

· 基础研究 ·

桂枝茯苓胶囊原料药及其组分对人源乳腺癌细胞株增殖的影响

于子茹¹ 李莉¹ 王金华¹ 王振中² 萧伟² 杜冠华¹

摘要 **目的** 利用高通量筛选技术,观察桂枝茯苓胶囊原料药及其组分对人源乳腺癌细胞株增殖的作用。**方法** 桂枝茯苓胶囊原料药经萃取、洗脱后获得的粗组分,再经分离得到 929 种标准组分。采用磺酰罗丹明 B 比色法评价以含 1% DMSO 的无血清 DMEM 培养液体系为对照时桂枝茯苓胶囊原料药(6.125、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及其 929 种组分(50、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对人源乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 增殖的影响。**结果** 作用 72 h 后,高浓度的桂枝茯苓胶囊原料药对 MCF-7 细胞的增殖抑制能力强,且有良好量效关系($r = 0.9875$),低浓度对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制能力强;929 个组分(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中仍有部分样品对乳腺癌细胞生长抑制率 $>50\%$,同时这些组分对正常人脐静脉内皮细胞无生长抑制作用。**结论** 桂枝茯苓胶囊原料药在两种人源乳腺癌细胞株上均有显著的抑制细胞增殖作用,并具有明显的浓度和时间依赖性。

关键词 桂枝茯苓胶囊;高通量筛选;乳腺癌;MCF-7 细胞;MDA-MB-231 细胞

Effect of Guizhi Fuling Capsule and Its Ingredients on Human Breast Cancer Cells Proliferation
YU Zi-ru¹, LI Li¹, WANG Jin-hua¹, WANG Zhen-zhong², XIAO Wei², and DU Guan-hua¹ 1 Beijing Key Laboratory of Drug Targets Identification and Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing (100050); 2 State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu (222001)

ABSTRACT **Objective** To evaluate the effect of Guizhi Fuling Capsule active pharmaceutical ingredient (API) and its fractions on human breast cancer cells proliferation by high-throughput screening assay. **Methods** The crude fractions were obtained from the extraction and elution of Guizhi Fuling Capsule API, and 929 standard fractions were obtained by the optimal separation conditions. Sulforhodamine B (SRB) method was used to evaluate the effects of Guizhi Fuling Capsule API(6.125, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 929 kinds of fractions (50, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the proliferation of human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 while the serum-free DMEM medium with 1% DMSO was used as blank control. **Results** The Guizhi Fuling Capsule API had a strong ability to inhibit the proliferation of MCF-7 cells at high concentration with significant concentration-dependent manner($r = 0.9875$) and the ability to inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells at low concentration following 72 hours treatment; some samples of 929 fractions (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were found to have a breast cancer cell growth inhibition rate above 50%, without toxicity on HUVECs proliferation. **Conclusion** The API of Guizhi Fuling Capsule had significant cytotoxicity effects on two human breast cancer cell lines, with significant concentration-and time-dependent manner.

基金项目:“重大新药创制”国家科技重大专项资助项目(No. 2013ZX09402203, No. 2013ZX09508104);国家自然科学基金面上项目(No. 81573454);中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目(No. 2016-I2M-3-007)

作者单位:1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所北京市药物靶点研究与新药筛选重点实验室(北京 100050); 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室江苏康缘药业股份有限公司(江苏 222001)

通讯作者:杜冠华, Tel: 010-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

Dol: 10.7661/j.cjim.20171212.329

KEYWORDS Guizhi Fuling Capsule; high-throughput screening; breast cancer; MCF-7 cell; MDA-MB-231 cell

