

Apoptosis Effect of Pien Tze Huang on Breast Cancer Cells

Fengqin Wei¹, Xiaoti Lin^{2*}

¹Department of Emergency, Fujian Provincial 2nd People's Hospital, Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

²Department of Breast, Fujian Provincial Maternity and Children's Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou Fujian

Email: linxt3@mail2.sysu.edu.cn

Received: Jan. 24th, 2020; accepted: Feb. 20th, 2020; published: Mar. 3rd, 2020

Abstract

Objective: To investigate the apoptosis effect of Pien Tze Huang on breast cancer cells. **Methods:** MTT assay was performed to determine the cell viability of breast cancer cells. Further, both AnnexinV-FITC/PI expression and cell cycle of breast cancer cells were evaluated by flow cytometry. Moreover, apoptosis-related proteins, including Bcl-2 and Bax, were analyzed to evaluate. **Results:** MTT assay found that Pien Tze Huang induced apoptosis of breast cancer cells by a dose- and time-dependent manner. Both results of AnnexinV-FITC/PI and cell cycle further indicated that Pien Tze Huang resulted in significant apoptosis effect of breast cancer cells ($p < 0.05$). Furthermore, Pien Tze Huang significantly reduced Bcl-2 expression of breast cancer cells; on the contrary, Pien Tze Huang significantly increased Bax expression of breast cancer cells. **Conclusion:** Pien Tze Huang can result in the apoptosis effect of breast cancer cells. It is worth for investigators to further clarify the potential therapeutic application of Pien Tze Huang upon breast cancer.

Keywords

Pien Tze Huang, Breast Cancer, Cell Apoptosis

片仔癀对乳腺癌细胞凋亡的影响

魏风琴¹, 林小提^{2*}

¹福建中医药大学附属第二人民医院急诊科, 福建 福州

²福建医科大学附属福建省妇幼保健院乳腺科, 福建 福州

Email: linxt3@mail2.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020年1月24日; 录用日期: 2020年2月20日; 发布日期: 2020年3月3日

*通讯作者。

文章引用: 魏风琴, 林小提. 片仔癀对乳腺癌细胞凋亡的影响[J]. 中医学, 2020, 9(2): 108-114.

DOI: [10.12677/tcm.2020.92017](https://doi.org/10.12677/tcm.2020.92017)

摘要

目的: 探讨片仔癀(Pien Tze Huang)对乳腺癌细胞(MDA-MB-231和MCF-7)凋亡的影响。**方法:** 采用噻唑蓝/MTT测定细胞的存活率; 使用流式细胞仪测定AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡及细胞周期检测; 应用Western Blot测定凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2。**结果:** 片仔癀对MDA-MB-231的细胞存活率呈时间和浓度相关性的显著性影响效果($p < 0.05$)。AnnexinV-FITC/PI和细胞周期结果均表明, 片仔癀可显著性地引起乳腺癌细胞的凋亡($p < 0.05$)。同时, 片仔癀可显著性地减少乳腺癌细胞中的抗凋亡蛋白Bcl-2的表达; 相反地, 片仔癀可显著性地增加乳腺癌细胞中的促进凋亡蛋白Bax的表达。**结论:** 片仔癀可引起乳腺癌细胞凋亡, 其在乳腺癌的治疗价值需要进一步探究。

关键词

片仔癀, 乳腺癌, 细胞凋亡

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

根据中国肿瘤登记地区关于乳腺癌的报告, 我国每年新发病例 30.4 万例, 高居女性恶性肿瘤发病率首位; 虽然目前手术、化疗、放疗、靶向治疗、内分泌治疗等综合治疗方法取得了巨大的进展, 但乳腺癌的每年死亡病例 9.5 万例, 其死亡率亦高居我国女性恶性肿瘤首位[1]。我国传统医学博大精深, 蕴含着许多治疗策略和治疗方剂药物等有待去发展。片仔癀是我国一种传统的名贵中成药, 该药具有清热、解毒、消肿、止痛、凉血、化瘀等功效[2]。并且已经有报道其可用于多种恶性肿瘤的治疗, 如结直肠癌[3]、骨肉瘤[4]、肝癌[5]、舌癌[6]、卵巢癌[7]等。但是, 片仔癀在乳腺癌的潜在治疗效果如何, 目前的相关研究甚少。本项目就片仔癀对乳腺癌细胞凋亡的影响进行了探讨。

