

制首乌含药血清对人乳腺癌 T-47D 细胞增殖及 ER 表达的影响^Δ

朱 璨^{1*}, 王 嫣¹, 李尧锋¹, 田 敏², 唐文超¹, 杨长福^{1#}, 王和生¹(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3062-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.08

摘要 目的: 研究制首乌含药血清对人乳腺癌 T-47D 细胞增殖及雌激素受体(ER)表达的影响, 探讨其植物雌激素(PE)样作用。方法: 将性未成熟 SD 大鼠随机分为空白组, 戊酸雌二醇(Ev)组(阳性对照, 0.12 mg/kg), 制首乌低、高剂量组(0.75、3 g/kg, 以生药量计)以及制首乌低、高剂量+Ev 联用组(剂量同各药单用组), 每组 10 只。空白组大鼠灌胃等体积水, 各给药组大鼠灌胃相应药物, 早晚各 1 次, 连续 4 d。末次给药 2 h 后采血, 制备空白血清和含药血清。将 T-47D 细胞随机分为空白组, Ev 组, 制首乌低、高剂量组以及制首乌低、高剂量+Ev 联用组, 分置于含 20% 空白或相应含药血清的培养基中培养, 采用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖率(PR), 采用 Western blotting 法和逆转录-聚合酶链反应法检测 ER- α 、ER- β 蛋白及其 mRNA 的表达情况。结果: 与空白组比较, 各给药组细胞的 PR[各给药组(24 h), 除制首乌高剂量+Ev 联用组外的其余各给药组(48、72 h)]均显著升高; 且制首乌高剂量组(72 h)显著高于 Ev 组, 制首乌低剂量组+Ev 联用组(72 h)显著高于同剂量制首乌单用组, 而制首乌高剂量+Ev 联用组(72 h)显著低于同剂量制首乌单用组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Ev 组、制首乌高剂量组和制首乌低剂量+Ev 联用组细胞中 ER- α 蛋白, 各给药组细胞中 ER- α mRNA 和 ER- β 蛋白以及 Ev 组、制首乌低剂量组和制首乌+Ev 联用组细胞中 ER- β mRNA 的相对表达量均显著升高; Ev 组细胞中 ER- α 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著高于制首乌单用和联用组; Ev 组细胞中 ER- β 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著低于制首乌低剂量+Ev 联用组, 但 ER- β mRNA 的相对表达量显著高于制首乌单用组和制首乌高剂量+Ev 联用组; 制首乌低剂量+Ev 联用组细胞中 ER- α 、ER- β 蛋白及其 mRNA 以及制首乌高剂量+Ev 联用组细胞中 ER- β mRNA 的相对表达量均显著高于同剂量制首乌单用组, 而制首乌高剂量+Ev 联用组细胞中 ER- α 蛋白及其 mRNA 相对表达量均显著低于同剂量制首乌单用组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 制首乌含药血清可促进人乳腺癌 T-47D 细胞的增殖, 并可通过促进 ER- α 和 ER- β 蛋白及其 mRNA 的表达来发挥 PE 样作用。但上述作用弱于雌激素, 且两者联合可能会拮抗雌激素的作用。

关键词 制首乌; 含药血清; T-47D 细胞; 细胞增殖; 雌激素受体; 植物雌激素样作用

Effects of Processed *Polygonum multiflorum* Containing Serum on the Proliferation and the Expression of ER of Human Breast Cancer T-47D Cells

ZHU Can¹, WANG Yan¹, LI Yaofeng¹, TIAN Min², TANG Wenchao¹, YANG Changfu¹, WANG Hesheng¹ (1. College of Basic Medicine, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of processed *Polygonum multiflorum* containing serum on the proliferation and the expression of estrogen receptor (ER) of human breast cancer T-47D cells, and to investigate its phytoestrogen (PE)-like effect. METHODS: Sexually immature SD rats were randomly divided into estradiol valerate (Ev) group (positive control, 0.12 mg/kg), processed *P. multiflorum* low-dose and high-dose groups (0.75, 3 g/kg, by crude drug), low-dose and high-dose processed *P. multiflorum*+Ev groups (same dose as single drug group), with 10 rats in each group. Blank group was given constant volume of water intragastrically, and administration groups were given relevant medicine intragastrically; once day and night, for consecutive 4 days. Two hours after last administration, blank serum and containing serum were prepared. T-47D cells were also randomly divided into blank group, Ev group, low-dose and high-dose processed *P. multiflorum* groups, low-dose and high-dose processed *P. multiflorum*+Ev groups, and then were cultured in medium which contained 20% blank serum or drug containing serum. CCK-8 assay was used to detect proliferation rate (PR). Western blotting assay and RT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of ER- α and ER- β . RESULTS: Compared with blank group, PR of administration groups [each administration group (24 h), other administration groups (48, 72 h) except for high-dose processed *P. multiflorum* + Ev group] were increased significantly; high-dose processed *P. multiflorum* group (72 h) was significantly higher than Ev group, and low-dose processed *P. multiflorum* + Ev group (72 h) was significantly higher than the same-dose processed *P. multiflorum* group; high-dose processed *P. multiflorum* + Ev

