

• 药效学评价 •

芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期基因和蛋白表达的影响

周瑞娟¹, 陈红风², 叶媚娜², 徐乐勤^{1*}

1. 福建中医药大学附属厦门中医院乳腺胸外科, 福建 厦门 361009

2. 上海中医药大学附属龙华医院乳腺科, 上海 200032

摘要: 目的 观察芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期相关基因和蛋白表达的影响。方法 乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231 经 0、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花素作用 48 h 后, 分别采用 Trizol 和 RIPA 裂解细胞, 收集细胞的总 RNA 和总蛋白, 进一步采用实时定量 PCR 技术和 Western blotting 技术检测细胞周期调控因子 cyclin D1、cyclin E、p21、p27 的基因和蛋白表达情况。结果 3 种乳腺癌细胞 cyclin D1 和 cyclin E 的基因及蛋白表达水平随着药物浓度的增加而降低, 而 p21 和 p27 的基因和蛋白表达水平随药物浓度的增加而升高, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 芒柄花素可以通过调控 cyclin D1、cyclin E、p21 和 p27 基因和蛋白的表达, 将乳腺癌细胞阻滞于 G1 期, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖。

关键词: 芒柄花素; 乳腺癌; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)03-0362-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.006

Effects of formononetin on expression of cell cycle—related genes and proteins in different subtypes of breast cancer cell lines

ZHOU Rui-juan¹, CHEN Hong-feng², YE Meina², XU Le-qin¹

1. Department of Breast and Chest Surgery, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Xiamen, 361009, China

2. Department of Breast Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of formononetin on expression of cell cycle related genes and proteins in different subtypes of breast cancer cell lines. **Methods** Three subtypes of breast cancer cell lines, MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231, were treated with different concentrations of formononetin for 48 h. Total RNA and protein from breast cancer cells were extracted with Trizol and RIPA method. Then the gene and protein expression of cyclin D1, cyclin E, p21 and p27 were assayed by real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** After treated with formononetin, the levels of gene and protein expression of cyclin D1 and cyclin E were down-regulated in breast cancer cells, however those of p21 and p27 were up-regulated. **Conclusion** Formononetin could arrest breast cancer cell in G₁ phase, through regulating the gene and protein expression of cyclin D1, cyclin E, p21 and p27.

Key words: formononetin; breast cancer; cell proliferation; cell cycle

乳腺癌的诊治已进入分类治疗时代, 不同基因表型或分子亚型的乳腺癌患者, 其诊治及预后存在很多差异^[1]。中医药在乳腺癌综合治疗, 尤其是防治术后复发转移方面的作用, 日益受到广大学者和患

者的重视。本课题组针对扶正类中药对乳腺癌细胞增殖的影响开展了一系列的研究^[2-3], 前期研究结果表明, 黄芪及其提取物能够抑制乳腺癌细胞增殖^[4-6], 其有效组分芒柄花素可以将乳腺癌细胞阻滞于 G1

收稿日期: 2016-03-08

基金项目: 福建省自然科学基金青年创新项目 (2014D013); 厦门市科技计划项目 (3502Z20154052); 厦门市中医后备人才项目。

作者简介: 周瑞娟 (1983—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向为中医药防治乳腺癌复发、转移研究。Tel: (0592)5579883 E-mail: zrzj0104@163.com

*通信作者 徐乐勤 (1981—), 男, 博士, 研究方向为中医药防治乳腺癌研究。Tel: (0592)5579627 E-mail: xuleqin@163.com

期^[7], 然而, 其具体的分子机制尚不明确。为此, 本实验采用实时定量 PCR 和 Western blotting 技术, 从基因和蛋白水平研究芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期阻滞的分子机制, 进一步为临床应用芒柄花素防治乳腺癌提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞株 MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231, 均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品及主要试剂

芒柄花素 (中国食品药品检定研究院, 批号 111703-200602, 质量分数 $\geq 98\%$); 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司); McCoy's 5A、EMEM 及 L-15 液体培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Gibco 公司); 逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Cyclin D1、Cyclin E、p21、p27 抗体 (英国 Abcam 公司); BCA 试剂盒 (美国 Thermo 公司)。

