

· 论著 ·

雀梅藤石油醚提取物诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的实验研究

冯志惠¹, 邓仪卿², 叶冰³, 安培², 张宏¹, 张海军¹ (1. 淮北师范大学生命科学学院创新药物研究中心, 安徽淮北 235000; 2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 3. 云南鸿仁堂健康管理有限公司呈贡中医门诊部, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 探讨雀梅藤石油醚提取物对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 石油醚提取物孵育乳腺癌细胞不同时间后, CCK8 法检测细胞活力, 平板克隆形成法检测细胞增殖, DAPI 染色法观察细胞核形态变化, 免疫荧光检测线粒体膜电位和活性氧变化, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡, CCK8 法观察对人正常血管内皮细胞毒性。结果 雀梅藤石油醚提取物孵育 BT549 和 MDA-MB-231 人三阴性乳腺癌细胞株 24 h 后的 IC₅₀ 分别为 45.40 μg/ml 和 12.23 μg/ml, 时间和剂量依赖地抑制乳腺癌细胞活力和克隆形成, 诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G1/S 期, 降低线粒体膜电位, 升高活性氧; 对人正常血管内皮细胞无明显毒性作用。结论 雀梅藤石油醚提取物可能通过升高活性氧, 引起线粒体膜电位坍塌, 激活线粒体通路诱导细胞凋亡, 从而抑制乳腺癌细胞生长, 支持其民间抗乳腺肿瘤的应用。

[关键词] 雀梅藤; 乳腺癌; 增殖; 凋亡; 线粒体; 活性氧

[文章编号] 2097-2024(2024)06-0253-07 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202311055

Induction of apoptosis in triple-negative breast cancer cells by petroleum ether extract of *Sageretia thea*

FENG Zhihui¹, DENG Yiqing², YE Bing³, AN Pei², ZHANG Hong¹, ZHANG Haijun¹ (1. Innovation Drug Research Center, School of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China; 2. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. TCM Outpatient Department of Yunnan Hongrentang TCM Hospital Co., Ltd, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the petroleum ether extract of *Sageretia thea* on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells. **Methods** After breast cancer cells were incubated with the petroleum ether extract for different times, cell viability was analyzed by CCK8 assay, cell proliferation was detected by plate cloning test, nuclear morphology was observed by DAPI staining, mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) were determined by immunofluorescence, and the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. After incubating with the extract for 24 h, the CCK8 assay was used to observe the toxicity to normal human vascular endothelial cells. **Results** The IC₅₀ of BT549 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines treated with the petroleum ether extract for 24 h were 45.40 μg/ml and 12.23 μg/ml, respectively. The extract time and dose dependently inhibited breast cancer cell viability and clonal formation, induced cell apoptosis and cycle arrest in G1/S phase, decreased MMP and increased ROS levels. There was no toxic effect on normal endothelial cells. **Conclusion** The petroleum ether extract of *Sageretia thea* may induce apoptosis by increasing ROS to cause MMP collapse, followed by activating mitochondrial pathway, thereby hindering the growth of breast cancer cells. These results could support the application of *Sageretia thea* to anti-breast tumor in the folk.

[Key words] *Sageretia thea*; Breast cancer; Proliferation; Apoptosis; Mitochondrion; ROS

雀梅藤 *Sageretia thea* (Osbeck) Johnst 又名雀

[基金项目] 安徽省高等学校科学研究项目(2023AH040055); 安徽省自然科学基金项目(2308085MC79); 安徽省高校优秀创新团队(2022AH010029)

[作者简介] 冯志惠, 硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤药理, Email: feng18740536649@163.com

[通信作者] 张宏, 教授, 研究方向: 中药抗肿瘤药理, Email: zhanghong@chmu.edu.cn; 张海军, 教授, 研究方向: 乳腺癌发生、发展与转移的分子机制, Email: haijunzhang@163.com

梅刺、对角刺、碎米子等, 为鼠李科雀梅藤属植物, 主要分布地区包括云南、安徽、江苏等^[1-2]。根、茎、叶均可入药, 其性甘、淡、平, 具有降气化痰、祛风利湿等功效^[3]。民间常用雀梅藤药材煎汤或浸酒内服治疗乳腺肿瘤、淋巴结肿大和水肿等疾病, 具有较好效果^[4]。现代药理研究表明, 雀梅藤具有抗结直肠癌、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌和肝保护等活性^[5-6], 但尚未见雀梅藤对乳腺癌等其他肿瘤影响的报道。该研究通过多种体外实验观察雀梅

藤对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响,并初步探索其作用机制,以证实民间应用该药材治疗乳腺肿瘤的合理性,为进一步的药物开发奠定基础。

