

文章编号: 1007- 2985(2008) 02- 0106- 06

5, 4'- 二- 正辛烷氧基- 7- 二氟亚甲基异黄酮抑制人乳腺癌细胞生长和诱导凋亡的作用*

郑芳¹, 向其德¹, 姜浩¹, 曹建国²

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 探讨金雀异黄素(Genistein, Gen) 衍生物 5, 4'- 二- 正辛烷氧基- 7- 二氟亚甲基异黄酮(5, 4'- Di- n-octoxyl- 7- gem- difluoromethylene- genistein, DOdFMG) 体外抑制人乳腺癌细胞系 MCF- 7 细胞生长和诱导凋亡作用及机制, 以寻找具有开发前景的肿瘤治疗新候选药物。方法 体外培养人乳腺癌细胞系(MCF- 7) 细胞, 分别应用不同浓度的 DOdFMG 处理人乳腺癌细胞系(MCF- 7) 细胞, 软琼脂克隆形成法测定 DOdFMG 对体外培养 MCF- 7 细胞的锚定非依赖性增殖及生长作用的影响; PI 染色流式细胞计分析(FCM) 法检测 DOdFMG 对 MCF- 7 细胞诱导凋亡影响。western blotting 法检测蛋白激酶 CK2, NF- KB 蛋白表达和活性的变化, 初步探讨 DOdFMG 抗乳腺癌作用的分子机制。结果 DOdFMG 对体外培养 MCF- 7 细胞具有抑制增殖及生长作用, 呈剂量依赖性。DOdFMG 诱导人 MCF- 7 细胞凋亡。Western Blot 分析结果显示: DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理人乳腺癌 MCF- 7 细胞 24 h 后, 比较于空白对照组, 蛋白激酶 CK2 的表达下调 12.50%, 41.50%, 67.30%, NF- KB 的表达下调 20.50%, 51.47%, 71.93%。DOdFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 6, 12, 24 h 后, 比较于空白对照组, 蛋白激酶 CK2 的表达下调 27.73%, 44.8%, 65.2%, NF- KB 的表达下调 20.50%, 49.83%, 69.93%。这表明 DOdFMG 以时间- 剂量依赖方式引起蛋白激酶 CK2, NF- KB 下调, 与先导化合物 Gen 比较, DOdFMG 更为有效($P < 0.05$)。结论 DOdFMG 显著抑制人乳腺癌细胞系(MCF- 7) 细胞增殖及生长; DOdFMG 可诱导人乳腺癌细胞系(MCF- 7) 细胞凋亡; 抑制蛋白激酶 CK2, 下调 NF- KB 的表达可能是 DOdFMG 诱导凋亡的分子机制之一。

关键词: 乳腺癌; 金雀异黄素; 5, 4'- 二- 正辛烷氧基- 7- 二氟亚甲基异黄酮; 蛋白激酶 CK2

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

乳腺癌是危害妇女健康和生命的主要恶性肿瘤之一, 近年来, 随着乳腺癌基础与临床研究的深入, 特别是采用了合理的综合治疗, 乳腺癌的疗效显著提高, 而化学治疗与内分泌治疗在乳腺癌综合治疗中占有非常重要的地位, 但是, 现有的抗肿瘤药物也面临着严重的挑战, 不少抗肿瘤药物在临床应用过程中产生耐药性, 许多抗肿瘤药物还存在着严重毒副作用, 这常导致治疗失败或治疗后肿瘤缓解期短^[1]。因此, 新型抗肿瘤药物开发研究势在必行。金雀异黄素是天然的受到广泛关注的肿瘤化学预防剂, 但因其体内的吸收差, 难以在体内达到有效的药物浓度, 因而限制了它在体内的抗肿瘤作用的发挥^[2], 迟迟不能应用于临床。笔者通过对金雀异黄素引入具有较强亲脂活性的二氟亚甲基和提高生物活性的烷氧基获得其衍生物 5, 4'- 二- 正辛烷氧基- 7- 二氟亚甲基异黄酮(DOdFMG), 进一步探讨新合成的金雀异黄素衍生物的抗肿瘤活性, 为开发研制临床乳腺癌治疗新药提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂

