

· 基础研究 ·

白藜芦醇抑制胰岛素样生长因子 1 促乳腺癌细胞增殖及其机制的研究*

郭慧琳, 张献全[△]

(重庆医科大学附属第二医院肿瘤科, 重庆 400010)

摘要:目的 研究不同浓度白藜芦醇抑制胰岛素样生长因子 1(IGF-1)介导的促乳腺癌细胞增殖效应及其机制。方法 本研究以人乳腺癌 MCF-7 细胞株为研究对象,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞的增殖,免疫印迹法检测 MCF-7 细胞中磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、p-PI3K、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)及 p-AKT 蛋白的表达情况。结果 不同浓度 IGF-1(10、20、40 ng/mL)可促进 MCF-7 细胞增殖,而不同浓度白藜芦醇(10、25、50 $\mu\text{mol/L}$)对 MCF-7 细胞具有的增殖抑制作用,均具有浓度依赖性($P < 0.05$);白藜芦醇与 IGF-1 共同作用后,MCF-7 细胞增殖明显降低($P < 0.05$);Wortmannin (10^{-6} mol/L)预处理后,IGF-1 对 MCF-7 细胞的促增殖效应受到明显抑制($P < 0.05$);IGF-1(40 ng/mL)作用 MCF-7 细胞后,细胞中 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白的表达水平明显提高($P < 0.05$),而以白藜芦醇(50 $\mu\text{mol/L}$)、IGF-1(40 ng/mL)共同作用 MCF-7 细胞后,细胞中 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白的表达水平明显低于 IGF-1 组($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇对 IGF-1 介导的促乳腺癌细胞增殖具有抑制作用,该抑制效应与 PI3K-AKT 信号途径密切相关。

关键词:1-磷脂酰肌醇 3-激酶;蛋白激酶类;胰岛素样生长因子;乳腺肿瘤;白藜芦醇

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)02-0170-04

Inhibitory effects of resveratrol on insulin-like growth factor 1-mediated breast cancer cell proliferation and its mechanism*

Guo Huiling, Zhang Xianquan[△]

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract:Objective To study inhibitory effects of different concentrations of resveratrol on insulin-like growth factor 1(IGF-1)-mediated breast cancer cell proliferation and its mechanism. **Methods** Human breast cancer MCF-7 cell line served as research object. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method was used to measure cellular proliferation, and immunoblotting technique was employed to detect expression of phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K), p-PI3K, serine/threonine protein kinases(AKT) and p-AKT protein. **Results** IGF-1(10, 20, 40 ng/mL) improved proliferation of MCF-7 cells and resveratrol (10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) suppressed it, both in concentration-dependent manner($P < 0.05$). Co-treated with resveratrol and IGF-1, proliferation of MCF-7 cells was decreased markedly($P < 0.05$). After pre-treated with Wortmannin(10^{-6} mol/L), IGF-1-mediated MCF-7 cells proliferation was significantly inhibited($P < 0.05$). Expression levels of p-PI3K and p-AKT protein in MCF-7 cells were obviously increased by IGF-1 (40 ng/mL) treatment and decreased by co-treatment of resveratrol(50 $\mu\text{mol/L}$) and IGF-1(40 ng/mL) ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol possess inhibitory effects on IGF-1-mediated breast cancer cell proliferation, which is closely related to PI3K-AKT signaling pathway.

Key words:1-phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinases; insulin-like growth factor; breast neoplasms; resveratrol

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,尽管化疗和内分泌疗法已普遍应用于乳腺癌的治疗,并显示出一定效果,但是有相当部分的患者治疗后复发转移^[1]。因此,寻求预防和治疗乳腺癌复发转移的有效低毒药物具有重要意义。胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)与乳腺癌的发生、发展密切相关,IGF-1 通过自分泌和旁分泌方式在乳腺癌的发病中发挥重要作用,靶向抑制 IGF-1 的促肿瘤细胞增殖效应可提高对乳腺癌细胞的杀伤作用^[2]。白藜芦醇是广泛存在于葡萄、虎杖等多种植物中的非黄酮类多酚化合物。研究发现白藜芦醇对多种恶性肿瘤细胞具有显著的抑制作用^[3]。但是,白藜芦醇能否抑制 IGF-1 的促乳腺癌的增殖效应并不清楚。本研究将人乳腺癌 MCF-7 细胞作为研究对象,观察白藜芦醇对 IGF-1 促乳腺癌细胞增殖的抑制效应,并探讨其抑制 IGF-1 作用的

