

文章编号: 1673 1689(2011)01-0055-05

苦荞麦蛋白质对乳腺癌细胞的作用机制

郭晓娜, 姚惠源

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了苦荞麦蛋白质 TBWSP31 对 Bcap37 乳腺癌细胞的作用机制。采用流式细胞仪分析测定苦荞麦蛋白质 TBWSP31 对 Bcap37 细胞作用后, 对细胞周期及癌基因和抑癌基因蛋白产生的影响。结果表明, TBWSP31 对 Bcap37 细胞的增殖抑制作用存在时间效应和剂量效应。TBWSP31 作用于 Bcap37 细胞后, G_0/G_1 期细胞比例增加, DNA 合成期 S 期细胞减少, 说明细胞受阻于 G_0/G_1 期, 阻滞 G_0/G_1 期的细胞向 S 期转化, 细胞的恶性增殖相应减慢。TBWSP31 可以上调抑癌基因蛋白 Fas 的表达, 下调癌基因蛋白 bcl-2 的表达。

关键词: 苦荞麦; 蛋白质; 乳腺癌细胞; 作用机制

中图分类号: Q 26

文献标识码: A

Study on the Mechanism of Tartary Buckwheat Protein on Breast Cancer Cells

GUO Xiaona, YAO Hu Yuan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The mechanism of tartary buckwheat protein on breast cancer cells was studied by Flow cytometry (FCM). The inhibition effect of TBWSP31 on the proliferation of Bcap37 cell existed in dose- and time-dependent manners. After treatment with TBWSP31, Bcap37 cell resulted in the accumulation of the cell in G_0/G_1 , and prevented the cell growing from G_0/G_1 phase to S phase. The cell cycle was related to G_1 phase, and the longer G_1 phase could slow the speed of cell malignant proliferation. The expression of bcl-2 and Fas were detected quantitatively by FCM. Based on the above results, it can be concluded that the antitumor mechanism was associated with the increasing expression of Fas and the decreasing expression of bcl-2.

Key words: tartary buckwheat, protein, breast cancer cells, mechanism

为了对付癌症给人类健康所造成的巨大威胁, 人们一直尝试着从各种生物中寻找天然抗肿瘤活性物质。我国有着丰富的天然生物资源, 从各种生物中筛选安全、高效、低毒的天然抗肿瘤活性成分成为近年来研究的热点。

众多研究表明, 肿瘤的发生、发展不仅与肿瘤细胞分化异常、细胞增殖过度有关, 而且与细胞凋亡减少有关^[1]。细胞凋亡 (apoptosis) 又称为细胞的程序性死亡, 是受多种基因调控的一种主动性细胞死亡方式^[2]。近年来, 有关细胞凋亡的分子机制

收稿日期: 2010-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900999); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (200802951003)。

作者简介: 郭晓娜 (1978-), 女, 河南新密人, 工学博士, 副教授, 主要从事功能性食品研究。

Email: gxn1978@hotmail.com

研究较多,已发现多种蛋白产物参与细胞凋亡过程。如 *ced* 基因家族、*bcl2* 基因家族、*p53* 基因、*ICE* 基因家族、*Fas* 基因、*myc* 基因家族等。细胞凋亡的调节基因大多为肿瘤基因,如原癌基因和肿瘤抑制基因,或为病毒基因等。它们对细胞凋亡起着正或负的调节作用。前期研究采用体外细胞培养的方法从苦荞麦水溶性蛋白组分中筛选得到了具有抗肿瘤活性的有效组分,作者用流式细胞仪分析测定细胞周期及癌基因和抑癌基因蛋白的表达,研究苦荞麦蛋白对乳腺癌细胞的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 苦荞麦抗肿瘤蛋白的制备

采用硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱、Sephadex G-100 凝胶过滤色谱对苦荞麦水溶性蛋白质逐步分离纯化,并结合细胞实验,筛选出苦荞麦抗肿瘤蛋白 TBWSP31。

1.2 细胞培养

RPMI 1640 培养液用 1 mol/L HCl 或 NaOH 调 pH 值至 7.0~7.2,过滤除菌,用前加入质量分数 10% 小牛血清(FCS),质量分数 1% 200 mmol/L 谷氨酰胺,100 U/mL 的青霉素和 100 U/mL 链霉素,配制成完全培养液。肿瘤细胞生长在上述完全培养基中,于 37 °C,体积分数 5% CO₂,饱和湿度条件下培养,传代至旺盛生长^[3]。

