

葡萄籽提取物抑制乳腺癌细胞生长的实验研究

刘臣彪¹, 陈昌杰², 章尧², 章菊¹, 杨清玲², 王惠¹

[摘要]目的:探讨葡萄籽提取物(grape seed extract, GSE)抑制乳腺癌细胞生长的分子机制。方法:利用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 GSE 对乳腺癌细胞的抑制作用,并筛选合适的 GSE 实验浓度;流式细胞术检测 GSE 对乳腺癌细胞内活性氧(ROS)产生的影响;半定量 RT-PCR 法检测肿瘤细胞中肿瘤相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的水平。结果:GSE 抑制乳腺癌细胞的生长,作用具有剂量依赖性($P < 0.01$), IC_{50} 为 $100 \mu\text{g/ml}$;GSE 降低肿瘤细胞内 ROS 的产生;GSE 能减少乳腺癌细胞中 Bcl-2 基因的表达,对 Bax 基因无影响,其 Bcl-2/Bax 值显著降低($P < 0.01$)。结论:GSE 抑制乳腺癌细胞生长,可能是通过降低 ROS 的产生,减少相关基因 Bcl-2 的表达水平,进而降低 Bcl-2/Bax 值而实现的。

[关键词] 乳腺肿瘤;细胞株;葡萄籽提取物;活性氧;Bcl-2;Bax;实验室,体外

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9 **[文献标识码]** A

Experimental study on the role of grape seed extract in inhibiting the growth of breast cancer cells

LIU Chen-biao¹, CHEN Chang-jie², ZHANG Yao², ZHANG Ju¹, YANG Qing-ling², WANG Hui¹

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of grape seed extract (GSE) in inhibiting the growth of human breast cancer cells. **Methods:** MTT assay was employed to determine the inhibitory effect of GSE on human breast cancer cells, and suitable experimental concentration of GSE was screened. The influence of GSE on the generation of reactive oxygen species (ROS) in breast cancer cells was evaluated by flow cytometry; semiquantitative RT-PCR was used to detect the expression level of Bcl-2 gene and Bax gene related to tumor apoptosis. **Results:** GSE inhibited the growth of breast cancer cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$), and the proper dosage of IC_{50} was $100 \mu\text{g/ml}$. GSE might reduce the generation of ROS as well as the expression of Bcl-2 gene in tumor cells, but had no influence on the expression of Bax gene, and the value of Bcl-2/Bax decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions:** GSE can inhibit the growth of human breast cancer cells, which might be achieved by reducing the generation level of ROS and regulating the expression of Bcl-2 gene and Bax gene.

[Key words] breast neoplasms; cell line; grape seed extract; active oxygen; Bcl-2; Bax; laboratories, *in vitro*

葡萄籽提取物(grape seed extract, GSE)是一种多酚类复合物,主要成分是聚合多酚即原花青素(grape seed proanthocyanidins, GSP),还包括儿茶素和表儿茶素的二聚体、寡聚体和多聚体以及没食子酸酯等单体多酚^[1]。业已证实, GSE 有较强的抗氧化和抗衰老作用。近年来,人们发现 GSE 对人类肿瘤也具有广泛的抑制作用,相关的体内和体外实验均显示其对许多肿瘤有抑制作用,如前列腺癌、直肠癌、乳腺癌等^[2-4]。本研究进一步证实 GSE 对肿瘤细胞生长的抑制作用,并探讨其可能的作用机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 (1) 细胞株:人乳腺癌细胞

MCF-7 细胞株,由本实验室冻存。(2) 主要试剂:DMEM 培养基(Gibco 公司),新生牛血清(杭州四季青公司),0.25% 胰蛋白酶(Gibco 公司),GSE(深圳市安心久久科技有限公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA)(Sigma 公司),焦碳酸二乙酯(DEPC)(Invitrogen 公司),M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(MBI Fermentas 公司),Bcl-2、Bax、GAPDH 引物(上海生物工程技术有限公司)。(3) 主要仪器:CO₂ 培养箱, CX-201 超净工作台, Multiskan Ascent 酶标仪, PCR 扩增仪, FR-200 紫外与可见分析仪, 流式细胞仪等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 培养于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2.2 MTT 检测 GSE 对细胞增殖的抑制作用 GSE 的作用浓度分为 40、80、120、160、200 $\mu\text{g/ml}$,作用时间为 12、24、48、72 h。肿瘤细胞按每孔 3 000

