

文章编号:1005-6947(2005)09-0679-04

· 实验研究 ·

维生素 E 琥珀酸酯诱导 MCF-7 乳腺癌细胞的凋亡

徐昕昀, 张伟, 张军初, 江道振, 王强

(第二军医大学长征医院 普通外科, 上海 200003)

摘要:目的 检测维生素 E 琥珀酸酯(VES)对 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用,并分析凋亡诱导分子 Fas 表达的变化。方法 人乳腺癌细胞株 MCF-7 [雌激素受体阳性, ER(+)]以 VES 刺激 12, 24 h 和 48 h, VES 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用 MTT 法测定 VES 对细胞增殖的抑制作用;以流式细胞仪分析细胞周期和细胞表面 Fas 的表达;Western 蛋白印迹法检测 VES 作用后 Fas 蛋白水平的变化。结果 VES 对 MCF-7 乳腺癌细胞具有显著的抑制作用,并表现为时间和剂量依赖关系。MCF-7 乳腺癌细胞的自然凋亡率为 1.2%;5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 VES 作用 48 h 后凋亡率分别升高至 11.2%, 16.4% 和 41.2%。VES 作用后乳腺癌细胞 Fas 蛋白水平和细胞表面 Fas 表达升高。结论 VES 对 ER(+)乳腺癌细胞具有显著的增殖抑制作用,并诱导细胞凋亡,其机制与细胞表面 Fas 表达上调有关。

关键词: 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 维生素 E 琥珀酸酯

中图分类号: R737.9; Q329.25

文献标识码: A

Apoptosis of MCF-7 breast cancer cells induced by vitamin E succinate

XU Xin-yun, ZHANG Wei, ZHANG Jun-chu, JIANG Dao-zheng, WANG Qiang

(Department of General Surgery, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 20003, China)

Abstract: Objective To investigate the growth inhibition and apoptosis induction effect of vitamin E succinate on MCF-7 human breast cancer cells and to analyze the modulation of Fas expression in this process.

Methods Estrogen receptor positive MCF-7 human breast cancer cells were treated with VES for 12 h, 24 h and 48 h. The concentrations of VES were 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The inhibitory effect was measured with MTT method and the cell cycle and cell surface Fas expression were analyzed with flow cytometry. Fas protein level was detected by Western blotting assay. **Results** VES had significant inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells and the effect was dependently related to time and dosage. The apoptotic rate rose from 1.2% to 11.2%, 16.4% 和 41.2%, after treated with VES for 48 h at the concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Fas protein level and cell surface Fas expression in cancer cells increased after the administration of VES. **Conclusions** VES had significant growth inhibition and apoptosis induction effect on MCF-7 estrogen receptor positive breast cancer cells. The mechanism was related to Fas upregulation on the surface of cancer cells.

Key words: Breast Neoplasms; Apoptosis; VES

CLC number: R737.9; Q329.25

Document code: A

基金项目:上海市科委科技发展基金资助项目(024119105)。

收稿日期:2005-05-30; **修订日期:**2005-07-17。

作者简介:徐昕昀(1972-),女,上海人,第二军医大学长征医院主治医师,主要从事甲状腺和乳腺外科临床方面的研究。

通讯作者:张伟 电话:021-66540109(H),021-63610109-73312(O);E-mail: zhangwei412@yahoo.com.cn。

维生素 E 琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES)是维生素 E 的一种衍生物,对多种恶性肿瘤细胞具有强效的增殖抑制作用而对正常细胞影响很小^[1]。这种选择性抑制肿瘤细胞生长的作用,以及其对人体的低毒性使之成为一种很有前途的肿瘤预防及治疗药物。

