文章编号:1000-5404(2005)11-1065-03

论著

Genistein 对乳腺癌异种移植瘤的抑制作用及其与 uPA 表达变化的关系

余小平,糜漫天,朱俊东 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨三羟异黄酮(genistein)对原癌基因 HER-2/neu 高表达乳腺癌异种移植瘤的抑制作用及其与尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)表达变化的关系。**方法** 应用基因转染技术建立 HER-2/neu 高表达的乳腺癌 MCF-7 细胞(MCF-7/HER-2)。BALB/c 裸鼠皮下接种 MCF-7 和 MCF-7/HER-2 细胞,其中接种 MCF-7/HER-2 细胞的裸鼠随机分为 3 组:对照组、genistein 处理组、HER-2/neu 抗体处理组。应用免疫组化法观察移植瘤细胞生长能力,应用 Western blot 法观察移植瘤 uPA 的表达变化。**结果** MCF-7/HER-2 移植瘤与 MCF-7 移植瘤相比细胞增殖能力较强且 uPA 表达增加,而 MCF-7/HER-2 移植瘤经 genistein 和 HER-2/neu 抗体处理后,移植瘤细胞增殖能力减弱,其 uPA 表达降低。**结论** Genistein 能有效抑制 HER-2/neu 高表达乳腺癌异种移植瘤细胞的增殖能力,且这种作用与 uPA 的表达有关。

关键词: 尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂;三羟异黄酮;乳腺癌
中图法分类号: R282.71; R730.23; R737.9 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of genistein on HER-2/neu-overexpressing breast cancer xenograft tumors and its relationship with uPA expression

YU Xiao-ping, MI Man-tian, ZHU Jun-dong (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of genistein on oncogene HER-2/neu-overexpressing breast cancer xenograft tumors and its relationship with urokinase type plasminogen activator (uPA) expression. **Methods** HER-2/neu-overexpressing MCF-7 human breast cancer cells (MCF-7/HER-2) were generated by transfecting the HER-2/neu negative MCF-7 cells with HER-2/neu cDNA. MCF-7/HER-2 and MCF-7 xenograft models were established in BALB/c nude mice, and the nude mice with MCF-7/HER-2 xenograft were randomly divided into three groups: control group, genistein-treated group, and HER-2/neu antibody-treated group. The growth ability of xenograft tumors was analyzed by immunohistochemical staining with Ki-67 antibody, and uPA expression of xenograft tumors was analyzed by Western blotting. **Results** The growth ability and uPA expression were significantly higher in MCF-7/HER-2 xenograft tumors than those in MCF-7 xenograft tumors. MCF-7/HER-2 xenograft tumors treated by genistein or HER-2/neu antibody showed lower growth ability and uPA expression as compared with MCF-7/HER-2 xenograft tumors. **Conclusion** Genistein can inhibit the growth ability of HER-2/neu-overexpressing breast cancer xenograft tumors, which is associated with the uPA expression.

Key words: urokinase type plasminogen activator; genistein; breast cancer

目前认为肿瘤的抗血管生成疗法-联合放疗、化疗成为肿瘤治疗的新模式[1,2]。临床研究表明原癌基因 HER-2/neu 高表达乳腺癌生长速度快,瘤内血管形成能力强,易发生转移,预后较差[3]。已有研究表明,乳腺癌组织微血管密度与尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)的表达呈正相关,提示 uPA 可能是影响乳腺癌血管形成能力的重要因素[4,5]。三羟异黄酮(genistein,又称染料木黄酮或金雀异黄素)是大豆中的一种重要非营养素成分,具有较强抗癌效应[6]。我们实验室先前利用裸鼠异种移植瘤动物模型研究发现 genistein 在体内能有效抑制 HER-2/neu 高表达乳腺癌细胞移植瘤血管生成[7]。本实验探讨 genistein 抑制原癌基因 HER-2/neu 高表达乳腺癌异种移植瘤的作用及其与 uPA 表达变化的关系,为临床应用 genistein 辅助治疗乳腺癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3 ~ 4 周龄体质量 10 ~ 15 g 健康雌性

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30000136)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000136)
作者简介: 余小平(1970 -),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68753585, E-mail: yuxiaoping2005@sina.com
收稿日期: 2004-02-22; **修回日期:** 2004-06-20

BALB/c 裸小鼠 20 只，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 MCF-7 细胞株的来源与培养 MCF-7 细胞由上海中科院细胞生物研究所提供，培养在含 10% 小牛血清 DMEM 完全培养基中。

