

## 研究论文

# 木犀草素下调AEG-1和MMP-2的表达对血管生成和乳腺癌细胞侵袭性的抑制作用

姜英, 谢鲲鹏, 霍洪楠, 王丽梦, 邹伟, 谢明杰\*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 大连 116081

**摘要:** 本研究探讨木犀草素对乳腺癌细胞增殖及其对血管生成和乳腺癌细胞侵袭性作用的影响。采用MTT比色法检测木犀草素对乳腺癌细胞增殖的作用; 鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)模型检测木犀草素对新生血管生成的影响; 细胞划痕法检测木犀草素对乳腺癌细胞侵袭性的情况; Western blot方法检测凋亡抑制基因Bcl-2蛋白、星形胶质细胞升高基因-1 (astrocyte elevated gene-1, AEG-1)蛋白、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)蛋白的表达。实验结果显示, 木犀草素以时间和剂量依赖的方式抑制MCF-7细胞增殖, 下调Bcl-2蛋白表达; 木犀草素能显著抑制CAM中新生血管生成; 与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作用MCF-7细胞48 h后, 其迁移率降低了71.07% ( $P < 0.01$ ), AEG-1和MMP-2蛋白表达量分别下降了82.34%和85.70% ( $P < 0.05$ )。以上结果表明, 木犀草素能有效地抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖, 抑制抑癌基因Bcl-2蛋白表达, 抑制血管新生和乳腺癌细胞的侵袭, 下调AEG-1和MMP-2表达。

**关键词:** 木犀草素; 基质金属蛋白酶-2; 人乳腺癌细胞株MCF-7; 鸡胚绒毛尿囊膜

**中图分类号:** R7337

## Inhibitory effect of luteolin on the angiogenesis of chick chorioallantoic membrane and invasion of breast cancer cells via downregulation of AEG-1 and MMP-2

JIANG Ying, XIE Kun-Peng, HUO Hong-Nan, WANG Li-Meng, ZOU Wei, XIE Ming-Jie\*

Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China

**Abstract:** The purpose of the present study was to investigate the effect of luteolin on the angiogenesis and invasion of breast cancer cells. MTT assay was used to examine breast cancer proliferation. The chick chorioallantoic membrane model was used to assess the angiogenesis effect. Wound healing assay was used to assess cell invasion ability. Western blot was used to analyze Bcl-2, AEG-1 and MMP-2 expression levels. The results showed luteolin inhibited MCF-7 cells proliferation in a dose- and time-dependent manner, and the expression of Bcl-2 protein was decreased. Luteolin had a strong anti-angiogenesis of chick chorioallantoic membrane. After treatment of MCF-7 cells with luteolin at 60  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h, migration rate was reduced by 71.07% compared with control ( $P < 0.01$ ). After treatment of MCF-7 cells with luteolin at 60  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h, the expression of AEG-1 and MMP-2 was reduced by 82.34% ( $P < 0.05$ ) and 85.70% ( $P < 0.05$ ) respectively, compared with control. In conclusion, the results suggest that luteolin can inhibit the proliferation of breast cancer cells, and suppress the expression of Bcl-2. Furthermore, luteolin has strong anti-angiogenesis of chick chorioallantoic membrane and anti-invasive activity on breast cancer cells, and down-regulates the expression of AEG-1 and MMP-2.

**Key words:** luteolin; MMP-2; MCF-7; chick chorioallantoic membrane

Received 2013-05-22 Accepted 2013-07-24

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. L2013412) and the Science and Technology Program of Dalian Municipality, China (No. 2013E13SF108).

