论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0710-04

三羟异黄酮与化疗药物联合作用对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 增殖的影响

张 红,朱俊东,糜漫天,郎海滨,彭俊华 (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 观察三羟异黄酮(genistein, GEN)与紫杉醇(paclitaxel, PTX)或阿霉素(doxorubicin, DOX)联合作用对体外培养的 HER2/neu 高表达人乳腺癌细胞株 MDA-MB -453 增殖的作用,探讨三羟异黄酮和化疗药物的联合抗癌效应。**方法** GEN 和化疗药物 PTX、DOX 单独或联合处理体外培养的人乳腺癌细胞 MDA-MB-453,MTT 法测定细胞增殖抑制率并用联合用药公式分析合并效应,流式细胞仪分析细胞周期,形态学观察和 Annexin-V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡。**结果** GEN、PTX、DOX 单独作用于乳腺癌 MDA-MB-453 细胞,均可抑制细胞增殖,引起细胞周期阻滞,并诱导细胞凋亡。10、20 μmol/L 的 GEN 与 DOX 联合作用时,q 值在 0.85 ~ 1.15 之间,二者的联合效应为相加效应;40 μmol/L 的 GEN 与 DOX 联合作用时,$q > 1.15$,二者的联合效应为协同效应;而各剂量的 GEN 与 PTX 联合作用时,$q < 0.85$,二者的联合效应为拮抗作用。GEN (40 μmol/L)可增强 DOX 诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡的作用,而削弱 PTX 诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡的作用。**结论** GEN 能增加或协同 DOX 对 MDA-MB-453 细胞的抑制增殖作用,而拮抗 PTX 的抑制增殖作用。

关键词:三羟异黄酮;人乳腺癌细胞 MDA-MB-453;增殖;细胞凋亡;细胞周期

中图法分类号:R73-361;R737.9;R979.1 **文献标识码**:A

Effects of genistein and chemotherapeutic agents on proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-453

ZHANG Hong, ZHU Jun-dong, MI Man-tian, LANG Hai-bin, PENG Jun-hua (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the combined effects of genistein and chemotherapeutic agents on the growth of breast cancer cell MDA-MB-453 *in vitro*. **Methods** HER-2/neu-overexpressing MDA-MB-453 breast cancer cells were treated by genistein or doxorubicin or paclitaxel alone, or genistein and doxorubicin, or genistein and paclitaxel *in vitro*. Cell proliferation was measured by MTT assay. Distribution of cell cycle was determined by flow cytometry. Cell apoptosis was observed by light microcopy and flow cytometry with Annexin-V-FITC/PI dual labelling. The combined effect of two drugs was evaluated by q value, less than 0.85, in the range of 0.85 and 1.15, more than 1.15, which respectively meant that the combined effect of the drugs is antagonistic, additive and synergistic. **Results** Genistein, doxorubicin, paclitaxel alone inhibited the proliferation, blocked the cell cycle and induced apoptosis of human breast cancer cell MDA-MB-453 line *in vitro*. The inhibitory rate (IR) of genistein (10, 20 μmol/L) combined with doxorubicin was higher than that of the drug used alone, and q value was between 0.85 and 1.15, suggesting the combined effect is additive; IR of genistein (40 μmol/L) combined with doxorubicin was higher than that of the drug used alone, and q value was more than 1.15, suggesting the combined effect is synergetic; IR of genistein combined with paclitaxel was lower than that of the drug used alone, which meant the combined effect is antagonistic. Genistein (40 μmol/L) promoted apoptosis induced by doxorubicin, but attenuated apoptosis induced by paclitaxel in MDA-MB-453 cells. **Conclusion** The effect of genistein combined with doxorubicin is additive or synergetic on the growth of MDA-MB-453, whereas it is antagonistic when combined with paclitaxel.

