

超氧阴离子和细胞外信号调节激酶在金雀异黄素抑制人乳腺癌细胞浸润中作用的研究

金建明¹, 杜 军^{2*}

(¹泰州职业技术学院医学院, 江苏 泰州 225300; ²南京医科大学生理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究金雀异黄素对乳腺癌细胞(MDA-MB-231)浸润能力的影响及其可能机制。方法:不同浓度的金雀异黄素(25~100 μmol/L) 孵育 MDA-MB-231 细胞 24 h,用 Transwell assay 检测细胞浸润能力;用免疫印迹法比较细胞内磷酸化和总细胞外信号调节激酶(ERK)蛋白含量的改变;用免疫荧光实验检测细胞内磷酸化 ERK 的分布;用 DHE 染色及荧光显微镜检测细胞内超氧阴离子水平。结果:金雀异黄素处理使细胞浸润能力降低;同时,金雀异黄素的处理引起细胞内磷酸化 ERK 量明显降低,且磷酸化 ERK 在核内含量明显下降;ERK 抑制剂 U0126 作用于细胞亦能明显降低细胞的浸润能力;金雀异黄素处理还能使细胞内超氧阴离子含量明显下降,超氧阴离子清除剂 TEMPOL 不仅明显抑制磷酸化 ERK 含量,同时细胞浸润能力也明显降低。结论:金雀异黄素可能通过抑制乳腺癌细胞的超氧阴离子水平和 ERK 活性,进而抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的浸润能力。**[关键词]** 金雀异黄素;乳腺癌细胞(MDA-MB-231);细胞外信号调节激酶;超氧阴离子;浸润

[中图分类号] R329.28

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1351-05

Genistein suppresses MDA-MB-231 breast cancer cells invasion via decreasing superoxide anion-dependent ERK activation

JIN Jian-min¹, DU Jun^{2*}

(¹College of Medicine, TZPC, Taizhou 225300; ²Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of genistein on the invasion of breast cancer cells (MDA-MB-231) and its possible mechanism. **Methods:** MDA-MB-231 cells were co-cultured with genistein at various concentrations (25 to 100 μmol/L) for 24 h. Cell invasion ability was studied by Transwell invasion assay. Phosphorylated ERK and total ERK proteins were quantified by Western blot analysis. Distribution of cellular phosphorylated ERK was detected by fluorescence microscope. Intracellular superoxide anion production was stained by DHE staining and detected by fluorescence microscope. **Results:** After treated with genistein for 24 h, the invasion ability of MDA-MB-231 cells was significantly reduced in a dose-dependent manner compared to the control cells. Consistently, ERK activity and p-ERK location in the nucleus also decreased after genistein treatment. Furthermore, ERK inhibitor U0126 could inhibit cell invasion similarly as genistein. In addition, superoxide anion production was suppressed when treated with genistein, and superoxide anion scavenger TEMPOL could not only suppress ERK phosphorylation, but also inhibit cell invasion. **Conclusion:** Genistein can inhibit invasive ability of MDA-MB-231 cells, probably through inhibiting the superoxide anion/ERK pathway.

[Key words] genistein; breast cancer cells (MDA-MB-231); ERK; superoxide anion; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1351-1355]

金雀异黄素(genistein)是大豆异黄酮的重要活性成分,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤细胞浸润和转移

等功能,尤其是近年来流行病学研究发现其摄入量的增多与包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生率呈明显负相关而广受关注^[1-3]。