1.3 流式细胞仪测定细胞周期

流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是将流体喷射技术、激光光学技术、电子技术和计算机技术集为一种新技术,可以对单个细胞或其它生物粒子进行定量分析和分选。它能高速分析上万个细胞,并能同时测量细胞的物理或化学性质,如粒子的大小、体积、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等,进行多信息分析^[4]。

1) 细胞培养 取对数生长期的 Bcap37 细胞,接种于细胞培养瓶中,细胞浓度为 4×10^5 个/mL,24 h 后加入 TBWSP31 溶液,空白对照不加样品,于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h、48 h。

2) 单细胞悬液制备 将不同培养时间的细胞用胰蛋白酶消化,收集于离心管内(800 r/min, 5 min),沉淀用 PBS 洗涤 2 次(800 r/min, 5 min),弃去上清液,将细胞沉淀重新悬起,缓慢滴加体积分数 70% 乙醇(PBS 配制, -20 °C 预冷),同时混匀,置冰箱内固定 24 h 以上。测定前离心弃去固定液,用 PBS 漂洗 2 次,然后离心去除上清液,细胞加 1

mL PI 染液(0.01 mol/L、pH 7.2, PBS 配制,含 100 μg/mL PI, 100 μg/mL RNase A),吹打分散,4 °C 暗染 30 min,200 目滤网过滤,上机检测。

3) 细胞周期分析 数据处理采用 B. D 公司 Cellfit 软件,每个样品分析 8 000~10 000 个细胞^[5]。

1.4 流式细胞仪测定基因蛋白的表达

取对数生长期的 Bcap37 细胞,接种于细胞培养瓶中,细胞浓度为 5×10^5 个/mL,24 h 后加入 TBWSP31 溶液,空白对照不加样品,于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。48 h 后用胰蛋白酶消化收集细胞, PBS 洗涤两次(800 r/min, 5 min)。

1) 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,用体积分数 4% 多聚甲醛(PBS 配制)室温固定 15 min(800 r/min, 5 min),然后 PBS 洗涤细胞 1 次(800 r/min, 5 min)。

2) 用体积分数 0.2% 的 Triton(PBS 配制) 2 mL 重悬细胞,4 °C 放置 20 min(800 r/min, 5 min),然后 PBS 洗涤细胞 1 次(800 r/min, 5 min),进行免疫荧光染色。

3) 分别加入 *bcl2* 和 *Fas* 鼠抗人单克隆抗体(使用前 1:40 稀释) 100 μL,37 °C 水浴 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次以除去多余的一抗,加 100 μL 荧光标记的山羊抗小鼠 FITC-IgG(使用前 1:20 稀释),4 °C 避光放置 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次以除去多余的二抗,加 1 mL PBS 分散,筛网过滤,用流式细胞仪进行测定,光源为氩离子激光器,激发波长为 488 nm。FITC 发出的绿色荧光以 520 nm 的带通滤片进行荧光信号的检测,用相应的数据软件进行数据处理,得出各基因蛋白的阳性细胞比率,每个样品分析 8 000~10 000 个细胞^[6]。

2 结果与讨论

2.1 TBWSP31 对 Bcap37 细胞周期的影响

DNA 是染色体的主要构成物质,是基因的主要化学成分,细胞的分裂增殖实质上是 DNA 的复制。肿瘤细胞由于调节与生长控制障碍而获得无限制恶性增殖的能力,其细胞需要大量合成核酸以满足迅速增长的需要,因此细胞 DNA 含量的变化是一项直接反映肿瘤细胞增殖能力的重要生物学指标。

用 FCM 检测细胞周期与 DNA 含量的样品制备方法有两种:一种是活细胞直接用去污剂(1.0% Triton X-100)打孔,然后用相应的荧光染料染色后

上机检测。这种方法制备的标本细胞碎片较多,细胞保存时间短,而活细胞又必须及时处理和上机分析,否则会影响样品测定结果,因此,应用上受到很大的限制。另一种方法是用固定剂固定细胞,检测时洗去固定液,用荧光染料染色后上机检测。目前,以FCM测定细胞周期和DNA含量使用的荧光染料为碘化丙啶(PI)。该染料为插入性核酸荧光染料,可定量地插入核酸(DNA、RNA)双链螺旋的碱基对中并与之结合,但不能穿过完整的细胞膜。因此,用该染料染色的细胞必须经打孔剂打孔或固定剂固定,使细胞膜皱缩,以利于染料进入细胞内。乙醇是目前流式细胞术中常用的固定剂,固定时间至少要24 h以上^[7]。

