

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.004>

白藜芦醇对子宫内膜癌细胞模型雌激素内稳态的影响

王席¹, 丁晓虎¹, 鲁振雯², 丁玺¹, 陈蓉¹

(东台市人民医院 1. 药学科; 2. 内分泌科, 江苏 盐城 224215)

[摘要] 目的: 观察子宫内膜癌细胞雌激素及其代谢产物的变化规律, 考察白藜芦醇对子宫内膜癌雌激素内稳态的影响, 并从雌激素内稳态的角度初步探究其潜在的作用机制。方法: 本实验分为正常子宫内膜细胞对照组(Control组)和白藜芦醇给药组(Res组), 子宫内膜癌细胞模型组(Model组)和模型组给予白藜芦醇治疗组(Model+Res组), RT-PCR检测各肿瘤标志物的mRNA表达; 利用LC-MS/MS法检测子宫内膜细胞内外液中雌激素及其代谢产物的含量变化, 并结合SIMCA 14.0软件对数据进行分析, 寻找疾病差异标志物。结果: Model组Ccnd1和ErbB2 mRNA表达水平较Control组显著升高($P<0.05$)。经SIMCA 14.0软件分析可知, 子宫内膜癌细胞内外液样本中2-甲基雌二醇(2-MeOE2), 2-甲基雌酮(2-MeOE1), 和4-甲基雌酮(4-MeOE1)的浓度水平显著下降($P<0.01$), 4-羟基雌二醇(4-OHE2)含量显著增加($P<0.05$), 在给予Res治疗后, 子宫内膜癌细胞外液中4-MeOE1的含量显著升高($P<0.05$), 子宫内膜癌细胞内液中2-MeOE2和2-MeOE1含量显著升高($P<0.05$), 4-OHE2在子宫内膜癌细胞内外液中的含量均显著降低($P<0.05$)。结论: 子宫内膜癌细胞内外液雌激素代谢产物2-MeOE2含量降低和4-OHE2含量升高, 可能是诱导子宫内膜癌细胞雌激素出现代谢紊乱的原因之一, 白藜芦醇能够逆转这两种代谢产物的相对失衡。

[关键词] 子宫内膜癌; 白藜芦醇; 雌激素

Effect of resveratrol on estrogen homeostasis in mice model of early endometrial cancer

WANG Xi¹, DING Xiaohu¹, LU Zhenwen², DING Xi¹, CHEN Rong¹

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Endocrinology, Dongtai People's Hospital, Yancheng Jiangsu 224215, China)

Abstract **Objective:** To observe the changes of estrogen and its metabolites in endometrial cancer cells, to investigate the effect of resveratrol on estrogen homeostasis in endometrial cancer, and to explore its potential from the perspective of estrogen homeostasis. The mechanism of action. **Methods:** The experiment was divided into normal endometrial cell control group (Control group) and resveratrol administration group (Res group), endometrial cancer cell model group (Model group) and model group given resveratrol treatment group (Model + Res group), RT-PCR was used to detect the mRNA expression of each tumor marker; LC-MS/MS method was used to detect the changes of estrogen and its metabolites in the endometrial cells, and combined with SIMCA 14.0 software. The data was analyzed to find markers of disease differences. **Results:** The mRNA levels of Ccnd1

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-05

通信作者 (Corresponding author): 丁晓虎, Email: xhd333333@sina.com

and Erbb2 were significantly higher in the Model group than those in the Control group ($P < 0.05$). According to SIMCA 14.0 software analysis, the concentration levels of 2-MeOE2, 2-MeOE1 and 4-MeOE1 in the internal and external fluid samples of endometrial cancer cells decreased significantly ($P < 0.01$), and the content of 4-OHE2 increased significantly ($P < 0.05$). After treatment with Res, the content of 4-MeOE1 in the extracellular fluid of endometrial cancer cells was significantly increased ($P < 0.05$), and the contents of 2-MeOE2 and 2-MeOE1 in the endometrial cancer cells were significantly increased ($P < 0.05$), the content of 4-OHE2 in the inner and outer fluid of endometrial cancer cells was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The decrease of 2-MeOE2 and 4-OHE2 in the endometrial cancer cells may be one of the causes of the metabolic disorder of estrogen in endometrial cancer cells. Resveratrol can reverse this. The relative imbalance between the two metabolites.

