

文章编号: 1000-5862(2018)01-0100-06

诺丽果粉水溶液对 MCF-7 人乳腺癌细胞及其内源性 VEGF 影响

阚艳鹏¹ 盛占武² 申佳琦¹ 赵 帅¹ 夏栋楠¹ 符文英^{1*}

(1. 海南大学热带农林学院生物系, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院海口实验站, 海南 海口 70102)

摘要: 用诺丽冻干粉加入至不完全培养基中, 培养人乳腺癌 MCF-7 细胞, 通过 Cck-8、流式细胞术、TUNEL-DAPI 染色等方法体外实验, 比较不同处理方式下细胞的多方面生物学特性. Cck-8 检测法的结果显示, 经诺丽果粉水溶液处理细胞的 Cck-8 吸光值低于用不完全培养基培养细胞的吸光值, 并且与作用时间呈负相关性. TUNEL-DAPI 双染结果显示, 经诺丽果粉水溶液处理的细胞凋亡率高于正常培养的细胞, 并且凋亡率与浓度呈正相关性. 流式细胞术检测结果显示, 经过诺丽果粉水溶液处理的细胞在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下 24 h 即会发生早期凋亡. 酶联免疫吸附(Elisa 法)检测内源性 VEGF 含量结果显示, 经诺丽果粉水溶液处理后的细胞上清液中 VEGF 的含量: $20, 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下 VEGF 含量降低, $5, 2, 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下 VEGF 含量升高. 诺丽果粉水溶液对 MCF-7 人乳腺癌细胞系有生长抑制作用, 作用方式可能为阻碍 VEGF 与细胞结合.

关键词: 诺丽; 乳腺癌细胞; VEGF

中图分类号: R 737.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2018.01.17

0 引言

诺丽(*Morinda citrifolia* Linn), 英文名 noni, 也称为海巴戟, 茜草科, 巴戟天属植物. 诺丽含有多种有效抗癌成分, 主要为黄酮^[1-2]、萜醌^[3-4]及萜类, 有抑制癌症细胞生长的能力^[5-6]. 诺丽能抑制异常新生血管生成, 从而预防癌症^[7]. 细胞内皮生长因子(VEGF)通过血管内皮细胞表面 VEGFR2 受体激活下游信号^[8], 可诱导内皮细胞的生长、迁移和管状形成, 促进新生血管形成、提高血管通透性、满足肿瘤细胞对氧和营养的需求^[9-10]. 对 VEGF 信号通路阻碍, 是现阶段药物治疗肿瘤的一种方向^[11-13]. 目前对诺丽全果中含有的抗癌物质及其作用机制的报道较少. 本文从抗乳腺癌细胞的角度, 分析诺丽中抗癌物质引发的抗癌机制, 及其对乳腺癌细胞内源性 VEGF 的影响.

1 实验材料与方法

1.1 细胞培养

Mcf-7 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员

会上海生命科学院研究院细胞库提供. 细胞待其生长至细胞培养瓶(康宁, 美国)底 0.80 满后常规胰蛋白酶(翊圣, 中国)消化传代, 间隔 2 d 换液, 完全培养基按照 0.89 DMEM 高糖培养基(Cat No: SH30243.01 HyCloneTM)、0.10 胎牛血清(英文全称: fetal bovine serum, FBS life technologiesTM)、0.01 青-链霉素(翊圣, 中国)配制, 用 CO₂ 水套培养箱培养(赛默飞, 美国) $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ CO₂, 37 °C 培养.

1.2 含药培养基配置

称取 200 mg 诺丽全果冻干粉(万维诺丽, 中国)溶于 10 mL DMEM 不完全培养基中, 超声 30 min, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清, 无菌条件下 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜(millipore, 美国)压滤, 制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 实验时用不完全培养基稀释至所需浓度.

1.3 Cck-8 检测法

1.3.1 Cck-8 标准曲线及孵育时间的确定 将培养好的细胞胰蛋白酶消化处理后, 用完全培养基重悬. 通过细胞计数板(上海计量)计数, 分别稀释至 2.000, 1.000, 0.500, 0.250, 0.125 万个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板(康宁, 美国), 每孔加样 $100 \mu\text{L}$, 每个

收稿日期: 2017-08-06

基金项目: 国家自然科学基金(31360066)和海南省研究生创新课题(Hys2016-34)资助项目.

