

## 论著

11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 基因表达作为葡萄籽  
提取物预防乳腺癌靶点的探讨宋筱瑜<sup>1</sup>, 王华骞<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 美国田纳西大学兽医学院比较医学系, 诺克斯维尔 37996)

**摘要:**目的 研究 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 型基因(11 $\beta$ -HSD 2)表达在癌症发生及预防过程中的变化,探讨该基因作为葡萄籽提取物(GSE)抑制乳腺上皮细胞慢性癌变过程中靶点的可能性。方法 建立低浓度致癌物 NNK 和 B[a]P 刺激乳腺上皮细胞 MCF 10A 癌变及 GSE 抑制乳腺上皮细胞癌变过程的细胞模型,研究瞬时转染了靶向 11 $\beta$ -HSD 2 基因的小 RNA 后的癌变细胞的生物学特性改变,并用 Western blot 分析 11 $\beta$ -HSD 2 基因在癌变细胞和经 GSE 抑制后细胞中的表达情况。结果 使用靶向 11 $\beta$ -HSD 2 基因的小 RNA 抑制后的癌变细胞,在低生长因子培养基中形成细胞集落的能力降低,与正常乳腺上皮细胞相当。11 $\beta$ -HSD 2 基因在致癌物慢性刺激的细胞中呈现高表达,而在正常乳腺上皮细胞和经 GSE 与致癌物联合处理的细胞中基本不表达或表达水平很低。结论 抑制癌变细胞中 11 $\beta$ -HSD 2 基因的表达可使细胞的生物学表现趋于正常,GSE 抑制细胞癌变的机制可能是通过抑制 11 $\beta$ -HSD 2 基因的表达实现,11 $\beta$ -HSD 2 基因可能是 GSE 抑制乳腺上皮细胞癌变的分子靶点。

**关键词:** 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 型基因;基因表达;乳腺细胞;癌变;癌症预防

中图分类号:R730.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)03-0224-04

**Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 genes as a molecular target endpoint for the prevention of breast cell carcinogenesis with grape seed extracts**

Song Xiaoyu, Wang Hwa-Chain Robert

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To study the change of 11 $\beta$ -HSD 2 gene expression in carcinogenesis and cancer prevention and to study the possibility of using 11 $\beta$ -HSD 2 gene expression as a molecular target endpoint in the progression of breast cell carcinogenesis suppressed by Grape Seed Extract (GSE). **Methods** Cell carcinogenesis model for human breast epithelial MCF10A cell was induced by treating the cell with carcinogens NNK and B[a]P repeatedly, and the cell model system for the prevention of carcinogenesis was developed by combining GSE with NNK and B[a]P. Western blot analysis was used to detect the expression of 11 $\beta$ -HSD 2 gene. The biological change of carcinogen treated cells was studied by transfecting small interference RNA (siRNA) to inhibit 11 $\beta$ -HSD 2 gene expression of cells. **Results** The colony formation of carcinogen treated cells in low-mitogen medium was less after the expression of 11 $\beta$ -HSD 2 gene was inhibited by specific siRNA, which was just like the colony formation of normal cells. The expression of 11 $\beta$ -HSD 2 gene was high in carcinogen treated cells, and the gene expression was low or undetectable in normal breast epithelial cells and cells combined treated with GSE and carcinogen. **Conclusion** The biological display of carcinogen treated cells could be normalized after the expression of 11 $\beta$ -HSD 2 gene was inhibited. The mechanism for GSE preventing carcinogenesis might be the result of GSE inhibiting the expression of 11 $\beta$ -HSD 2 gene. 11 $\beta$ -HSD 2 gene might be the molecular target endpoint for the suppression of breast cell carcinogenesis by GSE.