桂枝茯苓胶囊由桂枝茯苓丸经剂型改革而成,其组方来自于张仲景《金匮要略》一书,以等比例桂枝、茯苓、赤芍、桃仁及牡丹皮组成,具有活血化瘀、消癥散结的功效,临床上主要用于妇科疾病如经闭、痛经、子宫肌瘤、乳腺增生、卵巢囊肿等^[1]的治疗,疗效显著。研究表明,桂枝茯苓胶囊可有效治疗乳腺增生^[2,3]、改善内分泌、调节雌激素水平^[4],并可显著抑制体外培养宫颈癌 Hela 细胞的增殖^[5],其机制与促进 Fas、FasL 及 Caspase-3 表达,并抑制 Bcl-2 表达有关。抗肿瘤治疗中很大比例药物通过抑制细胞增殖起效,目前此类药物主要通过细胞水平筛选获得。高通量筛选技术可用于进行大规模系统活性研究,以快速准确地了解活性组分的药理作用。本研究采用高通量筛选技术,评价了桂枝茯苓胶囊原料药及组分对人源乳腺癌细胞株 MCF-7 及 MDA-MB-231 增殖的影响。

材料与方法

1 细胞株 人源乳腺癌 MCF-7(货号:JNO-0528)、MDA-MB-231(货号:JNO-0530)细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC,货号:CRL-1730)购自美国标准生物品收藏中心。

2 药物及试剂 桂枝茯苓胶囊原料药:桂枝茯苓胶囊(以等比例桂枝、茯苓、赤芍、桃仁及牡丹皮组成),江苏康缘药业股份有限公司生产,批号:160420,去胶囊外壳后直接配制使用。桂枝茯苓胶囊组分:枝茯苓胶囊原料药经醇提取、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取;水提部分上 D101 柱乙醇梯度洗脱。分别得粗组分后经 HPLC 分离,选择最优分离条件进行液相制备,得到标准组分 929 个。

各组分用二甲基亚砜(DMSO)溶解为 1 mg/mL,无菌条件下生理盐水稀释到适当浓度,采用同样终浓度 DMSO 溶液为对照。5-氟尿嘧啶(5-FU,批号:F6627)和磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B, SRB,批号:230162)购于美国 Sigma 公司。RPMI 1640 细胞培养基购于美国 Gibco 公司,批号:11875-093。标准胎牛血清购于德国 PAN Seratech 公司,批号:P30-3302。

3 仪器细胞 培养箱 MCO-175,日本 SANYO 公司;YT-CJ-2ND 超净工作台,北京亚泰科隆仪器

技术有限公司;显微镜 IX71,日本 Olympus 公司;SpectraMaxM5 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司。

4 细胞培养 人源乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株及 HUVEC CRL-1730,均用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养,隔天换液,根据细胞生长情况每 2~3 天传代 1 次。

5 SRB 法检测增殖抑制率 细胞增殖活力取对数生长期的细胞调整至 1.65 × 10⁴ 个/mL,每孔 180 μL 接种于 96 孔板,培养 24 h 后进行给药实验。实验分为对照组(加入 20 μL 含 1% DMSO 的培养基)、桂枝茯苓胶囊组加入 20 μL 待检测样品溶液(终浓度为 6.125、12.5、25.50、100、200、400 μg/mL 的药物)、桂枝茯苓胶囊组分溶液 10 μL(终浓度 50 或 5 μg/mL 的药物)、阳性药组 10 μL(终浓度 5 μg/mL 的 5-FU),桂枝茯苓胶囊组分孔和阳性药孔均用 10 μL 含 1% DMSO 的培养基补足体系。

药物作用一定时间后,弃上清,预冷的 10% 三氯醋酸(TCA)液固定静置 5 min,4 ℃ 1 h 后,洗板 5 次,晾干后各孔加入 SRB 溶液 100 μL,室温染色 10 min 后倒掉染液,1% TCA 液洗板 6 次,空气干燥后各孔加入 150 μL 10 mmol/L 的 Tris 溶液(pH 10.5),振荡 5 min 使其充分溶解,酶标仪 540 nm 波长处测定吸光度(Absorbance, A)。

