

## 植物性功能食品原料在前列腺癌细胞 22RV1 中的雄激素效应及其机制研究

陆 玲<sup>1</sup>, 胡春艳<sup>2</sup>, 李 忠<sup>2</sup>, 汪之琰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系,<sup>2</sup>营养与食品卫生学系,江苏 南京 211126)

**[摘要]** 目的:研究植物性功能食品原料(当归、甘草、布渣叶)是否具有类雄激素效应,并初步探讨其机制。方法:采用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt(MTS)法检测植物性功能食品原料提取物对雄激素受体阳性前列腺癌细胞 22RV1 增殖的影响;采用 real-time PCR 法检测提取物对雄激素受体转录活性的影响。结果:布渣叶提取物与对照组相比,能够促进 22RV1 细胞的增殖,并且能够诱导雄激素受体靶基因 PSA 的表达,当加入雄激素受体抑制剂后,细胞活性和 PSA 水平均明显下降,当归和甘草提取物与对照相比并没有明显改变;ERK1/2 的抑制剂 U0126 也可抑制布渣叶提取物介导的细胞增殖和 PSA 的表达。结论:在当归、甘草、布渣叶 3 种植物提取物中,布渣叶具有雄激素效应,并且这种效应依赖雄激素受体途径;ERK1/2 信号通路参与了布渣叶提取物介导的雄激素效应。

**[关键词]** 植物性功能食品;雄激素受体;雄激素效应;ERK1/2;雄激素依赖性前列腺癌细胞 22RV1

**[中图分类号]** R737.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)07-897-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130708

## Androgenic activities and its mechanism of plant-based functional food ingredients in 22RV1 prostate cancer cells

Lu Ling<sup>1</sup>, Hu Chunyan<sup>2</sup>, Li Zhong<sup>2</sup>, Wang Zhixu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Maternal, Child and Adolescent Health,<sup>2</sup>Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211126, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the androgenic activities of *Microcos paniculata*, licorice root, *Angelica sinensis* and the underlying molecular mechanisms. **Methods:** The effects of extracts on cell viability were examined by an assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS). The expression of androgen receptor target gene was determined by real-time PCR. **Results:** Three extracts were screened for effects on viability of androgen-responsive 22RV1 cells. The extract of *Microcos paniculata* enhanced cell viability and the expression of PSA mRNA. But they were blocked by the androgen receptor (AR) antagonist flutamide and by the extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor, U0126. **Conclusion:** *Microcos paniculata* has androgenic activities in an AR-dependent manner among the three plant extracts. And ERK1/2 signaling participates in *Microcos paniculata*-induced androgenic effects.

**[Key words]** plant-based functional foods; androgen receptor; androgenic activities; extracellular-signal-regulated kinase 1/2; androgen-dependent 22RV1 prostate cancer cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):897-901]

随着社会的发展,人们的保健意识和保健需要也在不断提高,原本一些作为治疗疾病或者健康保

健的传统食用植物或者中草药也被广泛应用于功能食品中,比如当归就是一种药食两用植物,还有甘草、布渣叶、金银花、菊花等也是凉茶的主要原料。这些植物的化学成分十分复杂,其中的黄酮类、酚类、烃类等化学物质都可能具有不同强度的内分泌干扰效应<sup>[1-2]</sup>。适量植物来源的天然激素对人体有一定益处,如大豆异黄酮预防肿瘤、骨质疏松和心血管

**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划(863计划, 2010AA023001)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhixu.wang@126.com

疾病<sup>[3-5]</sup>。但是对于特定的人群,如正在生长发育的儿童、更年期妇女、乳腺癌或者前列腺癌人群而言,摄入植物类激素可能产生潜在的健康风险。

对植物雌激素的效应已经有大量研究,如甘草、当归等就被证明有雌激素效应<sup>[6-7]</sup>,但是在它们的雄激素效应方面尚未见报道,而这类具有类雄激素效应的植物性功能食品原料的摄入依然可能对人体产生一定的内分泌干扰作用,所以为了更安全地食用这些植物性功能食品,就有必要对它们是否具有雄激素效应进行研究。本研究选取了3种重要的药食两用植物当归、甘草、布渣叶,对它们的雄激素效应进行评价并初步探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

