

# 青蒿琥酯对生存素在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 表达的影响

陈 竞<sup>1</sup>, 高砚春<sup>2△</sup> (1. 川北医学院生化教研室, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院 普外科, 四川南充 637000)

**【摘要】 目的** 探讨青蒿琥酯对生存素(survivin)在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中表达的影响。**方法** 以不同浓度(0、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的青蒿琥酯处理 MDA-MB-231 细胞,分别于药物处理后 24、48 和 72 h 收集细胞及培养上清液,用 RT-PCR 检测不同组别、不同时间点的细胞中 survivin 的基因表达情况,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组、各时间点培养上清液中 survivin 的蛋白质表达水平。**结果** PCR 结果和 ELISA 结果均显示,随着药物浓度的增加和处理时间的延长,survivin 基因水平和蛋白质水平的表达也逐渐降低,同一时间点各组间 survivin 的表达量进行单因素方差分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );对照组(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )在 24 h 和 48 h survivin 的表达量变化不大,经 *t* 检验分析,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而各浓度经药物处理 48 h 后 survivin 的表达量明显低于 24 h 的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 青蒿琥酯可通过抑制 survivin 的表达促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡。

**【关键词】** 青蒿琥酯; MDA-MB-231; 乳腺癌; 生存素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0135-03

**Influence of artesunate on expression of survivin in breast cancer MDA-MB-231 cells** CHEN Jing<sup>1</sup>, GAO Yan-chun<sup>2△</sup> (1. Department of Biochemistry, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**【Abstract】 Objective** To study the influence of artesunate on the expression of survivin in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** The different concentrations (0, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of artesunate were used to treat the MDA-MB-231 cells. The cells and supernatant were collected at 24, 48, 72 h after treating by different concentrations of drugs. RT-PCR was used to detect the mRNA level of survivin, and the secreted protein level of survivin was determined by ELISA kit. **Results** Both the results of PCR and ELISA displayed that with the increasing of drug's concentration or the extending of treating time, the gene level and protein level of survivin analyzed by one-way ANOVA were gradually reduced, showing statistical difference among experimental groups in the same time ( $P < 0.05$ ). There was no difference of survivin's expression at 24 h and 48 h in control group (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) analyzed by *t*-test. But the expression of survivin in each drug treated group was decreased more conspicuously at 48 h than at 24 h, *t*-test showing statistical difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Artesunate can induce the MDA-MB-231 cells to apoptosis through inhibiting the expression of survivin.

**【Key words】** artesunate; MDA-MB-231; breast cancer; survivin

随着国民经济发展和人民生活水平的提高,乳腺癌的发病率和病死率都呈上升趋势,我国乳腺癌发病率增长速度位于全球之首,2009 年广州乳腺癌临床诊治论坛暨专家见面会资料显示,乳腺癌已成为中国妇女发病率第一和病死率第二的恶性肿瘤。因此,应重视乳腺癌的危害,预防和加强乳腺癌治疗。近年来不少研究显示中药在抗肿瘤治疗中的作用越来越重要,如熊果酸<sup>[1]</sup>、苦参碱<sup>[2]</sup>、冬凌草甲素<sup>[3]</sup>、乙酰紫草根素(acytylshikonin)<sup>[4]</sup>等可通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤效应。因此,开发中草药治疗乳腺癌具有广阔的应用前景。青蒿琥酯是抗疟疾药物青蒿素的衍生物,具有比其前体更强的抗疟效应。研究者在前期工作中发现,青蒿琥酯能明显抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞增殖,并可促进该细胞凋亡。桑占发等<sup>[5]</sup>研究发现凋亡抑制蛋白 survivin 在乳腺癌中表达上调,提示 survivin 可能通过抑制细胞凋亡从而导致乳腺癌的发生和发展。因此,本研究拟通过 RT-PCR 和酶联免疫吸附试验

(ELISA)检测不同浓度的青蒿琥酯处理 MDA-MB-231 细胞后 survivin 的表达情况,探讨青蒿琥酯的抗凋亡机制,为将青蒿琥酯应用于临床治疗乳腺癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 细胞** 乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为本实验组保存。**1.1.2 试剂** DMEM 培养基(购自美国 GIBCO 公司);胎牛血清(购自杭州四季青公司),使用浓度 10%;Trizol 总 RNA 提取试剂盒、MMLV 逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶均购自大连 Takara;survivin ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,测定方法采用双抗体夹心 ELISA 方法。采用美国 BIO-RAD 的 Model 680 型全自动酶标仪进行检测,按试剂盒说明书进行操作。