DOdFMG 由湖南师范大学医学院药理学系药物化学室合成, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{F}_2$, 分子量 544, 性状黄色粉末, 纯度 98%。PRMI- 1640 培养基、胰酶为 Gibco 公司产品; 新生小牛血清购于杭州四季青生物工程公司。三苯氧胺(TAM)、Gen 为 Sigma 公司产品。Ck2, NF- KB, 抗体购自 Santa Cruz 公司, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天公司。

* 收稿日期: 2007- 11- 28

作者简介: 郑芳(1982-), 女, 湖南汨罗人, 南华大学附属第一医院硕士研究生, 主要从事肿瘤内科研究。

1.2 细胞与细胞培养

人乳腺癌 MCF-7 细胞购于中南大学湘雅医学院细胞中心,细胞培养于含 10% 灭活小牛血清 PRMI-1640 培养基中,37 °C、5% CO 混合气体、95% 饱和湿度的培养箱内培养.均取对数生长期的细胞用于实验.

1.3 实验方法

1.3.1 软琼脂克隆形成法 取对数生长期 MCF-7 细胞用完全培养基调整细胞浓度为 1×10^3 /mL,充分吹散成单细胞悬液后接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 450 μ L,培养 8 h,待细胞贴壁后在倒置显微镜下拍照,次日待其充分贴壁后加入 50 μ L 药物,使 DOdFMG 终浓度分别为 3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L,阳性对照组加入 5 μ mol/L 的 TAM,先导对照组加入 30 μ mol/L 的 GEN,每浓度设 3 个复孔,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱中继续培养,以对照组形成 30~50 个细胞为一团的克隆为准,结束培养(一般 6~8 d),在倒置荧光显微镜下观察拍照,计数每孔的细胞克隆数,计算集落抑制率.集落抑制率=(对照组克隆均数-实验组克隆均数)/对照组克隆均数 \times 100%.

1.3.2 流式细胞仪分析 取常规传代的 MCF-7 细胞数瓶,用含 0.1% 的小牛血清的培养基处理 24h 进行细胞周期同步化后,分别加入不同浓度 DOdFMG 使其终浓度分别为 3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L,先导化合物对照品 GEN 终浓度为 30.0 μ mol/L,溶媒对照组加入相同体积含终浓度为 0.1% DMSO 的完全培养基分别处理 48 h 后,收集细胞,用 PBS 吹打细胞成单细胞悬液,离心,冷 PBS 洗 2 遍,用 4 °C 的 70% 乙醇固定 24 h 后,经碘化丙啶 (PI) 染色,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况.

1.3.3 Western Blot 在 MCF-7 细胞中分别加入不同浓度 DOdFMG 使其终浓度分别为 3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L,先导化合物对照品 GEN 终浓度为 30 μ mol/L,溶媒对照组加入相同体积含终浓度为 0.1% DMSO 的完全培养基,处理 24 h 后,收集细胞,用 PBS 洗 3 次,用细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-cl. (pH 值 7.6), 0.001 mol/L EDTA(pH 值 8.0), 1 mg/L Aprotinin, 100 mg/L PMSF) 裂解后,4 °C, 13 000 r/min 离心 10 min,用酶联免疫检测仪进行蛋白定量.

取提取的蛋白样品(25 μ g 总蛋白/泳道)加入等体积上样缓冲液,100 °C 煮 10 min,10% 或 6% SDS-PAGE 电泳后转移(105 mA 3 h)至 PVDF 膜上.用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 2 h,1:200 加入 CK2、NF- κ B 于 37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜;TBST 洗涤 30 min,每 10 min 换液 1 次,加入相应的二抗室温孵育 1 h 后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min.然后在含化学发光剂 A、B 的溶液中激发荧光,于暗室中压片,显影、定影.结果用图像分析仪分析,以面积和光密度的乘积为积分光密度表示.

