论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2206-04

黑米花青素对 HER-2/neu 高表达人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 移植瘤血管生成的影响

于 斌[1,2],余小平[3],易 龙[1],常 徽[1],陈春烨[1],金 鑫[1],糜漫天[1] ([1]第三军医大学预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038;[2]济南军区疾病预防控制中心,济南 250014;[3]成都医学院公共卫生学教研室,成都 610083)

摘 要:目的 观察黑米花青素对 HER-2/neu 高表达人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 移植瘤血管生成的影响。**方法** 以 24 只雌性 BALB/c 裸鼠建立 MDA-MB-453 细胞移植瘤模型,按照完全随机设计原则平均分入对照组、VEGF 组、黑米花青素组和联合组 4 个处理组,分别以 VEGF 和黑米花青素提取物进行单独和联合干预;免疫组织化学法检测瘤组织核抗原 Ki-67 和Ⅷ因子相关抗原表达,评价移植瘤肿瘤细胞生长能力和瘤组织微血管密度(MVD)的变化;Western blot 检测瘤组织促血管生成因子 MMP-2、MMP-9 和 uPA 表达水平的变化。**结果** 相对于对照组,黑米花青素组瘤体积、MVD 值和促血管生成因子的表达水平均显著降低($P<0.05$),VEGF 组上述指标则均有明显升高($P<0.05$),联合组上述指标同对照组之间均无显著差异。相对于 VEGF 组,黑米花青素组和联合组的上述指标均有显著降低($P<0.05$),其中黑米花青素组瘤体积有非常显著的降低($P<0.01$)。与对照组相比,黑米花青素组核抗原 Ki-67 表达强阳性的细胞数显著减少,VEGF 组核抗原 Ki-67 表达强阳性的细胞数显著增多。**结论** 黑米花青素可能通过抑制移植瘤内血管生成而抑制肿瘤生长。

关键词: 黑米花青素;乳腺癌;血管生成;移植瘤;HER-2/neu

中图法分类号: R151.2;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Effect of black rice anthocyanins on angiogenesis in transplanted tumor of human breast cancer MDA-MB-453 cells over-expressing HER-2/neu

YU Bin[1,2], YU Xiao-ping[3], YI Long[1], CHANG Hui[1], CHEN Chun-ye[1], JIN Xin[1], MI Man-tian[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Medical Nutrition Research Center, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]CDC of Jinan Military Region, Jinan 250014; [3]Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of black rice anthocyanins on angiogenesis in transplanted tumor of human breast cancer MDA-MB-453 cells over-expressing HER-2/neu. Methods Twenty-four female BALB/c nude mice were used to establish transplanted tumor models with MDA-MB-453 cells. The mice were equally randomized into 4 groups including the control group, the VEGF group, the black rice anthocyanins group and the co-treatment group, with the intervention of VEGF and/or black rice anthocyanin-rich extract. Immunohistochemistry was used to detect the expression of nuclear antigen Ki-67 and factor Ⅷ related antigen in order to evaluate alternations of tumor cells growth ability and tumor microvessel density (MVD) respectively. Western blotting was used to examine the expression of tumor angiogenesis-related factors MMP-2, MMP-9 and uPA. Results Compared to the control group, statistically significant decrease was observed in the black rice anthocyanins group on items of tumor volume, MVD value and the expression levels of tumor angiogenesis-related factors, with each P value lower than 0.05. Also, statistically significant increase was observed in the VEGF group on the items described above, with each P value lower than 0.05. There are no significant differences between the co-treatment group and the control group on these items described above. On the other hand, significant decrease of these items described above in black rice anthocyanins group as well as the co-treatment group

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30771794);"十一五"国家科技支撑计划(2008BA158B06);四川省青年基金(08ZQ026-051)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771794), the "Eleventh Five-year Plan" National Key Technology R&D Program (2008BA158B06) and Sichuan Provincial Foundation for Youths (08ZQ026-051)

作者简介: 于 斌,男,山东省莒南县人,硕士研究生,医师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291,E-mail: Fishead@126.com
通信作者: 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail: mimt@vip.sina.com

收稿日期: 2009-05-08;**修回日期:** 2009-07-24

were observed in comparison against the VEGF group, with each P values lower than 0.05. Besides, the amount of cells with strong positive Ki-67 staining were dramatically increased in the VEGF group and decreased in the black rice anthocyanins group compared to the control group. **Conclusion** Black rice anthocyanins might inhibit the growth of transplanted tumor of human breast cancer *via* tumor angiogenesis repression.