**1.1.3 引物设计与合成** 根据 GenBank 中的 survivin 基因编码序列(序列号 NM\_001168),用引物设计软件 Primer Premier

△ 通讯作者, E-mail: boyang11111@163.com。

5.0 设计引物,由上海生工生物技术有限公司合成 survivin 和内参 GAPDH 的 PCR 引物序列; survivin 引物(产物为 563 bp)的上游引物 P1:5'-GAG GTG GCG GCG GCA TG-3';下游引物 P2:5'-GTT GAT CTC CTT TCC TAA GAC ATT GC-3';GAPDH 引物(产物为 430 bp)的上游引物 P1:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3';下游引物 P2:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

1.1.4 仪器 细胞培养箱,PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪均为美国 BIO-RAD,酶标仪(美国 BIO-RAD model 680 型)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞用 DMEM 培养基(加有 10% 的胎牛血清和终浓度皆为 100 U/mL 的青霉素及链霉素)于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞密度为 90% 左右时用 0.25% 胰酶消化细胞,按每孔约 1×10<sup>5</sup> 个细胞(每孔终体积 1 000 μL)传代至 6 孔板中继续培养,待贴壁后进行后续实验。

1.2.2 药物分组 将青蒿琥酯按终浓度不同分为 0、25、50 μg/mL 共 3 组,其中 0 μg/mL 组为对照组,其余 2 组为实验组。药物以培养基稀释,每组设 3 个复孔。待细胞贴壁后将各组药物加入培养基中继续培养。

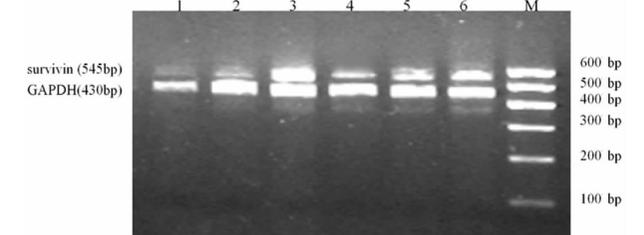
1.2.3 RT-PCR 分别于加药后 24、48 和 72 h 收集各组细胞(其中培养上清液分装后保存于 -80 °C 备用),将 3 孔的细胞合并在一起,用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,测定其浓度和纯度后,各取约 1 μg 用 MMLV 逆转录酶逆转录为 cDNA,用 survivin 和 GAPDH 的 PCR 引物进行扩增,反应条件:94 °C 预变性 5 min;1 个循环;94 °C 变性 30 s,62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30s,35 个循环;72 °C 延伸 5min,1 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,经凝胶成像仪成像,Quantity One 软件测定吸光度值,以每组每一时间点的 survivin 吸光度值与相应内参 GAPDH 光密度值的比值作为 survivin 的表达量,并以此进行统计学分析。

1.2.4 ELISA 测定 survivin 的表达 取出保存于 -80 °C 的各組不同时间点培养液,自然融化,按试剂盒操作说明检测 survivin 的表达情况。

1.3 统计学处理 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,用统计软件 SPSS16.0 进行相关分析。各组间两两比较用单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对 survivin 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中基因表达的影响



注:1 泳道为 50 μg/mL 青蒿琥酯作用 48 h;2 泳道为 25 μg/mL 青蒿琥酯作用 48 h;3 泳道为 0 μg/mL 青蒿琥酯作用 48 h;4 泳道为 50 μg/mL 青蒿琥酯作用 24 h;5 泳道为 25 μg/mL 青蒿琥酯作用 24 h;6 泳道为 0 μg/mL 青蒿琥酯作用 24 h;M 为 DNA 相对分子质量标准。