Keywords endometrial cancer; resveratrol; estrogen

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是最常见的妇科肿瘤之一,是发达国家妇科肿瘤中排名最高的常见癌症^[1],也是全球癌症排名第六的常见肿瘤。近年来,我国EC的发病率也逐年增加,而且发病年龄愈发年轻化^[2],其中年龄 < 40 岁的女性在EC患者中所占比例已达15%^[3]。研究^[4]表明:超生理浓度的雌激素可与雌激素受体结合,介导多种生长因子的过度表达,促进肿瘤细胞的生长和增殖;同时雌激素多种代谢产物则可与DNA形成加合物,诱导基因突变,产生直接的基因毒性。因此,雌激素及其毒性代谢产物的异常蓄积是EC发生发展的重要危险因素。按照雌激素活性物质组分的分子结构,可将雌激素活性物质分为雌激素类、羟基雌激素及甲氧基雌激素。临床试验^[5]表明:生育期EC患者血清中E2水平与正常对照组相比较具有显著差异,同时绝经后EC患者血清中E2水平比正常对照组显著增高。另有研究^[6]发现:EC患者体内羟基雌激素排泄增加,而甲氧基雌激素的含量相比正常人有所降低,这说明雌激素的代谢失衡很大程度上导致了肿瘤的发生。文献^[7]报道:雌激素的羟基代谢产物与EC的发生具有很高的相关性。Newbold等^[8]发现:用一定剂量的羟基雌激素处理大鼠后,取大鼠的子宫内膜组织做病理检查,发现大鼠患EC的概率增加。而相对于其他几种雌激素代谢物,甲氧基雌激素表现出相对的保护作用^[9]。由此可见,雌激素及其毒性代谢产物水平升高是EC的重要危险因素,但目前缺乏对雌激素及其代谢产物的浓度水平变化趋势和调控规律的认识。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种多酚类化合物,具有抗突变、抗氧化抗炎等多种生物学活性^[10]。近年来,Res的抗肿瘤作用受到科学界的广泛重

视。研究^[11]发现:Res对多种妇科肿瘤具有显著的抗癌效应。Res可以抑制DMBA诱导的乳腺癌大鼠肿瘤病灶的生成,减少肿瘤发生率并延长肿瘤潜伏期。在异种移植的乳腺癌裸鼠模型中,Res也显示出良好的抗肿瘤效果^[12]。有文献^[13]报道:Res可以通过诱导迁移前端的细胞自噬来抑制卵巢癌细胞中白细胞介素-6的迁移,继而通过表观遗传机制引发其抗肿瘤作用。在Ishikawa EC细胞的研究^[14]中发现:Res抑制了细胞的生长,并诱导了其细胞的凋亡和自噬。但也有研究^[15]证实:Res可以与雌激素受体结合,发挥类雌激素效应。Res可以抑制成年乳腺癌雌鼠的肿瘤发生。因此,Res对肿瘤的调控作用与实验对象体内雌激素水平密切相关。

本研究以EC细胞为研究对象,考察白藜芦醇对雌激素内稳态的调控及EC的治疗作用,并探讨潜在的调控机制。以期为探寻早期EC临床诊断潜在生物标志物和临床药物治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雌酮(E1),雌二醇(E2),2-甲基雌酮(2-MeOE1),4-甲基雌酮(4-MeOE1),2-甲基雌二醇(2-MeOE2),4-甲基雌二醇(4-MeOE2),2-羟基雌酮(2-OHE1),4-羟基雌酮(4-OHE1),2-羟基雌二醇(2-OHE2)和4-羟基雌二醇(4-OHE2)均购自北京博朗威科技有限公司;d5-雌二醇(d5-E2)购自美国C/D/N同位素有限公司;人EC细胞株(HEC-1B细胞株)购自上海酶研生物科技有限公司。所有其他化学品和溶剂均为分析级。Agilent 1290高效液相色谱仪购自美国安捷伦公司,Agilent 6460三重四级杆质谱仪购自美国安捷伦公司。