\*Corresponding author. Tel: +86-411-84259341; Fax: +86-411-85827069; E-mail: xmj1222@sina.com

乳腺癌是全球女性第一大恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升,且发病年龄趋于年轻化趋势,目前分子靶向药物是用于肿瘤治疗的主要途径<sup>[1,2]</sup>。研究者认为,药物的抗肿瘤作用机制与抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、阻遏细胞周期、抑制癌细胞组织中血管新生和肿瘤转移侵袭等有关<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞的转移侵袭是乳腺癌死亡率和复发率增加的主要原因之一,而肿瘤的增殖和转移侵袭都依赖于新生血管的生成。因此,获得有效地抑制肿瘤细胞血管生成和抑制肿瘤生长、转移侵袭的药物,成为治疗乳腺癌的有效途径之一<sup>[4]</sup>。目前关于药物抑制肿瘤细胞血管生成的研究,已经取得了一些进展。有研究结果显示,雷公藤红素、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、苦参素等可以阻滞肿瘤血管的形成,从而抑制肿瘤的生长和转移<sup>[5,6]</sup>。木犀草素(luteolin)是从天然药物、蔬菜果实中分离得到的一种天然无毒的黄酮类化合物<sup>[7]</sup>。已有研究表明,木犀草素能够抑制胃癌、肝癌、结直肠癌、前列腺癌和乳腺癌等细胞的增殖,表现出较强的活性<sup>[8-12]</sup>。目前,关于木犀草素对新生血管生成和乳腺癌细胞的侵袭性作用机制的研究,国内外尚未见报道。本研究以人乳腺癌 MCF-7 细胞为实验材料,通过木犀草素作用后,检测新生血管生成、乳腺癌细胞侵袭性、星形胶质细胞升高基因-1 (astrocyte elevated gene-1, AEG-1) 蛋白、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 蛋白的表达等情况,以探讨木犀草素对新生血管生成和乳腺癌细胞侵袭性的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人乳腺癌细胞株 MCF-7 由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。木犀草素标准品,纯度≥98%,购自大连诺威信生物有限公司。鸡胚购自大连韩伟养鸡场。新生牛血清和 RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司。胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)均购自 Sigma 公司。鼠 Bcl-2 单克隆抗体、鼠 AEG-1 多克隆抗体、鼠 MMP-2 单克隆抗体、β-actin 单克隆抗体、羊抗鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP 均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 木犀草素对 MCF-7 细胞生长的影响** 取对数生长期的 MCF-7 细胞,制备单细胞悬液,以每孔 200 μL (4 × 10<sup>3</sup> 个/孔)接种于 96 孔培养板,待

细胞贴壁后,加入终浓度为 20、40 和 60 μmol/L 的木犀草素,对照组加入 1% DMSO。继续培养 24 h 和 48 h。按参考文献<sup>[13]</sup>方法用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值并计算药物对细胞生长的抑制率。实验重复三次,取平均值。抑制率 =  $[1 - (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

### 1.2.2 木犀草素对鸡胚绒毛尿囊膜 (chick chorioallantoic membrane, CAM) 模型新生血管生成的影响

6 日龄鸡胚用 1% 新洁尔灭 (38~42 °C) 浸洗擦干,钝头朝上,倾斜 45° 放入 37 °C、相对湿度为 60%~70% 的恒温培养箱中培养 24 h。将鸡胚随机分为四组,每组 4~5 枚,在超净工作台内,用 75% 酒精消毒后,在距胚头 1 cm 处开窗,滴加一滴生理盐水,显现出 CAM 血管,当 CAM 与壳膜分离后制成假气室。将玻璃纤维滤纸载体放于两条前卵黄静脉之间的相对无血管区,各组分别滴入 30 μL 的 40、60 和 80 μmol/L 木犀草素,对照组加入 30 μL 生理盐水,然后用无菌胶带封闭,放到培养箱中培养 24 h,拍照观察。

**1.2.3 木犀草素对 MCF-7 细胞侵袭性的影响** 取对数生长期的 MCF-7 细胞 1 mL (5 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔),接种于 24 孔板中,待培养到形成单层细胞后,用无菌枪头沿孔板底部中央水平划一道痕迹,用 PBS 清洗划痕区域,弃去 PBS,反复三次,将刮掉的细胞冲洗干净,然后每孔加入无血清 RPMI 1640 培养基和不同浓度木犀草素 (0、20、40 和 60 μmol/L)。分别于 0、24、48 h 时在倒置显微镜下摄像。测量划痕宽度,计算迁移率。迁移率 =  $(\text{原划痕宽度} - \text{现在划痕宽度}) / \text{原划痕宽度} \times 100\%$ 。实验重复三次。

