

β -榄香烯注射液联合紫杉醇注射液对乳腺癌 MB-468 细胞体外协同作用研究

蔡东焱 高翔 吴小红 洪婷婷

摘要 **目的** 探讨 β -榄香烯与紫杉醇对乳腺癌细胞株协同作用及其机制。**方法** 体外分别以 β -榄香烯注射液(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0、320.0、640.0 $\mu\text{g/mL}$)、紫杉醇注射液(0.00100、0.00200、0.00400、0.00800、0.01600、0.03125、0.06250、0.12500、0.25000 $\mu\text{g/mL}$)作用 24 h 和 48 h 以及两药联合处理人乳腺癌细胞株 MB-468 细胞,SRB 法检测增殖变化,流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期分布,通过 Western blot 检测干预后细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase,CDK1)、细胞周期蛋白 B1(cyclin B1)、细胞周期调控蛋白 P21^{kip1}和 P27^{kip1}表达变化。**结果** 单药 β -榄香烯或紫杉醇对 MB-468 细胞株生长均有抑制作用, β -榄香烯 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 和 IC_{20} 值分别为 34.20、52.59 和 10.15、17.81 $\mu\text{g/mL}$,紫杉醇 24、48 h 的 IC_{50} 值分别为 2.449 和 1.698 $\mu\text{g/mL}$ 。联合组(β -榄香烯和紫杉醇的浓度分别为 20、40 和 0.016、0.008 $\mu\text{g/mL}$)对乳腺癌 MB-468 细胞株的生长抑制率具有协同作用,Q 值 > 1.15。 β -榄香烯组(52.59 $\mu\text{g/mL}$)cyclin-B1 蛋白表达有明显的下降,联合组较紫杉醇单药组(1.698 $\mu\text{g/mL}$)cyclin B1 的表达水平也有降低,联合组 P27^{kip1}蛋白的表达较 β -榄香烯和紫杉醇单药作用时有增加。**结论** β -榄香烯对紫杉醇具有协同作用,其可能机制是通过下调细胞周期蛋白 cyclin B1 表达和上调 P27^{kip1}表达有关。

关键词 乳腺癌; β -榄香烯;紫杉醇;协同作用;细胞周期

Synergistic Effect of β -elemene Injection Combined Paclitaxel Injection on Human Breast Cancer MB-468 Cells: an *in vitro* Study CAI Dong-yan, GAO Xiang, WU Xiao-hong, and HONG Ting-ting
Department of Oncology, Fourth People's Hospital of Wuxi City, Jiangsu (214062), China

ABSTRACT **Objective** To observe the synergistic effect of β -elemene Injection (β I) combined Paclitaxel Injection (PI) on breast cancer MB-468 cells and to study possible mechanisms. **Methods** Breast cancer MB-468 cells were treated with β I (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0, 320.0, and 640.0 $\mu\text{g/mL}$), PI (0.00100, 0.00200, 0.00400, 0.00800, 0.01600, 0.03125, 0.06250, 0.12500, and 0.25000 $\mu\text{g/mL}$), and β I combined PI for 24 h and 48 h respectively. Cell proliferation was determined using SRB assay. Cell apoptosis and cell cycle phase distribution were detected using flow cytometry. The post-intervention expressions of cell cycle proteins [cyclin-dependent kinase (CDK1), cyclin-B1, P21^{kip1}, and P27^{kip1}] were detected by Western blot. **Results** β -elemene or paclitaxel inhibited the growth of MB-468 cell line. The IC_{50} and IC_{20} values treated with β -elemene for 24 h were 34.20 and 52.59 $\mu\text{g/mL}$ and for 48 h were 10.15 and 17.81 $\mu\text{g/mL}$ respectively, while the IC_{50} values treated with paclitaxel for 24 h and 48 h were 2.449 and 1.698 $\mu\text{g/mL}$ respectively. β -elemene (20 and 40 $\mu\text{g/mL}$ respectively) and Paclitaxel (0.016 and 0.008 $\mu\text{g/mL}$ respectively) synergistically inhibited cell proliferation of MB-468 cells, with Q value > 1.15. β -elemene alone (52.59 $\mu\text{g/mL}$) apparently decreased the expression of cyclin-B1 protein. The expression of cyclin-B1 protein in the combined group was also lower than that in the PI group (1.698 $\mu\text{g/mL}$). The expression of P27^{kip1} was up-regulated when compared with that in the β I group or the PI group. **Conclusion** β -elemene had synergistic effect with Paclitaxel, and its possible mechanism might be correlated with down-regulating the cell cycle protein cyclin-B1 expression and up-regulating the P27^{kip1} expression.

