

白藜芦醇对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响 *

王毅铮^{1,2} 臧照辉¹ 牛秀琰¹ 张 岭¹ 王 越¹ 陈 虹^{1,2△}

(1 武警医学院 天津 300162 2 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室 天津 300162)

摘要 目的 研究白藜芦醇体外活性,确定它的植物雌激素作用。方法 采用 MTT 法观察不同浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞增殖作用的影响。采用 DNA ladder 法和荧光显微镜观察高浓度白藜芦醇对细胞的影响。免疫组化法观察低浓度白藜芦醇对核增殖抗原 PCNA 表达的影响。结果 MTT 结果显示白藜芦醇高浓度抑制 MCF-7 细胞增殖,IC₅₀ 为 8.70×10^{-5} mol/L,低浓度 ($10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/L) 则对细胞有促增殖作用,最高促增殖浓度为 1.0×10^{-7} mol/L。DNA ladder 和荧光显微镜可观察到高浓度白藜芦醇作用后细胞典型的凋亡形态。免疫组化结果显示低浓度白藜芦醇作用后,细胞核内 PCNA 表达明显增加 ($P < 0.05$)。结论:高、低浓度的白藜芦醇对 MCF-7 细胞分别表现为诱导凋亡和促增殖作用,呈现出植物雌激素对 MCF-7 细胞典型的双向调节作用。

关键词 植物雌激素;白藜芦醇;MCF-7 细胞;增殖

中图分类号 R737.9 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)12-2254-04

Effects of Resveratrol on Proliferation of MCF-7 Cells in Breast Cancer*

WANG Yi-zheng^{1,2}, ZANG Zhao-hui¹, NIU Xiu-long¹, ZHANG Ling¹, WANG Yue¹, CHEN Hong^{1,2△}

(1 Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, 300162, Tianjin, China; 2 Tianjin Key Laboratory of Biomarkers for Occupational and Environmental Hazard, 300162, Tianjin, China)

ABSTRACT Objective: Our goals were to examine the phytoestrogen-like effect of Resveratrol (RES) using in vitro tests. **Methods:** Effects of RES on proliferation of MCF-7 cells were detected by MTT test. The fluorescent microscopes by the staining of Hoechst 33342 and DNA gel electrophoresis analysis were used to determine the effects of MCF-7 cells by RES. Immunohistochemistry was used to assess PCNA expression. **Results:** A MTT test and growth curve showed that the proliferation of MCF-7 cells was inhibited by a high concentration of RES, and that its IC₅₀ was 8.70×10^{-5} mol/L. However, RES induced the proliferation of MCF-7 cells at $10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/L, and resulted in a peak proliferation at 1.0×10^{-7} mol/L. After the cells were treated with high concentrations RES, morphological characteristic of apoptosis was detected. Agarose gel electrophoresis showed typical DNA ladder. The expression of PCNA was increased after treated with low concentrations of RES. **Conclusions:** These results suggest that RES had a dual regulatory effect on MCF-7 cells.

Key words: Phytoestrogen; Resveratrol; MCF-7 cell; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2254-04

前言

植物雌激素(phytoestrogen, PE)是指一类非甾体植物来源的具有雌激素活性的化合物。其通过与甾体雌激素受体以低亲和度结合而发挥弱的雌激素样效应^[1]。体外实验证实,植物雌激素是一类生物活性较弱的雌激素,它们与哺乳动物的 ER 的结合能力很低,且不同植物雌激素与 ER 结合的亲和力也不同^[2]。植物雌激素具有雌激素激动剂和阻断剂效应,对于妇女绝经后因雌激素减少引起的一些疾病以及激素相关疾病有较好的预防和治疗作用^[3-6]。

白藜芦醇(Resveratrol, RES),又名 3,5,4'-三羟基二苯乙烯(图 1),是一种结构类似雌激素己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)的天然多酚类化合物,广泛存在于葡萄、花生、虎杖等植物中。流行病学研究及大量的实验结果均表明:白藜芦醇具有多种医疗保健作用,如抗血小板聚集、抗人体低密度脂蛋白氧

化、降血脂、防癌抗癌、抗过敏、消除自由基、消炎、改善微循环、保肝利肝等作用^[7-11]。最近,白藜芦醇的雌激素样作用颇受关注。本文对白藜芦醇体外活性及其植物雌激素作用,以及作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与试剂

