

## · 论著 ·

# 金雀异黄素诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的研究

王欢 卢陈嘉 马威 毛俊 范盼红 赵文月 王露 李连宏

**【摘要】 目的** 探讨金雀异黄素(genistein, GEN)诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的分子机制。**方法** 用 0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  GEN 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h。采用 CCK-8、Hoechst 33342 染色和流式细胞仪测定不同浓度 GEN 对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响。采用 Western blotting 检测不同浓度 GEN 处理前后 MDA-MB-231 细胞中 Fas 相关死亡域蛋白(FADD)、活性半胱天冬酶 8(cleaved caspase-8)、Fas、FasL 蛋白表达水平。采用实时 RT-PCR 分析不同浓度 GEN 处理前后 MDA-MB-231 细胞中 Fas、FasL 基因表达水平。多组均数比较采用方差齐性检验后进行单因素方差分析。**结果** 在 GEN 作用 24 h 后, 0、5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率分别为  $(3.00 \pm 1.41)\%$ 、 $(14.02 \pm 1.57)\%$ 、 $(27.5 \pm 1.52)\%$ 、 $(48.90 \pm 1.44)\%$ 。与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组呈浓度依赖性增加( $F=528.119$ ,  $P=0.000$ )。两两比较显示:各浓度组之间差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。0、5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组诱导 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率分别为  $(3.40 \pm 0.40)\%$ 、 $(9.34 \pm 1.34)\%$ 、 $(19.26 \pm 0.93)\%$ 、 $(27.41 \pm 1.12)\%$ 。与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组呈浓度依赖性增加( $F=379.573$ ,  $P=0.000$ )。两两比较显示:各浓度组之间差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。Western blotting 结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 其他浓度组经 GEN 处理的 MDA-MB-231 细胞 FADD、cleaved caspase-8、FasL 蛋白表达升高( $F=368.621$ 、 $456.744$ 、 $419.129$ ,  $P$  均  $=0.000$ ), Fas 蛋白表达差异无统计学意义( $F=0.800$ ,  $P=0.528$ ); 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  组 FasL 蛋白表达降低有统计学意义( $F=92.235$ ,  $P=0.001$ )。实时 RT-PCR 结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 其他浓度组经 GEN 处理的 MDA-MB-231 细胞 FasL mRNA 表达升高( $F=646.983$ ,  $P=0.000$ ), Fas mRNA 表达差异无统计学意义( $F=1.556$ ,  $P=0.274$ ); 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  组 FasL mRNA 表达降低有统计学意义( $F=52.562$ ,  $P=0.020$ )。**结论** GEN 通过上调 Fas/FasL 途径中 FasL 基因表达诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 金雀异黄素; MDA-MB-231 细胞; Fas/FasL 途径

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Genistein-induced apoptosis in breast cancer MDA-MB-231 cells** WANG Huan\*, LU Chen-jia, MA Wei, MAO Jun, FAN Pan-hong, ZHAO Wen-yue, WANG Lu, LI Lian-hong. \*Department of Clinical Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Corresponding author: LI Lian-hong, Email: Lilianhong917@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the molecular mechanism of genistein-induced apoptosis in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** MDA-MB-231 cells were treated with 0, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  genistein for 24 h, respectively. CCK-8, Hoechst 33342 staining and flow cytometry were used to determine the effects of genistein on proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells. The expressions of FADD, cleaved caspase-8, Fas, FasL in the protein level were measured by Western blotting. The expressions of Fas and FasL in the mRNA level were detected by real-time RT-PCR. The one-way ANOVA was conducted after homogeneity for variance was tested. **Results** The cell proliferation inhibition rate of MDA-MB-231 cells were  $(3.00 \pm$

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.05.003

基金项目:国家自然科学基金(81272430)

作者单位:116044 大连医科大学临床医学系(王欢、王露),病理教研室和辽宁省肿瘤干细胞研究重点实验室(卢陈嘉、马威、毛俊、范盼红、赵文月、李连宏)

