

# 三七总皂苷对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响<sup>\*</sup>

随蓓蓓 李华舜 孟 晓 孙秀玲 刘 莉

(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)

**摘 要** 目的 探究三七总皂苷对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。方法 三七总皂苷作用于人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为处理组,同时设置空白对照组;MTT 法检测细胞活性变化,光镜观察检测细胞形态学变化,凋亡试剂盒检测细胞凋亡情况,caspase 3 试剂盒检测 caspase 3 的酶活性情况。结果 与空白对照组相比,0.5、1.0 和 2.0mg/ml 三七总皂苷组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞活性逐渐降低( $P<0.05$ ),呈时间和浓度依赖性;光镜观察下 1.0、2.0mg/ml 三七总皂苷组产生了凋亡小体;荧光观察下 1.0、2.0mg/ml 三七总皂苷组出现了核固缩现象;与空白对照组相比,0.5、1.0 和 2.0mg/ml 三七总皂苷组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 caspase3 的酶活性明显增加,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 三七总皂苷可降低人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的活性,具有促凋亡作用。

**关键词** 三七总皂苷;细胞活性;凋亡

中图分类号:Q255 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2021)04-077-04

## Apoptosis of human breast cancer cell line MDA-MB-231 by Panax notoginseng saponins

SUI Beibei, LI Huasun, MENG Xiao, SUN Xiuling, LIU Li

(School of Biological Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract; Objective** To explore the extraction of Panax notoginseng saponins (PNS) from Panax notoginseng and the effect on human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** The total saponin of hepaescin was used as treatment group on human breast cancer cell MDA-MB-231. The blank control group was set up at the same time. MTT method was used to detect the changes of cell activity; the morphological changes of cells were detected by light microscope; apoptosis was detected by apoptosis kit; the expression of caspase-3 was detected by kit. **Results** Compared with the blank control group, the activity of MDA-MB-231 cells in 0.5, 1.0, 2.0mg/ml groups decreased gradually in a time and concentration dependent manner; apoptotic bodies were produced in 1.0 and 2.0mg/ml PNS groups; karyopyknosis was observed in 1.0 and 2.0mg/ml PNS groups; compared with the blank control group, the enzyme activity of MDA-MB-231 caspase-3 in 0.5, 1.0 and 2.0mg/ml PNS groups was significantly increased, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Panaxnotoginsengsaponins can reduce the activity of MDA-MB-231 cells and promote apoptosis.

**Keywords:** Panax notoginseng saponins; Cellular activity; Apoptosis

三七,别名田七,我国主要生产地为云南、广西等地<sup>[1]</sup>。三七主要通过其含有的皂苷类物质发挥药用作用<sup>[2]</sup>。三七总皂苷大多数可分为达玛烷型的 20(S)-原人参二醇和 20(S)-原人参三醇 2 种类型<sup>[3]</sup>。有研究发现,三七总皂苷能抑制癌细胞增

殖、生长、促进癌细胞凋亡<sup>[4]</sup>。常规化疗手段与三七总皂苷联合使用既能降低化疗手段的副作用又可发挥抗肿瘤的疗效,在临床治疗中对延长患者生存期有重要意义<sup>[5]</sup>。因此,三七总皂苷对肿瘤治疗有十分重要的临床意义,值得深入研究。

### 1 材料和方法

<sup>\*</sup> [基金项目] 国家级大学生创新项目 (201610443086)

## 1.1 材料

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(ATCC)购自上海研生生化试剂有限公司;FBS 和 DMEM 为 Gibco 产品;三七总皂苷为实验室自提取;细胞凋亡试剂盒和 Caspase 3 活性检测试剂盒为碧云天产品。人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 使用含 FBS 10% 的高糖 DMEM 培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行传代培养。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的活性检测

将细胞接种于 96 孔板,待铺满细胞培养板 80% 时开始处理。分别设空白对照组及不同浓度的三七总皂苷处理组。空白对照组加入 DMEM 培养基,三七总皂苷处理组分别加入终浓度含 0.5、1.0、2.0mg/ml 三七总皂苷的 DMEM 培养基。每组每个时间段设置 3 个平行孔。取出 96 孔板,将每个待测孔加入 20μl MTT 溶液(5mg/ml,即 0.5% MTT),37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 4h。终止孵育,弃去孔内溶液,加入适量 PBS,清洗两次。每孔精确加入 DMSO 150μl,低速振荡 10min,酶标仪 490nm 波长下检测各孔的吸光值。以平均吸光值为纵坐标,以时间为横坐标,绘制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的吸光值曲线。