Key words: genistein; human breast cancer cell line MDA-MB-453; proliferation; cell apoptosis; cell cycle

乳腺癌目前已经成为第1位威胁女性健康的恶性肿瘤,其中原癌基因 HER2/neu 过度表达类型约占30%。此类乳腺癌对传统化疗药物存在明显耐药,常导致化疗失败[1]。HER2/neu 编码的蛋白为跨膜增殖因子受体家族成员,具有内在的酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性,Knuefermann 等[2]研究发现 HER2/neu

作者简介:张 红(1972-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291

通讯作者:朱俊东,电话:(023)68775351

收稿日期:2005-04-22;修回日期:2005-09-18

高表达乳腺癌的化疗抗性与 HER2/neu PTK 激活介导的信号转导通路有关。近年来,大量流行病学、体内外实验研究证实,三羟异黄酮(GEN)作为大豆中的一种主要异黄酮成分,对降低乳腺癌发病率有明显效果,是一种潜在的乳腺癌防治药物[3,4]。GEN 具有抑制 PTK 活性的作用,它能否增强 HER2/neu 高表达乳腺癌化疗的敏感性尚不清楚。本研究通过体外研究 GEN 分别和两种作用机制不同的常用乳腺癌化疗药物紫杉醇(PTX,作用于微管蛋白)、阿霉素(DOX,作用于 DNA)联合应用对 HER2/neu 过度表达乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖的作用,以了解 GEN 在 HER2/neu 高表达乳腺癌化疗中的潜在应用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

MDA-MB-453 细胞(人乳腺癌细胞株,ER^-,HER-2/neu 高表达)由中科院上海细胞所提供。GEN 、PTX、DOX 购自 Sigma 公司,用二甲基亚砜(DMSO)分别配制成浓度为 40、0.1、0.5 mmol/L的储备液,然后用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。DMSO 在各组培养液中的终浓度均为 0.5 %。

MTT 为 Sigma 公司产品。DMEM/F12 培养基干粉为 Hyclone 公司产品。Annexin Ⅴ-FITC 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。流式细胞仪(FACS-440 型,美国),倒置相差显微镜(CK-40 型,Olympus,日本)。、

1.2　方法

1.2.1　实验分组　　依据 MTT 预实验结果,实验分为:GEN(10、20、40 μmol/L);PTX (0.2、0.4、0.80 μmol/L);DOX (0.125、0.250、0.500 μmol/L);GEN (10、20、40 μmol/L) + PTX (0.2、0.4、0.8 μmol/L);GEN (10、20、40 μmol/L) + DOX 0.125、0.250、0.500 μmol/L);DMSO 对照组;细胞对照组。

1.2.2　细胞培养　　人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 培养于含 10% 小牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU /L 链霉素的 DMEM/F12(Hyclone 公司)高糖培养液中,37 ℃,5% CO_2 常规传代培养。

1.2.3　对细胞增殖的抑制作用　　MTT 法,取对数增殖期的 MDA - MB -453 细胞以 2 ×10^5/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板,200 μl/孔。24 h 贴壁后,加入处理因素培养 3 d,各设 4 个平行孔,以溶剂 DMSO 为对照组。收获细胞前 4 h 每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),37 ℃继续培养 4 h,吸弃孔内上清液。每孔加 200 μl DMSO,振荡摇匀使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值[D(490)],取平均值,根据公式:抑制率(IR) = [1 - 实验组平均 D(490)/对照组平均 D(490)] ×100%,计算抑制率。合并用药效果,根据金氏公式[5]判断:q = Ea + b/ (Ea + Eb - Ea ×Eb),其中 Ea + b 为合并用药抑制率,Ea 和 Eb 分别为 A 药和 B 药单用的抑制率。q 值 0.85 ~ 1.15 为单纯相加,>1.15 ~2.0 为协同,<0.85 为拮抗。

1.2.4　流式细胞仪检测细胞周期相分布　　将乳腺癌细胞 MDA-MB-453 细胞接种于培养瓶中,24 h 后,分别加入各处理因素,每个浓度设 3 个平行,处理时间为 24、48、72 h ,胰酶消化,PBS 漂洗,调细胞浓度为 1 ×10^6/ml 。70% 冰冷乙醇固定,RnaseA 消化,碘化丙啶(PI)染色,采用流式细胞仪检测细胞周期相分布。