通信作者:李连宏, Email: Lilianhong917@126.com

1.41)% , (14.02±1.57)% , (27.5±1.52)% , (48.90±1.44)% after the treatment of 0, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  genistein for 24 h respectively. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  group, the inhibition rate was increased in a concentration-dependent manner in the other 3 groups ( $F = 528.119$ ,  $P = 0.000$ ). The pairwise comparison showed the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The early apoptotic rate of MDA-MB-231 cells were (3.40±0.40)% , (9.34±1.34)% , (19.26±0.93)% , (27.41±1.12)% in each concentration group, respectively, after genistein treatment for 24 h. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  group, the early apoptotic rate was increased in a concentration-dependent manner in the other 3 groups ( $F = 379.573$ ,  $P = 0.000$ ). The pairwise comparison showed the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). Western blotting showed that genistein increased the protein expression levels of FADD, cleaved caspase-8 and FasL ( $F = 368.621, 456.744, 419.129$ ; all  $P = 0.000$ ), with no alteration in Fas protein level ( $F = 0.800$ ,  $P = 0.528$ ). Compared with 10  $\mu\text{mol/L}$  group, FasL protein expression decreased in 20  $\mu\text{mol/L}$  group ( $F = 92.235$ ,  $P = 0.001$ ). Real-time RT-PCR showed that genistein increased the mRNA expression of FasL ( $F = 646.983$ ,  $P = 0.000$ ), with alteration in Fas mRNA level ( $F = 1.556$ ,  $P = 0.274$ ). Compared with 10  $\mu\text{mol/L}$  group, FasL mRNA expression also decreased in 20  $\mu\text{mol/L}$  group ( $F = 52.562$ ,  $P = 0.020$ ). **Conclusion** Genistein induces apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells by up-regulating FasL gene expression in Fas/FasL pathway.

**【Key words】** Breast neoplasms; Apoptosis; Genistein; MDA-MB-231 cells; Fas/FasL pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。流行病学调查显示,存在于大豆食物中的金雀异黄素(genistein, GEN)可以降低乳腺癌的发病率<sup>[1]</sup>。GEN可以通过调控凋亡相关基因的表达,抑制乳腺癌细胞的生长。Fas/FasL途径是介导凋亡的一条重要的死亡受体信号途径,参与到不同细胞系的凋亡过程中。Fas/FasL途径是通过表达于细胞表面的FasL与死亡受体Fas结合而诱导的,Fas在胞内的死亡区域发生寡聚,形成Fas相关死亡域蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD),FADD包含氨基末端死亡效应区,与前体半胱天冬酶-8(caspase-8)结合,被裂解为活性caspase-8(cleaved caspase-8),释放到胞质内参与凋亡过程<sup>[2-3]</sup>。在非乳腺癌细胞中,GEN可以通过Fas/FasL途径来诱导凋亡<sup>[4]</sup>。在乳腺癌ER阳性MCF-7细胞中GEN上调Fas表达,诱导凋亡<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨GEN在乳腺癌ER阴性MDA-MB-231细胞中通过Fas/FasL途径诱导细胞凋亡的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

人乳腺癌MDA-MB-231细胞株、金雀异黄素(Sigma, USA)、DMEM(dulbecco's modified eagle medium)/F12培养基(Gibco, USA)、胎牛血清(Gibco, USA)、胰蛋白酶(Gibco, USA)、细胞增殖-毒性检测试剂盒 cell counting kit-8(CCK-8, 东

仁化学科技有限公司)、Annexin V-EGFP/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒(上海美季生物技术有限公司)、TIANScript RT试剂盒(TIANGEN BIOTECH公司)、兔抗人FADD多克隆抗体(Abcam, USA)、兔抗人cleaved caspase-8多克隆抗体(Abcam, USA)、兔抗人Fas多克隆抗体(Proteintech公司)、兔抗人FasL多克隆抗体(Bioworld公司)、兔抗人Tubulin多克隆抗体(北京中杉金桥生物公司)。