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,常采用包括手术、化疗、放疗和内分泌等多种治疗手段的综合治疗。如何提高乳腺癌术后辅助治疗的效果倍受关注。本实验旨在检测新的凋亡诱导药物 VES 对雌激素受体阳性[ER(+)]的 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制和凋亡诱导作用,分析其对凋亡诱导分子 Fas 蛋白的调控作用,了解 VES 诱导肿瘤细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人乳腺癌细胞株 ER(+)的 MCF-7,受赠于上海肿瘤医院乳腺中心;VES 为 SIGMA 公司产品;MTT 为 AMRESCO 产品;PE 标记的抗人 Fas 抗体和抗人 Fas 抗体购自晶美公司;酶标二抗购自基因公司;ECL 发光试剂盒为 Santa Cruz 公司产品;Fas 中和性抗体为 Coulter & Immunotech 公司产品。

1.2 实 验 方 法

MCF-7 细胞以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃,5% CO₂ 的条件下培养。VES 以无水乙醇溶解,实验浓度为 5 μg/mL,10 μg/mL 和 20 μg/mL;无水乙醇在培养基内的终浓度 < 2‰。作用时间分别为 12,24 h 和 48 h。

1.3 检 测 项 目 及 方 法

1.3.1 MTT 法检测 VES 抑制乳腺癌细胞的增殖

乳腺癌细胞以 2 × 10⁴/mL 接种于 96 孔板,每孔 200 μL,每组设 6 个复孔。接种细胞 24 h 后加入药物。药物处理结束后每孔加入 5 g/L MTT 20 μL,继续于 37℃ 孵箱培养 4 h 后,吸去上清;加入 DMSO 150 μL/孔,震荡 5 min 后于自动酶标仪上进行比色;测定波长为 492 nm 吸光值(A)。计算药物对乳腺癌细胞的生长抑制率。抑制率(%) = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值)/对照组平均 A 值 × 100%。

1.3.2 流式细胞仪分析细胞周期 乳腺癌细胞以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板;以 5 μg/mL,10 μg/mL 和 20 μg/mL VES 处理 48 h 后收集细胞并离心弃去培养液制成单细胞悬液;70% 冰乙醇固定后加入碘化丙啶(PI),4℃ 黑暗处静置 30 min 后上机分析细胞周期和凋亡率。每个标本分析 10 000 个细胞,用随机所附软件对测量值进行分析。

1.3.3 阻断试验 为检测 Fas 在 VES 诱导乳腺癌

凋亡过程中的作用,本实验采用 Fas 中和性抗体进行阻断试验。在 VES 以上述 3 种浓度刺激的同时加入 0.5 μg/mL Fas 中和性抗体,共同作用 48 h,随后收集细胞以流式细胞仪分析乳腺癌细胞凋亡率的变化。

1.3.4 Western 蛋白印迹法检测 Fas 蛋白水平 上述 3 种浓度的 VES 作用 48 h 后,裂解细胞分离提取蛋白并定量。每条泳道加入 20 μg 蛋白样品后,12% SDS-PAGE 分离蛋白,并以半干式电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上;5% 脱脂牛奶封闭 30 min,加入 1:500 稀释的抗人 Fas 抗体,于 4℃ 孵育过夜;PBS 漂洗 3 遍后加入 1:1 000 稀释的酶标二抗与膜孵育 1 h;TBS 漂洗 3 遍后以 ECL 发光试剂盒显色,NIH 软件分析蛋白条带灰度。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞表面 Fas 表达 MCF-7 细胞以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后按上述浓度加入 VES 作用 48 h;处理结束后收集细胞离心去除培养液,加入 PE 标记的抗人 Fas 抗体于黑暗处静置 30 min;PBS 漂洗 3 遍后流式细胞仪分析荧光强度。

1.4 统 计 学 处 理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;用方差分析进行统计学处理。

2 结 果

2.1 VES 对 ER(+)乳腺癌细胞的生长抑制作用

不同浓度和作用时间的 VES 对 MCF-7 细胞均具有显著的生长抑制作用($P < 0.05$),而且呈剂量和时间的依赖关系(附表)。

附表 VES 对 MCF-7 细胞的生长抑制作用

分组		吸光值	抑制率(%)
空白对照组		0.799 ± 0.024	0
VES 处理组			
浓度(μg/mL)	时间(h)		
5	12	0.702 ± 0.031	12.14 [†]
10	12	0.667 ± 0.023	16.52 [†]
20	12	0.604 ± 0.025	24.40 [†]
5	24	0.663 ± 0.015	17.02 [†]
10	24	0.433 ± 0.025	45.80 [†]
20	24	0.321 ± 0.019	59.82 [†]
5	48	0.621 ± 0.033	22.28 [†]
10	48	0.377 ± 0.013	52.81 [†]
20	48	0.189 ± 0.007	76.35 [†]