2. 仪器和材料

2.1. 仪器

流式细胞仪(美国 BD 贝克曼); 超净工作台(北京亚泰科隆); 5%二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司)。

2.2. 实验细胞

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7, 均购买自 ATCC (American Type Culture Collection)公司。

2.3. 实验药物与试剂

片仔癀(漳州片仔癀药业股份有限公司); 添加有 0.02% EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化液(美国 Gibco 公司)、DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司), DMEM 中添加 10%胎牛血清蛋白(美国 Gibco 公司)、青霉素、链霉素溶液 100× (10,000 U/ml 青霉素 G, 10,000 U/ml 链霉素, 美国 Gibco 公司); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 噻唑蓝/MTT (美国 Invitrogen 公司); AnnexinV-FITC 试剂盒(上海碧云天生物技术公司); 碘化丙啶(美国 Sigma 公司); BCL-2 抗体、Bax 抗体和 GAPDH (美国 Abcam 公司)。

3. 方法

3.1. 片仔癀溶液的配制

先称取片仔癀粉末 1000 mg, 用 PBS 溶液配制成 10 mg/mL 的溶液, 再将该溶液放于超声机中进行超声溶解, 经高压灭菌处理后放置于 4°C 的冰箱中贮存以备。使用时, 将 10 mg/mL 的溶液用 PBS 稀释为 0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.75 mg/mL 不同浓度的治疗组, 并以 PBS 作为对照组。

3.2. 乳腺癌细胞培养及传代方法

将对数生长的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的细胞培养瓶中的培养液用吸管吸除; 加入 1.5 mL 的 0.25% 胰酶溶液, 让所有的细胞都能被浸入到溶液中, 置室温或 37°C 恒温箱中消化; 待消化充分时, 及时加入 10 mL Hank's 液以终止消化; 用吸管将贴壁已消化的细胞吹打成悬液, 转移至一个 15 mL 的离心管中, 以 1000 rpm 速度离心 5 min, 吸除并弃去上清液; 用 15 mL 新鲜 DMEM 中添加 10% 胎牛血清蛋白培养基重悬细胞, 并将其分装到三个培养瓶中, 置于 37°C 恒温培养箱中继续培养; 过夜后观察细胞的贴壁及生长状况。

3.3. 细胞存活率的 MTT 检测方法

取对数生长的 MDA-MB-231 细胞, 先用 0.25% 的胰酶消化, 待消化充分时, 及时加入 10 ml Hank's 液以终止消化。取 96 孔板, 在每孔中接种 1×10^4 的细胞。于 37°C 的 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr 后, 可见细胞贴壁生长。分别给予对照组(PBS)、0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.75 mg/mL 不同浓度的处理组, 每组含 6 个复孔。再将 96 孔板置于 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr、48 hr 和 72 hr, 用吸管吸除上清液, 加入 MTT 孵育 4 hr 后, 使用 PBS 溶解, 在多功能酶标仪采用 490 nm 波长下进行检测, 并计算出每组的细胞存活率, 本实验重复 3 次。

3.4. 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡率

先取对数生长的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, 待消化充分时, 及时加入 10 ml Hank's 液以终止消化。取 96 孔板, 在每孔中接种 1×10^4 的细胞。于 37°C 的 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr 后, 可见细胞贴壁生长。分别给予对照组 PBS 和 0.25 mg/mL 处理组, 每组含 6 个复孔。继续将 96 孔板置于 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr, 用吸管吸除上清液, 收集处理后的乳腺癌细胞, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 5 μ L 的 Annexin V, 先室温避光 15 min, 再加入 10 μ L PI, 再于室温避光 15 min。处理好的细胞用流式细胞仪进行检测。

3.5. 流式细胞仪碘化丙啶(PI)染色对细胞周期的检测方法

取对数生长的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, 先用 0.25% 的胰酶消化, 待消化充分时, 及时加入 10 ml Hank's 液以终止消化。取 96 孔板, 在每孔中接种 1×10^4 的细胞。于 37°C 的 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr 后, 可见细胞贴壁生长。分别给予对照组 PBS 和 0.25 mg/mL 处理组, 每组含 6 个复孔。继续将 96 孔板置于 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr, 用吸管吸除上清液, 收集处理后的乳腺癌细胞, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入核糖核酸酶 A (浓度为 0.25 mg/mL) 和 5 μ L 的 PI 染液, 避光孵育 30 min。处理好的细胞用流式细胞仪进行检测。