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81460670); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No.黔教合 KY 字[2017]181、黔教合 KY 字[2016]186); 贵州省“中西医结合基础”重点学科(培育)项目(No.黔学位合字 ZDXK[2016]25 号); 贵阳中医学院科研项目(No.贵中院内[2016]33 号)

* 助教, 硕士。研究方向: 中医药防治生殖系统疾病。电话: 0851-88308013。E-mail: 992204746@qq.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药及天然药物防治疾病的生物化学机制。电话: 0851-88308013。E-mail: zfy435140961@qq.com

group (72 h) was significantly lower than the same-dose processed *P. multiflorum* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Relative protein expression of ER- α in Ev group, high-dose processed *P. multiflorum* group and low-dose processed *P. multiflorum*+Ev group, relative mRNA expression of ER- α and protein expression of ER- β in administration groups, relative mRNA expression of ER- β in Ev group, low-dose processed *P. multiflorum* group and processed *P. multiflorum*+Ev groups were all increased significantly. Relative protein and mRNA expression of ER- α in Ev group were significantly higher than processed *P. multiflorum* groups and combination groups. Relative protein and mRNA expression of ER- β in Ev group were significantly lower than low-dose processed *P. multiflorum*+Ev group, but relative mRNA expression of ER- β was significantly higher than processed *P. multiflorum* groups and high-dose processed *P. multiflorum*+Ev group. Relative protein and mRNA expression of ER- α and ER- β in low-dose processed *P. multiflorum*+Ev group as well as relative mRNA expression of ER- β in high-dose processed *P. multiflorum*+Ev group were significantly higher than the same-dose processed *P. multiflorum* group. Relative protein and mRNA expression of ER- α in high-dose processed *P. multiflorum*+Ev group were significantly lower than the same-dose processed *P. multiflorum* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: The processed *P. multiflorum* containing serum can promote the proliferation of human breast cancer T-47D cells, and play the PE-like role through promoting protein and mRNA expression of ER- α and ER- β . However, the above effects are weaker than estrogen, and the combination of the two may antagonize the effect of estrogen.

KEYWORDS Processed *Polygonum multiflorum*; Containing serum; T-47D cells; Cell proliferation; Estrogen receptor; Phytoestrogen-like effect

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,其炮制品制首乌(Polygoni multiflori radix preparata)具有补肝肾、益精血、壮筋骨、乌须发之功效^[1]。现代药理研究表明,制首乌具有植物雌激素(PE)样作用,可抗衰老、抗骨质疏松,预防和延缓卵巢颗粒细胞凋亡,阻止卵泡闭锁^[2-3]。本课题组前期研究发现,制首乌可调节去卵巢大鼠的生殖轴,亦能抑制雷公藤多苷对大鼠生殖功能的破坏作用^[4-5];同时在体研究表明,制首乌主要成分二苯乙烯苷能升高性未成熟小鼠的子宫系数,上调其子宫雌激素受体(ER- α 、ER- β)的表达^[6]。为进一步探讨制首乌的PE样活性及可能机制,本课题采用中药血清药理学实验方法,以制首乌含药血清为干预物,考察其对体外培养的雌激素受体阳性[ER(+)]人乳腺癌T-47D细胞增殖和ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA表达的影响,旨在为制首乌PE药物研发以及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BB15型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Eclipse TS100型倒置显微镜(日本Nikon公司);Synergy 2型荧光/吸收光酶标仪(美国Bio-Tek公司);Mini-Protean Tetra型电泳槽、C1000 Touch Thermal Cycler型聚合酶链反应(PCR)仪、ChemicDoc Touch型超高灵敏化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);Nano Photometer-N80型超微量分光光度计(德国Implen公司);Microfuge 20R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司)。