### 1.2.2 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的光镜观察

将细胞接种于 6 孔板,待细胞铺满 80% 的时候。同上设置空白对照组和实验组,实验组分别加入 0.5、1.0 和 2.0mg/ml 三七总皂苷,置于二氧化碳培养箱中继续培养 24h。用 0.25% 的胰酶消化不同浓度三七总皂苷处理过的 MDA-MB-231,吹打至均匀,1000r/min,离心 5min,弃上清。将沉淀的细胞与台盼蓝染液(9:1)混合均匀。将混合液 1000r/min,离心 5min,弃上清液,加 PBS 清洗,再次离心,弃上清。重复 3 次,至细胞清洗干净。将细胞沉淀加入适量 PBS 制成细胞悬液,滴在载玻片上,制成标本,置于显微镜下观察、拍照。

### 1.2.3 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡检测

将细胞接种于 6 孔板内,待细胞铺满 80%,同上设置空白对照组和实验组。实验组分别加入 0.5、1.0 和 2.0mg/ml 三七总皂苷,吸尽培养液,每孔加入 0.5ml 固定液,固定 30min。弃去固定液,用适量 PBS 清洗两次,每次 2min。每孔加入 0.5ml 染液,晃动染色 5min。弃去染液,加入适量 PBS,晃动清洗两遍,每次 2min。加入抗荧光淬灭剂,置于荧光倒置显微镜下观察拍照。

**1.2.4 Caspase3 酶活检测** 分别加入 0.5、1.0、2.0mg/ml 浓度的三七皂苷处理 12h 后,将空白对照组和实验组细胞 600r/min,4℃ 离心 5min 收集细胞,PBS 洗涤 1 次。按照每 200 万细胞加入 100μm 裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15min。然后,15000r/min,4℃ 离心 10min。将上清转移到冰浴预冷的离心管中,-70℃ 保存样品。取出适量的 Ac-DEVD-pNA(2mM),置于冰浴上备用。如表 1 配制反应体系,加入 Ac-DEVD-pNA(2mM)后混匀,37℃ 孵育 1h。酶标仪检测样品 A405 吸光度,利用 pNA 浓度相对于 A405 的标准曲线, $y = 0.0025x$ , $R^2 = 0.99$ ,求取样品 pNA 浓度。一个酶活力单位定义为当底物饱和时,在 37℃ 1h 内可以剪切 1nmol Ac-DEVD-产生 pNA1nmol pNA 的 caspase 3 的酶量,由此计算出样品中含有多少个酶活力单位的 caspase 3。

表 1 反应体系

|                  | 对照/μl | 样品/μl |
|------------------|-------|-------|
| 检测缓冲液            | 40    | 40    |
| 待测样品             | 0     | 50    |
| 裂解液              | 50    | 0     |
| Ac-DEVD-pNA(2mM) | 10    | 10    |
| 总体积              | 100   | 100   |

## 1.3 统计学方法

应用 SPSS20 统计软件进行统计学分析。计量单位以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni-q 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞活性变化情况

在 0.5~2mg/ml 三七总皂苷处理后,人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的吸光度值随着浓度升高和作用时间延长而不断降低,具有时间和浓度依赖性。见图 1。

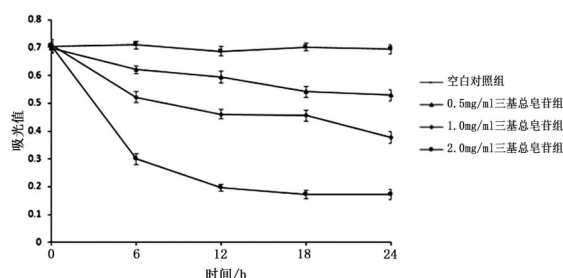
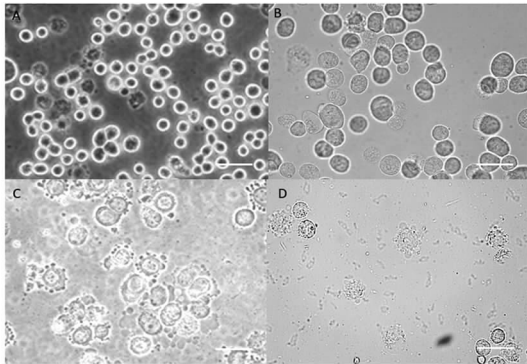