3.6. Western Blot 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2

与上述处理乳腺癌细胞方法相近似, 在上述给予对照组 PBS 和 0.25 mg/mL 处理, 并继续将 35 mm

孔板置于 5% CO₂ 培养箱培养 24 hr, 用吸管吸除上清液, 收集处理后的乳腺癌细胞。用 Laemmli Buffer 裂解细胞, 收集蛋白; 超声打匀后, 使用 BCA 法将每个样品的蛋白浓度调一致, 再用 10% SDS-PAGE 分离蛋白, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂牛奶 in TBST 封闭后; 加入一抗 Bax (1:1000) 或 BCL-2 (1:1000), GAPDH 作为内参对照。本实验重复 3 次。

3.7. 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计分析软件分析处理数据, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间直接比较采用 t 检验, 两组间合并有时间因素的比较采用重复测量设计的方差分析; 以 $p < 0.05$ 为检验水准。

4. 结果

4.1. 片仔癀对乳腺癌细胞的细胞存活率的影响

本部分的研究通过检测片仔癀对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 在不同浓度和不同时间的凋亡影响情况, 初步检测片仔癀对乳腺癌细胞的存活是否有影响, 并筛选出下一步处理的合适片仔癀处理浓度。如图 1 所示, 片仔癀在 0.1 mg/mL 浓度作用 24 hr、48 hr 和 72 hr 时, 其对 MDA-MB-231 细胞的细胞存活率均无显著性影响。而在 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.75 mg/mL, 作用 24 hr、48 hr 和 72 hr 时, 与对照组比较, 均有显著性的差异 ($p < 0.05$)。因此, 研究初步表明片仔癀对 MDA-MB-231 的细胞存活率有显著性影响效果。并且, 下一步的凋亡研究中, 取其最小有效浓度及最小有效作用时间, 以减少坏死细胞对凋亡细胞的检测效果, 在下一步研究中, 处理组拟选择 0.25 mg/mL 片仔癀作用 24 hr。

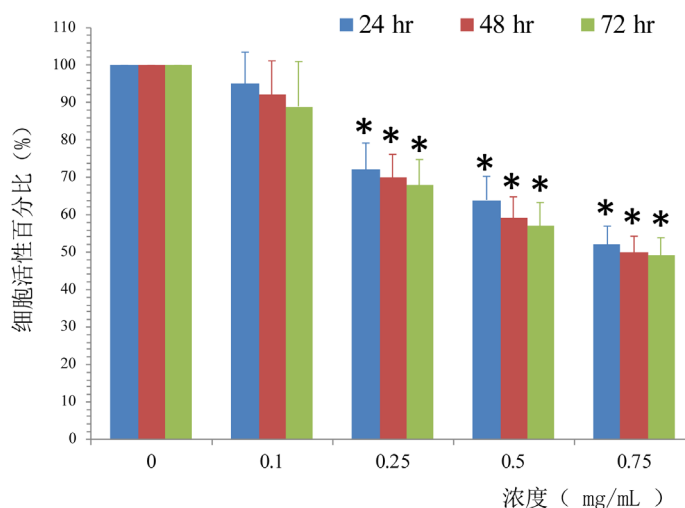


Figure 1. MTT assays of cell viability showed that Pien Tze Huang inhibited the cell viability in MDA-MB-231 cell. *, $p < 0.05$

图 1. MTT 法测定片仔癀对 MDA-MB-231 细胞的细胞存活率的影响。*, $p < 0.05$

4.2. 片仔癀对乳腺癌细胞的细胞凋亡率

研究组进一步采用 Annexin V-FITC/PI 检测法, 检测片仔癀对乳腺癌细胞的凋亡影响。其典型的流式细胞仪检测结果如图 2(a) 所示。研究组发现, 对于 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 片仔癀组可使凋亡细胞率达到 $36.20\% \pm 4.37\%$, 而对照组的细胞凋亡百分率为 $3.27\% \pm 0.65\%$, 两组间存在显著性差异 ($p < 0.05$, 图 2(b))。相似地, 对于 MCF-7 乳腺癌细胞, 片仔癀组可使凋亡细胞率达到 $35.17\% \pm 3.66\%$, 而对照组的

