

◇ 预防医学研究 ◇

硒-甲基硒代半胱氨酸对 MCF-7 细胞 抗氧化及 Survivin 基因表达的影响

罗雅婕 徐璐 邵继红 黄秋 谢蒙蒙

摘要 目的 探讨硒-甲基硒代半胱氨酸(MSC)对乳腺癌 MCF-7 细胞抑制及其诱导凋亡的作用机制。方法 采用不同浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) MSC 作用于 MCF-7 细胞,四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定 MSC 对细胞增殖的抑制作用;Hoechst 染色法观察细胞凋亡形态;氮蓝四唑(NBT)显色法检测 MSC 对细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响;硫代巴比妥酸法(TBA)法检测 MSC 对细胞内丙二醛(MDA)水平的影响;RT-PCR 法检测细胞 Survivin 基因的表达。结果 MSC 对 MCF-7 细胞的增殖具有抑制作用,细胞存活率随其浓度的增加而逐渐降低;荧光染色可见,MSC 干预组细胞变圆、胞核皱缩、染色质浓缩,与对照组比较差异有统计学意义;MSC 降低 MCF-7 细胞内 SOD 的活性,升高细胞内 MDA 水平($P < 0.01$);同时,MSC 能下调 Survivin mRNA 的表达($P < 0.01$)。结论 MSC 可通过调节乳腺癌细胞内氧化还原状态及 Survivin 基因的表达抑制乳腺癌细胞的体外增值和诱导凋亡,MSC 作为一种新型营养强化剂有望开发其预防和辅助乳腺癌治疗的新用途。

关键词 硒-甲基硒代半胱氨酸;人乳腺癌 MCF-7 细胞;Survivin 基因;细胞凋亡

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0194-04

硒-甲基硒代半胱氨酸(Se-methylselenocysteine, MSC)是一种广泛存在于多种植物中的天然有机硒化合物。我国卫生部于 2009 年批准 L-硒-甲基硒代半胱氨酸为新型营养强化剂(食品添加剂新品种 2009 年第 11 号公告),其具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤及解毒重金属等作用。MSC 是一种有效的细胞生长抑制剂,能有效抑制肿瘤细胞的增殖,诱导其凋亡,并能抑制多种癌基因的表达^[1-2]。目前,对 MSC 抗癌作用的研究较多,但对于其与细胞凋亡相关机制及氧化应激在细胞凋亡过程中发挥作用的研究较

少。该研究采用不同浓度 MSC 体外处理人乳腺癌 MCF-7 细胞,探讨 MSC 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制的效果以及诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用机制,为进一步探讨 MSC 作为新型营养强化剂,在乳腺癌的辅助化疗以及高危人群的营养预防新用途提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株由南京医科大学营养与食品卫生教研室惠赠。

1.2 主要试剂 MSC 购自美国 Sigma 公司,溶解于双蒸水中配制成 100 mmol/L 的储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Amersco 公司;细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所;Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 MCF-7 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 完全培养基,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱中培养 3 d 传代 1 次。MSC 储存液使用前用 DMEM 完全培养基倍比稀释成 200、100、50、25、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度溶液。实验分为对照组(细胞培养体系中不加任何干预试剂)和试验组[细胞培养体系中加入不同浓度的 MSC,分别记为 MSC(200、100、50、25、12.5 $\mu\text{mol/L}$)组]。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖活力 取对数生长期细胞消化接种于 96 板中,培养 24 h 后,试验组分别加入 MSC(200、100、50、25、12.5 $\mu\text{mol/L}$) 200 μl ,对照组加入等体积 DMEM 培养液,每组设 5 个复孔,分别培养 24、36、48 h 后弃去各孔培养基,各孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl ,置培养箱中继续孵育 4 h 后弃上清液,再加入 DMSO 100 μl ,振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定每孔吸光度(OD)值。以空白(PBS + 完全培养基)无细胞组及完全培养基有细胞

2013-08-14 接收

基金项目:徐州市科技发展指导性计划(编号: XZZD1220);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(编号: CXZZ12_0998)

