

# 淫羊藿素对雌激素依赖性乳腺癌 MCF-7 细胞作用的影响

胡蕾蕾<sup>1</sup>, 段小群<sup>1\*</sup>, 卢曦<sup>1</sup>, 李军<sup>2</sup>, 张可锋<sup>1</sup>, 孙晓玲<sup>1</sup>, 李云秋<sup>1</sup>  
(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 新加坡国立大学 999002)

**[摘要]** 目的:探讨淫羊藿素(ICT)对雌激素依赖性乳腺癌 MCF-7 细胞的作用。方法:以在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养的人乳腺癌 MCF-7 为研究对象,用不同浓度的淫羊藿素单独作用及与雌二醇联合作用,测定人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖率,并检测该过程中雌激素受体 ER $\alpha$  的表达情况。结果:当 ICT 浓度大于  $1 \times 10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> 时单独使用能促进 ER $\alpha$  阳性人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,能诱导 ER $\alpha$  基因的表达;淫羊藿素与雌二醇联合作用抑制 MCF-7 细胞增殖,抑制 ER $\alpha$  的表达。结论:淫羊藿素与雌二醇联合作用具有抑制 E<sub>2</sub> 诱导的人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖作用;淫羊藿素与雌二醇联合作用可抑制 ER $\alpha$  基因的表达。

**[关键词]** 淫羊藿素; 人乳腺癌细胞 MCF-7; 雌激素; 雌激素受体 ER $\alpha$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0155-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1510.004.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-15 15:10

## The Role of Icaritin on Estrogen-dependent Breast Cancer Cell MCF-7

HU Lei-lei<sup>1</sup>, DUAN Xiao-qun<sup>1\*</sup>, LU Xi<sup>1</sup>, LI Jun<sup>2</sup>, ZHANG Ke-feng<sup>1</sup>, SUN Xiao-ling<sup>1</sup>, LI Yun-qiu<sup>1</sup>

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 2. National University of Singapore 999002, Singapore)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the role of icaritin on Estrogen-dependent breast cancer cell line MCF-7. **Method:** MCF-7 human breast cancer was used to observe proliferation rate by different concentrations of icaritin alone and combined effects of estrogen in human breast cancer MCF-7 cell, and test the expression of estrogen receptor (ER $\alpha$ ). **Result:** When MCF-7 cells were treated with ICT, MCF-7 cells proliferation was promoted. The activity of ER $\alpha$  report gene expression could be induced by icaritin. The effect of estradiol (E<sub>2</sub>) could be antagonized by icaritin when treated with the combined icaritin and E<sub>2</sub>. **Conclusion:** The icaritin can promote MCF-7 cells proliferation and has certain phytoestrogenic effects. The activity of ER $\alpha$  report gene expression can be antagonized by icaritin.

**[Key words]** icaritin; human breast cancer; MCF-7; estrogen; estrogen receptor

乳腺癌是一种多原因、多机制引起的恶性肿瘤。一般来说,其发病与激素、遗传、免疫、以及各种环境因素(包括饮食,生活习惯等)有关,并极有可能是以上各种因素共同作用的结果<sup>[1]</sup>。许多研究表明,雌激素暴露是引发乳腺癌的高危因素之一,大量的

临床流行病学调查显示内源性雌激素水平持续升高或大量补充外源性雌激素均使乳腺癌发生率明显升高。体外研究结果也表明雌激素促进雌激素受体(ER)阳性乳腺肿瘤细胞的增殖与侵袭。其机制可通过其受体(ER)信号传导途径促进乳腺肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。近年来,我国乳腺癌的发病率迅速增长,死亡率也相应增加,尤其是在我国城市调查中发现:乳腺癌发病率已位居大城市女性肿瘤发病率的第一位<sup>[3]</sup>。所以对其进行深入研究具有十分重要的意义。