1.2 药材、药品与试剂

制首乌饮片(四川省川源药业有限公司,批号:171001)经贵阳中医药大学药学院王世清教授鉴定为制首乌真品,各项质控指标均符合2015年版《中国药典》(一部)的相关要求^[1]。

戊酸雌二醇片(Ev,阳性对照,德国Jenapharm GmbH & Co. KG,规格:1 mg);DMEM高糖培养基、DMEM高糖无酚红培养基、胰蛋白酶(美国Gibco公司);胎牛血清(FBS)、活性炭-葡聚糖苷处理的胎牛血清(CDT-FBS)(以色列Biological Industries公司);青链霉素双抗、CCK-8试剂盒(批号:013018181008)、细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒、Quickblock™封闭液(上海碧云天生物技术公司);兔源ER- α 单克隆抗体、兔源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(内参)(美国CST公司,批号分别为6、4);兔源ER- β 多克隆抗体(美国Abcam公司,批号:GR3211677-6);山羊抗兔IgG二抗(美国Jackson Immuno Research公司,批号:139799);TRNzol Universal总RNA提取试剂盒、FastKing一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒[含FastKing One Step RT-PCR Master Mix、RT-PCR Enzyme Mix、无RNA酶ddH₂O等试剂,天根生化科技(北京)有限公司];PCR引物(序列见表1)由上海生工生物工程股份有限公司设计、合成;其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

表1 PCR引物序列

Tab 1 PCR primer sequence

基因	引物序列	扩增片段, bp
ER- α	上游:5'-GACATGAGAGCTGCCAACCT-3'	421
	下游:5'-AGATCTCCACCATGCCTCT-3'	
ER- β	上游:5'-AGCTGGGCAAGAAGATTCC-3'	501
	下游:5'-GAGCAGATGTTCCATGCCCT-3'	
β -actin	上游:5'-GTGCTATCCCTGTACGCCCTC-3'	530
	下游:5'-TTCTGCATCCTGTCGGCAAT-3'	

1.3 动物

SPF级SD大鼠60只,雌性,出生21 d(刚断乳、性未成熟),体质量60~80 g,购自重庆市中药研究院实验动

物研究所,动物使用许可证号:SYXK(渝)2017-0003。

1.4 细胞

ER(+)人乳腺癌T-47D细胞由上海复祥生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 制首乌水煎液的制备

取制首乌饮片60 g,加5倍量(g/mL,下同)水浸泡30 min,煎煮至微沸,保持20 min,滤过;再加3倍量水,同法煎煮,滤过;合并两次滤液,浓缩,制得每1 mL含生药0.3 g的水煎液,经微孔滤膜滤过后,将滤液置于4℃保存,备用。

2.2 动物分组与给药

参考文献方法^[7],将大鼠随机分为6组,即空白组,Ev组,制首乌低、高剂量组以及制首乌低、高剂量+Ev联用组,每组10只。空白组大鼠灌胃等体积水,Ev组大鼠灌胃Ev 0.12 mg/kg(以水为溶剂,剂量根据人用临床等效剂量换算而得),制首乌低、高剂量组大鼠分别灌胃“2.1”项下制首乌水煎液0.75、3 g/kg(以生药量计,以水为溶剂,剂量参照人用等效剂量和本课题组前期预实验结果设置),制首乌低、高剂量+Ev联用组大鼠按上述单用剂量灌胃相应药物;给药体积均为1 mL/100 g,早晚各1次,连续4 d。

2.3 含药血清的制备

末次给药2 h后,麻醉各组大鼠,于腹主动脉取血,室温静置1 h,以2 000 r/min离心10 min,分离上层血清。合并同组大鼠血清,即得空白血清和含药血清,于56℃下灭活补体30 min,经0.22 μm微孔滤膜滤过后,将滤液置于-20℃保存,备用。

