

# 氧化苏木素诱导人乳癌 MCF-7 细胞凋亡及其作用机制

陶黎阳<sup>1</sup>, 黎渐英<sup>2</sup>, 张建业<sup>1</sup>

(1.广州医学院基础学院,广东 广州 510182; 2.中山大学附属第一医院肾内科,广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨氧化苏木素对人乳癌 MCF-7 细胞的凋亡作用及其相关作用机制。【方法】MTT 实验检测氧化苏木素对 MCF-7 细胞和正常乳腺上皮细胞 MCF 10A 的细胞毒作用;Annexin V/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡的发生;荧光染料 DiOC6 染色,流式细胞仪检测细胞内线粒体膜电位的变化;Western blot 实验检测细胞浆细胞色素 C 及细胞内 caspase-9 和 survivin 蛋白的变化。【结果】氧化苏木素对人乳癌 MCF-7 细胞具有高效的细胞毒作用,而对正常乳腺上皮 MCF 10A 细胞毒性较弱,IC<sub>50</sub> 值分别为  $(7.15 \pm 0.43) \mu\text{mol/L}$  和  $(33.56 \pm 2.87) \mu\text{mol/L}$ ;0、7.5、15、30  $\mu\text{mol/L}$  的氧化苏木素处理 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞的凋亡率从  $(3.37 \pm 0.66)\%$  依次升高到  $(16.8 \pm 1.27)\%$ 、 $(31.31 \pm 4.22)\%$ 、 $(51.23 \pm 5.55)\%$ ;DiOC6 染色流式细胞仪检测结果显示氧化苏木素可以剂量依赖性地降低线粒体膜电位;Western blot 结果显示氧化苏木素诱发了线粒体内细胞色素 C 的释放和细胞内 caspase-9 蛋白的剪切激活,同时氧化苏木素也可剂量依赖性地降低 survivin 蛋白的表达。【结论】氧化苏木素可通过线粒体通路诱导 MCF-7 细胞凋亡,下调 survivin 蛋白可能是其诱导细胞凋亡的主要机制。

**关键词:**氧化苏木素; MCF-7 细胞; 细胞凋亡; survivin 蛋白

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2011)04-0449-05

## Brazilein Induced Cells Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells and Its Action Mechanism

TAO Li-yang<sup>1</sup>, LI Jian-ying<sup>2</sup>, ZHANG Jian-ye<sup>1</sup>

(1.Basic School, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; 2.Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the cytotoxic activity of brazilein against human breast cancer MCF-7 cells and its action mechanism. 【Methods】 MTT assay was used to detect the cytotoxic activity of brazilein against MCF-7 cells and immortalized breast epithelial MCF10A cells. The apoptosis was determined by Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry analysis. Mitochondrial membrane potential was indicated by DiOC6 staining. The Western blotting was performed to detect wanted protein. 【Results】 Brazilein exerted potent cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cells, and the IC<sub>50</sub> values was  $(7.15 \pm 0.43) \mu\text{mol/L}$ . However, the IC<sub>50</sub> values of brazilein against the MCF10A cells was  $(33.56 \pm 2.87) \mu\text{mol/L}$ . After treatment with 0, 7.5, 15, 30  $\mu\text{mol/L}$  brazilein for 48 h, the percent of apoptosis was elevated from  $(3.37 \pm 0.66)\%$  to  $(16.8 \pm 1.27)\%$ ,  $(31.31 \pm 4.22)\%$ ,  $(51.23 \pm 5.55)\%$ , respectively. Brazilein decrease the level of mitochondrial membrane potential in a dose-dependent manner, as detected by DiOC6 staining. Western blotting showed that brazilein released cyto-c to cytoplasm and following cleaved caspase-9 protein. The further study showed that brazilein down-regulated survivin in protein level by Western blot analysis. 【Conclusion】 Brazilein induced apoptosis through a mitochondria-dependent pathway, and which was related to the down-regulation of survivin protein.

