文章编号:1000-5404(2009)04-0315-03

论著

异黄酮改构化合物F11对人乳腺癌细胞凋亡的影响及其机制研究

尹姝心[1],艾国平[2],常 青[1],杨 伟[1],粟永萍[2] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究异黄酮改构化合物F11对人乳腺癌细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 采用DNA Ladder、DAPI细胞核染色检测F11对人乳腺癌细胞MCF-7凋亡的影响,Western blot检测凋亡相关蛋白Caspase-3、PARP、p53的表达。**结果** 异黄酮改构化合物F11可诱导人乳腺癌细胞发生凋亡,增加Caspase-3和PARP蛋白的表达($P<0.01$),抑制p53蛋白的表达($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 异黄酮改构化合物F11诱导MCF-7发生凋亡,可能是通过诱导Caspase-3和PARP蛋白表达的增加,抑制p53蛋白的表达实现的。

关键词: 异黄酮改构化合物F11;MCF-7;凋亡
中图法分类号: R285.5;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Effect of an isoflavone derivative F11 on apoptosis of human breast cancer cells

YIN Shu-xin[1], AI Guo-ping[2], CHANG Qing[1], YANG Wei[1], SU Yong-ping[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which an isoflavone derivative F11 affects apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. Methods The apoptosis of MCF-7 cells induced by F11 was detected by DNA Ladder and DAPI dyeing. Western blot assay was used to detect the protein expressions of Caspase-3, PARP and p53. Results F11 induced cell apoptosis of MCF-7. After F11 treatment, the expressions of Caspase-3 and PARP increased, and the expression of mutant p53 decreased. Conclusion Isoflavone derivative F11 induces the apoptosis of breast cancer cells through upregulating the expressions of Caspase-3 and PARP, and decreasing p53 expression .

Key words: isoflavone derivative F11; MCF-7; apoptosis

研究表明大豆的抗癌作用主要缘于其中的异黄酮成分,特别是金雀异黄素。大豆异黄酮需在较大剂量时才能显示出抗癌活性,但大剂量对机体正常细胞也造成损伤,为了增强其生物活性,我们以其为先导化合物,进行结构修饰,改构合成了一系列的异黄酮类化合物,并以金雀异黄素(GEN)为对照。通过前期实验研究[1-3]的筛选,得到了体内外抑制肿瘤细胞增殖活性较强的化合物F11。本实验在体外研究F11对MCF-7细胞凋亡的影响及其可能机制,以进一步证实异黄酮改构化合物F11抑制肿瘤生长的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞MCF-7,由第三军医大学全军复合伤研究所冻存保存。

1.1.2 化合物、药物与试剂 异黄酮改构化合物F11(由华西医科大学药物化学教研室合成并提供),GEN(纯度≥98.0%,HPLC,Sigma,美国),二甲基亚砜(DMSO,上海生工),IMDM(HyClone,美国),胎牛血清(TBD,天津),预染蛋白标准

基金项目:重庆市科技攻关课题(2004BB5034);重庆市院士基金(2004BC5006)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Chongqing Municipal (2004BB5034) and the Funds for Academicians by Scientific Committee of Chongqing Municipal (2004BC5006)

作者简介:尹姝心,女,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科内分泌方面的研究。E-mail: joyin77@163.com
通信作者:常 青,电话:(023)68765399,E-mail: CQLi99@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-05-06;修回日期:2008-07-14

(美国 Fermanta 公司),DAPI 染色液(碧云天公司),Apoptotic DNA Ladder Kit 为 Roche 公司产品,一抗:PARP、Caspase-3、p53(美国 CST 公司),二抗:羊抗兔 IgG-HRP(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养[4] MCF-7 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液中,培养条件为 5% CO_2、37 ℃,饱和湿度。

1.2.2 化合物的配置 精确称量化合物 F11 及 GEN 后,溶于 DMSO 中,配成 5、10 mmol/L 的工作液。

1.2.3 荧光显微镜观察 常规培养 MCF-7 细胞,接种于 6 孔板内 24 h,分溶剂对照组(加入等体积 DMSO)和 F11(100 μmol/L 组),24 h 后进行 DAPI 染色,步骤如下:PBS 清洗 1 次;4% 的多聚甲醛 PBS 在室温固定 20 min;PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;加入 DAPI 染色液(1 μg/ml 无水甲醇)作用 15 min;PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。荧光显微镜下观察,细胞发生凋亡时,可见凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。

1.2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳 实验分组:①溶剂对照组,在培养液中加入等体积的 DMSO;②GEN 对照组,在培养液中的终浓度为 100 μmol/L;③F11 组,在培养液中的终浓度分别为 50、100 μmol/L。常规收集不同浓度 F11 和 GEN 处理 24 h 的 MCF-7 细胞,按试剂盒说明提取 DNA,2% 琼脂糖凝胶,50 V 电泳约 40 min。