2.4 细胞增殖情况检测

采用CCK-8法检测。将人乳腺癌T-47D细胞置于含10%FBS、1%青链霉素双抗的DMEM高糖培养基中,于37℃、5%CO₂、相对饱和湿度条件下培养(下同),于后续试验开始前3 d,将培养基更换为含5%CDT-FBS、1%青链霉素双抗的DMEM高糖无酚红培养基,以增加细胞对雌激素样物质的敏感性^[8]。取上述经预处理且处于对数生长期的T-47D细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)清洗,经0.25%胰蛋白酶消化后,以3×10³个/孔接种于96孔板中,每孔加入含5%CDT-FBS、1%青链霉素双抗的DMEM高糖无酚红培养基150 μL,培养24 h待细胞贴壁后,将细胞随机分为空白组、Ev组和制首乌低、高剂量组以及制首乌低、高剂量+Ev联用组,每组设6个复孔。吸弃各孔上清液,空白组加入含1%青链霉素双抗、20%空白血清(“2.3”项)的DMEM高糖无酚红培养基150 μL,各给药组分别加入含1%青链霉素双抗、20%相应含药血清(“2.3”项)的DMEM高糖无酚红培养基150 μL,分别培养24、48、72 h,在各时间点分别加入CCK-8试剂15 μL,于37℃孵育2 h,使用荧光/吸收光酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度(A),并计算增殖率

(PR),PR=(试验组细胞平均A值/空白组细胞平均A值)×100%。上述试验重复3次(下同)。

2.5 细胞中ER-α、ER-β蛋白表达情况检测

采用Western blotting法检测。取“2.4”项下经预处理且处于对数生长期的T-47D细胞,用PBS清洗,经0.25%胰蛋白酶消化后,以1×10⁶个/孔接种于6孔板中,每孔加入含5%CDT-FBS、1%青链霉素双抗的DMEM高糖无酚红培养基2 mL,培养24 h待细胞贴壁后,按“2.4”项下方法分组、给药,每组设3个复孔。培养48 h后收集细胞,经细胞裂解液裂解后,吸取裂解液适量,于4℃下以12 000 r/min离心15 min,取上清液,按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量。经5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液稀释后,于100℃变性5 min。每组取变性蛋白20 μg进行SDS-PAGE电泳(电压:120 V,时间:60 min),电泳结束后转移至PVDF膜上,以封闭液室温封闭15 min,加入相应一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;用TBST溶液清洗10 min×3次,随后加入二抗(稀释度均为1:10 000),室温孵育1 h;用TBST溶液清洗10 min×3次,以ECL显色后,采用超高灵敏化学发光成像系统成像并使用Image-Pro Express 5.1图像处理软件分析。以相应蛋白与内参β-actin条带的灰度值比值作为目标蛋白的相对表达量。

2.6 细胞中ER-α、ER-β mRNA表达情况检测

采用RT-PCR法检测。取“2.4”项下经预处理且处于对数生长期的T-47D细胞,按“2.5”项下方法培养、分组、给药,每组设3个复孔。培养48 h后收集细胞,采用TRNzol Universal总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,使用超微量分光光度计测定其纯度(即A_{260 nm}/A_{280 nm}值,若A_{260 nm}/A_{280 nm}值为1.8~2.0即表明其纯度符合要求^[9])。参照FastKing一步法RT-PCR试剂盒说明书进行RT-PCR,反应体系(50 μL):总RNA 2 μL、2×FastKing One Step RT-PCR Master Mix 25 μL、25×RT-PCR Enzyme Mix 2 μL、上/下游引物各1.25 μL、无RNA酶ddH₂O 18.5 μL。反应条件:42℃逆转录30 min,95℃预变性3 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共循环35次;72℃再延伸5 min。扩增产物行1.2%琼脂糖凝胶电泳(电压:120 V,时间:45 min)后,采用超高灵敏化学发光成像系统成像并使用Image Lab 5.2.1软件进行分析,以相应基因与内参β-actin条带的灰度值比值作为目标基因mRNA的相对表达量。

2.7 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 制首乌含药血清对T-47D细胞增殖的影响

作用24 h时,各给药组细胞的PR均较空白组显著升高($P < 0.05$)。作用48、72 h时,除制首乌高剂量+Ev

联用组外,其余各给药组细胞的PR均较空白组显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且在作用72 h时,制首乌高剂量组细胞的PR显著高于Ev组,制首乌低剂量+Ev联用组细胞的PR显著高于同剂量制首乌单用组,而制首乌高剂量+Ev联用组细胞的PR显著低于同剂量制首乌单用组($P<0.05$),详见表2。