细胞增殖抑制率(%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$

6 IC₅₀ 测定 取对数生长期的细胞,以 1.65 × 10⁴ 个/mL,每孔 180 μL 接种于 96 孔板,边缘孔加 100 μL 生理盐水,培养 24 h 后,分别加入不同浓度的样品,剂量设置为 10、5.6、3、1.8、1、0.3、0.1 μg/mL,对照组以含 1% DMSO 的培养基补足体系。药物作用 72 h 后,SRB 法测定细胞生长抑制率。

7 统计学方法 上述实验均重复 3 次。实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 IBM SPSS Statistics 22.0 统计学软件进行分析。采用 Tukey 事后多重比较检验组间差异, P < 0.05 为差异有统计学意义。统计图以 Origin 9 软件绘制,Adobe Illustrator CC2015(3) 软件进行处理。

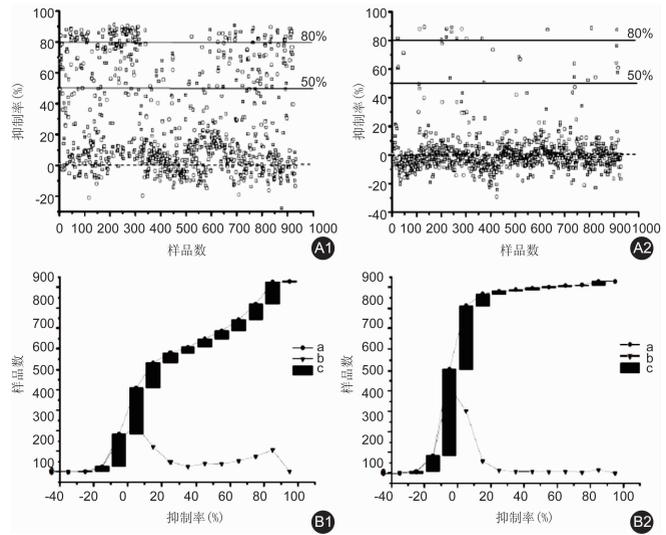
结 果

1 各组 MCF-7 细胞增殖抑制率比较(表 1) 与

对照组比较,200 μg/mL 的桂枝茯苓胶囊原料药作用 24 h 时已显示出细胞增殖抑制作用($P < 0.01$);作用时间延长为 72 h 后,包括最低剂量 6.125 μg/mL 的所有桂枝茯苓胶囊组均具有细胞增殖抑制作用($P < 0.01$),且具有明显的量效关系(作用 24 h, $r = 0.995 1$;作用 48 h, $r = 0.986 1$;作用 72 h, $r = 0.987 5$),起效时间较短,作用 24、48、72 h IC_{50} 值分别为 1424.04、163.36、125.27 μg/mL。

2 各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率比较(表 2) 与对照组比较,不同浓度、不同作用时间的桂枝茯苓胶囊处理组均有细胞增殖抑制作用($P < 0.01$, $P < 0.05$)。药物处理 72 h 时,最低浓度的桂枝茯苓胶囊处理组(6.125 μg/mL)对细胞增殖的抑制率已达到 50%。作用 24、48、72 h IC_{50} 值分别为 367.20、228.87、27.55 μg/mL。

3 929 个桂枝茯苓胶囊组分对 MCF-7 增殖的影响(图 1) 929 个桂枝茯苓胶囊组分处理 MCF-7 细胞 72 h 后,发现终浓度为 50 μg/mL 的多个组分样品对 MCF-7 细胞具有显著增殖抑制作用,其中抑制率 > 50% 的组分有 280 个,约占样品总数的 30%;抑制率 > 80% 的组分有 110 个,占样品总数的 12%。样品



注:A1、B1 组分浓度 50 μg/mL; A2、B2 组分浓度 5 μg/mL; B1、B2 中,a 为抑制率区间的样品数,b、c 为累积样品数

图 1 929 个桂枝茯苓胶囊组分处理 72 h MCF-7 增殖抑制率

终浓度为 5 μg/mL 时,活性组分数量有所降低,其中抑制率 > 50% 的组分有 33 个,约占样品总数的 4%;抑制率 > 80% 的组分有 16 个,占样品总数的 2%。