Key words: black rice anthocyanins; breast cancer; angiogenesis; transplanted tumor; HER-2/neu

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。HER-2/neu 是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的家族成员,其高表达的乳腺癌血管生成能力强,增殖迅速,恶性程度高。目前临床上缺乏针对乳腺癌血管生成的手段,现有药物不但治疗效果有限,而且副作用较大。黑米花青素(black rice anthocyanins)是天然存在于黑米皮中的一组花色苷类物质。以往有研究发现黑米花青素能够稳定动脉粥样硬化脆性斑块的形成,其机制可能在于对斑块中血管生成的抑制作用[1],推测黑米花青素也可能通过抑制乳腺癌血管生成发挥抗肿瘤作用。本实验以 HER-2/neu 高表达的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 构建裸鼠移植瘤模型,分别以黑米花青素和重组人内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)进行单独和联合干预,观察黑米花青素对 HER-2/neu 高表达乳腺癌移植瘤血管生成的影响及其与肿瘤生长的关系,并初步探讨其可能的分子机制。

1　材料与方法

1.1　材料

6~8 周龄健康雌性 BALB/c 裸鼠 24 只,体质量 15~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供[scxk(军)2007015]并饲养于其 SPF 动物实验室。裸鼠依照完全随机设计原则均分为 4 组:空白对照组、VEGF 处理组、黑米花青素干预组、VEGF 和黑米花青素联合处理组(分别简称对照组、VEGF 组、黑米花青素组和联合组),每组 6 只动物。

黑米花青素提取自广东省广州产黑优 110(籼粘型)黑米品种,主要有效成分包括矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cyanidin-3-glucose)和芍药素-3-葡萄糖苷(Peonidin-3-glucose)等[2],提取物标称有效成分含量 43%,由中山大学公共卫生学院凌文华教授馈赠。改良型 RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,标准胎牛血清购自天津 TBD 公司。VEGF 购自美国 Peprotech 公司。兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体和兔抗人 Ki-67 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、MMP-9 和尿激酶性纤维蛋白溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗人 β-tubulin 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG、DAB 试剂盒购自北京中杉。人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 细胞株购自中科院上海细胞所,在 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 条件下正常培养于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.2　方法

1.2.1　裸鼠异种移植及处理因素　　收集处于对数生长期的 MDA-MB-453 细胞,PBS 漂洗 2 遍,以不含血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞,调整细胞数至 1×10^7/ml,每只 0.1 ml 右肩胛皮下注射,同时开始给予处理因素。黑米花青素组和联合组按 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} 灌胃给予黑米花青素提取物水溶液,对照组和 VEGF 组灌以等量的无菌蒸馏水;VEGF 组和联合组按 5 μg·kg^{-1}·d^{-1} 腹腔注射给予 VEGF,对照组和黑米花青素组以生理盐水替代。细胞移植 4 周后处死裸鼠,收集瘤标本用于后续实验。

1.2.2　免疫组织化学法检测瘤组织核抗原 Ki-67 和Ⅷ因子相关抗原表达　　瘤标本以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,常规脱水,微波修复抗原约 20 min,3% H_2O_2 封闭 10~15 min,山羊血清封闭 10~15 min;1∶200 稀释的兔抗人核抗原 Ki-67 抗体和Ⅷ因子相关抗原抗体 4 ℃ 孵育过夜;次日室温复温 30 min,PBS 清洗 3 次,每次浸泡 3 min,1∶500 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h;再次以 PBS 浸泡清洗 3 min×3 次,DAB 显色;梯度酒精脱水至二甲苯后,以中性树脂封片保存。

1.2.3　移植瘤内微血管密度(microvessel density, MVD)的测定　　以免疫组织化学法检测Ⅷ因子相关抗原表达,特异性着色并呈内皮样结构的部位判定为组织微血管。每例切片在 100 倍视野下选择数个血管密度最高的视野,并计算各视野内微血管数目。各个视野间不得重叠。选取最高的 3 个计数,取其均值作为该例移植瘤的 MVD 值列入统计分析。

1.2.4　Western blot 检测移植瘤组织促血管生成因子表达　　包括 MMP-2、MMP-9 和 uPA。瘤组织以 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度后进行 Western blot 检测。蛋白样品于 120 V、10%~12% 的 SDS-PAGE 胶中电泳分离,半干法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,1∶250~1∶400 稀释的一抗于 4 ℃ 孵育过夜;次日 TBST 漂洗 10 min×3 次后,1∶2 000 稀释二抗工作液室温封闭 2 h,TBST 漂洗 10 min×3 次,DAB 显色。避光晾干 PVDF 膜后扫描存盘,以 Quantity One 软件进行条带分析。