1.2 子宫内膜细胞培养

分为正常子宫内膜细胞对照组(Control组)和白藜芦醇给药组(Res组), EC细胞模型组(Model组)和模型组给予白藜芦醇治疗组(Model+Res组), 将细胞在含有5% CO₂的潮湿环境中于37 °C培养。用于实验的所有细胞传代不超过10次。处理前24 h, 用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞两次, 然后在补充有5%活性炭-葡聚糖剥离马血清的无酚红DMEM/F12(50:50)培养基中生长。模型组给予白藜芦醇治疗组是将EC细胞用白藜芦醇(30 μmol/L)处理2 d。白藜芦醇给药组则是将正常子宫内膜细胞用白藜芦醇(30 μmol/L)处理2 d。正常对照组和模型组按照正常细胞培养模式进行。

1.3 RT-PCR法测定子宫内膜细胞中肿瘤标志物的mRNA表达

Ccnd1, Erbb2是与EC密切联系的肿瘤标志物。本实验使用RT-PCR方法检测各肿瘤标志物的mRNA表达水平。使用TRIzol进行细胞RNA提取, 并使用PrimeScript RT试剂盒根据制造商的方案合成cDNA。使用罗氏LightCycler96实时荧光定量PCR仪进行定量反转录PCR分析, 测定mRNA表达。引物序列列于表1。

表1 RT-PCR反应引物及扩增长度

Table 1 RT-PCR reaction primers

基因	引物顺序(5'-3')	
	正向	反向
<i>Ccnd1</i>	GGGTGGGTGGAAATGAAC	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG
<i>ErbB2</i>	GTCGCAACTTCATGTCGGTA	GATCATCATGGAGCTGGC
<i>GAPDH</i>	TTGATGGCAACAATCTCCAC	CGTCCCGTAGACAAAATGGT

2 结果

2.1 EC细胞与肿瘤标志物的表达变化

与Control组相比, 模型组中Ccnd1和Erbb2 mRNA表达显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 且给予Res治疗后, Ccnd1和Erbb2 mRNA表达显著降低($P < 0.01$, 图1)。

2.2 子宫内膜细胞内外液雌激素及其代谢产物的变化

Control组和Model组在细胞外液和细胞内液

1.4 子宫内膜细胞内液、外液雌激素及其代谢产物的含量测定

取细胞内液/外液各500 μL, 分别加入10 μL d5-E2溶液(50 nmol/L)作为内标, 涡旋1 min后, 加入1.5 mL乙酸乙酯, 涡旋10 min, 于4 °C以13 000 r/min离心5 min, 收集上层有机相, 有机相于40 °C真空冷冻干燥机旋转干燥后, 精密加入0.1 mol/L的Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液(pH=9.0)50 μL和1 g/L的丹磺酰氯丙酮溶液50 μL, 充分涡旋混合1 min, 65 °C烘箱加热反应7 min, 放冷后于4 °C以13 000 r/min离心15 min, 转移上清液入进样瓶中, 用LC-MS/MS法测定样本中雌激素及其代谢产物共11种目标分析物的含量, 定量方法采用加内标的标准工作曲线法。

1.5 统计学处理

采用SPSS 23.0软件进行数据分析。数据均数±标准误(mean ± SEM)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 数据符合方差齐性的采用LSD检验, 不符合方差齐性则采用Dunnett's T3检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用SIMCA 14.0软件, 主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析法(orthogonal partial least squares to latent structure-discriminant analysis, OPLS-DA)模式及t检验判别分析用于寻找潜在生物标志物。

中均能得到很好的分离, Model组和Model+Res组也分离良好, 且Res组和Model+Res组在一个区域(图2)。

将Control组与Model组细胞样本和子宫组织样本数据进行OPLS-DA分析(图3), 并根据VIP>1初步筛选出对两组间区分贡献较大的代谢物(图4), t检验分析发现: EC细胞外液中的潜在生物标志物有2-MeOE2, 4-MeOE1和4-OHE2, EC细胞内液中的潜在生物标志物为2-MeOE2, 2-MeOE1和4-OHE2。