1.4 统计学处理

计量资料用均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$),采用成组 t 检验或 χ^2 检验,采用 SPSS13.0 for Windows 统计分析软件进行统计学分析. $P < 0.05$ 为统计显著差异标准.

2 结果

2.1 软琼脂克隆形成法检测 DOdFMG 对 MCF-7 细胞锚定非依赖性生长的影响

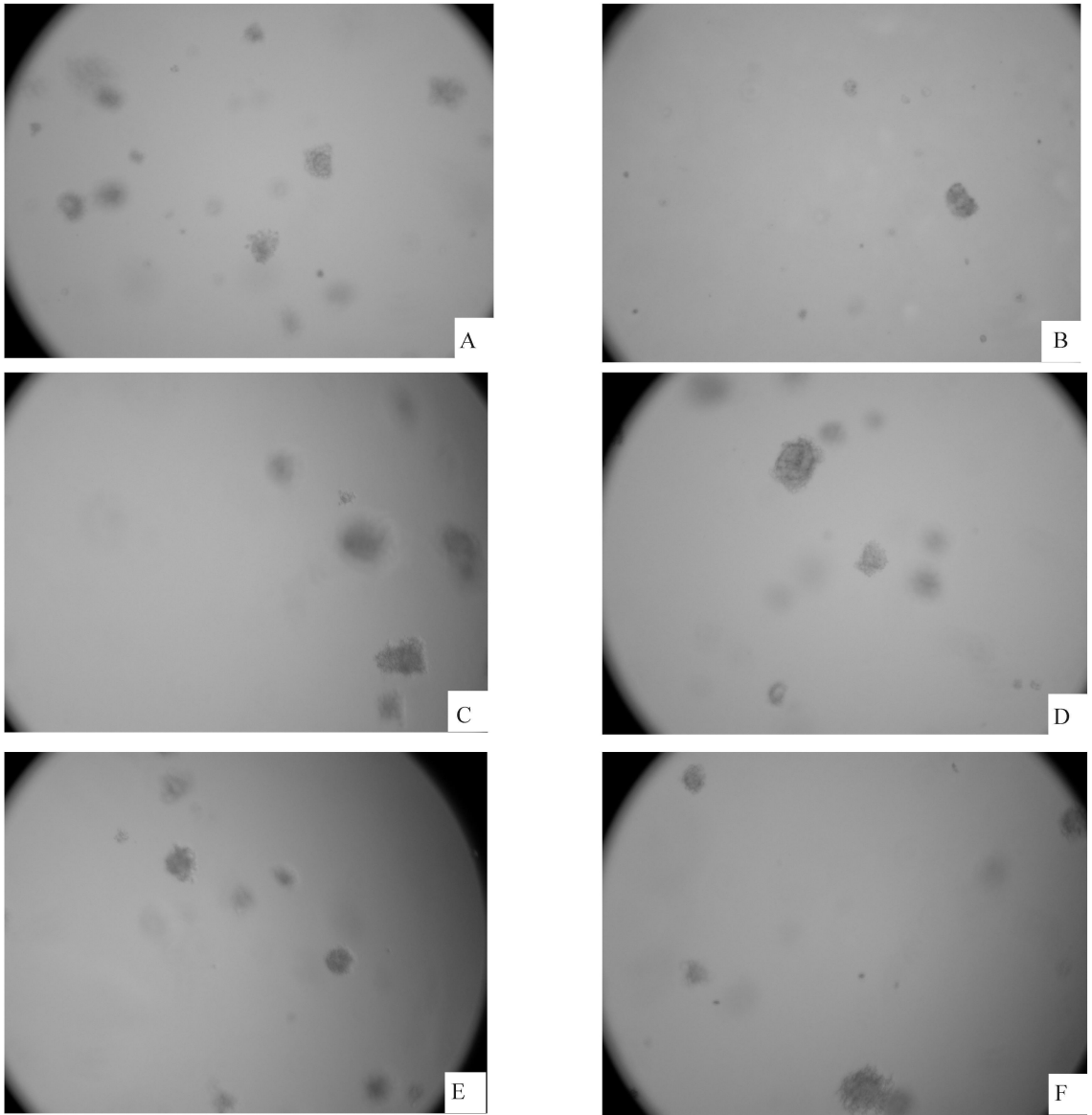
通常认为集落抑制率超出 50% 者,可认为药物具有明显抗肿瘤活性,本实验结果显示 DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L, GEN 30.0 μ mol/L 及 TAM 5.0 μ mol/L 对人 MCF-7 细胞的抑制率分别为 21.99%, 41.68%, 63.68%, 48.59% 和 75.44%, DOdFMG 30.0 μ mol/L 较 GEN 30.0 μ mol/L 组具有明显较强抗肿瘤活性($P < 0.05$).表明 DOdFMG 对体外培养人乳腺癌细胞系(MCF-7)细胞具有抑制生长作用,呈剂量依赖性(图 1A-F).其 IC₅₀ 为 14.94 μ mol/L.