### 1.2 细胞培养和传代

用含10%小牛血清的DMEM/F12培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养,待细胞生长至80%融合时,用0.25%胰酶消化,每2d更换一次培养液。加GEN前7d将细胞用PBS洗涤后在含10%去雌激素胎牛血清无酚红DMEM中培养,以耗尽细胞内储存的雌激素。GEN为白色粉末,溶解于DMSO中,配制成浓度为0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ 的GEN溶液用于处理细胞<sup>[6]</sup>。

### 1.3 CCK-8 比色法检测细胞增殖

在96孔板中加入100  $\mu\text{l}$ 的各浓度组处理细胞悬浮液,将培养板在培养箱培养24 h(37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下)。每孔加入10  $\mu\text{l}$ 的CCK-8溶液,将培养板在培养箱内孵育2 h。用酶标仪检测450 nm下的各孔吸光度(A)值,以每个浓度的三个复孔A值的平均值为各浓度的平均A值,计算不同药物浓度对细胞的增殖抑制率:抑制率(%)=(阴性对照组平均A值-实验组平均A值/对照组

平均 A 值)×100%<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 Hoechst 33342 染色

将单细胞悬浮液加入放有盖玻片的 6 孔板内,进行细胞爬片,调节每孔细胞数为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。6 孔板内培养细胞 24 h 后加入浓度为 0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的 GEN 溶液,再培养 24 h 后用 PBS 洗一次,加入 Hoechst 33342 染色,避光放置 30 min,再用 PBS 洗 3 次后,在荧光显微镜下观察凋亡细胞<sup>[7]</sup>。

#### 1.5 流式细胞法分析细胞凋亡率

24 h 后收集处理浓度分别为 0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  GEN 的细胞悬浮液,PBS 洗涤,胰酶消化,调整细胞数为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入 500  $\mu\text{l}$  缓冲液悬浮细胞,分别加入 10  $\mu\text{l}$  膜连蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和 10  $\mu\text{l}$  PI 混匀,温室避光孵育染色 15 min,用流式细胞仪进行双色荧光细胞流式计数,观察凋亡细胞的百分比<sup>[7]</sup>。

#### 1.6 Western blotting 法检测 MDA-MB-231 细胞中 FADD、cleaved caspase-8、Fas 和 FasL 蛋白表达

细胞样品加入裂解缓冲液,超声粉碎,160 000 g 离心 10 min,取上清液,使用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计测蛋白浓度。60  $\mu\text{g}$  总蛋白上样于 10% SDS-PAGE,电泳分离后电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉溶液封闭过夜。分别加入一抗:FADD(1:400)、cleaved caspase-8(1:500)、Fas(1:500)、FasL(1:500)、Tubulin(1:1000),二抗(1:5000),电化学发光(ECL)。曝光后,使用灰度分析软件进行定量分析。

#### 1.7 实时 RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞中 Fas 和 FasL 基因的表达

各浓度组制成单细胞悬浮液,进行总 RNA 提取,使用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计定量各组总 RNA。参照 TIANScript RT Kit 说明书操作。Fas 和 FasL 的 PCR 引物由上海生工设计和合成。通过 GenBank 查询全部引物,均为目前已知基因特异性引物序列。具体的引物信息如下:Fas 上游引物为 5'-CTGTATGTGAACACTGTGACCCTTG-3',下游引物为 5'-TGCTGCTGAGTGTGCATTCCT-3'; FasL 上游引物为 5'-TCCGTGAGTTCACCAACCAAA-3',下游引物为 5'-GGGGGTTCCCTGTAAATGGG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3',下游引物为 5'-AGTCCTCCACGATACCAAGT-3'。

