

## ·药效与毒理学研究·

## 山慈菇-蜂房药对抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外侵袭转移的机理研究

刘琦<sup>1</sup>, 程旭锋<sup>2</sup>, 张新峰<sup>3</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 赵慧朵<sup>2</sup>(1. 河南中医学院科研处, 河南 郑州 450008; 2. 河南中医学院第一附属医院乳腺外科, 河南 郑州 450000; 3. 郑州大学附属肿瘤医院中西医结合科, 河南 郑州 4500008)

**摘要:** **目的** 研究山慈菇-蜂房药对对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响及其作用机制。**方法** 噻唑蓝(MTT)法检测山慈菇-蜂房药对大鼠含药血清对细胞活力的影响, Transwell 小室法测定其侵袭力, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测细胞基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)基因的表达。**结果** 山慈菇-蜂房药对组 MDA-MB-231 细胞体外生长杀伤率为 35.86%; 能明显抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力( $P < 0.01$ ), 其抑制率为 34.8%; MMP-9 mRNA 明显降低, TIMP-1 mRNA 明显升高, MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 值显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 山慈菇-蜂房药对能够抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭能力, 其机制可能与下调 MMP-9mRNA 表达, 上调 TIMP-1mRNA 的表达, 降低 MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 比值有关。

**关键词:** 山慈菇-蜂房药对; MDA-MB-231 细胞; 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶组织抑制剂-1

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0389-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.001

### Mechanism Research of Chinese Herbal Pair of Pseudobulbus Cremastrae seu Pleiones and Nidus Polistis Mandarinini in Inhibiting In-vitro Invasion and Metastasis of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

LIU Qi<sup>1</sup>, CHENG Xufeng<sup>2</sup>, ZHANG Xinfeng<sup>3</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>, ZHAO Huiduo<sup>2</sup> (1. Department of Academic Affairs, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China; 2. Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000 Henan, China; 3. Department of Integrated Chinese and Western Medicine of Tumor Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008 Henan, China)

**Abstract: Objective** To explore the inhibitive effects and mechanism of Chinese herbal pair of Pseudobulbus Cremastrae seu Pleiones (*Shancigu*) and Nidus Polistis Mandarinini (*Lufengfang*) on in-vitro invasion and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** The effect of serum containing *Shancigu-Lufengfang* on MDA-MB-231 cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The invasion ability of the cells was measured by Transwell chamber. Real-time fluorescence polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to evaluate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in MDA-MB-231 cells. **Results** Chinese herbal pair of *Shancigu-Lufengfang* showed an in-vitro killing rate of 35.86% on MDA-MB-231 cells, and could obviously inhibit the invasion ability of MDA-MB-231 cells ( $P < 0.01$ ), the inhibition ratio being 34.8%. MMP-9 mRNA expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while TIMP-1 mRNA expression was obviously increased ( $P < 0.05$ ), therefore the ratio of MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA was reduced dramatically ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Chinese herbal pair of *Shancigu-Lufengfang* could inhibit

收稿日期: 2014-05-09

作者简介: 刘琦, 女, 医学硕士, 讲师, 研究方向: 中医药的分子生物学。Email: liuqi117@126.com。通讯作者: 程旭锋, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 中西医结合防治乳腺疾病的临床与基础研究。Email: cx9939@163.com。

基金项目: 河南省科技厅 2010 年基础与前沿项目 (102300410040); 金水区 2011 技术研究与开发经费支持项目 (20113149); 河南中医学院 2010 年苗圃工程。

the invasion ability of MDA-MB-231 cells, and the inhibitive mechanism may be correlated with the down-regulation of MMP-9 mRNA and the UP-regulation of TIMP-1 mRNA, thus decreasing the ratio of MMP-9mRNA/ TIMP-1 mRNA.