细胞凋亡百分率为 $4.90\% \pm 0.81\%$, 两组间亦存在显著性差异($p < 0.05$, 图 2(b))。因此, 研究表明片仔癀可非常显著地引起乳腺癌细胞的凋亡。

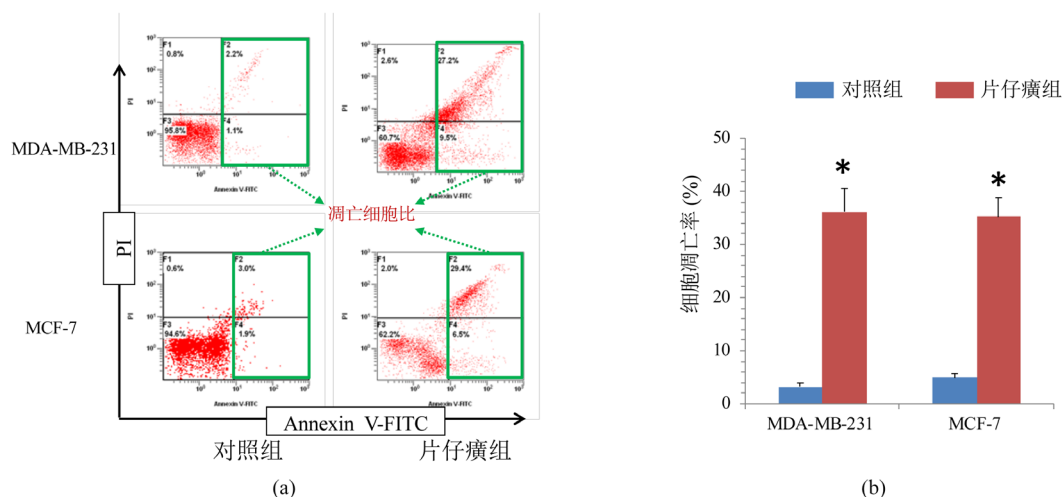


Figure 2. Annexin V-FITC Annexin V-FITC/propidium iodide staining and FACS quantification of the number of apoptotic cells in MDA-MB-231 and MCF-7 cells treated with Ctrl or Pien Tze Huang. (a) Representative images; (b) Statistical results. *, $p < 0.05$

图 2. Annexin V-FITC/PI 法检测片仔癀对乳腺癌细胞的凋亡率。(a) 典型图象; (b) 统计结果。*, $p < 0.05$

4.3. 片仔癀对乳腺癌细胞的细胞周期的影响

细胞周期主要分为 G1 期、S 期和 G2-M 期, 凋亡细胞常常表现为在细胞周期中有 Sub-G1 期。研究组进一步采用流式细胞仪测定细胞周期的改变情况。研究组发现, 片仔癀可引起乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 出现明显的 Sub-G1 期(图 3(a))。进一步分析细胞周期各分期的改变发现, 对于 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 片仔癀组可使 Sub-G1 期百分率达到 $12.76\% \pm 1.98\%$, 而对照组的 Sub-G1 期百分率为 $2.70\% \pm 0.41\%$, 两组间存在显著性差异($p < 0.05$, 图 3(b))。相似地, 对于 MCF-7 乳腺癌细胞, 片仔癀组可使 Sub-G1 期百分率达到 $8.99\% \pm 1.44\%$, 而对照组的 Sub-G1 期百分率为 $2.95\% \pm 1.11\%$, 两组间存在显著性差异($p < 0.05$, 图 3(b))。在此, 研究发现片仔癀可显著性地使乳腺癌细胞的细胞周期出现凋亡特异性的 Sub-G1 分期, 引起乳腺癌的凋亡。

4.4. 片仔癀对乳腺癌细胞中凋亡相关蛋白的影响

研究组采用 Western Blot 法, 进一步测定乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7, 在片仔癀作用下, 其凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达改变情况。研究发现, 片仔癀可显著性地减少 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达; 相反地, 片仔癀可显著性地增加 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的促进凋亡蛋白 Bax 的表达(图 4)。故而, 进一步证实了, 片仔癀可引起乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的凋亡。