分子机制。

1 材料与方

1.1 主要试剂与细胞株 DMEM 干粉培养基购自美国 Hy-Close 公司;磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinases, AKT) 及磷酸化 AKT (p-AKT) 抗体均为兔抗多克隆抗体,购自美国 Cell Signaling 公司;PI3K 抑制剂——Wortmannin 购自美国 Sigma 公司;SuperSignal 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司;四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)为北京中衫金桥生物技术有限公司产品。人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自中科院上海生化细胞研究所。

1.2 细胞培养 将 MCF-7 细胞置于含 10% 胎牛血清的

DMEM 培养基中,在 37 ℃,含有 95%空气和 5%CO₂ 的培养箱中常规培养。待细胞长至融合状态时以 0.25%胰蛋白酶消化、传代。

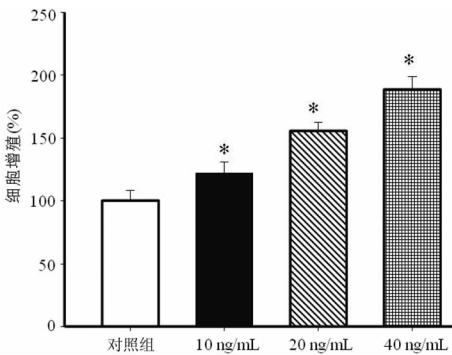
1.3 细胞增殖实验 将细胞制成单细胞悬液,计数后将细胞密度调整为 1×10⁴/mL,接种于 96 孔培养板,培养 24 h,细胞贴壁后换为无血清培养基培养 4 h,分别用不同浓度 IGF-1 (10、20、40 ng/mL)或白藜芦醇(10、25、50 μmol/L)作用 MCF-7 细胞 48 h,然后每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL)溶液,置培养箱中继续培养 4 h,吸弃上清液终止培养,每孔加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μL,于振荡器上摇匀 10 min,在 490 nm 波长处测各孔细胞的吸光度值。以不用药物处理的细胞作为对照。

1.4 免疫印迹实验 药物作用后的 MCF-7 细胞经常规方法提取蛋白,考马斯亮蓝法测定细胞提取物的蛋白质浓度。加入上样缓冲液,沸水浴 5 min,取等量总蛋白行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),采用半干转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜。室温下用 5%脱脂奶粉封闭 3 h,然后将膜与抗 PI3K、p-PI3K、AKT 及 p-AKT 抗体(1:400 稀释)作用,4 ℃孵育过夜;用含吐温-20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜 3 次;加入羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,采用 Super-Signal 化学发光试剂盒显色发光。

1.5 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,两组以上的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1 对 MCF-7 细胞的促增殖效应 IGF-1 作用 48 h 后,MCF-7 细胞增殖明显,随着 IGF-1 作用浓度的不断增加,其对 MCF-7 细胞增殖的促进效应不断增强(*P* < 0.05),见图 1。

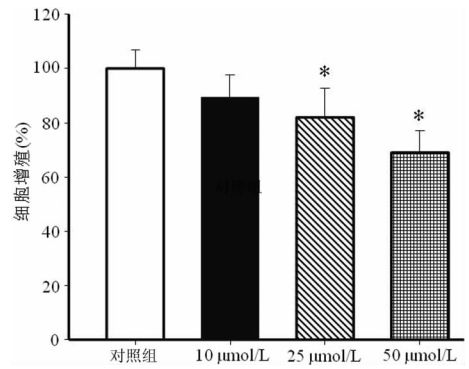


*: *P* < 0.05, 与对照组比较。

图 1 不同浓度 IGF-1 对 MCF-7 细胞增殖的影响

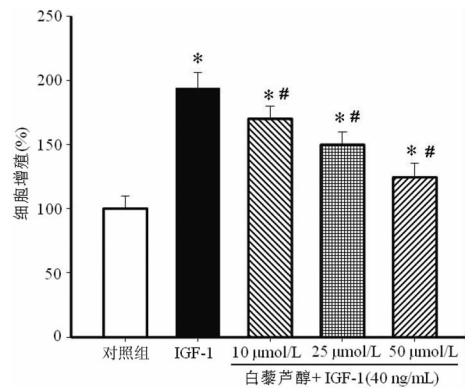
2.2 白藜芦醇对 MCF-7 细胞增殖的抑制效应 白藜芦醇对 MCF-7 细胞具有一定的增殖抑制作用,随着白藜芦醇作用浓度的增加,其对 MCF-7 细胞的抑制效应逐渐增强(*P* < 0.05),见图 2。