1.3 主要仪器

3111 细胞培养箱, Thermo Fisher Scientific 公司; TH4-200 倒置相差显微镜, OLYMPUS 公司; Mastercycler personal 5332 逆转录 PCR 仪, Eppendorf 公司; RG-3000A real-time PCR 仪, Rcorbett 公司; Multiskan Mk 3 酶标仪, Thermo Labsystems 公司; 1653311 Western blotting 制胶装置, 041BR66661 垂直电泳仪、电转仪, 美国 BIO-RAD 公司; LICOR ODYSSEY CLx Odyssey 双色红外激光成像系统, 美国 LICOR 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 细胞采用含 0.01 mg/mL 胰岛素和 10%

FBS 的 EMEM 培养基置于 37 °C、95% 空气、5% CO₂ 的无菌培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次; 待细胞生长至 80%~90% 时, 采用 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 比例传代。

SK-BR-3 细胞采用含 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基置于 37 °C、95% 空气、5% CO₂ 的无菌培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次; 待细胞生长至 80%~90% 时, 采用 0.25% 胰酶消化, 按 1:2 比例传代。

MDA-MB-231 细胞采用含 10% FBS 的 L-15 培养基置于 37 °C、无 CO₂ 的无菌培养箱中培养, 换液及传代方法同 MCF-7 细胞。

2.2 实时定量 PCR

3 种乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231, 按 2×10^4 /mL、每瓶 5 mL 的细胞密度, 接种于 25 mL 培养瓶中。培养 48 h 后, 每种细胞各分为 3 组: 芒柄花素 0、40、80 $\mu\text{mol/L}$ ^[8]组, 0 $\mu\text{mol/L}$ 组加入 2 μL DMSO。

经药物作用 48 h 后^[8], PBS 清洗 2 遍, 加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 将裂解液转移至 1.5 mL EP 管中。常规提取 RNA, 经紫外分光光度计测定纯度和浓度, 逆转录成 cDNA, 随后进行实时荧光定量 PCR 检测 Cyclin D1、Cyclin E、P21 及 P27 的基因表达情况, GAPDH 作为内参。

采用 ΔC_t 法进行统计分析 (C_t 为循环阈值), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示各组间各基因的表达差异。根据 GenBank 检索目的基因序列设计引物, 采用 primer 5 软件设计扩增引物序列, 由华大基因公司合成引物序列。各基因名称和序列见表 1。

2.3 Western blotting 检测细胞周期相关蛋白的表达情况

细胞培养及分组给药同“2.2”项, 经药物作用

表 1 引物序列及产物长度
Table 1 Primer sequences and product length

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
Cyclin D1	正向引物	TGATGCTGGGCACTTCACTG
	反向引物	TCCAATCATCCCGAATGAGAGTC
Cyclin E	正向引物	CACTCTACACAGTCACGGGACAAAG
	反向引物	TCTGGTGAAGGTCCATGAGACAAG
P21	正向引物	AAGACCATGTGGACCTGTCACTGT
	反向引物	GAAGATCAGCCGGCGTTTG
P27	正向引物	CAAATGCCGGTTCTGTGGAG
	反向引物	TCCATTCCATGAAGTCAGCGATA
GAPDH	正向引物	AACGGATTGGTCGTATTG
	反向引物	CTGGAAGATGGTGATGGG

48 h 后, 去除培养液, PBS 清洗 2 遍, 加入 500 μ L RIPA 裂解液裂解细胞, 常规提取细胞总蛋白, 随后采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 并应用 Western blotting 技术检测 Cyclin D1、Cyclin E、P21、P27 及 GAPDH 的蛋白表达情况。GAPDH 作为内参。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行灰度值分析。

2.4 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。对各组数值变量进行正态性分析, 不符合正态分布的数据采用非参数检验; 符合正态分布的数据, 进一步检验方差齐性。方差齐时, 多组数据间的比较采用单因素方差分析 LSD-t 法检验; 方差不齐时, 两组间数据比较采用非参数检验, 多组数