Bcap37细胞经不同浓度的TBWSP31作用不同时间后,胰蛋白酶消化收集细胞,固定,染色后采用流式细胞仪进行细胞周期分析,见表1。

表1 TBWSP31对Bcap37细胞周期影响

Tab. 1 Effect of TBWSP31 treatment on the Bcap37 cell cycle

作用时间/h	样品质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	$(G_0/G_1)/\%$	$S/\%$	$(G_2/M)/\%$	G_2/G_1
24	对照	53.6	33.5	12.9	1.863
	5	57.3	31.4	11.3	1.870
	10	68.4	28.9	2.7	1.981
48	5	70.9	28.5	0.6	2.108
	10	77.6	21.8	0.7	2.080

从表1可以看到, Bcap37细胞经 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TBWSP31作用24 h后, G_0/G_1 期细胞所占比例由空白对照组的53.6%增加为57.3%、68.4%, S期细胞所占比例由空白对照组的33.5%减少为31.4%、28.9%, G_2/M 期细胞所占比例明显降低,分别为12.9%、11.3%和2.7%。 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TBWSP31继续作用至48h, G_0/G_1 期细胞所占比例分别上升为70.9%、77.6%, S期分别降低为28.5%、21.8%, G_2/M 期分别减少至0.6%、0.7%。从细胞周期分布可知, TBWSP31对Bcap37细胞的增殖抑制作用存在时间效应和剂量效应。

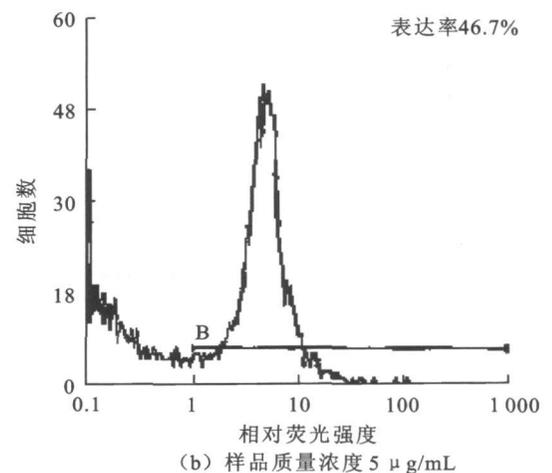
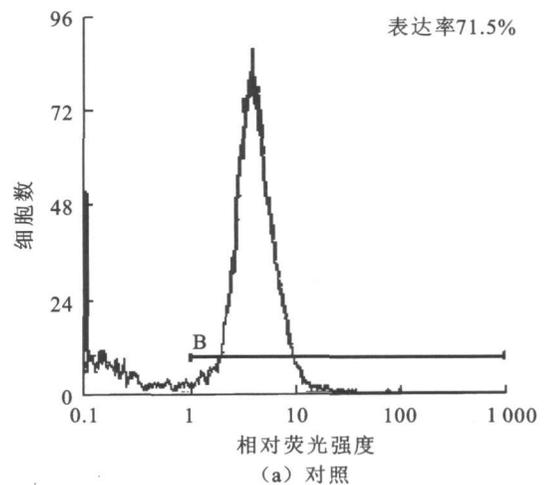
通过细胞周期分析发现, TBWSP31作用于Bcap37细胞后, G_0/G_1 期细胞比例增加, DNA合成期即S期和 G_2/M 期细胞比例减少,说明细胞受阻于 G_0/G_1 期,可阻滞 G_0/G_1 期的细胞向S期转化。细胞周期的长短主要决定于 G_1 期, G_1 期阻滞使Bcap37细胞周期延长,细胞的恶性增殖相应减慢。

2.2 流式细胞仪测定Bcap37细胞中基因蛋白的表达

2.2.1 流式细胞仪测定Bcap37细胞中bcf2基因蛋白的表达

bcf2基因是最初从小鼠B淋巴瘤中分离得到的原癌基因,定位于染色体18q21,含有3个外显子,2个开放阅读框架,编码相对分子质量为25 000,由239个氨基酸组成的蛋白质。免疫组化及电子显微镜观察表明, bcf2蛋白位于核膜、内质网及线粒体膜上。bcf2蛋白能够延长细胞寿命,有阻止细胞凋亡的能力。

Bcap37细胞经不同浓度的TBWSP31作用48 h后,胰蛋白酶消化收集细胞,固定,经bcf2和FITC-IgG标记后,流式细胞仪检测阳性细胞数和平均荧光强度,见图2。对照组表达bcf2蛋白的阳性细胞比率为71.5%,加样组($5\mu\text{g}/\text{mL}$)表达bcf2蛋白的阳性细胞比率为46.7%,加样组($10\mu\text{g}/\text{mL}$)表达bcf2蛋白的阳性细胞比率为32.3%,说明Bcap37细胞经TBWSP31作用后, bcf2蛋白表达水平降低,即bcf2蛋白阻止细胞凋亡的能力下降,并且存在剂量依赖性。另外,从图中也可以看到,加样组的荧光吸收左移,平均荧光强度变小。



