

红三叶总异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响

尹春萍¹, 樊龙昌², 何俊文², 刘妙娜¹, 王月琴¹, 张滋洋²

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究红三叶总异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制和凋亡的诱导作用。方法 在体外细胞培养下, 采用不同质量浓度红三叶总异黄酮和 5-Fu 处理 MCF-7 细胞, MTT 法测定红三叶总异黄酮抑制 MCF-7 细胞增殖的量-效关系; TUNEL 法、流式细胞术分析其细胞凋亡率和周期分布。结果 红三叶总异黄酮对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用随药物质量浓度提高和作用时间延长而更加明显, 而在低质量浓度时却出现轻微促细胞增殖现象。TUNEL 法、流式细胞术分析结果表明, 红三叶总异黄酮能诱导 MCF-7 细胞凋亡, 阻滞细胞于 G₂/M 期, 降低细胞增殖指数, 且这种作用也存在剂量-效应关系。结论 红三叶总异黄酮可抑制 MCF-7 细胞增殖并诱导其凋亡, 具有抗肿瘤作用。

关键词:红三叶总异黄酮; 乳腺癌; MCF-7; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0232-03

Effect of red clover total isoflavones on cell proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7

YIN Chun-ping¹, FAN Long-chang², HE Jun-wen², LIU Miao-na¹, WANG Yue-qin¹, ZHANG Zi-yang²

(1. Department of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of red clover total isoflavones on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7 and the molecular mechanism of the action. **Methods** Proliferation of MCF-7 cells pre- and post-treatment with red clover total isoflavones and 5-Fu was determined by MTT assay. The induction of apoptosis and the change of cell cycle in MCF-7 cells treated with red clover total isoflavones were investigated by TUNEL and Flow cytometry. **Results** MTT Assay showed that the proliferation of MCF-7 cells *in vitro* was inhibited by red clover total isoflavones in time-dependent and concentration-dependent manners. But it could promote the proliferation in low concentration (<25.0 μg/mL). TUNEL and flow cytometry showed that the apoptosis and inhibition of MCF-7 cells in G₂/M phase were induced after treated with red clover total isoflavones. **Conclusion** The total isoflavones from red clover have the effect of anti-tumor for they could inhibit the proliferation and induce the cell apoptosis of MCF-7 cells.

Key words: red clover total isoflavones; breast cancer; MCF-7 cell; apoptosis

红三叶(英文名 red clover), 又名红花车轴草 *Trifolium pratense* L., 红荷兰翘摇, 为豆科车轴属植物, 其主要活性成分为异黄酮类化合物, 具有雌激素样作用和抗肿瘤效应, 除对激素相关肿瘤发挥抗癌作用外, 还可抑制体外培养的胃癌、肝癌及肺癌细胞株的生长^[1,2]。虽然有关的研究已取得较深入的进展和认识, 但迄今为止其抗癌成分和机制仍未阐明。本实验通过 MTT 法、原位细胞凋亡检测、流式细胞术等方法, 研究红三叶总异黄酮对体外培养的人乳

腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用, 并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 红三叶总异黄酮(有效部位)由湖北省医药工业研究院孙代华研究员馈赠, 其中含总异黄酮 58%; 5-Fu (5-氟尿嘧啶, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 0508161)。人乳腺癌 MCF-7 细胞引自同济医院基础外科实验室。RPMI-1640 及胰酶为 Gibco 公司生产; 胎牛血清购于兰州市民海生物制

收稿日期: 2006-08-08

作者简介: 尹春萍(1965—), 女, 湖北武汉人, 副教授, 硕士生导师, 长期从事生药学、中药药理学教学及科研工作, 发表论文 20 余篇, 获多项省、厅级科研课题, 先后赴日本、美国留学。Tel: (027) 83692733 E-mail: cpyin888@163.com

品公司;MTT、二甲基亚砷 (DMSO) 均购自美国 Sigma 公司;细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自武汉凌飞科技有限公司。

1.2 对 MCF-7 细胞体外增殖的影响:采用 MTT 比色法,取对数生长期 MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板,每孔 5×10^3 个细胞,培养 24 h 后,加入红三叶总异黄酮溶液,使终质量浓度分别为 6.25、12.5、25.0、50.0、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个质量浓度设 4 个平行孔,另设溶剂对照组、5-Fu (5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组,分别检测各组 24、48、72、96 h 时细胞增殖情况。即加药后继续培养相应时间,加入 5 mg/mL MTT,再培养 4 h 后倒掉板中的培养液,各孔加 150 μL DMSO,轻轻振动后,用酶标仪 (波长 570 nm) 测定各孔的吸光度 (A) 值,以上实验重复 5 次。取每组 4 个孔总计 20 孔 A 的平均值作为各组的 A 值,按下式计算细胞存活率及增殖抑制率。