作者单位:徐州医学院公共卫生学院,徐州 221004

作者简介:罗雅婕,女,硕士研究生;

邵继红,女,教授,研究生导师,责任作者,E-mail: sjh@xzmc.edu.cn

组作为对照。计算各组细胞在不同药物浓度下细胞存活率,计算公式:细胞存活率(%) = 测定组 OD 值 - 无细胞组 OD 值 / 对照组 OD 值 - 无细胞组 OD 值 × 100%。

1.2.3 Hoechst33258 荧光染色观察细胞核形态
按 Hoechst 染色试剂盒说明书操作。荧光显微镜下观察并拍摄图片,以细胞皱缩、胞核致密浓染、荧光强度增强等作为细胞凋亡指标。

1.2.4 SOD 活性及 MDA 水平检测 用细胞裂解液裂解细胞 4 ℃ 1 000 g 离心 5 min,取上清液作为待测样品。BCA 法检测待测样品的蛋白浓度,按总 SOD 活性检测试剂盒[氮蓝四唑(NBT)显色法]和 MDA 检测试剂盒[总硫代巴比妥酸(TBA)法]说明书的方法和操作要求,检测细胞总 SOD 活性和细胞 MDA 水平。

1.2.5 RT-PCR 法检测 Survivin 基因的表达 用 TRNzol Reagent 提取细胞总 RNA,核酸蛋白测定仪测定 RNA 纯度和浓度。按 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书操作进行扩增。引物由上海生工有限公司合成。Survivin 基因上游:5'-CCACCCGATCTC-TACATTC-3',下游:5'-CTTTCTCCGAGTTTCCTC-3',产物长度 343 bp;β-actin 基因作为内参照,上游:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3',下游:5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3',产物长度 300 bp。PCR 扩增反应条件为:95 ℃ 初始变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,65 ℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环,最后 1 个循环后 65 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用溴化乙锭(EB)经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,应用 Image J 软件统计分析各基因及对应组别内参 β-actin 的灰度值,各基因 cDNA 的扩增倍数用 β-actin 的表达量进行校正。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素多组均数间比较采用单因素方差分析,资料满足方差齐性时,多实验组与同一对照组均数间两两比较采用 Dunnett's *t* 检验,资料不满足方差齐性时,多实验组与同一对照组均数间两两比较采用 Dunnett's *T3* 检验。

2 结果

2.1 MSC 对 MCF-7 细胞增殖的影响 MTT 结果显示,各浓度 MSC 作用 MCF-7 细胞后有明显的增殖抑制作用,处理 24、36、48 h,各试验组存活率与对照组相比均降低,各试验组间差异有统计学意义 ($F_1 = 361.72, F_2 = 529.41, F_3 = 699.09, P <$

0.05)。在同一浓度下,随着处理时间的延长,细胞存活率逐渐降低 [MSC(100、200 μmol/L)组],200 μmol/L 浓度处理 48 h 后,细胞增殖抑制最明显,细胞存活率最低。而 MSC(12.5、25、50 μmol/L)组随处理时间的延长,同一浓度下,细胞存活率变化不明显,见表 1。

表 1 MSC 对 MCF-7 细胞存活率的影响 (n=5, % $\bar{x} \pm s$)

MSC 浓度 (μmol/L)	时间 (h)		
	24	36	48
0	100.00 ± 2.33	100.00 ± 1.75	100.00 ± 2.23
12.5	93.80 ± 3.16 **	96.29 ± 1.99	96.53 ± 1.65
25	90.92 ± 2.09 **	92.22 ± 4.00 **	92.59 ± 1.31 **
50	71.44 ± 1.95 **	71.50 ± 3.11 **	70.77 ± 1.28 **
100	63.55 ± 3.17 **	53.61 ± 0.82 **	45.02 ± 3.40 **
200	42.94 ± 2.40 **	35.53 ± 2.27 **	23.92 ± 4.36 **

