

雌马酚抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及机制研究



王萌 任国峰¹

中南大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,长沙 410078

摘要:目的 研究雌马酚对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用并初步探讨其分子机制。方法 利用 MTT 法测定不同浓度(0.1、0.5、1.5 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 雌马酚对 MCF-7 细胞增殖率的影响,流式细胞仪测定雌马酚对细胞凋亡率和细胞周期的影响,Western blot 测定 bag-1、bcl-2、VEGF、ERK1/2、p-ERK1/2、p38 以及 p-p38 蛋白表达。结果 随着雌马酚浓度升高,人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖率下降($P < 0.05$) 细胞凋亡率升高,细胞周期被阻滞于 G_0/G_1 期,雌马酚可以下调 bag-1、bcl-2、VEGF、p-ERK1/2 以及 p-p38 蛋白表达,并具有一定剂量-效应关系。结论 雌马酚可以通过促进细胞凋亡并阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期,以及下调 bag-1、bcl-2、VEGF 蛋白、抑制 ERK1/2 和 p38 蛋白磷酸化的方式实现对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制。

关键词: 雌马酚 凋亡 乳腺癌 p38

中图分类号: R737.9 Q946.885

文献标志码: A

Study on the inhibiting effects of equol on MCF-7 cells proliferation and its molecular mechanisms

WANG Meng, REN Guofeng

Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China

Abstract: Objective To investigate the proliferation inhibition effects of equol on human breast cancer cell line MCF-7 and explore its molecular mechanisms. **Methods** MCF-7 cells were treated with different concentration of equol, including 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$. After the treatment, the proliferation rate of cells was examined by MTT method and the cell apoptosis percentage and cell cycle phase were determined by flow cytometry. The bag-1, bcl-2, VEGF, ERK1/2, p-ERK1/2, p38 and p-p38 protein were determined using Western blotting. **Results** A dose and time effect of proliferation inhibition of equol was proved in MCF-7. The MCF-7 cell apoptosis percentage increased significantly in the groups of equol, and the cell cycle arrest in G_0/G_1 phase. The expression of bag-1, bcl-2, VEGF, p-ERK1/2 and p-p38 protein were decreased gradually with the increase concentration of equol. **Conclusion** The equol could inhibit the proliferation of the breast cancer cell lines MCF-7 and its inhibitory effect may be due to inducing apoptosis, arresting the cell cycle in G_0/G_1 phase, down-regulating the expression of bag-1, bcl-2, VEGF, p-ERK1/2 and p-p38 protein.

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30500407)

作者简介: 王萌,女,硕士研究生,研究方向: 营养与慢性病预防, E-mail: znxywm@163.com

¹ 通信作者: 任国峰,男,副教授,硕士生导师, E-mail: renguofeng@csu.edu.cn

Key words: equol , apoptosis , breast cancer , p38

乳腺癌的女性癌症死亡率最高,在所有癌症和因癌症死亡的病例中分别占 23% 和 14%^[1]。在美国,几乎每年 20 万人被诊断为乳腺癌,在我国,全国肿瘤登记地区恶性肿瘤中,乳腺癌占女性恶性肿瘤的第一位^[2]。膳食植物雌激素可以降低乳腺癌发病风险,其中,大豆饮食对乳腺癌发病的危险度为 0.86^[3]。雌马酚作为大豆异黄酮中主要成分大豆苷元的代谢终产物,具有多种生物学活性,如雌激素、抗雌激素双重作用、抗氧化、抗抑郁以及抗肿瘤作用。有研究证明,大豆苷元和雌马酚对人乳腺癌细胞 MCF-7 裸鼠移植瘤活性的抑制作用高于染料木黄酮和他莫昔芬,并且可以明显促进肿瘤细胞凋亡,表现出抗肿瘤的潜力^[4],但并未对雌马酚的作用机制进行探讨,因此,本实验拟用各浓度雌马酚处理人乳腺癌细胞 MCF-7,观察其对细胞增殖的抑制作用并对其可能的分子机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

雌马酚(纯度为 99%)购自 LC Labs;雌二醇、噻唑蓝(MTT)均购自 Sigma;灭活胎牛血清购自北京鼎国、0.25%胰蛋白酶、蛋白酶抑制剂、二甲基亚砷(DMSO)均购自 Amresco;RPMI-1640 培养基购自 Gibco;无酚红去雌激素 RPMI-1640 培养基购自迈晨科技有限公司;Anti-p38 单克隆抗体、Anti-p38 单克隆抗体均购于 Santa Cruz、Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒购自晶美;人乳腺癌细胞 MCF-7 购自中南大学。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞接种于含 10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养,每 1~2 天换培养液一次。当细胞生长到足以覆盖瓶底壁的大部分表面时(大约 4 d 可形成 90%~95% 细胞汇合的单层细胞),用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。加入受试物前 5 d 将细胞用 PBS 冲洗后改用无酚红去雌激素 RPMI-1640 培养基继续培养。