22RV1 细胞株(美国 ATCC 公司),当归、甘草、布渣叶均购自南京当地药店,胰蛋白酶(南通碧云天公司),RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司),活性炭处理胎牛血清 CS-FBS(澳大利亚 Serana 公司),双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、雄激素受体(androgen receptor, AR)的抑制剂氟他胺(美国 Sigma 公司),TRIzol(英国 Invitrogen 公司),3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS, 美国 Promega 公司),PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),ABI7300 系统(美国 ABI 公司),细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植物提取物的制备

将适量当归、甘草、布渣叶粉碎成粉末状,加入乙酸乙酯置于可调温度摇床上,过滤取滤液,重复4次,将滤液旋转蒸发至干燥,用 DMSO 稀释至终浓度 1 g/ml(图 1)。

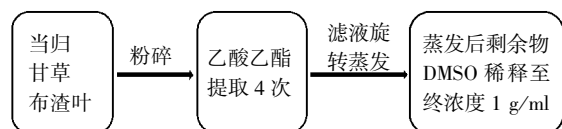


图 1 植物提取物的制备步骤

Figure 1 Procedure used for the preparation of plant extracts

#### 1.2.2 细胞培养

22RV1 细胞常规维持在 RPMI1640 培养液中,其中含有 10 nmol/L 双氢睾酮,1 mmol/L 丙酮酸钠,20 mmol/L HEPES,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素和 10% FBS,置于 5% CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱培养。

MTS 实验和 real-time PCR 实验之前 5~7 d,更换无酚红无双氢睾酮的 5% CS-FBS 的 RPMI1640 培养液。

#### 1.2.3 MTS 实验

22RV1 细胞在无酚红,5% CS-FBS 的 RPMI 1640 培养液中培养 5 d 后接种 100 μl/孔的细胞悬液到 96 孔板中,3 × 10<sup>3</sup> 个/孔。24 h 之后,用移液器吸出旧培养液,加入含不同浓度提取物或者 0.1% DMSO 的培养液,200 μl/孔,设 5 个平行组。处理培养 4 d,更换新鲜的无酚红 RPMI1640,加入 MTS,10 μl/孔,继续培养 4 h,之后取出 96 孔板用全自动酶标分析仪,逐步读数测量 490 nm 处吸光度值,检测细胞活性。

#### 1.2.4 real-time PCR 反应

22RV1 细胞在无酚红,5% CS-FBS 的 RPMI 1640 培养液中培养 5 d 后用不同浓度提取物或者对照处理 48 h 之后,用 TRIzol 提取总 RNA。测定 RNA 浓度,取 1 μg 总 RNA 进行逆转录成 cDNA,实时定量 PCR,选择 GAPDH 用作标准化内参。相关引物序列如下:PSA 正义链 5'-GATGAAACAGGCTGTGCCG-3',反义链 5'-CCTCACAGCTACCCACTGCA-3';GAPDH 正义链 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反义链 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。RT-PCR 反应使用 ABI7300 系统检测,定量结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。