[基金项目] 中国博士后基金(2011M501254, 2012T50484); 江苏省博士后基金

肿瘤细胞的转移涉及细胞外基质的降解、细胞脱黏附和细胞浸润能力的加强。细胞浸润能力的加强是细胞穿越组织学屏障,实现远处转移的关键。肿

*通讯作者, E-mail: dujun@njmu.edu.cn

瘤细胞内含有丰富的产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的酶系, 恶性肿瘤细胞中的 ROS 生成量明显高于正常细胞^[4], 同时, 研究发现, 金雀异黄素具有抗氧化的作用^[5]。据此, 本文推测金雀异黄素可通过改变细胞 ROS 生成量, 进而参与肿瘤细胞浸润和转移的调控。因此, 本研究旨在通过观察金雀异黄素对乳腺癌细胞 (MDA-MB-231 细胞) ROS 中重要成员超氧阴离子生成及细胞外信号调节激酶 (EPK) 的影响及可能作用机制, 为深入探讨金雀异黄素的抗肿瘤分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231 细胞, 南京凯基生物公司); 金雀异黄素 (Sigma 公司, 美国); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司, 美国); 新生牛血清 (PAA 细胞培养公司, 奥地利); 二氧化碳培养箱 (Heal Force 公司, 美国); Transwell 小室 (Corning 公司, 美国); U0126 (Sigma 公司, 美国); DHE (Upstate 公司, 美国); TEMPOL (Sigma 公司, 美国); 抗 ERK 及抗 p-ERK (Thr 202/Tyr204) 抗体 (Charlottesville 公司, 美国); β -肌动蛋白单克隆抗体 (Chemicon 公司, 美国); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (Santa Cruz 公司, 美国); ECL 化学发光剂 (Pierce 公司, 美国); 电泳仪和半干转膜仪 (Bio-Rad 公司, 美国); Matrigel 胶 (BD 公司, 美国); 荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本); 倒置显微镜 (Nikon 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MDA-MB-231 细胞接种于含 10% 新生牛血清的 DMEM 高糖培养基中 (含 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下常规培养。

1.2.2 实验分组

用二甲亚砜 (DMSO) 溶解金雀异黄素, 配制成 100 mmol/L 的储存液。实验设 0.1% DMSO 溶剂对照组和 25、50、100 μ mol/L 金雀异黄素的实验组。溶剂和不同剂量的金雀异黄素处理细胞时间均为 24 h。DMSO 在各组培养液中的终浓度为 0.1%。

1.2.3 浸润实验

用无血清培养液重悬 MDA-MB-231 细胞, 并调整使细胞密度为 1×10^6 个/ml。在 24 孔板中放入 Transwell 小室, 小室内预先铺 Matrigel, 小室下部培养室加含 10% 血清培养液作趋化物, 上部培养室嵌室中加 MDA-MB-231 细胞悬液 300 μ l, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵

育 24 h。用棉棒擦去嵌室底部内表面上的细胞后, 将嵌室浸入 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, PBS 洗 3 遍后, 随机选择 5 个 100 倍显微视野, 统计视野中细胞数目, 以穿膜细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组平行设 5 个同样的实验。

1.2.4 免疫荧光实验

细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于含盖玻片 (24 mm \times 24 mm) 的 6 孔板中。分组处理后, 细胞用 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛室温下固定 15 min, 0.2% Triton X-100 处理 5 min, 加 1:200 稀释的一抗 (抗磷酸化 ERK 抗体) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后加 1:2 000 稀释的罗丹明标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 封片, 荧光显微镜观察。

1.2.5 细胞全蛋白的提取

细胞分组处理后, 弃去残液, 冷 PBS 洗 2 遍, 加入 500 μ l 预冷的细胞裂解液 (1% Triton X-100、0.1% SDS、150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L NaF、1% 脱氧胆酸钠、1 mmol/L Na₃VO₄、1 mmol/L PMSF 和 1% Cocktail, pH7.4), 刮刀刮取细胞至预冷的 EP 管, 冰上振摇 20 min。4 $^{\circ}$ C 离心 (12 000 r/min, \times 20 min) 后, 将上清转入预冷的 EP 管。BCA 法测定蛋白浓度, 样品 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.6 免疫印迹法

将蛋白样品 (40 μ g) 与加样缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3 min, 离心后用于 SDS-PAGE 凝胶电泳 (10%) 分离蛋白。电泳完毕后将胶上蛋白半干转至硝酸纤维素膜, 于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h 后, 加 1:1 000 稀释的一抗 (抗磷酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加 1:2 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 加 ECL 反应 4 min, 于暗房内压片, 显影。

1.2.7 超氧阴离子测定

按 1×10^5 个/ml 的细胞密度将乳腺癌细胞悬液接种于 6 孔板中。待细胞用药物处理后, 培养液中加入 DHE (0.5 mmol/L) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 随后用 PBS 清洗 3 次, 荧光显微镜观察并拍照。

1.3 统计学方法

实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *F* 检验, 两两比较采用 SNK-*q* 法进行统计学处理, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