1.3　统计学处理

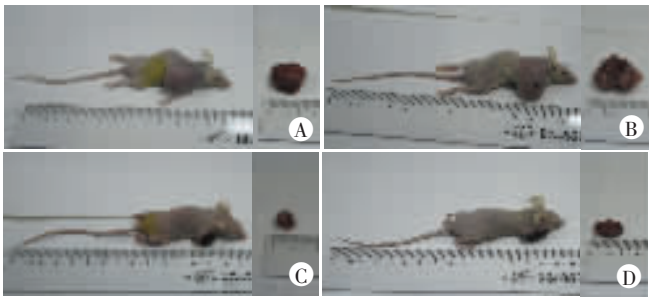
结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,多组数据比较使用单因素方差分析。

2　结果

2.1　黑米花青素对移植瘤生长的影响

BALB/c 裸鼠接种 MDA-MB-453 乳腺癌细胞后,于第 4~7 天形成肉眼可见的皮下包块,成瘤率 100%,各处理组间成瘤时间及成瘤率均无显著差别。饲养期间动物生长状态良好,未见明显的毒副作用。至观察终点时,各处理组动物体质量无显著

差别。与对照组相比，VEGF 组肿瘤体积明显增大，而黑米花青素组瘤体积明显减小，具有显著差异（$P<0.05$）；黑米花青素组和联合组瘤体积相对于 VEGF 组均有非常显著的减小（$P<0.01$），见图 1、表 1。提示黑米花青素能够抑制移植瘤的生长，并对抗 VEGF 促肿瘤生长的作用。



A：对照组；B：VEGF 组；C：黑米花青素组；D：联合组

图 1　人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 裸鼠移植瘤模型

表 1　各组裸鼠移植瘤生长资料（$n=6$）

组别	成瘤时间（d）	成瘤率（%）	瘤体积（cm^3）	体质量（g）
对照组	5 ± 1	100	2.82 ± 0.51	17.2 ± 0.92
VEGF 组	5 ± 2	100	4.47 ± 1.41[a]	18.15 ± 2.61
黑米花青素组	5 ± 1	100	1.15 ± 0.40[ab]	19.01 ± 3.33
联合组	5 ± 2	100	2.23 ± 0.95[b]	17.21 ± 3.04

a：$P<0.05$，与对照组相比；b：$P<0.01$，与 VEGF 组相比

2.2　黑米花青素对移植瘤组织肿瘤细胞生长能力的影响

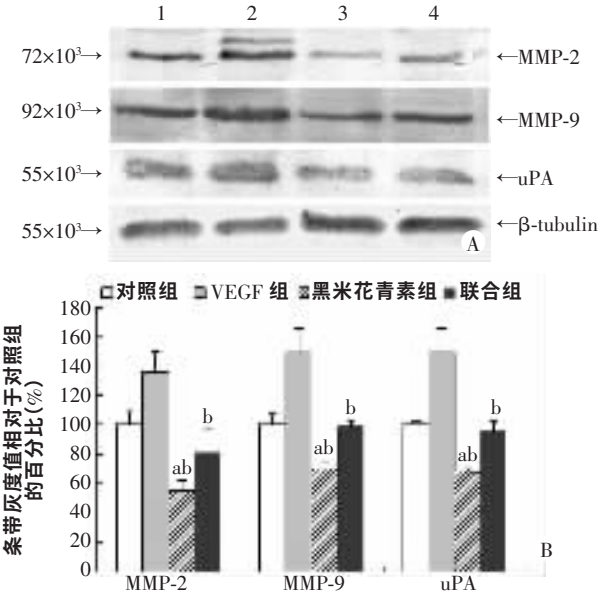
低倍镜下可见，相对于对照组和 VEGF 组，黑米花青素组和联合组核抗原 Ki-67 表达呈强阳性的细胞明显减少（图 2），提示瘤组织肿瘤细胞的生长能力受到抑制。

2.3　黑米花青素对移植瘤 MVD 值的影响

与对照组 MVD 值（18.5 ± 3.3）相比，VEGF 组 MVD 值（24.8 ± 4.1）显著升高，黑米花青素组 MVD 值（11.9 ± 2.4）则显著降低（$P<0.05$）；与 VEGF 组相比，黑米花青素和联合组 MVD 值（16.2 ± 3.1）均显著降低（$P<0.05$），见图 3。提示 VEGF 能够促进瘤组织内微血管生长，而黑米花青素干预可有效抑制瘤内血管生成。

