

# The Inhibition Effects of Oridonin on Bcap-37 Cells

Yang Yu<sup>1</sup>, Yanlong Liu<sup>2</sup>, Xiaofang Wang<sup>2</sup>, Guo Qian<sup>3</sup>, Wei You<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Breast Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou Henan

<sup>2</sup>Wenzhou Medical University, Wenzhou Zhejiang

<sup>3</sup>Ningbo Fourth Hospital, Ningbo Zhejiang

Email: 510790135@qq.com

Received: Sep. 29<sup>th</sup>, 2017; accepted: Oct. 13<sup>th</sup>, 2017; published: Oct. 19<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

To investigate the effects of oridonin on Bcap-37 cells, MTT was used to measure the inhibition effects of oridonin on Bcap-37 cells and RT-PCR was used to measure the Bcl-2 and Bax mRNA expression. Our results showed the inhibition effects of oridonin on Bcap-37 cells by time- and dose-dependent manner. Bcl-2 mRNA expression decreased and Bax mRNA expression increased by oridonin treatment for 24 hours ( $p < 0.05$ ).

## Keywords

Oridonin, Bcap-37 Cells

---

# 冬凌草甲素对Bcap-37细胞生长的抑制作用

于洋<sup>1</sup>, 刘彦隆<sup>2</sup>, 王小芳<sup>2</sup>, 钱国<sup>3</sup>, 尤伟<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南省人民医院乳腺外科, 河南 郑州

<sup>2</sup>温州医科大学, 浙江 温州

<sup>3</sup>宁波市第四医院, 浙江 宁波

Email: 510790135@qq.com

收稿日期: 2017年9月29日; 录用日期: 2017年10月13日; 发布日期: 2017年10月19日

---

## 摘要

研究冬凌草甲素对Bcap-37细胞生长的抑制作用。MTT法检测冬凌草甲素对Bcap-37细胞生长的抑制作用。

用, RT-PCR检测Bcl-2和Bax mRNA的表达。研究表明冬凌草甲素对Bcap-37细胞生长具有显著的抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。冬凌草甲素作用Bcap-37细胞24 h, Bcl-2的mRNA表达显著降低, Bax的mRNA表达显著增加( $p < 0.05$ )。

## 关键词

冬凌草甲素, Bcap-37细胞

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

冬凌草甲素(oridonin, ORI)是从冬凌草中提取的一类四环二萜类化合物, 具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性[1]。近年来人们对其研究的重点集中在其抗肿瘤活性上, 发现其对多种实体瘤如肝癌、食管癌、乳腺癌、前列腺癌等有效果。目前, 冬凌草甲素在抗乳腺癌方面的作用尤为显著。冬凌草甲素可以诱导人乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7细胞发生凋亡[2][3]。本文将探讨冬凌草甲素作为一种潜在的抗乳腺癌制剂, 对乳腺癌细胞Bcap37的作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 细胞与试剂

乳腺癌细胞株Bcap-37购自中科院上海细胞生物研究所。冬凌草甲素购自成都普思生物科技有限公司。RPMI1640购于Gibco公司。小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 细胞培养

细胞用含10%小牛血清的RPMI1640培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

#### 2.2.2. MTT 法检测细胞增殖活力

将生长状态良好的Bcap-37细胞以 $1.0 \times 10^4$ 个/孔的密度传代培养于96孔板中, 待细胞贴壁后, 每板按照分组加入含不同浓度冬凌草甲素的完全培养液, 使其终浓度为0、10、20、40 μM, 每组5个复孔, 并设置调零孔, 继续分别培养12、24和48小时。并于培养后12、24、48 h时, 取出培养板, 每孔加入20 μL浓度为5 mg·mL<sup>-1</sup>的MTT溶液, 培养箱中继续孵育4 h, 弃去培养液, 每孔加入100 μl DMSO, 震荡溶解沉积在孔底的蓝紫色结晶, 并在10 min内于570 nm波长处检测各孔吸光度值(A570), 并计算细胞活力: 细胞活力(%) = (加药组 A570 - 空白组 A570)/(对照组 A570 - 空白组 A570) × 100%。实验独立重复3次。

#### 2.2.3. 实时PCR 检测 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 水平

用Trizol法提取总RNA, A260/A280比值为1.8~2.0, 经逆转录反应合成cDNA。然后利用SYBR荧光实时PCR法检测Bcl-2和Bax mRNA相对表达量。实验所用引物均由北京六合华大基因科技股份有限