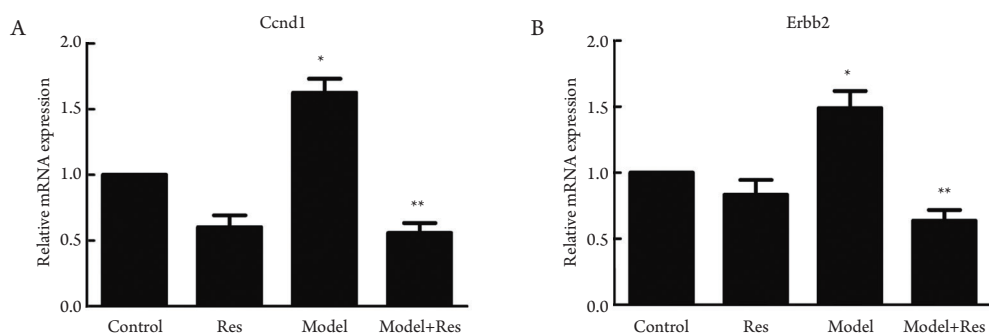


图1 细胞肿瘤标志物(A)Ccnd1和(B)Erbb2 mRNA表达水平变化

Figure 1 Changes in (A) Ccnd1 and (B) Erbb2 mRNA expression levels of cell tumor markers

Mean \pm SEM, $n=10$ 。与Control组比较, * $P<0.05$; 与Model组比较, ** $P<0.01$ 。

Mean \pm SEM, $n=10$. Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, ** $P<0.01$.

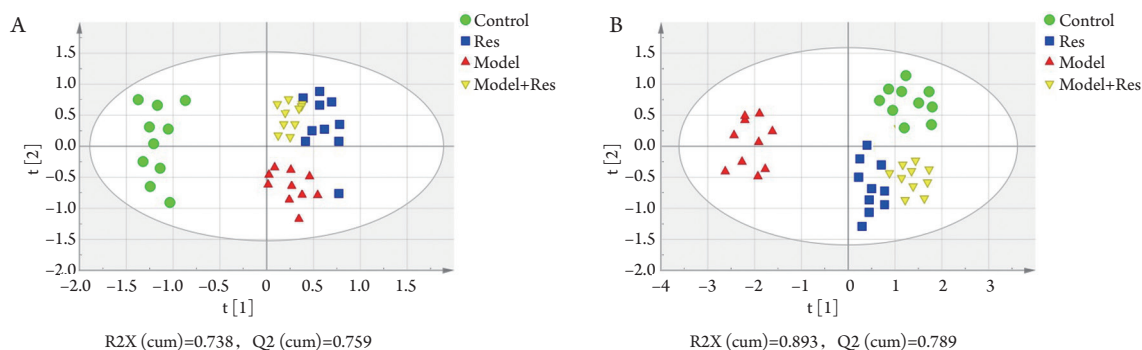


图2 细胞内液(A)和细胞外液(B)的PCA分析Scores图

Figure 2 Scores of PCA analysis of extracellular fluid (A) and intracellular fluid (B) samples

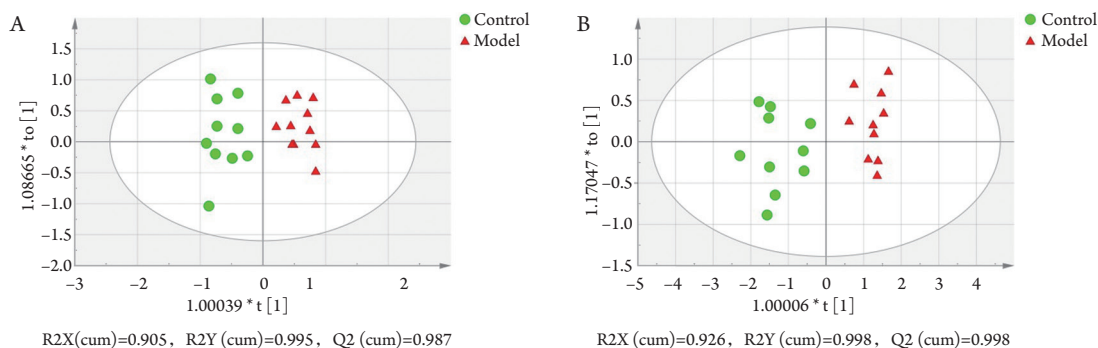


图3 细胞外液(A)和细胞内液(B)样本Control组与Model组的OPLS-DA分析Scores图

Figure 3 Scores of OPLS-DA analysis of Control group and Model group of extracellular fluid (A) and intracellular fluid (B) sample