表2 制首乌含药血清对T-47D细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

Tab 2 Effects of processed *P. multiflorum* containing serum on the proliferation of T-47D cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	24 h	48 h	72 h
空白组	100	100	100
Ev组	165.83 ± 13.10*	142.59 ± 12.86*	139.05 ± 10.73*
制首乌低剂量组	201.90 ± 83.18*	123.90 ± 14.45*	123.51 ± 15.82*
制首乌高剂量组	139.03 ± 11.94*	145.21 ± 17.06*	315.82 ± 85.92**
制首乌低剂量+Ev联用组	166.23 ± 23.34*	145.78 ± 14.91*	210.02 ± 57.14** ^Δ
制首乌高剂量+Ev联用组	135.26 ± 17.45*	118.90 ± 12.05	114.85 ± 13.25 ^Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Ev组比较,[#] $P<0.05$;与同剂量制首乌单用组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. Ev group, [#] $P<0.05$; vs. the same-dose processed *P. multiflorum* group, ^Δ $P<0.05$

3.2 制首乌含药血清对T-47D细胞中ER-α、ER-β蛋白表达的影响

与空白组比较,Ev组、制首乌高剂量组、制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER-α蛋白以及各给药组细胞中ER-β蛋白的相对表达量均显著升高;且Ev组细胞中ER-α蛋白的相对表达量显著高于制首乌单用及联用组,而ER-β的相对表达量显著低于制首乌低剂量组+Ev联用组;制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER-α、ER-β蛋白的相对表达量均显著高于同剂量制首乌单用组,而制首乌高剂量+Ev联用组ER-α蛋白的相对表达量显著低于同剂量制首乌单用组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图1、表3。

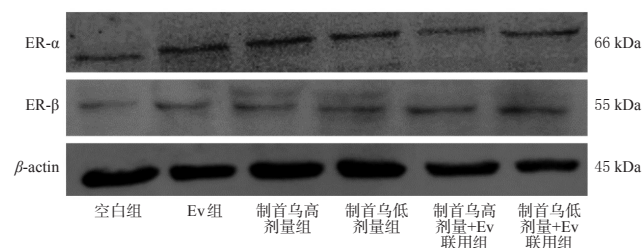


图1 制首乌含药血清对T-47D细胞中ER-α、ER-β蛋白表达影响的电泳图

Fig 1 Electrophoresis of the effects of processed *P. multiflorum* containing serum on protein expression of ER-α and ER-β in T-47D cells

3.3 制首乌含药血清对T-47D细胞中ER-α、ER-β mRNA表达的影响

与空白组比较,各给药组细胞中ER-α mRNA以及Ev组、制首乌低剂量组和制首乌+Ev联用组细胞中

表3 制首乌含药血清对T-47D细胞中ER-α、ER-β蛋白及其mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 3 Effects of processed *P. multiflorum* containing serum on protein and mRNA expression of ER-α and ER-β in T-47D cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	蛋白		mRNA	
	ER-α	ER-β	ER-α	ER-β
空白组	0.092 ± 0.008	0.021 ± 0.001	0.471 ± 0.008	0.034 ± 0.001
Ev组	0.253 ± 0.010**	0.041 ± 0.001*	2.131 ± 0.025**	0.062 ± 0.002**
制首乌低剂量组	0.108 ± 0.002 [#]	0.055 ± 0.007*	0.856 ± 0.009* [#]	0.054 ± 0.001**
制首乌高剂量组	0.195 ± 0.007**	0.040 ± 0.006*	1.842 ± 0.028** [#]	0.040 ± 0.001 [#]
制首乌低剂量+Ev联用组	0.178 ± 0.012** ^Δ	0.091 ± 0.011** ^Δ	1.226 ± 0.022** ^Δ	0.121 ± 0.001** ^Δ
制首乌高剂量+Ev联用组	0.092 ± 0.010** ^Δ	0.049 ± 0.011*	1.131 ± 0.019** ^Δ	0.054 ± 0.001** ^Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Ev组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与同剂量制首乌单用组比较,^Δ $P<0.05$,^Δ $P<0.01$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. Ev group, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$; vs. the same-dose processed *P. multiflorum* group, ^Δ $P<0.05$, ^Δ $P<0.01$

