文章编号:1000-5404(2007)11-1083-04

论著

三羟异黄酮对人乳腺癌细胞端粒酶的影响

封明霞,朱俊东,糜漫天,郎海滨 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究三羟异黄酮(Genistein,Gen)对人乳腺癌细胞系体外增殖的影响及其与端粒酶的关系。**方法** 体外培养雌激素受体阳性(ER^+)和阴性(ER^-)乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231,MTT法检测细胞增殖的影响;RT-PCR法观察端粒酶逆转录酶TERT基因mRNA的表达;免疫细胞化学染色观察NF-κB p65的核移位。**结果** 雌二醇(Estradiol,E_2)单独作用时,促进MCF-7细胞增殖、TERT mRNA表达和NF-κB p65的核移位,但对MDA-MB-231细胞无明显影响。低剂量的Gen对MCF-7细胞的单独作用与E_2类似,与E_2联合作用时,MCF-7细胞无明显变化;高剂量的Gen单独或联合E_2作用于MCF-7细胞以及MDA-MB-231细胞,均表现为抑制细胞增殖、TERT mRNA表达和NF-κB p65的核移位。**结论** Gen对两种乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231增殖的不同影响与雌激素受体表达状态及E_2存在与否有关,并可能是通过调节TERT的mRNA表达、NF-κB p65的核移位来调控细胞端粒酶活性的。

关键词: 三羟异黄酮;雌二醇;MCF-7;MDA-MB-231;端粒;端粒酶;TERT;核移位
中图法分类号: R151.3; R730.23; R737.9 **文献标识码:** A

Effect of Genistein on telomerase of human breast cancer cells *in vitro*

FENG Ming-xia, ZHU Jun-dong, MI Man-tian, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of Genistein (Gen) on the proliferation of human breast cancer cell lines *in vitro* and the relationship with telomerase. **Methods** Human breast cancer cell lines MCF-7 (ER^+) and MDA-MB-231(ER^-) were cultured *in vitro*. MTT assay was used to determine the effects of Gen and Estradiol (E_2) on the proliferation of the two cell lines. RT-PCR was conducted to detect the expression of TERT mRNA and immunocytochemistry assay was used to observe the nuclear translocation of NF-κB. **Results** E_2 promoted the proliferation of MCF-7 cells ($P<0.01$), the expression of TERT mRNA ($P<0.01$) and the nuclear translocation of NF-κB, but had no effect on MDA-MB-231 cells. The effect of Gen alone on MCF-7 in low dose was similar to E_2, and the effect of Gen in combination with E_2 was similar to the control. For both cell lines, in high dose, Gen inhibited the proliferation ($P<0.01$), the expression of TERT mRNA ($P<0.01$) and the nuclear translocation of NF-κB p65 when used alone or in combination with E_2. **Conclusion** The varied effects of Gen on MCF-7 and MDA-MB-231 cells are related to the status of ER expression and the presence or absence of estrogen, and the underlying mechanisms of these effects may be through regulating the TERT expression and nuclear translocation of NF-κB p65.

Key words: Genistein; Estradiol; MCF-7; MDA-MB-231; telomere; telomerase; telomerase reverse transcriptase; nuclear translocation

乳腺癌已经成为全球女性,尤其是中老年女性发病率最高的恶性肿瘤,每年有50万患者死于此病。大量研究资料表明[1,2],雌激素在乳腺癌发生发展过程中起着重要作用。而亚洲女性的发病率明显低于欧美地区,这与她们膳食中大豆高摄入量呈负相关[3]。大豆中的主要成分三羟异黄酮(Genistein, Gen)是一种具有抗氧化、抑制酪氨酸蛋白酶活性、模拟或拮抗雌激素效应等多种重要生理活性的非营养活性成分,是大豆防治乳腺癌的主要活性成分[4-6]。目前认为其重要作用机制可能包括抑制DNA拓扑异构酶Ⅰ、抑制PTK来阻断细胞内信号传导等途径。端粒酶是近年来发现的肿瘤细胞最为广谱、特异的恶性肿瘤分子标志物,绝大多数肿瘤细胞是通过端粒酶激活机制维持端粒稳定,从而获得无限增殖的能力。有关研究资料表明,在乳腺癌组织中,端粒酶阳性检出率达90%以上[7],端粒酶激活与乳腺癌的发生演进关系密切。