1 材料和仪器

1.1 试剂和仪器

CCK8 试剂盒(大连美仑生物技术有限公司); Spark 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 二氧化碳培养箱(Thermo Fisher); 96 孔培养板(泰坦); 电子分析天平(塞多利斯 BSA2245-CW); 细胞计数仪(Corning 6749); 倒置相差显微镜(奥林巴斯 IX73)。

1.2 药材提取

雀梅藤药材购自昆明井田药业有限公司,生产许可证号:滇 20160155。经海军军医大学药学系生药学教研室辛海量教授鉴定为鼠李科雀梅藤属植物雀梅藤 *Sageretia thea* (Osbeck) Johnst. 的茎。取雀梅藤干燥药材 660 g,粉碎后用 8 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。合并提取液,过滤后回收溶剂,得乙醇提取物。乙醇提取物用水溶解混悬,加入等体积的石油醚萃取 3 次,收集萃取液,通过旋转蒸发得到石油醚萃取部位。进一步采用真空冷冻干燥机在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冻干,分别称重,获得乙醇和石油醚提取物质量为 57 g 和 0.91 g,提取得率分别为 8.63% 和 0.13%。

1.3 提取物溶解

称取 20 mg 雀梅藤石油醚提取物溶于 1 ml 的 DMSO 溶剂中,然后用培养液稀释成不同药物浓度,药物最高剂量下的 DMSO 浓度不超过 0.3%。同时,对照组培养液中添加 0.3% 的 DMSO 作为阴性对照。

1.4 细胞株

三阴性人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、BT549 购自中国科学院上海细胞库;人脐静脉血管内皮细胞株购自上海赋望实业有限公司。

2 方法

2.1 细胞活力分析

分别取对数生长期的人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 BT549 及人脐静脉血管内皮细胞株(HUVEC)并计数,以每孔 5×10^3 个的细胞密度接种到 96 孔板,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中过夜培养至细胞贴壁。实验分为对照组和给药组,对照组以正常培养基培养,给药组以不同浓度含药培养基孵育细胞 24 h。随后按试剂盒说明书进行操作,每孔加入 10% 的 CCK8 试剂,在培养箱中孵育 2 h

后,用酶标仪在 450 nm 处检测各孔的吸光度(OD)值。对照组细胞活力换算为 100%,其余各给药组按以下公式计算:细胞增殖抑制率(%)=[(对照组 A 值-实验组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)] \times 100%。

2.2 平板克隆试验

取上述对数生长期的人三阴性乳腺癌细胞株,以每孔 500 个细胞的密度均匀接种在 12 孔板内,过夜,使细胞贴壁,随后加入雀梅藤提取物孵育 24 h。吸弃培养基,用含 10% 的胎牛血清培养基继续培养,当培养皿中出现肉眼可见的克隆形成时,终止培养。吸弃上清液,用 PBS 小心浸洗,然后甲醇固定。去除固定液,加入适量的结晶紫染色液进行染色,采用 PBS 多次轻轻洗去周边染色液,干燥后拍照,随后用 Image J 软件进行统计分析。

2.3 活死细胞分析

将两种乳腺癌细胞接种于 96 孔板,放置培养箱中过夜,随后加入提取物孵育 24 h。吸弃培养基,用 PBS 温和洗涤细胞一次,每孔加入 100 μl 的 Calcein AM/PI 染色工作液,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 15 min 后,用高内涵系统采集图像。

2.4 细胞周期分析

取对数生长期乳腺癌细胞株,以每孔 40 万个细胞接种于 6 孔板,培养箱中过夜,待细胞贴壁后,用含不同浓度提取物的培养基处理 24 h,消化,离心收集细胞,以预冷的 70% 乙醇混悬固定过夜。离心,去除乙醇,用 PBS 清洗一次,加入 500 μl 的碘化丙啶染色工作液,避光染色 30 min 后用流式细胞仪分析细胞周期。

2.5 流式凋亡分析

将对数生长期的三阴性乳腺癌细胞株以每孔 40 万个接种于 6 孔板中,过夜,待细胞贴壁后,用含不同浓度提取物的培养基孵育 24 h。消化,离心收集细胞,用 100 μl 的 1 \times 结合缓冲液混悬后加入 FITC Annexin V 和 PI 各 5 μl ,轻微振荡,室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪分析凋亡率。

2.6 DAPI 染色分析

将上述对数生长期的人三阴性乳腺癌细胞株以每孔 20 万个接种于 6 孔板,过夜,待细胞贴壁后,用含不同浓度提取物的培养基孵育 24 h,吸弃培养基,每孔加入 1 ml 稀释过的 DAPI 染液孵育细胞 10 min, PBS 清洗 2 遍后采用 Cytation 5 拍照。