1.2.5 Western blot 检测 常规培养 MCF-7 细胞,分为溶剂对照组(加入等体积 DMSO)、F11 各组(终浓度分别为 25、50、100、200 μmol/L),加入各处理因素 24 h 后,收集细胞提取总蛋白,向收集的细胞内加入约 3 倍体积的预冷的总蛋白提取液,冰浴中匀浆,4 ℃裂解 15 min,4 ℃ 13 000 × g 离心 20 min,上清液即为全细胞裂解液。Bradford 法测定蛋白含量后,加入 5 × 上样 Buffer 后,99 ℃加热 5 min,4 ℃冷却 10 min 变性,-70 ℃保存备用。12% SDS-PAGE 凝胶电泳后,将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜与 5% 脱脂奶粉一起常温封闭 1 h,取 PVDF 膜与 5% 牛血清白蛋白稀释的一抗 4 ℃过夜,PBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min,放入含辣根酶标记的羊抗兔 IgG,37 ℃孵育 1 h,PBS-T 洗膜,5 min × 3 次,暗室内化学发光显色。将蛋白胶片照相并在 Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统上进行扫描和分析,同一样本重复 3 次。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析。

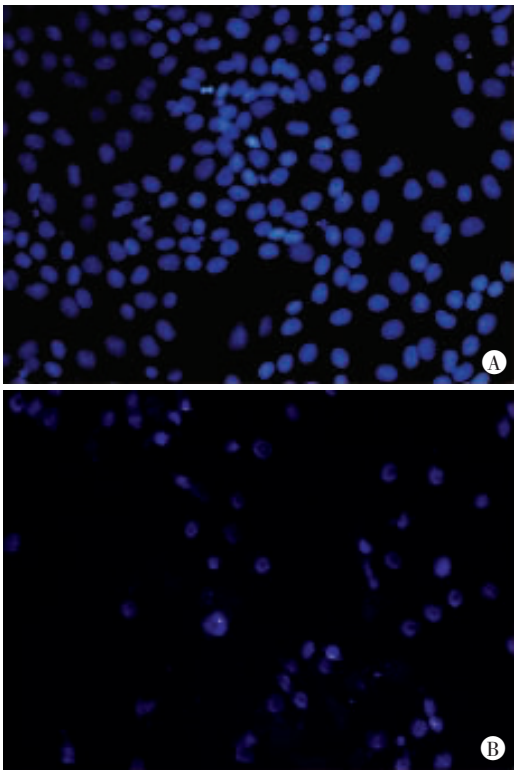
2 结果

2.1 荧光显微镜观察 DAPI 细胞核染色结果

DAPI 荧光染料可与细胞内的 DNA 结合,使细胞核发出淡蓝色荧光,荧光显微镜下观察:溶剂对照组细胞核近圆形,边缘清晰,染色均匀(图 1A);F11 组细胞核不规则,可见细胞核呈致密浓染(图 1B)。

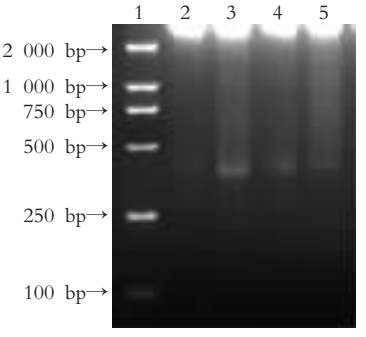
2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

F11 作用于 MCF-7 后,凋亡细胞 DNA 发生降解,有序断裂成 180 ~ 200 bp 及其倍数的片段,电泳后在琼脂糖凝胶上呈梯形条带(DNA Ladder),F11 100 μmol/L 组最为明显,溶剂对照组未形成明显梯形条带(图 2)。



A:溶剂对照组; B:F11 处理组

图 1 荧光显微镜观察 DAPI 细胞核染色结果 (×200)

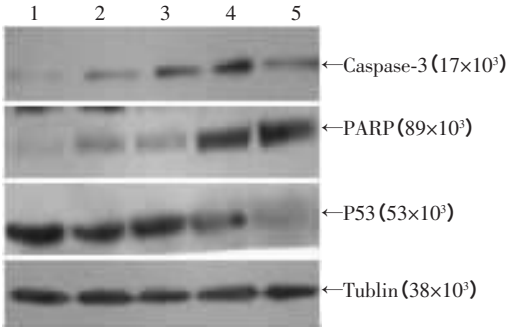


1: DNA 标准(DL2 000); 2: 溶剂对照组; 3: F11 100 μmol/L 组; 4: F11 50 μmol/L 组; 5: GEN 对照组

图 2 琼脂糖凝胶电泳 DNA 片段的检测

2.3 Western blot 检测 Caspase-3、PARP、P53 蛋白的表达

F11 作用于 MCF-7 细胞 24 h 后,随 F11 浓度增加,Caspase-3 和 PARP 蛋白的表达增加($P < 0.01$),P53 蛋白的表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Tublin 为引入的内参照(图 3,表 1)。



1:溶剂对照组; 2: F11 25 μmol/L 组; 3: F11 50 μmol/L 组; 4: F11 100 μmol/L 组; 5: F11 200 μmol/L 组