**Key words:** brazilein; MCF-7 cell; apoptosis; survivin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4): 449-453]

苏木为豆科植物小乔木,干燥心材味甘微辛可入药,是我国的传统中药,有活血通络、消肿止

痛的功效,其药理作用主要包括:改善血液循环,消炎、抗氧化,免疫抑制,抗肿瘤等<sup>[1-3]</sup>。目前国内

收稿日期:2011-03-28

基金项目:2010 年度广州医学院博士、留学回国人员基金(2010C17);广东省中医药局科研课题基金(2010420)

作者简介:陶黎阳,博士,讲师,研究方向:肿瘤多药耐药, E-mail: sohutly@163.com

外学者对苏木的抗肿瘤研究主要集中在粗提物上,没有找到其中可以诱导肿瘤细胞凋亡的活性单体成分<sup>[4-5]</sup>。随着现代化学分离鉴定技术的发展,大量的单体化学成分从苏木中分离鉴定出来,为其药理活性研究提供了保障。氧化苏木素(brazilein)是从苏木提取物中分离的一个单体成分,研究已经显示其具有缩血管、中枢神经细胞的缺血保护和抗炎作用<sup>[6-8]</sup>。为了探讨氧化苏木素是否具有抗肿瘤活性,本研究选用人乳腺癌 MCF-7 细胞观察其抗肿瘤作用和可能的抗癌机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

MTT、DiOC6、青霉素、链霉素为美国 Sigma 公司产品,DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco BRL 公司,Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒为南京凯基生物公司产品,DMSO 是广东光华化学厂有限公司产品,细胞色素 C (cyto-c)、caspase-9、survivin、GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

### 1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和正常乳腺上皮细胞 MCF 10A 在 37℃ 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于含 100 mL/L 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素及 100 IU/mL 链霉素的 DMEM 培养液中。

### 1.3 细胞生长抑制实验

将处于对数生长期的细胞接种到 96 孔板(3 000 个/孔),细胞贴壁后加入梯度浓度的化合物,继续培养 68 h,每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 再孵育 4 h,弃去培养液,加入 100 μL DMSO 溶解结晶,每个浓度重复 3 个复孔,Model 550 酶标仪(Bio-Rad, USA)540/655 nm 双波长测定 OD 值,计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub> 值)<sup>[8]</sup>。

### 1.4 Annexin V/PI 双染法细胞凋亡分析

不同浓度的氧化苏木素处理 MCF-7 细胞 48 h 后,收集细胞,PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次(4℃),按照试剂盒的说明加入 Annexin V-FITC 和 PI,混匀室温避光孵育 30 min,PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次(4℃),重悬于 500 mL 4℃ PBS 缓冲液中,Cytomics FC500 流式细胞仪分析(Beckman Coulter, USA),每个样品检测 10 000 个细胞。其中 Annexin V 阳性和 Annexin V 与 PI 双阳性的细胞为凋亡细胞。

### 1.5 线粒体膜电位的检测

收集不同浓度氧化苏木素处理 48 h 后的 MCF-7 细胞,PBS 缓冲液洗涤细胞(4℃),加入 DiOC6 至终浓度 40 nmol/L,混匀室温避光孵育 20 min,流式细胞仪分析前 PBS 缓冲液洗涤细胞,激发波长为 488 nm,发射波长 501 nm,FL1 通道处检测发射波长,每次检测收集 10 000 个细胞。DiOC6 在细胞内荧光的强弱间接反映出线粒体膜电位( $\psi_m$ )的高低。

### 1.6 蛋白免疫印迹分析

不同浓度药物处理细胞 48 h,1 × SDS 上样缓冲液裂解细胞提取总蛋白,总蛋白 95 ~ 100℃ 加热 10 min 后再 12 000 ×g 离心 10 min,吸取上清,SDS-PAGE 胶(8% 积层胶,12% 分离胶)上电泳分离蛋白后,电转移至 PVDF 膜,将膜浸润在含 50 mL/L 脱脂奶粉的 TBST 中 1h 以封闭非特异性结合位点,加入一抗(1:1 000)4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,最后加入发光底物 X-ray 曝光显示目的蛋白条带。GAPDH 蛋白作为内参照以显示相同的上样量。