[收稿日期] 2008-04-18

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘臣彪(1981-), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈昌杰, 博士, 研究生导师, 副教授。

细胞接种于 96 孔板,设空白孔和对照孔,每孔 6 个复孔。24 h 后加各浓度 GSE,然后在不同时间段每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l,孵育 4 h 后每孔加入 200 μ l DMSO,避光振荡摇匀,在酶标仪上检测 530 nm 处的吸光度值,计算肿瘤细胞生长抑制率:

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = \frac{1 - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.2.3 细胞内活性氧(ROS)检测 肿瘤细胞接种于 6 孔板,设空白孔和对照孔,培养 24 h 后加 GSE,终浓度参考 MTT 结果设计,分别为 50、100、200 μ g/ml,空白孔和对照孔不加,继续培养 2 h 后每孔加入终浓度为 10 μ mol/L DCFH-DA,空白孔不加,置培养箱中孵育 30 min,然后收集细胞,PBS 洗细胞 2 遍,各用 200 μ l PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 (1)总 RNA 提取:MCF-7 细胞按每孔 1.0×10^6 /ml 接种于 6 孔板,培养 24 h 后每孔加入 2 ml 培养液,GSE(5 μ g/ μ l)各加 20、40、80 μ l,使 GSE 终浓度分别为 50、100、200 μ g/ml,对照孔不加 GSE。作用 24 h 后用 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗细胞 2 遍后,各加 1 ml Trizol,反复吹打后置室温 10 min,使核蛋白体复合体完全解离。加 0.2 ml 氯仿,剧烈振荡混匀 15 s,室温孵育 2~3 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min。离心后,混合物分成 3 个相:底层红色的酚-氯仿相;中间相;上层的无色水相。RNA 全都在水相,小心转移水相至另一个 EP 管中,加入等体积异丙醇,4 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min。小心移去上清液,加 1 ml 75%乙醇,混匀,在 4 $^{\circ}$ C 7 500 r/min 离心 5 min,弃乙醇。待 RNA 略干燥后溶解在无 RNase 的水中。

以提取的总 RNA 为模板合成 cDNA,方法参照说明书。(2)PCR 扩增:用 Primer 5.0 设计各目的基因的引物。Bcl-2:上游 5'-CAG CCT TCC TCC AAA CCC TC-3',下游 5'-CAT CAT CAT TGC GAC CCA CA-3',产物长度 231 bp。Bax:上游 5'-ACC AAG AAG CTG AGC GAG TGT C-3',下游 5'-TGT CCA GCC CAT GAT GGT TC-3',产物长度 258 bp。GAPDH:上游 5'-GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC-3';下游 5'-AGC AGA GGG GGC AGA GAT GAT-3',产物长度 375 bp。各取 5 μ l PCR 产物,3 μ l Marker,2 μ l 溴酚蓝指示剂,于 1.5%琼脂糖凝胶上电泳约 45 min(电压 100 V),FR-200 紫外与可见分析仪扫描拍照,用 Smart View 图像分析软件半定量分析扫描灰度值,以 GAPDH 表达量为对照,计算并比较各组 Bcl-2 和 Bax 相对表达量。实验均重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 q 检验及 Poisson 分布的 u 检验。

2 结果

2.1 各组 MCF-7 细胞抑制率的比较 结果显示,随 GSE 作用剂量的增高,MCF-7 细胞的生长力逐渐降低,生长受到明显的抑制,且抑制作用具有剂量依赖性($P < 0.05 \sim P < 0.01$);GSE 80 μ g/ml 剂量组 48 h 和 72 h 及 160 μ g/ml 组与 200 μ g/ml 组 72 h MCF-7 细胞生长抑制率均高于 12 h($P < 0.05$),其他各剂量均无明显的时间依赖性($P > 0.05$)(见表 1)。根据 24 h 组抑制率绘制生长抑制率曲线,得 GSE 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 生长的 IC_{50} 为 100 μ g/ml,据此设计后边的 GSE 实验浓度为 50、100、200 μ g/ml。

表 1 GSE 对 MCF-7 细胞生长的影响($n_i = 3, \bar{x} \pm s$)