$$\text{存活率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

$$\text{增殖抑制率} = (1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.3 原位凋亡细胞检测 (TUNEL 染色):取对数生长期细胞常规消化,以含红三叶总异黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养基、细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板中,制备细胞爬片,培养 48、96 h,用丙酮溶液 [丙酮-无水乙醇 (1:1)] 固定。按照细胞凋亡检测试剂盒的说明操作,用二氨基联苯胺法 (DAB) 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封固。光镜下观察见细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。在高倍镜 ($\times 200$) 下随机选择细胞分布均匀的 5 个视野,计数 1 000 个细胞,计算阳性细胞的百分率,即凋亡指数。

1.4 流式细胞仪检测凋亡细胞:用含红三叶总异黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养基培养 MCF-7 细胞 48、72、96 h 后,0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液,收集于离心管中离心,弃上清液。用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 反复洗涤、离心。加入 75% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。加 200 μL RNA 酶溶液 (5 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 后,冰浴终止。细胞悬液加等体积的 PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 避光染色,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,将样品放入流式细胞仪的样品室,以激发波长 488 nm 测定细胞周期。每组设 4 个平行孔,实验重复 3 次,取 12 孔平均值统计凋亡率和细胞周期。

1.5 统计方法:采用 *t* 检验,用软件 SPSS 11.5 处理。

2 结果

2.1 红三叶总异黄酮对 MCF-7 细胞体外增殖影

响的量-效关系:MTT 结果显示,低质量浓度红三叶总异黄酮 ($< 25.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) 对 MCF-7 细胞表现轻微促细胞增殖作用,高质量浓度时表现为抑制作用,且随着质量浓度的升高呈明显的量-效关系 (见表 1、2)。

表 1 红三叶总异黄酮对 MCF-7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effect of red clover total isoflavones on MCF-7 cells survival rate ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	存活率/%			
		24 h	48 h	72 h	96 h
对照	—	100.0 \pm 0.1	100.0 \pm 1.4	100.0 \pm 0.8	10.0 \pm 0.3
红三叶总异黄酮	6.5	107.4 \pm 0.8	105.8 \pm 1.6	104.0 \pm 2.4	102.8 \pm 1.6
	12.5	113.3 \pm 1.3	123.2 \pm 2.1	106.3 \pm 4.5	118.6 \pm 3.1
	25.0	106.2 \pm 2.2*	102.2 \pm 0.2*	91.7 \pm 0.7*	89.6 \pm 0.1*
	50.0	95.8 \pm 1.4*	90.3 \pm 4.8*	80.6 \pm 1.4*	72.6 \pm 2.8*
	100	82.5 \pm 3.1**	76.5 \pm 1.2**	68.4 \pm 1.8**	38.0 \pm 0.1**
	200	75.3 \pm 0.1**	62.0 \pm 2.8**	54.8 \pm 1.1**	20.7 \pm 1.1**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 红三叶总异黄酮作用 72 h 对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of red clover total isoflavones on proliferation of MCF-7 cells treated for 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
对照	—	0.386 \pm 0.031	—
5-Fu	5.0	0.282 \pm 0.022**	26.9
	10.0	0.226 \pm 0.016**	41.5
红三叶总异黄酮	25.0	0.354 \pm 0.024** Δ	8.3
	50.0	0.312 \pm 0.018** Δ	19.2
	100	0.264 \pm 0.014** Δ	31.6
	200	0.212 \pm 0.020** Δ	45.1

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较: $\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 5-Fu group

2.2 原位凋亡细胞检测:光镜 ($\times 200$) 下观察可见,红三叶总异黄酮作用 48、96 h 后,细胞凋亡指数明显高于溶剂对照组。红三叶总异黄酮作用 48、96 h 组细胞凋亡率分别为 (8.49 \pm 1.07)%、(13.28 \pm 2.07)%,而溶剂对照组的凋亡指数分别为 (2.82 \pm 1.34)%、(3.02 \pm 1.26)%。差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

2.3 流式细胞仪分析结果:流式细胞仪分析显示,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红三叶总异黄酮作用于 MCF-7 细胞 48、96 h,细胞凋亡率显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$),见表 3。红三叶总异黄酮作用 72 h, MCF-7 细胞产生明显的亚 G_1 期峰。同溶剂对照组比较, G_2/M 期细胞百分比增加, G_0/G_1 期细胞百分比下降, S 期细胞两者比例相近,细胞滞留于 G_2/M 期。处理