2.3 白藜芦醇对 EC 的抑制作用

EC细胞外液内具有细胞保护效应的甲氧基雌激素含量显著降低, 具有基因毒性作用的4-OHE2

含量显著升高, 而给予Res治疗后, 其含量具有相应的升高和降低趋势, 且在EC细胞外液体内4-OHE2在Model+Res组显著降低(图5, 6)。

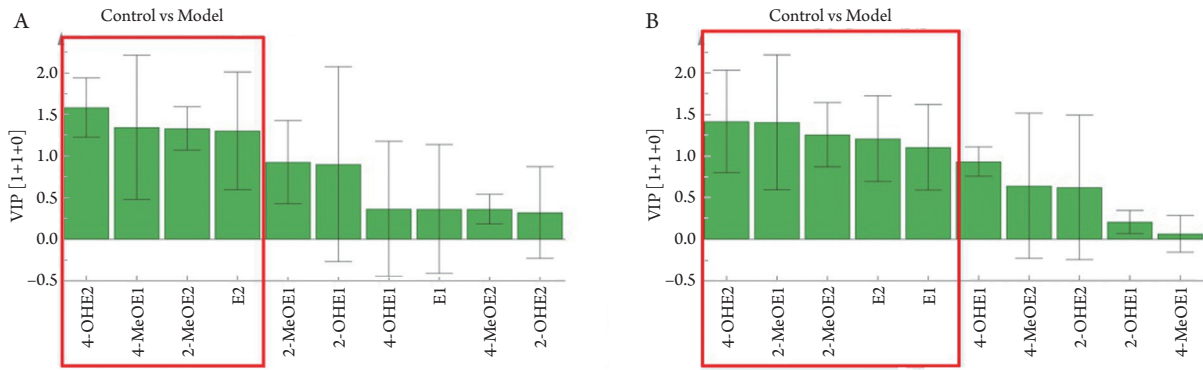


图4细胞外液(A)与细胞内液(B)样本Control组与Model组VIP图

Figure 4 VIP map of Control group and Model group of extracellular fluid (A) and intracellular fluid (B) sample

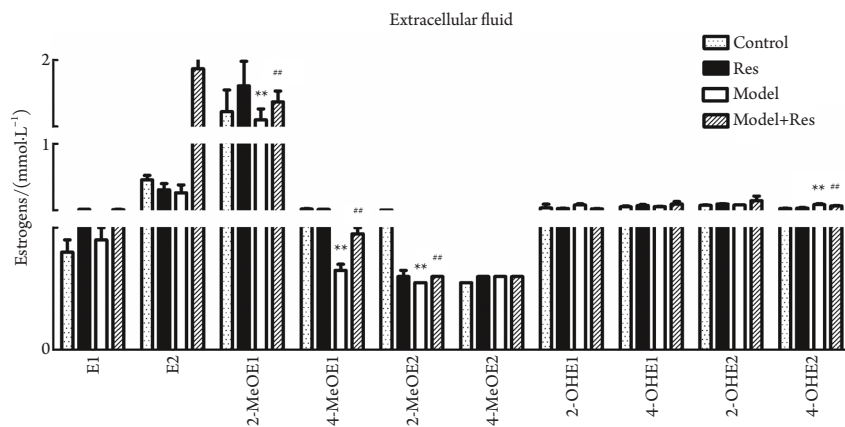


图5 细胞外液中10种目标分析物的含量

Figure 5 Content of 10 target analytes in the extracellular fluid

Mean ± SEM, n=10。与Control组比较, **P<0.01; 与Model组比较, **P<0.01。

Mean ± SEM, n=10. Compared with the Control group, **P<0.01; compared with the Model group, **P<0.01.