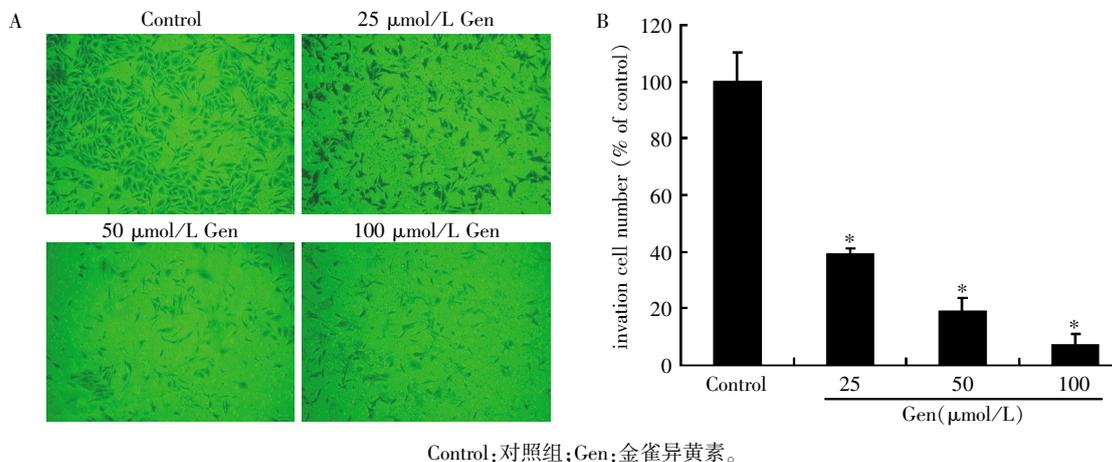
2 结果

2.1 金雀异黄素对细胞浸润能力的影响

众多的研究证明, Matrigel 能模拟细胞外基质,

是研究细胞浸润能力的常用的人工基底膜。Transwell 小室中上室细胞能够穿过 Matrigel 至膜的下室面,其数量的多少可反映细胞浸润能力的大小。

结果显示,金雀异黄酮可明显减少迁移至膜下室面的 MDA-MB-231 细胞数(图 1A),与对照组相比有统计学差异(图 1B, $P < 0.05$)。



Control:对照组;Gen:金雀异黄酮。
A:结晶紫染色显示不同浓度的金雀异黄酮处理后 Transwell 小室下室的细胞;B:浸润细胞统计图,与对照组相比, $*P < 0.05$ ($n = 5$)。

图 1 金雀异黄酮对 MDA-MB-231 细胞浸润能力的影响

Figure 1 Effect of genistein on invasion of MDA-MB-231 cells

2.2 金雀异黄酮对细胞 ERK 蛋白的影响

随着金雀异黄酮处理浓度的增加,磷酸化 ERK 含量逐渐减少,而总 ERK 水平在金雀异黄酮 25 和 50 μmol/L 处理组无变化,在 100 μmol/L 处理时明显下降(图 2)。

2.3 阻断 ERK 活性对其细胞内分布及细胞浸润能力的影响

用免疫荧光技术分析磷酸化 ERK 的细胞内定位发现,对照组细胞内磷酸化 ERK 水平较高,主要分布于胞浆和胞核。细胞经金雀异黄酮或 U0126 处理 24 h 后,胞核中磷酸化 ERK 含量均呈明显减少(图 3A)。当用 ERK 活性阻断剂 U0126 处理细胞

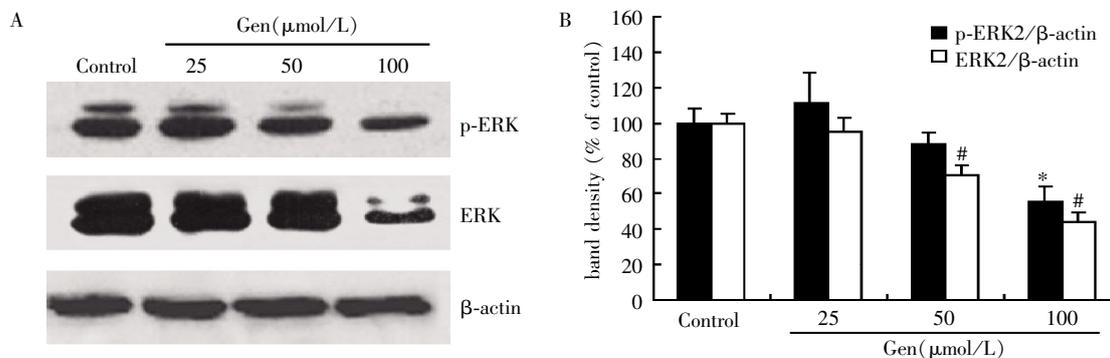
后,核内磷酸化 ERK 含量明显下降,细胞浸润能力亦能明显下降,其效应与金雀异黄酮相一致(图 3B)。