通信作者: 符文英(1962-), 女, 海南万宁人, 教授, 主要从事植物药理学研究. E-mail: fwynoni@163.com

浓度做 6 个平行. 空白对照为无细胞完全培养基. 在点板后放入培养箱进行正常培养. 大约 5~6 h 后, 倒置显微镜下观察细胞贴壁情况(轻轻晃动细胞培养板, 细胞不随培养液晃动, 即判定为细胞已经贴壁). 待细胞贴壁后, 移弃完全培养基, 加入事先配好的 $v(\text{Cck-8}):v(\text{不完全培养基}) = 1:11$ 的反应液, 避免加液时产生气泡. 放入 37 °C 恒温孵育, 分别在孵育 3 4 5 6 7 h 时用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值. 实验重复 3 次, 并按 $A_{\text{细胞数量}} = A_{\text{测量}} - A_{\text{空白}}$ 公式计算. 取计算值 A 为纵坐标, 细胞数量为横坐标, 做吸光值和细胞数量之间的相关性分析, 并以 r^2 和时间做相关性分析, 找出相关性最适合的孵育时间点, 为 Cck-8 对 MCF-7 细胞系最佳孵育时间点, 结果见图 1.

相关性随着时间的变化见表 1. 经 spss 20 线性回归分析, 其中 Cck-8 孵育至 6 h 时, 细胞数量与吸光度之间相关性为 $r^2 = 0.996 0$, 故本实验采纳在加入 Cck-8 后孵育 6 h 在 450 nm 处测得的吸光值.

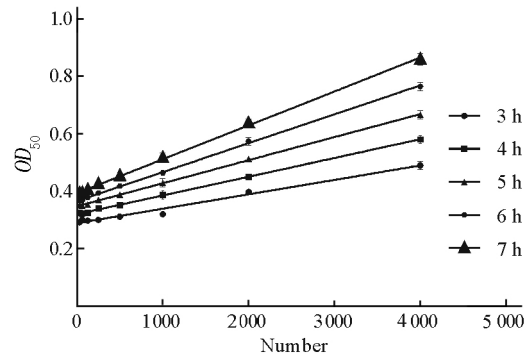


图 1 Cck-8 孵育时间曲线

表 1 Cck-8 孵育时间与吸光值相关性

孵育时长/h	3	4	5	6	7
r square	0.976 0	0.991 4	0.994 1	0.996 0	0.994 3
$Sy. x$	0.010 430	0.008 010	0.008 191	0.008 395	0.011 860

1.3.2 检测细胞存活与浓度相关性 将处在对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化处理后 $1\ 000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞. PBS(pH 值为 7.4) 清洗 2 次并离心收集, 用完全培养基重悬细胞. 细胞计数后稀释至 $3\ \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔板, 次日换为 $100\ \mu\text{L}$ 不完全培养基血清饥饿过夜. 诺丽果粉水溶液处理实验组分为 20, 10, 5, 2, 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 个浓度, 对照组为不完全培养基处理, 每个浓度做 6 副孔, 同时每个浓度做 3 孔含果粉无细胞培养基作为空白对照. 用已经饥饿处理好的细胞, 加入含果粉培养基后, 于 24 h 后, 直接向检测孔内加入 $10\ \mu\text{L}$ Cck-8 溶液, 孵育 6 h 后用酶标仪检测 450 nm 处吸光值. 细胞存活率公式为 $A = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$ [14,45].

1.3.3 Cck-8 检测细胞存活率在相同药物浓度下时间相关性 将在对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化处理后于 $1\ 000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ 速率下离心分离 5 min 收集细胞. PBS 清洗 2 次, 细胞计数板计数后, 用完全培养基重悬细胞至浓度为 $3\ \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按每孔 $100\ \mu\text{L}$, 点入 96 孔板, 培养过夜, 次日血清饥饿 24 h 后实验. 诺丽果粉水溶液实验组分为 20, 10, 5, 2, 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个浓度分别在培养 48 h 及 72 h 后, 用上述 Cck-8 法检测细胞存活率. 其中, 每个时间段每个浓度做 6 组重复, 3 孔空白对照. 于 48 h 和 72 h 后, 直接向检测孔内加入 $10\ \mu\text{L}$ Cck-8 溶液, 孵育 6 h 后用酶标仪检测 450 nm 处吸光值.