### 1.2.4 木犀草素对 MCF-7 细胞中 Bcl-2、AEG-1 和 MMP-2 蛋白表达的影响

取对数生长期的 MCF-7 细胞,制备成 2.5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,加入不同浓度木犀草素,使其终浓度为 0、20、40 和 60 μmol/L,继续培养 48 h,然后用细胞裂解液裂解不同处理组细胞,收集细胞总蛋白,Bradford 法定量后按参考文献<sup>[14]</sup>方法进行 Western blot。用凝胶成像系统对胶片扫描记录相应条带的透射光积分光密度值,β-actin 为内参。

**1.2.5 统计学分析** 采用 SPSS13.0 和 Excel XP 软件对数据进行差异显著性 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学显著性。实验组和对照组的相关数值均用 means ± SD 表示。

## 2 结果

### 2.1 木犀草素对MCF-7细胞生长抑制作用

木犀草素对 MCF-7 细胞的生长具有一定的抑制作用, 呈现明显的时间和剂量依赖关系 (表 1)。与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$  的木犀草素作用 MCF-7 细胞 48 h, 其对 MCF-7 细胞的抑制率为  $(44.51 \pm 1.52)\%$  ( $P < 0.01$ )。结果显示木犀草素可显著抑制 MCF-7 细胞增殖。

### 2.2 木犀草素对MCF-7细胞中Bcl-2蛋白表达影响

随着木犀草素浓度的增加, MCF-7 细胞 Bcl-2 蛋白表达量逐渐降低 (图 1)。其中 60  $\mu\text{mol/L}$  的木犀草素组作用细胞 48 h 后, 与对照组相比, MCF-7 细胞的 Bcl-2 蛋白表达下降了  $(76.16 \pm 2.01)\%$  ( $P < 0.05$ )。结果显示木犀草素能有效抑制 MCF-7 细胞 Bcl-2 蛋白的表达。

表 1. 木犀草素对MCF-7细胞生长的抑制作用

Table 1. Inhibitory effects of luteolin on proliferation of MCF-7 cells

Groups	Control	20 $\mu\text{mol/L}$ luteolin	40 $\mu\text{mol/L}$ luteolin	60 $\mu\text{mol/L}$ luteolin
24 h	0	$(6.21 \pm 1.63)\%$	$(22.63 \pm 2.87)\%$	$(30.25 \pm 1.37)\%$ *
48 h	0	$(10.02 \pm 0.94)\%$	$(29.56 \pm 2.72)\%$ *	$(44.51 \pm 1.52)\%$ **

The inhibitory rate of MCF-7 cells was determined using MTT assay. Means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control.