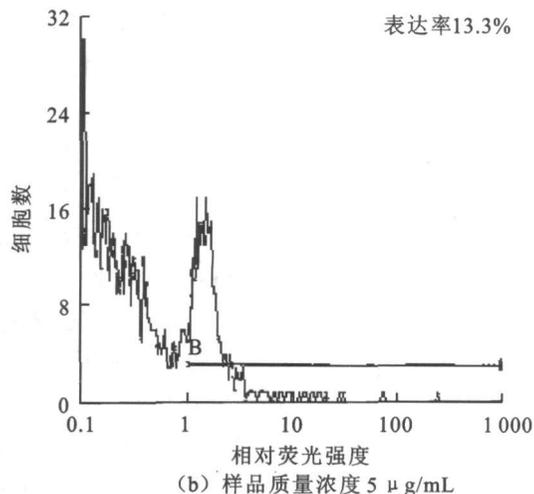
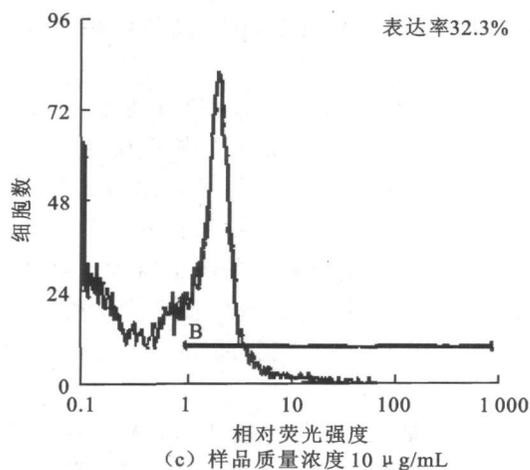


图1 流式细胞仪测定 Bcap37 细胞中 bcl 2 基因蛋白的表达

Fig.1 The expression of bcl 2 protein of Bcap37 cell with Flow Cytometry

2.2.2 流式细胞仪测定 Bcap37 细胞中 Fas 基因蛋白的表达 Fas 蛋白属于肿瘤坏死因子(TNF)和神经生长因子(NGF)受体家族的细胞表面分子,是一种细胞凋亡信号受体。Fas 分子主要分布于活化的 T、B 淋巴细胞等免疫细胞的表面,在人体各个组织器官以及多种肿瘤细胞表面都有表达。它和 Fas 配体结合后,其胞质经特殊胞内蛋白介导,直接激活凋亡基因产物,诱导 Fas 蛋白所在细胞的凋亡。有研究表明⁸,在人类乳腺、前列腺、结肠、食管等部位的恶性肿瘤中 Fas 的转录水平下调,从而使 Fas 抗原表达下降。

Bcap37 细胞经不同浓度的 TBWSP31 作用 48 h 后,胰蛋白酶消化收集细胞,固定,经 Fas 和 FITC-IgG 标记后,流式细胞仪检测阳性细胞数和平均荧光强度,见图 3。