1.2.2 细胞接种 取经无酚红去雌激素 RPMI-1640 培养基培养的对数生长期 MCF-7 细胞,用 0.25% 胰酶消化,台盼兰染色后用细胞计数板计算细胞浓度,根据结果调整细胞浓度,每孔 100 μl (约含 1000 个细胞)培养于 96 孔培养板内,置 37℃、

5% CO₂ 温箱中培养。每组设置 6 个平行样本。

1.2.3 MTT 实验 将在无酚红去雌激素 RPMI-1640 培养基中培养 5 d 并消化吹打好的 MCF-7 细胞悬液接种于 96 孔板中,接种数量为 5000 个/孔,每孔 200 μl,设雌马酚组(0.1、0.5、1、5 和 10 μmol/L)、溶剂对照组(0.1% DMSO)和 E₂ 阳性对照组(0.001 μmol/L 雌二醇)。称取 242 μg 雌马酚溶于 10 ml DMSO,充分溶解 1 h,配制成原液(100 μmol/L),过滤除菌,-20℃保存,待用时按各处理组浓度分别进行稀释。处理后放置在 37℃ CO₂ 培养箱中继续培养 24、48 和 72 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,37℃ 避光孵育 4 h,终止培养,小心吸去每孔内培养上清液,每孔加入 150 μl DMSO 显色,在振荡器上振荡 10 min,使甲瓚充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,计算增殖率。

1.2.4 雌马酚对人乳腺癌细胞 MCF-7 的影响

1.2.4.1 分组 取对数期细胞制成单层悬液,接种于 6 孔板内,设雌马酚组、溶剂对照组和 E₂ 阳性对照组,每组设 6 个平行孔,处理 48 h 后进行检测。

1.2.4.2 流式细胞仪检测 在消化、离心、固定后,将细胞数量调整为 5 × 10⁶ 个/孔,移至新 EP 管,每管加 1 ml 预冷的 PBS 离心。

①每管加 400 μl PBS,检测细胞周期,并利用 Phoenix Flow Systems 公司 MCYCLE 11.0 分析软件进行分析。

②弃上清,将细胞悬浮于 200 μl 结合缓冲液(按照试剂盒中说明将缓冲液与去离子水 1:3 混合)后,移至流式管。将两种细胞分别分为 4 管:空白、只加荧光 Annexin、只加 PI、两者都加。两组对照组和雌马酚组每管加入 10 μl Annexin FITC 和 5 μl PI,轻轻摇匀,室温避光反应 25 min。最后,每管加入 200 μl PBS 立即上机检测。光源为 488 nm 氩离子激光器,受到激发后,FITC 发绿色荧光,PI 发红色荧光,检测细胞凋亡。

1.2.4.3 Western blot 检测 将样品进行预处理后,测定各组蛋白质含量,从而确定样品上样浓度,最后用 Western blot 凝胶电泳测定 bag-1、bcl-2、VEGF、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38 蛋白表达。

1.3 统计学分析

结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,P 值取双侧检验概率,显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法测定细胞增殖率

由表 1 可知,与两个对照组相比,分别作用 24、48 和 72 h 时,各浓度组雌马酚均可抑制人乳

腺癌细胞 MCF-7 增殖,且不同时间和浓度之间存在交互作用($F = 26.679, P = 0.000$)。随着雌马酚浓度不断升高,其对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用也越明显,具有一定的剂量-效应关系。

表 1 MTT 法测量各组 MCF-7 细胞增殖率
Table 1 The proliferation rate of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	雌马酚/($\mu\text{mol/L}$)	24 h	48 h	72 h
溶剂对照组	0	100	100	100
E ₂ 阳性对照组	0	107.74 \pm 1.64 ⁽¹⁾	116.93 \pm 1.05 ⁽¹⁾	126.46 \pm 1.57 ⁽¹⁾
雌马酚组	0.1	94.69 \pm 3.92 ^(1 2)	91.20 \pm 1.37 ^(1 2)	75.80 \pm 1.88 ^(1 2)
	0.5	89.83 \pm 3.26 ^(1 2)	86.30 \pm 1.03 ^(1 2)	68.72 \pm 1.48 ^(1 2)
	1	86.51 \pm 4.27 ^(1 2)	77.68 \pm 3.99 ^(1 2)	61.91 \pm 1.33 ^(1 2)
	5	85.11 \pm 4.71 ^(1 2)	66.70 \pm 1.46 ^(1 2)	57.43 \pm 2.53 ^(1 2)
	10	78.26 \pm 5.56 ^(1 2)	57.45 \pm 2.59 ^(1 2)	47.43 \pm 2.62 ^(1 2)