1.4 TUNEL-DAPI 细胞凋亡检测

1.4.1 细胞玻片预处理 将细胞培养玻片(15 mm nest, 中国)用 120 g 重铬酸钾、200 mL 浓硫酸(广州化学试剂厂)、400 mL 去离子水配置的溶液浸泡玻璃片, 摇床过夜. 次日, 将玻片取出, 每片玻片单独取出用去离子水正反面各冲洗 15 s, 冲洗 3 遍, 在滤纸上控干水. 用 $950\ \text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇浸泡过夜. 第 3 天, 将玻片取出, 放置于培养皿中进行高温高压灭菌, 通风晾干待用.

1.4.2 细胞 TUNEL-DAPI 染色处理 将处理好的细胞玻片放入 48 孔培养板(康宁, 美国)中. 对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化下来, PBS 清洗 2 遍, 用完全培养基重悬稀释至 $10\ \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 $500\ \mu\text{L}$ 点板, 次日换为不完全培养基血清饥饿过夜. 诺丽果粉水溶液实验组分为 1.000, 0.500, 0.250, 0.125 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对照组分为阴性对照组、阳性对照组、空白对照组. 阴性对照组染色体系中不加入 TdT 酶; 阳性对照组染色前用 DNase 处理 10 min, 后正常染色处理; 空白对照组用不完全培养基培养处理. 所有细胞爬片染色前, 用 4 °C 预冷含有 $40\ \text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醇的 PBS 冰上固定 15 min, 用 PBS 轻轻冲洗 2 次. TUNEL 染色过程及拍照方式严格参照试剂盒产品说明书, TUNEL 试剂盒、DAPI 染剂、抗荧光猝灭剂为中国翊圣制造. 每个浓度任选 8 个视野, 统计 TUNEL 阳性细胞(FTIC 显色数量)数占总细胞数(FTIC 显色数量 + DAPI 显色数量)的比值, 为细胞晚期凋亡率. 拍摄用倒置荧光显微镜为德国蔡斯

产品.

1.5 流式细胞检测

将处于对数生长期的细胞,经胰蛋白酶消化收集后,制成 $500 \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液,点于6孔细胞培养板,每板2 mL.培养过夜,待细胞贴壁,用不完全培养基饥饿24 h后,诺丽果粉水溶液实验组分为 $1.000 \text{ } \mu\text{.} 500 \text{ } \mu\text{.} 250 \text{ } \mu\text{.} 125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组为不完全培养基处理的细胞,培养24 h.用胰蛋白酶消化,吹打后制成单细胞悬液,并与原细胞培养液混合后于 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 5 min 条件下离心分离,弃上清收集细胞.用已经 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 预冷过的 PBS,清洗细胞2次后收集.用 PBS 将细胞浓度稀释至 $50 \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$.取1 mL 细胞悬液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 5 min 离心收集50万个细胞,加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 结合缓冲液重悬细胞,annexV-pi 双染色过程严格参照试剂盒说明书.染色完成后1 h内上流式细胞仪检测.检测用流式细胞仪为美国 BD 公司生产.以 FTIC 荧光强度和 PI 荧光强度,将图分为4个区域,统计 FTIC 荧光强度高,PI 荧光强度低的区域为早期凋亡区域.经 flowjo 7.6 软件统计结果.

1.6 Elisa 法检测细胞上清液 VEGF 含量

将处于对数生长期的细胞,经胰蛋白酶消化收集后,PBS 清洗2遍,按照每孔 $10 \text{万个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入96孔板中进行培养.待细胞贴壁后,弃去完全培养基,用 PBS 冲洗3遍,加入不完全培养基,进行血清饥饿24 h,诺丽果粉水溶液实验组分为 $2.0 \text{ } \mu\text{.} 1.0 \text{ } \mu\text{.} 0.5 \text{ } \mu\text{.} 0.2 \text{ } \mu\text{.} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.对照组为不完全培养基培养细胞,空白对照组为各浓度含诺丽果粉水溶液药培养基,不含细胞^[14].分别收集实验组、对照组、空白组细胞上清液 $600 \text{ } \mu\text{L}$, 10000 g 离心 5 min 后检测,每组做4个副孔^[15].检测方法参照 Eisa 人源 VEGF 试剂盒说明书. Elisa 人源 VEGF 试剂盒由中国博士德公司生产制造.