淫羊藿作为我国的传统中药具有温肾壮阳,强筋骨,御风湿的功效。临床上主要用于阳痿遗精,宫

**[收稿日期]** 20111103(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81060272);广西医学科学实验中心开发课题(KFJJ2011-12)

**[第一作者]** 胡蕾蕾,硕士研究生,抗肿瘤机制的研究, Tel: 0773-5895058, E-mail: hl\_hope@126.com

**[通讯作者]** \*段小群,博士,教授,从事药用资源开发研究, Tel:0773-5895058, E-mail: robor2duan@163.com

冷不孕,风湿痹痛,麻木拘挛以及高血压等心血管疾病。近年来的一些研究表明,淫羊藿的提取物或淫羊藿衍生物具有雌激素样作用。其中,以黄酮为主要有效成分<sup>[4]</sup>,而黄酮成分中主要为淫羊藿苷(icariin, ICA),淫羊藿素(icaritin, ICT)为淫羊藿苷的水解衍生物,目前针对淫羊藿素的研究相对较少,淫羊藿素有可能为淫羊藿中真正的雌激素活性成分之一,因此我们选择淫羊藿素做进一步研究,期望其为选择性雌激素受体调节剂,为乳腺癌的治疗开发一种更安全,更有效,副作用更小的药物提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株及试剂** MCF-7 细胞株(购自美国菌种保藏中心), DMSO、MEM 培养基(不含酚红)、MTT(Sigma 公司),胎牛血清(用活性炭处理)、胰蛋白酶(Gibco 公司),左旋谷氨酰胺(Hyclone 公司),Hoechst33342(南京凯基生物科技发展有限公司),多聚甲醛(北京鼎国生物技术公司),Trizol、反转录及 PCR 试剂盒(宝生物工程有限公司),引物(上海生工合成),荧光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天生物研究所)。

**1.2 药物** 淫羊藿素(购于 Toronto Research Chemicals Inc, 货号 I163700, 纯度 99%), 17- $\beta$  雌二醇( $E_2$ , 新加坡国立大学李军博士惠赠)。

**1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fische 公司), PCR 仪(德国 BIOMETRA 公司), 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), 微孔板式化学发光检测仪 LB960Centro(德国 Berthold 公司), 酶标仪(美国伯乐公司)。

## 2 方法

**2.1 淫羊藿素对 MCF-7 细胞增殖的影响** 将处于对数生长期的 MCF-7 细胞按  $2 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 96 孔, 每孔为 200  $\mu$ L, 每个浓度( $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) 设 5 个复孔。并设空白对照组、0.1% DMSO 溶剂对照组, 和不同浓度淫羊藿素及淫羊藿素与  $E_2$  联合, 用 MTT 比色法检测细胞增殖情况, 以吸光度(A)表示。

$$\text{增殖率} = (\text{实验组 } A / \text{溶剂对照组 } A) \times 100\%$$

**2.2 淫羊藿素( $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)与  $E_2$ ( $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>)联合作用后细胞生长状态的观察** 具体方法同 2.1。

**2.3 细胞凋亡形态学观察** 将处于对数生长期的 MCF-7 细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于六孔板中, 培养

12 h 后用不同浓度 ICT 与  $E_2$ ( $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>)联合作用 MCF-7 细胞, 在实验条件下培养 6 d 后, 每孔加入 4% 的多聚甲醛 800  $\mu$ L, 室温下固定 30 min, 吸去多聚甲醛后, 用 PBS 冲洗 2 次, 风干后, 每孔加入 1:100 稀释后的 Hoechst33342 染料 500  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 摇床孵育 15 min, 在倒置显微镜下观察细胞形态。

**2.4 基因检测** 取对数生长期稳定表达 ER $\alpha$  的 hela 细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于六孔板中, 培养 12 h 后用不同浓度 ICT 与  $E_2$ ( $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>)联合作用细胞, 在实验条件下培养 6 d 后, 按报告基因试剂盒操作测定 ER $\alpha$  报告基因的活性。