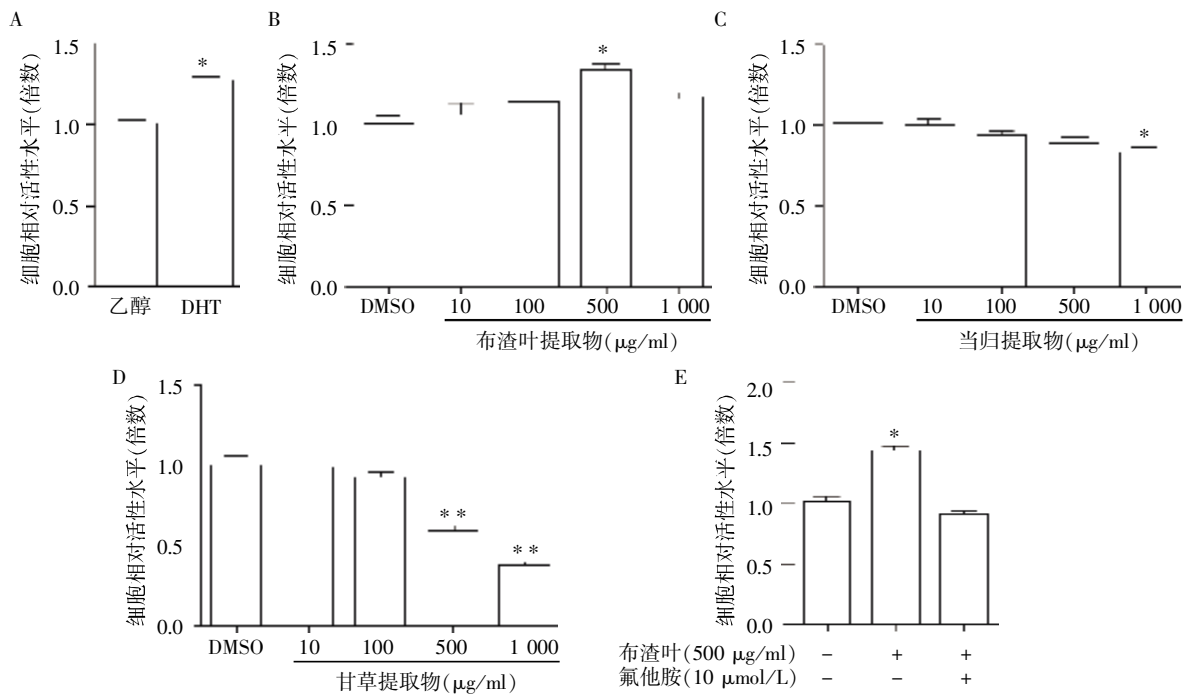
### 1.3 统计学方法

由 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,所有数据均用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析后行 Dunnett-*t* 检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 植物提取物对 22RV1 细胞活性的影响

为了检测当归、甘草、布渣叶提取物对雄激素依赖性前列腺癌细胞 22RV1 活性的影响,用不同浓度的植物提取物处理 22RV1 细胞 96 h,以 0.1% 的 DMSO 和 10 nmol/L 的 DHT 分别作为阴性和阳性对照。加入 DHT 后,细胞活性水平升高(图 2A)。布渣叶提取物随着浓度的增加,其细胞活性也随之增强,在 500 μg/ml 的浓度下达到最强的刺激细胞增殖的作用(图 2B),而当归、甘草和阴性对照组相比,并没有增加细胞的活性,并且在高浓度下对细胞增殖表现出了一定的抑制作用(图 2C、D)。当加了氟他胺(10 μmol/L)之后,布渣叶提取物的这种刺激效应被抑制(图 2E),提示布渣叶提取物促进细胞增殖可



A:加入 DHT 后细胞活性水平(阳性对照);B-D:分别加入布渣叶、当归、甘草提取物后细胞活性水平;E:加入 AR 拮抗剂氟他胺后,抑制了布渣叶提取物介导的细胞活性。与 DMSO 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=5$ )。