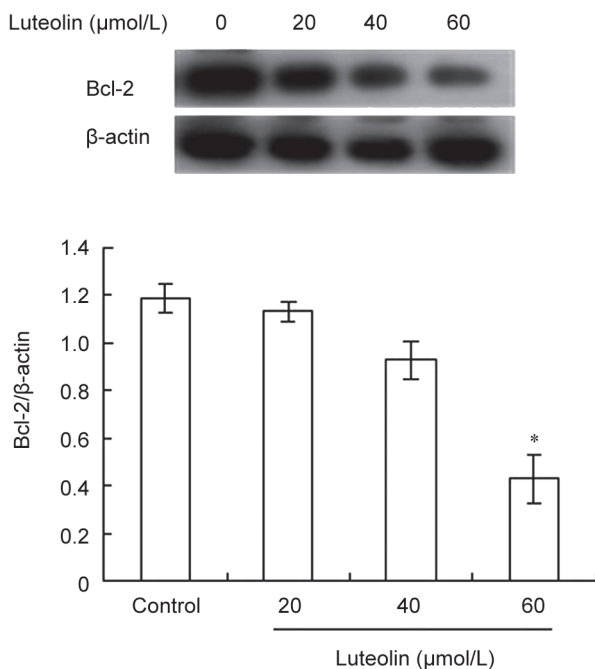


图 1. 木犀草素对MCF-7细胞中Bcl-2蛋白表达影响

Fig. 1. Effects of luteolin on the expression of Bcl-2 protein. The amount of protein was assessed by Western blot. Means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  compared with control.

### 2.3 木犀草素对鸡胚新生血管生成的影响

对照组的 CAM 血管丰富且生长良好, 主血管长势旺盛。当 40 和 60  $\mu\text{mol/L}$  木犀草素处理 CAM 24 h 后, 血管密度降低, 管径变细。当木犀草素浓度达到 80  $\mu\text{mol/L}$  时, CAM 出现了血管壁部分溶解, 血管分支多处断开, 分布零乱, 血管颜色变浅 (图 2)。结果显示木犀草素对 CAM 中血管新生有明显抑制作用。

### 2.4 木犀草素对MCF-7细胞侵袭性的影响

木犀草素可显著抑制 MCF-7 细胞的侵袭性作用, 且随着浓度的增加和作用时间的延长, 其抑制作用逐渐增强, 呈剂量和时间依赖性 (图 3)。与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$  木犀草素作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 其迁移率降低了  $(71.07 \pm 2.9)\%$  ( $P < 0.01$ )。结果显示木犀草素显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭性。

### 2.5 木犀草素对MCF-7细胞中AEG-1和MMP-2表达影响

随着木犀草素浓度的增加, MCF-7 细胞 AEG-1 和 MMP-2 蛋白表达量逐渐降低 (图 4)。与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$  木犀草素作用 MCF-7 细胞 48 h 后, AEG-1 和 MMP-2 蛋白表达量分别下降了  $(82.34 \pm 1.19)\%$  和  $(85.70 \pm 2.24)\%$  ( $P < 0.05$ )。结果显示木犀草素可抑制 MCF-7 细胞中 AEG-1 和 MMP-2 蛋白的表达。

## 3 讨论

乳腺癌的发生、侵袭转移是一个受多种因素调控的复杂过程, 其中肿瘤的血管生成起着极其重要的作用, 是影响患者预后的主要因素之一。因此近年来抗肿瘤血管生成治疗已成为肿瘤靶向治疗的一种有效的手段和方法。本研究结果显示, 木犀草素能显著地抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖和 Bcl-2 的表达。Bcl-2 为凋亡抑制基因, 其表达水平增高能够抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[15]</sup>。由此推测木犀草素具有通过抑制 Bcl-2 的表达发挥其促细胞凋亡的作用。

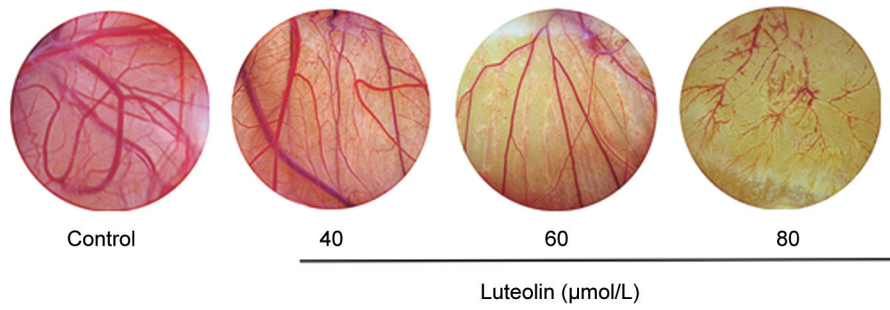


图 2. 木犀草素对鸡胚尿囊膜新生血管的抑制作用  
 Fig. 2. Inhibitory effects of luteolin on the angiogenesis of chick chorioallantoic membrane.