**Key words:** 11 $\beta$ -HSD 2 gene; gene expression; breast cell; carcinogenesis; cancer prevention

防止导致癌症发生的遗传及表现遗传因素的改变是控制癌症发生比较合理的方法<sup>[1,2]</sup>。用物质

在癌症的早期阻断、阻止甚至逆转癌症的发生即化学预防越来越受到关注。有化学预防功能的葡萄籽提取物(GSE)在体内及体外实验中均表现出了抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>。二甲基苯蒽(DMBA)诱导的鼠乳腺癌模型中,GSE具有预防乳腺肿瘤形成的作用<sup>[4]</sup>。葡

收稿日期:2010-12-13

作者简介:宋筱瑜 女 助理研究员 E-mail:xiaoyujoyce@gmail.com

萄籽提取物预防癌症形成的可能作用机制尚不清楚。本研究试图找到 GSE 在癌症预防过程中可能的靶点,从而进一步了解其作用机制。

乳腺癌的发生是遗传和环境等多种因素相互作用的过程<sup>[5]</sup>,环境因素对于乳腺癌的发生起着重要的作用<sup>[6]</sup>。在前期的研究中,使用相当于环境暴露水平剂量的致癌物长期诱导正常乳腺上皮细胞癌变,建立了致癌物诱导乳腺上皮细胞癌变的模型,并发现了受致癌物刺激后的细胞中有 11 $\beta$ -HSD 2 基因高表达现象<sup>[7,8]</sup>。本研究在细胞癌变模型的基础上,同时使用有抗癌功能的 GSE 干预,并以 11 $\beta$ -HSD 2 基因作为研究靶点,了解该基因在乳腺细胞癌变以及 GSE 癌前预防过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株

人正常乳腺上皮细胞 MCF10A 细胞株购于美国 ATCC,由本实验室冻存。

### 1.2 主要试剂

DMEM/Ham's F12 培养基、胰岛素、氢化可的松、表皮生长因子、马血清、青链霉素、胰酶/EDTA 均购于美国 Sigma 公司,马血清购自 Life Technologies 公司;致癌物 4-甲基亚硝胺-1-(3-吡啶)-1-丁酮(NNK)购于美国 Chemsyn 公司,苯并芘(B[a]P)购于美国 Aldrich 公司,葡萄籽提取物(GSE)由美国 InterHealth Nutraceuticals 公司惠赠,小 RNA 转染试剂和靶向 11 $\beta$ -HSD 2 基因的小 RNA(sc-41379),购于美国 Santa-Cruz 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养及处理

人正常乳腺上皮 MCF10A 细胞在含有 10  $\mu$ g/ml 胰岛素、0.5  $\mu$ g/ml 氢化可的松、20 ng/ml 表皮生长因子、5% 马血清及 1% 青链霉素的 DMEM/Ham's F12 完全培养基中培养,置于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。细胞在 60 mm 细胞培养皿中培养,处理流程见图 1。细胞传代后 24 h, MCF10A 细胞培养基中加入 100 pmol/L NNK 和 100 pmol/L B[a]P, 处理 48 h 作为一个周期,连续处理 20 个周期,得到致癌物 NNK 和 BP 处理 20 代的细胞(NB-P20 细胞)。另在加入致癌物的同时,加入 40  $\mu$ g/ml GSE 处理细胞(该剂量为不产生细胞毒性的最大剂量),也处理 20 代,建立 GSE 抑制致癌物诱导癌变的细胞模型,得到 NB/G-P20 细胞。

#### 1.3.2 小 RNA 的瞬时转染

取对数生长期 NB-P20 细胞,  $2 \times 10^5$  个接种于 35 mm 细胞培养皿中, 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h

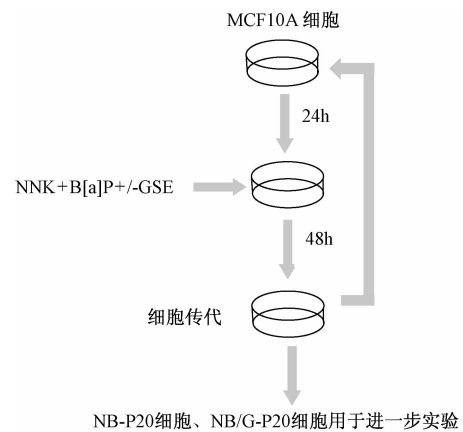


图 1 细胞培养及处理的工作流程

Figure 1 Experimental scheme for the carcinogenesis of human breast epithelial cell induced by NNK and B[a]P and treated with or without GSE