**2.5 RT-PCR 检测细胞雌激素受体的表达情况** 用不同浓度的淫羊藿素( $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) +  $E_2$ ( $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>)处理后的处于对数生长期 MCF-7 细胞, 采用 Trizol 方法提取总 RNA, 并进行反转录合成 cDNA, 然后 PCR 扩增目的基因。ER $\alpha$  上游引物 5'-CACTCAACAGCGTGTCTCCG-3', 下游引物 5'-TATCCCACCTTTCATCATTCC-3', 产物长度 470 bp。以  $\beta$ -actin 作为内参照, 上游为: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' 下游为: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 产物长度 205 bp。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C, 保存 5 min。2% 琼脂糖凝胶中电泳, 全自动凝胶成像分析系统分析结果。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件分析, 两个样本均数比较采用 *t* 检验, 多样本均数比较采用完全随机的单因素方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 淫羊藿素单独使用及淫羊藿素与雌激素联合作用对 MCF-7 细胞增殖的影响** 由表 1 和表 2 实验结果可见, 淫羊藿素单独使用, 在一定浓度范围内, 表现出雌激素样活性, 使 MCF-7 细胞增殖率增加; 从淫羊藿素与雌激素联合作用对 MCF-7 细胞增殖的结果来看, 浓度为  $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup> 的雌激素与大于  $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> 浓度 ICT 联合作用均能明显抑制 MCF-7 细胞的生长。

**3.2 淫羊藿素与雌激素联合作用后细胞生长状态的观察**  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 的淫羊藿素 +  $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>  $E_2$  作用后, 细胞生长有少量受到抑制;  $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 的淫羊藿素 +  $1 \times 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>  $E_2$  作用后, 细胞生长受到明显抑制, 部分细胞死亡;  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>

表 1 ICT 单独应用 6 d 后对 MCF-7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	A	增殖率/%
对照	-	0.320 ± 0.01	100.0
ICT	1 × 10 <sup>-10</sup>	0.324 ± 0.03	101.3
	1 × 10 <sup>-9</sup>	0.340 ± 0.05	106.3
	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.364 ± 0.04	113.8 <sup>2)</sup>
	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.376 ± 0.07	117.5 <sup>2)</sup>
	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.509 ± 0.05	159.1 <sup>1)</sup>
	5 × 10 <sup>-6</sup>	0.874 ± 0.06	273.1 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.911 ± 0.02	284.7 <sup>1)</sup>
5 × 10 <sup>-5</sup>	0.853 ± 0.03	266.6 <sup>1)</sup>	

注:与对照组相比<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01。

表 2 ICT + E<sub>2</sub> 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> 对 MCF-7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	A	增殖率/%
对照	-	0.331 ± 0.02	100
E <sub>2</sub> + ICT	1 × 10 <sup>-9</sup>	0.852 ± 0.03	257.4
	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.843 ± 0.02	254.7
	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.827 ± 0.07	249.8
	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.537 ± 0.01	162.2
	5 × 10 <sup>-6</sup>	0.482 ± 0.06	145.6
	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.421 ± 0.04	127.2

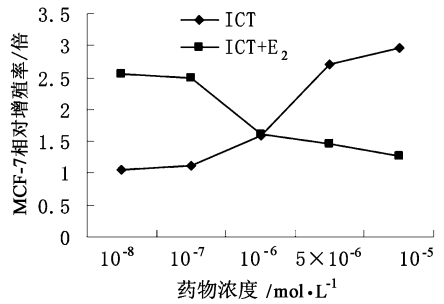
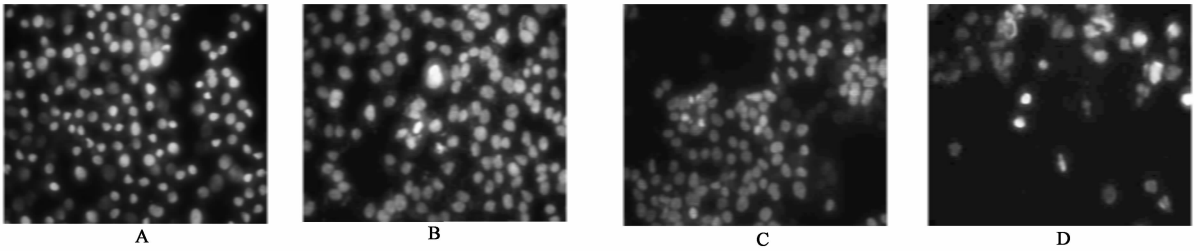