ER-β mRNA的相对表达量均显著升高,且制首乌单用及联用组细胞中ER-α mRNA以及制首乌单用组、制首乌高剂量+Ev联用组细胞中ER-β mRNA的相对表达量均显著低于Ev组,而制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER-β mRNA的相对表达量显著高于Ev组;制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER-α、ER-β mRNA以及制首乌高剂量+Ev联用组细胞中ER-β mRNA的相对表达量均显著高于同剂量制首乌单用组,而制首乌高剂量+Ev组ER-α mRNA的相对表达量显著低于同剂量制首乌单用组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图2、表3。

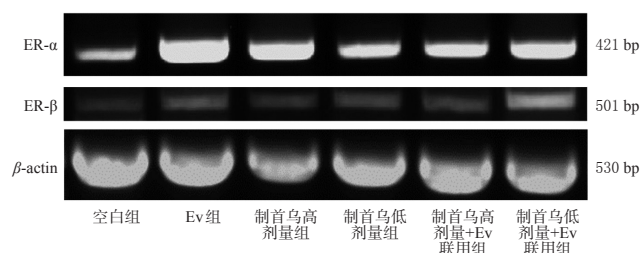


图2 制首乌含药血清对T-47D细胞中ER-α、ER-β mRNA表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of the effects of processed *P. multiflorum* containing serum on mRNA expression of ER-α and ER-β in T-47D cells

4 讨论

T47-D细胞是ER(+)人乳腺癌细胞株,富含ER,可受雌激素或雌激素样活性物质诱导而增殖,是用以检测雌激素样活性的常用细胞株^[10-11]。雌激素受体主要包括ER-α和ER-β两种亚型,其中ER-α主要高表达于子宫、卵巢等组织,且总体活性高于ER-β^[12-15]。

制首乌是传统补益中药,能补肝肾、益精血,本课题组前期研究发现制首乌及其活性成分在体内具有PE样作用^[6]。考虑到制首乌成分复杂、须经血液循环分布和消化道吸收才能发挥相应作用^[7],故本研究采用中药血

清药理学方法,制备制首乌含药血清,并将其直接作用于T-47D细胞,初步探讨制首乌的PE样作用及可能机制。以含药血清为干预药物既可排除制首乌粗提物(如水煎剂)理化性质对体外研究的影响,也可真实反映药物经在体消化、吸收和生物转化后的药效发挥过程^[7]。与此同时,本研究还考察了制首乌与Ev联用对细胞ER表达的影响,以进一步探讨制首乌的双重调节作用。

CCK-8试验结果显示,作用24 h时,各给药组细胞的PR均较空白组显著升高。作用48、72 h时,除制首乌高剂量+Ev联用组外,其余各给药组细胞的PR均较空白组显著升高;且在作用72 h时,制首乌高剂量组细胞的PR显著高于Ev组,制首乌低剂量+Ev联用组细胞的PR显著高于同剂量制首乌单用组,而制首乌高剂量+Ev联用组细胞的PR显著低于同剂量制首乌单用组。这提示Ev和制首乌均能明显促进T-47D细胞的增殖。当单用制首乌时,这种促增殖作用有随剂量增加而逐渐增强的趋势,且在作用72 h时,高剂量制首乌的作用明显强于阳性对照Ev;当制首乌与Ev联用时,这种促增殖作用有随剂量增加而逐渐减弱的趋势,且在作用72 h时,低剂量联用组的作用明显强于低剂量单用组,而高剂量联用组的作用则明显弱于高剂量单用组,表明低剂量制首乌与Ev联合具有协同作用,而高剂量制首乌与Ev联合则具有拮抗作用。这可能与PE在体内的双重调节作用有关,即当体内雌激素水平较低时,PE可与ER结合发挥雌激素样作用;而当体内雌激素水平较高时,PE则可通过竞争性结合ER而产生抗雌激素作用^[16]。但本研究并未考察Ev联用剂量的影响,故上述结论有待进一步证实。