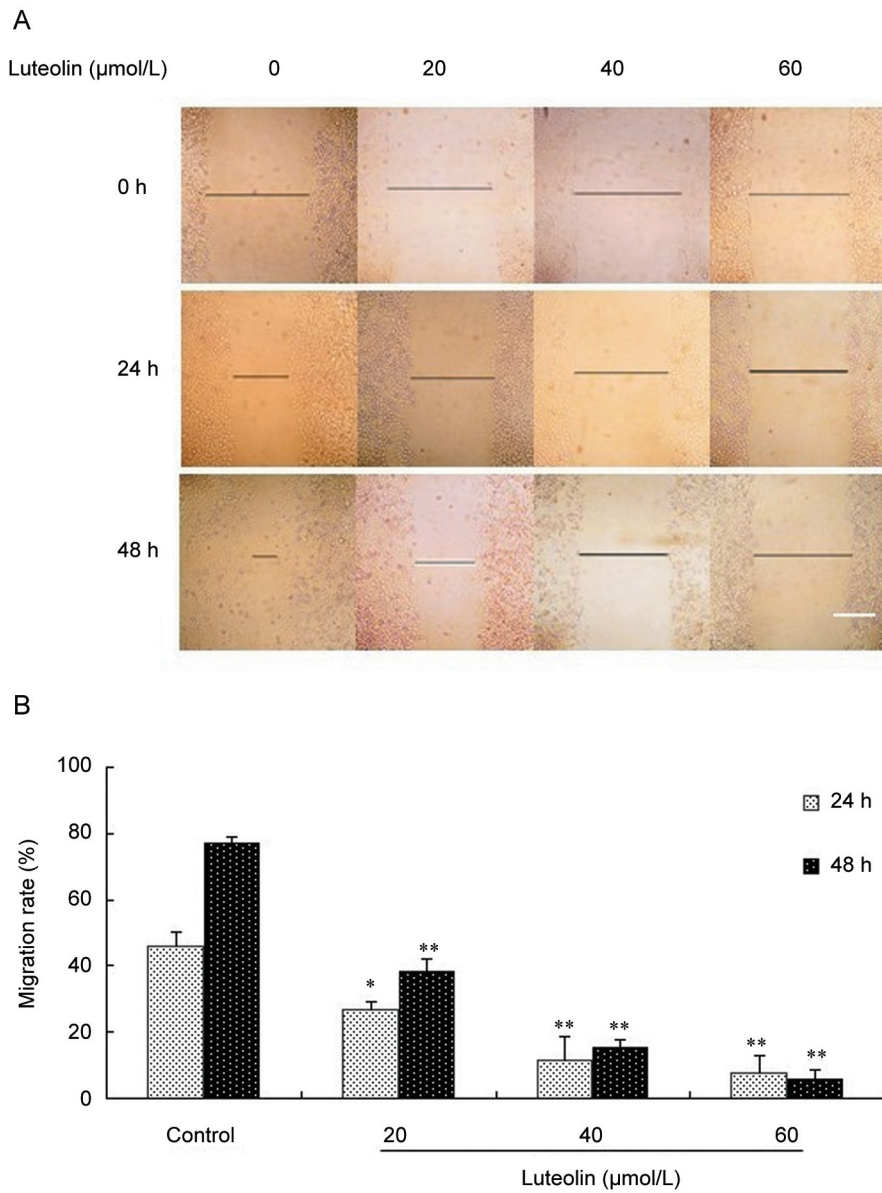


图 3. 木犀草素对MCF-7细胞侵袭性作用的影响  
 Fig. 3. Effects of luteolin on migration and invasion of MCF-7 cells. *A*: Migration map. Scale bar, 50 μm. *B*: Migration rate. Means ± SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control.