图 2 植物提取物对细胞活性的影响

Figure 2 The effects of plant extracts on cell viability in 22RV1 cells

能是通过雄激素受体途径发挥的。

## 2.2 植物提取物对雄激素受体靶基因的影响

雄激素的经典效应是通过雄激素与其受体 AR 结合形成激素-受体复合物,再结合到 AR 靶基因 PSA (prostate-specific antigen) 等的特异性反应原件上,激活 PSA 等靶基因的转录活性,从而发挥转录活化因子和细胞分化因子的作用<sup>[8-9]</sup>。所以,本研究用 3 种植物提取物来处理 22RV1 细胞 48 h,检测它们对 PSA 表达的影响。实时定量 PCR 检测结果如图 3 所示,布渣叶提取物可以剂量依赖的方式促进 PSA mRNA 的表达(图 3A),而这种现象并没有在当归和甘草提取物中看到(图 3B、C)。选取增加最明显的 500 µg/ml 浓度的布渣叶提取物和 AR 抑制剂氟他胺(10 µmol/L)共同处理细胞后,PSA mRNA 的表达水平明显下降(图 3D)。以上结果表明,在当归、甘草和布渣叶 3 种植物中,只有布渣叶提取物具有雄激素效应。

## 2.3 ERK1/2 信号通路对布渣叶介导的雄激素效应的影响

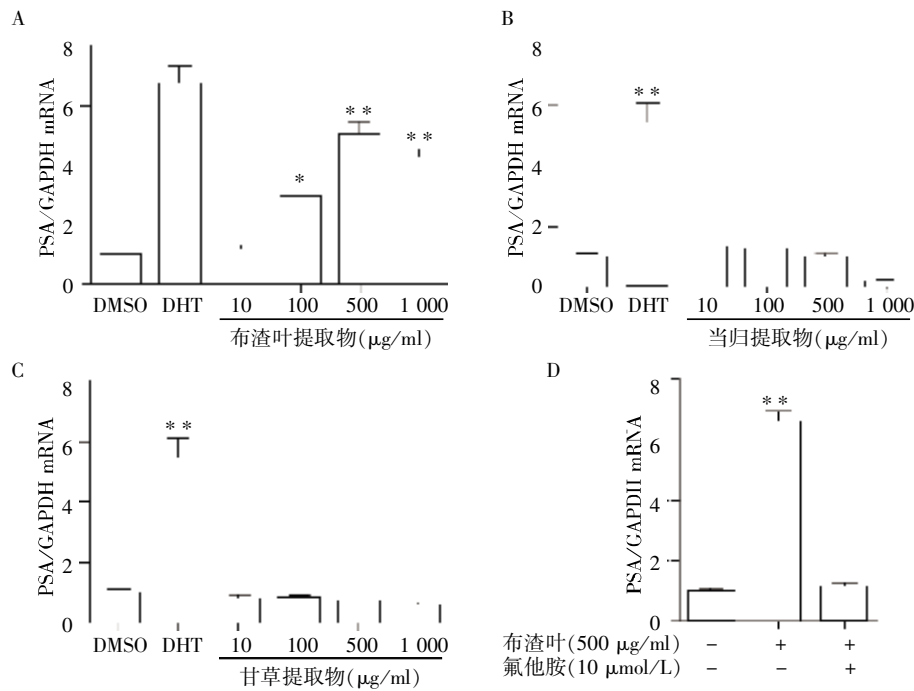
有研究表明,DHT 能够激活 ERK1/2 信号途径,引起细胞增殖<sup>[10-11]</sup>,而 ERK1/2 的拮抗剂 U0126 能够抑制一种合成的雄激素 R1881 介导的 AR 磷酸化<sup>[12]</sup>。为了探讨 ERK1/2 信号通路是否参与了布渣

叶介导的雄激素效应,本研究用 10 µmol/L U0126 来处理 22RV1 细胞 48 h,检测是否对细胞活性和 AR 的靶基因 PSA 有影响。如图 4 所示,在加了 U0126 以后,抑制了原本布渣叶提取物所介导的细胞活性的增加以及 PSA mRNA 的表达。以上结果表明,ERK1/2 信号通路也参与了布渣叶介导的雄激素效应。

## 3 讨论

在很多研究中,植物雌激素能够产生雌激素效应,促进乳腺癌细胞的增殖<sup>[13-14]</sup>,但是,目前还缺少对植物的雄激素效应的研究,特别是作为植物性功能食品原料的植物是否具有雄激素效应常常被人们所忽视。所以,本实验选取了当归、甘草、布渣叶 3 种植物性功能食品的原料来评价它们的雄激素效应,并初步探讨其潜在的机制。