与对照组(0 μmol/L MSC)比较: ***P* < 0.01

2.2 MSC 对 MCF-7 细胞凋亡染色的影响 对 MCF-7 细胞用不同浓度 MSC 处理后进行 Hoechst 染色,于荧光显微镜下观察发现:对照组细胞的细胞核呈圆形或椭圆形,为弥散均匀的蓝色荧光,荧光强度较弱。100、200 μmol/L MSC 处理细胞后,较多细胞的细胞核呈致密浓染,出现核固缩,荧光强度较大,颜色发白,与对照组比较差异明显。见图 1。

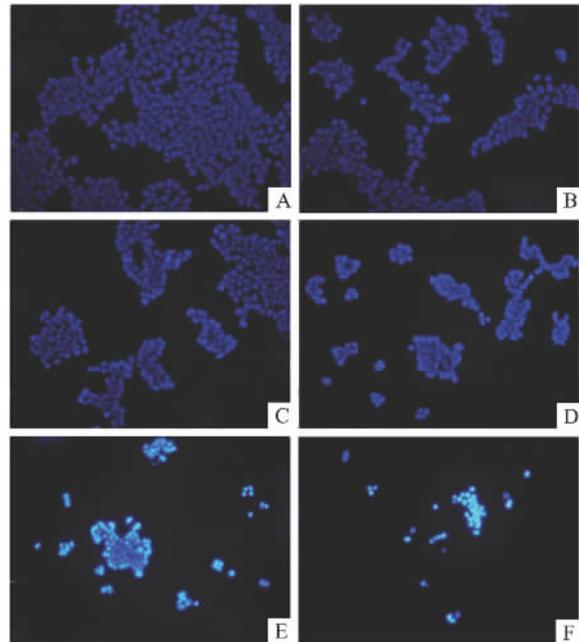


图 1 MSC 不同浓度干预 MCF-7 细胞 Hoechst 33258 染色情况 ×100
A: 对照组; B: MSC 12.5 μmol/L 组; C: MSC 25 μmol/L 组; D: MSC 50 μmol/L 组; E: MSC 100 μmol/L 组; F: MSC 200 μmol/L 组

2.3 MSC 对 MCF-7 细胞内总 SOD 活性的影响 NBT 显色法结果显示,各浓度 MSC 处理细胞后,各

处理组细胞总 SOD 活力均弱于对照组 ($F = 401.15$, $P < 0.01$)。随着试验组 MSC 浓度的增加,细胞总 SOD 活力逐渐降低,200 $\mu\text{mol/L}$ MSC 处理细胞后 SOD 的活力最低,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 MSC 对 MCF-7 细胞总 SOD 活力的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

MSC 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	SOD 活力 (U/mg)
0	65.91 \pm 4.87
12.5	40.47 \pm 2.42**
25	22.64 \pm 2.23**
50	17.03 \pm 1.58**
100	9.38 \pm 0.55**
200	7.31 \pm 0.48**

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ MSC) 比较: ** $P < 0.01$

2.4 MSC 对 MCF-7 细胞内 MDA 的影响 TBA 法结果显示,与对照组相比,MSC 处理能增加 MCF-7 细胞内 MDA 含量 ($F = 1522$, $P < 0.01$)。随 MSC 浓度的提高,细胞 MDA 含量逐渐提高,MSC (200 $\mu\text{mol/L}$) 组 MDA 含量最高,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 MSC 对 MCF-7 细胞 MDA 水平的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

MSC 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	MDA 含量 ($\mu\text{mol/g}$)
0	2.73 \pm 0.17
12.5	3.75 \pm 0.10**
25	5.00 \pm 0.16**
50	6.34 \pm 0.27**
100	8.90 \pm 0.24**
200	11.48 \pm 0.15**