图 1 ICT + E<sub>2</sub> 对 MCF-7 细胞的作用

的淫羊藿素 + 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> 作用后,凋亡细胞和死亡细胞增多,活细胞明显减少; 5 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的淫羊藿素 + 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> 作用后,细胞数量明显减少。

**3.3 E<sub>2</sub> 与 ICT 联合应用诱导细胞凋亡** Hoehst 染色结果显示:在不同浓度药物作用下,药物浓度越高,细胞凋亡率也随着增加。见图 2。

**3.4 ICT 单独作用及与 E<sub>2</sub> 联合作用对 ER $\alpha$  报告基因表达活性影响** 模拟绝经后妇女经 HRT 治疗后,体内 E<sub>2</sub> 浓度可达 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>,因此选择 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> 浓度。由表 3 实验结果表明:



A. E<sub>2</sub> 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> + ICT 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>; B. E<sub>2</sub> 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> + ICT 5 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>; C. E<sub>2</sub> 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> + ICT 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>; D. E<sub>2</sub> 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> + ICT 5 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>

图 2 E<sub>2</sub> + ICT 对 MCF-7 细胞的凋亡诱导作用 (Hoehst 染色, × 100)

淫羊藿素单独作用能诱导 ER $\alpha$  的表达。由表 4 表明,在雌激素质量浓度一定下,发现与浓度大于 1 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> ICT 联合作用后,对 ER $\alpha$  报告基因表达有显著抑制作用。

**3.5 淫羊藿素与 E<sub>2</sub> 联合作用后 ER $\alpha$  的表达**

**3.5.1 总 RNA 的提取结果电泳图** RNA 的纯度在正常范围内(1.8 ~ 2.0)。电泳图显示总 RNA 的 3 条带即 28 S, 18 S, 5 S 条带,基本看不到杂带。见图 3。

**3.5.2 E<sub>2</sub> 和淫羊藿素联合作用后对 ER $\alpha$  报告基因表达的影响** 当 E<sub>2</sub>(生理治疗量)为 1 × 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>时,随着 ICT 浓度的增加,表达量减少。见图 4。

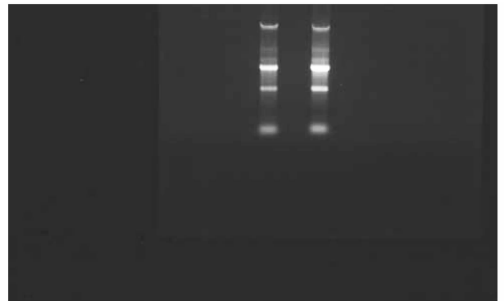


图 3 总 RNA 的提取电泳图

**4 讨论**

植物雌激素是一类存在于植物中的非甾体类化合物,其结构及生物活性与内源性雌激素相似。由于可模拟或干扰内源性雌激素而具有雌激素效应或

表 3 ICT 单独作用对 ER $\alpha$  报告基因表达活性的影响

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	RLU( $\bar{x} \pm s$ )	最大相对活性
E <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-9</sup>	35 061 ± 547	166.6 <sup>1)</sup>
ICT	1 × 10 <sup>-10</sup>	2 102 ± 63	10.0 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-9</sup>	2 219 ± 76	10.5 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-8</sup>	3 994 ± 111	19.0 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-7</sup>	11 546 ± 837	54.9 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-6</sup>	23 370 ± 689	111.0 <sup>1)</sup>
	5 × 10 <sup>-6</sup>	25 292 ± 497	120.2 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-5</sup>	26 873 ± 326	127.7 <sup>1)</sup>
	5 × 10 <sup>-5</sup>	24 386 ± 373	115.8 <sup>1)</sup>