细胞浆中细胞色素 C (cyto-c) 的提取:收集不同浓度药物处理的细胞,加入破膜缓冲液(10 mmol/L HEPES,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,10 mmol/L KCl,0.5 mmol/L DTT,0.05% NP40,pH 7.9)4℃ 放置 40 min,其间不断震荡,800 ×g 4℃ 离心 10 min,取上清 12 000 ×g 4℃ 离心 15 min,取上清按比例加入 5 × SDS 上样缓冲液。上清中的蛋白为细胞浆蛋白,后续的 Western blot 检测按上述总蛋白的方法进行。GAPDH 蛋白作为细胞浆蛋白的内参照。

### 1.7 统计分析

实验数据以均数 ± 标准差表示,组间差异采用 Student's *t* 检验,*P* < 0.05 为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 氧化苏木素对人乳腺癌 MCF-7 细胞显示了高效的抗肿瘤活性

MTT 结果显示氧化苏木素对 MCF-7 细胞具有高效的细胞毒作用,半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值为(7.15 ± 0.43) μmol/L,然而氧化苏木素对正常乳腺上皮 MCF 10A 细胞的毒性较弱,IC<sub>50</sub> 值为(33.56 ± 2.87) μmol/L。随后我们用 Annexin V/PI 双染法检测氧化苏木素是否引起了 MCF-7 细胞凋

亡性死亡,流式细胞仪检测的结果显示:0、7.5、15、30  $\mu\text{mol/L}$  的氧化苏木素处理 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞的凋亡率从  $(3.37 \pm 0.66)\%$  依次升高到  $(16.8 \pm 1.27)\%$ 、 $(31.31 \pm 4.22)\%$ 、 $(51.23 \pm 5.55)\%$  (图 1)。

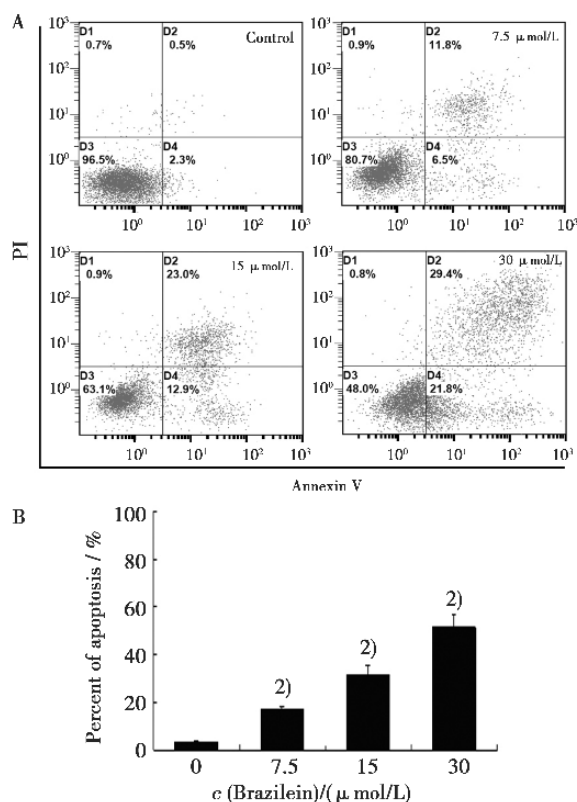


图 1 氧化苏木素诱导 MCF-7 细胞凋亡

Fig.1 Brazilein induced apoptosis of MCF-7 cells

A: After treatment with 0, 7.5, 15, 30  $\mu\text{mol/L}$  brazilein for 48 h, the apoptosis was determined by Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry analysis as described in methods. The Annexin V (+) and Annexin V (+)PI (+) cells were apoptotic cells. All these experiments were repeated at least thrice, and a representative experiment was shown in each panel. B: The histogram showed the percent of apoptosis cells. 1)  $P < 0.01$

## 2.2 氧化苏木素降低了线粒体膜电位

DiOC6 为一种荧光染料,其在细胞内浓度的高低可以间接反映出线粒体膜电位的变化,因此我们使用 DiOC6 检测了氧化苏木素对线粒体膜电位的影响,以流式细胞仪 X 轴的  $\bar{x} \pm s$  值表示细胞内 DiOC6 荧光的强弱。图 2 显示:0、7.5、15、30  $\mu\text{mol/L}$  的氧化苏木素处理细胞 48 h 后,  $\bar{x} \pm s$  值从  $11.54 \pm 0.58$  依次减低到  $9.93 \pm 0.72$ 、 $8.54 \pm 0.66$ 、 $8.03 \pm 0.43$ ,荧光值平均降低了 14%、26%、30%。