表 1 各组 MCF-7 细胞增殖抑制率比较

组别 (μg/mL)	n	24 h		48 h		72 h	
		A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
对照	3	1.96 ± 0.02	0.00 ± 0.00	1.70 ± 0.09	0.00 ± 0.00	1.93 ± 0.11	0.00 ± 0.00
桂枝茯苓胶囊 6.125	3	1.94 ± 0.01	1.00 ± 0.89	1.71 ± 0.07	2.02 ± 7.27	1.76 ± 0.03**	8.52 ± 2.99**
12.5	3	1.92 ± 0.02	2.15 ± 1.62	1.58 ± 0.03	7.06 ± 4.44	1.67 ± 0.04**	12.02 ± 1.55**
25	3	1.84 ± 0.15	6.26 ± 7.58	1.57 ± 0.04	7.88 ± 5.14	1.70 ± 0.04**	11.84 ± 3.14**
50	3	1.87 ± 0.06	4.66 ± 2.66	1.51 ± 0.05	11.50 ± 2.78	1.61 ± 0.02**	16.21 ± 3.86**
100	3	1.76 ± 0.02	10.31 ± 0.55	1.47 ± 0.16*	21.16 ± 3.79*	1.52 ± 0.03**	21.28 ± 2.70**
200	3	1.57 ± 0.04**	19.61 ± 2.55**	0.85 ± 0.05**	47.67 ± 0.13**	1.20 ± 0.02**	36.70 ± 0.81**
400	3	1.13 ± 0.09**	42.01 ± 4.58**	0.37 ± 0.02**	78.42 ± 0.71**	0.20 ± 0.02**	89.77 ± 1.22**
阳性药	3	0.87 ± 0.01**	55.58 ± 0.63**	0.82 ± 0.04**	51.88 ± 2.27**	0.42 ± 0.03**	78.20 ± 1.53**

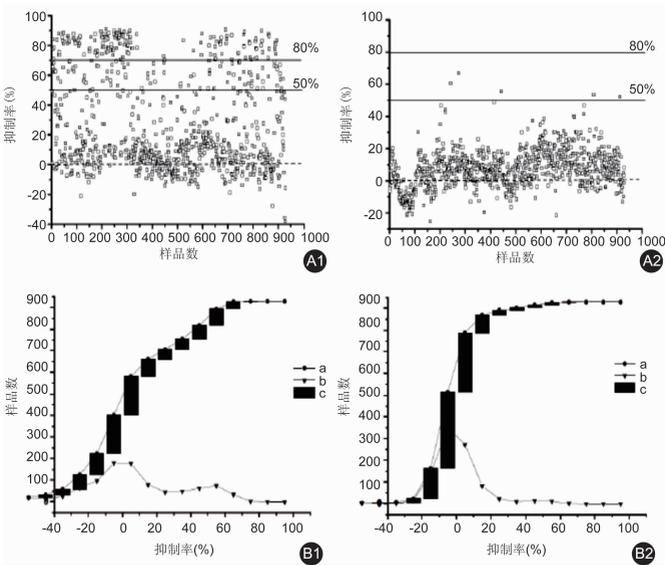
注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率比较