注:与 E<sub>2</sub> 组对比<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01(表 4 同)。

表 4 ICT + E<sub>2</sub> 联合作用对 ER $\alpha$  报告基因表达活性的影响

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	RLU( $\bar{x} \pm s$ )	最大相对活性
E <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-9</sup>	35 061 ± 547	166.6 <sup>1)</sup>
ICT + E <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-10</sup>	34 708 ± 87	164.9 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-9</sup>	31 808 ± 41	151.1 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-8</sup>	31 684 ± 10	150.5 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-7</sup>	31 628 ± 15	150.3 <sup>1)</sup>
	1 × 10 <sup>-6</sup>	26 531 ± 20	126.0 <sup>2)</sup>
	5 × 10 <sup>-6</sup>	21 041 ± 58	100.0 <sup>2)</sup>
	1 × 10 <sup>-5</sup>	15 615 ± 15	74.2 <sup>2)</sup>
	5 × 10 <sup>-5</sup>	9 227 ± 7	43.8 <sup>2)</sup>

抗雌激素效应而受到广泛关注。多项研究表明植物雌激素在体内外都具有抑制乳腺癌的作用<sup>[5-7]</sup>。一些关于植物雌激素尤其是大豆异黄酮类植物雌激素在抗乳腺癌的方面的研究比较多。但往往流行病学调查和实验室研究结果并不一致。一些流行病学调查表明,富含大豆异黄酮的豆类制品并不能预防所有女性乳腺癌的发生。因此,在植物雌激素中选择疗效更明确的,副作用更低的药物作为临床妇科用药,尤其是抗乳腺癌药物,是研究的重要方向之一。淫羊藿近来的一些研究表明,淫羊藿苷的衍生物淫羊藿素( ICT)可能为真正的药理活性成分,具有一定的雌激素样作用。本实验对其进行了研究,期望其能作为选择性雌激素受体调节剂作用在乳腺癌上,为乳腺癌患者带来福音。

[参考文献]

[1] Toniolo P G, Levitz M, Zeleniuch Jacquotte A, et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women[J]. J Natl Cancer Inst, 1995,87(3):190.

[2] 杨洁,韩为东,赵亚丽. 雌激素与乳腺癌[J]. 现代肿瘤医学,2007,15(3):431.

[3] 中国乳腺疾病调查报告[D]. 北京:中国人口协会,2010.

[4] 刘文和,雷光华. 淫羊藿的药用成分、药理作用及典型制剂中的鉴别研究进展[J]. 湘南学院学报:自然科学版,2005,7(2):66.

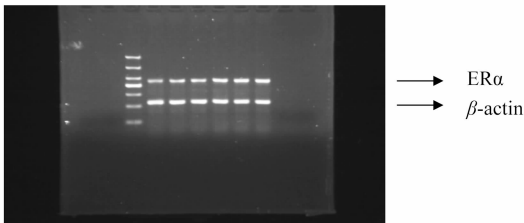
[5] Dai Q, Franke A A, Yu H, et al. Urinary phytoestrogen excretion and breast cancer risk:evaluating potential effect modifiers endogenous estrogens and anthropometrics[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2003,12(6):497.

[6] Sharon A, Sylviam, Carl O, et al. Dietary genistein reduces metastasis in a postsurgical orthotopic breast cancer model[J]. Cancer Res,2005,65:3396.

[7] 刘观昌,朱怀荣,张凤英,等. 植物雌激素对乳腺癌的抑制作用[J]. 菏泽医学专科学校学报,2007,19(3):1.

[责任编辑 聂淑琴]

M 1 2 3 4 5 6



M 为 Maker;1~5 分别为 E<sub>2</sub>(1 × 10<sup>-9</sup> mol·L) + ICT(1 × 10<sup>-5</sup>, 5 × 10<sup>-5</sup>, 5 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-7</sup> mol·L);6 为对照组

图 4 RT-PCR 检测 E<sub>2</sub> + ICT 对 ER $\alpha$  表达的影响