KEYWORDS breast cancer; β -elemene; Paclitaxel; synergistic effect; cell cycle

基金项目:无锡市医管中心科技计划项目(No.ygm1017)

作者单位:无锡市第四人民医院肿瘤科(江苏无锡 214062)

通讯作者:蔡东焱,Tel:13861797995, E-mail:cdy19761108@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0978

β -榄香烯(β -elemene)系由中药温莪术挥发油中分离出来的油状物单体,既往实验表明具有逆转部分化疗药物耐药的作用^[1]。过去对 β -榄香烯抗癌作用机制的研究仅限于 β -榄香烯对肿瘤细胞可诱导细胞凋亡、下调 bcl-2、bax 及上调 p53 基因表达,改变细胞周期分布等影响^[2],关于它是否参与细胞周期蛋白表达的调控,文献报道较少。本研究旨在通过体外实验观察 β -榄香烯注射液对人乳腺癌 MB-468 细胞增殖和凋亡的影响,并联合临床常用的化疗药物紫杉醇注射液,检测 β -榄香烯注射液联合紫杉醇注射液处理乳腺癌细胞是否具有协同作用,并进一步研究其可能的机制,以期为乳腺癌的临床治疗提供新的思路和方案。

材料与方法

1 细胞 人乳腺癌 MB-468 细胞系购于上海细胞库(批号:0611121)。

2 药物 β -榄香烯注射液,大连金港制药公司,20 mL,0.5%,批号:1111181),紫杉醇注射液,扬子江医药公司,5 mL,0.6%,批号:10031812)。

3 试剂及仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,兔抗人细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase CDK1)、细胞周期蛋白 B1(cyclinB1)、细胞周期调控蛋白 P21^{cip1} 和 P27^{kip1} 单克隆抗体为美国 Epitomics 公司产品;FACScan 流式细胞仪(美国 BD 公司产品),Thermo BBD 6220 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司产品)。

4 细胞培养 MB-468 细胞常规方法复苏,接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中常规培养,2~3 天换液传代 1 次。

5 细胞分组及干预方法 细胞分为 5 组,分别为 β -榄香烯组、紫杉醇组、两药联合组(联合组)、空白组(不接种细胞)及对照组(不加药物)进行干预,每组设 6 个复孔,分别培养 24、48 h。

6 检测指标及方法

6.1 乳腺癌 MB-468 细胞生长抑制率检测 取对数生长期的乳腺癌 MB-468 细胞经胰酶消化,接种于 96 孔板,每孔 200 μ L 进行培养,培养 24 h 后加药,每个浓度设 6 个复孔,并设空白组(不接种细胞)、对照组(不加药物)。分别培养 24、48 h 后,按文献[3,4]方法用 SRB 法经酶联免疫检测仪在 570 nm 波长下测量吸光度值(OD),实验重复 3 次,并计算抑制率。细胞生长抑制率(%)=[(对照组 OD_{570 nm}-实验组 OD_{570 nm})/对照组 OD_{570 nm}] $\times$ 100%,并以抑

制率对药物剂量作量效曲线。按以下公式计算 Q 值并判断两药的联合效应:Q=E(A+B)/[EA+(1-EA) $\times$ EB],其中,E(A+B)为两药合用的抑制率,EA、EB 为两药单用的抑制率,Q 为 0.85~1.15,表示两药作用相加,Q>1.15 表示两药作用协同,Q<0.85 表示两药作用相互拮抗。应用 Prism 5(GraphPad 公司)剂量效应公式拟合计算获得 IC₂₀、IC₅₀。

6.2 细胞形态学观察 取对数生长期浓度 5 $\times$ 10⁵/mL 的 MB-468 细胞悬液,接种于预置无菌 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,培养至生长 60%~70% 时(48 h 左右),不同浓度 β -榄香烯注射液作用 24 h,在倒置相差显微镜下 100 倍放大观察细胞形态。