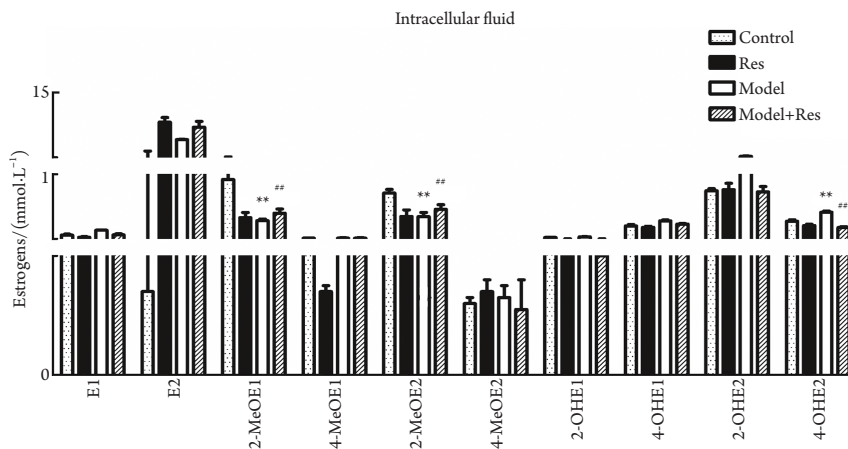


图6 细胞内液10种目标分析物的含量

Figure 6 Content of 10 target analytes in intracellular fluid

Mean ± SEM, n=10。与Control组比较, **P<0.01; 与Model组比较, **P<0.01。

Mean ± SEM, n=10. Compared with the Control group, **P<0.01; compared with the Model group, **P<0.01.

3 讨论

EC是最常见的妇科恶性肿瘤之一,同时它的发病率亦逐年升高,目前仅次于宫颈癌,居女性生殖系统恶性肿瘤的第二位^[1]。毫无疑问,EC若能尽早被发现并加以控制,病情将得到改善或逆转。但事实上EC的早期临床诊断尚缺乏金标准。目前临床上对EC的诊断方法主要还是通过诊断性刮宫及分段诊刮^[16]。但是,诊刮不能判断是否有肌层的浸润及浸润的深度,是否有淋巴结转移情况,故无法进行术前准确分期,不能达到早期、准确诊断EC的要求。因此,寻找有预测价值的EC生物标志物具有极其重要的临床意义。研究^[7]表明:雌激素代谢紊乱与妇科肿瘤疾病密切相关。雌激素类物质可在体内多种代谢酶的介导下进行动态的生物转化,而雌激素及其毒性代谢产物组成的活性物质组则根据其结构的不同、浓度水平的差异,以不同的分子机制在EC的发生发展过程中发挥重要作用。内源性雌激素主要包括E1, E2和E3,由于体内E3的含量极低,故雌激素的代谢研究主要还是考察E1和E2的代谢情况。雌激素的代谢方式包括氧化代谢与结合代谢两种。氧化代谢主要为羟基化过程,主要产物为4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1, 2-OHE1和16 α -OHE1。雌激素的代谢紊乱被认为与妇科肿瘤相关是因为有证据表明其可以引起DNA损伤和突变,其中雌激素的羟基化代谢起主要作用。研究^[17]发现4-OHE2在氧化过程中产生的活性氧会导致DNA损伤和细胞死亡。活性氧自由基参与脂质过氧化反应,在此反应中产生的脂质过氧化物是4-OHE2代谢的协同因子,与DNA加合,导致DNA的损伤,促进肿瘤细胞的增殖和分化进而诱发肿瘤形成。雌激素的另一类代谢产物是由羟基化代谢产物被COMT甲基化生成的甲氧基雌激素(2-MeOE2, 4-MeOE2, 2-MeOE1, 4-MeOE1)。研究^[18]发现:当COMT在EC细胞中过量表达时,甲氧基雌激素的含量增加,可进一步抑制EC细胞的生长。

白藜芦醇因其具有抗癌、抗心血管疾病、抗突变、抗炎、抗氧化、诱导细胞凋亡及雌激素调节的作用而受到生物医学界的重视。Res作用于在肿瘤的起始、促进、发展3个阶段:1)通过抗氧化、抗突变、诱导二相药代酶的作用发挥抗肿瘤起始活性^[19];2)通过抗炎、抑制环加氧酶和氢过氧化物酶的活性在肿瘤的促进阶段起抑制作用^[20];3)诱导人早幼粒白血病细胞的分化而抑制肿瘤的发展^[21]。本研究中,Model+Res组给予Res治疗后,

肿瘤标志物的表达显著降低,表明Res对EC产生了一定的抑制作用。EC细胞具有保护作用的代谢产物2-MeOE2, 2-MeOE1和4-MeOE1的浓度水平显著下降,同时其具有毒性作用的代谢产物4-OHE2的含量显著增加,在给予Res治疗后,对应的代谢产物的浓度水平也发生了相应的逆转,这再次表明Res抑制了EC的发生发展。此外,在EC细胞内,2-MeOE2和4-OHE2的浓度水平在细胞内外液中具有相似的变化趋势,表明2-MeOE2和4-OHE2有可能作为EC临床诊断的无创性生物标志物。同时白藜芦醇能够逆转这两种代谢产物的相对失衡。因此临床上可以采用检测患者的雌激素及其代谢产物浓度水平,早期诊断EC,减少患者的痛苦,提高患者的生存率。