作者简介:封明霞(1981-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)60726173
通讯作者:朱俊东,电话:(023)68753361
收稿日期:2007-01-04;修回日期:2007-01-30

但关于Gen抗乳腺癌与端粒酶之间关系的研究，鲜有报道。为此，本研究以 ER^+ MCF-7 和 ER^- MDA-MB-231 两种乳腺癌细胞为对象，观察 Gen、E_2 对两种乳腺癌细胞增殖及端粒酶的影响，以探讨三羟异黄酮对人乳腺癌细胞的影响及其与端粒酶的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 雌激素受体阳性(ER^+)乳腺癌细胞 MCF-7 雌激素受体阴性(ER^-)乳腺癌细胞 MDA-MB-231，购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。

1.1.2 试剂 三羟异黄酮，雌二醇购自 Sigma 公司；PRMI1640 液体培养基为美国 Hyclone 公司产品，胰蛋白酶为 Gibco 产品；血清为天津 TBD 公司胎牛血清；DMSO，噻唑蓝(MTT)，曲拉通(Triton-X 100)，为 Sigma 公司产品；AMV 反转录酶和 *Taq* DNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司；一抗兔抗人 TERT 为武汉博士德公司产品；S-P 试剂盒，DAB 显色试剂盒为中杉公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7，MDA-MB-231 培养于 PRMI1640 培养基中，常规加入 10% 胎牛血清，100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 MTT 收集对数生长期细胞，按约 2.5×10^4/孔细胞接种于 96 孔板中，每孔加 100 μl 培养液，常规下培养 24 h，待细胞贴壁后吸掉培养液，加入处理因素，分为 9 组：①正常组。②0.005% DMSO 组。③$5\times10^{-6}$ mol/L Gen 组。④$40\times10^{-6}$ mol/L Gen 组。⑤$80\times10^{-6}$ mol/L Gen 组。⑥$10^{-9}$ mol/L E_2 组。⑦$5\times10^{-6}$ mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组。⑧$40\times10^{-6}$ mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组。⑨$80\times10^{-6}$ mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组。每个组做 3 个平行，分别培养 24、48、72 h。然后每孔加入 MTT(5 mg/ml)试剂 25 μl，37 ℃孵育 4 h，弃去培养液，每孔加入 DMSO 150 μl 溶解结晶颗粒，在 490 nm 处测定吸光度值[D(490)]。

1.2.3 RT-PCR 检测 TERT mRNA 表达 收集各组细胞，用 Tripure 试剂提取总 RNA 并计算其浓度，按说明书进行逆转录反应，产物 -20 ℃保存。用 PRIMER 5.0 软件设计引物(表1)，并送 Invitrogen 公司合成。PCR 反应体系(25 μl)如下：cDNA模板 1.5 μl，10 × 反应缓冲液 2.5 μl，10 mmol/L dNTP 0.5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl，引物各 1.5 μl，*Taq* 酶 0.2 μl，去离子水 15.8 μl。混匀后于 95 ℃温育 5 min，94 ℃30 s，退火 52 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环后 72 ℃终末延伸 10 min，1.2% 琼脂糖凝胶电泳，Bio-Rad 凝胶图像分析仪扫描各条带，软件Quantity One 对条带进行灰度分析，以目的条带与内参照条带的灰度比值代表目的基因 mRNA 的表达水平。