6.3 细胞周期测定 将乳腺癌 MB-468 细胞接种于 6 孔板内,分别用药物处理 24 h 后,收集各组细胞 5 $\times$ 10⁴ 个。常规消化,200 r/min 离心 5 min,收集沉淀,冷洗 2 次,加 1 mL 70% 乙醇(预冷)固定,4℃固定过夜。次日加 1 mL 冷 PBS 混匀,同上离心收集细胞沉淀,将细胞重悬于 0.5 mL 冷 PBS 中,加 10 mg/mL 的 RNase A 10 μ L,37℃水浴 30 min,加 0.5 mg/mL 的 PI 染料 10 μ L,避光 30 min,上流式细胞仪检测,每管计数 20000 个细胞,Modfit 分析细胞周期时相及凋亡率(SubG1 为凋亡峰)。

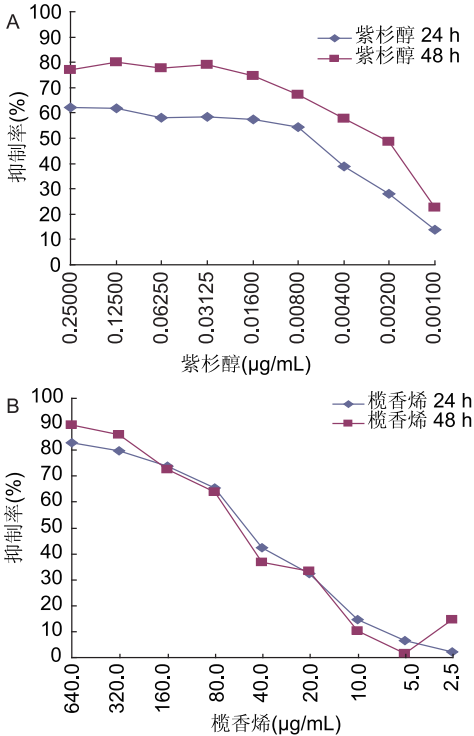
6.4 蛋白 CDK1、cyclin B1、P21^{cip1} 和 P27^{kip1} 表达检测 分别收集 IC₅₀ β -榄香烯单药组、IC₅₀ 紫杉醇单药组和两药联合组培养 48 h 的 MB-468 细胞,冰上裂解后 1500 r/min,离心 10 min,收集上清,紫外分光光度计法进行蛋白定量。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,通过电转印法将蛋白质转移到 PVDF 膜后,在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 2 h。加入一抗孵育过夜,TBST 漂洗 4 次后,加入二抗室温孵育 1 h,TBST 充分漂洗 4 次,化学发光试剂反应 5 min,X 线片暗室曝光,常规显影定影。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件,细胞生长抑制率作回归分析,应用 Prism5 软件(GraphPad 公司)剂量效应公式对各组细胞生长抑制率进行拟合计算,得到 IC₂₀、IC₅₀。

结 果

1 不同浓度 β -榄香烯及紫杉醇组各时间点 MB-468 细胞生长抑制率比较(图 1) β -榄香烯作用于 MB-468 细胞的量效曲线表现出浓度的依赖性,一定的时间依赖性,作用 48 h 组抑制作用未进一步的增强。 β -榄香烯终浓度分别为(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0、320.0、640.0 μ g/mL)作用 24 和 48 h 的 IC₅₀ 和 IC₂₀ 值

分别为 34.20、52.59 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.15、17.81 $\mu\text{g/mL}$ 。紫杉醇作用于 MB-468 细胞的量效曲线表现出时间及浓度的依赖性。紫杉醇 (0.00100、0.00200、0.00400、0.00800、0.01600、0.03125、0.06250、0.12500、0.25000 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 MB-468 细胞 24、48 h 的 IC_{50} 值分别为 2.449 和 1.698 ng/mL 。



注:A 为紫杉醇作用 24、48 h 量效曲线;B 为 β -榄香烯作用 24、48 h 量效曲线

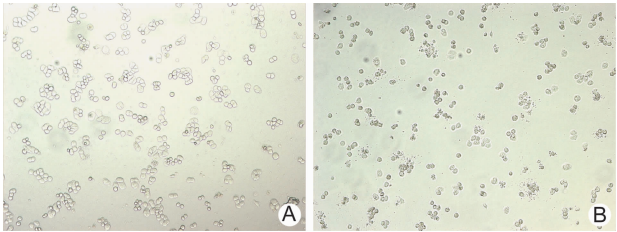
图 1 不同浓度 β -榄香烯及紫杉醇组各时间点 MB-468 细胞生长抑制率

2 各时间点不同浓度两药联用细胞生长抑制率比较(表 1) 根据单药对 MB-468 细胞的抑制效应结果,为了观察药物的协同效应,本研究选用低浓度药物进行联合:20 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ β -榄香烯及 0.016 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇单独及联合处理 MB-468 细胞,并观察 24、48 h 的作用结果。结果显示联合组对乳腺癌 MB-468 细胞株的生长抑制率具有协同作用, Q 值 > 1.15 ,但随着作用时间的延长,协同作用有下降的趋势。