图 1 及图 2 显示 DOdFMG 对 MCF-7 细胞的克隆形成具有显著的抑制作用,且呈剂量依赖性,相应浓度的 DOdFMG 的克隆抑制率明显高于先导化合物 Gen,其差别具有统计学意义($P < 0.05$)

2.2 PI 染色流式细胞计分析(FCM)法检测 DOdFMG 对 MCF-7 细胞诱导凋亡影响

PI 染色 FCM 分析显示,凋亡细胞呈特征性亚二倍峰,这是细胞凋亡时,DNA 断裂生成小的 DNA 片段,从细胞内释放的结果,可通过凋亡峰面积检测凋亡细胞在整个细胞群中的比例.本实验中用不同浓度的 DOdFMG(3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L) 及 30.0 μ mol/L GEN 和 5.0 μ mol/L TAM 分别处理细胞 48 h,采用 PI 染色流式细胞术进行检测.流式细胞仪检测结果显示(表 1,图 3),DOdFMG 对 MCF-7 具有诱导凋亡的作用,以 30

$\mu\text{mol/L}$ 浓度时更为明显, 凋亡率为 22.97%, 其高于 30.0 $\mu\text{mol/L}$ GEN 的凋亡率 14.95%, 与空白组比较具有显著统计学差异. 而且凋亡率随药物浓度的增高而升高, 呈浓度依赖性.



A—空白组细胞; B—TAM 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; C—Gen 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; D—DodFMG 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; E—DodFMG 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; F—DodFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 1 DOdFMG 对 MCF-7 细胞集落生长的抑制作用(10 \times)

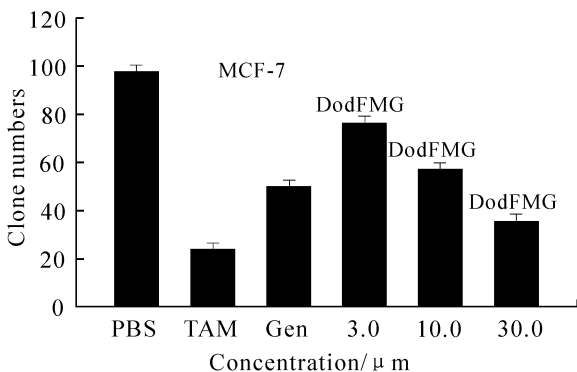


图 2 GEN, DOdFMG, TAM 对 MCF-7 细胞集落形成能力的影响

表 1 FCM 检测 DOdFMG 对 MCF-7 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	凋亡率% ($\bar{x} \pm s$)
Control		1.99 \pm 0.18
GEN	30.0	14.95 \pm 2.54* \blacktriangledown
TAM	5.0	28.43 \pm 2.31* \blacktriangledown
DOdFMG	3.0	5.55 \pm 0.38* \blacktriangledown
DOdFMG	10.0	9.89 \pm 1.05* \blacktriangledown
DOdFMG	30.0	22.97 \pm 2.83* \blacktriangledown

注 * —与对照组比较 $P < 0.05$; \blacktriangledown —用药组两两比较 $P < 0.05$

DOdFMG 诱导 MCF- 7 细胞凋亡, 呈浓度依赖, 柱形表示 3 次实验样品测定值的均数与标准差; $P < 0.05$ 与空白对照组比较.