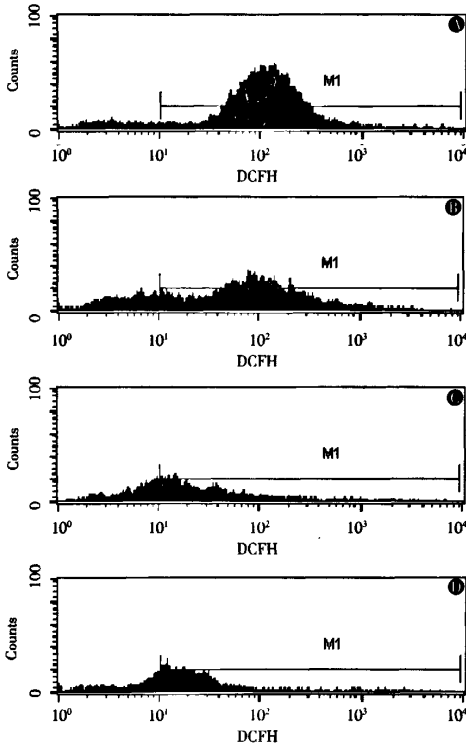
| GSE (μ g/ml) | 12 h | | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|----------------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
| | OD 值 | 抑制率(%) | OD 值 | 抑制率(%) | OD 值 | 抑制率(%) | OD 值 | 抑制率(%) |
| 对照组 | 0.204 9 \pm 0.038 1 | — | 0.326 3 \pm 0.028 9 | — | 0.432 2 \pm 0.015 3 | — | 0.224 4 \pm 0.005 1 | — |
| 40 | 0.185 9 \pm 0.032 3 | 12.50 | 0.273 4 \pm 0.012 6 Δ^* | 18.95 | 0.350 3 \pm 0.004 0 Δ^* | 22.10 | 0.185 8 \pm 0.007 0 Δ^* | 23.68 |
| 80 | 0.159 3 \pm 0.032 0 | 30.90 | 0.214 8 \pm 0.010 9 Δ^* | 40.26 | 0.226 7 \pm 0.049 9 Δ^* | 55.44* | 0.128 3 \pm 0.011 7 Δ^* | 59.18* |
| 120 | 0.126 9 \pm 0.006 8 Δ^* | 50.65 | 0.176 6 \pm 0.009 3 Δ^* | 54.10 | 0.186 4 \pm 0.027 7 Δ^* | 66.38 | 0.110 6 \pm 0.003 0 Δ^* | 70.13 |
| 160 | 0.120 8 \pm 0.003 6 Δ^* | 54.60 | 0.159 0 \pm 0.010 0 Δ^* | 60.66 | 0.153 4 \pm 0.013 6 Δ^* | 75.30 | 0.095 6 \pm 0.010 9 Δ^* | 79.42* |
| 200 | 0.110 8 \pm 0.001 6 Δ^* | 61.04 | 0.129 4 \pm 0.005 2 Δ^* | 71.27 | 0.129 8 \pm 0.026 1 Δ^* | 81.69 | 0.085 7 \pm 0.015 1 | 85.58* |
| F | 7.34 | | 75.23 | | 58.89 | | 96.92 | |
| P | <0.01 | | <0.01 | | <0.01 | | <0.01 | |
| MS _{组内} | 0.000 6 | | 0.000 2 | | 0.000 7 | | 0.000 1 | |

q 检验:与对照组间比较 * * $P < 0.01$;与 40 μ g/ml 组比较 $\Delta P < 0.05, \Delta \Delta P < 0.01$;与 12 h 比较 # $P < 0.05$

2.2 细胞内 ROS 测定结果 本实验用的 ROS 染料是 DCFH-DA,对细胞 ROS 进行染色,流式细胞仪检

测到的荧光强度反映胞内 ROS 的产生水平。对照组和 MCF-7 细胞经 50、100、200 μ g/ml GSE 作用

24 h 后用 DCFH-DA 染色后测得 ROS 的平均荧光强度分别为 188.40 ± 29.53 , 184.42 ± 26.47 , 88.98 ± 8.61 和 73.68 ± 6.70 , 差异有统计学意义 ($F = 26.40, P < 0.01, MS_{\text{组内}} = 422.926$) (见图 1)。GSE 50 $\mu\text{g/ml}$ 组肿瘤细胞内 ROS 产生水平与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 100 $\mu\text{g/ml}$ 和 200 $\mu\text{g/ml}$ GSE 组 ROS 水平均比对照组显著下降 ($P < 0.01$)。