1.7 统计学处理

用 spss 20 统计软件进行处理.对数据进行单因素方差分析 $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果与分析

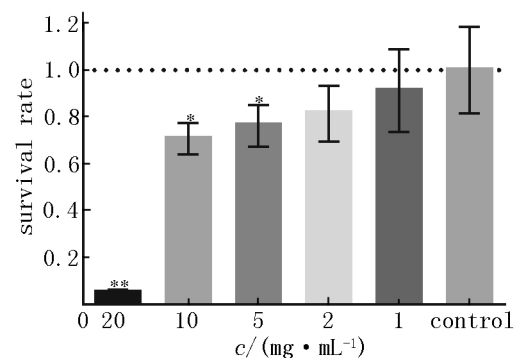
2.1 细胞形态观察

经不同剂量的诺丽果粉水溶液的培养基培养后的细胞,与不完全培养基培养的细胞(对照组)在倒置光学显微镜下观察细胞形态.在培养24 h后

$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组细胞即出现大量较为明显的皱缩形态, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组细胞出现少量细胞皱缩,大部分细胞仍具有完整细胞形态, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和对照组基本没有细胞出现皱缩现象,视野范围内所有细胞均保持完整细胞形态.培养48 h后, $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组大量细胞没有完整细胞形态, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组部分细胞呈现皱缩,部分细胞呈现完整细胞形态, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组细胞出现少量皱缩现象,对照组细胞仍保持完好的细胞形态.培养72 h后, $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组视野范围内只有极少量细胞为细胞皱缩形态,极大部分细胞已经不具有细胞形态, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组细胞出现大量皱缩现象.对照组出现极少量细胞皱缩现象.通过观察形态可知,诺丽果粉水溶液会影响乳腺癌细胞正常生长.

2.2 Cck-8 细胞活性检测

2.2.1 Cck-8 浓度相关性检测 实验结果如图2所示.结果表明经过24 h培养, Mcf-7 细胞系的存活率随诺丽果粉含量增加而降低,同空白对照组相比, $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 有极显著差异 ($p < 0.01$), $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组有显著性差异 ($p < 0.05$).诺丽果粉水溶液处理24 h $IC_{50} = (9.030 \pm 0.956) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的状态下出现部分增殖现象.实验结果说明诺丽果粉水溶液对 Mcf-7 细胞增殖具有抑制作用.

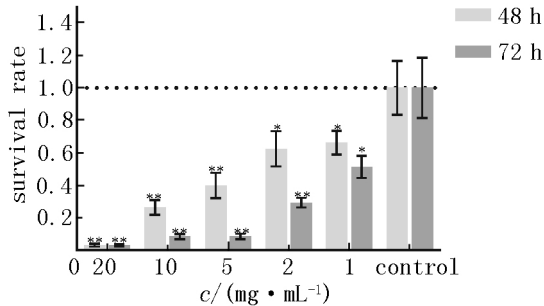


注:与空白对照组相比 * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$.

图2 Mcf-7 细胞系不同浓度下处理24 h后用 Cck-8 检测存活率的结果

2.2.2 Cck-8 时间相关性检测 实验结果如图3所示.分别经过48 h和72 h培养后,所有浓度下 Mcf-7 细胞系的存活率均随培养时间的延长而降低,诺丽果粉水溶液处理48 h $IC_{50} = (2.964 \pm 0.430) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、诺丽果粉水溶液处理72 h $IC_{50} = (0.983 \pm 0.007) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组在处理48 h时,与对照组呈

现极显著差异 ($p < 0.01$), $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组在处理 48 h 时, 与对照组呈现显著差异 ($p < 0.05$). 所有浓度均在处理 72 h 后, 与对照组呈现显著差异 ($p < 0.05$). 实验结果说明诺丽果粉水溶液对 MCF-7 细胞增殖抑制程度与处理浓度时间存在依赖性.



注: 与相同时间段空白对照组相比 * : $p < 0.05$ ** ; $p < 0.01$.