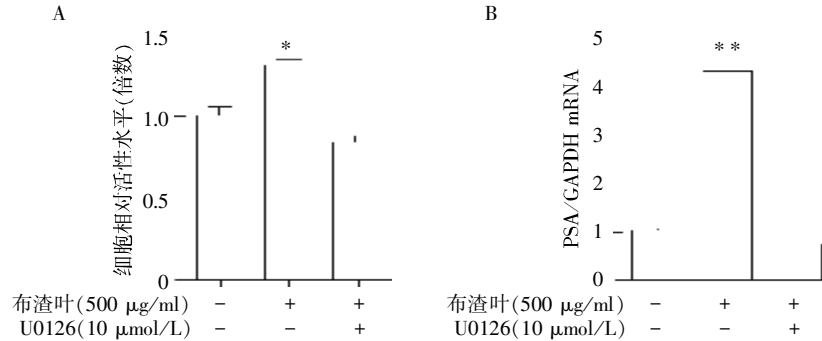
植物雄激素发挥其雄激素效应主要是通过与其受体结合成复合物,受体发生构象转化形成二聚体而活化,并进入细胞核中与相应的 DNA 反应元件结合,促进靶基因的转录,进而促进细胞的增殖。所以为了检测这些植物原料的雄激素效应,本研究首先通过 MTS 实验检测 3 种原料对细胞活性的影响,发现布渣叶提取物能够增加雄激素依赖性前列腺癌细



A~C: 分别加入布渣叶、当归、甘草提取物后 AR 靶基因 PSA mRNA 的表达水平; D: 加入 AR 拮抗剂氟他胺后, 抑制了布渣叶提取物诱导的 PSA mRNA 的表达。与 DMSO 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 3 植物提取物对 AR 靶基因 PSA mRNA 表达的影响

Figure 3 The effects of plant extracts on expression of PSA mRNA



A: MTS 检测 U0126 对布渣叶提取物诱导的细胞活性的影响; B: 实时定量 PCR 检测 U0126 对 PSA mRNA 的影响。与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 4 ERK 信号通路参与了布渣叶提取物诱导的雄激素效应

Figure 4 Extracts of *Microcos paniculata* exert androgenic activities via ERK1/2 signaling

胞 22RV1 的活性, 刺激其生长。雄激素对靶器官的作用必须通过雄激素受体介导, 在前列腺癌组织中, AR 介导雄激素促进前列腺癌细胞增殖, AR 是重要的调节其靶基因 PSA 表达的因子, 可以上调 PSA 的表达<sup>[15]</sup>。所以本研究使用了 AR 抑制剂氟他胺, 发现其能够抑制布渣叶诱导的这种活性, 说明这种细胞活性刺激效应是通过 AR 发挥的<sup>[16-18]</sup>, 同时, 当归和甘草并没有表现出增加细胞活性的作用。PSA 是经典的 AR 靶基因, 在大多数有临床意义的前列腺癌中都会升高, 是其最重要的早期检测指

标<sup>[19]</sup>。所以本研究继续检测 3 种植物提取物对 AR 靶基因 PSA 表达的影响, 以明确是否具有雄激素效应。结果发现, 布渣叶提取物能增强 PSA mRNA 的表达, 而且这种效应能被氟他胺抑制, 当归和甘草提取物和对照组相比则没有明显变化。以上结果表明, 布渣叶提取物具有雄激素效应并且这种效应是通过 AR 介导的。

因为 MEK/ERK 信号通路与肿瘤细胞的生长与增殖关系密切<sup>[17]</sup>, 也是雄激素介导的细胞增殖中的关键信号通路<sup>[12]</sup>, 在本研究中发现 ERK1/2 的拮抗