图 3　Western blot 检测 Caspase-3、PARP、P53 蛋白的表达

表 1　Caspase-3、PARP、p53 蛋白表达(OD 值×面积,$n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-3	PARP	p53
溶剂对照组	764.33 ±37.50	920.33 ±34.80	5 002.67 ±188.10
F11 25 μmol/L 组	1 466.00 ±99.70^b	1 547.33 ±54.30^b	4 341.00 ±152.40^b
50 μmol/L 组	1 908.00 ±44.50^b	1 522.00 ±60.00^b.	4 468.67 ±57.60^a
100 μmol/L 组	2 169.00 ±76.50^b	4 355.00 ±142.00^b	2 577.67 ±148.50^b
200 μmol/L 组	2 277.00 ±57.80^b	4 460.00 ±68.50^b	1 777.33 ±52.70^b

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与溶剂对照组比较

3　讨论

DAPI(4,6-联脒-2-苯基吲哚)[2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride]是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,其作用机制是与 DNA 双螺旋的凹槽部分可以发生相互作用,从而与 DNA 的双链紧密结合,产生蓝色荧光。在本实验,F11 处理 MCF-7 细胞 24 h 后,DAPI 染色可见细胞核不规则,细胞核呈致密浓染。细胞凋亡时,DNA 双链在核小体间断裂成 180 ~200 bp 及其倍数的片段,因此在 DNA 凝胶电泳图上出现特有的梯形条带。F11 处理 MCF-7 细胞 24 h 后,收集细胞提取 DNA 进行 DNA Ladder 检测,可见凋亡细胞 DNA 发生降解,呈梯形条带。以上结果提示,F11 在体外可以诱导肿瘤细胞发生凋亡。因此,我们用 F11 作用于人乳腺癌细胞后,对细胞凋亡相关蛋白进行 Western blot 检测,以探讨其发生凋亡的可能机制。

凋亡是一个多种信号分子程序性调控的过程,为细胞维持自身稳定与生长所必需。Caspase 是一组存在胞质溶胶中的结构上相关的半胱天冬氨酸蛋白酶,半胱天冬氨酸蛋白酶是白细胞介素转化酶(interleukin-1β enzyme, ICE)家族的总称,现已发现的 Caspase 有 14 种,他们均以无活性的酶原形式存在于细胞中,包括一个 N 末端的前结构域及大、小 2 个亚基[5]。Caspase 的激活是凋亡事件的核心机制,多种因素如活性氧、Ca^{2+}、细胞因子等都可引起 Caspases 的活化,从而触发细胞凋亡发生的级联。Caspase-3 是 ICE 蛋白酶家族的重要成员,它是由 28×10^3 的酶原经酶解作用生成由 17×10^3、$12\times10^3$2 个亚单位组成的异二聚体,是细胞凋亡早期阶段启动地关键的蛋白酶。Caspase-3 被凋亡信号启动后,由其前体形式转变为成熟的酶,进而酶切特异性底物如 PARP 等,通过其结构改变或影响特定的信号分子而参与细胞凋亡地发生。PARP 是 Caspase 最富特征性的蛋白裂解产物,PARP 是 DNA 修复酶,PARP 的裂解可干扰细胞内环境的稳定。p53 是十分重要的诱导凋亡蛋白。p53 基因正常情况下可抑制细胞的生长和分裂,并能抑制癌基因的活动,当 p53 基因突变后可引起细胞的转化和癌变。有研究显示[6]:在乳腺癌、癌前病变及良性乳腺肿瘤中 P53 蛋白表达逐渐降低,说明 p53 基因突变是乳腺癌发生、发展过程中的早期事件。在本实验中,通过 Western blot 检测可知随 F11 浓度增加,Caspase-3 和 PARP 表达增加,P53 蛋白表达降低。由此推测 F11 诱导 MCF-7 细胞发生凋亡,可能是通过激活了 Caspase-3,并有效切割了 PARP,及降低 P53 蛋白的表达实现的。

综上所述,异黄酮改构化合物 F11 可通过诱导乳腺癌细胞发生凋亡而发挥抗肿瘤作用,其机制可能是 F11 激活了 Caspase-3,并有效切割了 PARP,及降低 P53 蛋白的表达实现的。

参考文献:

[1] 张丽龙, 粟永萍, 刘晓宏, 等. 新型异黄酮及甾体类化合物体外抗癌细胞增殖活性的初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1393 - 1396.

[2] 张丽龙, 艾国平, 粟永萍, 等. 异黄酮类化合物 F11 抗癌活性的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1155 - 1157.

[3] 刘小燕, 常　青. 大豆异黄酮防治绝经相关疾病研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(13): 1490 - 1492.

[4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996: 25.

[5] Fan T J, Han L H, Cong R S, *et al*. Caspase family proteases and apoptosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37(11): 719 - 727.

[6] 宋顺宗, 孙　抒, 杨万山, 等. 乳腺肿瘤中 Bcl-2、p53 和 PCNA 蛋白的表达及临床意义[J]. 山东医药, 2007, 47(27): 1 - 3.

(编辑　张　维)