

6 种类胡萝卜素对人乳腺癌细胞株细胞间隙连接通讯功能影响的比较

彭光华¹, 李 忠², 张声华¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

2. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

摘 要: 目的: 探讨类胡萝卜素对乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 和 MCF-7 细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响。方法: 类胡萝卜素分别与乳腺癌细胞 MDA-MB-435S、MCF-7 共培养, 划痕标记染料示踪技术检测类胡萝卜素对乳腺癌细胞间隙连接通讯功能的影响。结果: β -胡萝卜素、虾青素和番茄红素对 MDA-MB-435S 细胞的细胞间隙连接通讯功能具有较强的促进作用; 角黄素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对 MDA-MB-435S 细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响不明显; β -胡萝卜素、虾青素和角黄素对 MCF-7 细胞的细胞间隙连接通讯功能具有较强的促进作用; 番茄红素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对 MCF-7 细胞间隙连接通讯功能的影响不明显。
关键词: 类胡萝卜素; 乳腺癌细胞; 细胞间隙连接通讯

Comparison of Effect of Six Kinds of Carotenoids on Gap Junctional Intercellular Communication of Human Breast Cancer Cell

PENG Guang-hua¹, LI Zhong², ZHANG Sheng-hua¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of carotenoid on gap junctional intercellular communication of human breast cancer cell of MDA-MB-435S and MCF-7. Methods: The breast cancer cell MDA-MB-435S and MCF-7 were cultured with carotenoids relatively *in vitro*, and the gap junctional intercellular communication of breast cancer cell was determined by scrape-loading and dye transfer assay. Results: β -carotene, astaxanthin and lycopene could enhance the gap junctional intercellular communication of breast cancer cell MDA-MB-435S, but canthaxanthin, zeaxanthin and zeaxanthin dipalmitate have little effects on it. β -carotene, astaxanthin and canthaxanthin could enhance the gap junctional intercellular communication of MCF-7, but lycopene, zeaxanthin and zeaxanthin dipalmitate have little effects on it.

Key words: carotenoids; human breast cancer cells; gap junctional intercellular communication

中图分类号: Q279

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0045-04

细胞通讯是多细胞生物体内信号传递的主要通道, 主要有两种方式: 一种是信号物质如激素、生长因子等, 从特定细胞产生, 经过体循环作用于靶细胞, 这是远距离细胞之间的通讯; 另一种是细胞间隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC), 细胞间隙连接是细胞膜形成的通道结构, 能将小分子信号物质如 cAMP、Ca²⁺ 等从一个细胞的胞质内传递到另一个细胞, 是组织或细胞群体内信号传递的主要通道。这

种细胞间隙连接通讯方式对细胞的正常增殖分化和代谢功能以及组织自身稳定等起着重要调节作用^[1]。

近年来, 国内外对细胞间隙连接通讯与癌变的关系进行了大量的研究, 认为细胞间隙连接通讯在癌变发生过程中扮演着极为重要的角色。众多的研究表明, 细胞间隙连接通讯功能异常可能是癌症发生的重要机制之一^[2]。体外实验证实许多促癌物、癌基因、生长因子抑制细胞间隙连接通讯功能, 而一些有抗癌作用的物质

收稿日期: 2007-07-23

作者简介: 彭光华(1968-), 男, 副教授, 博士, 主要从事天然活性成分化学与食品化学的研究。

E-mail: guangh@mail.hzau.edu.cn

则明显提高细胞间隙连接通讯功能,说明细胞间隙连接通讯功能异常与癌症的发生有密切关系。类胡萝卜素的抗癌作用已被广泛承认,但其作用机理迄今为止尚未完全阐明。细胞间隙连接通讯与癌变的密切关系提示类胡萝卜素的抗癌作用可能和细胞间隙连接通讯有某种内在的联系,因此,本研究以人乳腺癌细胞作为离体研究模型,采用划痕标记染料示踪技术检测类胡萝卜素对乳腺癌细胞间隙连接通讯功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

雌激素受体阳性(ER-)乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 购自中科院上海细胞生物研究所细胞库。