由于本实验条件所限,仅进行了体外实验研究,未能开展大规模临床试验,由于体外和体内研究可能存在不同可能,因此本组计划在多中心大样本收集EC患者的血清和组织样本,进一步验证白藜芦醇对EC的抑制作用和2-MeOE2和4-OHE2是否可以作为EC临床诊断的无创性生物学标志物。

参考文献

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236.
2. Hall C, Stone RL, Gehlot A, et al. Use of metformin in obese women with type I endometrial cancer is associated with a reduced incidence of cancer recurrence[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(2): 313-317.
3. Smith RA, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2015: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 30-54.
4. Busch EL, Crous-Bou M, Prescott J, et al. Endometrial cancer risk factors, hormone receptors, and mortality prediction[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017, 26(5): 727-735.
5. Chuffa LG, Lupi-Júnior LA, Costa AB, et al. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers[J]. *Steroids*, 2017, 11(8): 93-108.
6. Zhao H, Jiang Y, Liu Y, et al. Endogenous estrogen metabolites as biomarkers for endometrial cancer via a novel method of liquid chromatography-mass spectrometry with hollow fiber liquid-phase microextraction[J]. *Horm Metab Res*, 2014, 47(2): 158-164.
7. Saeed M, Higginbotham S, Gaikwad N, et al. Depurinating naphthalene-DNA adducts in mouse skin related to cancer

- initiation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(7): 1075-1081.
8. Newbold RR, Liehr JG. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 235-237.
 9. Borriello A, Bencivenga D, Caldarelli I, et al. Resveratrol: from basic studies to bedside[J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 159(159): 167-184.
 10. Chin YT, Hsieh MT, Yang SH, et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12891-12907.
 11. Kim TH, Shin YJ, Won AJ, et al. Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1): 615-625.
 12. Ferraresi A, Phadngam S, Morani F, et al. Resveratrol inhibits IL-6-induced ovarian cancer cell migration through epigenetic up-regulation of autophagy[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(3): 1164-1181.
 13. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, et al. Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2560-2566.
 14. Horn-Ross PL. Phytoestrogens, body composition, and breast cancer[J]. *Cancer Causes Control*, 1995, 6(6): 567-573.
 15. Sato M, Pei RJ, Yuri T, et al. Prepubertal resveratrol exposure accelerates N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats[J]. *Cancer Lett*, 2003, 202(2): 137-145.
 16. Dovník A, Crnobrnja B, Zegura B, et al. Incidence of positive peritoneal cytology in patients with endometrial carcinoma after hysteroscopy vs. dilatation and curettage[J]. *Radiol Oncol*, 2017, 51(1): 88-93.
 17. Li Y, Yao JQ, Chang MS, et al. Equine catechol estrogen 4-hydroxyequilenin is a more potent inhibitor of the variant form of catechol-O-methyltransferase[J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(4): 512-520.
 18. Salama SA, Kamel M, Awad M, et al. Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in human endometrial glandular cells: protective effect of catechol-O-methyltransferase[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(6): 1246-1254.
 19. Mikstacka R, Rimando AM, Dutkiewicz Z, et al. Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1[J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(17): 5117-5126.
 20. Kang YF, Qiao HX, Xin LZ, et al. Chain elongation analog of resveratrol as potent cancer chemoprevention agent[J]. *J Physiol Biochem*, 2016, 72(3): 445-452.
 21. Peng DY, Song H, Liu LB. Resveratrol-downregulated phosphorylated liver kinase B1 is involved in senescence of acute myeloid leukemia stem cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(4): 485-489.

本文引用: 王席, 丁晓虎, 鲁振雯, 丁玺, 陈蓉. 白藜芦醇对子宫内膜癌细胞模型雌激素内稳态的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(7): 1405-1411. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.004

Cite this article as: WANG Xi, DING Xiaohu, LU Zhenwen, DING Xi, CHEN Rong. Effect of resveratrol on estrogen homeostasis in mice model of early endometrial cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(7): 1405-1411. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.004