据间的比较采用单因素方差分析 Dunnett's T3 法检验。

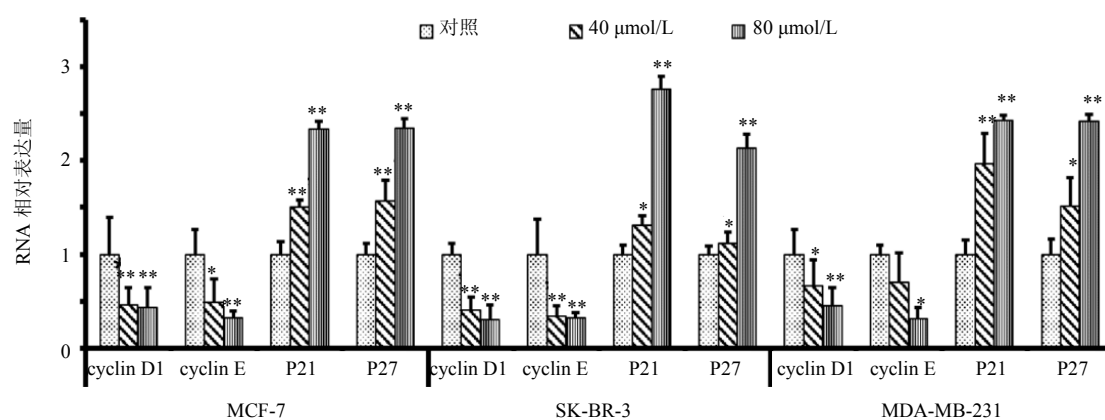
3 结果

3.1 对细胞周期 G1 期相关基因的影响

cyclin D1 和 cyclin E 的表达水平随着芒柄花素浓度的增加而降低, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01); P21 和 P27 的表达水平随着芒柄花素浓度的增加而升高, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。

3.2 对细胞周期 G1 期相关蛋白表达的影响

cyclin D1 和 cyclin E 的蛋白表达随着芒柄花素浓度的增加而降低, p21 和 p27 的蛋白表达随着芒柄花素浓度的增加而升高, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 2。



与 0 μ mol/L 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 0 μ mol/L group, same as below

图 1 cyclin D1、cyclin E、p21 和 p27 的基因表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Gene expression of cyclin D1, cyclin E, p21, and p27 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

芒柄花素是黄芪的有效组分之一, 具有多种抗癌作用。①诱导肿瘤细胞凋亡, 通过上调凋亡基因或蛋白的表达, 从而诱导乳腺癌细胞^[9-10]、骨肉瘤细胞^[11-12]、前列腺癌细胞^[13-16]、肺癌细胞^[17]发生凋亡; ②调控肿瘤细胞周期, 通过 PI3K/AKT 信号通路调控宫颈癌 HeLa 细胞的有丝分裂^[18]; 还可通过 IGF1/PI3K/Akt 信号通路调控乳腺癌细胞周期^[19], 通过 Akt/Cyclin D1/CDK4 信号通路将前列腺癌细胞阻滞于 G0/G1 期^[20]; ③抑制肿瘤细胞迁移, 可通过 PI3K/AKT/MMPs 信号通路调控乳腺癌细胞的迁移能力^[8]。本课题组的前期实验结果表明, 芒柄花素对 3 种乳腺癌细胞各用药组均出现 G1 期细胞比例增多。由此证明, 芒柄花素可以通过阻滞细胞周期于 G1 期来达到抑制细胞增殖目的。

乳腺癌的发生、发展与细胞周期调控因子的异常表达密切相关。细胞周期的正常运行依赖于正、负调节因子的共同参与。正调节因子包括细胞周期蛋白 (cyclin) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinase, CDK); 负调节因子主要是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)。以上 3 种调控因子在维持细胞有序的增殖、分裂活动中起重要作用, 3 者相互作用, 共同参与细胞周期调控。细胞周期分为分裂间期和分裂期, 其中分裂期又可分为: DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期 (G2 期)。有丝分裂期 (M 期) 可分为前、中、后、末 4 期。在一个完整的细胞周期运行过程中, 存在有 3 个检测点 (check point), 分别为 G1/S 检测点、G2/M 检测点和纺锤体组装检测点。由于细