后,使用转染试剂将 1  $\mu$ g 靶向 11 $\beta$ -HSD 2 基因的小 RNA(siRNA)转至细胞内,具体操作按说明书进行。同时另一含相同数目细胞的培养皿中转染阴性 siRNA 作为对照。转染 24 h 后,细胞换至正常培养基中再培养 24 h,收集细胞用 Western blot 检测目的基因的抑制情况,并进行进一步的细胞试验。

#### 1.3.3 Western blot 分析

提取待检细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白含量。40  $\mu$ g 总蛋白变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳,分离后的蛋白 0.3 mA 恒流 50 min 转至尼龙纤维膜上。膜上的非特异性结合位点用 5% 的脱脂牛奶室温孵育结合 30 ~ 50 min,后用经 5% 脱脂牛奶 1:1 000 倍稀释的兔抗人 11 $\beta$ -HSD 2 特异性抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。用含 0.05% Tween-20 的 Tris 缓冲液洗膜 3 次,用羊抗兔 1:6 000 倍稀释二抗室温孵育 45 ~ 60 min,再洗膜 3 次后用 Supersignal chemiluminescence 试剂盒(Pierce)显色曝光。以  $\beta$ -actin 作为上样的内参。

#### 1.3.4 低生长因子条件下细胞集落生长实验

分别计数  $1 \times 10^4$  个转染了 11 $\beta$ -HSD 2 siRNA 和阴性 siRNA 的 NB-P20 细胞以及 MCF10A 细胞,置于含 5 ml 低生长因子培养基(只含 2% 完全培养基中刺激细胞有丝分裂生长成分)的 60 mm 细胞培养皿中进行培养。为了尽量减少因操作带来的实验误差,每种细胞同时用 3 个培养皿进行平行培养。培养 10 d 后,弃去培养基,用姬姆萨染液对所形成的细胞集落进行染色。倒置显微镜下对细胞集落进行计数,直径大于 0.5 mm 的一团细胞可被记为一个细胞集落。

#### 1.3.5 数据分析

使用 Student *t* 检验法对数据进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 经小 RNA 干扰后细胞中 11β-HSD 2 基因的表达

为了研究 11β-HSD 2 基因是否在 NNK 和 B[a]P 诱导的乳腺癌形成过程中起到重要作用,使用靶向 11β-HSD 2 基因的 siRNA 抑制 NB-P20 细胞中 11β-HSD 2 基因的表达,经 Western blot 检验证实瞬时转染成功,转染了 11β-HSD 2 siRNA 的 NB-P20 细胞中 11β-HSD 2 蛋白呈现低表达,见图 2。

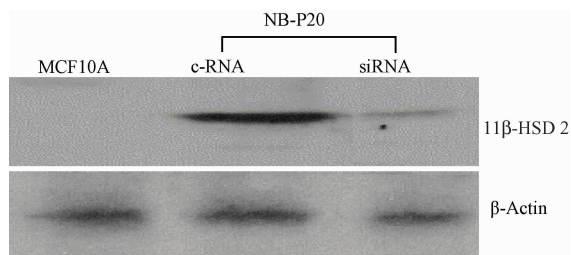


图 2 MCF10A 细胞,用对照小 RNA 处理后的 NB-P20 细胞(c-RNA)以及用 11β-HSD 2 特异性小 RNA 处理后的细胞(siRNA)中 11β-HSD 2 的蛋白表达  
Figure 2 Expression of 11β-HSD 2 protein in MCF10A cells, NB-P20 cells transfected with control siRNA or 11β-HSD 2 specific siRNA

