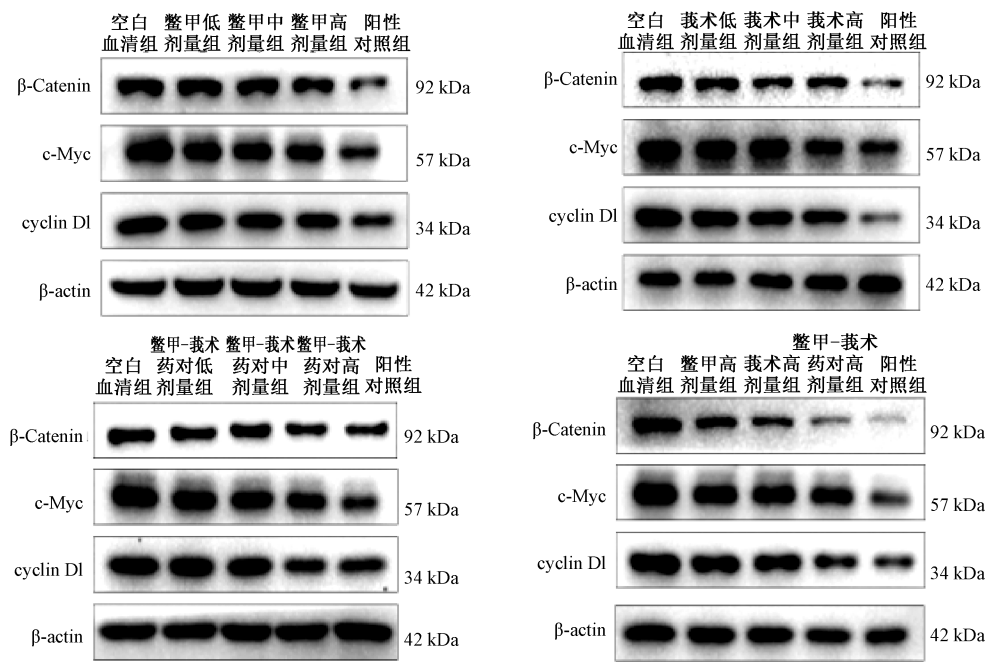


图 2 Western blot 检测 β -Catenin、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达
Fig. 2 Protein expressions of β -Catenin, c-Myc and cyclin D1 by Western blot

乳腺癌的发生及发展与 Wnt 信号通路功能失调有密切的关系, cyclin D1、c-Myc 是 Wnt 信号转导通路中至关重要的靶基因^[11-12], 研究表明抑癌基因失活和癌基因的激活可异常激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, β -catenin 降解障碍可导致 c-Myc 等靶基因激活及细胞周期调控出现异常, 从而导致乳腺癌的发生^[13]. cyclin D1 作为调控细胞周期 G1 期的关键蛋白之一, 其过度表达可以促进细胞由 G1 期进入 S 期, 促进细胞周期转换速度的加快, 最终引起细胞增殖失控, 导致癌变^[14]. c-Myc 基因既可刺激细胞增殖又可诱导细胞凋亡, 其作用是通过调节细胞由 G1 期进入 S 期完成的, 高水平的 c-Myc mRNA 可加快细胞进入 S 期的速度, 导致肿瘤的发生^[15].

综上所述, 各组含药血清均可抑制 MCF-7 细胞增殖, 促进其凋亡, 其抗乳腺癌的机制可能与下调 β -catenin 及 β -catenin 下游靶基因 cyclin D1、c-Myc 蛋白表达, 阻止 G1/G0 期的细胞顺利进入 S 期及 G2 期, 导致其增殖受到抑制有关。此外, 鳖甲-莪术药对的抑制作用高于单味药, 可能是配伍后相得益彰, 间接辅助某一功能发挥, 从而发挥协同增效的作用^[16]。由于乳腺癌形成的机制十分复杂, 涉及多种细胞、细胞因子以及多条信号通路, 因此鳖甲-莪术药对含药血清抗乳腺癌作用及其机制仍需进行大量体内外实验作进一步探讨。

参考文献:

[1] 王 翔, 秦 岭. 中国乳腺癌发病率增速为何全球第一? [N]. 北京科技报, 2018-03-05(32).

[2] 卫 蓉, 刘尚义. 刘尚义教授巧用对药抗肿瘤的体会[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(4): 2-4.

[3] 杨 柱, 唐东昕, 郭 斌, 等. 刘尚义治疗肿瘤用药经验数据挖掘分析[J]. 中医杂志, 2016, 57(19): 1641-1645.