3 各组细胞形态学结果比较(图 2) 乳腺癌 MB-468 细胞经不同浓度及配伍的紫杉醇和 β -榄香烯处理 24、48 h 后,结果表现出不同的细胞皱缩,边缘毛糙,染色质凝集,细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒,细胞体积缩小,凋亡小体出现。以 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 浓度紫杉醇联合 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 β -榄香烯组最为显著。

表 1 各时间点不同浓度两药联用细胞生长抑制率比较 (%)

浓度	时间 (h)	抑制率			Q 值
		紫杉醇单药	β -榄香烯单药	联合	
紫杉醇 0.016 $\mu\text{g/mL}$ + β -榄香烯 40 $\mu\text{g/mL}$	24	0.334	0.316	0.657	1.20
	48	0.659	0.355	0.898	1.15
紫杉醇 0.008 $\mu\text{g/mL}$ + β -榄香烯 40 $\mu\text{g/mL}$	24	0.310	0.316	0.633	1.19
	48	0.623	0.355	0.884	1.16
紫杉醇 0.016 $\mu\text{g/mL}$ + β -榄香烯 20 $\mu\text{g/mL}$	24	0.334	0.192	0.546	1.18
	48	0.659	0.247	0.848	1.16
紫杉醇 0.008 $\mu\text{g/mL}$ + β -榄香烯 20 $\mu\text{g/mL}$	24	0.310	0.192	0.561	1.26
	48	0.623	0.247	0.821	1.15

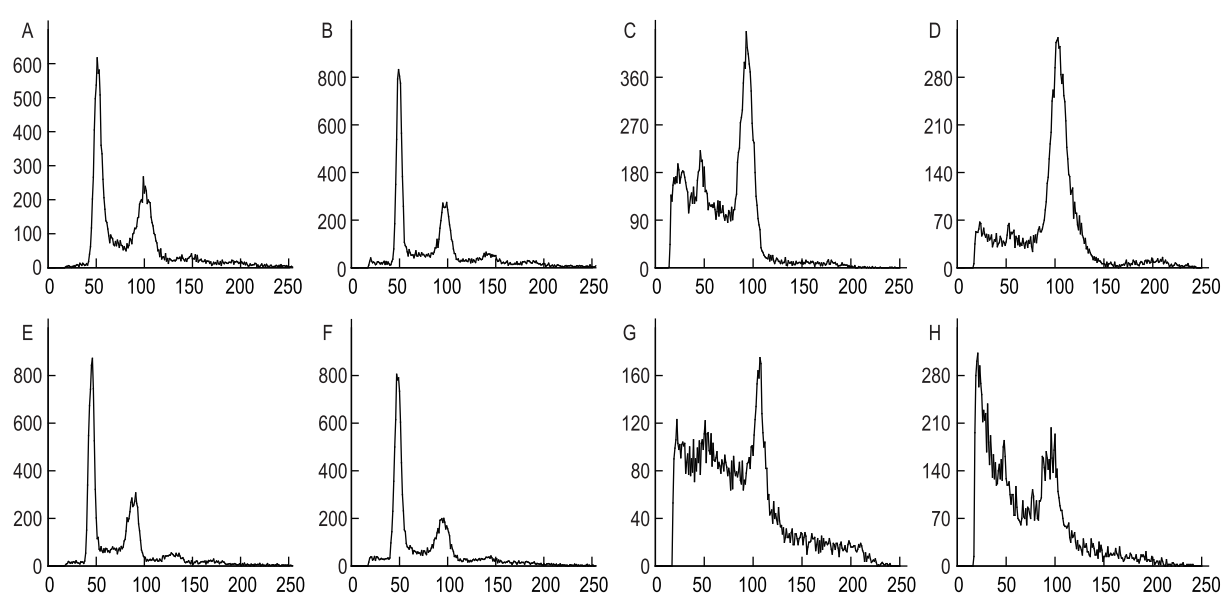


注:A 为不加药组;B 为 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇 + 40 $\mu\text{g/mL}$ β -榄香烯组处理 24 h 后

图 2 药物处理前后 MB-468 细胞形态学 ($\times 100$)