组别 (μg/mL)	n	24 h		48 h		72 h	
		A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
对照	3	0.44 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.00 ± 0.00
桂枝茯苓胶囊 6.125	3	0.38 ± 0.01**	13.77 ± 8.00**	0.29 ± 0.00**	22.23 ± 6.38**	0.24 ± 0.01**	50.41 ± 1.64**
12.5	3	0.37 ± 0.00**	17.61 ± 1.51**	0.27 ± 0.01**	28.66 ± 7.44**	0.24 ± 0.01**	50.35 ± 1.98**
25	3	0.38 ± 0.01**	16.63 ± 2.69**	0.27 ± 0.00**	27.13 ± 4.61**	0.27 ± 0.03**	44.79 ± 6.17**
50	3	0.40 ± 0.43*	12.38 ± 4.01*	0.30 ± 0.02**	19.30 ± 6.81**	0.25 ± 0.01**	49.94 ± 2.01**
100	3	0.36 ± 0.02**	14.77 ± 0.63**	0.27 ± 0.01**	27.69 ± 6.05**	0.24 ± 0.01**	51.68 ± 1.51**
200	3	0.34 ± 0.01**	21.25 ± 3.82**	0.21 ± 0.01**	43.71 ± 4.93**	0.17 ± 0.01**	64.45 ± 2.41**
400	3	0.20 ± 0.01**	53.51 ± 1.39**	0.16 ± 0.01**	57.11 ± 5.12**	0.14 ± 0.02**	70.89 ± 4.09**
阳性药	3	0.38 ± 0.01**	13.39 ± 2.15**	0.28 ± 0.02**	25.45 ± 4.83**	0.24 ± 0.02**	50.61 ± 1.76**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 929 个桂枝茯苓胶囊组分对 MDA-MB-231 增殖的影响 (图 2) 929 个桂枝茯苓胶囊组分作用 MDA-MB-231 细胞 72 h 后,发现终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多个组分样品对 MDA-MB-231 细胞均具有显著增殖抑制作用,其中抑制率 >50% 的组分有 174 个,约占样品总数的 19%;抑制率 >80% 的组分有 2 个。样品终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,仍有 5 个组分抑制率 >50%;无抑制率 >80% 的样品。



注:A1、B1 组分浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;A2、B2 组分浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;B1、B2 中,a 为抑制率区间的样品数,b、c 为累积样品数

图 2 929 个桂枝茯苓胶囊组分处理 72 h MDA-MB-231 增殖抑制率

5 活性样品对正常细胞增殖的作用 (图 3) 将稀释到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后仍对两种乳腺癌细胞有显著抑制活性的样品以初始浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在正常细胞上进行评价,以含 1% DMSO 的无血清 DMEM 培养液体系为

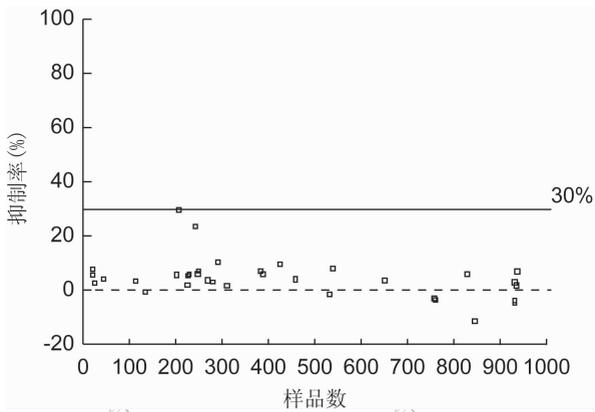


图 3 35 个桂枝茯苓胶囊活性组分处理 72 h CRL-1730 增殖抑制率

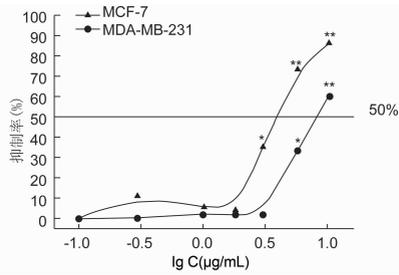
空白对照,结果发现,35 个样品对 HUVEC CRL-1730 的抑制率为 -12% ~ 33%,无明显生长抑制或促进作用。

6 活性样品 IC_{50} 的测定及特异性作用评价 (表 3,图 4-7) 250 号样品由桂枝茯苓胶囊的醇提物经乙酸乙酯萃取后过柱得到,后两者均由醇提物直接过柱所得。三种组分在两种人源乳腺癌细胞上均有明显抑制作用,且有较好的量效关系,三种组分对于 MCF-7 的增殖抑制能力略强于 MDA-MB-231。终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的桂枝茯苓组分对 MCF-7 和 MDA-MB-231 增殖抑制率 >50% 的共计 287 个,占样品总数的 31%;对两种细胞同时具有显著增殖抑制作用的样品共计 167 个,占样品总数的 18%。终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 MCF-7 和 MDA-MB-231 增殖抑制率 >50% 的桂枝茯苓组分样品共计 35 个,占样品总数的 5%,而对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞同时具有显著增殖抑制作用的样品共计 3 个。