图 3 mcf-7 细胞在不同浓度下分别处理 48 h 与 72 h 后用 Cck-8 检测存活率的结果

2.3 Tunel-dapi 染色结果

实验结果如图 4 所示. 运用 ImageJ 软件统计处

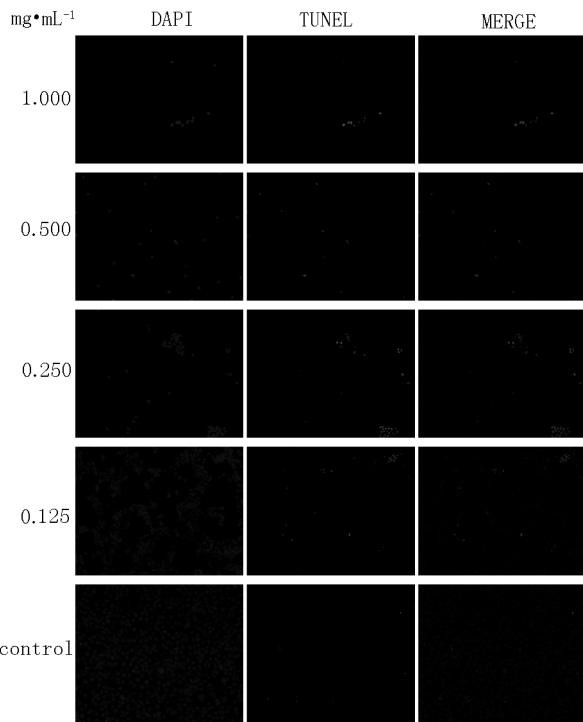


图 4 mcf-7 细胞在不同浓度下处理 24 h 后用 tunel-dapi 双染色后荧光显微镜下观察结果

理 8 个随机视野, 统计结果见表 2. $1.000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组, 均存在细胞凋亡现象, 凋亡率与浓度呈正相关. 并且存在细胞脱壁情况, 即浓度越高, 视野范围内可见细胞数量越少. 该实验结果表明, 诺丽果粉

水溶液会影响 MCF-7 细胞贴壁能力, 同时诱导细胞凋亡, 凋亡比率与浓度有关, 浓度越高凋亡比越高.

表 2 tunel-dapi 染色检测结果统计

果粉浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	视野数量	凋亡比 / %	p 值
1.000	8	18.369 ± 0.040	0.012
0.500	8	17.445 ± 0.020	0.017
0.250	8	12.792 ± 0.060	0.021
0.125	8	10.400 ± 0.080	0.053
0.000	8	9.290 ± 0.032	-

2.4 流式细胞检测

实验结果如图 5 所示. 运用 flowjo 7.6 软件统计得出, 经低浓度诺丽果粉水溶液处理的细胞会进入凋亡早期. 在 $1.000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度处理 24 h 下, 出现的早期凋亡率为 0.12. 而极低浓度 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下, 凋亡率达到 0.04. 相对于正常处理的细胞, 凋亡率也略有增长. 该实验结果表明, 诺丽果粉水溶液会诱导 MCF-7 细胞凋亡, 24 h 即发生早起凋亡, 浓度越高细胞群向晚期凋亡偏移, 凋亡比率与浓度有关, 浓度越高细胞群向晚期凋亡偏移.

2.5 上清液 VEGF 含量检测

实验结果如图 6 所示, 与对照组对比可以看出, 在 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞上清液中 VEGF 含量微量增高, $10, 5, 2, 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞上清液中的 VEGF 含量大量增长. 不同的时间点之间相互对比, 发现每个时间点, 使细胞上清液中 VEGF 含量达到峰值的浓度有所不同, 24 h 在 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 出现峰值, 48 h 在 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 出现峰值, 72 h 在 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 出现峰值. 该实验结果表明, 诺丽果粉水溶液并不会抑制细胞内源性 VEGF 产生, 在一定浓度条件下会促进细胞产生 VEGF.

3 结论

Cck-8 检测结果表明诺丽果粉水溶液含有对 MCF-7 细胞系生长抑制的成分, 具体有效成分有待后续研究. 在诺丽果粉水溶液浓度 $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的情况下, 细胞培养 24 h 即出现脱壁现象. 诺丽果粉水溶液会影响细胞贴壁粘附能力, DAPI-TUNEL 双染实验只使用了 $1.000, 0.500, 0.250, 0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4 个低于 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度. 处理浓度越高视野范围内细胞数量少. 结合流式细胞检测结果, 说

明这部分悬浮细胞脱壁后并未立即死亡.