本研究结果显示,Ev和制首乌均可不同程度地增加ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA的表达。其中,Ev组、制首乌高剂量组和制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER- α 蛋白,各给药组细胞中ER- α mRNA和ER- β 蛋白,Ev组、制首乌低剂量组以及制首乌+Ev联用组细胞中ER- β mRNA的相对表达量均较空白组显著升高;Ev组细胞中ER- α 蛋白及其mRNA的相对表达量均显著高于制首乌单用和联用组;Ev组细胞中ER- β 蛋白及其mRNA的相对表达量显著低于制首乌低剂量+Ev联用组,但其ER- β mRNA的相对表达量显著高于制首乌单用组和制首乌高剂量+Ev联用组。这提示Ev的促增殖作用较制首乌更强,与文献报道的制首乌PE样作用弱于雌激素这一观点基本相符^[16];同时,制首乌高剂量+Ev联用虽能明显上调T-47D细胞中ER- α mRNA的表达,但对ER- α 蛋白表达的影响却不明显,可能与翻译过程中转录因子的表达有关^[17-18],但具体机制尚需进一步探索。此外,制首乌低剂量+Ev联用组细胞中ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA以及制首乌高剂量+Ev联用组ER- β mRNA的相对表达量均显著高于同剂量制首乌单用组,而制首乌高剂量+Ev联用组细胞中ER- α 蛋白及其mRNA相对表达量均显著低于同剂量制首乌单用组。这进一步揭示了不同剂量制

首乌与Ev联用促增殖作用的差异,即低剂量制首乌与Ev联合后,对ER- α 蛋白及其mRNA表达的上调具有协同作用;而高剂量制首乌与Ev联合则呈拮抗作用。但与同剂量制首乌单用比较,不同剂量制首乌与Ev联用均可促进ER- β mRNA的表达,但高剂量制首乌与Ev联用对ER- β 蛋白表达的影响则不明显,这可能与设计ER- β mRNA引物序列时未包含变异片段、而高剂量制首乌单用能诱导引物序列某些片段的扩增有关^[19-20]。

综上所述,制首乌含药血清可促进人乳腺癌T-47D细胞的增殖,并可通过促进雌激素受体ER- α 和ER- β 蛋白及其mRNA的表达来发挥PE样作用。但上述作用弱于雌激素,且两者联合可能会拮抗雌激素的作用。此外,RT-PCR试验结果提示制首乌PE样作用的分子机制可能与Ev有所不同,故仍有待后续研究深入探讨。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:176-177.
- [2] 李亦晗,王跃飞,朱彦.何首乌二苯乙烯苷抗衰老研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(2):182-185.
- [3] 张娜,李亚丽,张耀恒,等.中药何首乌饮对衰老大鼠卵巢组织形态学影响的实验研究[J].中国新药杂志,2010,19(8):704-707.
- [4] 朱璨,李尧锋,杨长福,等.制首乌对去卵巢大鼠子宫指数和性激素水平的影响研究[J].中国民族民间医药,2017,26(10):25-27.
- [5] 朱璨,李尧锋,彭芳,等.制首乌对大鼠卵巢功能减退的影响研究[J].医学研究生学报,2018,31(6):602-607.
- [6] 朱璨,李尧锋,彭芳,等.二苯乙烯苷的雌激素样作用及其对性未成熟小鼠ER表达的影响研究[J].中国药房,2019,30(8):1031-1036.
- [7] 张灵娜,林兵,宋洪涛.中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J].中草药,2015,46(17):2662-2666.
- [8] BAKER KM, BAUER AC. Green tea catechin, EGCG, suppresses PCB 102-induced proliferation in estrogen-sensitive breast cancer cells[J]. *Int J Breast Cancer*, 2015. DOI: 10.1155/2015/163591.
- [9] WU ZG, JIANG W, MANTRI N, et al. Transcriptome analysis reveals flavonoid biosynthesis regulation and simple sequence repeats in yam (*Dioscorea alata* L.) tubers[J]. *BMC Genomics*, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-1547-8.
- [10] GONZALEZ TL, MOOS RK, GERSCH CL, et al. Metabolites of n-butylparaben and iso-butylparaben exhibit estrogenic properties in MCF-7 and T47D human breast cancer cell lines[J]. *Toxicol Sci*, 2018, 164(1):50-59.
- [11] AMANATULLAH DF, TAMAREISIS JS, CHU P, et al. Local estrogen axis in the human bone microenvironment regulates estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2017. DOI: 10.1186/s13058-017-0910-x.
- [12] ZHAO Q, LU Y, ZHAO Y, et al. Rational design of multi-

采用UPLC-Q-TOF-MS技术鉴定连翘中45种化学成分^Δ

周明月*, 霍金海, 孙国东, 王伟明[#](黑龙江省中医药科学院中药研究所, 哈尔滨 150036)