注: (1) 与溶剂对照组相比, $P < 0.05$; (2) 与 E₂ 阳性对照组相比, $P < 0.05$

2.2 雌马酚对细胞凋亡和细胞周期的影响

进 MCF-7 细胞早期凋亡,还可以促进其晚期凋

2.2.1 雌马酚对细胞凋亡的影响 由表 2 可知,与两个对照组相比,各组浓度雌马酚不仅可以促

亡,并具有一定的剂量-效应关系。

表 2 各组 MCF-7 细胞凋亡率
Table 2 The apoptosis percentage of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	雌马酚/($\mu\text{mol/L}$)	早期凋亡	晚期凋亡
溶剂对照组	0	9.147 \pm 0.606	8.790 \pm 0.517
E ₃ 阳性对照组	0	3.083 \pm 0.647 ⁽¹⁾	2.633 \pm 0.529 ⁽¹⁾
雌马酚组	0.1	11.563 \pm 0.244 ^(1 2)	11.753 \pm 1.122 ^(1 2)
	0.5	13.067 \pm 0.715 ^(1 2)	14.773 \pm 0.492 ^(1 2)
	1	14.580 \pm 0.547 ^(1 2)	18.257 \pm 1.099 ^(1 2)
	5	16.363 \pm 0.572 ^(1 2)	22.560 \pm 0.803 ^(1 2)
	10	17.757 \pm 0.581 ^(1 2)	27.947 \pm 0.955 ^(1 2)

注: (1) 与溶剂对照组相比 $P < 0.05$; (2) 与 E₂ 阳性对照组相比 $P < 0.05$

2.2.2 雌马酚对细胞周期的影响 由图 1 可知,与两组对照组相比,各浓度雌马酚 G₀/G₁ 期细胞明显增多, S 期细胞比例下降,表现出 G₀/G₁ 期阻滞。浓度为 1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的雌马酚可使 G₂M 期细胞比例下降,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

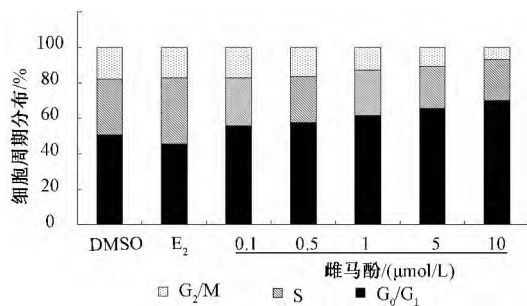


图 1 雌马酚对 MCF-7 细胞周期的影响

Figure 1 The effects of equol on MCF-7 cell cycle phase

2.3 雌马酚抑制 MCF-7 细胞增殖作用的机制

2.3.1 雌马酚对 bag-1、bcl-2、VEGF 蛋白水平的

影响 由图 2 可见,与两个对照组相比,各浓度雌马酚均可抑制 bag-1、bcl-2、VEGF 蛋白的表达,且随着雌马酚浓度不断升高抑制作用越发明显,当雌马酚浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, bag-1、bcl-2、VEGF 蛋白的表达量与对照组相比最低。

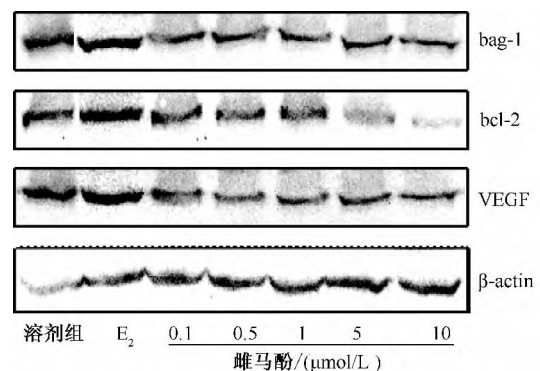


图 2 雌马酚对 bag-1、bcl-2、VEGF 蛋白水平的影响

Figure 2 The effects of equol on bag-1, bcl-2, VEGF protein

2.3.2 雌马酚对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 由图 3 可见,与两个对照组相比,雌马酚对总 ERK1/2 蛋白表达无影响,各浓度雌马酚均可下调 p-ERK1/2 蛋白表达,且随着雌马酚浓度不断升高 p-ERK1/2 蛋白表达量逐渐降低。