2.3 western blotting 法检测 DOdFMG 对 CK2, NF- κ B 蛋白表达和活性的影响

2.3.1 Western Blot 方法分析 DOdFMG 对 MCF- 7 细胞 CK2 蛋白表达的影响 经 DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 Gen 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF- 7 细胞 24 h 后, 与溶媒对照组相比 CK2 蛋白表达下调了 12.50%, 41.50%, 67.30% 和 11.33%, DOdFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 6, 12, 24 h 后, CK2 的表达较溶媒对照组分别下调了 23.73%, 44.80%, 65.20%. 表明: DOdFMG 作用于人乳腺癌 MCF- 7 细胞, 随着剂量和时间的增加, CK2 蛋白表达进行性降低.

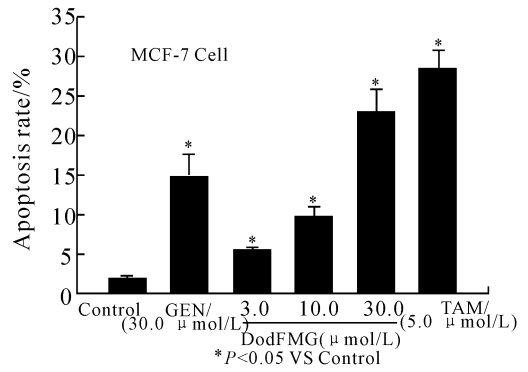


图 3 FCM 分析 DOdFMG 处理后 MCF- 7 细胞凋亡率的变化

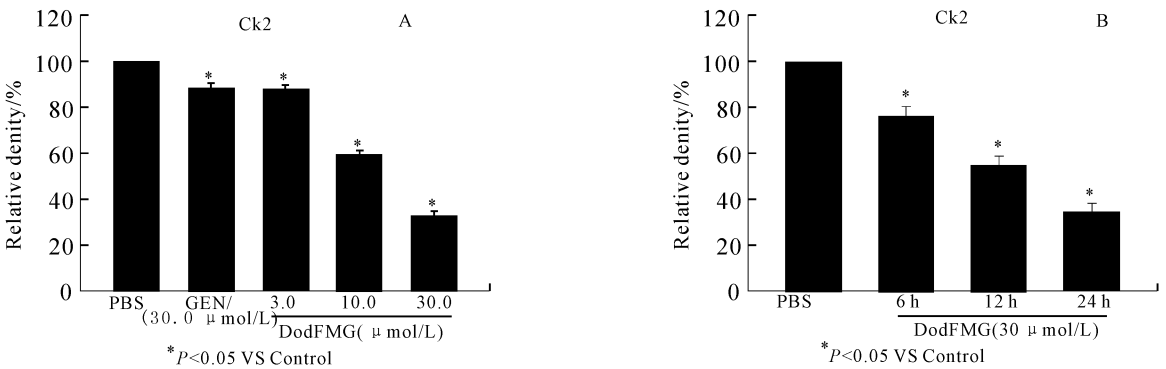
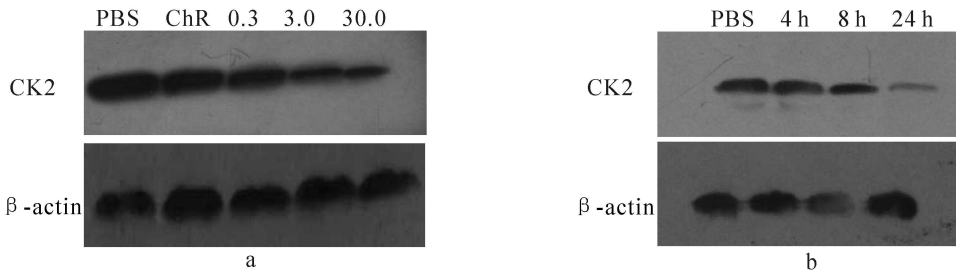


图 4 DOdFMG 对 MCF- 7 细胞 CK2 蛋白表达的影响

图 4 中, A 为 DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 Gen 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF- 7 细胞 24 h 后 CK2 蛋白表达变化, B 为 DOdFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 6, 12, 24 h 后 CK2 的表达变化. * 与 PBS 比较 $P < 0.05$.