注:† 与空白对照组比, $P < 0.05$

2.2 VES 对乳腺癌细胞的凋亡率的影响

MCF-7 细胞的自然凋亡率为 1.2%。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VES 刺激 48 h 后 MCF-7 细胞

的凋亡率分别为 11.2%, 16.4% 和 41.2% (图 1)。

图 1 VES 对乳腺癌细胞凋亡率的影响

2.3 阻断实验

加入 Fas 中和性抗体与 VES 共同作用于乳腺癌细胞后, VES 诱导的凋亡被阻断, 与未经中和性抗体处理的细胞间存在差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.5 VES 对乳腺癌细胞表面 Fas 表达的影响

不同浓度 VES 作用 48 h 后 MCF-7 细胞表面 Fas 平均荧光强度显著增强, 由对照组的 50.07 升高至 54.72, 71.68 和 86.84。

3 讨论

VES 在维生素 E 的衍生物中活性最强, 但对正常细胞相对无毒性, 具有选择性抗肿瘤细胞生长的作用^[1]。自 1995 年首次报道 VES 能诱导人 B 淋巴瘤细胞凋亡以来^[2], 进一步的体外研究^[3~5] 证明, VES 作为一种潜在的肿瘤细胞生长抑制剂, 对 90% 的人类恶性肿瘤, 如乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌和子宫内膜癌等都具有显著的凋亡诱导作用。本实验结果表明, VES 对 ER(+) 的 MCF-7 乳腺癌细胞具有强效的增殖抑制作用, 并且表现为时间和剂量的依赖关系。除了显著抑制乳腺癌细胞的增殖外, VES 还表现出强效的凋亡诱导作用。从流式细胞仪分析细胞周期的结果看, VES 作用后 MCF-7 细胞的凋亡率明显升高, 提示 VES 对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制作用主要通过诱导细胞的凋亡。

近来研究^[6,7] 表明, VES 可通过影响细胞多条信号传导途径诱导肿瘤细胞凋亡。其抗肿瘤作用涉及到抑制肿瘤细胞 DNA 合成; 调控 Fas 表达诱导细胞凋亡, 阻断细胞周期; 诱导细胞分化, 促进具有生物活性的转化生长因子 β (TGF- β) 的分泌及 TGF- β II 型受体的表达; 以及影响细胞内的第二信使系统, 抑制蛋白激酶 PKC 活性等。而其中调控 Fas 蛋白表达的途径倍受关注。Fas 是细胞表面死亡受体, 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员; 当细胞膜表面的 Fas 抗原与其特异性抗体或 Fas 配体结

1: 空白对照组; 2: VES 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h; 3: VES 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h, 4: VES 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h

图 2 阻断实验结果

2.4 VES 对乳腺癌细胞 Fas 蛋白水平的影响

与未经药物处理的对照组细胞相比, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VES 作用 48 h 后乳腺癌细胞 Fas 蛋白水平分别升高 2.3, 2.7 和 2.9 倍 (图 3)。

1: 空白对照组; 2: VES 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h; 3: VES 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h, 4: VES 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h

图 3 VES 对乳腺癌细胞 Fas 蛋白水平的影响

合后即触发细胞凋亡。有研究^[3]表明, VES 能促进 Fas 蛋白的合成, 使 Fas 活性成分移向细胞表面, 并能上调细胞膜表面 Fas 表达, 从而恢复乳腺癌细胞对 Fas 介导凋亡的敏感性。Turley 等^[8]也发现 VES 具有促进 Fas 蛋白合成的作用, 应用拮抗 Fas 的中和抗体能阻断 VES 对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用。因此目前认为, Fas 凋亡诱导途径是 VES 诱导肿瘤细胞凋亡的主要机制^[7]。