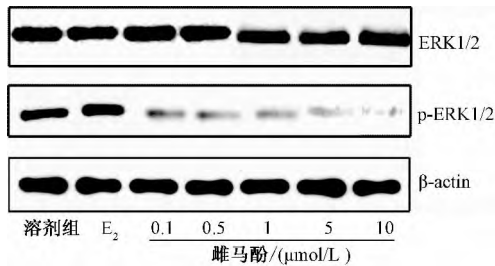


图 3 ERK1/2 及磷酸化 ERK1/2 蛋白表达量
Figure 3 The effects of equol on ERK1/2 and p-ERK1/2 protein

2.3.3 雌马酚对 p38、p-p38 蛋白表达的影响 由图 4 可见,雌马酚对总 p38 蛋白的表达无影响;与两个对照组相比,雌马酚可以下调 p-p38 蛋白表达,且随着雌马酚浓度不断升高 p-p38 表达量逐渐降低。

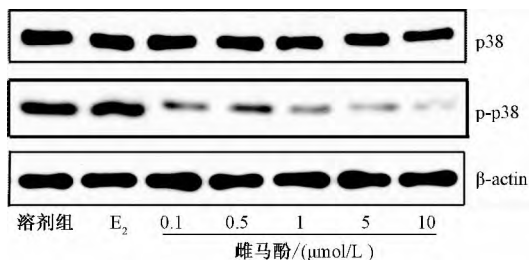


图 4 p38 及磷酸化 p38 蛋白表达量

Figure 4 The effects of equol on p38 and p-p38 protein

3 讨论

流行病学研究显示,在亚洲人群中,雌马酚有降低乳腺癌发病风险的趋势^[5],作为植物雌激素的雌马酚具有雌激素和抗雌激素双重作用,这取决于内源性雌激素的含量,当内源性雌激素水平较低时,雌马酚可以与雌激素受体(ER)结合,发挥雌激素作用,而当内源性雌激素水平较高时,雌马酚可以与 ER 竞争性结合,减弱靶细胞对雌激素的应答,防治雌激素依赖性疾病。雌马酚可以减轻雌激素的促细胞增殖作用,降低与雌激素有关的癌症发病风险,也是由于其发挥了抗雌激素作用,可以竞争性结合 ER,减少雌激素与受体结合的机会^[6-7]。本实验说明,雌马酚可以抑制乳腺癌细胞增殖,一方面可能是由于雌马酚发挥了抗雌激素作用,另一方面也由于雌马酚具有促凋亡作用。

关于雌马酚是否可以诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡说法不一,有实验表明雌马酚可以诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡^[8],但是有的实验却发现雌马酚可以促进 MDA-MB-231 细胞凋亡,而并非 MCF-7 细胞^[9]。本实验表明,雌马酚在浓度为 0.1 ~ 10 μmol/L 范围内,可以显著促进 MCF-7 细胞凋亡,用雌马酚作用于人乳腺癌细胞 MCF-7 时,出现 G₀/G₁ 期阻滞,而 S 期和 G₂M 细胞比例的下降也提示 G₀/G₁ 期细胞向 S 期进展时出现了阻滞现象,这与 CHOI 等^[10]的研究结果相一致。以上结果均提示,雌马酚可以通过阻滞细胞 G₀/G₁ 期,使其不能进入 S 期和 G₂M 期进行细胞复制和分裂来实现对细胞增殖的抑制。