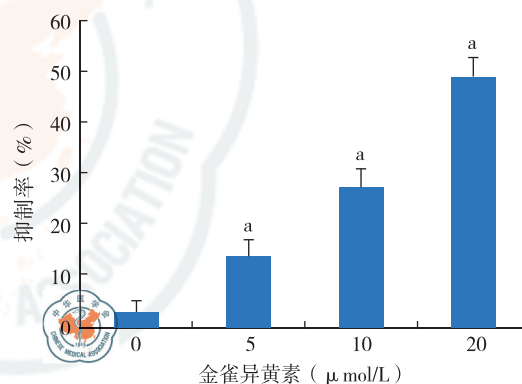
### 1.8 统计学分析

统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件包。多组均数比较采用方差齐性检验后进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差分析两两比较采用 LSD 检验方法。 $P < 0.050$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GEN 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

不同浓度的 GEN 作用 MDA-MB-231 细胞 24 h 后,0、5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率分别为  $(3.00 \pm 1.41)\%$ 、 $(14.02 \pm 1.57)\%$ 、 $(27.5 \pm 1.52)\%$ 、 $(48.90 \pm 1.44)\%$ 。与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比,各浓度组差异有统计学意义( $F = 528.119, P = 0.000$ ),且随着 GEN 浓度升高而增强(图 1)。两两比较显示:各浓度组之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。



a:  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比;两两比较显示:各浓度组之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )

图 1 不同浓度的金雀异黄素作用 24 h 后 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率

### 2.2 GEN 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

AV-PI 流式分析结果显示,在 GEN 作用 24 h 后,0、5、10 和 20  $\mu\text{mol/L}$  组诱导 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率分别为  $(3.40 \pm 0.40)\%$ 、 $(9.34 \pm 1.34)\%$ 、 $(19.26 \pm 0.93)\%$ 、 $(27.41 \pm 1.12)\%$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比,呈浓度依赖性增加( $F = 379.573, P = 0.000$ ),两两比较显示:各浓度组之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 2、3)。晚期凋亡率也存在一定的差异,但是坏死细胞可能影响结果的准确性,而早期凋亡率能更准确地说明 GEN 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。

Hoechst 33342 染色在荧光显微镜下可观察到凋亡细胞发出强烈的蓝色荧光,随着 GEN 处理



浓度的增加,发出强烈蓝色荧光的凋亡细胞数量也逐渐增加(图 4)。

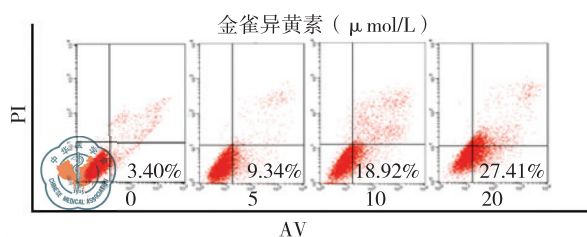
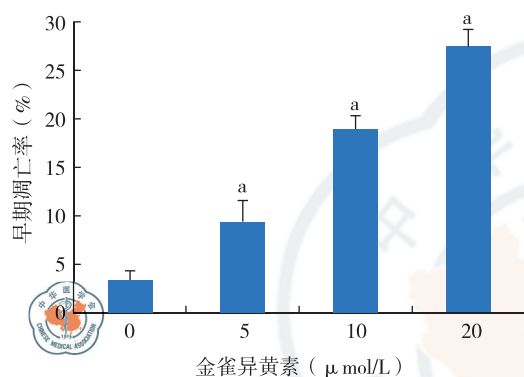


图 2 AV-PI 流式细胞仪分析不同浓度金雀异黄酮作用于 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率



a:  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比; 两两比较显示: 各浓度组之间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