5. 结论

从中医角度, 乳腺癌的病因病机为情志和冲任失调, 正气亏虚、痰毒瘀结、肝肾不足、脏腑失调和六淫所伤; 中医辩证治疗的方面考虑, 应重点给予扶正、疏肝、活血、理气和解毒[8]。而片仔癀由牛黄、蛇胆、三七、麝香等名贵中药组成[9]。在药理上, 三七可以化瘀止血, 消肿定痛; 牛黄能泻火清热, 豁

痰解毒; 麝香则可活血通经, 消肿止痛; 蛇胆亦能清热泻火, 燥湿解毒。诸药合用, 可具有清热解毒、消肿散结、活血化瘀的特异功效。故而, 片仔癀具有治疗乳腺癌的潜在理论基础[10]。

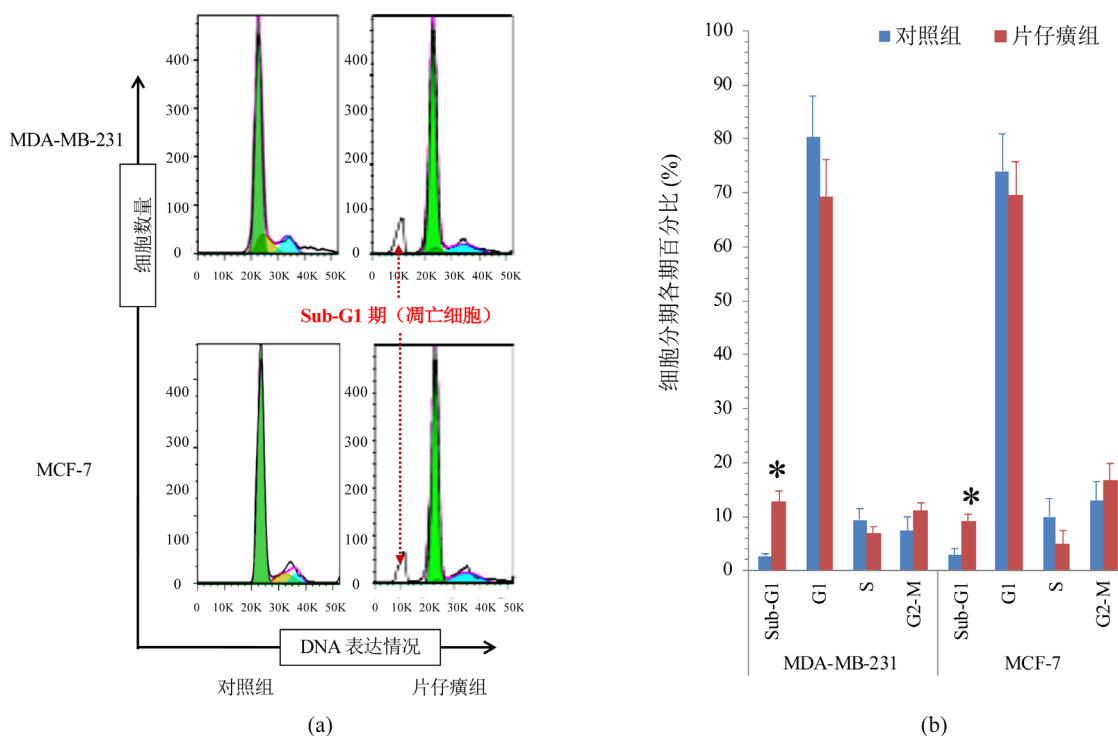


Figure 3. Cell cycle analyses for cells treated with Ctrl or Pien Tze Huang, followed by staining with propidium iodide and subjected to flow cytometry analysis for the determination of DNA content. (a) Representative images; (b) Statistical results. *, $p < 0.05$

图 3. 片仔癀对乳腺癌细胞周期的影响。(a) 典型图象; (b) 统计结果。*, $p < 0.05$

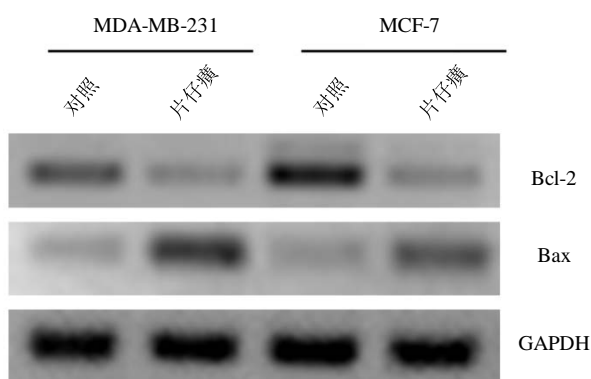


Figure 4. Breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF-7) were treated with Ctrl or Pien Tze Huang, and expressions of Bax and Bcl-2 were detected by western blot. GAPDH was used as control