**Keywords:** Chinese Herbal Pair of Pseudobulbus Cremastrae seu Pleiones and Nidus Polistis Mandarinii; MDA-MB-231 Cells; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤, 严重威胁着女性的健康, 乳腺癌术后复发转移尤其是内脏转移是导致最终治疗失败甚至死亡的主要原因<sup>[1]</sup>, 也是目前临床上的治疗难点。如何抑制乳腺癌细胞生长, 阻断癌细胞侵袭与转移, 防止乳腺癌根治术后复发转移, 是目前乳腺癌治疗研究的热点之一。中医临床实践发现<sup>[2]</sup>, 乳腺癌术后复发转移的根本原因是患者体内未尽的癌毒, 治疗可采用解毒散结法。山慈菇、蜂房是沪上名医陆德铭教授、刘胜教授等防治乳腺癌术后复发转移的基本药对, 是具有抗乳腺癌复发转移功效的中药制剂乳移平的主要药物, 具有解毒散结、抗癌杀毒的功效。本研究旨在探究具有解毒散结功效的山慈菇-蜂房药对对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭和迁移的作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 胎牛血清(批号: 348555)、DMEM 培养基(批号: 714498)、胰酶(批号: 1095511)、TRIzol Reagent (批号: 53879405), 美国 Gibco 公司。噻唑蓝(MTT, 批号: M2128)、二甲基亚砜(DMSO, 批号: RNBC1435), 美国 Sigma 公司; 目的基因引物及探针, 由北京赛百盛生物工程公司合成; Reverse Transcription System, 美国 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶, 北京艾比根生物技术有限公司; Matrigel 基底膜基质胶, 美国 BD 公司, 批号: 356234; 溴乙锭, 瑞士 Fluka 公司; SYBR Green I 实时荧光定量 PCR (CRT-PCR) 试剂盒, 瑞士 Roche 公司; 其余试剂为国产分析纯。

**1.2 仪器** 超净工作台, 上海净化设备厂; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; 多功能酶标仪, 芬兰 Labsystem 公司; 8  $\mu\text{m}$  Transwell 小室、96 孔培养板, 美国 Costar 公司; 倒置生物显微镜, 日本 Olympus 公司; 医用显微镜, 日本 Nikon 公司; Eppendorf real Hex2 型 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; 凝胶数码成像及分析系统, 美国 Alpha Innotech 公司。

**1.3 药物** 蜂房、山慈菇由河南中医学院第一附属医院中药房提供, 常规煎煮, 减压浓缩至  $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 为生药量; 阿霉素(ADM), 深圳万乐药业有限公司, 批号: 0905E1, 以生理盐水配制成  $2.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 现配现用。

**1.4 动物及细胞** SPF 级 SD 雌性大鼠, 体质量( $300 \pm 30$ )g, 由河南省实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(豫)2005-0001。人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞由上海肿瘤医院分子生物实验室邵志敏教授惠赠。细胞以含  $50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  庆大霉素、10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  充分湿化条件下培养备用。

**1.5 大鼠分组及含药血清的制备** 取 SD 雌性大鼠, 分为阴性对照组、山慈菇-蜂房药对组、ADM 组。按人鼠等效药量换算方法计算给药剂量, 参照血清药理学给药方法<sup>[3]</sup>制备含药血清, 大鼠给药剂量为人鼠等效剂量的 6 倍。山慈菇-蜂房药对组灌胃给予山慈菇-蜂房药对水煎液  $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , ADM 组尾静脉注射 ADM  $9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 阴性对照组给予等量生理盐水, 连续给药 3 d 后, 当夜禁食不禁水, 第 4 天再给药 1 次, 山慈菇-蜂房药对组在末次给药后 2 h, ADM 组在末次给药后 1 h 腹主动脉采血, 无菌条件下分离血清, 同组血清混合,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌,  $56 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min 水浴灭活,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.6 MDA-MB-231 细胞体外杀伤实验<sup>[4]</sup>** 将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 DMEM 培养液调成  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , 接种于 96 孔培养板上, 每孔  $150 \mu\text{L}$ , 每组 8 孔; 根据预实验结果, 分别加入终浓度为 20% 的含药大鼠血清, 在常规条件下培养 72 h 后, 每孔再加入  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 弃各孔内液体, 每孔加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$ , 振荡 10 min, 用酶标测试仪于 570 nm 波长处检测吸光度(OD)值。