1.2.5　观察细胞形态变化[6]　　取指数增殖期的细胞,以 DMEM/F12 配成 2 ×10^5/ml 细胞悬液,接种于 12 孔培养板,每孔 2 ml ,置 37 ℃ 培养箱中培养,次日加入不同处理因素,24、48、72 h 后进行如下处理:用 0.1% 胰酶消化,收集细胞,离心涂片,甲醇室温固定,Giemsa 染色 5 min ,光镜观察凋亡细胞形态。

1.2.6　Annexin-V-FITC/ PI 双标记法检测细胞早期凋亡　　细胞分别培养在含各药物处理组的培养液中,24 h 后收集细胞。用 4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次,再用 250 μl 稀释的 binding 缓冲液重新悬浮细胞,并使其浓度为 1 ×10^6/ml ,取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加 5 μl Annexin V/FITC 溶液和 10 μl 20 μg/ml 的 PI 溶液,混匀后于室温避光放置 15 min ,在反应管中加 400 μl PBS,上机检测。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　GEN 联合化疗药物对 MDA-MB-453 细胞增殖的抑制作用

GEN、DOX、PTX 3 种药物单独作用于 HER-2/neu 高表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453 时,均可抑制 MDA-MB-453 细胞增殖,且随药物剂量增加,抑制率也增加,呈剂量依赖性关系。GEN 与 DOX 联合处理 MDA-MB-453 细胞时,10、20 μmol/L 的 GEN 与 DOX 的联合效应为相加效应,q 值在 0.85 ~ 1.15 之间,而 40 μmol/L GEN 与 DOX 的联合效应为协同效应,q > 1.15。GEN 与 PTX 联合处理时,各浓度的 GEN 与 PTX 的联合效应为拮抗效应,q < 0.85,见表 1。

表 1　GEN 联合抗肿瘤药物对 MDA - MB- 453 细胞增殖的抑制作用

组别	单用抑制率(%)	与 10 μmol/L GEN 联用		与 20 μmol/L GEN 联用		与 40 μmol/L GEN 联用	
		抑制率(%)	q	抑制率(%)	q	抑制率(%)	q
GEN							
10 μmol/L	8.98	–	–	–	–	–	–
20 μmol/L	23.18	–	–	–	–	–	–
40 μmol/L	33.00	–	–	–	–	–	–
DOX							
0.125 μmol/L	3.50	9.90	0.813 8	24.07	0.930 5	40.98	1.159 4
0.250 μmol/L	9.80	15.78	0.881 6	29.16	0.949 8	46.08	1.164 6
0.500 μmol/L	39.77	41.73	0.923 6	56.11	0.940 7	70.23	1.177 4
PTX							
0.2 μmol/L	38.65	34.01	0.770 3	33.98	0.642 7	33.29	0.565 3
0.4 μmol/L	44.23	37.99	0.771 5	36.96	0.646 7	36.04	0.575 4
0.8 μmol/L	49.31	41.57	0.771 8	40.98	0.671 2	38.87	0.588 6

所有数据为 3 次独立实验的均值

2.2　GEN 联合化疗药物对 MDA-MB-453 细胞周期分布的影响

GEN、DOX、PTX 均可影响 MDA-MB-453 细胞周期进程。0.5 μmol/L DOX 单独作用 48 h 后,G_0/G_1 期、S 期细胞减少、而

G_2/M 期细胞比例显著增加，显示 DOX 引起 MDA-MB-453 细胞阻滞于 G_2/M 期；0.8 μmol/L PTX 单独作用 48 h 后，细胞周期分布特点类似于 DOX，同样是引起 G_2/M 期阻滞；40 μmol/L GEN 单独作用 48 h 后，S 期细胞比例减少，G_2/M 期变化不明显，而 G_0/G_1 期细胞比例明显增加，显示 GEN 引起 MDA-MB-453 细胞阻滞于 G_0/G_1 期。GEN 与 DOX 或 PTX 联合作用 48 h 后，细胞周期分布特征与 DOX 或 PTX 单独作用时不同，GEN 削弱 DOX 或 PTX 对 MDA-MB-453 细胞 G_2/M 期的阻滞作用，见表 2。