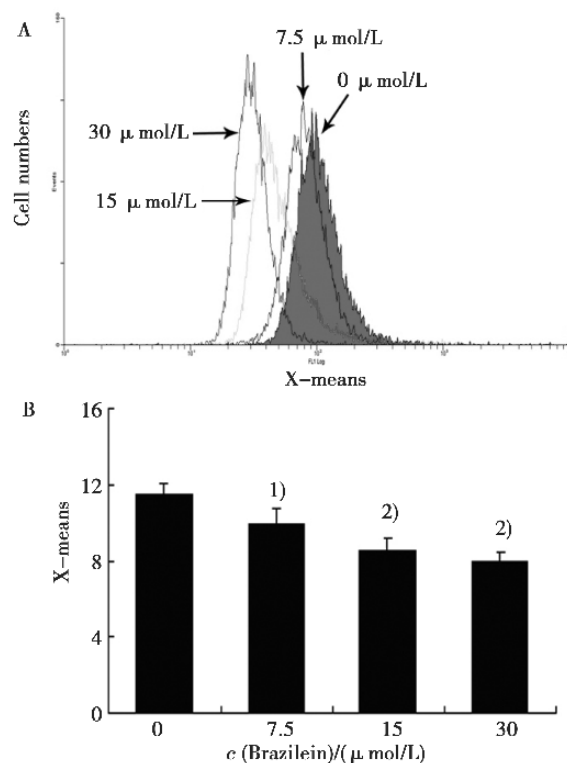


图 2 氧化苏木素降低了 MCF-7 细胞线粒体膜电位

Fig.2 Brazilein decrease the level of mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells

A: MCF-7 cells were treated with 0, 7.5, 15, 30  $\mu\text{mol/L}$  brazilein for 48 h. Then cells were stained with DiOC6 and detected by flow cytometry in FL1 channel. All these experiments were repeated at least thrice, and a representative experiment was shown in each panel. B: The histogram showed the X-mean values of FL1 channel. 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

## 2.3 氧化苏木素激活了线粒体凋亡通路

线粒体膜电位的改变会导致细胞色素 C 的释放,从而激活线粒体凋亡通路,因此我们提取细胞浆蛋白检测了氧化苏木素对细胞色素 C 在细胞内分布的影响,Western blot 的结果显示:指定浓度的氧化苏木素处理 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞浆内细胞色素 C 呈剂量依赖性的升高(图 3A)。随后的蛋白免疫印迹检测发现了 caspase-9 裂解带的出现,说明释放入胞浆内的细胞色素 C 剪切了下游的 caspase-9,从而激活了 caspase-9,进而导致了线粒体通路的凋亡(图 3B)。