1.1.3 主要试剂 Genistein 购于 Sigma 公司，DMEM 和小牛血清购于 Gibco 公司，鼠抗人 HER-2/neu、Ki-67 单克隆抗体购于 Zymed 公司，鼠抗人 uPA 单克隆抗体购于 DAKO 公司，S-P-9002、S-P-9003 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司，脂质体转染试剂盒购于 Roche 公司，G418 购于 Sigma 公司。

1.1.4 质粒 含人 HER-2/neu 基因的质粒 pCMV/ERBB2 由美国 Anderson 癌症研究中心的 Ming Tan 教授惠赠；含新霉素抗性基因的质粒 pCI^{neo} 由本室杨志祥博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 质粒转染 pCMV/ERBB2 质粒扩增、酶切鉴定并测试浓度后与 pCI^{neo} 质粒进行共转染 MCF-7 乳腺癌细胞，转染步骤参照脂质体转染试剂盒说明书。以 400 μg/ml G418 初筛 MCF-7 细胞，对照组细胞完全死亡后，以 200 μg/ml G418 维持筛选，最后按常规免疫细胞化学法鉴定转染是否成功。转染 pCMV/ERBB2 质粒的 MCF-7 细胞命名为 MCF-7/HER-2。

1.2.2 裸鼠异种移植 取对数生长期 MCF-7、MCF-7/HER-2 两种细胞，0.25% 胰酶消化后，PBS 洗 2 遍，离心，无血清的 DMEM 培养基重悬细胞，调整其浓度为 1×10^7/ml，每只 BALB/c 裸小鼠用 1 ml 注射器接种 200 μl 细胞悬液于背部右前侧。待移植瘤直径达 8～10 mm 时，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤鼠分为：对照组、genistein 处理组、HER-2/neu 抗体处理组。HER-2/neu 抗体剂量为 1 mg/kg，genistein 处理剂量为 100 mg/kg，隔日 1 次，肿瘤周边皮下注射，药物作用 2 周后，活杀动物，剥离瘤块。

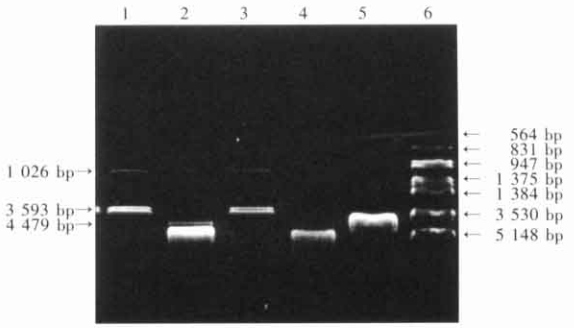
1.2.3 移植瘤组织肿瘤细胞生长能力检测 常规免疫组织化学方法检测肿瘤细胞核抗原 Ki-67 的表达。移植瘤组织石蜡切片梯度乙醇脱蜡水化，3% H_2O_2 孵育 5～10 min，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min，0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原 20 min，100 μl 正常山羊血清封闭液封闭 10 min，弃去封闭液，加 100 μl 1∶100 稀释鼠抗人单克隆 Ki-67 抗体（阴性对照用 PBS 代替），37 ℃，2 h，PBS 漂洗，3 min×3 次；加 100 μl S-P-9002 试剂盒中的二抗工作液，37 ℃，10 min，PBS 漂洗，3 min×3 次；加 100 μl S-P-9002 试剂盒中的三抗工作液，37 ℃，10 min，PBS 漂洗，3 min×3 次；3，3′二氨基联苯胺（DAB）显色（6 mg DAB，10 μl TBS，10 μl 30% H_2O_2）5～10 min，自来水冲洗，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，封片，显微镜下观察并照相。

1.2.4 Western blot 法检测移植瘤组织 uPA 的表达变化 提取移植瘤组织总蛋白，采用 Brodford 法测含量后取 20 μg 蛋白稀释至 20 μl，加入 20 μl 2×SDS 凝胶加样缓冲液，100 ℃煮沸 5～10 min 变性后，上样进行凝胶电泳，电泳溴酚蓝距离底线 1 cm 左右。取下凝胶，按“三明治”夹心法进行转膜，80 mA 转移 18～20 h。转移完毕后，按以下步骤进行显色：含 1% BSA 的 PBST 封闭 1 h→1∶400 稀释 uPA 单抗，4 ℃过夜→PBST 漂洗，10 min×3 次→1∶40 稀释生物素化二抗工作液，室温振摇 1 h→PBST 漂洗，10 min×3 次→1∶40 稀释 HRP 标记的链酶卵白素三抗工作液，室温振摇 1 h→PBST 漂洗，10 min×3 次→DAB 显色→自来水冲洗→照相。