表 2 Genistein 和 Doxorubicin、Paclitaxel 对 MDA-MB-453 细胞周期分布的影响

组别	细胞周期分布(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	59.16	34.28	6.56
阿毒素处理 48 h	3.66	21.01	75.32
紫杉醇处理 48 h	19.52	18.34	62.14
三羟异黄酮处理 48 h	76.52	16.56	6.92
三羟异黄酮＋阿毒素处理 48 h	44.99	24.86	30.15
三羟异黄酮＋紫杉醇处理 48 h	81.42	15.95	2.63
DMSO 处理 48 h	60.53	31.15	8.32

2.3 GEN 联合化疗药物对 MDA-MB-453 细胞形态学的影响

MDA-MB- 453 细胞经 Giemsa 染色后，光镜下观察发现，细胞核染蓝紫色，细胞质染粉红色。对照组正常细胞核均匀着色呈淡蓝色或蓝色，未见凋亡小体。处理组细胞质中颗粒增多并可见细胞膜出泡，核质比增大，核变形、皱缩，核染色质浓聚或呈月牙形边聚，出现凋亡小体。但凋亡形态细胞存在时间短，且大部分死细胞很快崩解、坏死，另可见肿胀的坏死细胞。

2.4 Annexin-V-FITC/ PI 双标记法检测细胞早期凋亡

流式细胞仪检测结果显示，溶剂对照组细胞凋亡率为 4.52%，0.5 μmol/L DOX 单独处理组细胞凋亡率为 12.36%（$P>0.05$），当 DOX 合用 40 μmol/L genistein 时，其凋亡率达 35.26%（$P<0.05$），说明 GEN 可增强 DOX 诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡的作用。0.8 μmol/L PTX 单独处理组细胞凋亡率为 20.90%（$P<0.05$），当 PTX 合用 40 μmol/L GEN 时，其凋亡率下降为 10.50%（$P<0.05$），说明 GEN 可拮抗 PTX 诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡的作用。见表 3。

表 3 各处理组作用 24 h 对 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响［$n=3$，$(\bar{x}\pm s)$%］

组别	凋亡率
阿霉素	12.36 ± 2.4
紫杉醇	20.90 ± 2.4 [a]
三羟异黄酮	8.23 ± 1.1
三羟异黄酮＋阿毒素	35.26 ± 3.1 [ac]
三羟异黄酮＋紫杉醇	10.50 ± 2.3 [b]
溶剂(DMSO)	4.52 ± 0.7
对照组	1.12 ± 0.2

a：$P<0.05$，与溶剂比较；b：$P<0.05$，与紫杉醇比较；c：$P<0.05$，与阿霉素比较

3 讨论

化疗是乳腺癌治疗的主要手段之一，克服化疗耐药是提高化疗疗效指数的关键所在。原癌基因 HER2/neu（又称 ErbB2）编码具有跨膜酪氨酸激酶（PTK）活性的生长因子受体，在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用。HER2/neu 的过度表达和扩增可见于多种肿瘤，如乳腺癌、卵巢癌、非小细胞性肺癌等，与肿瘤侵袭转移、化疗耐药等关系极为密切。临床诊断的乳腺癌患者中约有 30% 为 HER2/neu 过度表达类型，此类乳腺癌对化疗药物明显耐药，常导致临床化疗失败。有研究报道，HER2/neu 过度表达乳腺癌的化疗抗性可能与 HER2/neu 的 PTK 激活 PI3K/Akt 抗凋亡信号通路有关[2]。GEN 是存在于大豆中的一种具有抗氧化、抑制 PTK 活性、模拟或拮抗雌激素效应等多种重要生理活性的非营养素活性成分[7,8]。尽管已有大量研究资料表明 GEN 是一种潜在的乳腺癌化学防治药物，但其能否增加 HER2/neu 高表达乳腺癌化疗敏感性尚不清楚。