2.4　黑米花青素对移植瘤组织促血管生成因子表达水平的影响

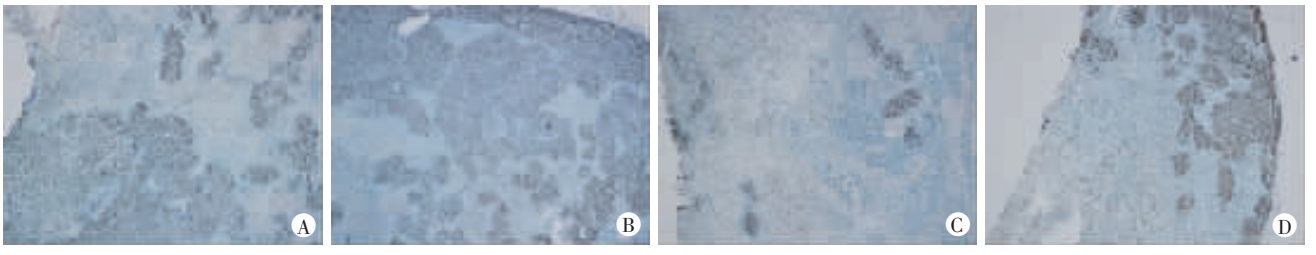
Western blot 检测（图 4）示，相对于对照组，VEGF 组瘤组织中促血管生成因子表达水平明显升高，而黑米花青素组促血管生成因子的表达水平则明显降低，均存在显著差异（$P<0.05$）；联合组的数据与对照组相比均不具有显著差异。相对于 VEGF 组，黑米花青素和联合组的各因子表达水平均有显著下降（$P<0.05$）。提示黑米花青素能够有效抑制瘤组织促血管生成因子的表达，并对抗 VEGF 对促血管生成因子表达水平的上调作用。



A：Western blot 检测结果　1：对照组；2：VEGF 组；3：黑米花青素组；4：联合组

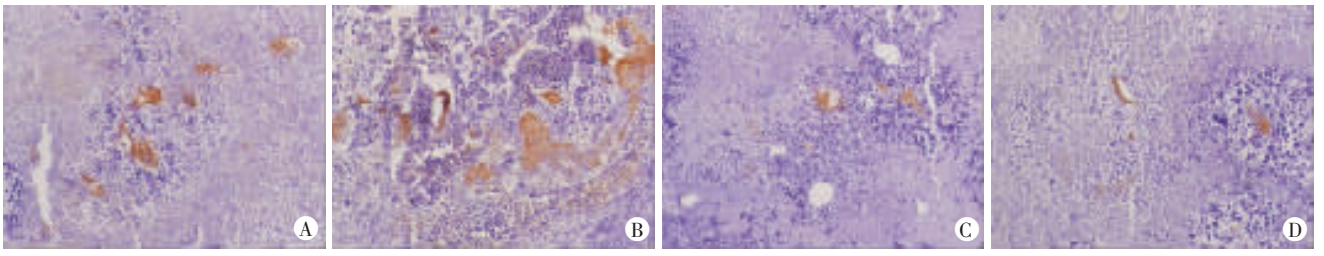
B：定量分析结果　a：$P<0.05$，与对照组相比；b：$P<0.05$，与 VEGF 组相比