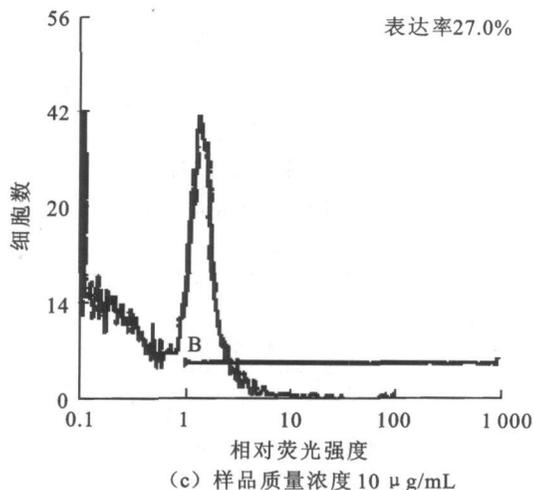


图2 流式细胞仪测定 Bcap37 细胞中 Fas 基因蛋白的表达

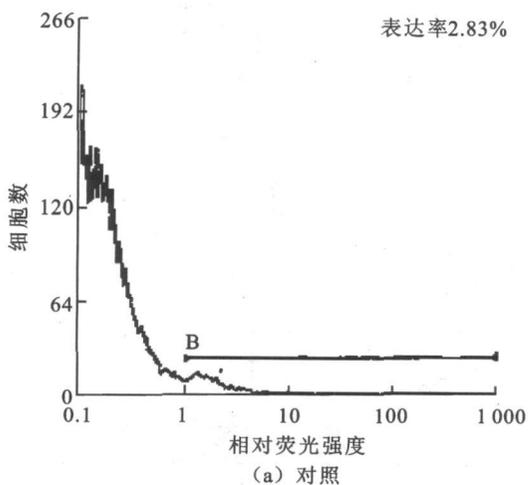
Fig.2 The expression of Fas protein of Bcap37 cell with Flow Cytometry

对照组表达 Fas 蛋白的阳性细胞比率为 2.83%,加样组(5 µg/mL)表达 Fas 蛋白的阳性细胞比率为 13.3%,加样组(10 µg/mL)表达 Fas 蛋白的阳性细胞比率为 27.0%。另外,从图中也可以看到,加样组的荧光吸收明显右移,平均荧光强度增大。这说明 Bcap37 细胞经 TBWSP31 作用后, Fas 蛋白表达水平显著增加,促进细胞凋亡的能力增强,并且存在剂量效应。

3 结 语

采用流式细胞仪分析测定细胞周期及癌基因和抑癌基因蛋白的表达,研究苦荞麦蛋白质 TBWSP31 对 Bcap37 细胞的作用机制:

1) 采用流式细胞仪 PI 单染色法检测 TBWSP31 对 Bcap37 细胞周期的影响,结果发现 TBWSP31 对 Bcap37 细胞的增殖抑制作用存在时间效应和剂量效应。TBWSP31 作用于 Bcap37 细胞后,



G_0/G_1 期细胞比例增加, DNA 合成期 S 期细胞减少, 说明细胞受阻于 G_0/G_1 期, 可阻滞 G_0/G_1 期的细胞向 S 期转化。细胞周期的长短主要决定于 G_1 期, G_1 期阻滞使 Bcap37 细胞周期延长, 细胞的恶性增殖相应减慢。

2) 采用流式细胞仪 FITC-IgG 标记法检测 TBWSP31 对 Bcap37 细胞作用后癌基因和抑癌基因的变化, 结果发现 TBWSP31 可以上调抑癌基因蛋白 Fas 的表达, 下调癌基因蛋白 bcl2 的表达。

参考文献(References):

- [1] 涂水平. 细胞凋亡与胃肠疾病[J]. 内镜, 1997, 3(1): 61-64.
TU Shui ping. Cell apoptosis and gastral disease[J]. **Inner mirror**, 1997, 3(1): 61-64.
- [2] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1998, 255.
- [3] 孙震, 姚惠源. 玉米蛋白粉中玉米黄素对人口腔鳞癌细胞株 KB 增殖的抑制[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 6: 34-37.
SU N Zhen, YAO Hui yuan. Inhibitory effects of zeaxanthin from corn gluten meal on human oral squamous cell carcinoma[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 6: 34-37. (in Chinese)
- [4] 张芝. 流式细胞仪构成与工作原理[J]. 中国医疗设备, 2005, 20(8): 25-26.
ZHANG Yi. The introduction to the flow cytometer[J]. **China Medical Equipment**, 2005, 20(8): 25-26. (in Chinese)
- [5] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium staining and flow cytometry[J]. **J Immunol Methods**, 1991, 139: 271.
- [6] 魏玲, 王兴武, 左文述, 等. 三氧化二砷抑制人乳腺癌细胞生长及其作用机制的初步研究. 中华医学杂志, 2005, 85(17): 1209-1213.
WEI Ling, WANG Xing wu, ZUO Wen shu, et al. Primary research on arsenic trioxide inhibiting human breast cancer cells growth and its mechanisms[J]. **National Medical Journal of China**, 2005, 85(17): 1209-1213. (in Chinese)
- [7] 曹云新, 刘智广, 张晓楠. 流式细胞术细胞周期分析样品保存条件的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(4): 317-318.
CAO Yun xin, LIU Zhi guang, ZHANG Xiao nan. Study on the preservation condition of cell cycle phase analysis by Flow cytometry[J]. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, 1999, 15(4): 317-318. (in Chinese)
- [8] Shibakita M, Tachibana M, Dhar D K. Spontaneous apoptosis in advanced esophageal carcinoma: its relation to Fas expression[J]. **Clin Cancer Res**, 2000, 6: 4755-4759.