2.3.2 Western Blot 方法分析 DOdFMG 对 MCF- 7 细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响 经 DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 Gen 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF- 7 细胞 24 h 后, 与溶媒对照组相比 NF- κ B 蛋白表达下调了 20.50%, 51.47%, 71.93% 和 18.47%, DOdFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 6, 12, 24 h 后, NF- κ B 的表达较溶媒对照组分别下调了 20.50%, 49.83%, 69.93%. 表明: DOdFMG 作用于人乳腺癌 MCF- 7 细胞, 随着剂量和时间的增加, NF- κ B 蛋白表达进行性降低.

图 5 中, A 为 DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 Gen 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 MCF- 7 细胞 24 h 后 NF- κ B 蛋白表达变化, B 为 DOdFMG 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 6, 12, 24 h 后 NF- κ B 的表达变化. * 与 PBS 比较 $P < 0.05$.

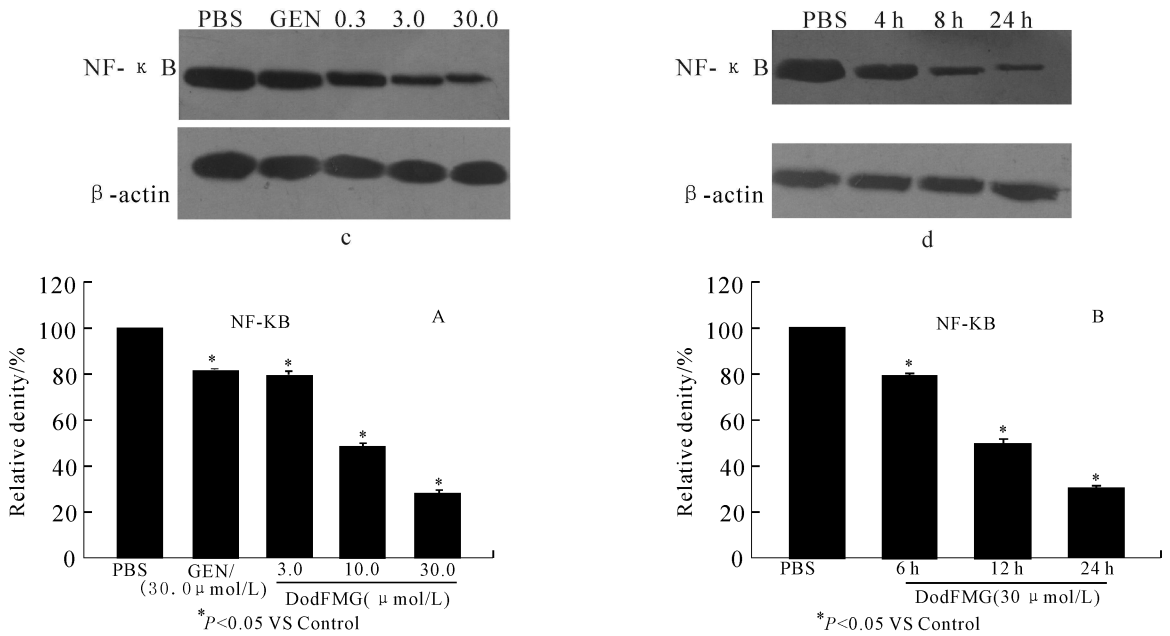


图5 DOfFMG对MCF-7细胞NF-κB蛋白表达的影响

3 讨论

母体金雀异黄酮(Genistein, Gen, 5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone)是黄酮类化合物中最具代表性的一种异黄酮类化合物,我们已有研究表明Gen和其衍生物DOfFMG可抑制体外人乳腺癌MCF-7细胞增殖和诱导凋亡作用,且Gen的衍生物DOfFMG对人乳腺癌MCF-7细胞具有更明显的细胞增殖抑制作用,并比先导化合物Gen具有更强的诱导细胞凋亡的能力^[3]。