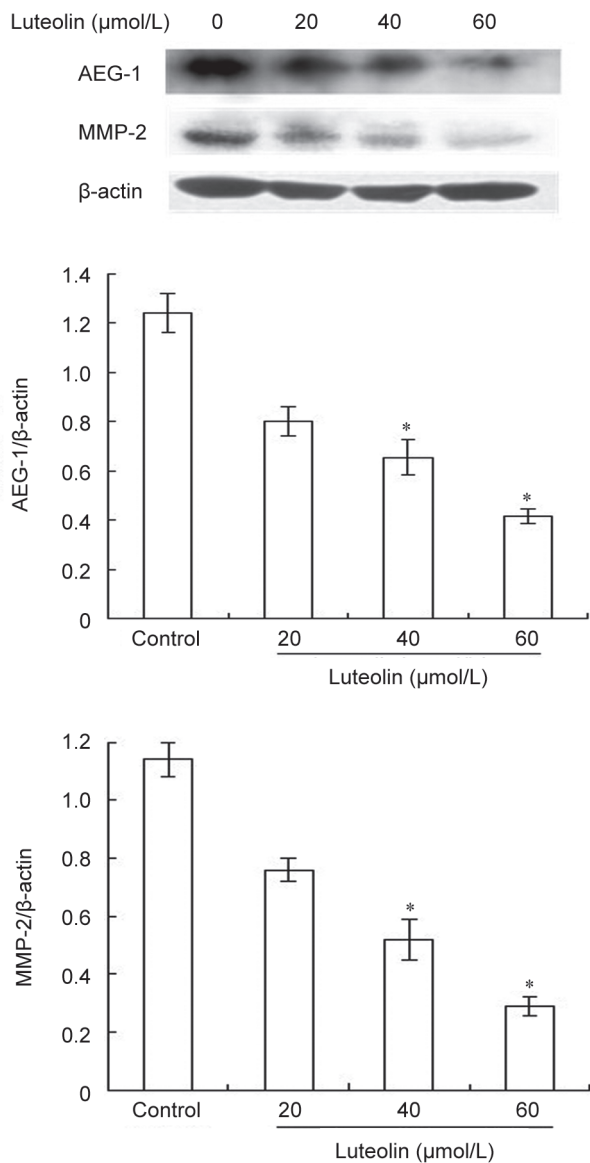


图 4. 木犀草素对MCF-7细胞中AEG-1和MMP-2蛋白表达的影响

Fig. 4. Effects of luteolin on the expression of AEG-1 and MMP-2 proteins. The amount of protein was assessed by Western blot. Means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  compared with control.

具有局部侵袭和远处转移的能力是恶性肿瘤最主要的生物学特性, 并且是导致患者死亡的主要原因<sup>[16]</sup>。肿瘤的血管生成和侵袭转移是相互依赖、共同进展的过程, 都与基底膜的降解有关。MMP-2是MMPs家族的重要成员, MMP-2可以降解基底膜中IV型胶原蛋白, 形成肿瘤细胞移动通道, 使肿瘤得以扩散, 最终导致肿瘤转移侵袭, 并可释放促血管生成因子, 促进乳腺上皮细胞增长<sup>[17]</sup>。而AEG-1对MMP-2的表达至关重要, AEG-1是与血

管生成和乳腺癌侵袭性关系密切的关键基因, 它可通过调控MMP-2的表达来促进肿瘤细胞的侵袭和粘附<sup>[18]</sup>。Emdad等在鼠胶质瘤细胞系中敲除AEG-1基因后, 发现MMP-2和MMP-9的启动子活性降低, 细胞迁移和血管生成的能力受到了抑制<sup>[19]</sup>。因此抑制MMP-2和AEG-1的表达是药物抑制血管生成和侵袭的机制之一。本研究的CAM实验和细胞划痕实验结果显示, 木犀草素能抑制血管新生和乳腺癌细胞的侵袭, 抑制AEG-1和MMP-2蛋白的表达, 且其抑制作用呈浓度依赖性, 表明木犀草素抑制新生血管的生成和乳腺癌细胞的侵袭能力与调控AEG-1和MMP-2的表达有关。