图 3 不同浓度的金雀异黄酮作用 24 h 后 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率

### 2.3 GEN 对 Fas/FasL 途径的影响

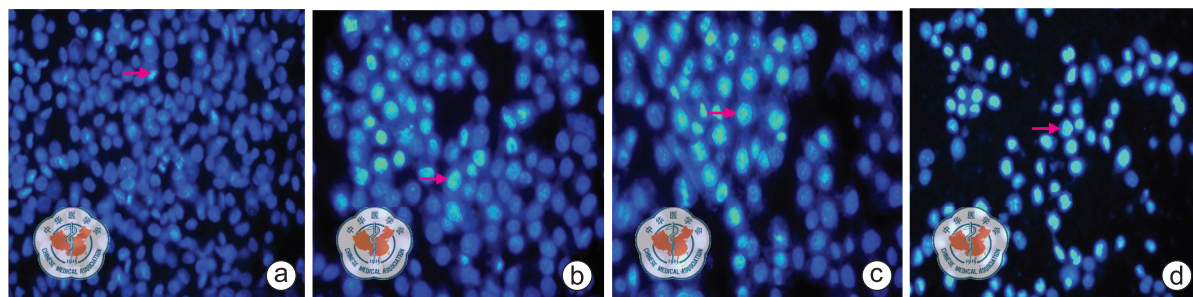
Western blotting 结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 经 GEN 处理的 MDA-MB-231 细胞 FADD、cleaved caspase-8、FasL 蛋白表达升高 ( $F = 368.621$ 、 $456.744$ 、 $419.129$ ,  $P$  均  $= 0.000$ ), Fas 蛋白表达差异无统计学意义 ( $F = 0.800$ ,  $P = 0.528$ ); 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  组 FasL 蛋白表达降低有统计学意义 ( $F = 92.235$ ,  $P = 0.001$ ) (图 5、6)。实时 RT-PCR 结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 经 GEN

处理的 MDA-MB-231 细胞 FasL mRNA 表达升高 ( $F = 646.983$ ,  $P = 0.000$ ), Fas mRNA 表达差异无统计学意义 ( $F = 1.556$ ,  $P = 0.274$ ); 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  组 FasL mRNA 表达降低有统计学意义 ( $F = 52.562$ ,  $P = 0.020$ ) (图 7)。

### 3 讨论

GEN 是具有多种生物学作用的异黄酮类物质, 自从 GEN 被发现是蛋白酪氨酸激酶特异性抑制剂以来, 其抗癌活性引起广泛关注。雌激素与 ER 结合在正常乳腺组织的生长发育过程中起重要作用。ER 是类固醇激素受体超家族成员之一, 包括 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ 。雌激素生长诱导效应大多数是通过 ER $\alpha$  介导的, 而 ER $\beta$  表现为相反的效应<sup>[8]</sup>。GEN 作为一种植物雌激素, 具有雌激素样作用, 但这种作用在 GEN 低浓度水平 ( $< 10 \mu\text{mol/L}$ ) 和 ER 阳性细胞系中才可体现出来<sup>[9]</sup>。乳腺癌 MDA-MB-231 是以 ER $\beta$  为主的细胞系<sup>[10]</sup>, GEN 与 ER $\beta$  的结合具有选择性, 即与 ER $\beta$  亲和力强<sup>[1]</sup>, 所以较高浓度的 GEN 不会引起雌激素相关的不良反应。

研究显示, GEN 的抗癌活性主要是由于其诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>。GEN 诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制研究较多, 但是 GEN 经 Fas/FasL 途径诱导凋亡机制研究较少<sup>[11]</sup>。Fas/FasL 途径是一条重要的细胞凋亡信号外途径, Fas 和 FasL 的结合是 Fas/FasL 途径启动的主要因素, 这种结合导致的 FADD 形成和前体 caspase-8 的活化是检测 Fas/FasL 途径启动的重要指标。GEN 可以在非乳腺癌细胞中经 Fas/FasL 途径诱导凋亡。在乳腺癌 ER 阳性 MCF-7 细胞系中, GEN 经 Fas/FasL 途径诱导凋亡是通过上调 Fas 蛋白表达完成的<sup>[5]</sup>。本实验探讨 GEN 在乳腺癌 ER 阴性 MDA-MB-231