### 2.2 细胞经 11β-HSD 2 siRNA 处理后对细胞集落形成的影响

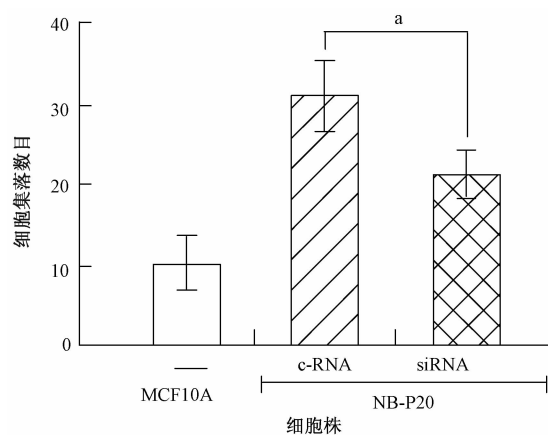
正常细胞在缺少生长因子的条件下会进入细胞周期中的休止期从而导致细胞凋亡;而若细胞对生长因子的依赖性减少使得存活率反而增加,可导致细胞成瘤性变性<sup>[9-11]</sup>。正常细胞在低生长因子培养基中无法形成集落或形成集落数目很少,而发生了癌变的细胞在低生长因子培养基中随癌变性质增加形成细胞集落数增大。结果发现,转染了 11β-HSD 2 siRNA 的 NB-P20 细胞在低生长因子培养基中形成的细胞克隆数显著低于转染了阴性 siRNA 的 NB-P20 细胞( $P < 0.05$ ),见图 3。

### 2.3 11β-HSD 2 蛋白在经不同处理的细胞中的表达

以 β-Actin 作为上样的内参,Western blot 分析结果显示,11β-HSD 2 蛋白表达水平在 NB-P20 细胞中较高,而在 NB/GSE-P20 中则与 MCF10A 中表达量相当,见图 4。表明致癌物长期处理正常乳腺上皮细胞可以使 11β-HSD 2 在蛋白水平高表达,而葡萄籽提取物与致癌物同时处理细胞,可抑制该基因的高表达,其表达水平与正常乳腺上皮细胞水平相当。

## 3 讨论

乳腺癌是女性最常发的癌症之一<sup>[12]</sup>,环境因素



注:<sup>a</sup> 转染了 11β-HSD 2 siRNA 的 NB-P20 细胞与转染了阴性 siRNA 的 NB-P20 细胞相比, $P < 0.05$ 。

图 3 MCF10A 细胞,转染了阴性 siRNA 的 NB-P20 细胞(c-RNA)以及转染了 11β-HSD 2 siRNA 的 NB-P20 细胞(siRNA)在低生长因子培养基上的细胞集落形成情况

Figure 3 Colony formations of MCF10A cells and NB-P20 cells transfected with control siRNA (c-RNA) or 11β-HSD 2 specific siRNA (siRNA) in low mitogenic medium

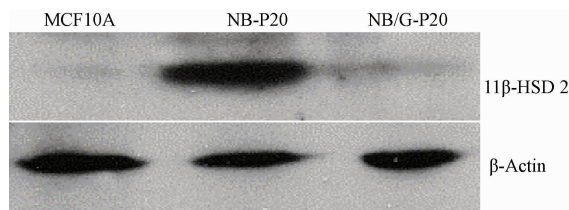


图 4 MCF10A、NB-P20 及 NB/G-P20 三种细胞中 11β-HSD 2 的蛋白表达

Figure 4 Expression of 11β-HSD 2 protein in MCF10A, NB-P20 and NB/G-P20 cells

对于乳腺癌的发生起重要作用<sup>[5]</sup>。随着对癌症发病原因的了解,化学预防作为先于治疗的重要手段之一,已经被医学界重视起来。葡萄籽中的许多成分,如原青花素或多酚类生物黄酮碱,被证实具有化学预防的功能<sup>[3]</sup>。但是对于 GSE 早期预防致癌物诱导细胞慢性癌变机制的相关研究还比较少,本研究试图找到 GSE 作为化学预防物质在癌细胞形成过程中的靶点,从而对其可能作用的机制做出初步的了解。