β -胡萝卜素(β -carotene, β -C, 纯度 $\geq 98\%$)、番茄红素(lycopene, LYC, 纯度 $\geq 98\%$)、玉米黄素(zeaxanthin, ZEA, 纯度 $\geq 98\%$)、角黄素(canthaxanthin, CAN, 纯度 $\geq 98\%$)和虾青素(astaxanthin, ASX, 纯度 $\geq 98\%$) F.Hoffman-La Roche 公司;玉米黄素双棕榈酸酯(zeaxanthin dipalmitate, ZDP, 纯度为 95%,按 β -胡萝卜素计)按文献[5]自制。

RPMI-1640 GIBCO 公司;四氢呋喃 江苏南兴助剂厂;小牛血清 杭州四季青公司;罗氏黄(Lucifer yellow CH, LY) Sigma 公司。

BX-60 万能落射式荧光显微镜 日本奥林巴斯公司;CO₂培养箱 德国 Heraeus 公司。

1.2 方法

1.2.1 类胡萝卜素处理浓度配制

将 β -胡萝卜素、番茄红素、玉米黄素、角黄素、虾青素、玉米黄素双棕榈酸酯分别溶解于四氢呋喃中,配制成浓度为 20mmol/L 的储备液于 -20°C 冰箱中保存,两周内有效。临用前用四氢呋喃(THF)配制成所需要的浓度(20、40、60 $\mu\text{mol/L}$),加入培养液中,四氢呋喃在培养液中的终浓度为 0.5% 对细胞活性无影响。所有操作步骤在暗处进行。

1.2.2 细胞培养

收集对数生长期约 2×10^6 个乳腺癌细胞接种于 $\phi 90\text{mm}$ 培养皿,在 37°C 、5%CO₂及饱和湿度条件下培养 24h 后,然后分别用 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -胡萝卜素、番茄红素、玉米黄素、角黄素、虾青素、玉米黄素双棕榈酸酯处理,每 2d 更换培养液。4d 后,终止培养,为检测细胞间隙连接通讯功样品备用。

1.2.3 细胞间隙连接通讯功能测定^[4]

倾去类胡萝卜素培养液,用 37°C PBS(pH7.4)小心冲洗 3 次,除去残留的培养液,用锋利的手术刀片平行轻划细胞层 5~6 次;加入 37°C 的罗氏黄应用液约 2ml,

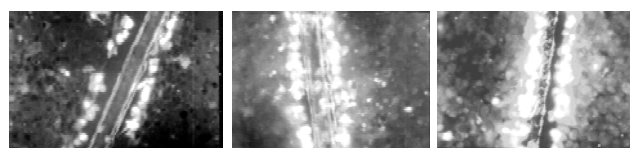
放回 CO₂ 培养箱中标记 2~3min;吸出罗氏黄液,用 37°C PBS 小心冲洗细胞 2~3 次,除去残留罗氏黄液和细胞碎片;将平皿倒扣于滤纸上吸取残留 PBS 液,向平皿中加入 4% 甲醛 2ml,室温固定 15min,弃甲醛固定液;在倒置荧光显微镜下观察荧光传递情况。

1.2.4 结果评价

每条划痕选择平滑处计数带有荧光的细胞层数,每个剂量组观察 40 个点左右,荧光局限于划痕边缘单层细胞者为未传递,为-,1~2 层细胞有荧光者为+,2~3 层细胞有荧光为++,3~4 层细胞有荧光为+++,4 层以上有荧光为++++,并将荧光传递强度-至++++量化为 0~4 后取平均值。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素对 MDA-MB-435S 细胞间隙连接通讯功能的影响



A. 对照组; B. 经 β -胡萝卜素处理; C. 经虾青素处理。

图 1 不同处理后 MDA-MB-435S 细胞荧光传递情况

Fig.1 Transfer of fluorescence of MDA-MB-435S under different treatments

类胡萝卜素处理 MDA-MB-435S 细胞后,划痕、标记并在荧光显微镜下观察荧光物质传递情况,荧光物质传递越远,细胞间隙连接通讯功能越强,荧光物质集中在划痕周围,细胞间隙连接通讯功能较弱。由图 1 可