表 3 三种桂枝茯苓胶囊组分作用人源乳腺癌细胞 72 h 的 IC_{50} 值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

组分代号	MCF-7	MDA-MB-231
250	4.17	7.94
828	4.37	7.08
931	4.21	8.13

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$



注:与对照组 (抑制率为 0) 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;表 5、6 同

图 4 组分 250 作用于 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的量效曲线

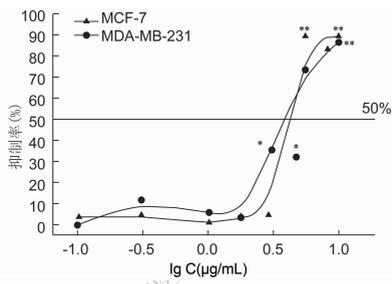


图 5 组分 828 作用于 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的量效曲线

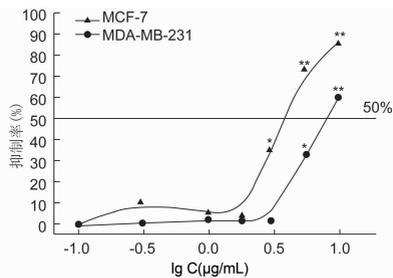
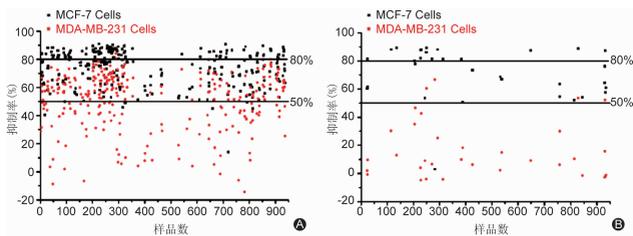


图6 组分 931 作用于 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的量效曲线



注:A:浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$;B:浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$

图7 桂枝茯苓胶囊组分对 MCF-7 和 MDA-MB-231 增殖抑制率 >50% 的提取物的作用比较

讨 论

桂枝茯苓胶囊组方历史悠久,应用广泛。经临床研究证实,在妇科疾病中,桂枝茯苓丸及其加减常用来治疗子宫肌瘤、卵巢囊肿、临床表现以“痛经”为主的子宫内膜异位症等。而在内科疾病中,胃肠系统疾病、消化系统疾病临床凡兼有瘀、肿现象者,也均可用本方。此外,桂枝茯苓丸还可用于内分泌与代谢性疾病的治疗。在桂枝茯苓丸现代运用涉及到的中医病名谱中,出现频率最高的是癥瘕,其次是产后恶露不绝、崩漏、不孕、乳癖,其中明确提出本方可用于治疗乳房疾病^[6]。

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,发病率呈逐年上升趋势。临床上根据雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、原癌基因人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)及 Ki-67 分子表型将其划分为 4 类^[7]: Luminal A 型(ER⁺/PR⁺, HER-2⁻)、Luminal B 型(ER⁺/PR⁺, HER-2⁺)、HER-2⁺型(ER⁻/PR⁻/HER-2⁺)和 Basal-like 型(ER⁻/PR⁻/HER-2⁻)。Luminal A 型为单纯内分泌治疗;Luminal B 型为内分泌治疗结合细胞毒治疗;HER-2⁺型为内分泌治疗、细胞毒治疗以及抗 HER-2 治疗;三阴性则只能通过细胞毒治疗^[8,9]。不