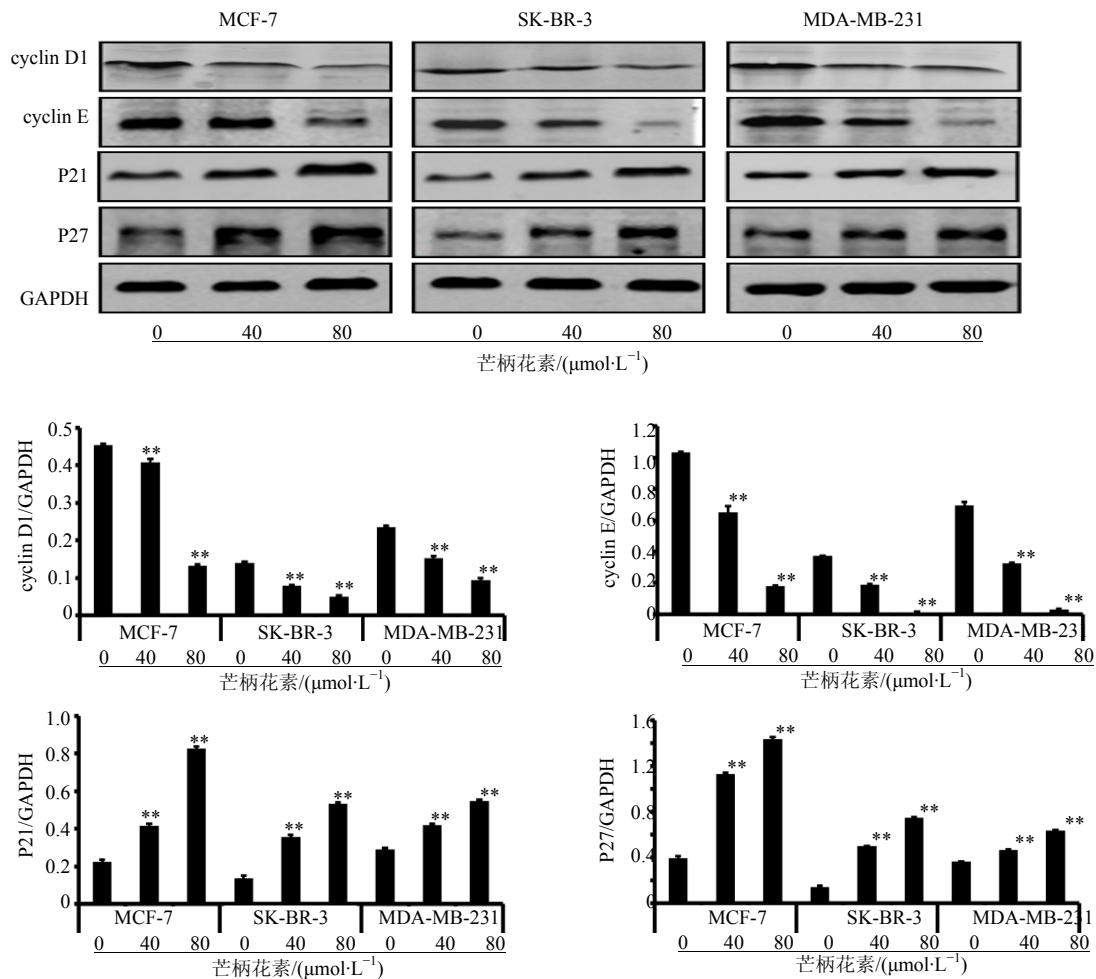


图2 cyclin D1、cyclin E、p21 和 p27 的蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Protein expression of cyclin D1, cyclin E, p21, and p27 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞一旦通过 G1/S 检测点, 其可不再依赖外源性信号的刺激就能自主完成细胞周期, 所以 G1/S 检测点被认为是最为重要的细胞限制点^[21]。细胞恶性化的核心事件—细胞周期进程破坏也常发生于G1期。而在细胞 G1/S 转换中起重要作用的调节因子有 Cyclin D1、Cyclin E、p21 及 p27。细胞受到生长因子的刺激, 通过活化细胞膜上的酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinases, RTKs), 进一步经 Ras/MEK/ERK 或 PI3K/Akt 等多条信号通路将增殖信号传至细胞内部, 促使细胞表达 cyclin D, 从而活化 CDK4/6, 使 pRb 蛋白磷酸化^[22]。磷酸化后的 Rb 与转录因子 E2F 分离, 促使细胞表达 cyclin E 并与 CDK2 结合, 使得细胞进入 S 期, 开始进行 DNA 复制。p27 与 p21 属于 CKI, 共同抑制 cyclin/CDK 形成的异二聚体结构^[23], 使细胞停滞于 G1 期, 从而实现对细胞周期调控功能^[24]。