2.7 线粒体膜电位(MMP)分析

将对数生长期的人三阴性乳腺癌细胞株以每孔 20 万个接种于 6 孔板,过夜,待细胞贴壁后,用

含不同浓度提取物的培养基孵育细胞 24 h。吸弃培养液, PBS 洗涤细胞之后每孔加入 1 ml 的 JC-1 染液, 在 37 °C 培养箱中孵育 20 min。吸除上清液, 用缓冲液洗涤细胞 3 次后加入 2 ml 细胞培养液, 高内涵系统拍照。

2.8 活性氧 (ROS) 含量检测

取上述对数生长期细胞株, 以每孔 20 万个的细胞密度接种于 6 孔板, 过夜, 待细胞贴壁后, 用含不同浓度提取物的培养基孵育 24 h。吸弃培养基, 每孔加入 1 ml 含 DCFH-DA 的新鲜培养基孵育细胞 20 ~ 30 min, DAPI 复染, 采用高内涵系统拍照。

2.9 统计学处理

使用 Graphpad Prism 8.0.1 分析软件对所获得的实验数据进行统计学分析, 组间比较采用单因素

方差分析, 两组比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抑制乳腺癌细胞生长

通过细胞活力分析发现, 雀梅藤石油醚提取部位对多种癌细胞均有明显细胞毒性, 其中对乳腺癌细胞株抑制作用最强, 而且明显强于乙醇提取物。结合临床应用, 实验选择两种人三阴性乳腺癌系 (BT549 和 MDA-MB-231) 进一步研究 (见图 1)。CCK8 结果表明 (图 1A-B), 雀梅藤石油醚提取物以剂量和时间依赖的方式抑制乳腺癌细胞活力, 作用 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 45.40、12.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 38.87、7.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。平板克隆实验结果显示 (图 1C-