2.3 白藜芦醇对 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖的抑制效应 白藜芦醇(10、25、50 μmol/L)与 IGF-1(40 ng/mL)共同作用 MCF-7 细胞 48 h 后,MCF-7 细胞增殖明显降低,并呈浓度依赖性(*P* < 0.05),见图 3。



*: *P* < 0.05, 与对照组比较。

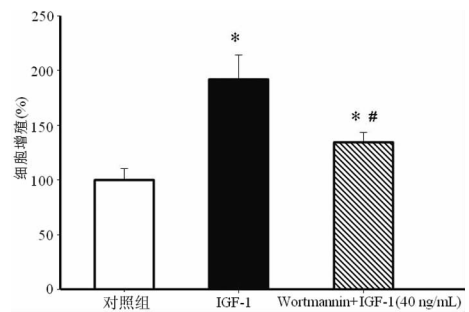
图 2 不同浓度白藜芦醇对 MCF-7 细胞增殖的影响



*: *P* < 0.05, 与对照组比较; #: *P* < 0.05, 与 IGF-1 组比较。

图 3 白藜芦醇对 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖的抑制效应

2.4 PI3K-AKT 信号途径在 IGF-1 介导的促 MCF-7 细胞增殖中的作用 为了明确 PI3K-AKT 信号途径在 IGF-1 介导的促 MCF-7 细胞增殖中的作用,利用 PI3K 抑制剂 Wortmannin 与 IGF-1 共作用 MCF-7 细胞 48 h。结果显示经 Wortmannin(10⁻⁶ mol/L)预处理后,IGF-1(40 ng/mL)对 MCF-7 细胞的促增殖效应受到明显抑制(*P* < 0.05),见图 4,提示 PI3K-AKT 信号途径在 IGF-1 介导的促 MCF-7 细胞增殖效应中发挥了重要作用。

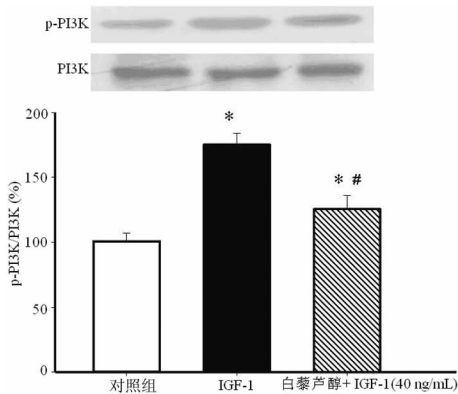


*: *P* < 0.05, 与对照组比较; #: *P* < 0.05, 与 IGF-1 组比较。

图 4 Wortmannin 对 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖效应的影响

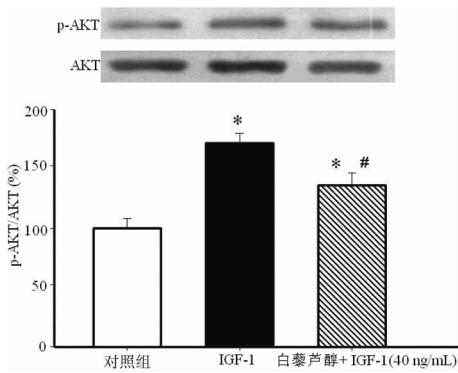
2.5 白藜芦醇对 IGF-1 促增殖信号的抑制作用 为了探讨白藜芦醇抑制 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖的分子机制,采用免疫印迹法检测白藜芦醇对 IGF-1 促增殖信号的影响。结果发现,IGF-1(40 ng/mL)作用 30 min 后,p-PI3K 与 p-AKT 蛋白的表达水平明显提高(*P* < 0.05),但对总 PI3K 与 AKT 蛋白表达没有影响(*P* > 0.05)。以白藜芦醇(50 μmol/L)、IGF-1(40 ng/

mL)共同作用 MCF-7 细胞后,细胞中 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白表达水平明显低于 IGF-1 组 ($P < 0.05$),见图 5、6。上述结果提示白藜芦醇抑制 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖效应与其抑制 IGF-1 激活的 PI3K-AKT 信号途径密切相关。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 IGF-1 组比较。