公司合成。以  $\beta$ -actin 为内参照基因,  $\beta$ -actin 引物序列: 上游, 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'; 下游, 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'。Bcl-2 引物序列: 上游, 5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAG-3'; 下游, 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'。Bax 引物序列: 上游, 5'-GGACGAACTGGACAGTAACATGG-3'; 下游, 5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'。反应体系为 10  $\mu$ l, 包含 Power SYBR Green PCR Master Mix 5  $\mu$ l, 上游引物 0.2  $\mu$ l, 下游引物 0.2  $\mu$ l, cDNA 模板 0.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 4.1  $\mu$ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环。每个样本设 3 个复孔, 同时设无模板阴性对照。反应结束后, 各个样本的 Ct 值分别取平均数。以对照组的靶基因表达量为 1,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  即为实验组相对对照组靶基因表达的倍数。

### 2.3. 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件处理实验数据, 数据均以  $\bar{x} + s$  表示, 组间均值比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  认为统计学有显著差异。

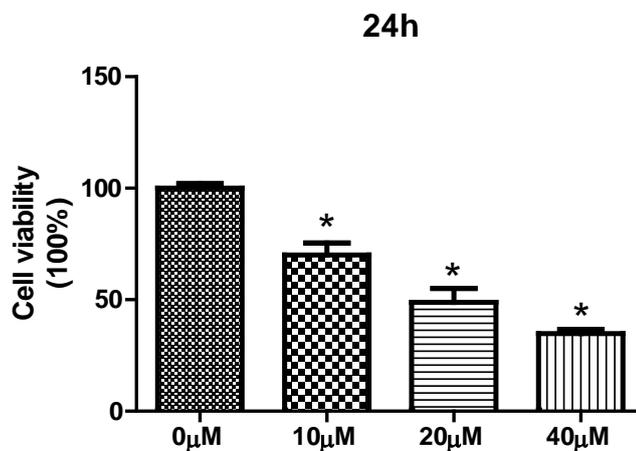
## 3. 结果

### 3.1. 冬凌草甲素对乳腺癌 Bcap37 细胞生长的抑制作用呈剂量依赖性

观察 10, 20, 40  $\mu$ M 冬凌草甲素对乳腺癌细胞株 Bcap37 细胞存活的作用。取对数期生长的乳腺癌 MCF-7 细胞消化后加入 96 孔板, 调节细胞密度为 10,000 个每孔, 5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。移除培养基, 每孔加入用培养基配制的浓度梯度药物 100  $\mu$ l, 每个药物浓度设置 5 复孔。5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时, 倒置显微镜下观察。避光条件下, 每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液, 5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时后移除含 MTT 的培养基。每孔加入 100  $\mu$ l 二甲基亚砜, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪, 在 570 nm 波长处测量各孔吸光值, 计算细胞增殖活力。结果显示, 冬凌草甲素作用 24 小时可明显抑制 Bcap37 人乳腺癌细胞株的增殖, 且呈现明显的剂量依赖性(图 1)。

### 3.2. 冬凌草甲素对乳腺癌细胞株 Bcap37 细胞的抑制作用呈时间依赖性

观察 40  $\mu$ M 冬凌草甲素对乳腺癌细胞株 Bcap37 细胞的作用。取对数期生长的乳腺癌 MCF-7 细胞消化后加入 96 孔板, 调节细胞密度为 10,000 个每孔, 5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。移除培养基, 每孔加入用培养基配制的浓度梯度药物 100  $\mu$ l, 每个药物浓度设置 5 复孔。5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 分别孵育 12, 24 和 48 小时,



**Figure 1.** The inhibition of oridonin on Bcap37 cells shows dose-dependence  
**图 1.** 冬凌草甲素对乳腺癌细胞 Bcap37 生长的抑制作用呈剂量依赖性(\* $P < 0.05$ )

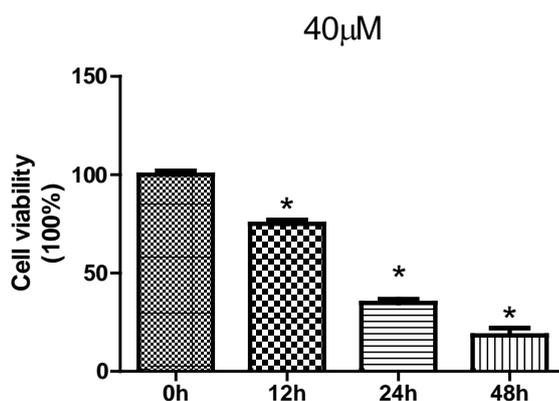
倒置显微镜下观察。避光条件下,每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液,5% $\text{CO}_2$ ,37 $^\circ\text{C}$  孵育 4 小时后移除含 MTT 的培养基。每孔加入 100  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪,在 570 nm 波长处测量各孔吸光值,计算细胞活力。结果显示,作用 12, 24 和 48 小时后,冬凌草甲素可明显抑制 Bcap37 人乳腺癌细胞株的增殖,且呈现明显的时间依赖性(图 2)。