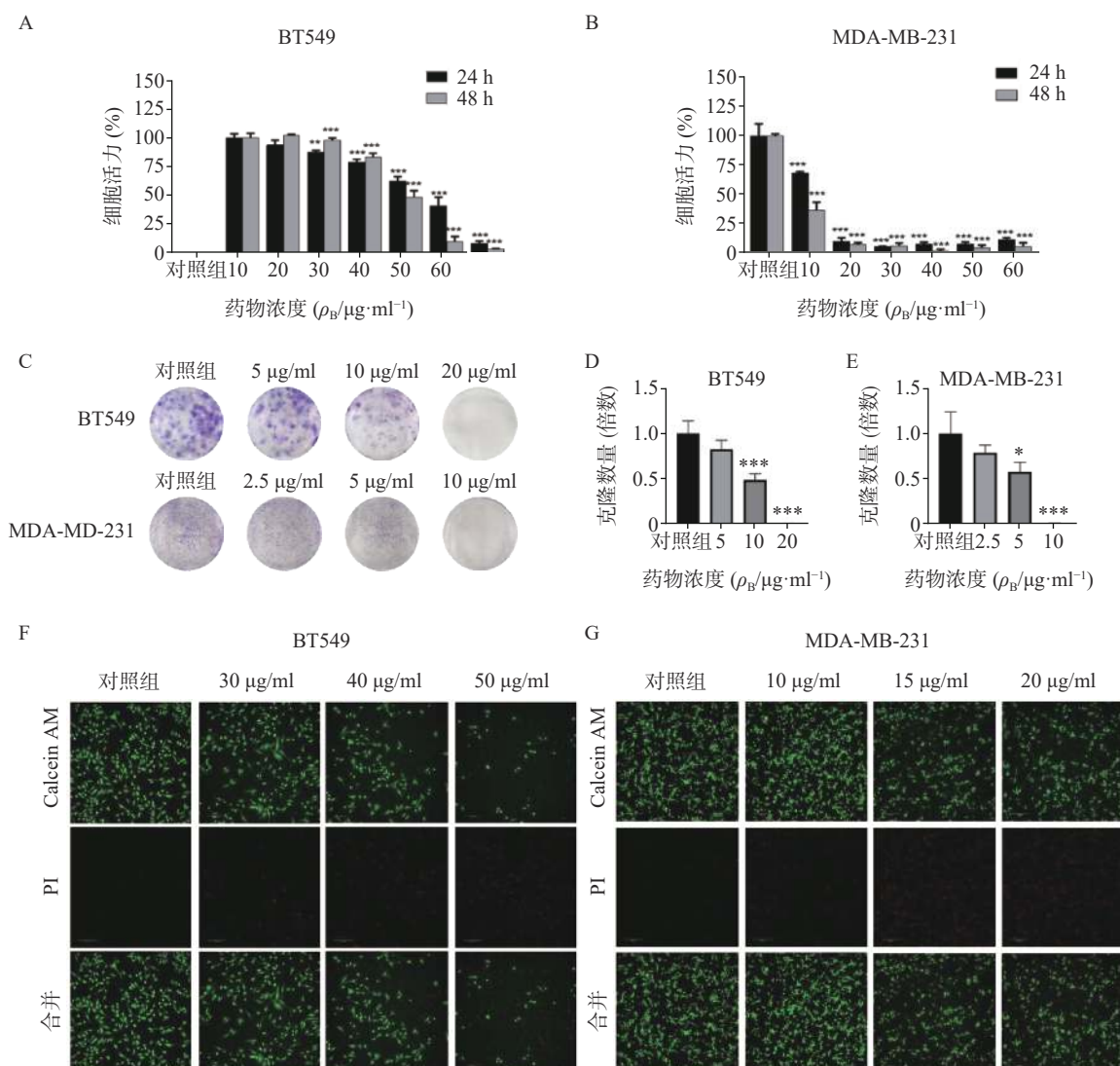


图 1 雀梅藤石油醚提取物抑制乳腺癌细胞生长

A-B. 对两种乳腺癌细胞活力的影响; C-E. 对两种乳腺癌细胞平板克隆生长的影响; F-G. 两种乳腺癌细胞的 Calcein AM/PI 染色分析, 绿色代表活细胞, 红色代表死细胞
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

E),随着雀梅藤石油醚提取物剂量的增加,两种乳腺癌细胞生长均被显著抑制。浓度分别在 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 时,MDA-MA-231 和 BT549 细胞株的生长被完全抑制。Calcein AM/PI 活死细胞染色显示(图 1F-G),随着药物剂量增加,活细胞(绿色)数量较对照组显著减少,而死亡细胞(红色)数量则显著增加,与对照组比较有极显著差异。

3.2 诱导乳腺癌细胞周期阻滞

雀梅藤石油醚提取物孵育乳腺癌细胞 24 h 后,采用流式细胞仪测定细胞的增殖周期情况(见图 2)。结果显示,药物明显阻滞两种乳腺癌细胞株的细胞周期,但对两种细胞阻滞周期不同,BT549 细胞阻滞在 G1 期(图 2A 和 2C,给药组 G1 期细胞比率较对照组显著升高),MDA-MA-231 细胞阻滞在 S 期(图 2B 和 2D,给药组 S 期细胞比率较对照组显著升高),提示石油醚提取物对两种细胞株的细胞周期阻滞可能存在不同机制。

3.3 诱导乳腺癌细胞凋亡

采用 DAPI 染色方法对细胞核形态进行分析(见图 3)。如图 3A-B 所示,正常对照组乳腺癌细胞核呈均匀的圆形浅蓝色,药物处理后细胞核质固缩或碎裂成凋亡小体,且呈剂量依赖性。流式细胞仪凋亡定量分析显示(图 3C-F),石油醚提取物显著增加两种乳腺癌细胞的凋亡率,与对照组比较有显著性差异,其中尤以 MDA-MA-231 细胞株明显,20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下几乎诱导细胞全部凋亡。

3.4 诱导线粒体膜电位坍塌

线粒体通路是肿瘤细胞最常见的凋亡途径,最典型的特征是线粒体膜电位(MMP)水平显著下降。因此,研究采用 JC-1 免疫荧光染色检测线粒体膜电位水平。结果如图 4 所示,给药组红色荧光随剂量增加明显减弱,绿色荧光则明显增强,说明给药组线粒体膜电位显著下降。实验结果提示,雀梅藤石油醚提取物可能通过损伤线粒体而促进了乳腺癌细胞凋亡。