[4] 陈云云. 刘尚义治疗恶性肿瘤经验[J]. 中医杂志, 2010, 51(S1): 109-110.

[5] 蒋华波, 陆 斌. 鳖甲在抗肝纤维化和抗肝癌作用中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1446-1450.

[6] 汤芷妮, 骆云鹏, 葛 菲, 等. 活血化瘀抗肿瘤中草药作用机制的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(8): 1146-1149.

[7] 唐广义, 殷东风. 中医“积证”与现代恶性肿瘤的关系[J]. 中医杂志, 2014, 55(6): 470-472.

[8] 刘志华, 何 成. 白花蛇舌草提取物对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用[J]. 四川生理科学杂志, 2012, 34(1): 6-8.

[9] 张小慧, 韩向晖, 刘 胜, 等. 温肾壮骨方对乳腺癌骨转移 Tac1/NK1R 通路蛋白的影响[J]. 中成药, 2014, 36(8): 1569-1573.

[10] 张灵娜, 林 兵, 宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2662-2666.

[11] Nwabo Kamdje A H, Takam Kanga P, Tagne Simo R, *et al.* Developmental pathways associated with cancer metastasis: Notch, Wnt, and Hedgehog[J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14

(2): 109-120.

[12] Marimuthu M, Andiappan M, Wahab A, *et al.* Canonical Wnt pathway gene expression and their clinical correlation in oral squamous cell carcinoma [J]. *Indian J Dent Res*, 2018, 29 (3): 291-297.

[13] Khalil S, Tan G A, Giri D D, *et al.* Activation status of Wnt/ β -catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues; relationship to HER2/neu expression in human and mouse [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33421.

[14] Kalvik T V, Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(3): 269-276.

[15] 潘泳岐, 高 原, 郝凤霞, 等. C-myc 参与 β -Catenin 介导的肺腺癌 A549/DDP 细胞的化疗耐药的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2013, 7(12): 5408-5414.

[16] 唐于平, 束晓云, 李伟霞, 等. 药对研究 (I) ——药对的形成与发展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (24): 4185-4190.

芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用

雷 昌^{1,2}, 黄 丹^{1,2}, 向 韵^{1,2}, 张秀丽^{1,2}, 孟 盼^{1,2}, 邹蔓姝^{1,2}, 王宇红^{1,2}, 凌成利^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 研究芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用。**方法** 芍药苷预先处理 PC12 细胞 1 h, 再加入 CoCl₂ 共孵育 24 h。采用 MTT 法检测 PC12 细胞存活率, 利用 DCFH-DA 探针、Annexin FITC-V/PI 双染法、JC-1 探针检测芍药苷 (100、200 μ g/mL) 对 PC12 细胞 ROS 水平、细胞凋亡率及线粒体膜电位值 (MMP) 的影响。**结果** CoCl₂ 诱导 PC12 细胞 24 h 后, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.2 mmol/L。与模型组比较, 200 μ g/mL 芍药苷提高 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞存活率 (*P*<0.05), 减少细胞内 ROS 水平 (*P*<0.05), 抑制细胞凋亡 (*P*<0.05), 提高 MMP (*P*<0.05)。**结论** 芍药苷对 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤有显著保护作用。

关键词: 芍药苷; 脑卒中; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2605-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.012

Protective effects of paeoniflorin on CoCl₂-induced oxidative stress injury of PC12 cells

LEI Chang^{1,2}, HUANG Dan^{1,2}, XIANG Yun^{1,2}, ZHANG Xiu-li^{1,2}, MENG Pan^{1,2}, ZHOU Man-shu^{1,2}, WANG Yu-hong^{1,2}, LING Cheng-li^{1,2*}

(1. Training Bases of Hunan Province & National Ministry Co-founded Key Laboratory for Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To study the protective effects of paeoniflorin on CoCl₂-induced oxidative stress injury of PC12 cells. **METHODS** PC12 cells previously subjected to 1h paeoniflorin pre-treatment were incubated with CoCl₂ for 24 h *in vitro*. PC12 cells had their survival rate detected by MTT method; and their ROS level, cell apoptosis rate and mitochondrial membrane potential (MMP) due to the effect of paeoniflorin (100, 200 μ g/mL)

收稿日期: 2020-02-21

基金项目: 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科资助项目 (2018); 湖南中医药大学中医学一级学科开放性基金项目 (2018ZYX48)

作者简介: 雷 昌 (1988—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药制剂研究。E-mail: 401583231@qq.com

* 通信作者: 凌成利 (1988—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药新制剂与新工艺。E-mail: 289632020@qq.com