2 结果

2.1 pCMV/ERBB2 质粒酶切鉴定及细胞转染

pCMV/ERBB2 质粒全长 9 130 bp，含有多个限制性内切酶位点，其中包括两个 *Hin*dⅢ 和一个 *Xho* Ⅰ 内切酶的酶切位点，用限制性内切酶 *Xho* Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 酶切 pCMV/ERBB2 质粒后，电泳所得 3 个 DNA 片段为 4 479 bp（含 erbB-2/neu 片段）、3 593 bp（含 CMV 启动子）和 1 026 bp，符合理论计算值（图 1）。pCMV/ERBB2 质粒与含新霉素抗性基因的空载体 pCI^{neo} 质粒进行共转染 MCF-7 乳腺癌细胞，常规免疫细胞化学法鉴定结果提示已成功地将 pCMV/ERBB2 质粒和 pCI^{neo} 质粒共转入了 MCF-7 乳腺癌细胞（命名为 MCF-7/HER-2 细胞）。



1: pCMV/ERBB2 plasmid digested with restrictive endonuclease; 2: pCMV/ERBB2 plasmid; 3: pCMV/ERBB2 plasmid digested with restrictive endonucleases; 4: pCMV/ERBB2 plasmid; 5: pCI^{neo} plasmid; 6: Marker

图 1 pCMV/ERBB2 质粒酶切图谱

Fig 1 Restrictive endonuclease map of pCMV/ERBB2 plasmid

2.2 移植瘤形态观察

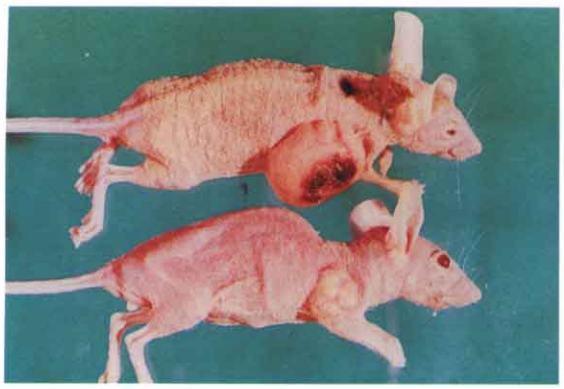
MCF-7 和 MCF-7/HER-2 细胞皮下植入 BALB/c 裸鼠前背侧 5 d 后，肉眼能观察到肿瘤小块，植入 5～21 d，瘤块生长缓慢，在第 21～35 天瘤块生长较快，35 d 后肿瘤生长又变缓慢，且 MCF-7/HER-2 细胞移植瘤组肿瘤常侵犯皮肤，出现溃疡性坏死，并见“癌脐”（图 2）。

2.3 移植瘤细胞生长能力检测

MCF-7 细胞移植瘤组 Ki-67 抗体染色后细胞阳性率较低，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤组经染色后阳性率较高，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤经 HER-2/neu 抗体和 genistein 处理 Ki-67 抗体染色后细胞阳性率也较低，表明 MCF-7 细胞移植瘤增殖能力较弱，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤增殖能力较强，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤经 HER-2/neu 抗体和 genistein 处理后细胞增殖能力减弱。

2.4 移植瘤组织 uPA 的表达变化

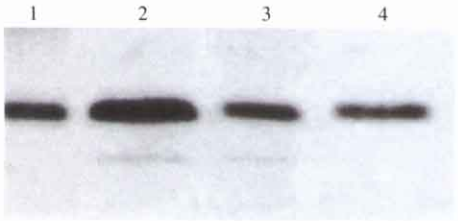
应用 Western blot 法检测移植瘤组织 uPA 的表达结果见图 3，MCF-7 细胞移植瘤组 uPA 的表达较低，而 MCF-7/HER-2 细胞移植瘤组表达最高，MCF-7/HER-2 细胞移植瘤经 HER-2/neu 抗体和 genistein 处理后移植瘤内 uPA 的表达降低。



Up: MCF-7/HER-2 cell xenograft tumor; Down: MCF-7/HER-2 cell xenograft tumor treated with genistein

图 2　BALB/c 裸鼠 MCF-7/HER-2 细胞异种移植瘤

Fig 2　MCF-7/HER-2 cell xenograft tumor in BALB/c nude mice



1: MCF-7; 2: MCF-7/HER-2; 3: MCF-7/HE; 4: MCF-7/HER-2 treated by genistein treated by HER-2/neu antibody