同分子亚型乳腺癌的临床治疗反应和生存期不同,另外,由于化学药的不良反应或疗效不理想等问题,近年来从中药中寻找治疗妇科疾病的药物逐渐受到重视^[7-13]。早在上世纪,就有日本学者将桂枝茯苓丸在乳腺癌的诊断中推广使用^[14],由于疗效好,不良反应少,其可代替抗雌激素药作为诊断乳腺癌的诊断性内分泌治疗药。

本研究采用两种不同激素受体表达类型的人源乳腺癌细胞进行实验, MCF-7 细胞表型为 ER(+), PR(+), HER-2(-), MDA-MB-231 细胞则是三阴性乳腺癌,表型为 ER(-), PR(-), HER-2(-)。结果显示,桂枝茯苓胶囊原料药及其 3 个组分样品对两种乳腺癌细胞均有较显著的抑制增殖作用,且具有明显时效和量效关系。高浓度的桂枝茯苓胶囊原料药对 MCF-7 细胞的增殖抑制能力强,低浓度时对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制能力强。作用 72 h,对 MCF-7 细胞的增殖抑制 IC₅₀ 值略高于在 MDA-MB-231 细胞中的 IC₅₀ 值,说明相较于 ER 阳性的乳腺癌细胞,桂枝茯苓胶囊原料药对三阴性乳腺癌细胞的增殖抑制作用起效浓度更低,更敏感。这些结果表明,桂枝茯苓胶囊原料药对于不同类型的乳腺癌细胞均具有增殖抑制作用,但在不同类型乳腺癌细胞增殖抑制作用的强度和敏感性具有差异,其作用及作用机制尚需深入探讨。

对桂枝茯苓胶囊的 929 个组分进行的体外抗肿瘤活性检测显示,在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,对 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞抑制率达到 50% 以上的样品分别有 30% 和 19%;将浓度降至 5 $\mu\text{g/mL}$ 后,仍分别有 4% 和 0.54% 的样品可以显著抑制细胞增殖,且有效样品对正常 HUVEC 无生长抑制作用。说明桂枝茯苓胶囊的部分组分也对不同类型的乳腺癌细胞具有增殖抑制作用,同时对正常细胞无生长抑制作用,提示桂枝茯苓胶囊的有效组分可能构成了其整方发挥乳腺癌细胞增殖抑制作用的物质基础。

本研究发现,桂枝茯苓胶囊组分作用于人源乳腺癌细胞 72 h,对 MCF-7 细胞表现为显著增殖抑制作用的样品较 MDA-MB-231 细胞有效的样品偏多,而大部分对 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用的样品,也同时对 MCF-7 细胞具有显著增殖抑制作用。对两种乳腺癌细胞均有较显著的抑制增殖作用的 3 个组分样品作用 72 h,对 MCF-7 细胞的增殖抑制 IC₅₀ 值略低于在 MDA-MB-231 细胞中的 IC₅₀ 值,说明这 3 个组分对 ER 阳性的乳腺癌细胞的增殖抑制作用更敏感。

中药复方通过中药中多个有效成分形成的有效成

分组与疾病相关多个靶点的相互作用、相互调节,形成有效成分-有效成分关联网络的有机组合,协同调节疾病相关主要靶点、次要靶点和协同靶点形成的疾病网络,使病理条件下机体的多个非平衡状态调节到新的平衡状态,最终达到治愈疾病的目的^[15]。网络药理学研究显示,桂枝茯苓胶囊主要通过其所含的五环三萜类、甾醇类和黄酮类化合物与多个靶点蛋白作用,调控多条生物通路来抑制子宫平滑肌的增殖和收缩、改善子宫内膜的血管形成和血液循环、降低雌激素和黄体酮的分泌(如 PGE₂、PGF₂ α 、leukotriene B₄),发挥治疗痛经、盆腔炎和子宫肌瘤的作用^[16]。