图 1 不同药物浓度的青蒿琥酯作用细胞不同时间后对 survivin 基因表达的影响

由于青蒿琥酯处理细胞 72 h 后各实验组细胞凋亡即非常明显,收集细胞提取的总 RNA 经电泳未见明显 RNA 条带,经重复 3 次后结果亦如此,故未进行该时间点 survivin 的基因表达检测。由图 1 可见,在同一时间点,随着药物浓度的增加, survivin 的表达呈下降趋势,各组间进行单因素方差分析,差异具有统计学意义(*P*<0.05)(表 1);随着药物处理时间的延长,未处理组 24 h 和 48 h 后 survivin 表达的变化不大(*P*>0.05),而各药物处理组则随着时间的延长 survivin 的表达也降低,同一浓度作用 24 h 和 48 h 后 survivin 的表达量进行 *t* 检验,差异具有统计学意义(*P*<0.05)(表 2)。

表 1 不同药物浓度青蒿琥酯处理细胞后同一时间点 survivin 基因表达的方差分析结果

处理时间 (h)	药物终浓度 (μg/mL)	survivin( $\bar{x} \pm s$ )	<i>F</i>	显著性概率
24	0	1.007±0.015	310.247	0.000
	25	0.952±0.064		
	50	0.266±0.025		
48	0	1.042±0.053	512.574	0.000
	25	0.600±0.013		
	50	0.086±0.001		

表 2 同一药物浓度青蒿琥酯处理细胞后不同时间点 survivin 基因表达的 *t* 检验结果

药物终浓度 (μg/mL)	处理时间 (h)	survivin( $\bar{x} \pm s$ )	<i>t</i>	显著性概率
0	24	1.007±0.015	-1.100	0.333
	48	1.042±0.053		
25	24	0.952±0.064	9.402	0.001
	48	0.600±0.013		
50	24	0.266±0.025	11.722	0.000
	48	0.086±0.001		

2.2 青蒿琥酯对 survivin 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中分泌表达的影响 ELISA 检测结果显示(图 2),随着药物浓度的增加和处理时间的延长, survivin 的分泌表达逐渐降低,其中处理后 72 h 各药物浓度组均未检测到 survivin 的分泌表达,与 PCR 结果一致。未用药物处理组(0 μg/mL 组)在不同时间点 survivin 的分泌表达差异无统计学意义(*P*>0.05);相同药物处理组在不同时间点的 survivin 表达量进行 *t* 检验,差异具有统计学意义(*P*<0.05)(图 2)。

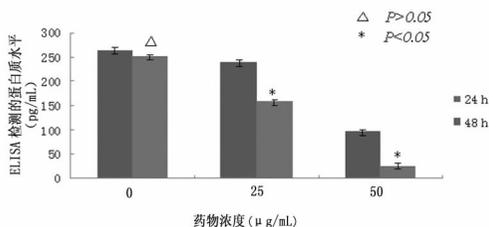


图 2 不同药物浓度的青蒿琥酯作用细胞不同时间后对 survivin 蛋白分泌表达的影响

### 3 讨 论

survivin 是凋亡抑制蛋白家族的新成员, survivin 具有肿瘤特异性, 只表达于肿瘤和胚胎组织, 且与肿瘤细胞的分化、增殖及浸润、转移密切相关。有研究显示, survivin 可直接作用于半胱氨酸天冬酰胺酶(Caspase, 主要通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性)<sup>[6]</sup>; survivin 还可与周期素依赖激酶(CDK4) 相互作用, 使 CDK4 中 p21 释放出来, 并与 Caspase-3 相结合, 间接抑制 Caspase-3 的活性, 阻止线粒体释放 Cyt-c, 从而抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>。

临床用药结果显示, 许多化疗药物对人体的损伤很大, 而中医药可减轻化疗药物的毒性反应, 一直以来中药在乳腺癌的治疗过程中扮演着辅助角色。近年来有研究发现, 一些中药制剂(如黄芪注射液<sup>[8]</sup>)对乳腺癌细胞具有抑制作用。由于中药的毒性和不良反应小, 运用中医药治疗乳腺癌越来越受到广大临床医师和肿瘤患者的青睐。从中药中寻找抗乳腺癌的药物也成为研究的热点。

本实验结果显示, 青蒿琥酯能抑制乳腺癌细胞株 MDA-MA-231 细胞中凋亡抑制基因 survivin 的基因表达和蛋白质的分泌表达。随着药物浓度的增加和药物处理时间的延长, 抑制作用也相应增加, 经青蒿琥酯处理后的细胞也以凋亡作为最终结局。说明抑制 survivin 的表达可能是青蒿琥酯促进乳腺癌 MDA-MA-231 细胞凋亡的途径之一, 也进一步证实青蒿琥酯具有促进细胞凋亡的作用, 为将青蒿琥酯应用于临床治疗乳腺癌奠定了理论基础。

### 参考文献

[1] 张维文, 黎银燕, 张贵平, 等. 熊果酸诱导人乳腺癌细胞

MCF-7 凋亡的实验研究[J]. 中药材, 2005, 28(4): 297-301.