4 各组细胞周期比较(图 3) MB-468 细胞经 β -榄香烯 20 $\mu\text{g/mL}$ 作用 24、48 h 后,细胞凋亡率分别为 3.40% 和 4.37%。0.008 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇作用乳腺癌 MB-468 24、48 h 后,细胞凋亡率为 10.01% 和 15.23%,两药联合作用 24、48 h 后,细胞凋亡率增加至 12.21% 和 22.21%。单药 β -榄香烯对细胞周期无明显的影响。与对照组比较,紫杉醇作用 MB-468 细胞 24、48 h 后, $G2/M$ 期细胞比例分别增加至 61.73% 和 50.14%,两药联合作用后 $G2/M$ 期细胞比例为 75.13% 和 65.43%。

5 各组细胞 CDK1、cyclin B1、 $P21^{cip1}$ 和 $P27^{kip1}$ 蛋白表达比较(图 4) IC_{50} 浓度的 β -榄香烯和/或紫杉醇作用 MB-468 细胞 24 h 后,CDK1 和 $P21^{cip1}$ 蛋白的表达没有明显的变化, β -榄香烯组 Cyclin B1 蛋白表达有明显的下降,联合组较紫杉醇单药组 Cyclin B1 的表达水平也有降低, $P27^{kip1}$ 在对照组有一定的表达, β -榄香烯或紫杉醇单独作用后,表达均有下降,而联合组 $P27^{kip1}$ 蛋白的表达较 β -榄香烯或紫杉醇单药作用时有增加。



注:A 为 MB-468 细胞不加药培养 24 h 后,AP:0.17, G2/M:21.19;B 为 β -榄香烯 20 $\mu\text{g/mL}$ 处理 24 h 后,AP:3.40, G2/M:20.83;C 为紫杉醇 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 处理 24 h,AP:10.01, G2/M:61.73;D 为两药联合处理 24 h,AP:12.21, G2/M:75.13;E 为 MB-468 细胞培养 48 h 后,AP:1.81, G2/M:20.89;F 为 β -榄香烯 20 $\mu\text{g/mL}$ 处理 48 h,AP:4.37, G2/M:20.49;G 为紫杉醇 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 处理 48 h,AP:15.23, G2/M:50.14;H 为两药联合处理 48 h,AP:22.21, G2/M:65.43

图 3 各组细胞周期比较

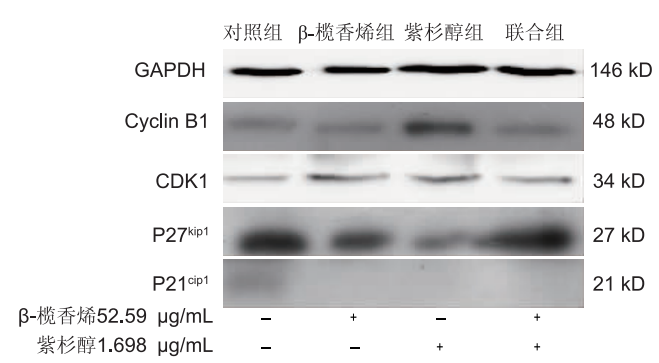


图 4 β -榄香烯和紫杉醇对 MB-468 细胞周期蛋白的影响

讨 论

近年来晚期乳腺癌的治疗取得了一定的进展,但患者的总生存期没有较大的提高,所以寻找一种有效的药物联合方案,提高治疗效果是临床应用的研究方向。 β -榄香烯是中药莪术的主要成分之一,对于多种肿瘤有一定的治疗作用,可以抑制 DNA 合成,促进肿瘤细胞的凋亡^[5]。紫杉醇是一种抗微管药物,它可以有效抑制细胞的增值,诱导细胞的凋亡。在乳腺癌的治疗中,紫杉醇类药物是最常用的抗肿瘤药物。早在 1992 年紫杉醇即被 FDA 批准开始应用于转移性乳腺癌的治疗。我们的研究发现 β -榄香烯与紫杉醇在乳腺癌治疗中具有协同作用。

本研究通过 SRB 方法检测 β -榄香烯的细胞毒性

作用,结果显示 β -榄香烯能抑制 MB-468 细胞的生长。 β -榄香烯作用于 MB-468 细胞的量效曲线表现出浓度的依赖性,紫杉醇的量效曲线表现出明显的时间及浓度依赖性。低浓度的 β -榄香烯(40 和 20 $\mu\text{g/mL}$)联合紫杉醇具有协同作用,Q 值 > 1.15,同时显示 β -榄香烯作用也有一定的时间效应,表现为 48 h 后协同作用有下降趋势。两药联合作用后肿瘤细胞的凋亡率和 G2/M 期细胞比例有增加。