表1 RT-PCR 反应引物序列及退火温度

产物	引物序列	退火温度	循环次数	长度(bp)
TERT	5′-GCTCCAGGCACAACGAAC-3′	52 ℃	30	220
	5′-CTCGACGACGTACACACTCATC-3′			
GAPDH	5′-AGCCACATCGCTCAGACAC- 3′	52 ℃	30	616
	5′- CCATCACGCCACAGTTTCC- 3′			

1.2.4 免疫细胞化学染色 将消毒无菌的小盖玻片(10 mm × 10 mm)置入 24 孔培养板中，调整细胞浓度后加入 2 ml 细胞悬液，受试物处理处于对数生长期的 MCF-7 和 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞 24、48、72 h 后，小心取盖玻片细胞于载玻片上，每个载玻片上装 2 个盖玻片，4% 多聚甲醛室温固定 15 ~ 30 min，0.5% H_2O_2 甲醇溶液室温处理 30 min，灭活内源性过氧化物酶，蒸馏水冲洗 3 次，按 S-P 试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色(SABC)。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，运用 SPSS 10.0 统计软件对实验结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Gen 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 增殖的影响

MTT 实验结果表明，对 ER^+ 乳腺癌细胞 MCF-7，Gen 在低浓度(5×10^{-6} mol/L)下，表现为轻度的促增殖作用($P<0.05$)，在高浓度(40×10^{-6}、80×10^{-6} mol/L)时则表现为明显的抑制作用($P<0.01$)；E_2 在 10^{-9} mol/L 浓度时，对此细胞表现为明显的促增殖作用，和低浓度的 Gen 联合作用细胞时，未表现出明显的促进或是抑制作用($P>0.05$)，但和高浓度的 Gen 联合作用时，表现为明显的抑制作用($P<0.01$)，仅与 Gen 呈浓度依赖性。而对 ER^- 乳腺癌细胞 MDA-MB-231，Gen 表现出明显的抑制作用，而且都随浓度、时间的增加作用更显著；E_2 单独作用时，对它未表现出任何促进作用，联合 Gen 共同作用时与 Gen 单独作用无显著性差异($P>0.05$)。见表2。

表2 Gen 和 E_2 对乳腺癌细胞增殖的影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	MCF-7			MDA-MB-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
正常组	0.530 ±0.018	0.626 ±0.015	0.811 ±0.012	0.583 ±0.020	0.678 ±0.017	0.892 ±0.015
0.005% DMSO	0.532 ±0.015	0.628 ±0.013	0.814 ±0.013	0.577 ±0.011	0.676 ±0.009	0.895 ±0.010
5×10^{-6}mol/L Gen	0.569 ±0.023[a]	0.672 ±0.018[a]	0.863 ±0.024[b]	0.571 ±0.015	0.654 ±0.010[b]	0.843 ±0.025[b]
40×10^{-6}mol/L Gen	0.385 ±0.025[b]	0.416 ±0.017[b]	0.481 ±0.016[b]	0.433 ±0.018[b]	0.481 ±0.023[b]	0.547 ±0.018[b]
80×10^{-6}mol/L Gen	0.326 ±0.017[b]	0.342 ±0.011[b]	0.383 ±0.008[b]	0.376 ±0.009[b]	0.411 ±0.008[b]	0.431 ±0.016[b]
10^{-9}mol/L E_2	0.611 ±0.013[b]	0.723 ±0.014[b]	1.003 ±0.025[b]	0.585 ±0.026	0.681 ±0.015	0.895 ±0.015
5×10^{-6}mol/L Gen + 10^{-9}mol/L E_2	0.529 ±0.033	0.631 ±0.016	0.810 ±0.017	0.575 ±0.018	0.654 ±0.014[b]	0.839 ±0.018[b]
40×10^{-6}mol/L Gen + 10^{-9}mol/L E_2	0.391 ±0.012[b]	0.424 ±0.021[b]	0.498 ±0.016[b]	0.433 ±0.013[b]	0.484 ±0.011[b]	0.551 ±0.015[b]
80×10^{-6}mol/L Gen + 10^{-9}mol/L E_2	0.328 ±0.013[b]	0.353 ±0.017[b]	0.397 ±0.017[b]	0.381 ±0.015[b]	0.413 ±0.012[b]	0.429 ±0.017[b]

