

## ·基础研究·

本文引用:陈 梦,赵丕文,孙丽萍,武虹波,赵 笛.羟基红花黄色素 A 对雌激素效应相关蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1218-1221.

## 羟基红花黄色素 A 对雌激素效应相关蛋白表达的影响

陈 梦,赵丕文\*,孙丽萍,武虹波,赵 笛  
(北京中医药大学中医学院,北京 100029)

**[摘要]** **目的** 探讨羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)对雌激素效应相关蛋白表达的影响。**方法** 培养雌激素受体阳性细胞 T47D 和特异性雌激素受体(estrogen receptor, ER)阴性细胞 SK-BR-3,将  $1 \times 10^{-7}$  mol/L- $1 \times 10^{-9}$  mol/L 三种梯度浓度的 HSYA 作用于两种细胞,通过蛋白质免疫印迹法检测雌激素受体 ER $\alpha$  及 ER $\beta$ 、细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)及 p-ERK1/2、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、抑癌基因 P27 等蛋白的表达情况。**结果** 与空白对照组相比,在 T47D 细胞中,高浓度的 HSYA 促进了 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERK1/2、p-ERK1/2、PR 的表达,抑制了 P27 的表达( $P < 0.01$ );在 SK-BR-3 细胞中,HSYA 显著抑制了 ERK1/2 的表达,但对 p-ERK1/2 的表达影响不明显( $P > 0.05$ )。**结论** HSYA 在细胞内影响雌激素效应相关蛋白的表达情况不同,可能是通过调节 ER 表达及激活 ERK 信号通路而发挥雌激素样作用。

**[关键词]** 羟基红花黄色素 A; Western Blot; T47D 细胞; SK-BR-3 细胞

**[中图分类号]** R285.5; R393 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.11.012

### Influence of Hydroxysafflor Yellow A on Related Protein Expression of Estrogenic Effects

CHEN Meng, ZHAO Piwen\*, SUN Liping, WU Hongbo, ZHAO Di

(School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on related protein of estrogenic effect. **Methods** The positive cells T47D and ER, and negative cells SK-BR-3 of estrogen receptor (ER) were cultured, and  $1 \times 10^{-7}$  mol/L- $1 \times 10^{-9}$  mol/L of HSYA act on this two cells., negative cells SK-BR-3. The expression of protein ER $\alpha$ , ER $\beta$ , extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2), p-ERK1/2, Progesterone Receptor (PR), P27 was detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank control group, the high concentration HSYA promoted the expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ERK1/2, p-ERK1/2, PR, while inhibit the expression of P27 in T47D cells ( $P < 0.01$ ). HSYA showed significant inhibitory effects on ERK1/2, while had no obvious effects on p-ERK1/2 in SK-BR-3 cells ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** HSYA has different influences on related protein of estrogenic effect in the cells, which possibly through regulating the expression of ER and activating the ERK signaling pathway.

**[Keywords]** hydroxysafflor yellow A; Western Blot; T47D cell; SK-BR-3 cell

雌激素是人体内关键的调节激素,对女性健康尤为重要,主要来源于女性卵泡内膜细胞和卵泡颗粒细胞<sup>[1]</sup>,主要成分为 17 $\beta$ -雌二醇,通过与特异性雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合,将受体活化并迁移至细胞核中形成二聚体复合物,该复合物与

特定的 DNA 序列结合,启动靶基因转录表达<sup>[2]</sup>。ER 有  $\alpha$  和  $\beta$  两种亚型<sup>[3]</sup>。

植物雌激素(phytoestrogen, PE)与内源性雌激素结构和功能类似,羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)属于 PE 的一种,是红花的主

**[收稿日期]** 2016-12-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81673764);北京中医药大学自主科研课题(2017-JYB-JS-001)。

**[作者简介]** 陈 梦,女,硕士,实验师,研究方向:植物雌激素的药理作用研究。

**[通讯作者]** \* 赵丕文,女,博士,教授, E-mail: pwzhao@263.net。

要活性成分,为查尔酮类化合物。研究表明,HSYA 具有抗炎、抗肿瘤、抗心血管疾病等作用<sup>[4-7]</sup>。笔者前期对其在细胞内的作用机制进行研究,发现具有弱雌激素效应<sup>[8]</sup>,因此本文拟从蛋白水平继续深入研究。以人乳腺癌细胞 T47D(ER+)和 SK-BR-3(ER-)为载体,检测 HSYA 作用下,ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、孕激素受体(progesterone receptor, PR),细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂 P27, 以及 MAPK 信号通路中细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)及其磷酸化 ERK1/2(P-ERK1/2)的表达情况。SK-BR-3 细胞有膜受体 G 蛋白偶联雌激素受体 1(G protein-coupled estrogen receptor,GPER1),诸多研究发现,GPER1 参与了雌激素在体内的转导过程,因此通过检测 MAPK 信号通路中 ERK1/2、p-ERK1/2 两种蛋白表达的影响<sup>[9-10]</sup>,推测 HSYA 在体内的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物 HSYA 购自中国药品生物制品检定所;17 $\beta$ -雌二醇购自 Sigma 公司。均用无水乙醇溶解至所需浓度。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌细胞株 T47D、SK-BR-3 购自北京协和细胞资源中心。