图 4. 片仔癀对乳腺癌细胞中凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

乳腺癌作为当前女性恶性肿瘤居首位的癌种, 目前的常规治疗如手术治疗、化学治疗、放射治疗、内分泌治疗、靶向治疗等, 虽然在乳腺癌治疗中取得了巨大的进步, 但是, 当前乳腺癌的死亡率仍然高

居女性恶性肿瘤的首位。其中最为难治的如三阴性乳腺癌, 目前的治疗效果极差, 是引起其病死率较高的主要原因之一。据研究者所知, 甚少有关于片仔癀在乳腺癌治疗的研究报道。Chen 等研究片仔癀对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响时发现, 片仔癀可通过抑制 EMT 作用而克服 MCF-7 的阿霉素耐药性[11]。MCF-7 是非三阴性乳腺癌, 而在本次研究中, 研究组发现, 片仔癀不仅对非三阴性乳腺癌细胞系 MCF-7, 而且对三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, 均具有引起凋亡的作用。因此, 本项目初步表明片仔癀可引起乳腺癌细胞凋亡, 具有潜在治疗价值; 同时, 也为片仔癀进一步在难治性乳腺癌, 例如三阴性乳腺癌的深入研究, 建立了初步的研究基础。

基金项目

中国博士后资金委面上一等奖项目(项目编号 2017M610570)、福建省科技厅引导性项目(项目编号 2016Y0020)及福建省卫计委中青年骨干人才培养项目(项目编号 2016-ZQN-18)。

参考文献

- [1] 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 曾红梅, 邹小农, 陈茹, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [2] 黄进明. 片仔癀在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 广东医学, 2019, 40(18): 2694-2698.
- [3] Wan, Y., Shen, A., Qi, F., Chu, J., Cai, Q., Sferra, T.J., *et al.* (2017) Pien Tze Huang Inhibits the Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Increasing the Expression of miR-34c-5p. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **14**, 3901-3907. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4972>
- [4] 陈炳艺, 郭文韬, 林嘉辉, 李楠, 张燕. 片仔癀通过 PI3k/Akt 通路抑制人骨肉瘤耐药细胞 MG63/ADM 增殖[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1520-1524.
- [5] 赖文芳, 黄鑫, 刘俊杰, 唐宇恒, 林昱, 林雅, 等. 片仔癀调控膜联蛋白 A1/VEGF 通路对人肝癌细胞系 HepG2 作用的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1534-1538.
- [6] 王丹, 张忠提, 王振华. 片仔癀联合多西他赛对舌鳞状细胞癌细胞生长及凋亡的影响[J]. 华西医学 2017, 32(6): 880-882.
- [7] He, F., Wu, H.N., Cai, M.Y., Li, C.P., Zhang, X., Wan, Q., *et al.* (2014) Inhibition of Ovarian Cancer Cell Proliferation by Pien Tze Huang via the AKT-mTOR Pathway. *Oncology Letters*, **7**, 2047-2052. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1989>
- [8] 戴金芳, 赵益, 孙有智. 乳腺癌中医病因病机探析[J]. 光明中医 2017, 32(7): 1069-1072.
- [9] 郑良朴, 曹治云, 陈旭征, 林薇. 片仔癀对小鼠结肠癌细胞增殖及肝转移的抑制作用[J]. 福建中医药, 2016, 47(5): 16-17.
- [10] 沈阿灵, 刘丽雅, 齐飞, 陈宏伟, 魏丽慧, 林久茂, 等. 片仔癀上调 miR-200a 抑制大肠癌耐药细胞转移的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3682-3686.
- [11] Chen, X., Qi, F., Shen, A.L., Chu, J.F., Sferra, T.J., Chen, Y.Q., *et al.* (2019) Pien Tze Huang (片仔癀) Overcomes Doxorubicin Resistance and Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in MCF-7/ADR Cells. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **25**, 598-603. <https://doi.org/10.1007/s11655-018-2992-4>