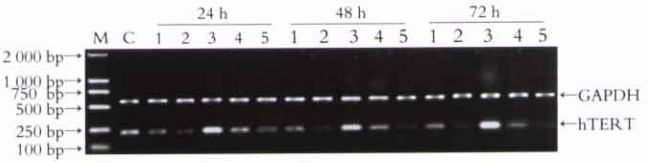
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较

2.2　Gen 和 E_2 对乳腺癌细胞 TERT 基因 mRNA 表达的影响

对 ER^- 细胞 MDA-MB-231，在 Gen 作用 24、48、72 h 后，TERT 基因 mRNA 表达低于正常组（$P<0.05$），随 Gen 浓度增高，mRNA 表达越低，且此作用不受 E_2 存在与否的影响；而对于 ER^+ 细胞 MCF-7，雌激素明显促进细胞 mRNA 表达（$P<0.01$）；在 Gen 低浓度（5×10^{-6} mol/L）时，mRNA 表达有轻度增加（$P<0.05$），高浓度（40×10^{-6} mol/L）时，mRNA 表达显著下降（$P<0.01$）；而当 Gen 和 E_2 联合作用后，mRNA 的表达仍然下降，仅与 Gen 呈量效关系（图 1、2）。

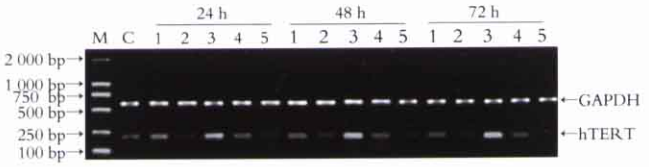
2.3　Gen 和 E_2 对乳腺癌细胞 NF-κB p65 核移位的影响

免疫细胞化学染色显示，MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞细胞质和细胞核中均有 NF-κB p65 着色。E_2 单独作用时，MCF-7 细胞较正常组细胞核着色强度增加，细胞质染色强度降低，而 MDA-MB-231 细胞与对照细胞近似。低剂量的 Gen 单独对 MCF-7 细胞的作用与 E_2 作用类似，二者联合作用时，与正常组相似；高剂量的 Gen 无论单独还是联合 E_2 作用，均降低细胞核的染色强度，增强细胞质染色强度。对 MDA-MB-231 细胞，各剂量的 Gen 无论单独还是联合 E_2 作用，细胞核的染色强度均降低，细胞质均增强（图 3）。