a: 0  $\mu\text{mol/L}$ ; b: 5  $\mu\text{mol/L}$ ; c: 10  $\mu\text{mol/L}$ ; d: 20  $\mu\text{mol/L}$ ; 红箭头: 早期凋亡细胞; 凋亡细胞发出强烈的蓝色荧光, 随着金雀异黄酮处理浓度的增加, 发出强烈蓝色荧光的凋亡细胞数量也逐渐增加

图 4 不同浓度的金雀异黄酮作用 24 h 后的 MDA-MB-231 细胞在荧光显微镜下的图片 (Hoechst 33342  $\times 200$ )

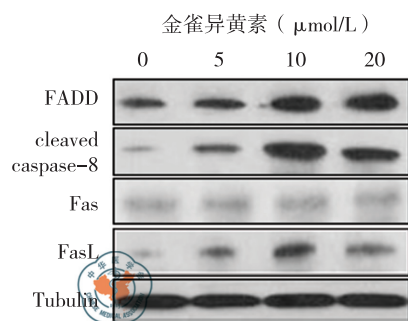
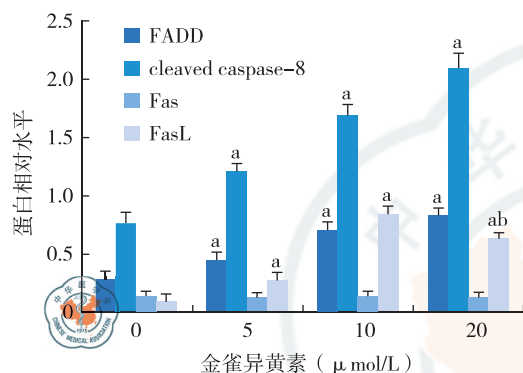
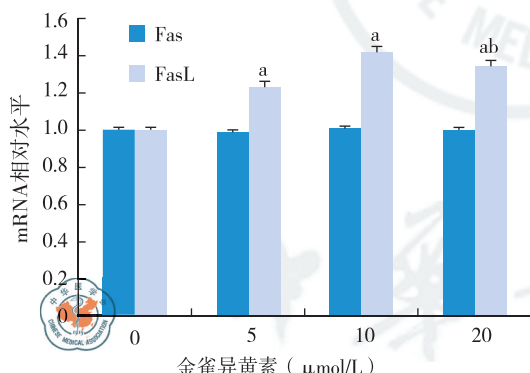


图 5 Western blotting 法检测 MDA-MB-231 细胞中各蛋白表达



a:  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比; b:  $P < 0.05$ , 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比

图 6 不同浓度的金雀异黄素作用 24 h 后 MDA-MB-231 细胞中各蛋白的表达水平



a:  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相比; b:  $P < 0.05$ , 与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比

图 7 不同浓度的金雀异黄素作用 24 h 后 MDA-MB-231 细胞中各蛋白的 mRNA 表达水平

细胞系中经 Fas/FasL 途径诱导凋亡的分子机制。结果表明在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, GEN 并不影响 Fas 蛋白及基因的表达, 而是通过促进 FasL 基因表达的方式来诱导凋亡。由此可见, 对于乳腺癌不同的细胞系, GEN 可能通过不同的作用方式经 Fas/FasL 途径诱导肿瘤细胞凋亡。

转录因子过氧化物酶增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 和叉头转录因子 1 (FoxO1) 可以与 FasL