综上所述, 木犀草素能有效地抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖, 抑制抑癌基因Bcl-2蛋白表达, 抑制血管新生和乳腺癌细胞的侵袭, 下调AEG-1和MMP-2表达。乳腺癌发生和发展是多因素、多环节和多途径参与的复杂过程, 关于木犀草素抗乳腺癌具体机制仍需要进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 10–29.
- 2 Liang ZC (梁忠铨), Li JW. Research progress of anti-angiogenic in breast cancer therapy. *Med Recapit (医学综述)* 2012; 18(7): 1032–1034 (Chinese, English abstract).
- 3 Xu T (徐韬), Xu RA. Progress on anti-tumor mechanism of Chinese medicine and its active ingredients. *J Huaqiao Univ (Nat Sci) (华侨大学学报自然科学版)* 2009; 30(4): 359–365 (Chinese, English abstract).
- 4 Bi SL (毕四丽), Cao JX. Research progress of targeted drugs and traditional Chinese medicine anti-angiogenesis therapy breast cancer. *Guide China Med (中国医药指南)* 2012; 10(6): 9–12 (Chinese, English abstract).
- 5 Zhou YX (周幽心), Sun CF, Xu QN, Shen HL, Huang YL. An *in vitro* study of tripterine inhibits proliferation of vascular endothelial cells. *Pract J Cancer (实用癌症杂志)* 2004; 19(6): 564–566 (Chinese, English abstract).
- 6 Gao Y (高勇), Wang JJ, Xu Q, Ye QQ, Guo J, Geng HC. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 on tumor neoangiogenesis. *Acad J Sec Mil Med Univ (第二军医大学学报)* 2001; 22(1): 40–42 (Chinese, English abstract).
- 7 Kapoor S. Luteolin and its inhibitory effect on tumor growth in systemic malignancies. *Exp Cell Res* 2013; 319(6): 777–778.
- 8 Wu B, Zhang Q, Shen W, Zhu J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer

- AGS cell line. *Mol Cell Biochem* 2008; 313(1–2): 125–132.
- 9 Xavier CR, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 281(2): 162–170.
  - 10 Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tsenq TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 203(2): 124–131.
  - 11 Jeoh YW, Suh YJ. Synergistic apoptotic effect of celecoxib and luteolin on breast cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29(2): 819–825.
  - 12 Wang LM, Xie KP, Huo HN, Shang F, Zou W, Xie MJ. Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ER $\alpha$  in human breast cancer MCF-7 cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(4): 1431–1437.
  - 13 Ma X (马兴), Xie KP, Shang F, Huo HN, Wang LM, Xie MJ. Wogonin inhibits IGF-1-stimulated cell growth and estrogen receptor  $\alpha$  expression in breast adenocarcinoma cell and angiogenesis of chick chorioallantoic membrane. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2012; 64(2): 207–212 (Chinese, English abstract).
  - 14 Zou W (邹伟), Wang HX, Liu J, Zhang H, An LJ. Expression of caveolin-1 protein in the rat brain and its role in the discrimination learning. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2006; 58(5): 429–434 (Chinese, English abstract).
  - 15 Elumalai P, Gunadharini DN, Senthilkumar K, Banudevi S, Arunkumar R, Benson CS, Sharmila G, Arunakaran J. Induction of apoptosis in human breast cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. *Toxicol Lett* 2012; 215(2): 131–142.
  - 16 Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25(5): 3327–3333.
  - 17 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(3): 165–197.
  - 18 Liu KJ (刘凯军), Wang WT, Wei P. Expression and significance of AEG-1 and ICAM-1, MMP-2, MMP-9 in gastric cancer tissue. *J Heibei Med Univ (河北医科大学学报)* 2012; 33(4): 441–443 (Chinese).
  - 19 Emdad L, Lee SG, Su ZZ, Jeon HY, Boukerche H, Sarkar D, Fisher PB. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(50): 21300–21305.