笔者采用不同的方法并以三本氧胺作为阳性对照组,其中,软琼脂克隆法结果显示当DOfFMG浓度分别为3.0, 10.0, 30.0 μmol/L作用6~8 d后,有抑制增殖作用,30.0 μmol/L时,抑制率达到63.68%,强于同浓度的先导化合物Genistein(GEN)48.59%的抑制率。流式细胞仪检测结果显示,DOfFMG对MCF-7具有诱导凋亡的作用,以30 μmol/L浓度时更为明显,凋亡率为22.97%,其高于30.0 μmol/L GEN的凋亡率14.95%,而且凋亡率随药物浓度的增高而升高,呈浓度依赖性。进一步证实DOfFMG的抗人乳腺癌作用比先导化合物Gen更强,但其抑制MCF-7细胞生长及诱导细胞凋亡作用均低于三苯氧胺,其原因还有待进一步探讨。

蛋白激酶CK2是一种在真核细胞中普遍存在的信使非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶,它与许多生物活性有关,在许多恶性肿瘤中过表达,它可促进肿瘤细胞中抗凋亡因子细胞核因子κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)的活性^[4-6]。NF-κB是近年来发现的重要转录调控因子,其广泛存在于细胞中,与肿瘤的发生发展和侵袭转移有密切关系。乳腺癌的发病机制就与转录因子NF-κB的异常活化有关,有研究表明,在人原发性乳腺癌和培养的肿瘤细胞中,蛋白激酶CK2和NF-κB的必需调节物IKKβ及IKKα活性增高,NF-κB的另一种新的活化剂——IKKγ/IKKε的表达也增高,而高表达的CK2可增加IKKγ/IKKε的mRNA和蛋白表达水平,而且CK2能催化NF-κB的抑制蛋白IκB磷酸化能加速羧基端PEST区的降解,有利于NF-κB活化,促进抗凋亡基因的转录^[7-9]。因此,CK2具有上调NF-κB的活性,这是乳腺癌发生的一个重要因素。而研究表明,抑制蛋白激酶CK2,阻断Wnt信号传导,进而抑制NF-κB,诱导肿瘤细胞凋亡^[10]是金雀异黄酮的全新抗肿瘤机理。

为进一步探讨DOfFMG诱导凋亡的作用分子机制,我们依据其先导化合物的全新抗肿瘤作用机制,采用Western Blotting方法测定DOfFMG作用后MCF-7细胞中蛋白激酶CK2、NF-κB表达变化。结果表明DOfFMG呈剂量及时间依赖性抑制蛋白激酶CK2,下调NF-κB的表达,而且作用强于其先导化合物GEN。

综上所述,本研究以金雀异黄酮为先导化合物获得衍生物DOfFMG,对体外培养的人乳腺癌(MCF-7)细胞系细胞具有明显细胞增殖和生长抑制作用,并可能通过抑制蛋白激酶CK2,下调NF-κB的表达导致细胞凋亡。