剂 U0126 能够抑制布渣叶提取物介导的细胞活力的增强,并且能够抑制 PSA 的表达,显示 ERK 信号通路参与了布渣叶介导的雄激素效应,而其进一步的调控机制还有待研究。

综上所述,在对这些植物性功能食品的雄激素效应筛选中,布渣叶具有雄激素效应。布渣叶现在多用于凉茶原料,在临床应用上也较为广泛,但是对布渣叶的研究大多停留在对其化学成分进行鉴定方面。究竟是布渣叶中的何种成分具有雄激素效应,目前未见文献报道,有待进一步研究。对植物性功能食品原料的雄激素效应的研究,有利于合理定位植物性功能食品功效,确保植物性功能食品安全性以及为临床用药提供科学依据。

#### [参考文献]

- [1] Moein MR, Khan SI, Ali Z, et al. Flavonoids from *Iris songarica* and their antioxidant and estrogenic activity[J]. *Planta Med*, 2008, 74(12): 1492-1495
- [2] Wu X, Tang L, Lin H, et al. Flavonoids from seeds of *Camellia semiserrata* Chi. and their estrogenic activity[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(9): 2428-2431
- [3] Ajdzanovic V, Mojic M, Maksimovic-Ivanic D, et al. Membrane fluidity, invasiveness and dynamic phenotype of metastatic prostate cancer cells after treatment with soy isoflavones[J]. *J Membr Biol*, 2013, 246(4): 307-314
- [4] Florencio-Silva R, Santos MA, de Medeiros VP, et al. Effects of soy isoflavones and mechanical vibration on rat bone tissue[J]. *Climacteric*, 2013[Epub ahead of print]
- [5] Rebholz CM, Reynolds K, Wofford MR, et al. Effect of soybean protein on novel cardiovascular disease risk factors: a randomized controlled trial [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2013, 67(1): 58-63
- [6] Hu C, Liu H, Du J, et al. Estrogenic activities of extracts of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 113(3-5): 209-216
- [7] Circosta C, Pasquale RD, Palumbo DR, et al. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis* [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(8): 665-669
- [8] Kapur P, Pereira BM, Wuttke W, et al. Androgenic action of *Tinospora cordifolia* ethanolic extract in prostate cancer cell line LNCaP[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(6-7): 679-682
- [9] Alexander B, Fishman AI, Green D, et al. Attenuation of androgenic regulation by brefeldin A in androgen-responsive prostate cancer cells[J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(1): 104-109
- [10] Peterziel H, Mink S, Schonert A, et al. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 1999, 18(46): 6322-6329
- [11] Bell WC, Myers RB, Hosein TO, et al. The response of extracellular signal-regulated kinase (ERK) to androgen-induced proliferation in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP[J]. *Biotech Histochem*, 2003, 78(1): 11-16
- [12] Shigemura K, Isotani S, Wang R, et al. Soluble factors derived from stroma activated androgen receptor phosphorylation in human prostate LNCaP cells: roles of ERK/MAP kinase[J]. *Prostate*, 2009, 69(9): 949-955
- [13] Saeed IA, Ali L, Jabeen A, et al. Estrogenic activities of ten medicinal herbs from the Middle East[J]. *J Chromatogr Sci*, 2013, 51(1): 33-39
- [14] 朱瑞清, 葛宝丰, 杨 斌, 等. 金雀异黄酮与芹菜素的雌激素样作用体外研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(15): 2317-2322
- [15] Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 360(1-2): 3-13
- [16] Park C, Kim Y, Shim M, et al. Hypoxia enhances ligand-occupied androgen receptor activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(2): 319-323
- [17] Izumi K, Zheng Y, Li Y, et al. Epidermal growth factor induces bladder cancer cell proliferation through activation of the androgen receptor[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(5): 1587-1592
- [18] Roskoski RJ. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143
- [19] Miller K. PSA progression under hormone therapy - of prognostic relevance? [J]. *Aktuelle Urol*, 2012, 43(4): 262-264

[收稿日期] 2013-02-03