### 3.3. 冬凌草甲素(Oridonin)对 Bcap37 细胞 Bcl-2 mRNA 的抑制作用

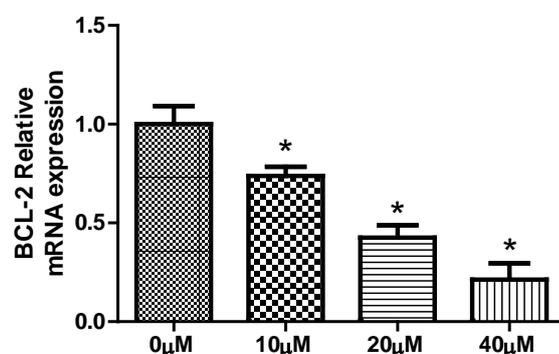
取对数生长期的乳腺癌细胞,消化并接种于无菌培养瓶中。以不同浓度的冬凌草甲素处理 24 小时后,收集细胞,用 ABI PRISM<sup>®</sup> 6100 Nucleic Acid PrepStation 试剂盒提取细胞总 RNA。总 RNA 的质量和完整性用分光光度计在 260 nm/280 nm 下分析。等量的 RNA 用 SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System 在 Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 反转录为 cDNA。扩增反应在 PCR 扩增仪上进行。用  $\beta$ -actin 作为内参定量。检测 Bcl-2 mRNA 的表达含量。本实验研究发现冬凌草甲素作用于 Bcap37 细胞 24 小时,随药物浓度的升高, Bcl-2 mRNA 的表达逐渐下降(图 3)。

### 3.4. 冬凌草甲素(Oridonin)对 Bcap37 细胞 Bax mRNA 的调节作用

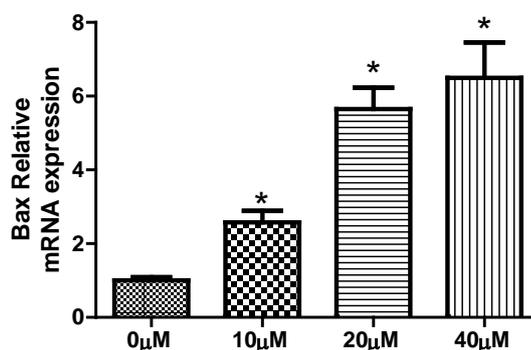
取对数生长期的乳腺癌细胞,消化并接种于无菌培养瓶中。以不同浓度的冬凌草甲素处理 24 小时后,收集细胞,检测 Bax mRNA 的表达含量。本实验研究发现冬凌草甲素作用于 Bcap37 细胞 24 小时,随药物浓度的升高, Bax mRNA 的表达上调。由此可推断冬凌草甲素对人乳腺癌 Bcap37 细胞的抑制作用可能是通过抑制 Bcl-2 的表达和增强 Bax 的表达诱导细胞凋亡(图 4)。



**Figure 2.** The inhibition of oridonin on Bcap37 cells shows time-dependence  
**图 2.** 冬凌草甲素对乳腺癌细胞 Bcap37 生长的抑制作用呈时间依赖性(\* $P < 0.05$ )



**Figure 3.** The effects of oridonin on Bcl-2 mRNA expression of Bcap37 cells  
**图 3.** 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞 Bcl-2 mRNA 的调节作用(\* $P < 0.05$ )



**Figure 4.** The effects of oridonin on Bax mRNA expression of Bcap37 cells

**图 4.** 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞 Bax mRNA 的调节作用(\* $P < 0.05$ )

## 4. 讨论

本研究发现冬凌草甲素对 Bcap-37 细胞生长具有显著的抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。冬凌草甲素作用 Bcap-37 细胞 24 h, Bcl-2 的 mRNA 表达显著降低, Bax 的 mRNA 表达显著增加。由此推断冬凌草甲素对人乳腺癌 Bcap37 细胞生长的抑制作用可能是通过抑制 Bcl-2 的表达和增强 Bax 的表达诱导细胞凋亡。