图 1 MDA-MB-231 的活性检测曲线

## 2.2 各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞光镜观察结果

空白对照组细胞形态为圆形或卵圆形且大小均一,细胞膜表面光滑。0.5mg/ml 三七总皂苷组细胞产生了轻微的空泡化。1mg/ml 三七总皂苷组细胞形态改变、结构紊乱,且细胞膜边缘出现大量的凋亡小体。2mg/ml 三七总皂苷组细胞形态改变、结构紊乱、出现大量的凋亡小体和细胞碎片。见图 2。

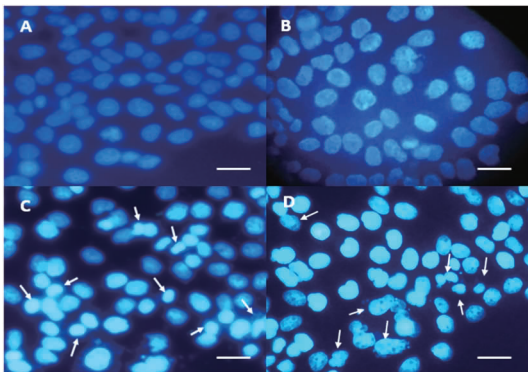


注:A.空白对照组,24h;B.0.5mg/ml 三七总皂苷组,24h;  
C.1.0mg/ml 三七总皂苷组,24h;D.2.0mg/ml 三七总皂苷组,24h;  
标尺=50 $\mu$ m

图 2 各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞形态

## 2.3 各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡情况

空白对照组细胞核形态正常,荧光强度均一,相对较弱。0.5mg/ml 三七总皂苷组细胞核形态,与空白对照组相比,变化不明显。1.0mg/ml 三七总皂苷组细胞核,形态改变、固缩变小,有的甚至呈碎块状,荧光强度变强。2.0mg/ml 三七总皂苷组细胞核,亦出现了形态改变、固缩变小、结构紊乱,荧光增强的特征。见图 3。

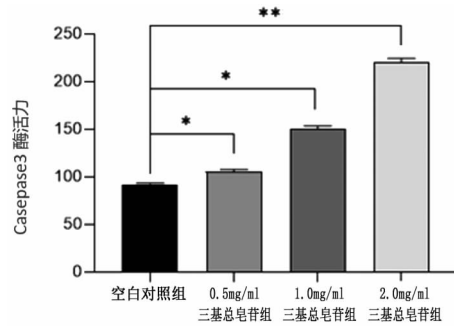


注:A.空白对照组,12h;B.0.5mg/ml 三七总皂苷组,12h;  
C.1.0mg/ml 三七总皂苷组,12h;D.2.0mg/ml 三七总皂苷组,12h;  
标尺=20 $\mu$ m

图 3 各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡情况

## 2.4 各组 Caspase3 酶活力变化情况

0.5、1.0 和 2.0mg/ml 三七总皂苷处理人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 12h 后,Caspase 3 酶活力不断提高,与浓度呈正相关。与空白对照组相比,Caspase 3 酶活力增加显著,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。



注:与空白对照组相比,\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$

图 4 各组 Caspase 3 活性情况

## 3 讨论

现代生活中,乳腺癌是女性中常见的一种疾病,患者人数逐年攀升,已成为困扰我国女性健康的重大疾病之一<sup>[6-7]</sup>。化疗、放疗等常规治疗手段对机体的毒副作用严重,寻求高效、低毒的新型抗癌药物,成为当前国内外研究的热点。三七总皂苷作为天然药物,来源广泛,对正常的细胞毒性较低,能抑制多种癌细胞的增殖,具有诱导凋亡的作用。三七总皂苷与常规化疗手段联合使用,对改善临床患者的生存质量,发挥着重要作用。研究表明,三七总皂苷对肝癌细胞 SMMC-7721 和白血病 NB4 细胞的增殖均有直接的抑制作用,且随着药物浓度增加,抑制作用增强,有药物浓度依赖性<sup>[8-9]</sup>。三七总皂苷处理白血病 HL-60 细胞后,细胞出现凋亡,说明三七总皂苷有促进细胞凋亡的作用,且这种作用随药物浓度增大而增加<sup>[10]</sup>。本文结果显示,与空白对照组相比,浓度为 0.5mg/ml、1mg/ml 和 2mg/ml 三七总皂苷可降低人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的活性,且具有时间和浓度依赖性;Caspase 3 酶活力增加显著,差异具有统计学意义,说明三七总皂苷能有效抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和活性,并具有促凋亡作用。此实验结果可为乳腺癌临床相关治疗提供用药参考,也为三七总皂苷基础研究提供数据支持。