1.1.3 主要试剂与仪器 培养基 RPMI1640 购自迈晨公司;Western Blot 相关试剂购自普利莱基因有限公司;一抗:ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERK1/2、p-ERK1/2、PR、P27、 $\beta$ -actin 购自 Santa Cruz 公司;二抗:Anti-Rabbit IgG/HRP 和 Anti-Goat IgG/HRP 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

TS100 普通倒置显微镜(NIKON);3K15 低温离心机(SIGMA);DYY-6C 电泳仪电源(北京市六一仪器厂);Mini-PROTEAN Tetra Cell 单垂直电泳槽(BIO-RAD);Mini-PROTEAN II 转移电泳槽(BIO-RAD)。

### 1.2 方法

1.2.1 溶液配制 10%分离胶,5%浓缩胶,电泳缓冲液,转膜缓冲液,PBST 封闭缓冲液(现配现用),封闭液,PMSF 储存液。

1.2.2 细胞培养 T47D 细胞的培养条件为含 10%

胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>,相对饱和湿度。取对数生长期细胞,以  $5 \times 10^5$  个/瓶的密度接种于塑料培养瓶中。待细胞贴壁后,换为含受试物 HSYA ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L- $1 \times 10^{-9}$  mol/L)、阳性对照药物( $1 \times 10^{-8}$  mol/L 雌二醇)的培养液继续培养,同时设置空白对照组,48 h 终止培养。SK-BR-3 细胞的培养条件、操作方法同上。

1.2.3 蛋白提取及定量 细胞终止培养,弃培养基。用预冷的 PBS 冲洗两遍,加入 0.25%胰酶进行消化,收集细胞混悬液,1 000 r/min 离心 1 min,小心吸弃上清液,将离心管置于冰上。加入预冷的蛋白裂解液(RIPA:PMSF=100:1),置于冰上,不断混匀。20 min 后转到 1.5 mL 离心管中,4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 15 min。取上清液,保存温度为-20  $^{\circ}$ C。选用 BCA 蛋白定量试剂盒进行检测。

1.2.4 Western Blot 分析蛋白表达 安装实验仪器,在两层玻璃板之间灌胶,下层灌注 10%分离胶约 40 min 后凝固,在上层灌注 5%浓缩胶。蛋白变性后迅速入冰冷却,加入 5 $\times$ Loading buffer 调节样品,再上样。80 V 恒压电泳 1 h,待条带至浓缩胶与分离胶界面时,电压改为 120 V。剪裁 PVDF 膜,60V 恒压湿法转膜 2 h。室温下封闭 1 h。加一抗 1  $\mu$ g/mL,4  $^{\circ}$ C 过夜。次日用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加二抗室温下振摇 1 h。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 发光,暗室曝光,显影定影得 X 光片。扫描 X 光片,用 Quantity One 软件(BIO-RAD)进行灰度分析,以受试药物组的条带与内参  $\beta$ -actin 条带灰度平均值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

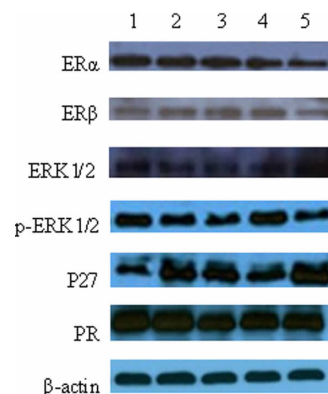
1.2.5 统计学处理 所得实验数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。先对各组数据进行正态性检验及方差齐性检验,结果显示正态性及方差齐性,因此采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HSYA 对 T47D 细胞蛋白表达的影响

与空白对照组相比,雌二醇促进了 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERK1/2、p-ERK1/2 四种蛋白的表达,显著抑制了 P27、PR 两种蛋白的表达,并且 ER $\alpha$ /ER $\beta$  的比值低于空白对照组,表明雌二醇促进 ER $\beta$  的表达更明