图 5 白藜芦醇(50 $\mu\text{mol/L}$)对 IGF-1 诱导 p-PI3K 表达的影响



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 IGF-1 组比较。

图 6 白藜芦醇(50 $\mu\text{mol/L}$)对 IGF-1 诱导 p-AKT 表达的影响

3 讨论

IGF-1 是促进细胞增殖、分化与血管形成等生物学效应的多肽生长因子。IGF-1 与其受体结合后,具有促进肿瘤细胞增殖,诱导细胞向恶性表型转化,抑制肿瘤细胞凋亡等作用,与多种恶性肿瘤的发生、发展、转移密切相关^[4]。IGF-1 以内分泌、自分泌和旁分泌方式作用于靶器官,局部合成和分泌的 IGF-1 可能与血液循环中的 IGF-1 共同对局部组织发挥作用。来自 12 个国家的 7 个前瞻性研究数据显示,血液循环中 IGF-1 水平与乳腺癌的危险性密切相关,乳腺癌组织中 IGF-1 的表达水平可作为独立预后因素^[5-6]。而且,IGF-1 受体基因的表达与原发乳腺癌的预后具有密切关联,特异性抑制 IGF-1 受体可以降低乳腺癌细胞的增殖^[7-8]。以上研究提示 IGF-1 在乳腺癌的发展、发展中具有重要作用,如何有效抑制其促肿瘤细胞的增殖效应具有重要意义。

近年来,白藜芦醇的抗肿瘤活性受到广泛重视。研究发现白藜芦醇对肺癌、肝癌、前列腺癌等多种肿瘤具有显著抑制作用^[9-10]。其中,白藜芦醇对乳腺癌的多种生物学作用引起人们的关注。研究表明白藜芦醇在多种乳腺癌细胞中具有抑制增殖效应。Sareen 等^[11]在体外实验中证实白藜芦醇能有效降低乳腺癌移植瘤的大小。白藜芦醇通过半胱-天冬氨酸蛋白酶

(cysteiny aspartate specific protease, Caspase) 依赖或非依赖的方式诱导乳腺癌细胞凋亡;通过抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 的表达而降低乳腺癌细胞的迁徙;还可以明显增强环磷酰胺、雷帕霉素等药物的抗肿瘤作用^[12-14]。Levi 等^[15]证实白藜芦醇与乳腺癌发病率呈负相关。但是,白藜芦醇作为重要的肿瘤细胞抑制剂,是否对 IGF-1 的促乳腺癌细胞增殖效应具有抑制作用并不清楚。本研究以乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象,观察白藜芦醇对 IGF-1 促乳腺癌细胞增殖是否具有抑制效应。结果发现,IGF-1 促 MCF-7 细胞的增殖作用明显,而白藜芦醇能明显抑制 IGF-1 的促 MCF-7 细胞增殖效应。与白藜芦醇单独作用抑制 MCF-7 细胞的增殖效应比较,白藜芦醇与 IGF-1 共同作用对 MCF-7 细胞的抑制作用更为显著。

PI3K-AKT 信号途径在乳腺癌细胞增殖过程中发挥了重要作用。雌激素通过雌激素受体依赖的 PI3K-AKT 信号途径促进乳腺癌细胞的增殖;PI3K-AKT 途径导致 Bcl-2 转录与表达增强,促进了乳腺癌细胞的生存;PI3K 活性过高可导致乳腺癌细胞对内分泌治疗的抵抗或逃逸^[16-17]。近年来的研究还发现 PI3K-AKT 的下游激酶也在雌激素受体介导的乳腺癌细胞生存中扮演了重要角色^[18]。而且,PI3K-AKT 信号途径在 IGF-1 等诸多因素促肿瘤细胞增殖中扮演了重要角色^[19]。本研究发现利用 PI3K 抑制剂 Wortmannin 能够有效抑制 IGF-1 的促 MCF-7 细胞增殖作用,提示 PI3K-AKT 信号途径参与了 IGF-1 的促 MCF-7 细胞增殖过程。有报道指出白藜芦醇通过 PI3K-AKT 信号途径抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[13]。本研究通过免疫印迹检测发现,IGF-1 能够显著提高 MCF-7 细胞 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白的表达水平,提示其激活 MCF-7 细胞的 PI3K-AKT 信号途径。进一步研究发现白藜芦醇能够显著降低 IGF-1 促 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白表达的作用,提示白藜芦醇抑制 IGF-1 促 MCF-7 细胞增殖与其抑制 IGF-1 激活 PI3K-AKT 信号途径有关。