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ MSC) 比较: ** $P < 0.01$

2.5 MSC 对 MCF-7 细胞中 Survivin mRNA 表达的影响 经不同浓度 MSC 处理 24 h 后,RT-PCR 法检测 Survivin mRNA 表达,电泳条带结果见图 2,Image J 灰度值分析,结果见图 3。结果可知,随 MSC 浓度的增加,Survivin mRNA 表达水平逐渐降低。MSC (200 $\mu\text{mol/L}$) 组 Survivin mRNA 表达水平最低,MSC (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 组虽低于对照组,但差异无统计学意义。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国占全身各种恶性肿瘤的 7% ~ 10%,呈逐年上升趋势,严重危害妇女的身心健康^[3]。化疗作为全身性治疗手段在乳腺癌综合治疗中占有重要地位^[4],但化疗药物在杀伤癌细胞的同时对正常细胞也造成损

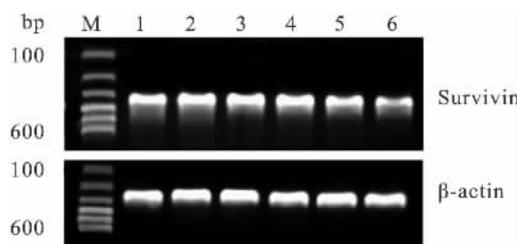


图 2 RT-PCR 法观察 MSC 对 MCF-7 细胞 Survivin mRNA 表达的影响

M: Marker; 1: 对照组; 2: MSC 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: MSC 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: MSC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: MSC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6: MSC 200 $\mu\text{mol/L}$ 组

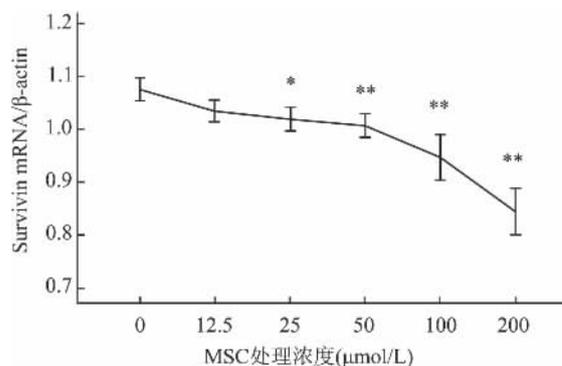


图 3 MSC 对 MCF-7 细胞 Survivin mRNA 表达的影响

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ MSC) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

伤,副作用较大,且容易产生耐药性。因此,寻找能有效杀伤乳腺癌细胞而对正常组织、细胞毒副作用小的天然活性物质并阐明其作用机制具有重要意义。MSC 是一种广泛存在于多种植物中的天然含硒氨基酸,具有防治癌症、抗氧化、抗衰老等多种生物学活性。与亚硒酸钠和硒代蛋氨酸等现有补硒剂相比,MSC 具有毒性小、补硒效果好、抗癌生物活性强等优点,是一种较好的硒化物载体^[5]。

细胞增殖与细胞凋亡的不平衡会导致肿瘤的发生,细胞增殖异常和细胞死亡机制调节缺陷将导致肿瘤细胞的恶性生长^[6]。SOD 是重要的过氧化物分解酶,是机体内唯一清除超氧阴离子的酶,防止超氧阴离子对机体产生氧化损伤,是体内重要的抗氧化防御物质。MDA 是一种生物体脂质氧化的天然产物,当细胞发生氧化应激时,一些脂肪酸会氧化后逐渐分解为一系列复杂的化合物,其中包括 SOD 和 MDA 常作为检测指标来反映机体的氧化应激状态^[7-8]。研究^[9]表明,肿瘤细胞自身能够诱导氧化应激,而较高的氧化应激能够诱导细胞凋亡。本研究显示 MSC 对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用,具有时间-剂量效应;MSC 能降低 SOD 活性,升高胞内脂

质代谢产物 MDA 水平增高胞内氧化应激,引起细胞的氧化损伤,从而诱导细胞凋亡的发生。

Survivin 基因是近年来发现的凋亡抑制因子家族中的新成员,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。研究^[10-12]表明, Survivin 基因可以作为妇科恶性肿瘤的一个预后指标,通过抑制 Survivin 基因的表达,细胞凋亡会明显增加。本研究结果表明, MSC 处理 MCF-7 细胞后,各浓度处理组 Survivin 基因的表达与对照组相比均下降,随着 MSC 浓度的增加 Survivin 基因表达逐渐下调,说明 MSC 可通过下调 Survivin 基因表达,进而导致 MCF-7 细胞凋亡的增多。