2.4 金雀异黄酮对细胞超氧阴离子含量的影响

研究发现,金雀异黄酮处理后细胞内超氧阴离子量明显减少(图 4A)。TEMPOL 是一种常用的超氧阴离子清除剂,0.5 mmol/L TEMPOL 孵育细胞 24 h 能抑制细胞磷酸化 ERK 的表达(图 4B)及细胞的浸润能力(图 4C)。

3 讨论

金雀异黄酮是一种大豆中含有的植物雌激素,

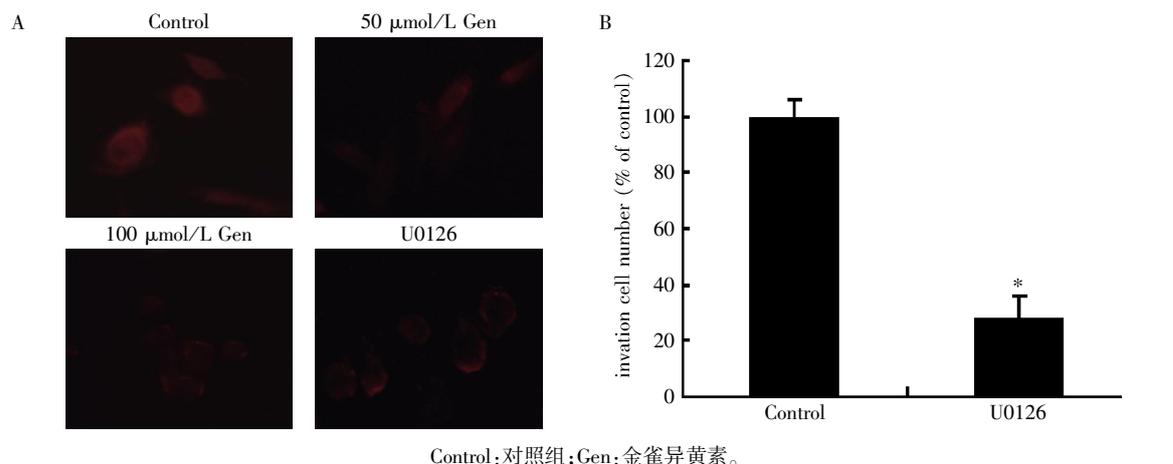


Control:对照组;Gen:金雀异黄酮。

A:金雀异黄酮处理对 ERK、p-ERK 表达的影响;B:ERK、p-ERK 表达统计图,与磷酸化 ERK 对照组比较, $*P < 0.05$;与总 ERK 对照组比较, $*P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 2 金雀异黄酮对磷酸化 ERK 表达的影响