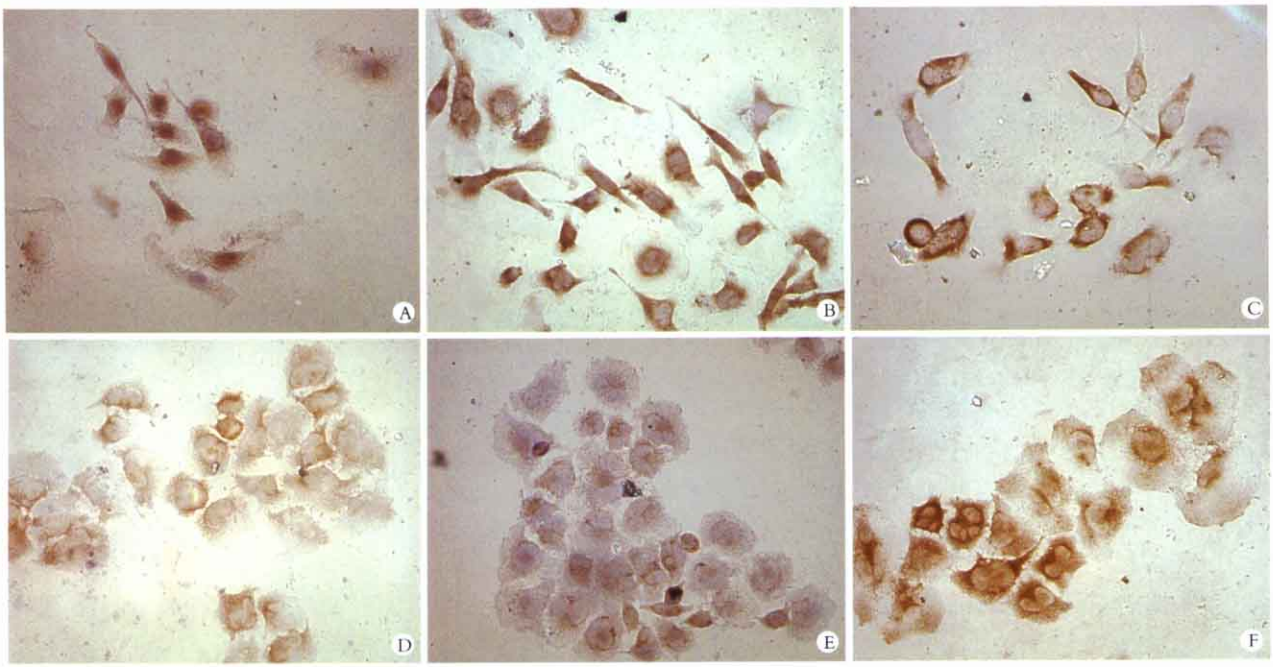
M：DNA 标准（DL 2000）；C：正常组；1：5×10^{-6} mol/L Gen 组；2：40×10^{-6} mol/L Gen 组；3：10^{-9} mol/L E_2 组；4：5×10^{-6} mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组；5：40×10^{-6} mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组

图 1　三羟异黄酮、雌二醇对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 TERT 基因 mRNA 表达的影响



M：DNA 标准（DL 2000）；C：正常组；1：5×10^{-6} mol/L Gen 组；2：40×10^{-6} mol/L Gen 组；3：10^{-9} mol/L E_2 组；4：5×10^{-6} mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组；5：40×10^{-6} mol/L Gen + 10^{-9} mol/L E_2 组

图 2　三羟异黄酮、雌二醇作用于乳腺癌细胞 MCF-7 TERT 基因 mRNA 表达的影响



A：正常 MDA-MB-231 细胞；B：10^{-9} mol/L E_2 作用于 MDA-MB-231 细胞；C：40×10^{-6} mol/L Gen 作用于 MDA-MB-231 细胞；D：正常 MCF-7 细胞；E：10^{-9} mol/L E_2 作用于 MCF-7 细胞；F：40×10^{-6} mol/L Gen 作用于 MCF-7 细胞

图 3　Gen 和 E_2 对乳腺癌细胞 NF-κB p65 核移位的影响　（SABC ×400）

3　讨论

端粒酶是一种特殊类型的逆转录酶，由端粒酶 RNA 模板（hTR）、端粒酶相关蛋白（hTLP）和端粒酶催化亚单位（hTERT）3 部分组成，主要功能是维持端粒的长度。肿瘤细胞的增殖正是由于活化了端粒酶的活性，获得了无限增殖的能力。而 TERT 是端粒酶活性调节的核心成分[8]，在细胞质合成，进入细胞核发挥

效应，主要在转录水平、翻译后磷酸化修饰及核移位等多个层次被调节[9]。近年来，以端粒酶为靶点的肿瘤防治策略已成为肿瘤研究领域的热点。

正常情况下，血浆中雌二醇(E_2)为乳腺组织的发育需要，它可以刺激乳腺腺泡和导管的生长。而对于某些乳腺癌患者，血浆中的E_2可能与其乳腺癌的发生发展密切相关[1]。本研究结果显示，E_2可促进ER^+ MCF-7细胞的增殖。其机制可能是E_2与ER结合后，受体空间构象发生改变，与TERT启动子序列上游的一个增强子序列——ERE(estrogen responsive element)顺式调控元件[10]结合，形成转录起始复合物而启动转录，激活了端粒酶的活性，促进细胞增殖。