综上所述,白藜芦醇对 IGF-1 介导的乳腺癌细胞增殖具有明显抑制作用,在一定程度上能够遏制 IGF-1 的促瘤效应,其抑制 IGF-1 促乳腺癌细胞增殖效应与抑制 PI3K-AKT 信号途径有关。对白藜芦醇进一步深入研究将对其在乳腺癌治疗的临床应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer—clinical applications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(12): 693-701.
- [2] Walsh LA, Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- β 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9(1): 10.
- [3] Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1215: 1-8.
- [4] Alberobello AT, D'Esposito V, Marasco D, et al. Selective disruption of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) signaling via phosphoinositide-dependent kinase-1 prevents the protective effect of IGF-1 on human cancer cell death[J].

- J Biol Chem, 2010, 285(9):6563-6572.
- [5] Endogenous H, Breast CA. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(6):530-542.
- [6] Chong KY, Subramanian A, Mokbel K, et al. The prognostic significance of the insulin-like growth factor-1 ligand and receptor expression in breast cancer tissue[J]. Surg Oncol, 2011, 104(3):228-235.
- [7] Fu P, Ibusuki M, Yamamoto Y, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is associated with survival in breast cancer; a comprehensive analysis of gene copy number, mRNA and protein expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(1):307-317.
- [8] Mukohara T, Shimada H, Ogasawara N, et al. Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor(IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression[J]. Cancer Lett, 2009, 282(1):14-24.
- [9] Miki H, Uehara N, Kimura A, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4):1020-1028.
- [10] Bae S, Lee EM, Cha HJ, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Cells, 2011, 32(3):243-249.
- [11] Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, et al. Mitochondria, Calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer [J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(6):1466-1475.
- [12] Alkhalaf M, El-Mowafy A, Renno W, et al. Resveratrol-induced apoptosis in human breast Cancer cells is mediated primarily through the caspase-3-dependent pathway [J]. Arch Med Res, 2008, 39(2):162-168.
- [13] Tang FY, Yc S, Chen NC, et al. Resveratrol inhibits migration and invasion of human breast-cancer cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(6):683-691.
- [14] Singh N, Nigam M, Ranjan V, et al. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants[J]. Cancer Sci, 2011, 102(5):1059-1067.
- [15] Levi F, Pasche C, Lucchini F, et al. Resveratrol and breast Cancer risk[J]. Eur J Cancer Prev, 2005, 14(2):139-142.
- [16] Bratton MR, Duong BN, Elliott S, et al. Regulation of ER-alpha-mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk; implications for breast Cancer cell survival[J]. Int J Oncol, 2010, 37(3):541-550.
- [17] Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer [J]. J Clin Invest, 2010, 120(7):2406-2413.
- [18] Wang Y, Zhou D, Phung S, et al. SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast Cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(1):72-82.
- [19] Ma JC, Sawai H, Matsuo Y, et al. IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/AKT signaling pathway in pancreatic Cancer cells[J]. J Surg Res, 2010, 160(1):90-101.

(收稿日期:2012-10-22 修回日期:2012-11-26)

(上接第 169 页)

- of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44V6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis [J]. Anticancer Res, 2003, 2(2B):1581-1589.
- [10] 谷化平. 环氧合酶-2 和 CD44V6 蛋白在宫颈鳞癌中表达及临床意义[J]. 生命科学研究, 2008, 12(1):87-90.
- [11] 米建强, 张朝晖, 沈铭昌. 胃癌及癌前病变组织中 CD44V6 表达的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(2):156-158.
- [12] 张大伟, 张锦红. CD44V6 在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达及与胃癌生物学行为的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(6):610-615.
- [13] Carvalho R, Milne AN, Polak M, et al. A novel region of amplification at 11p12-13 in gastric cancer, revealed by representational difference analysis, is associated with overexpression of CD44V6, especially in early-onset gastric carcinomas[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(10):967-975.
- [14] Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, et al. CD44V6, MMP-7 and nuclear Cdx 2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2009(22):745-755.
- [15] 于海英, 刘畅, 高凤兰, 等. 胃癌组织中 MMP-9、CD44V6 和 VEGF 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(26):78-79.

(收稿日期:2012-08-13 修回日期:2012-12-04)