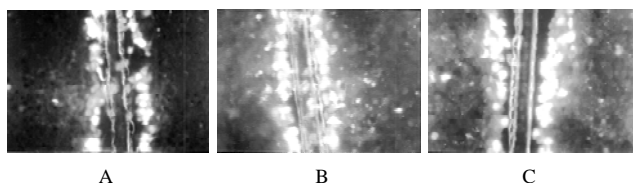
表 1 类胡萝卜素对 MDA-MB-435S 细胞间隙连接通讯功能的影响
Table 1 Effects of carotenoids on gap junctional intercellular communication of MDA-MB-435S breast cancer cells

类胡萝卜素	细胞数	MDA-MB-435S 荧光传递情况					平均水平
		-	+	++	+++	++++	
对照	23	16	7	0	0	0	0.30
β -C	56	19	15	8	7	7	1.43
LYC	37	10	14	8	5	0	1.22
ZEA	38	12	11	9	0	0	0.76
ZDP	32	21	4	7	0	0	0.56
CAN	42	23	11	8	0	0	0.64
ASX	21	4	8	3	1	5	1.76

注:-表示荧光物质局限于划痕边缘单层的细胞;+:表示荧光物质传递到 1~2 层的细胞;+:表示荧光物质传递到 2~3 层的细胞;+:表示荧光物质传递到 3~4 层的细胞;+:表示荧光物质传递到 4 层以上的细胞。表中的细胞间隙连接通讯功能的平均水平,即荧光物质传递强度的计算:将荧光传递强度-至++++量化为 0 至 4 后,取平均值。表 2 同。

见,对照组的荧光物质大部分集中在划痕周围,而 β -胡萝卜素、番茄红素、虾青素处理MDA-MB-435S细胞后,荧光物质传递较远,角黄素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯处理后,荧光物质主要集中在划痕附近,说明 β -胡萝卜素、番茄红素、虾青素对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能有增强作用,角黄素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响不明显。从表1可进一步看出,不同类胡萝卜素对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响差别,对照组荧光传递平均水平为0.30,虾青素、 β -胡萝卜素、番茄红素处理后荧光染料传递平均水平分别为1.76、1.43、1.22,说明虾青素、 β -胡萝卜素、番茄红素、对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响较强,其中虾青素和 β -胡萝卜素对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的促进作用最大。角黄素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯处理后,荧光物质传递平均水平分别为0.64、0.76、0.56,与对照组的荧光染料传递水平差别不大,说明角黄素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响不大。

2.2 类胡萝卜素对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响



A.对照组; B.经 β -胡萝卜素处理; C.经虾青素处理后。

图2 不同处理后MCF-7细胞荧光传递情况

Fig.2 Transfer of fluorescence of MCF-7 under different treatments

由图2可见,对照组的荧光物质大部分集中在划痕周围,而 β -胡萝卜素、角黄素、虾青素处理MCF-7细胞后,荧光物质传递较远,番茄红素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯处理后,荧光物质主要集中在划痕

表2 类胡萝卜素对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响
Table 2 Effects of carotenoids on gap junctional intercellular communication of MCF-7 breast cancer cells

类胡萝卜素	细胞数	MCF-7 荧光传递情况					平均水平
		—	+	++	+++	++++	
对照	23	18	5	0	0	0	0.22
BC	26	14	9	3	0	7	1.65
LYC	27	12	12	3	0	0	0.67
ZEA	33	12	16	5	0	0	0.78
ZDP	36	22	10	4	0	0	0.50
CAN	34	7	13	6	5	3	1.53
ASX	38	15	7	5	5	6	1.47

附近。说明 β -胡萝卜素、角黄素、虾青素对MCF-7细胞间隙连接通讯功能有增强作用,番茄红素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响不明显。从表2可进一步看出,不同类胡萝卜素对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响差别,对照组荧光传递平均水平为0.22,虾青素、 β -胡萝卜素、角黄素处理后荧光传递平均水平分别为1.47、1.65、1.53,说明虾青素、 β -胡萝卜素、角黄素对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响较强。番茄红素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯处理后,荧光物质传递平均水平分别为0.67、0.78、0.50与对照组的荧光传递水平差别不大,说明番茄红素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对MCF-7细胞间隙连接通讯功能的影响不大。