冬凌草甲素在抗乳腺癌方面的作用已有大量报道。崔桥等发现,冬凌草甲素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡[4]。朱仁书等发现,冬凌草甲素可显著抑制 MCF-7 细胞的生长及诱导细胞发生凋亡,并呈现出一定的剂量-效应与时间-效应关系[2]。江永青等通过体外实验证实冬凌草甲素可通过激活 Caspase 途径,下调抑制凋亡基因 Bcl-x1 的表达,同时上调促进凋亡基因 Bid 及 caspase3 的表达,进而诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡[3]。彭延延等通过体外实验表明冬凌草甲素通过下调 MMP-2 和 MMP-9 明显抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭[5]。汪茗等研究表明冬凌草甲素可通过调控 PI3K/Akt 通路,抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 PI3K 的活性,使下游 p-Akt、p-GSK3 $\beta$  蛋白表达降低,进而诱发细胞凋亡[6]。岳静发现冬凌草甲素对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制作用呈时间依赖性、浓度依赖性;冬凌草甲素阻滞 MCF-7 细胞于 G2/M 期,且可诱导其凋亡;冬凌草甲素可下调 wnt4、GSK3 $\beta$ -catenin 的表达[7]。李秀才发现冬凌草成分冬凌草素乙和冬凌草素甲诱导乳腺癌 MCF-7 细胞停滞于 S/G2/M 期,减慢 G1/S 期进程[8]。李瑞芳发现在一定的浓度范围内,冬凌草甲素可下调 K562 细胞的端粒酶活性。同时细胞周期各时相分布发生变化,G0/G1 期或 G2/M 期细胞增多,S 期细胞减少[9]。

余越美等研究发现冬凌草甲素可以诱导乳腺癌细胞 Bcap-37 发生凋亡,其可能与 Survivin 和 GADD34 的调控相关[10]。杜海爽等研究发现冬凌草甲素可抑制乳腺癌 Bcap-37 细胞的增殖,该作用可能与 p21mRNA 表达上调及 cdc、cyclin B1 mRNA 表达下调有关[11]。本研究也发现冬凌草甲素对 Bcap-37 细胞生长具有显著的抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。同时我们的研究结果也表明冬凌草甲素对人乳腺癌 Bcap-37 细胞生长的抑制作用可能是通过抑制 Bcl-2 的表达和增强 Bax 的表达诱导细胞凋亡。

## 基金项目

浙江省自然科学基金项目(LQ13H280002),河南省基础与前沿技术研究计划项目(142300410388, 132300410048),宁波市自然科学基金(2015A610234)。

## 参考文献 (References)

- [1] 李钦,冯卫生.冬凌草化学成分、药理作用及开发饮酒进展[J].河南中医学院学报,2003,18(6):31-33.

- [2] 朱仁书, 李希科. 冬凌草甲素对 MCF-7 细胞的生长抑制作用及诱导凋亡作用的实验研究[J]. 医药论坛杂志, 2009, 30(16): 3-5.
- [3] 江永青, 熊向阳, 余乐涵. 冬凌草甲素通过激活 caspase 途径诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1493-1495.
- [4] 崔桥. 冬凌草甲素诱导人肿瘤细胞自噬与凋亡关系的研究[D]: [博士学位论文]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [5] 彭延延, 施秋萍, 杨大朋, 等. 冬凌草甲素对人乳腺癌细胞侵袭的抑制作用及机制[J]. 苏州大学学报(医学版), 2012, 32(3): 318-321.
- [6] 汪茗, 章尧, 谢向荣, 等. 冬凌草甲素通过 PI3K/Akt 通路诱导 MDA-MB-231 细胞的凋亡[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(2): 161-165.
- [7] 岳静, 陈如意, 洪娇, 等. 基于 Wnt 信号通路抑制的冬凌草甲素抗乳腺癌研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(11): 1315-1321
- [8] 李秀才. 乳腺癌的中医中药治疗[J]. 中医临床研究, 2014(23): 147-148.
- [9] 李瑞芳, 王庆瑞. 冬凌草甲素对 K562 细胞端粒酶活性调控及细胞周期影响[J]. 药学学报, 2004, 39(11): 865-868.
- [10] 余越美, 严巧灵, 章康健, 等. 冬凌草甲素诱导乳腺癌 Bcap37 细胞凋亡的探索[J]. 浙江理工大学学报, 2013, 30(3): 377-382.
- [11] 杜海爽, 郭玲玲, 顾振纶, 等. 冬凌草甲素对人乳腺癌 Bcap-37 细胞的增殖抑制作用及其机制[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(3): 473-476.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [hjbm@hanspub.org](mailto:hjbm@hanspub.org)