三羟异黄酮作(Gen)为一种植物雌激素，其结构与雌二醇(E_2)相似，在一定条件下可以表现出拟雌激素和拮抗雌激素两种作用，这主要取决于Gen不同的剂量和雌激素存在状态。对ER^+的MCF-7细胞，低剂量的Gen(5×10^{-6}mol/L)单独作用时，Gen可与细胞上的雌激素受体(ER)结合，发挥雌激素样的促细胞增殖的作用；而当低剂量的Gen与E_2联合作用时，Gen竞争性的与ER结合，阻断E_2刺激信号的传入，可以发挥拮抗雌激素的作用。对ER^-的MDA-MB-231细胞则无此作用。高剂量的Gen(40×10^{-6}mol/L)对乳腺癌细胞的抑制作用，其机制可能是：在转录水平通过减量调节c-Myc基因的表达，降低了TERT的mRNA的表达，来调节hTERT的转录；在PI3 kinase/Akt途径[11]中抑制Akt的磷酸化，降低TERT的磷酸化(二者含有相同的473-丝氨酸磷酸化位点)，抑制TERT的核移位；另外，还通过抑制转录因子NF-κB的p65亚基[12]与TERT结合来降低TERT的核移位，降低端粒酶活性，来抑制乳腺癌细胞的增殖。这些都与本实验结果一致。

近年来，Gen防治乳腺癌的作用备受关注，但许多学者认为Gen在生理剂量的情况下，对ER^+乳腺癌患者可能存在潜在副作用。本研究结果也进一步表明：对于绝经前女性乳腺癌患者，服用大豆等富含三羟异黄酮的食物是安全的；而对于绝经后女性，若为ER^-乳腺癌患者，服用富含三羟异黄酮的食物是也安全的，但若为ER^+乳腺癌患者，少量的三羟异黄酮可能起到类似于内源性雌激素的作用，反而会促进乳腺癌细胞的增殖，加速病情的恶化。

参考文献：

[1] 李红智，喻林升，王宗敏，等. 乳腺癌细胞凋亡、增殖与相关基因表达、突变的关系[J]. 中国病理生理杂志，2003，19(5)：676－678.

[2] 冯继锋，吴剑秋，尹必俭，等. 乳腺癌组织中雌激素受体与C-erbB-2基因、多药耐药基因MDR1表达[J]. 实用临床医药杂志，2005，9(11)：8－11.

[3] Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, *et al*. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(12): 906－913.

[4] Lamartiniere C A. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(Suppl 6): S1705－S1709.

[5] 彭俊华，糜漫天，朱俊东. 辛基酚和三羟异黄酮联合作用对乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(15)：1578－1581.

[6] 张 红，朱俊东，糜漫天，等. 三羟异黄酮与化疗药物联合作用对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：710－713.

[7] 潘立峰，王立华，周宝臣. 乳腺癌组织中端粒酶活性的研究[J]. 实用肿瘤学杂志，2003，17(1)：10－12.

[8] Ducrest A L, Szutorisz H, Lingner J, *et al*. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene[J]. Oncogene, 2002, 21(4): 541－552.

[9] Mergny J L, Riou J F, Mailliet P, *et al*. Natural and pharmacological regulation of telomerase[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(4): 839－865.

[10] Kyo S, Takakura M, Kanaya T, *et al*. Estrogen activates telomerase [J]. Cancer Res, 1999, 59 (23): 5917－5921.

[11] Breitschopf K, Zeiher A M, Dimmeler S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism[J]. FEBS Lett, 2001, 493(1): 21－25.

[12] Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, *et al*. Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein[J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 18－21.

(编辑 薛国文)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有1个、2个或3个，但“姓”只有1个，因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q.

本刊编辑部