人乳腺癌细胞 MCF-7 由中国医学科学院协和医科大学药物研究所药理室提供。白藜芦醇(纯度 95%) (中国药品生物制品检定所),雌二醇、MTT、DMSO (美国 Sigma),枸橼酸他莫昔芬(扬子江药业集团有限公司),RMPH1640、无酚红 RMPH1640、Hoechst 33342、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),活性碳-葡聚糖处理的胎牛血清(CDT-FBS) (美国 Hyclone 公司),PCNA 抗体及免疫组化试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 细胞接种于含 10%胎牛血清,100U/mL 青霉

* 基金项目 武警医学院青年基金项目(WYQ201003)

作者简介 王毅铮(1982),女,硕士,讲师,主要研究方向 肿瘤药理

△通讯作者 陈虹,电话 022-60578193, E-mail: chen hongtian06@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-01-04 接受日期 2011-01-26)

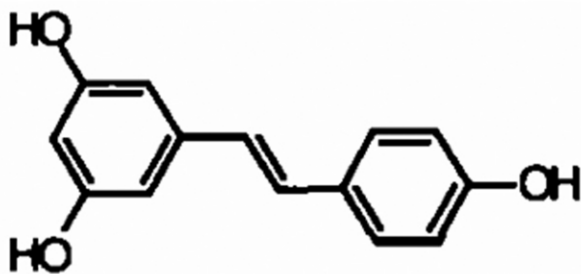


图1 白藜芦醇化学结构式

Fig. 1 The structure of RES

素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 将培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C、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, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代。细胞于加药前 2 天换用无酚红 RPMI1640 培养基 (内含 5% CDT-FBS) 继续培养, 以耗尽细胞内储存的雌激素。

1.2.2 实验分组 将各受试药物用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解后, 以培养基稀释成所需浓度: 溶剂对照组 (DMSO): 体积含量比 $\leq 0.5\%$ 雌二醇对照组 (E₂): 1.0×10^{-9} mol/L 他莫昔芬对照组 (TAM): 1.0×10^{-7} mol/L; 白藜芦醇组 (RES) 0.5, 1.0×10^{-4} mol/L, 0.5, 1.0, 2.0×10^{-7} mol/L。

1.2.3 MTT 试验 取经无酚红 RPMI1640 (内含 5% CDT-FBS) 培养的对数生长期 MCF-7 细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔 100 μ l (约含 1000 个细胞), 置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 温箱中培养。次日, 给药组加入含有不同浓度的白藜芦醇及对照药物 (E₂、TAM), 每组至少设 3 个平行孔。溶剂对照组加入与给药组等体积的溶剂。置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 温箱中培养。48h 后弃培养液, 每孔加 50 μ l 1mg/mL MTT 溶液 (未加血清的无酚红 RPMI1640 培养基配制)。37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l 溶解甲紫颗粒, 轻度振荡使之溶解。用酶标仪, 在检测波长 490nm 条件下测定光密度值 (OD), 以溶剂对照处理的细胞为对照组, 用下面公式计算药物对细胞的增殖 / 抑制率, 并计算 PR/IC₅₀ 增

殖率 = (给药组平均 OD 值 - 对照组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值) $\times 100\%$; 抑制率 = (对照组平均 OD 值 - 给药组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值) $\times 100\%$ 。每一实验重复 3 次。

1.2.4 荧光染色法检测 MCF-7 细胞凋亡 高浓度的白藜芦醇作用于 MCF-7 细胞 48h 后, 加入 Hoechst33342 (终浓度为 10 μ g/L), 37 $^{\circ}$ C 染色 5~10min, 水冲净, 晾干后以 340nm 紫外光激发 Hoechst, 观察并照像。

1.2.5 白藜芦醇对 MCF-7 细胞染色体 DNA 断裂的影响 收集高浓度白藜芦醇作用 48h 后的 MCF-7 细胞, 用磷酸 - 柠檬酸缓冲液抽提富集小分子量 DNA, 1.5% 琼脂糖电泳, 并在凝胶系统下观察。