因此, DOdFMG 是一种具有一定潜力的乳腺癌治疗新候选药物. 随着细胞信号传递系统广泛深入细致的研究, DOdFMG 抗癌作用机制将不断完善, 其在体内是否具有更强的抗肿瘤作用还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 宋丽华, 宋现让. A New Drug for Breast Cancer Treatment Herceptin [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2002, 29(1): 39-43.
- [2] KROOM P A, CLIFFORD M N, CROZIER A, et al. How Should We Assess the Effects of Exposure to Dietary Polyphenols in Vitro [J]. Am. J. Clin. Nutr., 2004, 80: 15-20.
- [3] 鲁凯莉, 姜浩, 曹建国. 5,4'-二-正辛烷氧基-7-二氟亚甲基异黄酮对人乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15: 482-484.
- [4] 阮杰, 刘新光, 梁念慈. 蛋白激酶 CK2 在信号转导中的作用及其与肿瘤发生的关系 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 574-577.
- [5] ORLANDINI M, SEMPLICI F, FERRUZZI R, et al. Protein Kinase CK2 α' is Induced by Serum as a Delayed Early Gene and Cooperates with H-Ras in Fibroblast Transformation [J]. J. Biol. Chem., 1998, 273(33): 2192-2197.
- [6] SELDIN D C, LANDESMAN-BOLLAGE E, FARAGOM, et al. CK2 as a Positive Regulator of Wnt Signalling and Tumorigenesis [J]. Mol. Cell. Biochem., 2005, 274(1-2): 63-67.
- [7] EDDY S F, GUO S, DEMICCO E G, et al. Inducible I κ B kinase Expression is Induced by CK2 and Promotes Aberrant Nuclear Factor- κ B Activation in Breast Cancer Cells [J]. Cancer Res., 2005, 65(24): 11375-11383.
- [8] 宋祖军, 王少波, 王琦. NF- κ B 的研究进展 [J]. 世界急危病医学杂志, 2007, 4(1): 1693-1696.
- [9] MILLERBS, ZANDIE. Complete Reconstitution of Human I κ B Kinase (IKK) Complex in Yeast. Assessment of Its Stoichiometry and the Role of IKK Gamma on the Complex Activity in the Absence of Stimulation [J]. J. Biol. Chem., 2001; 276(39): 36320-36326.
- [10] SONG D H, DOMINGUEZ I, MIZUNO J, et al. CK2 Phosphorylation of the Axin Repeat Region of β -Catenin Potentiates Wnt Signaling [J]. J. Biol. Chem., 2003; 278(26): 24018-24025.

Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Line by 5,4'-Di-n-octoxyl-7-gem-Difluoromethylene-Genistein in Vitro

ZHENG Fang¹, XIANG Qide¹, JIANG Hao¹, CAO Jianguo²

(1. The first Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan China; 2. Cancer Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan China)

Abstract: PURPOSE To investigate the effect and mechanism of the Genistein derivative 5,4'-Di-n-octoxyl-7-gem-difluoromethylene-genistein (DOdFMG) on the growth and apoptosis of human breast cancer (MCF-7) cells line in vitro, and provide a molecular mechanism of this effect so as to find a new candidate for tumor chemotherapy. METHODS Soft agar-colony assay was used to test colony formation inhibitory effect of MCF-7 by DOdFMG. PI stain flow cytometry (FCM) was used to analyse the apoptosis after being treated with DOdFMG. Western blotting assay was used to detect the effect of DOdFMG on the CK2 and NF- κ B protein expression level of breast cells. Results: DOdFMG significantly inhibited proliferation and growth of MCF-7 cells in dose-dependent manner. DOdFMG significantly induced apoptosis. Western blotting analysis indicated that after exposures to DOdFMG 3.0, 10.0, 30.0 μ mol/L for 24h, the protein expressions of CK2 were down-regulated by 12.50%, 41.50%, 67.30%, the protein expressions of NF- κ B were down-regulated by 20.50%, 51.47%, 71.93% respectively in comparison with the control group. After MCF-7 cells were treated with DOdFMG at 30.0 μ mol/L for 6, 12 and 24 h, the protein expressions of CK2 were down-regulated by 27.73%, 44.8%, 65.2%, the protein expressions of NF- κ B were down-regulated by 20.5%, 49.83%, 69.93% respectively in comparison with the control group. These showed that the expressions of CK2, NF- κ B were decreased in a time and dose-dependent manner after treatment with various concentrations of DOdFMG. In comparison with the lead compound Gen, DOdFMG was more effective. CONCLUSION DOdFMG possesses a significant inhibitory effect on the cell proliferation and growth of human breast carcinoma cell (MCF-7) in vitro. DOdFMG significantly induced apoptosis of human breast cancer (MCF-7) cell line. The mechanism might be associated with down-regulation of ck2 and NF- κ B.

Key words: breast cancer; Genistein; 5,4'-Di-n-octoxyl-7-gem-Difluoromethylene-genistein; CK2

(责任编辑 向阳洁)