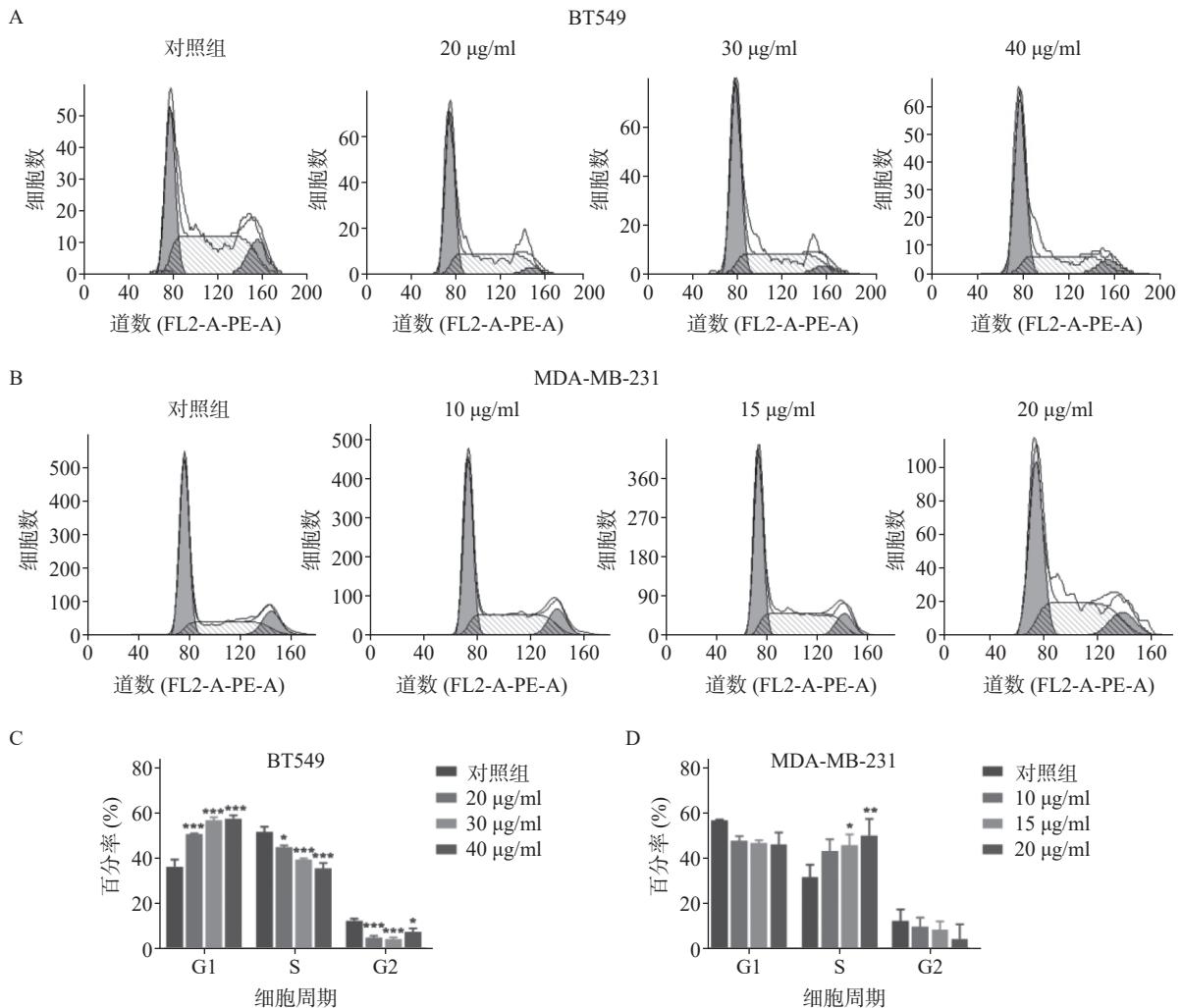


图 2 雀梅藤石油醚提取物诱导乳腺癌细胞周期阻滞

A-B. 对 BT-549 细胞周期的影响; C-D. MDA-MB-231 细胞周期的影响

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

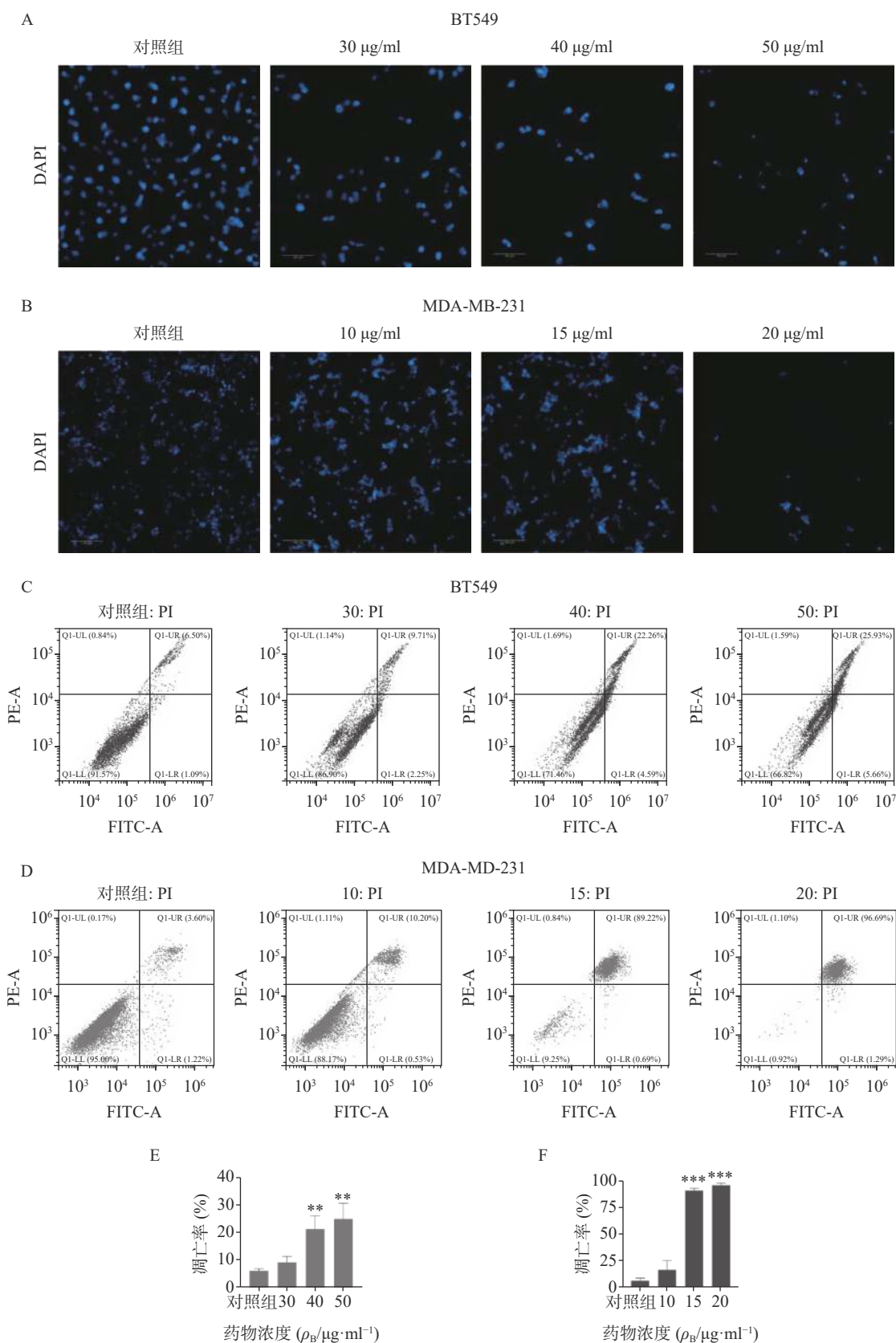


图3 雀梅藤石油醚提取物诱导乳腺癌细胞凋亡

A-B. 对两种乳腺癌细胞核的影响; C 和 E. 对 BT549 细胞凋亡的影响; D 和 F. 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响
** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