本实验结果显示, VES 作用后乳腺癌细胞 Fas 蛋白水平升高, 同时流式细胞仪分析结果也提示乳腺癌细胞表面 Fas 表达上调, 与此相对应的是细胞凋亡率的升高; 而应用 Fas 中和性抗体后, VES 诱导的乳腺癌细胞凋亡被明显阻断。据此认为, VES 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用主要通过诱导细胞的凋亡, 其中细胞表面的凋亡诱导分子 Fas 表达的上调在此过程中起重要作用。

参考文献:

- [1] Neuzil J, Weber T, Gellert N, *et al.* Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(1): 87-89.
- [2] Turley JM, Funakoshi S, Ruscetti RW, *et al.* Growth inhibi-

tion and apoptosis of RL human B lymphoma cells by vitamin E succinate and retinoic acid; role for transforming growth factor beta [J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(3): 655-663.

- [3] Yu W, Israel K, Liao QY, *et al.* Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43000 Fas in VES-triggered apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 953-961.
- [4] Ni J, Chen M, Zhang Y, *et al.* Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulating cell cycle regulatory machinery [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(2): 357-363.
- [5] Wu K, Zhao Y, Liu BH, *et al.* RRR-alpha-tocopheryl succinate inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 26-30.
- [6] Wu K, Liu BH, Zhao DY, *et al.* The effect of vitamin E succinate on the expression of TGF- β 1, c-JUN and JNK1 in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *World J Gastroenterol*. 2001, 7(1): 83-87.
- [7] 张军初, 张伟, 朱大乔, 等. 维生素 E 琥珀酸酯联合化疗药物对乳腺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4): 253-256.
- [8] Turley JM, Fu T, Ruscetti FW, *et al.* Vitamin E succinate induces Fas-mediated apoptosis in estrogen receptor negative human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(5): 881-890.

《临床医院感染学》(修订版)征订启事

为迎接“医院管理年”和准备医院分级评审, 由卫生部殷大奎、于宗河、王羽等领导主审, 中南大学湘雅医院医院感染控制中心(全国医院感染监控管理培训基地)徐秀华教授主编的《临床医院感染学》修订版(1998年初版)将于2005年7月正式出版发行。修订版增加了以下内容: 1. 新出现传染病的发生背景与影响及其感染控制, 如 SARS、艾滋病、猴痘、克雅病、尼派病毒感染等; 2. 潜在威胁的生物武器, 如可能产生生物恐怖的传染病(炭疽、鼠疫、天花、霍乱等)及其感染控制; 3. 新的研究进展, 如全身炎症反应综合征和脓毒血症、医院感染控制计划评价与成本-效益分析、美容手术后感染、试管婴儿术相关感染等; 4. 新的知识, 如部分医院感染的特殊情况判断、WHO 和美国 CDC 指南等; 5. 新的医院感染管理法律法规知识, 如《传染病防治法》、《医疗废物管理条例》及配套文件、《抗菌药物临床应用指导原则》、《医务人员预防艾滋病职业感染指导原则》、《内镜清洗消毒技术操作规范》、《医疗机构口腔诊疗器械消毒技术规范》等。

本书包括理论与实践两部分, 不仅可作为医院感染管理专职人员实践工作的工具书, 也是临床各科感染性疾病诊断治疗的参考书, 适合各级各类临床医师及护理、检验人员阅读。本书由湖南科学技术出版社出版发行, 售价定为148元/本, 加寄15%邮汇费, 合计170元/本(订购2本以上者, 邮汇费酌减为10%)。

联系地址与联系人: 长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院医院感染控制中心(全国医院感染监控管理培训基地), 邮编410008, 联系人: 龚瑞娥、王曼平、吕一欣, 电话: 0731-4327429, 传真: 0731-4327237。

《临床医院感染学》编委会
全国医院感染监控管理培训基地

2005年8月