图 3　uPA Western blot 检测结果

Fig 3　Western blotting results of uPA

3　讨论

MCF-7 细胞株是人源性乳腺癌细胞株，有研究表明 MCF-7 细胞移植瘤能保持人乳腺癌细胞的病理学特征及生物学特性[8]。本实验将 2×10^6 个 MCF-7、MCF-7/HER-2 细胞分别移植入 BALB/c 裸鼠后，移植瘤成功率达到 100%(20/20)，镜下观察移植瘤组织切片发现 MCF-7 细胞移植瘤乳腺癌细胞的形态没有发生改变，提示本实验建立的人乳腺癌细胞动物模型是成功的。

人 erbB-2/neu 基因表达产物为分子量 185×10^3 的单链跨膜糖蛋白(HER-2/neu)，其细胞内段的活性结构域具有酪氨酸激酶活性。有研究表明 HER-2/neu 高表达乳腺癌恶性程度高，肿瘤内新生血管形成能力强，肿瘤生长速度快，易发生转移，预后较差[3]。本实验结果提示 erbB-2/neu 基因产物能促进乳腺癌细胞的增殖，增加 uPA 表达。

血管内皮细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)间的相互作用是血管生成过程中的一个重要环节，由连接 ECM 和内皮细胞骨架的膜蛋白以及胞外蛋白水解酶及其抑制剂所介导。胞外蛋白水解酶(尿激酶型纤溶酶原激活物，uPA)能降解 ECM 成分，从而破坏基底膜屏障，促进肿瘤血管生成[4,5]。本实验观察到 MCF-7/HER-2 细胞移植瘤生长能力较强，uPA 的表达较高，而 MCF-7 细胞移植瘤生长能力较弱，uPA 的表达较低。

三羟异黄酮(genistein)是存在于大豆及其制品中的一种非营养成分，能有效抑制酪氨酸激酶的活性，已有资料显示 genistein 具有较强的抗癌作用，其抗癌机制较多，至今仍未完全阐明[9~13]。本实验以 HER-2/neu 高表达的乳腺癌细胞 MCF-7/HER-2 裸鼠异种移植瘤为研究对象，结果表明 MCF-7/HER-2 细胞移植瘤经 genistein 和 HER-2/neu 抗体处理 2 周后与未处理组相比，移植瘤细胞增殖能力下降，且 uPA 的表达也降低，结果表明 genistein 能有效抑制 HER-2/neu 高表达乳腺癌肿瘤的增殖能力，且这种作用与 uPA 的表达有关。

参考文献：

[1] Kerbel R S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future[J]. Carcinogenesis, 2001, 21(3): 505 - 515.

[2] Folkman J. Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4 Suppl 1): S127 - 133.

[3] Klapper L N, Glathe S, Vaisman N, *et al*. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(9): 4995 - 5000.

[4] Garbett E A, Reed M W, Stephenson T J, *et al*. Proteolysis in human breast cancer[J]. Mol Pathol, 2000, 53(2): 99 - 106.

[5] Kruger A, Soeltl R, Lutz V, *et al*. Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87)[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 292 - 299.

[6] Castle E P, Thrasher J B. The role of soy phytoestrogens in prostate cancer [J]. Urol Clin North Am, 2002, 29(1): 71 - 81.

[7] 余小平，糜漫天，朱俊东. 三羟异黄酮对乳腺癌异种移植瘤血管生成影响[J]. 中国公共卫生，2003，19(10)：1168 - 1170.

[8] 甄林林，武正炎，范　萍，等. 人乳腺癌裸鼠移植模型的建立[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2001，21(6)：509 - 510.

[9] Zhou J R, Mukherjee P, Gugger E T, *et al*. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones *via* alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5231 - 5238.

[10] Zhou J R, Gugger E T, Tanaka T, *et al*. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice[J]. J Nutr, 1999, 129(9): 1628 - 1635.

[11] Lopez-Lazaro M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study[J]. Curr Med Chem Anti Canc Agents, 2002, 2(6): 691 - 714.

[12] Suthar A C, Banavalikar M M, Biyani M K. Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (Glycine max): part I--anti-cancer activity[J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39(6): 511 - 519.

[13] Arliss R M, Biermann C A. Do soy isoflavones lower cholesterol, inhibit atherosclerosis, and play a role in cancer prevention[J]? Holist Nurs Pract, 2002, 16(5): 40 - 48.

(编辑　龙　亮)