基因启动子结合, 促进 FasL 基因的转录<sup>[12-13]</sup>。过氧化物酶增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 是一类配体激活的核转录因子超家族成员<sup>[14]</sup>。PPAR 包括 PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\beta/\delta$  和 PPAR- $\gamma$  三种表型, 其中以对 PPAR- $\gamma$  的研究最为深入。在乳腺癌细胞中, PPAR- $\gamma$  呈现过表达状态以调节凋亡、分化等相关基因的表达<sup>[15]</sup>。有研究证实在体外培养的星形胶质细胞中, GEN 能诱导 PPAR- $\gamma$  表达, 以抵抗炎性介质对细胞的损伤<sup>[16]</sup>。GEN 诱导 PPAR- $\gamma$  表达可能通过 3 种方式: (1) 诱导 PPAR- $\gamma$  配体的产生, 从而激活 PPAR- $\gamma$  转录活性<sup>[17]</sup>; (2) 本身作为 PPAR- $\gamma$  的激动剂<sup>[18]</sup>; (3) 直接参与 PPAR- $\gamma$  基因的表达<sup>[19]</sup>。

FoxO1 转录因子属于 FoxO 家族成员之一, 含有一段约 100 个氨基酸残基组成的保守叉头盒序列<sup>[20]</sup>。FoxO1 转录因子主要参与细胞凋亡、应激、DNA 损伤和修复、肿瘤发生、血管生成和糖代谢等生命过程<sup>[21]</sup>。FoxO1 作为转录因子发挥功能效应是与其磷酸化水平密切相关。PI3K/Akt 信号通路可磷酸化 FoxO1, 使其由细胞核转运至细胞质, 导致转录活性灭活, 从而抑制 FoxO1 所调控的下游基因表达<sup>[22]</sup>。GEN 可以抑制 PI3K/Akt 信号通路中 Akt 蛋白激酶中 Ser473 位点的磷酸化, 从而影响 Akt 蛋白激酶对下游 FoxO1 蛋白在 Ser256 位点的磷酸化<sup>[23]</sup>。

转录因子 PPAR- $\gamma$  对 FasL 基因表达的促进是通过与转录因子 Sp-1 形成共转录因子, 结合到 FasL 启动子上的 Sp-1 序列 (-280-GGCGCGG--275)<sup>[12]</sup>。转录因子 FoxO1 直接结合到 FasL 启动子上序列 (-897-TAAATAAATA--888, -885-TAAATAAATA--876 或 -889-TAAGTAAATA--880)<sup>[24]</sup>。转录因子 PPAR- $\gamma$  和 FoxO1 结合到 FasL 启动子的序列和位置, 表明两者对 FasL 基因的转录作用可能是彼此独立的, 而不是以形成共转录体的形式与 FasL 启动子结合。综上所述, GEN 上调 FasL 基因表达可能是通过影响 FasL 转录因子 PPAR- $\gamma$  表达和转录因子 FoxO1 磷酸化水平完成的。

本实验结果表明, 当 GEN 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时, 与 10  $\mu\text{mol/L}$  相比, FasL 表达在蛋白水平和 mRNA 水平均有所降低。最近有研究表明, FoxO1 可以通过蛋白-蛋白结合方式直接抑制 PPAR- $\gamma$  的

转录活性<sup>[25]</sup>。这种现象可能是由于在较低浓度的 GEN 作用下,胞核内积聚了适量活化的 FoxO1 和 PPAR- $\gamma$  转录因子,两者不足以形成蛋白-蛋白结合抑制,均参与 FasL 基因的转录过程。随着 GEN 处理浓度增加,胞核内积聚了一定数量活化的 FoxO1 和 PPAR- $\gamma$  转录因子,两者互相结合并产生抑制作用,彼此削减了部分对 FasL 基因的转录作用。

GEN 可以通过 FoxO1 和 PPAR- $\gamma$  转录因子促进 FasL 基因表达,经 Fas/FasL 途径诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,但随着 GEN 浓度升高,此效应有所减弱。本研究结果还提示 GEN 影响 FoxO1 和 PPAR- $\gamma$  转录因子表达可能是 GEN 抗癌活性的分子机制之一,进一步探索 GEN 对 FoxO1 和 PPAR- $\gamma$  转录因子的作用有助于开发新的 ER 阴性乳腺癌治疗策略。