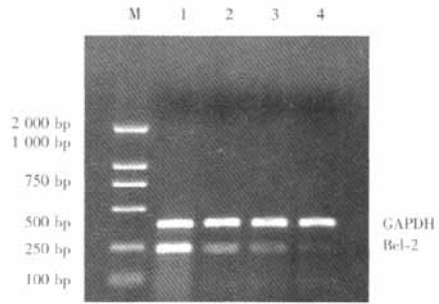
A: 对照组; B-D 分别为 50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GSE 组

图 1 各组 MCF-7 细胞经 GSE 作用后的细胞内 ROS 的平均荧光强度

2.3 半定量 RT-PCR 检测结果 经 RT-PCR 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像可见 MCF-7 细胞 Bcl-2 mRNA 表达随 GSE 浓度升高而逐渐降低 (见图 2); 同时, Bax mRNA 表达与对照组相比无明显变化 (见图 3)。经光密度扫描分析, Bcl-2 mRNA 表达与正常对照组比较, GSE 各浓度组光密度值明显降低, Bax mRNA 表达与对照组相比无明显变化, Bcl-2/Bax 值随 GSE 浓度升高而逐渐降低 ($P < 0.01$) (见表 2)。

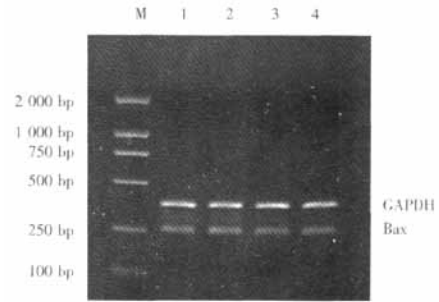
3 讨论

目前, 肿瘤是威胁人类健康的主要疾病, 虽然其治疗越来越多样化, 但是化疗仍是临床治疗肿瘤的主要方法之一。疗效高、副作用小的化疗药物是改



M: Marker; 1: 对照组; 2-4 分别为 50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GSE 组

图 2 RT-PCR 检测 Bcl-2 基因 mRNA 表达



M: Marker; 1: 对照组; 2-4 分别为 50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GSE 组

图 3 RT-PCR 检测 Bax 基因 mRNA 表达

表 2 不同剂量 GSE 作用 MCF-7 细胞后 Bcl-2、Bax mRNA 表达的比较 ($n = 3; \bar{x} \pm s$)

| GSE 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | Bcl-2 | Bax | Bcl-2/Bax |
|-----------------------------|-----------------------|------------------|----------------------|
| 对照组 | 97.24 ± 6.32 | 45.43 ± 3.12 | 2.21 ± 0.17 |
| 50 | $43.27 \pm 3.75^{**}$ | 47.76 ± 5.26 | $0.85 \pm 0.06^{**}$ |
| 100 | $22.16 \pm 2.03^{**}$ | 45.15 ± 4.34 | $0.44 \pm 0.04^{**}$ |
| 200 | $4.56 \pm 0.95^{**}$ | 44.73 ± 4.08 | $0.10 \pm 0.01^{**}$ |
| <i>F</i> | 328.54 | 0.30 | 300.61 |
| <i>P</i> | < 0.01 | > 0.05 | < 0.01 |
| <i>MS</i> _{组内} | 14.757 | 18.221 | 0.009 |

q 检验: 与对照组比较 * * $P < 0.01$

善肿瘤治疗现状的一个重要途径。GSE 起初是作为抗氧化剂而研究的, 并且在海外被用作很多食物的添加剂, 所以 GSE 对正常人体是无害的, 这使 GSE 被用于肿瘤治疗成为可能。Praveen 等^[2] 研究显示, GSE 可通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 途径并减少相关的基质金属蛋白酶的表达来抑制前列腺癌细胞的增殖。体外细胞实验和动物实验显示, GSE 能促进结肠癌、直肠癌细胞凋亡, 具有时间和剂量依赖性, 同时通过增加 Cip1/p21 合成和降低 G_1 期相关性细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶而使肿瘤细胞停滞于 G_1 期^[3]。Sharma 等^[4] 研究发现, GSE 抑制

乳腺癌细胞的作用与阿霉素类似,且两者联合用药具有协同作用。本实验结果也证实,GSE对乳腺癌细胞生长有较强的抑制作用。此外,GSE还抑制其他不同系统来源的肿瘤^[5]。