1.2.6 免疫组化法检测白藜芦醇对 MCF-7 细胞的促增殖作用 取对数生长期的 MCF-7 细胞接种于内置有盖玻片的六孔板中, 给药组加入含有不同浓度的白藜芦醇, 空白对照组加入 0.1% DMSO。作用 48h 后取出盖玻片, 晾干, 固定。按照免疫组化试剂盒操作, DAB 试剂盒显色。分析软件计算各条带的光密度值。

1.2.7 统计学分析 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

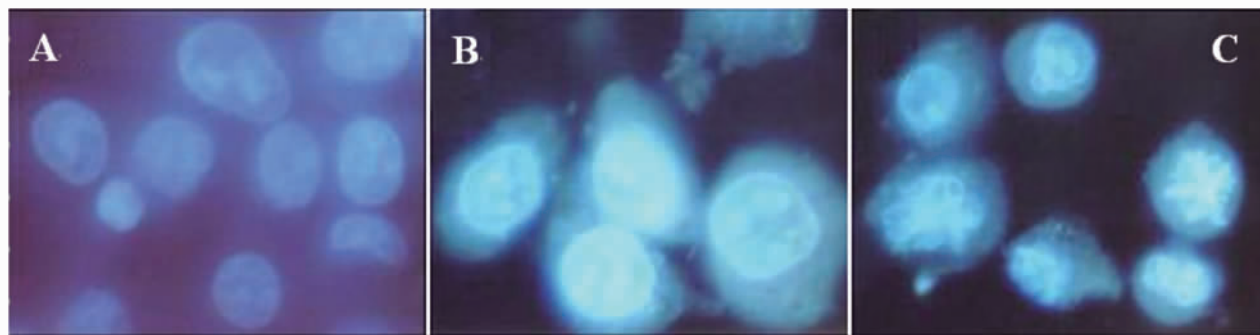
2 结果

2.1 白藜芦醇对 MCF-7 细胞生长的影响

高浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞有生长抑制作用, 其 IC₅₀ 为 8.70×10^{-5} mol/L; 低浓度 (10^{-7} ~ 10^{-6} mol/L) 则对细胞有促增殖作用, 最高促增殖浓度为 1.0×10^{-7} mol/L。

2.2 荧光法检测高浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞形态的影响

高浓度白藜芦醇作用于 MCF-7 细胞 48h 后, Hoechst33342 染色结果显示凋亡细胞核呈强亮的蓝色荧光, 核固缩, 染色体 DNA 断裂, 聚集成细小的凝聚块 细胞膜皱褶。随着药物浓度的加大, 镜下凋亡细胞比例逐渐增加, 并可见到凋亡小体。正常细胞仅呈微弱荧光。(图 2)

A: 0.1% DMSO; B: 0.5×10^{-4} mol/L RES; C: 1.0×10^{-4} mol/L RES图2 荧光显微镜下观察高浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞的作用 ($\times 400$)Fig. 2 Nuclear morphological appearance changes of MCF-7 cells treated with high concentrations RES by fluorescence microscope detection ($\times 400$)

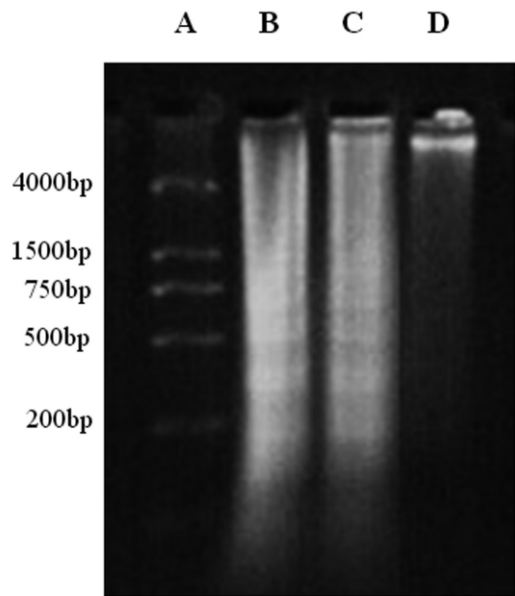
2.3 DNA 凝胶电泳分析

高浓度白藜芦醇作用于细胞后, 琼脂糖凝胶电泳可观察到典型的“DNA 梯子”样条带, 并呈一定的剂量依赖性。(图 3)