## 2.4 氧化苏木素下调了 survivin 蛋白

Survivin 凋亡抑制蛋白家族的一个成员,常常调节着凋亡通路,因此我们检测了 survivin 蛋白的变化,图 4 显示了氧化苏木素可以剂量依赖性的

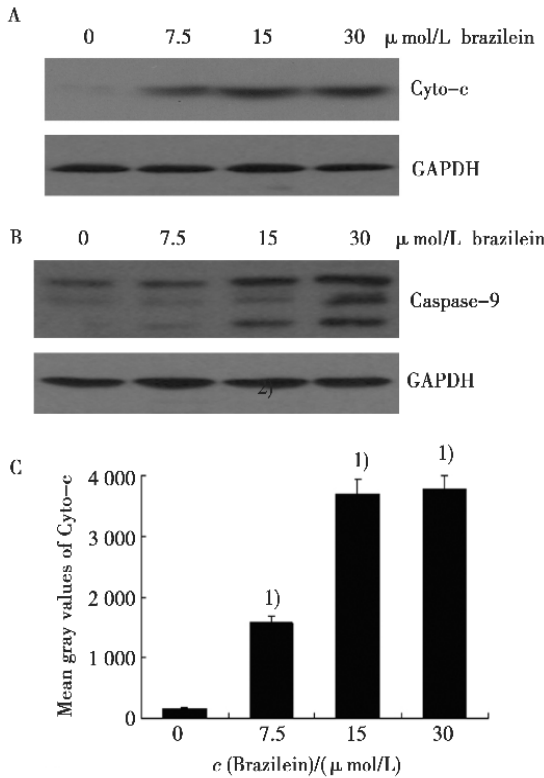


图 3 氧化苏木素激活了 MCF-7 细胞线粒体凋亡通路  
**Fig.3 Brazilein induced apoptosis through a mitochondria-dependent pathway**

A; MCF-7 cells were treated with 0, 7.5, 15, 30 μmol/L brazilein for 48 h. Then, the protein of cytoplasm was extracted and cyto-c was detected using specific antibody by Western blotting analysis. B; After treatment with indicated brazilein for 48 h, the total protein of cells was extracted and cleaved caspase-9 protein was detected by Western blotting analysis. All these experiments were repeated at least thrice, and a representative experiment was shown in each panel. C: The amount of immunoblotted protein was determined by the QuantityOne software (Bio-Rad Gel Dox XR, USA). The histogram showed the mean gray values of Cyto-c. 1)  $P < 0.01$

降低 survivin 蛋白的表达。

### 3 讨 论

癌症已成为新世纪人类的第二号杀手，其中乳腺癌在女性中占有极高的比例，在女性肿瘤死亡患者中乳腺癌约占 15%<sup>[9]</sup>。尽管治疗方法的不断改进，但肿瘤多药耐药的产生总是阻碍着成功的治疗，新的抗癌药物研发是克服肿瘤多药耐药的有效途之一。我国传统的中医中药在癌症治疗方面有着悠久的历史，随着化学分离鉴定技术的进展，一些抗肿瘤的单体成分不断地从中药中分

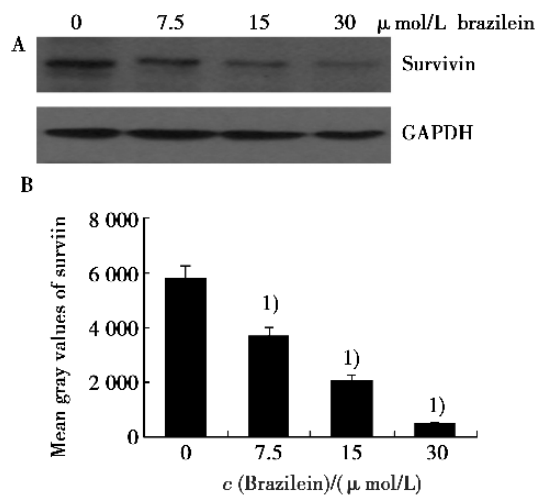


图 4 氧化苏木素下调了 MCF-7 细胞 survivin 蛋白的表达  
**Fig.4 Brazilein downregulated the expression of survivin in a protein level**

A; MCF-7 cells were treated with 0, 7.5, 15, 30 μmol/L brazilein for 48 h. Then, the total protein of cells was extracted and the survivin protein was detected by Western blot analysis as described in methods. All these experiments were repeated at least thrice, and a representative experiment was shown in each panel. B; The amount of immunoblotted protein was determined by the QuantityOne software (Bio-Rad Gel Dox XR, USA). The histogram showed the mean gray values of Cyto-c. 1)  $P < 0.01$

离出来,例如:姜黄素、长春新碱、紫杉醇等<sup>[10]</sup>。本研究发现一个分离自中药苏木的单体成分氧化苏木素也显示了高效的抗肿瘤活性。已有研究显示苏木的抗癌机制是诱发细胞的凋亡，因此我们探讨了氧化苏木素对 MCF-7 细胞凋亡通路的影响。同时我们的 MTT 细胞毒结果显示氧化苏木素对乳癌 MCF-7 细胞的毒性显著强于正常乳腺上皮 MCF10A 细胞(约 4.7 倍),所以我们进一步探讨了氧化苏木素抗乳腺癌细胞作用的机制。