本研究结果显示，GEN、DOX、PTX 单独作用于 HER-2/neu 高表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453 时，均可抑制其增殖，且随药物剂量增加，抑制率也增加，呈剂量依赖关系。GEN 与 DOX 联合处理 MDA-MB-453 细胞时，可产生单纯相加至协同的抑制效果。10、20 μmol/L的 GEN 与 DOX 的联合效应为相加效应，而 40 μmol/L 的 GEN 与 DOX 的联合效应为协同效应。此结果提示，在临床应用时二药如同时合用，既产生显著的协同杀伤效果，又可避免 DOX 的毒副作用。GEN 与 PTX 联合处理时，各浓度的 GEN 与 PTX 的联合效应为拮抗效应。DOX、PTX 为两种不同性质的化疗药物，其中 DOX 的作用靶点为 DNA，PTX 的作用靶点为微管系统，提示 GEN 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 化疗敏感性的不同影响与化疗药物的性质密切有关。

细胞周期在肿瘤细胞的增殖调控中具有重要的作用，通过细胞周期来阻止肿瘤细胞的增殖已受到广泛关注[9]。本研究表明，GEN、DOX、PTX 均可影响 MDA-MB-453 细胞周期进程。PTX 和 DOX 单独作用 48 h 后，引起细胞阻滞于 G_2/M 期；而 GEN 单独作用 48 h 后，使细胞受阻于 G_0/G_1 期。一些研究表明，GEN 可引起乳腺癌 MCF-7 细胞阻滞于 G_2/M 期[10]，表明 GEN 对乳腺癌细胞周期分布的影响与癌细胞不同类型有关。GEN 与 DOX 或 PTX 联合作用 48 h，GEN 均能削弱 DOX 或 PTX 对 MDA-MB-453 细胞 G_2/M 期的阻滞作用。但 MTT 实验结果显示 GEN 能增加或协同

DOX 对 MDA-MB-453 细胞的抑制增殖作用,而拮抗 PTX 的抑制增殖作用,推测细胞周期分布改变可能不是 GEN 影响 MDA-MB-453 细胞对不同化疗药物敏感性的主要作用机制。

诱导肿瘤细胞凋亡可能是不同作用机制的化疗药物发挥作用的共同通路[11]。本研究结果显示,各处理因素作用于 MDA-MB-453 细胞后, Giemsa 染色可观察到典型的凋亡细胞形态学改变。Annexin-V-FITC/ PI 双标记法进行细胞早期凋亡检测显示, GEN 可显著增强 DOX 诱导细胞凋亡的作用,而与 PTX 联合应用可拮抗 PTX 诱导凋亡的作用。GEN 联合两种化疗药物对细胞凋亡的作用与对细胞增殖的联合效应趋势基本一致,表明 GEN 改变化疗药物诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡的敏感性可能是其联合不同性质化疗药物对 MDA-MB-453 表现出不同效应的机制之一。有关 GEN 改变不同性质化疗药物诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡敏感性的分子机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] MENARD S, PUPA S M, CAMPIGLIO M, *et al*. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6570 - 6578.

[2] KNUEFERMANN C, LU Y, LIU B, *et al*. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells[J]. Oncogene, 2003, 22(21): 3205 - 3212.

[3] 余小平, 糜漫天, 朱俊东. 三羟异黄酮对脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖影响与 VEGFR 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 662 - 666.

[4] 王　斌, 糜漫天, 彭俊华, 等. 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺癌发生及细胞增殖影响的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 119 - 122.

[5] 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5): 479 - 480.

[6] 赵　霞, 魏于全. HSP70 反义寡脱氧核苷酸增强宫颈癌和卵巢癌细胞的热敏感性[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(2): 99 - 101.

[7] LAMARTINIERE C A. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(6 Suppl): 1705S - 1709S.

[8] 周　永, 糜漫天, 杨镇洲. 三羟异黄酮对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 471 - 473.

[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] CHINNI S R, ALHASAN S A, MULTANI A S, *et al*. Pleotropic effects of genistein on MCF-7 breast cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2003, 12(1): 29 - 34.

[11] JOHNSTONE R W, RUEFLI A A, LOWE S W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. Cell, 2002, 108(2): 153 - 164.

（编辑　周　芳）

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头,例如:M、G、T 等的首字母大写以外均为小写,容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

本刊编辑部