显。ERK1/2 与 p-ERK1/2 的比值低于空白对照组,表明雌二醇促其磷酸化活化的作用更显著。HSYA 促进 ER $\alpha$  及 ER $\beta$  蛋白表达,其干预组 ER $\alpha$ /ER $\beta$  的比值高于空白对照组,表明 HSYA 促进 ER $\alpha$  的表达更明显。在 MAPK 信号通路中 ERK1/2 磷酸化进行信号转导。高浓度 (1 $\times$ 10<sup>-7</sup>mol/L)HSYA 显著促进 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的表达,且促进其磷酸化活化。HSYA 作用下抑癌基因 P27 的表达显著低于空白对照组,且浓度高时抑制作用最显著。高浓度 HSYA 促进 PR 表达,低浓度 HSYA 与雌二醇作用相似,显著抑制了 PR 表达( $P<0.01$ )。如图 1,表 1。



注:1.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-7</sup>mol/L);2.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-8</sup>mol/L);3.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-9</sup>mol/L);4.雌二醇 (1 $\times$ 10<sup>-8</sup>mol/L);5.空白对照组。

图 1 T47D 细胞蛋白自显影结果

表 1 T47D 细胞蛋白的相对表达量

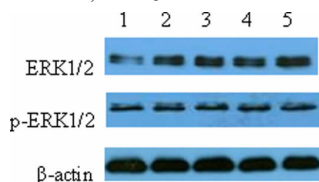
( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	ER $\alpha$	ER $\beta$	ERK1/2	p-ERK1/2	P27	PR
空白对照		0.253 4 $\pm$ 0.006 9	0.199 0 $\pm$ 0.008 1	0.290 2 $\pm$ 0.008 3	0.401 9 $\pm$ 0.024 6	0.851 4 $\pm$ 0.026 9	0.930 4 $\pm$ 0.024 4
雌二醇	1 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	0.289 5 $\pm$ 0.001 1	0.290 4 $\pm$ 0.006 5**	0.416 2 $\pm$ 0.013 9**	0.661 8 $\pm$ 0.012 5**	0.423 8 $\pm$ 0.023 6**	0.806 9 $\pm$ 0.034 5**
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-7</sup>	0.362 3 $\pm$ 0.009 4**	0.260 4 $\pm$ 0.007 9**	0.366 6 $\pm$ 0.000 0**	0.582 4 $\pm$ 0.031 3**	0.350 6 $\pm$ 0.025 8**	1.130 3 $\pm$ 0.009 1**
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	0.349 1 $\pm$ 0.029 5**	0.270 5 $\pm$ 0.004 8**	0.292 7 $\pm$ 0.000 0	0.445 7 $\pm$ 0.014 7*	0.608 4 $\pm$ 0.024 6**	1.229 5 $\pm$ 0.009 2**
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	0.306 2 $\pm$ 0.040 6*	0.217 3 $\pm$ 0.005 9*	0.288 8 $\pm$ 0.010 4	0.389 6 $\pm$ 0.016 0	0.514 4 $\pm$ 0.005 2**	0.756 9 $\pm$ 0.013 8**
<i>F</i> 值		14.85	30.54	27.67	130.1	293.6	291.6
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组相比 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

### 2.2 HSYA 对 SK-BR-3 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,HSYA 各组显著抑制了细胞 ERK1/2 的表达,与雌二醇组作用趋势一致,并且药物浓度高时抑制作用最显著( $P<0.01$ )。但雌二醇和 HSYA 各组均对 p-ERK1/2 蛋白的表达影响不显著( $P>0.05$ )。如图 2,表 2。



注:1.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-7</sup>mol/L);2.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-8</sup>mol/L);3.HSYA (1 $\times$ 10<sup>-9</sup>mol/L);4.雌二醇 (1 $\times$ 10<sup>-8</sup>mol/L);5.空白对照组。

图 2 SK-BR-3 细胞的蛋白自显影结果

表 2 不同浓度的 HSYA 作用于 SK-BR-3 细胞的蛋白的

相对表达量 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	ERK1/2	p-ERK1/2
空白对照		1.072 3 $\pm$ 0.013 6	0.350 4 $\pm$ 0.018 1
雌二醇	1 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	0.900 3 $\pm$ 0.014 8**	0.375 7 $\pm$ 0.008 5
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-7</sup>	0.640 8 $\pm$ 0.038 8**	0.340 5 $\pm$ 0.014 6
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	0.873 8 $\pm$ 0.032 5**	0.350 8 $\pm$ 0.026 1
HSYA	1 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	0.877 2 $\pm$ 0.024 5**	0.357 3 $\pm$ 0.021 1
<i>F</i> 值		198.7	0.770
<i>P</i> 值		0.000	0.557