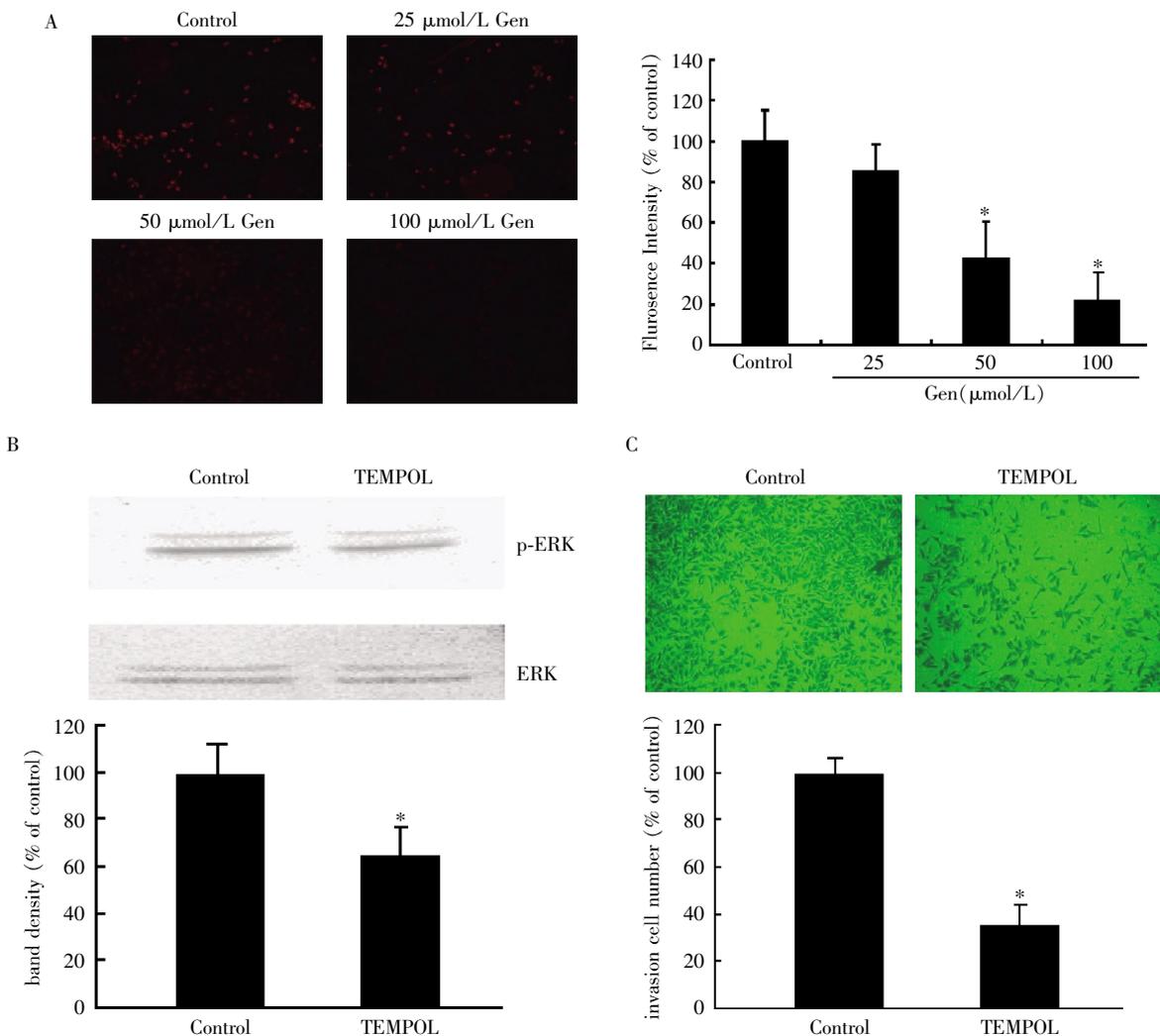
Figure 2 Effect of genistein on p-ERK expression in MDA-MB-231 cells



Control:对照组;Gen:金雀异黄素。
A:金雀异黄素及 U0126 处理对细胞内 p-ERK 分布的影响;B:U0126 处理对细胞浸润能力的影响,与对照组相比, * $P < 0.05$ ($n = 5$)。

图 3 U0126 处理对 p-ERK 分布及细胞浸润能力的影响

Figure 3 Effect of U0126 on p-ERK location and invasion ability of MDA-MB-231 cells



Control:对照组;Gen:金雀异黄素。

A:金雀异黄素处理对细胞内超氧阴离子的影响;B:TEMPOL 对 p-ERK 表达的影响;C:TEMPOL 对细胞浸润能力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$ ($n = 5$)。

图 4 超氧阴离子在金雀异黄素抑制细胞浸润中的作用

Figure 4 Effect of superoxide anion on the invasion of MDA-MB-231 cells

也是酪氨酸蛋白激酶和拓扑异构酶的抑制剂,能显著抑制包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞的浸润和转移能力,其抗癌机制研究是目前肿瘤研究的热点之一。