Annexin V/PI 双染法是一种特异且敏感的凋亡检测方法，细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)可外翻到细胞外与对 PS 有高度亲合力的磷脂结合蛋白 Annexin V 结合,此时细胞呈现 Annexin V 单阳性的特点,到了凋亡晚期细胞膜破损严重 PI 可以进入细胞，此时细胞 Annexin V 和 PI 染色呈双阳性<sup>[11]</sup>。我们的预实验结果显示氧化苏木素无自发荧光可以用于上述方法的凋亡检测，随后的凋亡检测显示氧化苏木素可以剂量依赖性地增加凋亡细胞的比例(图 1)。

细胞凋亡有线粒体途径和死亡受体途径两条

主要通路。线粒体膜电位的改变可以导致膜通透性变化,从而释放出细胞色素 C,与 Apaf-1、caspase-9 形成复合物,进而激活 Apaf-1 剪切 caspase-9,继而激活下游的 caspase-3 等诱发后续的凋亡反应<sup>[12]</sup>。DiOC6 是一种亲脂性阳离子荧光染料,因线粒体跨膜电位的存在可使其结合到线粒体基质上,所以其荧光的增强或减弱就说明了线粒体内膜电负性的增高或降低。流式细胞仪的检测结果显示氧化苏木素可以剂量依赖性的减低 DiOC6 在 MCF-7 细胞中的积累,说明其降低了线粒体的膜电位(图 2)。进一步的 Western blot 分析显示氧化苏木素促进了细胞色素 C 的释放和随后 caspase-9 的剪切激活(图 3)。

Survivin 是凋亡抑制蛋白 IAP 家族的新成员,可以抑制线粒体依赖的凋亡通路,已有研究显示下调 survivin 可以减低线粒体的膜电位、诱发细胞色素 C 的释放和 caspase 底物的剪切,另外 survivin 还可通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。我们的研究显示氧化苏木素可以剂量依赖性地下调 survivin 蛋白的表达(图 4),可能是其诱发线粒体凋亡通路的机制。

综上所述,氧化苏木素是通过线粒体途径诱导了人乳癌细胞 MCF-7 的细胞凋亡,下调 survivin 可能是其诱发凋亡的机制。此外,与正常细胞相比氧化苏木素对乳癌细胞显示了更高的细胞毒性,有望将其开发为高效低毒的抗癌新药用于肿瘤病人的治疗。

#### 参考文献:

- [1] Jeong GS, Lee DS, Kwon TO, et al. Cytoprotective constituents of the heartwood of *Caesalpinia sappan* on glutamate-induced oxidative damage in HT22 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 945-949.
- [2] Washiyama M, Sasaki Y, Hosokawa T, et al. Anti-inflammatory constituents of *Sappan Lignum* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 941-944.
- [3] 张静文. 苏木药理作用研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2008, 24(16): 2466-2467.
- [4] 王三龙, 蔡兵, 崔承彬, 等. 中药苏木提取物诱导 K562 细胞凋亡的研究[J]. *癌症*, 2001, 20(12): 1376-1379.
- [5] Kim EC, Hwang YS, Lee HJ, et al. *Caesalpinia sappan* induces cell death by increasing the expression of p53 and p21WAF1/CIP1 in head and neck cancer cells [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(3): 405-414.
- [6] Zhao YN, Pan Y, Tao JL, et al. Study on cardioactive effects of brazilein [J]. *Pharmacology*, 2006, 76(2): 76-83.
- [7] Ye M, Xie WD, Lei F, et al. Brazilein, an important immunosuppressive component from *Caesalpinia sappan* L [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(3): 426-432.
- [8] Shen J, Zhang H, Lin H, et al. Brazilein protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 558(1-3): 88-95.
- [9] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [10] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1-3): 334-340.
- [11] 佟俊杰, 张广耘, 袁晓. 细胞凋亡检测方法的研究进展 [J]. *口腔医学*, 2010, 30(7): 437-439.
- [12] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69(9): 217-245.
- [13] Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, et al. Therapeutic targeting of the survivin pathway in initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7): 2683-2692.

(编辑 孙慧兰)