细胞杀伤率 =  $(1 - \text{实验组 OD 值} / \text{阴性对照组 OD 值}) \times 100 \%$

**1.7 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力检测<sup>[5-6]</sup>**

Transwell 小室膜的上层铺上一层基质胶, 检测不同药物对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。将 MDA-MB-231 细胞于含 10 % 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养 24 h 后, 换用单纯 DMEM 培养基, 分别加入山慈菇 - 蜂房药对组、AMD 组和阴性对照组血清, 使其终浓度均为 20 %, 预处理细胞 24 h; 每组重复 3 个 Transwell 小室。用 0.25 % 胰酶消化各组细胞并计数, 按每室  $1 \times 10^6$  制成相应细胞悬液备用。在 Transwell 侵袭腔内置入 60  $\mu$ L Matrigel 与 DMEM 培养液的混合液(Matrigel : DMEM=1 : 3), 置 37  $^{\circ}$ C, 15 min, 使成凝胶状, 再在此层上置入 60  $\mu$ L 以 1 : 3 混合的含有  $1 \times 10^6$  细胞的 Matrigel 与 MEM 混合液, 并加入 15  $\mu$ L 药物血清。在底层孔加入 600  $\mu$ L 的常规细胞培养液, 并加入 150  $\mu$ L 药物血清, 使其终浓度为 20 %, 在 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 72 h。吸出底层孔的培养液, 加 0.5 mL 胰酶洗孔后吸出, 再加 0.5 mL 胰酶消化细胞 2~3 min, 将两次胰酶混合, 加 1 mL 常规培养液终止消化后离心, 吸弃上清, 加 100  $\mu$ L DMEM 培养液重悬细胞, 采用血球计数板计算穿过侵袭腔的细胞数。

抑制率 = (1 - 实验组细胞数 / 阴性对照组细胞数)  $\times 100\%$

**1.8 RT-PCR 法测定 MDA-MB-231 细胞基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)mRNA 的表达**

将对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔培养板, 常规培养 24 h, 换用含终浓度为 20 % 的阴性对照、山慈菇 - 蜂房药对、ADM 血清的 DMEM 培养液继续培养 72 h。采用 TRIzol 收集细胞, 按 TRIzol Reagent 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 然后用特定的引物进行各目的基因的 RT-PCR 扩增, 各基因引物及产物长度见表 1。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 2 min, 52  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 40 次, 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶数码成像及分析系统记录目的基因和内参  $\beta$ -actin 的 OD 值, 通过目的基因 OD 值 /  $\beta$ -actin OD 值进行相对定量分析。实验重复 3 次。

**1.9 统计学处理方法** 数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 应用 SPSS16.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析方法, 两两比较用 *t* 检验。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of primers

基因名称	引物序列 (5' -3')	产物长度 /bp
MMP-9	上游引物 5'-cac tgt cca ccc etc aga gc-3'	243
	下游引物 5'-gcc act tgt egg cga taa gg-3'	
TIMP-1	上游引物 5'-att ceg acc teg tea tca g3'	543
	下游引物 5'-gca ggc ttc agt tcc act c3'	
$\beta$ -actin	上游引物 5'-ta gct gtg etc geg cta etc tet c-3'	150
	下游引物 5'-gtc gga ttg atg aaa ccc aga cac a-3'	

**2 结果**

**2.1 山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用** 各组血清作用 72 h 时, 与阴性对照组比较, AMD 组、山慈菇 - 蜂房药对组 OD 值显著下降( $P < 0.01$ ), 对 MDA-MB-231 细胞体外生长杀伤率分别为 35.19 %、35.86 %, AMD 组和山慈菇 - 蜂房药对组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 The killing effect of *Shancigu-Lufengfang* on MDA-MB-231 cell

组别	OD 值	杀伤率 /%
阴性对照组	0.75 $\pm$ 0.03	
AMD 组	0.49 $\pm$ 0.08**	35.19
山慈菇 - 蜂房药对组	0.48 $\pm$ 0.04**	35.86

注: 与阴性对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

**2.2 山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响** 与阴性对照组比较, AMD 组、山慈菇 - 蜂房药对组能明显抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力 ( $P < 0.01$ ), 其抑制率分别为 40.4 % 和 34.8 %。AMD 组和山慈菇 - 蜂房药对组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 3。

表 3 山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 The effect of *Shancigu-Lufengfang* on cell invasion ability MDA-MB-231 cells

组别	细胞数 ( $\times 10^4$ )	抑制率 /%
阴性对照组	1.98 $\pm$ 0.14	
AMD 组	1.18 $\pm$ 0.09**	40.4
山慈菇 - 蜂房药对组	1.29 $\pm$ 0.11**	34.8

注: 与阴性对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.3 山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞中 MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达的影响

与阴性对照组比较, AMD 组和山慈菇-蜂房药对组 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 mRNA 明显降低( $P < 0.05$ ); 山慈菇-蜂房药对组 MDA-MB-231 细胞 TIMP-1 mRNA 明显升高、MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 值显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 AMD 组比较, 山慈菇-蜂房药对组 MDA-MB-231 细胞 TIMP-1 mRNA 明显升高, MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 比值