总之, MSC 能够通过增加人乳腺癌 MCF-7 细胞的氧化应激,下调凋亡抑制基因 Survivin 的表达,抑制肿瘤细胞的恶性生长,诱导凋亡。对 MSC 诱导乳腺癌细胞凋亡机制的进一步研究可为其作为营养强化剂,应用于乳腺癌高危人群的营养预防,以及乳腺癌化疗辅助剂的应用提供理论基础,具有重要应用意义。

参考文献

- [1] Unni E, Kittrell F S, Singh U, et al. Osteopontin is a potential target gene in mouse mammary cancer chemoprevention by Se-methylselenocysteine [J]. Breast Cancer Res, 2004, 6(5): 586-92.
- [2] Sinha R, Kiley S C, Lu J X, et al. Effects of methylselenocysteine on PKC activity, pdk2 phosphorylation and gadd gene expression in

synchronized mouse mammary epithelial tumor cells [J]. Cancer Letters, 1999, 146(2): 135-45.

- [3] 郭凤军, 郭锡永. 硒与乳腺癌相关性研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(2): 279-81.
- [4] 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 425-50.
- [5] 刘建群, 刘芳, 张小平, 等. 硒-甲基硒代半胱氨酸的合成与拆分研究 [J]. 化学研究与应用, 2008, 20(11): 1498-501.
- [6] Kim Y J, Kwon H C, Ko H, et al. Anti-tumor activity of the ginsenoside RK1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(5): 826.
- [7] 王秋林, 王浩毅, 王树人. 氧化应激状态的评价 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(10): 2069-74.
- [8] Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47: 143-83.
- [9] 孙国贵. 活性氧与肿瘤 [J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(1): 78-80.
- [10] Caldas H, Jiang Y, Holloway M P, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death [J]. Oncogene, 2005, 24(12): 1994-2007.
- [11] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Ribozyme-mediated inhibition of Survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells [J]. Oncogene, 2004, 23(2): 386-94.
- [12] 顾芳, 秦宜德, 桂丽, 等. 乳源免疫调节肽诱导人癌 Eca-109 细胞凋亡的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(1): 1-4.

Effect of Se-methylselenocysteine on antioxidation and the gene expression of Survivin in MCF-7 cells

Luo Yajie, Xu Lu, Shao Jihong, et al

(Dept of Public Health, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To investigate the effect of Se-methylselenocysteine (MSC) on the proliferation and apoptosis in breast cancer cell line MCF-7. **Methods** The human breast cancer MCF-7 cells were treated with different concentrations MSC: 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$. The cell viability was examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the apoptosis detected by Hoechst stain, the activity of superoxide dismutase (SOD) determined by nitrothiazolium blue chloride (NBT), and the level of malondialdehyde (MDA) detected by thiobarbituric acid (TBA). The expression of survivin gene in MCF-7 cells was test by RT-PCR. **Results** The proliferation of MCF-7 cells was inhibited by MSC, the cell viability reduced gradually with MSC concentration increased ($P < 0.01$). In the MSC pretreatment group, it showed cell rounded, nuclear shrinkage, chromatin concentration by fluorescence staining. MSC could decrease the activity of SOD, and increase the level of MDA ($P < 0.01$). The survivin gene expression in MSC pretreatment group was lower than that of control group ($P < 0.01$). **Conclusion** MSC can inhibit the proliferation of MCF-7 cells through regulating oxidative statuses and the expression of survivin gene. MSC, a kind of new nutrition fortification, is being expected to be a new material to prevent and treat the breast cancer.

Key words Se-methylselenocysteine; human breast cancer MCF-7 cells; Survivin gene; cell apoptosis