从上述结果来看, β -胡萝卜素和虾青素对MDA-MB-435S细胞和MCF-7细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响较大,对细胞间隙连接通讯具有较强的促进作用;玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对MDA-MB-435S细胞和MCF-7细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响都不是很明显;番茄红素和角黄素对MDA-MB-435S和MCF-7的细胞间隙连接通讯功能的影响存在差别,番茄红素对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响有较明显的作用,而对MCF-7细胞的作用不十分明显。角黄素对MDA-MB-435S细胞间隙连接通讯功能的影响不大,而对MCF-7细胞的作用十分明显。

3 讨论

类胡萝卜素属四萜类化合物,是具有广泛生理功能的脂溶性维生素,其潜在的肿瘤预防和治疗作用已受到广泛关注。许多动物评价试验研究发现,类胡萝卜素能降低大鼠乳腺癌发生率、发生数量及肿瘤生长速率,肿瘤转移也受到抑制^[5-6]。一些细胞学研究证实,类胡萝卜素对体外乳腺癌细胞的生长有抑制作用,而且与乳腺癌细胞株、生长状态、接种浓度、类胡萝卜素的用量和作用时间有直接的关系^[7]。但类胡萝卜素抗乳腺癌作用机理迄今为止尚未完全阐明。细胞间隙连接通讯可传输细胞群体内生长调控信号,调节细胞的正常增殖与分化,大多数肿瘤细胞的细胞间隙连接通讯功能微弱或缺失,细胞发生转化后其细胞间隙连接通讯功能降低或抑制或被破坏被认为是促癌变阶段的重要机制。本研究采用划痕染料示踪技术(SLDT)观察了类胡萝卜素对人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-435S细胞的细胞间隙连接通讯功能的改变情况,研究结果表明乳腺癌细胞的间隙通讯功能很微弱,不同结构的类胡萝卜素对乳腺癌细胞的间隙连接通讯功能的影响存在极大的差异性。 β -胡萝卜素和虾青素对MDA-MB-435S细胞和MCF-7细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响较大,对细胞间隙连接通

讯具有较强的促进作用；玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯对 MDA-MB-435S 细胞和 MCF-7 细胞的细胞间隙连接通讯功能的影响都不是很明显；番茄红素对 MDA-MB-435S 细胞间隙连接通讯功能的影响有较明显的作用，而对 MCF-7 细胞的作用不十分明显。角黄素对 MDA-MB-435S 细胞间隙连接通讯功能的影响不大，对 MCF-7 细胞的作用十分明显。类胡萝卜素增强乳腺癌细胞间隙连接通讯的机理有待进一步研究。

参考文献：

- [1] DIENER N, BEER N, DURK H, et al. Junctional intercellular communication of cultured rat liver parenchymal cells is stabilized by epithelial cells and their isolated plasma membranes [J]. *Experientia*, 1994, 50(2): 124-129.
- [2] YANWSAKI H. Gap junction intercellular communication and carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 1990(11): 1051-1057.
- [3] 彭光华, 李忠, 张声华. 薄层色谱法分离鉴定枸杞子中类胡萝卜素[J]. *营养学报*, 1998(1):76-78.
- [4] ZHANG L X, ROBERT V, COONEY. Bertram carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12 (11): 2109-2114.
- [5] 郑一凡, 朱心强, 黄幸舒. β -胡萝卜素和叶绿酸对 DMBA 诱发大鼠乳腺癌的影响[J]. *癌变·畸变·突变*, 1997(2): 99-102.
- [6] 朱元喜, 郝希山, 孙慧, 等. β -胡萝卜素对 TAI 小鼠移植性乳腺癌 MA737 影响的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1999(4): 262-264.
- [7] LEVY J, BOSIN E, FELDMAN B. Locopen is a more potent inhibitor of human cancer proliferation than either alpha carotene or beta-carotene [J]. *Nutr Cancer*, 1995, 24: 257-266.