在之前的研究中,对经致癌物诱导癌变的细胞通过基因芯片扫描发现了若干基因的上调表达,其中包括 11β-HSD 2<sup>[6,7]</sup>。人的 11β-HSD 2 基因编码 45 kDa 蛋白,具有脱氢酶的活性,可使糖皮质激素的活性降低;11β-HSD 2 的表达可抑制糖皮质激素的抗增殖活性<sup>[13,14]</sup>。11β-HSD 2 基因的上调表达在乳腺癌的发展中起一定的作用并对细胞生长起

到前增殖作用<sup>[13-15]</sup>。而本研究也证实了经致癌物诱导癌变后的细胞中 11 $\beta$ -HSD 2 基因呈现高表达。为了进一步确定 11 $\beta$ -HSD 2 基因的靶点作用,用 siRNA 抑制了癌变细胞中该基因的表达,结果显示抑制癌变细胞中该基因的表达可以使细胞的生物学形态趋于正常,从而证实了该基因在细胞癌变过程中的重要作用。癌症的预防是一个长期的过程,有抗癌活性物质的使用应该贯穿细胞被诱导癌变的始终。因此,在本研究中使用致癌物诱导细胞癌变的同时,加入 GSE 来抑制细胞癌变,模拟人体接触环境致癌物的同时服用抗癌物质的过程。本研究显示,若以 11 $\beta$ -HSD 2 基因作为靶点,对于经 GSE 处理过的细胞,该基因的表达较仅用致癌物处理的细胞低,其表达水平接近于正常细胞。因此,上调表达的 11 $\beta$ -HSD 2 基因表达在 NNK 和 B[a]P 诱导的乳腺癌形成过程中有重要作用,GSE 抑制细胞癌变的机制可能是通过抑制 11 $\beta$ -HSD 2 基因的表达实现,11 $\beta$ -HSD 2 基因可能是 GSE 抑制 NNK 和 B[a]P 诱导乳腺癌形成的重要靶点。

志谢:本研究系作者受国家留学基金委资助在美期间完成。

## 参考文献

- [ 1 ] SPORN M B, SUH N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2002, 2: 537-543.
- [ 2 ] HUNDERTMARK S, BUHLER H, RUDOLF M, et al. Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells[J]. *J Endocrinol*, 1997, 155: 171-180.
- [ 3 ] BAGCHI D, BAGCHI M, RAY S D, et al. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002,957:260-270.
- [ 4 ] KIM H, HALL P, SMITH M, et al. Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent[J]. *J Nutr*, 2004,134:3445S-3452S.
- [ 5 ] GUENGERICH F P. Metabolism of chemical carcinogens[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21:345-351.
- [ 6 ] STASZEWSKI J, HAENSZEL W. Cancer mortality among the Polish-born in the United States[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1965, 35:291-297.
- [ 7 ] SIRIWARDHANA N, WANG H C R. Precancerous carcinogenesis of human breast epithelial cells by chronic exposure to benzo[a]pyrene[J]. *Mol Carcinogen*, 2008, 47: 338-348.
- [ 8 ] SIRIWARDHANA N, CHOUDHARY S, WANG H C R. Precancerous model of human breast epithelial cells induced by NNK for prevention[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109: 427-441.
- [ 9 ] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000,100:57-70.
- [10] CAMPISI J, MORREO G, PARDEE A B. Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors[J]. *Exp Cell Res*, 1984,152:459-466.
- [11] LARSSON O, ZETTERBERG A, LARSSON O, et al. Consequences of parental exposure to serum-free medium for progeny cell division[J]. *J Cell Sci*, 1985,75:259-268.
- [12] PARKIN D M, BRAY F I, PARKIN D M, et al. Cancer burden in the year 2000, The global picture[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37:S4-S66.
- [13] RABBITT E H, GITTOES N J, RABBITT E H, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases, cell proliferation and malignancy[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003,85:415-421.
- [14] LIPKA C, MANKERTZ J, LIPKA C, et al. Impairment of the antiproliferative effect of glucocorticosteroids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 overexpression in MCF-7 breast-cancer cells[J]. *Horm Metab Res*,2004,36:437-444.
- [15] KOYAMA K, MYLES K, KOYAMA K, et al. Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in breast tumors and modulation of activity and cell growth in PMC42 cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001,76:153-159.