本研究采用不同浓度金雀异黄素处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,在观察细胞浸润能力改变的同时,检测了金雀异黄素处理对乳腺癌细胞中 ERK 表达和活性的影响。研究表明,正常情况下,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的 ERK 蛋白高表达且活性较高,金雀异黄素处理可使细胞内磷酸化 ERK 量逐渐降低。现已证明,基质金属蛋白酶(MMPs)对基底膜的分解是促进肿瘤细胞浸润和转移的常见方式。一些研究表明,乳腺癌组织 MMPs 表达改变,尤其是 MMP-2 和 MMP-9 的表达均增加,能引起肿瘤细胞降解细胞外基质(ECM)的能力增加,进而导致肿瘤转移^[6]。已有研究发现,ERK 磷酸化水平的改变与肿瘤细胞 MMP-9 分泌密切相关^[7-9]。本课题组以往的研究发现,ERK 磷酸化可促进乳腺癌细胞的迁移能力增加,其作用可能与磷酸化状态的 ERK 在胞核内增多有关^[10]。本研究中发现,金雀异黄素处理能使磷酸化 ERK 在胞核内分布减少,且 ERK 活性阻断剂 U0126 能模拟其效应,同样引起细胞浸润能力下降。据此推测:金雀异黄素处理引起的 ERK 活性水平下降很可能是引起乳腺癌细胞浸润能力下降的重要原因,其可能通过抑制磷酸化 ERK 在核内的分布,从而减少 MMP-9 的分泌所造成。

ROS 是一种化学性质较氧分子更活泼的小分子物质,细胞内的 ROS 主要是指在细胞能量代谢过程中产生的超氧阴离子、过氧化氢以及它们的转化产物羟自由基等。有研究表明,肿瘤细胞内含有丰富的产生 ROS 的酶系,恶性肿瘤细胞中的 ROS 生成量明显高于正常细胞^[4]。本研究表明,金雀异黄素处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231 可以明显抑制细胞内超氧阴离子的生成量。使用超氧阴离子抑制剂处理乳腺癌细胞可以模拟金雀异黄素所引起的 ERK 磷酸化表达水平降低和细胞浸润抑制现象。虽然实验发现 ERK 的激活是超氧阴离子依赖性的,我们以往的研究也发现在乳腺癌细胞 MCF-7 中 ROS 能够调控 ERK 的活性^[11],但目前尚没有研究证实超氧阴离子可以直接调控 ERK 的活性。本研究结果提示,超氧阴离子可能介导了金雀异黄素引起的细胞 ERK 磷酸化水平的降低以及细胞浸润能力的下降。

本研究对金雀异黄素在恶性肿瘤侵袭和转移中的确切分子调节机制进行了有益的探索。实验结果

表明,金雀异黄素可能通过抑制细胞超氧阴离子生成和 ERK 磷酸化水平,进而抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的浸润。

[参考文献]

- [1] Orlando L, Schiavone P, Cinieri S. Genistein: the future of prevention and treatment of breast cancer? [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(10): 918-920
- [2] Latratch C, Lubig J, Springwald A, et al. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(3): 253-261
- [3] Vantuyghem SA, Wilson SM, Postenka CO, et al. Dietary genistein reduces metastasis in a postsurgical orthotopic breast cancer model [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3396-3403
- [4] Kumar B, Koul S, Khandrika L et al. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1777-1785
- [5] Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF-kappaB binding activity in neuronal PC12 cells [J]. *Life Sci*, 2011, 88(1-2): 82-88
- [6] Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, et al. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(4): 241-247
- [7] Das G, Shiras A, Shanmuganandam K, et al. Rictor regulates MMP-9 activity and invasion through Raf-1-MEK-ERK signaling pathway in glioma cells [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(6): 412-423
- [8] Kim S, Choi JH, Lim HI, et al. EGF-induced MMP-9 expression is mediated by the JAK3/ERK pathway, but not by the JAK3/STAT-3 pathway in a SKBR3 breast cancer cell line [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(6): 892-898
- [9] Kim S, Choi JH, Lim HI, et al. Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Phytotherapy*, 2009, 16(6-7): 573-580
- [10] Du J, Sun C, Hu Z, et al. Lysophosphatidic acid induces MDA-MB-231 breast cancer cells migration through activation of PI3K/PAK1/ERK signaling [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15940
- [11] Du J, Xu R, Hu Z, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1alpha expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25213