本研究显示,桂枝茯苓胶囊原料药及其部分组分样品对两种乳腺癌细胞均有较显著的抑制增殖作用,相较于 ER 阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞,桂枝茯苓胶囊原料药对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用起效浓度更低、更敏感。本实验中也发现一些只对 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用的桂枝茯苓胶囊组分(共 24 个),代号集中在 100 以下,多为桂枝茯苓胶囊醇提物经正丁醇萃取过柱后获得。此外,大部分对 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用的桂枝茯苓胶囊组分样品,也同时对 MCF-7 细胞具有显著增殖抑制作用,这些组分多由醇提物直接硅胶过柱以及醇提后经正丁醇提取得到。因此,桂枝茯苓胶囊是否也通过有效成分调控乳腺癌相关靶点,发挥抑制乳腺癌细胞增殖的作用,其具体作用机制有待于深入研究。此外,目前临床上对于三阴性乳腺癌患者,仍缺乏良好的术后辅助治疗方法,2 个只对 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用的桂枝茯苓胶囊组分(282 与 459)也值得进一步研究。

本实验发现桂枝茯苓胶囊对乳腺癌细胞的增殖具有抑制作用,且不影响正常细胞状态,并筛选出对乳腺癌细胞有显著抑制作用的部分桂枝茯苓组分,为桂枝茯苓胶囊的临床应用提供了基础,并为进一步阐明桂枝茯苓胶囊发挥疗效的物质基础提供了依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] 苏真真,李娜,曹亮,等.桂枝茯苓胶囊主要药理作用及临床应用研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(6):989-992.

[2] 杨秀清.桂枝茯苓胶囊治疗女性乳腺囊性增生病的疗效观察[J].中国医药指南,2013,11(32):512.

[3] 赵海军,郑艳洁,刘冰冰,等.桂枝茯苓胶囊联合手术治疗肉芽肿性小叶乳腺炎的预后观察[J].现代中西医结合杂志,2014,23(14):1540-1541.

[4] 田颖,高晓俐.桂枝茯苓胶囊联合西药治疗多囊卵巢综合征及对内分泌代谢和排卵的影响[J].陕西中医,2017,38(4):444-445.

[5] 方莲花,陈若芸,郭晶,等.桂枝茯苓胶囊提取物的体外抗肿瘤活性及机制[J].中国药理学杂志,2012,47(10):813-817.

[6] 赵英.桂枝茯苓丸治疗妇科病临床研究[J].河北中医药学报,2016,31(1):30-31.

[7] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2012, 490(7418):61-70.

[8] 张毅.乳腺癌分子分型与治疗[J].中国普外基础与临床杂志,2014,21(5):525-531.

[9] 倪晨,李婷,吴振华,等.三阴性乳腺癌化疗进展[J].中国癌症杂志,2014,24(4):316-320.

[10] Kolhe S, Deb S. Dysmenorrhoea[J]. Obstet Gynaecol Reprod Med, 2011, 21(11):311-316.

[11] Stewart K, Deb S. Dysmenorrhoea [J]. Obstet Gynaecol Reprod Med, 2014, 24(10):296-302.

[12] Taylor DK, Leppert PC. Treatment for uterine fibroids: Searching for effective drug therapies [J]. Drug Discov Today Ther Strateg, 2012, 9(1):41-49.

[13] Islam MS, Akhtar MM, Ciavattini A, et al. Use of dietary phytochemicals to target inflammation, fibrosis, proliferation, and angiogenesis in uterine tissues: promising options for prevention and treatment of uterine fibroids? [J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(8):1667-1684.

[14] 古妻嘉一.桂枝茯苓丸在乳腺癌诊断中作为作为诊断性内分泌疗法治疗药的应用[J].日本东洋医学杂志,2000,51(1):35-42.

[15] 杜冠华.中药复方有效成分组学研究[J].中成药,2002,24(11):878-880.

[16] 张新庄,萧伟,徐筱杰,等.基于网络药理学的桂枝茯苓胶囊治疗痛经、子宫肌瘤和盆腔炎的分子作用机制研究[J].中草药,2016,47(1):81-94.

(收稿:2017-06-07 在线:2017-12-30)

责任编辑:赵芳芳