3.5 促进乳腺癌细胞活性氧生成
ROS 升高是激活线粒体通路诱导肿瘤细胞凋

亡的重要原因之一, 因此进一步检测了药物处理
24 h 后 ROS 含量变化(图 5)。结果代表 ROS 水平

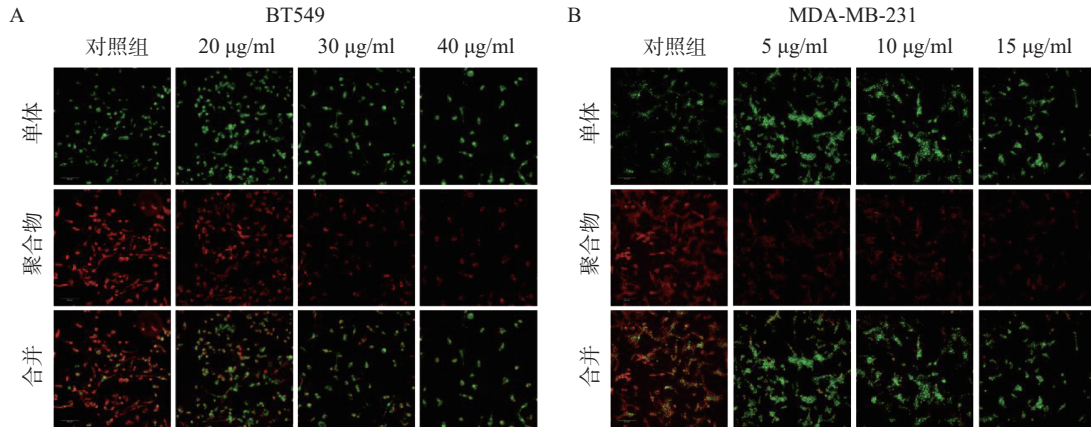


图4 雀梅藤石油醚提取物降低细胞线粒体膜电位

A. 对 BT549 细胞线粒体膜电位的影响; B. 对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响(绿色代表低电位, 红色代表高电位)

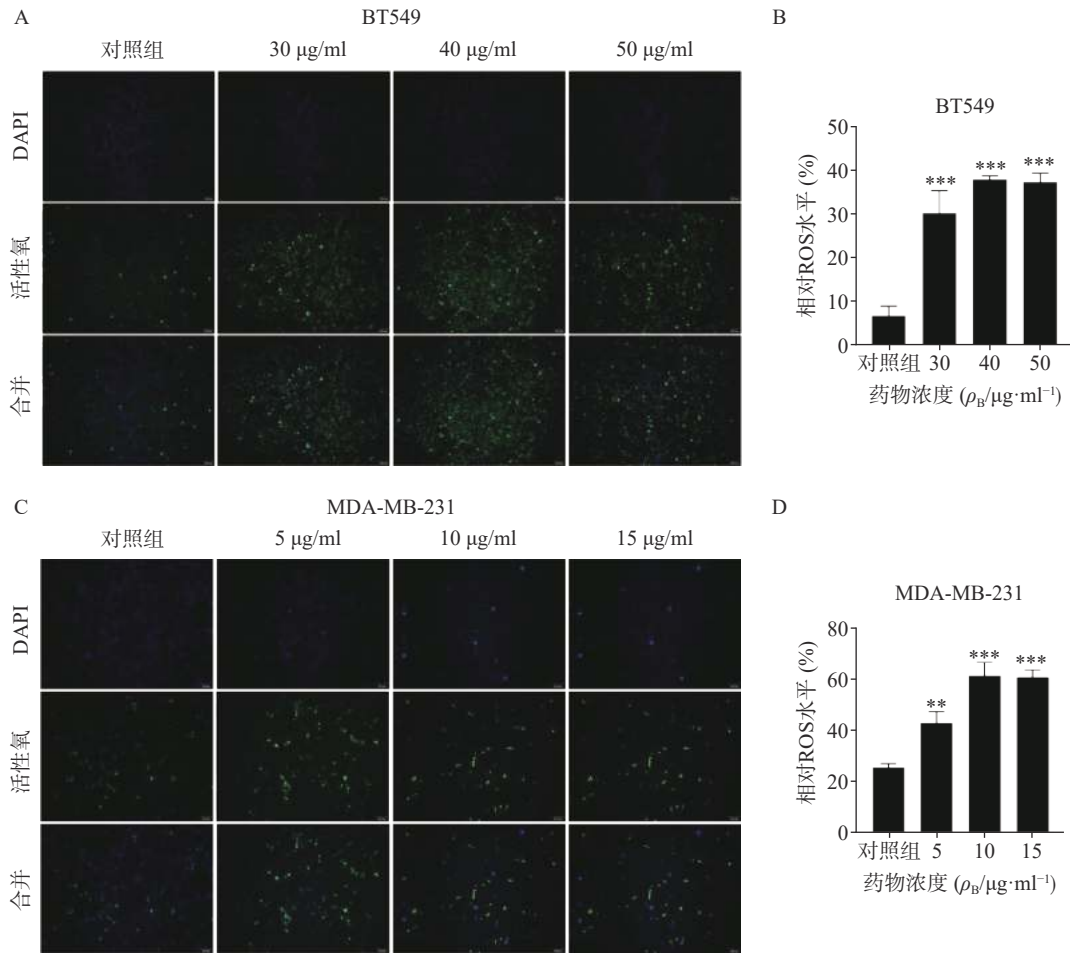


图5 雀梅藤石油醚提取物诱导乳腺癌细胞 ROS 增加

A-B.对 BT549 细胞 ROS 水平的影响; C-D.对 MDA-MB-231 细胞 ROS 水平的影响

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

的绿色荧光在对照组仅有少量表达,而在给药组则显著增加,经统计学处理有显著性差异,其中尤以 BT549 细胞株明显,提示药物可能通过促进 ROS 生成而诱导了乳腺癌细胞凋亡。

3.6 对正常血管内皮细胞活力的影响

为了确定雀梅藤提取物是否对正常细胞产生

毒性,进一步采用同样剂量对人正常脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)进行 CCK8 细胞活力分析。结果提取物孵育 24 h 后,即使在 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最高浓度下亦未观察到内皮细胞活力受到影响,与对照组比较无明显差异(图 6),提示雀梅藤石油醚提取物对正常细胞并不产生毒性,具有较好的安全性。

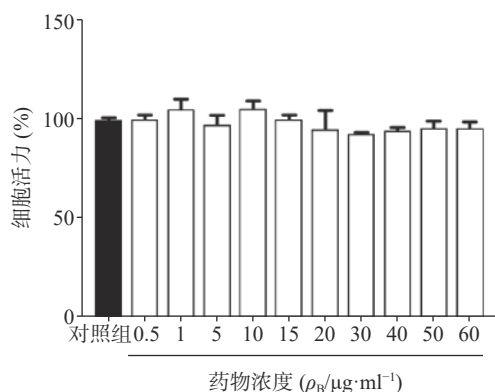


图6 雀梅藤石油醚提取物不影响正常细胞活力
(血管内皮细胞-24 h)