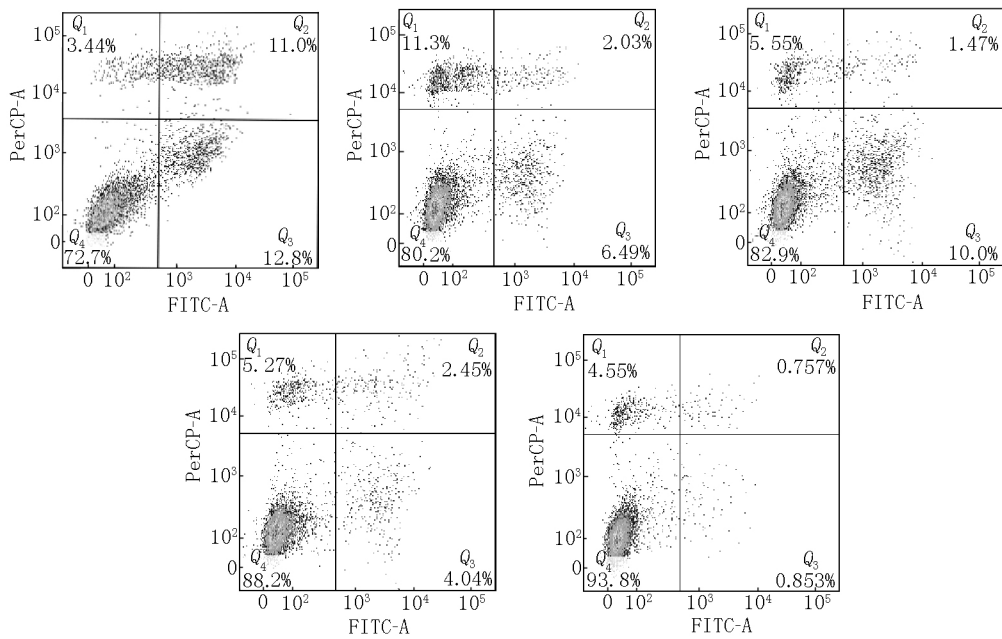
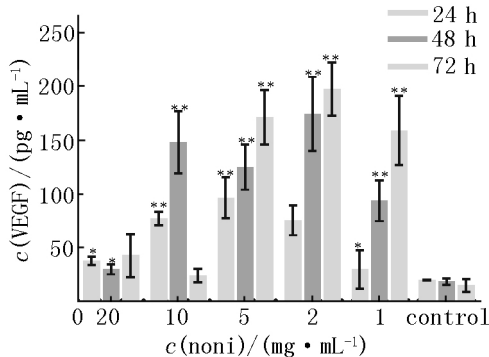


图5 AnnexV-pi 流式细胞检测结果



注: 与相同时间段空白对照组相比 * :p <0.05 **; p <0.01.

图6 Mcf-7 细胞在不同浓度下处理 24 h、48 h、72 h 后, 细胞上清液中 VEGF 的含量变化

Cck-8 检测结果显示, 诺丽果粉水溶液能抑制 Mcf-7 细胞系生长. 上清液 VEGF 含量检测结果显示, 在诺丽果粉水溶液浓度 $< 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理下, 细胞上清液中 VEGF 含量激增. 流式细胞术检测结果显示, 主要细胞在诺丽果粉水溶液浓度 $< 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理下 24 h 会进入凋亡早期. 综合以上结果分析, 高浓度诺丽果粉 ($\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理下, 细胞上清液内 VEGF 含量降低, 细胞存活率显著下降. 中低浓度诺丽果粉 ($1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理下, 细胞上清液中 VEGF 含量显著上升, 细胞存活率下降.

VEGF 在乳腺癌中高表达^[11], VEGF 可能在 leptin 介导的乳腺癌发生发展中起重要作用^[12]. 而罕见在乳腺癌细胞上清液中 VEGF 含量增加, 细胞数量减少的报道. 诺丽果粉水溶液中含有多种成分, 根据研究结果及相关文献分析, 诺丽的根中存在的

丹宁卡 (英文名: Damncanthal 结构: 2-甲基基-3-羟基-1-甲氧基-9,10 蒽醌) 能与 VEGFR2 结合, 阻断 VEGF 信号通路, 阻碍细胞内 VEGF 与细胞膜表面信号蛋白接触, 使细胞不能接收到 VEGF 信号^[2], 从而细胞不能接受到细胞上清液中 VEGF 浓度的反馈, 细胞大量分泌 VEGF, 细胞上清液 VEGF 含量增加. 但目前没有从诺丽果粉水溶液中检测出丹宁卡的报道. 引起 Mcf-7 细胞系凋亡同时大量分泌 VEGF 的成分未知, 有效成分结构及作用机制有待进一步研究.