Bag-1 基因全称 Bcl-2 结合抗凋亡基因,其分泌蛋白是独立于 Bcl-2 家族的 bcl-2 结合蛋白,能够正调节 bcl-2 的抗细胞凋亡作用,bag-1 表达与 bcl-2 高度正相关^[11],并且 bag-1 的高表达预示着乳腺癌预后不良和局部复发的可能性^[12]。VEGF 在良、恶性乳腺病变的阳性表达率有显著差别,且与病理组织分级、TNM 分期、腋淋巴结转移密切相关,分期级别越高 VEGF 阳性表达率越高^[13]。下调 VEGF 的表达可以抑制乳腺癌的生长^[14]。本实验表明,植物雌激素雌马酚可以明显下调 bcl-2、bag-1 和 VEGF 蛋白的表达,且均具有剂量依赖关系,说明雌马酚可以通过促进 MCF-7 细胞凋亡和下调 VEGF 蛋白表达的方式抑制肿瘤细胞增殖。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,MAPK 通路是细胞内重要的信号传导途径,在细胞的恶性转化和肿瘤的发生发展中起重要作用。ERK1/2 和 p38 都属于 MAPK 亚家族,在细胞凋亡、细胞因子产生、转录调节及细胞骨架识别中起重要作用,ERK1/2 在乳腺癌细胞中被明显激活,其表达高于乳腺良性病变组织和正常组织。p38 信号通路通过调控 VEGF 的表达促进肿瘤侵袭转移,在乳腺浸润性导管癌中可能起协同作用^[15-16]。本实验结果显示,低浓度的雌马酚即可抑制 ERK1/2 和 p38 蛋白磷酸化,且存在剂量依赖趋势,说明雌马酚可以阻断 ERK1/2 和 p38MAPK 信号转导通路,使其处于抑制状态,从而抑制肿瘤细胞增殖。

参考文献

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global

- cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61 (2): 69-90.
- [2] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国 2009 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(1): 2-12.
- [3] TROCK B J, HILAKIVI-CLARKE L. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk [J]. *J Natl Cancer Inst* 2006 98(7): 459-471.
- [4] LIU X, SUZUKI N, SANTOSH L Y, et al. Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents [J]. *Life Sci*, 2012, 91(11-12): 415-419.
- [5] LAMPE J W. Emerging research on equol and cancer [J]. *Nutr*, 2010, 140(7): 1369S-1372S.
- [6] PUGAZHENDHI D, WATSON K A, MILLS S, et al. Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *J Endocrinol*, 2008, 197(3): 503-515.
- [7] KANG H J, ANSBACHER R, HAMMOUD M M. Use of alternative and complementary medicine in menopause [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002, 79(3): 195-207.
- [8] 李伟,丁明,张玉梅,等. 雌马酚对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响[J]. *中国食物与营养*, 2010, 19(7): 64-66.
- [9] CHOI E J, KIM T. Equol induced apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 but not MCF-7 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2008, 1(2): 239-244.
- [10] CHOI E J, AHN W S, BAE S M. Equol induces apoptosis through cytochrome c-mediated caspases cascade in human breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 177(1): 7-11.
- [11] LIU H Y, WANG Z M, BAI Y, et al. Different BAG-1 isoforms have distinct functions in modulating chemotherapeutic-induced apoptosis in breast cancer cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(2): 235-241.
- [12] MILLAR E K, ANDERSON L R, MCNEI C M, et al. BAG-1 predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in ER-positive invasive ductal carcinoma of the breast [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(1): 123-133.
- [13] 刘崇梅,李岳,林明晖,等. VEGF 在乳腺癌中的表达及其与 ER、PR 的相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(3): 527-529.
- [14] BRAICU C, GHERMAN C D, IRIMIE A, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(1): 632-637.
- [15] FENG Y, HU J, MA J, et al. RNAi-mediated silencing of BEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, BEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced ERK, p38 and AKT signaling pathways [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(15): 2353-2363.
- [16] 韩艳春,刘鲁英,张骞,等. 乳腺癌组织中 VEGF-C 和 p38MAPK 的表达及与伴淋巴结转移的关系[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2013, 22(1): 20-24.

收稿日期: 2013-06-08

《卫生研究》编辑委员会

(按汉语拼音序)

名誉主任	葛可佑										
主任	陈君石										
委员	白雪涛	蔡琳	曹佳	曹兆进	常元勋	陈炳卿	陈君石	陈西平	陈学敏	程锦泉	程书均
	程义勇	段国兴	郭红卫	郭新彪	韩驰	郝卫东	胡东生	季成叶	金水高	金泰虞	金银龙
	兰亚佳	李德鸿	李洪源	李立明	李涛	李勇	李凤琴	梁超轲	林少彬	凌文华	刘秉慈
	刘殿武	刘沛	刘小立	刘秀梅	马爱国	马冠生	牛侨	戚其平	秦立强	宋伟民	孙长颢
	孙秀发	孙贵范	王五一	王心如	王振刚	王竹天	邬堂春	吴逸明	吴永宁	徐东群	徐贵发
	徐海滨	薛彬	严卫星	杨克敌	杨晓光	杨月欣	叶冬青	荫士安	于雅真	翟成凯	翟凤英
	张朝武	张德兴	张国雄	张立实	张天宝	张祥宏	赵景波	张万起	张遵真	郑玉新	庄志雄