[2] 李伏娥, 朱陵群, 叶红军, 等. 苦参碱诱导人胃癌细胞凋亡及对端粒酶活性的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(12): 1809-1810.

[3] 张俊峰, 陈规划, 陆敏强, 等. 冬凌草甲素诱导肝癌细胞凋亡中 Bcl-2 及端粒酶变化的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1811.

[4] Xiong W, Luo G, Zhou L. In vitro and in vivo antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst (Ruanzicao) cell suspension cultures[J]. Chin Med, 2009, 4(1): 14.

[5] 桑占发, 王兴, 齐玉新. 乳腺癌组织 Survivin 表达与细胞增殖的关系[J]. 现代肿瘤学, 2009, 17(8): 1478-1481.

[6] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8589.

[7] McKay TR, Bell S, Tenev T, et al. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin 1-34A; a combination gene therapy strategy[J]. Oncogene, 2003, 22(23): 3539-3547.

[8] 李琼, 刘胜. 黄芪注射液对人类乳腺癌细胞生长的抑制作用[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(2): 100-101.

(收稿日期: 2011-07-21)

(上接第 134 页)

和 CD79a) 和 T 淋巴细胞(CD3, CD4 和 CD8) 标记<sup>[5]</sup>。因此在本病的诊断中流式细胞仪的免疫分型显得至关重要。显示其高效、快速、方便、准确的特点, 这样为该病的诊断提供了一个可靠、实用的方法, 避免了传统免疫组化的缺点, 在对该病的诊断中起到了关键作用。

根据该患者的临床特征以胸腔渗出液为主要表现, 结合影像学诊断双侧胸腔积液、胸膜增厚及心包积液等特点, 再结合细胞学、流式细胞学技术及免疫组化的分型特点。本例患者符合 PEL, 该病是否与胃癌术后化疗有关, 临床检查未能明确病因, 但可以明确的是, 该患者 HIV 阴性, 为非 HIV 相关性 PEL。Knowles 于 1989 年报道此病, 也称浆膜腔性淋巴瘤(body cavity-based lymphoma), 占 HIV 相关性淋巴瘤的 3% 或更少<sup>[7]</sup>。PEL 的发病明显以男性为多见, 患者多为中青年同性恋, HIV 阳性男性, 文献报道发病年龄范围 31~94 岁<sup>[8]</sup>。

该患者经过环磷酰胺、地塞米松、长春瑞滨、表柔比星的联合化疗以及靶向治疗(CD20+美罗华治疗)后, 患者有明显转归(图 4)。患者至今没有复发, 预后良好。该病的治疗说明与该诊断息息相关, 同时说明靶向治疗在治疗这类肿瘤中是行之有效的。

### 参考文献

[1] Jaffe ES, Harris NL, Stain H, et al. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of

tumors of hematopoietic and lymphoid tissue[M]. Lyon: IARC Press, 2001: 179-180.

[2] Feller AC, Diebold J. Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkins lymphomas (Based on the WHO classification) [M]. 3rd ed. Verlag: Springer, 2004: 243-244.

[3] Dotti G, Fiocchi R, Motta T, et al. Primary effusion lymphomas after heart transplantation; a new entity associated with human herpesvirus-8[J]. Leukemia, 1999, 13(5): 664-670.

[4] Navarro WH, Kaplan LD. AIDS-related lymphoproliferative disease[J]. Blood, 2006, 107(1): 13-20.

[5] 王学文. 原发性渗出性淋巴瘤[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(1): 79-80.

[6] Matolcsy A, Nador RG, Cesarman E, et al. Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation[J]. Am J Pathol, 1998, 153(5): 1609-1614.

[7] 张明智. 恶性淋巴瘤诊断与治疗学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2003: 547.

[8] 宋诸臣, 顾洪兵, 魏金芝, 等. 原发性渗出性淋巴瘤(附 1 例报告)[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(1): 92.

(收稿日期: 2011-07-20)