ROS参与细胞的信号转导,通过调控相关基因的转录和表达来介导对细胞多种过程的调控。近年来有研究显示,ROS不仅参与肿瘤细胞的凋亡,还可作为细胞分裂的激动剂,促进核DNA的突变和细胞分裂,使肿瘤细胞获得选择性增生的优势^[6]。另外,体内的ROS以协同方式激活转录因子NF- κ B和MAPK,以启动相关基因的转录来促进肿瘤细胞增殖以及肿瘤的黏附、侵袭、转移等^[7-9]。本研究结果发现,低浓度组GSE与对照组中ROS产生水平无差异,可能是由于GSE在低浓度时其有效剂量还不能有效影响ROS的产生,但能通过其他途径抑制肿瘤细胞的生长,如减少Bcl-2基因的表达;而GSE 100 μ g/ml和200 μ g/ml组能明显降低肿瘤细胞中ROS的产生。可以推断,GSE在其有效剂量内通过降低ROS的生成,从而阻断了经由ROS介导的肿瘤增殖的信号转导通路,具体机制还有待于进一步的研究。

Bcl-2家族是调控凋亡的重要分子,其在肿瘤中的异常表达,导致肿瘤细胞能逃逸凋亡。Bcl-2编码蛋白属于线粒体膜蛋白,是重要的抗凋亡基因,在肿瘤中异常高表达。Bax同属于Bcl-2蛋白家族,属于促凋亡因子。Bcl-2和Bax在细胞的线粒体凋亡途径中发挥重要的调节作用,前者抑制细胞凋亡,而后者正好相反,两者可以形成异源二聚体,也可各自形成同源二聚体。Bcl-2/Bax值是一定的,这一比例的增大或减小就会决定是诱导细胞凋亡还是抑制细胞凋亡^[10]。本实验发现,GSE显著降低了Bcl-2基因的表达,同时对Bax基因的表达无影响,但是Bcl-2/Bax值却显著降低。即GSE降低Bcl-2/Bax值后,Bax同源二聚体形成增加,从而增加肿瘤细胞线粒体膜的通透性,导致细胞色素C的释放,激活下游信号通路,进而激活caspase家族,从而最终导致细胞凋亡^[11]。

本实验证实,GSE是通过不同的作用途径实现对肿瘤的抑制。GSE能够调节Bcl-2基因的表达,是通过线粒体途径而促进肿瘤细胞凋亡;GSE降低

肿瘤细胞中ROS的产生,是通过其他途径来促进乳腺癌细胞的凋亡,因为在线粒体凋亡途径中,ROS的产生应该是升高的,这也是很多通过线粒体途径促进肿瘤细胞凋亡药物的一个共同特点。由于ROS主要是由线粒体产生的,因此我们推断GSE通过清除胞质中的ROS,从而阻断了由ROS介导的信号传导通路,比如MAPK、NF- κ B^[8,9],还需要进一步研究来证实。

[参 考 文 献]

- [1] 冯建光. 葡萄籽提取物的质量评定[J]. 中国食品添加剂, 2004, 14(2): 49-51.
- [2] Praveen KV, Anshu M, Santosh KK. Proanthocyanidins from grape seeds inhibit expression of matrix metalloproteinases in human prostate carcinoma cells, which is associated with the inhibition of activation of MAPK and NF κ B[J]. *Carcinogenesis* Vol, 2004, 25(6): 987-995.
- [3] Kaur M, Singh RP, Gu M, *et al.* Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6194-6202.
- [4] Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, *et al.* Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 85(1): 1-12.
- [5] Ye X, Krohn RL, Liu W, *et al.* The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 196(1-2): 99-108.
- [6] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2001, 11(4): 173-186.
- [7] Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(4): 695-705.
- [8] Rhyu DY, Yang Y, Ha H, *et al.* Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(3): 667-675.
- [9] Hsu TC, Young MR, Cmarik J, *et al.* Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor κ B (NF- κ B)-dependent transcriptional events in carcinogenesis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(9): 1338-1348.
- [10] Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, *et al.* Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak[J]. *Nature*, 1995, 374(6524): 736-739.
- [11] Chou JJ, Li H, Salvesen GS, *et al.* Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling[J]. *Cell*, 1999, 96(5): 615-624.