在细胞周期调控机制中,与 G2/M 期调控有关的两个重要成员是 CDK1 和 cyclin B1,同时也是最早的被发现的细胞周期正调控因子。而 P21^{cip1} 和 P27^{kip1} 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors,CKIs)中的两个重要成员,P21^{cip1} 通过二个途径抑制细胞周期与细胞增生,一个途径是结合并抑制 CDK^[6,7],另一途径是抑制增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)^[8]。P27^{kip1} 在细胞静止期时表达增强,说明它是维持细胞静止期所必需的。细胞增殖时 P27^{kip1} 水平降低,p27^{kip1} 的表达与 G₁ 期持续时间有关,p27^{kip1} 表达增强时 G₁ 期延长^[9,10]。同时有研究显示乳腺癌耐药的出现与 p27^{kip1} 的表达下降有明显的关联性^[11]。

在紫杉醇导致肿瘤细胞凋亡的分子事件研究中发现,不管是高浓度的紫杉醇还是低浓度的紫杉醇作用,

细胞周期中 cyclin B1/CDc2 激酶的活性多有升高,且持续 6 h 以上^[12], Androic I 等^[13]的研究中发现: cyclin B1 对于肿瘤细胞的生存和增值具有重要意义,敲除 cyclin B1 可以抑制肿瘤细胞的增值,而且体内外试验中,均发现敲除 cyclin B1 可以致敏紫杉醇的抗肿瘤作用。Nakayama S 等^[14]的研究中证实,体内试验中,紫杉醇治疗后 CDK1 升高者,提示对紫杉醇治疗敏感,反之则不敏感。而在 Wang G 等^[15]的研究中显示,β-榄香烯可以阻滞 NSCLC 细胞在 G2/M 期,这一作用与降低了细胞周期中 cyclin B1 和 CDK1,升高 P27^{kip1}有关。

本研究中,β-榄香烯作用 MB-468 细胞后,cyclin B1 的表达水平有降低,β-榄香烯联合紫杉醇组较紫杉醇单药组 cyclin B1 的表达水平也有降低。两药联合作用后升高了 MB-468 细胞 P27^{kip1}的表达水平,CDK1 的表达水平变化不明显,而 P21^{cip1}的表达水平在单药组或联合组均有下降。

综上,可以初步判断 β-榄香烯对于紫杉醇抗肿瘤的协同作用是通过降低 cyclin B1 的表达水平,升高 P27^{kip1}的表达水平来实现的,但具体作用机制有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 胡军,金伟,杨佩满. β-榄香烯逆转人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素耐药性的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(5): 268-270.
- [2] Hao Jiang, Shenglin Ma, Jiangguo Feng. *In vitro* study of radiosensitization by β-elemene in A549 cell line from adenocarcinoma of lung[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2009, 8(1):12-15.
- [3] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. J Natl cancer Inst, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [4] 张兴忠,徐莉英,陶淑娟,等.β-榄香烯醇酯类化合物的合成及抗癌活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(1): 13-17.
- [5] 林元相,康德智,苏东辉,等. β-榄香烯体外诱导大鼠神经胶质瘤细胞热休克蛋白 70 的表达及肿瘤细胞的凋亡[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(S1): 103-107.
- [6] Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(3): 245-252.
- [7] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases[J]. Cell, 1993, 75(4): 805-816.
- [8] Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor[J]. Oncogene, 1995, 10(12): 2281-2287.
- [9] Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, 9(1): 67-80.
- [10] Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, et al. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27 (Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(1): 201-213.
- [11] Chu I, Sun J, Arnaout A, et al. p27 phosphorylation by SCr regulates inhibition of cyclin E-Cdk2[J]. Cell, 2007, 128(2): 281-294.
- [12] Huang TS, Shu CH, Chao Y, et al. Activation of MAD 2 checkprotein and persistence of cyclin B1/CDC 2 activity associate with paclitaxel-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Apoptosis, 2000, 5(3): 235-241.
- [13] Androic I, Krämer A, Yan R, et al. Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 391.
- [14] Nakayama S, Torikoshi Y, Takahashi T, et al. Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(1): R12.
- [15] Wang G, Li X, Huang F, et al. Antitumor effect of β-elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(7-8): 881-893.

(收稿:2012-11-01 修回:2013-03-11)