2.4 白藜芦醇对 MCF-7 细胞中 PCNA 表达的影响

与溶剂对照组比较, MCF-7 细胞经 0.5 ~ 2.0×10^{-7} mol/L 白藜

芦醇作用 48h 后, 位于胞核的 PCNA 阳性颗粒明显增多, 软件分析结果显示, PCNA 表达的阳性率, 白藜芦醇 1.0×10^{-7} mol/L 组为 0.272, 对照组为 0.087, 加药组 MCF-7 细胞 PCNA 表达较对照组显著增加 ($P < 0.05$)。表明低浓度的白藜芦醇通过上调 PCNA 的表达而发挥对 MCF-7 细胞的促增殖作用。(图 4)



A: Mark; B: 1.0×10^{-4} mol/L RES; C: 0.5×10^{-4} mol/L RES; D: 0.1% DMSO

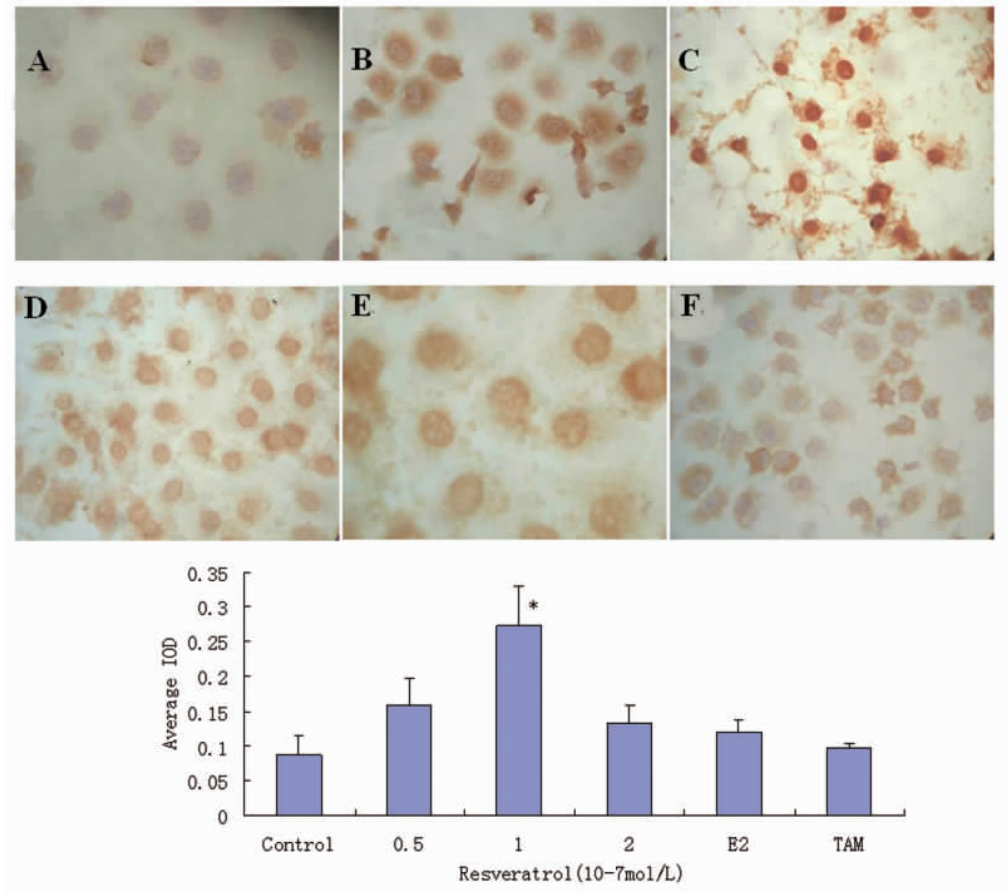
图3 高浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞染色体 DNA 断裂的影响

Fig.3 Electrophoresis analysis of apoptosis in MCF-7 cells treated with high concentrations RES