图 4　Western blot 检测移植瘤组织促肿瘤生成因子表达水平



A：对照组；B：VEGF 组；C：黑米花青素组；D：联合组

图 2　免疫组织化学法检测移植瘤组织核抗原 Ki-67 表达水平　（二步法 ×40）



A：对照组；B：VEGF 组；C：黑米花青素组；D：联合组

图 3　免疫组织化学法检测移植瘤组织 MVD　（二步法 ×200）

3　讨论

膳食、营养与肿瘤的关系是近年来备受关注的一个热点。花色苷对肿瘤具有较强的防治作用,其机制涉及抗氧化、抑制瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡以及抗血管生成等诸多方面[3-5]。血管生成(angiogenesis)是肿瘤生长和转移过程中的一个重要促进因素,而抗血管生成则是肿瘤治疗中的一个重要手段。HER-2/neu 高表达的肿瘤血管生成能力强,生长迅速。本实验室以往的研究发现,转染了 HER-2/neu 的 MCF-7 乳腺癌细胞株(HER-2/neu 低表达)所形成的移植瘤内 MVD 较野生型高,生长速度也更快[6]。本实验中,黑米花青素组的移植瘤组织内 MVD 较对照组有明显降低,同时联合组 MVD 较 VEGF 组亦有明显降低,说明黑米花青素能够有效抑制 HER-2/neu 高表达 MDA-MB-453 乳腺癌细胞移植瘤的血管生成。同时实验观察到,肿瘤的生长资料和核抗原 Ki-67 表达水平的变化均反映出肿瘤的生长受到了抑制,这一抑制作用同瘤组织内 MVD 的变化相一致,提示黑米花青素可能是通过抑制血管生成而对肿瘤的生长产生的抑制作用。

HER-2/neu 是自身具有酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)活性的生长因子受体,属于 EGFR 受体家族成员。HER-2/neu 与其配体结合后,主要通过 Ras/Raf/MAPK 信号通路,在肿瘤组织促进新生血管生成,促进肿瘤生长和转移[7],但是其中详细的信号传导机制目前并未完全阐明。就肿瘤组织的血管生成而言,VEGF 是 HER-2/neu 激活后的一个最重要的产物。VEGF 是血管生成的最强促进因子,它一方面直接促进内皮细胞快速增殖[8],另一方面上调可降解细胞外基质蛋白的相关酶类的表达,破坏基底膜和细胞外基质构成的组织屏障,允许血管内皮迁移,促进血管生成[9]。VEGF 的这些作用可能也同 Ras/Raf/MAPK 信号通路相关[10]。花色苷类物质能够下调 EGFR 磷酸化,抑制血管内皮细胞增殖和迁移[11],并抑制肿瘤细胞促血管生成因子的表达[12]。本实验对移植瘤组织中的促血管生成因子(包括 MMP-2、MMP-9、uPA)的表达水平进行了检测,发现 VEGF 处理能使这些因子表达水平升高,而黑米花青素处理则使其水平降低,并能对抗 VEGF 的上调作用,证实黑米花青素可以抑制移植瘤组织中促血管生成因子的表达,这可能是其对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 裸鼠移植瘤血管生成产生抑制作用的分子机制之一。

总之,黑米花青素能够抑制 HER-2/neu 高表达移植瘤血管生成,并可能由此而抑制瘤体的生长,这为 HER-2/neu 高表达乳腺癌的治疗提供了一个新的思路。然而,对肿瘤生长的抑制是一个复杂的调控过程,黑米花青素是通过何种机制对 HER-2/neu 下游通路产生影响,抑制血管内皮增殖并最终抑制肿瘤的生长,需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 张名位, 张瑞芬, 郭宝江, 等. 黑米花色苷对血管内皮细胞过氧化损伤的保护作用[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 216-220.

[2] 王　庆, 郭红辉, 张名位, 等. 高效液相色谱法分析黑米皮花青素及其体内代谢产物[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 212-215.

[3] Wang L S, Stoner G D. Anthocyanins and their role in cancer prevention[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 281-290.

[4] 常　徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 黑米花色苷对白血病细胞株 HL-60 及正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 585-587.

[5] 常　徽, 糜漫天, 凌文华. 黑米花色苷及联合化疗药物对不同肿瘤细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1943-1946.

[6] 余小平, 糜漫天, 朱俊东. 三羟异黄酮对乳腺癌异种移植瘤血管生成影响[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1168-1170.

[7] Redondo P, Jimenez E, Perez A, *et al*. N-acetylcysteine downregulates vascular endothelial growth factor production by human keratinocytes *in vitro*[J]. Arch Dermatol Res, 2000, 292(12): 621-628.

[8] Miura S, Matsuo Y, Kawamura A, *et al*. JTT-705 blocks cell proliferation and angiogenesis through p38 kinase/p27(kip1) and Ras/p21(waf1) pathways[J]. Atherosclerosis, 2005, 182(2): 267-275.

[9] Lamy S, Ruiz M T, Wisniewski J, *et al*. A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis[J]. Int J Cancer, 2005, 118(9): 2350-2358.

[10] Grummer M A, Sullivan J A, Magness R R, *et al*. Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells[J]. Biochem J, 2009, 417(2): 501-511.

[11] Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, *et al*. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(5): 989-996.

[12] Chen P N, Kuo W H, Chiang C L, *et al*. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion *via* repressions of MMPs and u-PA expression[J]. Chem Biol Interact, 2006, 163(3): 218-229.

(编辑　龙　亮)