### 参考文献

- [1] Orlando L, Schiavone P, Cinieri S. Genistein: the future of prevention and treatment of breast cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(10): 918-920.
- [2] Liu WH, Chang LS. Fas/FasL-dependent and -independent activation of caspase-8 in doxorubicin-treated human breast cancer MCF-7 cells: ADAM10 down-regulation activates Fas/FasL signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(12): 1708-1719.
- [3] Huang X, Lu Z, Lv Z, et al. The fas/fas ligand death receptor pathway contributes to phenylalanine-induced apoptosis in cortical neurons[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71553.
- [4] George J, Banik NL, Ray SK. Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(4): 877-886.
- [5] Seo HS, Cho HS, Cho HS, et al. Phytoestrogens induce apoptosis *via* extrinsic pathway, inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(10): 3301-3313.
- [6] 白和平,代志军,康华峰,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 Runt 相关转录因子 3 基因表达的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2013, 7(1): 25-29.
- [7] 毛俊,牟秋菊,李连宏,等. RNA 干扰 Notch1 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(1): 11-14.
- [8] Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(44): 6605-6616.
- [9] Li Z, Li J, Mo B, et al. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells *via* the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(7): 1749-1753.
- [10] Rajah TT, Peine KJ, Du N, et al. Physiological concentrations of genistein and 17 $\beta$ -estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing Bax/Bcl-2 and reducing pERK1/2 [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(4): 1181-1191.
- [11] Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 226-242.
- [12] Bonfiglioglio D, Gabriele S, Aquila S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113(3): 423-434.
- [13] Marfè G, Tafani M, Fiorito F, et al. Involvement of FOXO transcription factors, TRAIL-FasL/Fas, and sirtuin protein family in canine coronavirus type II-induced apoptosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27313.
- [14] Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\beta/\delta$ , a possible nexus of PPAR $\alpha$ - and PPAR $\gamma$ -dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(4): 322-330.
- [15] Kotta LI, Giaginis C, Theocharis S. The role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in breast cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(9): 1025-1044.
- [16] Valles SL, Dolz-Gaitona P, Gambinia J, et al. Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes [J]. *Brain Res*, 2010, 1312: 138-144.
- [17] Ma H, Sprecher HW, Kolattukudy PE. Estrogen-induced production of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand in a PPARgamma-expressing tissue [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30131-30138.
- [18] Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(2): 962-967.
- [19] Hirota K, Morikawa K, Hunad H, et al. Effect of genistein and daidzein on the proliferation and differentiation of human preadipocyte cell line [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(9): 5821-5827.
- [20] Tikhonovich I, Cox J, Weinman SA. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28 Suppl 1: 125-131.
- [21] Zhang X, Yalcin S, Lee DF, et al. FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(9): 1092-1099.
- [22] Roy SK, Srivastava RK, Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT



and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer[J]. J Mol Signal, 2010, 5:10.

- [23] Banerjee S, Zhang Y, Wang Z, et al. *In vitro* and *in vivo* molecular evidence of genistein action in augmenting the efficacy of cisplatin in pancreatic cancer [J]. Int J Cancer, 2007, 120(4): 906-917.

- [24] Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras, Badley AD, et al.

Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region [J]. J Biol Chem, 1998, 273(8): 4416-4423.

- [25] Fan W, Imamura T, Sonoda N, et al. FOXO1 transrepresses peroxisome proliferator -activated receptor gamma transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes [J]. J Biol Chem, 2009, 284(18): 12188-12197.

(收稿日期:2013-07-09)

(本文编辑:刘军兰)

王欢,卢陈嘉,马威,等. 金雀异黄素诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013,7(5):322-328.