(下转第 083 页)

# 参考文献:

- [1] 舒婷,肖畅,何慧,等. 青砖茶粗多糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 194-199. DOI: 10. 13684/j. cnki. spkj. 2019. 03. 035.
- [2] 赵胜男,郑晓凤,崔琳,等. 桔梗糖蛋白超临界辅助提取工艺及对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 187-190, 195. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2016. 03. 031.
- [3] Li DQ, Zhao J, Xie J, et al. A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts; Case study of  $\alpha$ -glucosidase[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88, 130-135. DOI: 10. 1016/j. jpba. 2013. 08. 029.
- [4] 陈海君,秦惠玉,龙飞,等. 超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接技术筛选毛茛苳种子中高亲和性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 分析化学, 2017, 45(6): 889-897. DOI: 10. 11895/j. issn. 0253-3820. 170050.
- [5] Yang L, Yang YL, Dong WH, et al. Sesquiterpenoids and 2-(2-phenylethyl) chromones respectively acting as  $\alpha$ -glucosidase and tyrosinase inhibitors from agarwood of an Aquilaria plant[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019, 34(1): 853-862. DOI: 10. 1080/14756366. 2019. 1576657.
- [6] 文丽霞,吴正钧,郭本恒. 两种  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂体外筛选模型的改良与比较[J]. 天然产物研究与开发,

- 2015, 27(4): 681-686. DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2015. 04. 024.
- [7] 李美华,王渭清,曾阳,等. 金露梅提取物对  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和醛糖还原酶的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 470-475. DOI: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20180413.
- [8] 张兆远,阮洪生. 金荞麦根茎乙醇提取物抗氧化和对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 102-106. DOI: 10. 13412/j. cnki. zyy. 2017. 02. 028.
- [9] 刘杰,向燕茹,丁嘉瑜,等. 青钱柳抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有效成分筛选及其对 II 型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 363-365, 369. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2015. 14. 066
- [10] 扶丽君,胡明华,尹西拳,等. 青钱柳叶对糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1134-1138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2017. 06. 005.
- [11] 吴少锦,邹荣灿,焦思棋,等. 青钱柳抑制  $\alpha$ -淀粉酶活性筛选研究[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 224-227. DOI: 10. 13684/j. cnki. spkj. 2018. 05. 040.
- [12] 王建礼,杨作成,王聪,等. 槲皮素对糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(2): 135-138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 02. 013.

(收稿日期 2020-12-10)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 079 页)

# 参考文献:

- [1] 龙朝明. 三七研究综述[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(6): 502-503. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-2814. 2013. 06. 064.
- [2] 董晓强,董文天,洪霞,等. 三七、人参与西洋参化学成分与药效学之间的关系[J]. 承德医学院学报, 2011, 28(3): 307-309. DOI: 10. 15921/j. cnki. cyxb. 2011. 03. 027.
- [3] 马珍琼,普俊学,屈云莲,等. 三七总皂苷提取、分离纯化技术的研究进展[J]. 中国当代医药, 2016, 21: 19-22.
- [4] 黄梅,杨丽娟,谢丹. 三七总皂苷联合三苯氧胺对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡影响[J]. 世界中医药, 2011, 6(4): 340-342. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7202. 2011. 04. 037.
- [5] Dang KT, Nguyen TH, Nguyen TD, et al. Anticancer effects of saponin and saponin - phospholipid complex of Panax notoginseng grown in Vietnam[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2016, 6(9): 795-800. DOI: 10. 1016/j.

apjtb. 2016. 04. 013.

- [6] 刘卫里,武军宏. 乳腺癌的研究进展[J]. 社区医学杂志, 2007, 5(18): 21-21. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4208. 2007. 18. 011.
- [7] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3969. 2013. 08. 001.
- [8] 陈鹏,王志萍,李文,等. 三七总皂苷对肝癌高转移细胞 HCCLM3 的抑制作用研究[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 9: 50-51. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-2349. 2012. 09. 037.
- [9] 李晓红,董作仁,郝洪岭,等. 三七皂苷对 NB4 细胞促凝活性及诱导分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1): 63. DOI: 10. 3321/j. issn: 1003-5370. 2004. 01. 018.
- [10] 郑文球,朱敏. 三七皂苷 R1 对 HL-60 细胞凋亡及 survivin, p53 表达的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(3): 198-200. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-170X. 2007. 03. 010.

(收稿日期 2020-11-20)

(本文编辑:石俊强)