组凋亡细胞占 9.32%。见表 4。

表 3 红三叶总异黄酮对 MCF-7 细胞凋亡率的影响

Table 3 Effect of red clover total isoflavones on apoptosis of MCF-7 cells

组别	作用时间/ h	流式细胞仪	
		原位凋亡检测 细胞凋亡率/%	分析凋亡率/%
对照	48	2.82±1.34	2.76±1.18
	96	3.02±1.26	2.86±1.24
红三叶总异黄酮	48	8.49±1.07*	8.86±1.08*
	96	13.28±2.07*	12.65±1.84*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

表 4 红三叶总异黄酮(作用 72 h)对 MCF-7 细胞周期分布的影响

Table 4 Effect of red clover total isoflavones (treated for 72 h) on cell cycles of MCF-7 cells

组别	细胞周期/%			凋亡率/ %
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	68.24±2.34	27.84±2.20	3.92±0.60	—
红三叶总异黄酮	59.47±3.78	29.93±2.26	11.60±0.47	9.32±0.42

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

3 讨论

红三叶为优良饲料和牧草,含有植物雌激素,其有效成分为异黄酮类^[1,2],具有弱雌激素作用、抗氧化作用、抗癌作用等,国外民间应用其花、种子、植株及根部制膏、浸膏、糊剂、煎剂和泡茶饮用,能有效地预防和治疗动脉硬化、冠心病、妇女更年期综合征、骨质疏松、乳腺癌、前列腺癌、肥胖症等疾病^[3~6]。近来的研究发现,异黄酮类对肿瘤细胞的影响是多途径、多机制的,除具有雌激素样作用外,另一条重要的途径是影响细胞周期,通过诱导细胞凋亡抑制细胞增殖。

MCF-7 细胞为雌激素受体阳性(ER+)细胞株之一。本实验结果提示,低质量浓度红三叶总异黄酮(<25.0 μg/mL)对 MCF-7 细胞表现出轻微促增殖作用,高质量浓度时表现为抑制作用,且随着质量浓度的升高呈明显的量-效关系。与 Nakagawa H 等^[6]报道一致,分析可能的原因是,红三叶总异黄酮的不同成分有雌激素活性或抗雌激素作用,在低、高剂量时,与 ERα、ERβ 有不同的亲和力,通过不同的

胞内信号途径,刺激或抑制雌激素依赖性乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖。而高剂量时,因其中活性成分的化学结构与雌二醇相似,可与胞内的雌激素受体结合,启动 TGF-β1 信号转导途径,上调 P53、P21 等抑癌蛋白的合成,下调 C-myc 的转录;上调 Bax 蛋白、下调 Bcl-XL 蛋白及激活 caspase-3,使肿瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是细胞的一种自杀过程,肿瘤 Unlimited 增生的恶性生物学特征与肿瘤细胞凋亡减少有关,增加肿瘤细胞凋亡是一种有效治疗肿瘤的手段^[7,8]。本实验通过 TUNEL 法,光镜下可见,随药量增大,抑制作用增强,细胞凋亡也逐渐明显。流式细胞仪分析显示,红三叶总异黄酮组 MCF-7 细胞滞留于 G₂/M 期,出现明显的亚 G₁期峰[凋亡细胞占(9.32±0.42)%]。上述实验结果表明,红三叶总异黄酮对 MCF-7 细胞生长有抑制作用,其机制与诱导癌细胞凋亡、阻滞细胞周期进程有关。

References:

- [1] Li C M, Xiang Y, Zhai L, et al. Research on the technology of extraction and purification of total isoflavones from the red clover [J]. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2004, 35(10): 1135-1136.
- [2] Pumford S L, Morton M M, Turkes A, et al. Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39(3): 281-292.
- [3] Booth N L, Overk C R, Yao P, et al. Seasonal variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(4): 1277-1282.
- [4] Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, et al. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in postmenopausal women [J]. *Proc Nutr Soc*, 2006, 65(1): 76-92.
- [5] Overk C R, Yao P, Chadwick L R, et al. Comparison of the *in vitro* estrogenic activities of compounds from hops (*Humulus lupulus*) and red clover (*Trifolium pratense*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16): 6246-6253.
- [6] Nakagawa H, Yamamoto D, Kiyozuka Y, et al. Effects of genistein and synergistic action in combination with eicosapentaenoic acid on the growth of breast cancer cell lines [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(8): 448-454.
- [7] Hino N, Higashi T, Nouse K, et al. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma [J]. *Liver*, 1996, 16(6): 123-129.
- [8] Kerr G F, Winterford C M, Hannon B V, et al. Apoptosis and its significance in cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73(8): 2013-2026.

保护植被 造福人类