3 讨论

植物雌激素一方面可与内源性雌激素竞争性结合 ER, 减弱了靶细胞对雌激素的应答, 而起到了抗雌激素作用。另一方面, 植物雌激素对 ER β 的亲合力远高于 ER α ^[12-14], ER β 与其结合后, 通过靶基因上的 AP1 反应元件以与 ER α 相反的介导模式影响 ER 介导的靶基因转录活性, 即抑制其转录。本文观察了白藜芦醇对 ER α 和 ER β 阳性的 MCF-7 细胞生长曲线的影响, 发现白藜芦醇高浓度组抑制 MCF-7 细胞的生长, 而低浓度组则对 MCF-7 细胞有明显的促增殖作用。在 1.0×10^{-4} mol/L~ 1.0×10^{-5} mol/L 范围内, 随着药物浓度的增大对细胞的抑制作用也越显著, IC₅₀ 为 8.70×10^{-5} mol/L; 而白藜芦醇在 1.0×10^{-7} mol/L 处达到增殖最高峰。由此提示白藜芦醇具有植物雌激素特有的双向调节特性。同时, 高浓度白藜芦醇作用细胞后, 荧光显微镜下可见核染色质聚集、边移、碎裂等典型的凋亡细胞形态, 在 DNA 琼脂糖凝胶电泳中也观察到了典型的 "DNA ladder"。以上结果说明高浓度白藜芦醇通过诱导 MCF-7 细胞凋亡而抑制其增殖。

PCNA 又称为周期蛋白, 是 DNA 多聚酶 δ 辅助蛋白, 是 DNA 合成不可缺少的因子^[15-17]。它是一种核内蛋白质, 在细胞核内阳性表达的高低与细胞增殖活性密切相关^[18,19], 是反映细胞增殖活性的良好指标^[20]。免疫组化实验结果显示, MCF-7 细胞经低浓度白藜芦醇作用后, 上调了 PCNA 的表达, 且在 1.0×10^{-7} mol/L 该浓度下作用效果最为明显, 与 MTT 实验结



A: 0.1% DMSO; B: 0.5×10^{-7} mol/L RES; C: 1.0×10^{-7} mol/L RES; D: 2.0×10^{-7} mol/L RES; E: 1.0nmol/L Estradiol; F: 2.0×10^{-7} mol/L TAM (Note: n=3, compared with control group; *P<0.05)

图4 免疫细胞化学法检测低浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞 PCNA 表达的影响 ($\times 400$)

Fig. 4. Effect of RES on PCNA protein expression in MCF-7 cells by immunohistochemistry ($\times 400$)

果一致,充分说明白藜芦醇通过调节 PCNA 的表达,促进细胞 DNA 复制,进而推动细胞进程。

由此可见,白藜芦醇对 MCF-7 细胞具有双相调节作用,表现出植物雌激素的特性,且作为天然中草药提取物,具有一定的开发前景。

参考文献(References)

- [1] Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 83(1-5): 113-118
- [2] Al-Azzawi F, Wahab M. Effectiveness of phytoestrogens in climacteric medicine[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1205(9): 262-267
- [3] Sassarini J, Lumsden MA. Hot flushes: are there effective alternatives to estrogen?[J]. Menopause Int, 2010, 16(2): 81-88
- [4] 孟庆书, 何平, 朱晓燕等. 植物雌激素的作用机制[J]. 生命的化学, 2007, 27(2):141-143
Meng Qing-shu, He Ping, Zhu Xiao-yan, et al. The Mechanism of phytoestrogen[J]. Chem Life, 2007, 27(2): 141-143(In Chinese)
- [5] Madsen S. Phytoestrogens and menopausal symptoms [J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2009, 129(21): 2238-2239
- [6] Lewiecki EM. Phytoestrogens and their role in the management of postmenopausal osteoporosis [J]. South Med J, 2009, 102 (1): 111-112
- [7] 高碌春, 张金超, 陈瑶. 植物雌激素的化学分类和药理作用[J]. 国外医药, 2006, 21(6):231-237
Gao Lu-chun, Zhang Jin-chao, Chen Yao. Chemical Classification and Pharmacologic Action of Phytoestrogens [J]. Foreign Med Sci, 2006, 21(6): 231-237(In Chinese)
- [8] Kumar A, Kaundal RK, Iyer S, et al. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy[J]. Life Sci, 2007, 80(13): 1236-1244
- [9] Yoshida Y, Shioi T, Izumi T. Resveratrol ameliorates experimental