表 4 山慈菇-蜂房药对 MDA-MB-231 细胞中 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 4 Expression of MMP-9 mRNA, TIMP-1 mRNA in 3 groups

分组	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA	MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA
阴性对照组	0.96 ± 0.10	0.82 ± 0.06	1.20 ± 0.12
AMD 组	0.82 ± 0.05*	0.81 ± 0.06	1.03 ± 0.10
山慈菇-蜂房药对组	0.82 ± 0.06*	1.17 ± 0.13** $\Delta\Delta$	0.71 ± 0.07** $\Delta\Delta$

注: 与阴性对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 AMD 组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

显著降低( $P < 0.01$ ), 见表 4。

### 3 讨论

乳腺癌患者术后, 机体内未尽的癌毒与正气相争, 正不胜邪, 则癌毒复发走窜, 从而导致乳腺癌的复发转移。肿瘤复发转移后癌毒侵及脏腑经络, 导致气血津液代谢失常, 产生痰、瘀等病理产物, 毒、痰、瘀互结, 进一步损伤脏腑经络, 导致正气更虚, 正不胜邪, 肿瘤进一步发展。故认为解毒化痰散结法是中医防治乳腺癌术后复发转移的关键。

恶性肿瘤转移包括诸多环节, 穿越生物学屏障是肿瘤细胞侵袭和转移的关键步骤<sup>[4]</sup>。细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)是肿瘤侵袭和转移的天然屏障, ECM 的降解和基底膜(basement membrane, BM)的破坏是肿瘤转移的一个关键步骤<sup>[5]</sup>。基质金属蛋白酶(MMPs)能降解几乎所有的 ECM 成分<sup>[6]</sup>, 一般认为与肿瘤侵袭、转移关系最密切的是 MMP-9<sup>[7]</sup>。目前有大量研究<sup>[8]</sup>证实 MMPs 与乳腺癌及其他肿瘤转移密切相关。金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)通过与 MMPs 结合形成复合物而抑制 MMPs 的降解活性, 从而抑制癌细胞浸润, 抑制肿瘤细胞的侵袭和转移, 其中 TIMP-1 基因过度表达可抑制肿瘤生长、浸润和

转移<sup>[9-10]</sup>。

研究发现, 山慈菇、蜂房具有广谱的抗肿瘤作用<sup>[11-12]</sup>, 可用于包括乳腺癌在内的多种肿瘤的中医治疗<sup>[13]</sup>。本研究证实了山慈菇-蜂房药对对 MDA-MB-231 细胞的体外生长和侵袭能力有明显的抑制作用, 其抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭能力分子机制可能是通过下调 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 mRNA 表达, 上调 TIMP-1 mRNA 的表达, 降低 MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 比值, 从而抑制了肿瘤细胞对 ECM 和基底膜的降解, 导致细胞的侵袭力降低。

### 参考文献:

- [1] 贾宝洋, 李海斌. 乳腺癌复发转移的相关因素分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(22): 4377-4378.
- [2] 刘胜, 花永强, 孙霁平, 等. 乳移平抗乳腺癌术后复发转移的临床研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(2): 147-149.
- [3] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨 I[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 13-15.
- [4] Jia BY, Li HB. Analysis related factors of breast cancer relapse and metastasis[J]. Mod Prev Med, 2009, 36(22): 4377-4378.
- [5] Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Steveson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation[J]. Cell, 1991, 64(2): 327-336.
- [6] 张雅青, 顾克东. 基质金属蛋白酶与肿瘤关系研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2006, 27(63): 79-84.
- [7] 王祥军, 周士福, 时伟峰, 等. uPA 和 MMP-9 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其相关性[J]. 四川医学, 2009, 30(8): 1200-1202.
- [8] Han B, Nakamura M, Moil I, et al. Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 105-112.
- [9] Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer [J]. Cancer Lett, 2006, 233(1): 98-107.
- [10] Jee BK, Park KM, Surendran S, et al. KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(2): 655-661.
- [11] 姚妮, 刘艳红, 张红, 等. 蜂房提取物抑制 H22 小鼠移植瘤增殖的作用研究[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(4): 270-273.
- [12] 阮小丽, 施大文. 山慈菇的抗肿瘤级抑菌作用[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1886-1889.
- [13] Bai L, Yamaki M, Yamagata Y, et al. Shancirol, a dihydrophenanthropyran from pleione bulbocodioides [J]. Phytochemistry, 1996, 27(18): 625-628.

(编辑: 梁进权)