4 讨论

雀梅藤为云南等地民间常用中药,临床观察发现其对乳腺癌生长有明显抑制作用^[7],且毒性较小^[4,8]。研究前期对雀梅藤的乙醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、正丁醇等5个部位提取物进行了多种肿瘤细胞活性筛选,结果显示,对多数癌细胞,如乳腺癌、结肠癌、肝癌等,都具有明显杀伤作用,其中以石油醚部位提取物对癌细胞作用最为显著。进一步实验发现,雀梅藤石油醚提取物时间和剂量依赖地抑制乳腺癌细胞活力,显著减少细胞克隆形成率,阻滞细胞周期在G1/S期,明显增加癌细胞凋亡率,但并不影响正常血管内皮细胞活力,提示其细胞毒性具有明显的选择性。

引起细胞凋亡的途径包括线粒体通路、死亡受体通路和内质网应激通路,其中线粒体通路是药物诱导肿瘤细胞凋亡的最常见途径^[9],因此研究人员进一步观察了雀梅藤石油醚提取物是否通过损伤线粒体诱导乳腺癌细胞凋亡。结果通过JC-1染色发现,两种乳腺癌细胞的线粒体膜电位均显著降低,提示雀梅藤提取物诱导了细胞线粒体途径的凋亡。

ROS的主要来源之一是线粒体内膜的呼吸链底物端,ROS升高会引起线粒体内膜损伤,造成细胞毒性,从而促进肿瘤细胞凋亡^[10]。研究人员用荧光探针方法检测雀梅藤石油醚提取物孵育BT549和MDA-MB-231细胞后的ROS水平,结果发现代表ROS的绿色荧光逐渐增强,表明石油醚提取物显著升高了线粒体内ROS水平。这些结果提示,石油醚提取物可能通过升高线粒体内ROS水平,造成ROS累积,损伤了线粒体,导致线粒体内内容物

如细胞色素c等流出到细胞质,进而激活caspase级联瀑布反应,从而诱导了细胞凋亡^[9,11]。

虽然雀梅藤提取物在体外研究中表现出较好的抗乳腺癌细胞生长作用,但是凋亡信号转导通路和作用靶点尚不明确,线粒体中蛋白表达的变化犹未可知,因此具体作用机制尚需进一步研究。此外,已有研究人员从雀梅藤药材中鉴定出43种化学成分,可分为有机酸类、黄酮类及其他类,有机酸类包括儿茶素及其衍生物等,黄酮类包括异槲皮素等^[12]。但是雀梅藤提取物中究竟何种成分发挥主要抗癌作用仍需进一步证实。

【参考文献】

- [1] 沈丕安. 中华本草[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2017.
- [2] 马雯芳. 瑶药倒丁风化学成分及质量控制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [3] 苗明三, 孙玉信, 王晓田. 中药大辞典[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2017.
- [4] 张美义, 篮振水, 周俊, 等. 云南民间抗肿瘤植物雀梅藤的化学和药理研究[J]. 云南植物研究, 1980, 2(1): 62-66.
- [5] KIM H N, PARK G H, PARK S B, et al. Extracts from *Sageria thea* reduce cell viability through inducing cyclin D1 proteasomal degradation and HO-1 expression in human colorectal cancer cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 43.
- [6] 丁永丽, 邓杨林, 陈新利, 等. 雀梅藤药用研究进展[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1755-1760.
- [7] 万嘉锤. 雀梅藤治疗甲状腺囊肿、乳腺癌20例疗效观察[J]. 云南中医学院学报, 1982, 5(1): 14-15.
- [8] 王茂三, 龚维桂, 范华芬, 等. 雀梅藤护肝作用研究[J]. 浙江药学, 1985, 2(5): 11-14.
- [9] AN P, LU D, ZHANG L J, et al. Synergistic antitumor effects of compound-composed optimal formula from Aidi injection on hepatocellular carcinoma and colorectal cancer[J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154231.
- [10] 郭晓萌, 魏婷, 张焱. 黑参皂苷的提取纯化及其对MGC-803细胞凋亡的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(4): 49-57.
- [11] DENG Y Q, GAO M, LU D, et al. Compound-composed Chinese medicine of Huachansu triggers apoptosis of gastric cancer cells through increase of reactive oxygen species levels and suppression of proteasome activities[J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155169.
- [12] 蒙雪雁, 王成海. 基于液质联用技术分析雀梅藤化学成分[J]. 中南农业科技, 2023, 44(3): 37-41, 55.

【收稿日期】 2023-11-29 【修回日期】 2024-04-17

【本文编辑】 费永和