注:与空白对照组相比 \*\* $P<0.01$ 。

### 3 讨论

HSYA 为红花黄色素中含量最高的单体成分,具有多种药理作用。本实验对其雌激素样效应及可能的机制进行了探究。在含有 ER 的 T47D 细胞中,HSYA 各组与雌二醇组均促进了 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的表达。但对于 ER $\alpha$  与 ER $\beta$  的比值,HSYA 组与雌二醇组作用相反,即 HSYA 对 ER $\alpha$  的诱导作用高于 ER $\beta$ 。

ERK 作为 MAPK 信号通路的核心成员,磷酸化进入细胞核后,调节转录因子,调控细胞增殖、分化和凋亡<sup>[1]</sup>。在 T47D 细胞中,高浓度的 HSYA 与雌二醇显著促进 ERK1/2、p-ERK1/2 的表达,且 p-ERK1/2 与 ERK1/2 的比值高于对照组,即激活了 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路。在 SK-BR-3 细胞中,HSYA 与雌二醇显著抑制了 ERK1/2 的表达,但对 p-ERK1/2 的表达影响不明显,可能的机制是 HSYA 阻断了 ERK 的磷酸化,即阻断了该条信号通路的传导。

P27 为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂的一种,属于抑癌基因,在抑制肿瘤发展、调控肿瘤细胞分化迁移等方面发挥重要作用<sup>[2]</sup>。在细胞内 P27 蛋

白表达减少会增加处于 S 期的细胞比例,使细胞过度增殖。本实验中 HSYA 对 T47D 细胞的 P27 蛋白表达显著低于对照组,与雌二醇促进该乳腺癌细胞增殖的结果一致。

PR 与 ER 同属于核受体超家族,研究发现,正常乳腺上皮细胞中 PR 与 ER 都有表达,因此乳腺组织是 PR、ER 的靶器官。乳腺组织癌变后仍表达 ER、PR 说明乳腺癌细胞具有激素依赖特性<sup>[13]</sup>。本研究中,高浓度的 HSYA 促进 PR 的表达,而低浓度的 HSYA 同雌二醇作用相似,抑制了 PR 的表达。出现这种结果的原因,还有待于进一步研究分析。

以上结果提示 HSYA 可调节 ER $\alpha$ /ER $\beta$  的比值,激活 ERK 信号通路以及通路相关蛋白而发挥作用,但具体的机制及对几种蛋白的相互作用还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate[J]. *Endocr Rev*, 1987, 8(3):338-362.
- [2] Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus [J].*Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968, 59(2):632-638.
- [3] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 5925-5930.
- [4] 杨小虎,王丹丹,朱 彦.羟基红花黄色素 A 的现代研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*,2013,33(3):102-106.
- [5] Jin M, Sun CY, Zhang BX. Hydroxysafflor yellow A attenuate lipopolysaccharide-induced endothelium inflammatory injury [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(1):36-41.
- [6] Sun L, Yang L, Fu Y, et al. Capacity of HSYA to inhibit nitrotyrosine formation induced by focal ischemic brain injury [J]. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*,2013,35:144-151.
- [7] Yang F, Li J, Zhu J, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibits angiogenesis of hepatocellular carcinoma via blocking ERK/MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway in H22 tumor-bearing mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 754: 105-114.
- [8] 陈 梦,赵丕文,臧金凤.羟基红花黄色素 A 的植物雌激素样作用机制[J].*湖北中医药大学学报*,2014,16(6):44-47.
- [9] Rago V, Romeo F, Giordano M, et al. Identification of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in human prostate: expression site of the estrogen receptor in the benign and neoplastic gland [J]. *Andrology*, 2016, 4(1): 121-127.
- [10] Sbert-Roig M, Bauza-Thorbrugge M, Galmes-Pascual BM, et al. GPER mediates the effects of 17 beta-estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function [J]. *Molecular and Cellular endocrinology*, 2016, 420(C):116-124.
- [11] Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions[J]. *Biochem J*, 2000, 351(pt2):289-305.
- [12] Lee CT, Lee YJ, Kwon SY, et al. In vivo imaging of adenovirus transduction and enhanced therapeutic efficacy of combination therapy with conditionally replicating adenovirus and adenovirus-p27[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 372-377.
- [13] Zhou LH, Yin WJ, Lu JS, et al. Clinico-pathological features of ER+/PR+and ER+/PR-breast tumors:a comparative study of 5211 cases[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(39): 2764-2767.

(本文编辑 杨 璞)