4 参考文献

- [1] 李明, 符文英, 赵帅, 等. 海巴戟冻干粉抗氧化活性的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(23): 171-172, 177.
- [2] Deng Ye, Chin Young-won, Chai Heebyung et al. Anthraquinones with quinone reductase-inducing activity and benzophenones from *Morinda citrifolia* (noni) roots [J]. Journal of Natural Products 2007, 70(12): 49-52.
- [3] Muhammad Abdul Aziz, Abdul Omar, Tamilselvan Subramani et al. Damncanthal is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by stimulating p53 and p21 genes in MCF-7 breast cancer cells [J]. Oncology Letters, 2014, 7(5): 1479-1484.
- [4] Taşkin Elif Ilkay, Akgün-Dar Kadriye, Kapucu Ayşegül et al. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice [J]. Cell Biochemistry & Function (Online), 2009, 7

- (2): 96-97.
- [5] 黄婧婧. 海巴戟果化学成分研究及药理活性初步筛选 [D]. 北京: 协和医学院, 2011.
- [6] 黄婧婧, 董海玲, 王芳菲, 等. 海巴戟果实化学成分研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(3): 290-291.
- [7] Javier A, García-Vilas, Almudena Pino-Ángeles, et al. The noni anthraquinone damnacanthal is a multi-kinase inhibitor with potent anti-angiogenic effects [J]. Cancer Letters, 2017, 385: 1-11.
- [8] 张景华, 张德才, 何津, 等. 乳腺癌中 VEGF 基因 mRNA 的表达及其与临床病理因素的关系 [J]. 实用癌症杂志, 2011(2): 140-143.
- [9] 杨静. VEGF 靶向抗体研制及其促肿瘤分子机制探讨 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [10] 于媛. Survivin 与 VEGF-c 双靶点治疗小鼠乳腺肿瘤 [D]. 青岛: 青岛大学, 2011.
- [11] 郑艳波, 弓建华, 李毅, 等. 乌苯美司抑制肿瘤细胞侵袭与诱导凋亡的研究 [J]. 药学学报, 2012(12): 1593-1598.
- [12] 黄新苹, 林文翰, 朱校斌. 束生刚毛藻 *Cladophora fascicularis* 中三萜化合物的活性研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2016, 40(1): 89-92.
- [13] 夏想厚, 尹文娟, 谷俊朝. 乳腺癌组织 Leptin 与 VEGF 表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014(22): 1807-1811.
- [14] 盛世乐, 黄钢. VEGF 上调 survivin 和 bcl-2 表达及抑制乳腺癌细胞凋亡的机制探讨 [J]. 肿瘤, 2005(6): 525-529.
- [15] 陈明伟, 杨岚, 倪磊, 等. RG3 对人肺癌 A549 细胞及其内源性 VEGF 的影响 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2006(1): 60-62.

The Effects of Noni's Freeze-Dried Powder on Breast Cancer MCF-7 Cell Line and Endogenous VEGF by Tumor Cells

QUE Yanpeng¹, SHENG Zhanwu², SHEN Jiaqi¹, ZHAO Shuai¹, XIA Dongnan¹, FU Wenyong^{1*}

(1. Institute of Life Science, College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou Hainan 570228, China;
2. Haikou Experimental Station Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou Hainan 570102, China)

Abstract: Adding noni's freeze-dry powder into Incomplete medium to culture MCF-7 cell. This paper will compare cellular biological characteristics, including Cck-8, flow cytometry, TUNEL-DAPI staining and so on. Cck-8 assay showed that the Cck-8 absorption value of the cells treated with aqueous solution of Noni fruit powder is lower than those with incomplete cultured cell light absorption value, and it has negative correlation with time. TUNEL-DAPI double staining showed that the apoptosis rate of the normal cell apoptosis is higher than the one with Noni powder aqueous solution treatment, and the apoptosis rate was positively correlated with the concentration. Flow cytometry results showed that the cells treated with Noni powder aqueous solution in the concentration of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, would occur early apoptosis within 24 h. Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa method) to detect endogenous VEGF content showed that the content of VEGF reduced after treated in aqueous solution with Noni powder of $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, but VEGF content increased after treated in aqueous solution with Noni powder of $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentration. Noni powder solution inhibited the growth of MCF-7 human breast cancer cell, and the mechanism might be by combining suppressor cell with VEGF.

Key words: noni; MCF-7; VEGF

(责任编辑: 刘显亮)