中图分类号 R282;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3067-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.09

摘要 目的:对连翘药材的化学成分进行结构鉴定。方法:利用超高效液相色谱联用四极杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术对连翘的化学成分进行分析。采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱,流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱,流速为0.3 mL/min,柱温为30℃,进样量为5 μL;采用电喷雾正、负离子模式检测,离子源温度为550℃,雾化气体为N₂,雾化气、辅助气压力均为379.2 kPa,气帘气压力为241.3 kPa,去簇电压为80 V/-80 V,碰撞能量为35 eV/-35 eV,质量扫描范围为80~1 500 Da。利用Peakview 2.0软件通过所测得成分的一级质谱进行目标性筛查,并计算各成分的高分辨精确分子量,对比对照品图谱以及相关文献,或计算二级质谱中碎片离子的元素组成及分析其裂解途径,推断化合物结构。结果与结论:共鉴定出连翘中的45个化合物,包括7个苯乙醇苷类成分、5个木脂素类成分、5个萜类成分、12个黄酮类成分、7个有机酸类成分、2个酚类成分、2个醌类成分、2个苷类成分和3个其他成分;其中有19个化合物为首次在连翘中得以鉴定。本研究可为连翘药效物质基础的深入研究及其成分的快速定性、定量分析提供基础。

关键词 连翘;化学成分;鉴定;超高效液相色谱;四极杆串联飞行时间质谱;苯乙醇苷类;木脂素类

Identification of 45 Kinds of Chemical Components of *Forsythia suspensa* by UPLC-Q-TOF-MS

ZHOU Mingyue, HUO Jinhai, SUN Guodong, WANG Weiming (Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of TCM, Harbin 150036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify chemical components of *Forsythia suspense*. METHODS: UPLC-Q-TOF-MS technology was used for the chemical components analysis of *F. suspense*. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution (A)- 0.1% formic acid acetonitrile solution (B) with

- target estrogen receptors ER- α and ER- β by QSAR approaches[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(5):576-591.
- [13] KUMAR A, BEAN LA, RANI A. Contribution of estrogen receptor subtypes, ER- α , ER- β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice[J]. *Hippocampus*, 2015, 25(12):1556-1566.
- [14] KUMAR R, YADAV A, PAKRASI PL. Expression of ER- α and ER- β during peri-implantation period in uterus is essential for implantation and decidualization in golden hamster[J]. *Life Sci*, 2017. DOI:10.1016/j.lfs.2016.12.002.
- [15] BERNARDINO RL, ALVES MG, SILVA J, et al. Expression of estrogen receptors alpha (ER- α), beta (ER- β), and G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in testicular tissue of men with klinefelter syndrome[J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(6):413-415.
- [16] THONGON N, BOONMUEN N, SUKSEN K, et al. Selective estrogen receptor modulator (SERM)-like activities of diarylheptanoid, a phytoestrogen from curcuma comosa, in breast cancer cells, pre-osteoblast cells, and rat uterine tissues[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(17):3490-3496.
- [17] KASTRATI I, CANESTRARI E, FRASOR J. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NF κ B-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres[J]. *Oncogene*, 2015, 34(18):2309-2316.
- [18] LEVIN ER. Membrane estrogen receptors signal to determine transcription factor function[J]. *Steroids*, 2018. DOI:10.1016/j.steroids.2017.10.014.
- [19] MANDUSIĆ V, NIKOLIĆ-VUKOSAVLJEVIĆ D, TANIĆ N, et al. Expression of estrogen receptor β wt isoform (ER-beta1) and ERbetaDelta5 splice variant mRNAs in sporadic breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin*, 2007, 133(8):571-579.
- [20] MORAIS-SANTOS M, NUNES ARYANE EB, OLIVEIRA AG, et al. Changes in estrogen receptor ER β (ESR2) expression without changes in the estradiol levels in the prostate of aging rats[J]. *PLoS One*, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0131901.

^Δ 基金项目:国家中药材产业技术体系任务(No.CARS-21);黑龙江省科研机构创新能力提升专项计划(No.YC13D001)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及质量评价。电话:0451-55653086-6902。E-mail:1138338821@qq.com

[#] 通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药新药研发。电话:0451-55665478。E-mail:zyyjy@163.com

(收稿日期:2019-02-21 修回日期:2019-07-28)

(编辑:张元媛)