autoimmune myocarditis[J]. Circ J, 2007, 71(3): 397-404

- [10] Vetvicka V, Volny T, Saraswat-Ohri S, et al. Glucan and resveratrol complex--possible synergistic effects on immune system [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007, 151(1): 41-46
- [11] Wang WW, Smith ED, Stuff J E, et al. Cholesterol-lowering effects of soy protein in normcholesterolemic and hypercholesterolemic men [J]. Am J Clin, 1998, 68(9):1385
- [12] Oseni T, Patel R, Pyle J, Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens[J]. Planta Med, 2008, 74(13): 1656-1665
- [13] Turner JV, Agatonovic-Kustrin S, Glass BD. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors [J]. J Pharm Sci, 2007, 96(8): 1879-1885
- [14] Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. Cellular and physiological effects of soy flavonoids [J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4 (8): 881-887
- [15] Dervan PA, Magtt HM, Carney DN, et al. Proliferating cell nuclear antigen counts in foramlin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fress tissue[J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 521-530
- [16] Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 301: 179-201
- [17] Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair[J]. Cell Res, 2008, 18(1): 85-98
- [18] Lee KY, Myung K. PCNA modifications for regulation of post-repli- cation repair pathways[J]. Mol Cells, 2008, 26(1): 5-11
- [19] Kirik OV, Beznin GV, Korzhevski? DE. Proliferation markers used in histological studies[J]. Morfologiya, 2009, 136(6): 95-100
- [20] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork[J]. Cell, 2007, 129(4): 665-679

(上接第 2253 页)

- [6] 沈萍,陈向东.微生物学实验第四版.高等教育出版社,2008
Shen Ping,Chen Xiang-dong.《Experiment Microbiology》Fourth Edition. High Education Press,2008
- [7] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法.中国轻工业出版社,1999
Lin Dai-wen.《Identification and experimental methods of Lactobacillus》.Chinese Light Industry Press,1999
- [8] 王琛,李韬,张宏宇,等.薏米营养保健酒的研制及其甘油三酯的测定[J].酿酒,2008,35(2):75-76
WANG Shen, LI Tao, ZHANG Hong-yu, et al. Development of Coix Lachrymal-jobi Nutritional Health Wine and Determination of Triglyceeride[J].Liquor making, 2008,35(2):75-76
- [9] 庄玮婧,吕峰,郑宝东.薏米营养保健功能及开发应用[J].福建轻纺, 2006,11:103-106
ZHUANG Wei-jing, LV Feng, ZHENG Bao-dong. The Nutrition of Seed of Jobs Tears And Its Development And Application [J].Fujian Light Textile, 2006, 11:103-106
- [10] 万荣峰,江善祥.3 株乳酸菌体外拮抗致病性大肠杆菌试验[J].畜牧与兽医,2007,39(3):50-52
Wan Rong-feng,Jiang Shan-xiang. The Antagnism of 3 strains of lactic acid bacteria and Pathogenic Escherichia coli in Vitro [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2007,39(3):50-52

- [11] 李南薇,李宁. 乳酸菌代谢产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用的研究 [J].中国酿造,2009,(5):49-52
Li Nan-wei,LI Ning. Inhibitory effects of Lactobacillus metabolites on Escherichia coli and Staphylococcus aureus [J]. China Brewing,2009, (5):49-52
- [12] 范薇. 实验小鼠肠道正常菌群 [J]. 中国比较医学杂志,2004,4(1): 58-60
Fan Wei.Normal intestinal Microfolora of mice[J].Chinese Journal of comparative Medicine,2004,4(1):58-60
- [13] Kohmoto T, Fukui F, Takaku H, et al. Dose - response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria [J]. Agricultural and Biological Chemistry ,1991,55(6) : 2157 -2159
- [14] Troy EB, Kasper DL. Beneficial effects of Bacteroides fragilis polysaccharides on the immune system [J]. Frontiers in Bioscience , 2009,15(1) : 25-34
- [15] 谢广发,戴军,赵光鳌,等.酒中的功能性低聚糖及其功能[J].中国酿造,2005(2) : 39-40
Xie Guang-fa,Dai Jun,Zhao Guang-ao, et al. Functional oligosaccharides in rice wine and its health function[J]. CHINA BREWING,2005 (2) : 39-40