本实验结果显示, 芒柄花素可减少乳腺癌细胞 G1/S 期正调控因子 cyclin D1 和 cyclin E 的基因和蛋白表达; 并可促进负调控因子 p21 和 p27 的基因和蛋白表达。这可能是芒柄花素调控细胞周期, 将乳腺癌细胞阻滞于 G1 期的分子机制。

参考文献

- [1] Goldhirsch A, Wood W C, Coates A S, *et al.* Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8): 1736-1747.
- [2] 周瑞娟, 陈红风. “扶正固本”防治乳腺癌术后复发转移的意义 [J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(1): 60-62.
- [3] 周瑞娟, 陈红风. 中药影响乳腺癌细胞周期的研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(1): 100-104.
- [4] 邓樱, 陈红风. 黄芪注射液及其有效成分对乳腺癌细胞增殖和 Akt 磷酸化的影响 [J]. *中西医结合学报*,

- 2009, 7(12): 1174-1180.
- [5] 叶媚娜, 陈红凤. 黄芪注射液对 basal-like 型乳腺癌细胞 MDA-MB-468 增殖的影响 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6(4): 399-404.
- [6] 叶媚娜, 陈红凤, 周瑞娟, 等. 黄芪多糖对基底细胞样乳腺癌细胞增殖和 Akt 磷酸化的影响 [J]. 中西医结合学报, 2011, 12(9): 1339-1346.
- [7] 周瑞娟, 陈红凤, 叶媚娜, 等. 芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(9): 1051-1055.
- [8] Zhou R, Xu L, Ye M, *et al.* Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(11): 753-760.
- [9] Chen J, Zhao X, Ye Y, *et al.* Estrogen receptor beta-mediated proliferative inhibition and apoptosis in human breast cancer by calycosin and formononetin [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6): 1790-1797.
- [10] Chen J, Sun L. Formononetin-induced apoptosis by activation of Ras/p38 mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor-positive human breast cancer cells [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(13): 943-948.
- [11] Hu W, Xiao Z. Formononetin Induces Apoptosis of human osteosarcoma cell line u2os by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3): 933-939.
- [12] Liu Y, He J, Chen X, *et al.* The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 637-645.
- [13] Huang W J, Bi L Y, Li Z Z, *et al.* Formononetin induces the mitochondrial apoptosis pathway in prostate cancer cells via downregulation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2013, 52(4): 466-470.
- [14] Liu X J, Li Y Q, Chen Q Y, *et al.* Up-regulating of RASD1 and apoptosis of DU-145 human prostate cancer cells induced by formononetin *in vitro* [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6): 2835-2839.
- [15] Ye Y, Hou R, Chen J, *et al.* Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(4): 263-267.
- [16] Zhang X, Bi L, Ye Y, *et al.* Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4): 656-661.
- [17] Yang Y, Zhao Y, Ai X, *et al.* Formononetin suppresses the proliferation of human non-small cell lung cancer through induction of cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8453-8461.
- [18] Jin Y M, Xu T M, Zhao Y H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-cancer activity of formononetin on human cervical cancer cell line HeLa [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 2279-2284.
- [19] Chen J, Zeng J, Xin M, *et al.* Formononetin induces cell cycle arrest of human breast cancer cells via IGF1/PI3K/Akt pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(10): 681-686.
- [20] Li T, Zhao X, Mo Z, *et al.* Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1351-1358.
- [21] Caldon C E, Daly R J, Sutherland R L, *et al.* Cell cycle control in breast cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(2): 261-274.
- [22] Massague J. G1 cell-cycle control and cancer [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 298-306.
- [23] Hernando E, Nahle Z, Juan G, *et al.* Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control [J]. *Nature*, 2004, 430(7001): 797-802.
- [24] Le X F, Claret F X, Lammayot A, *et al.* The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(26): 23441-23450.