维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0836-05

Genistein 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抗增殖作用

郑维萍[1],汤为学[2],李龙江[2],赵 华[3]

(1.重庆医科大学机能实验室,2.重庆医科大学病理生理学教研室,3.重庆医科大学中心实验室;重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Genistein 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制增殖作用及其机理。方法:采用 MTT 法测定 Genistein 在不同浓度、不同时间对 SMMC-7721 细胞抑制增殖的效应;流式细胞术分析细胞周期分布及凋亡率;透视电镜观察细胞超微结构改变;免疫细胞化学法检测细胞凋亡相关蛋白的表达。结果:Genistein 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,其抑制率与药物浓度和作用时间呈依赖关系;72h 的 IC50 为 29.0760 μmol/L;流式细胞仪分析证实 Genistein 能使 SMMC-7721 细胞聚积在 G2/M 期,凋亡率为 8.81%($P<0.05$);透视电镜观察发现 Genistein 能诱导细胞凋亡;免疫细胞化学法显示:Bax、Fas、Myc、iNOS、NF-kB 表达增加,Bcl-2、MTP53 表达减低。结论:Genistein 在体外可抑制 SMMC-7721 细胞增殖作用,是通过细胞阻滞在 G2/M 期和上调 Bax、Fas、Myc、iNOS、NF-kB 的表达及下调 Bcl-2、MTP53 表达诱导的细胞凋亡。

【关键词】Genistein;肝癌;凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-24

Effects of Genistein on proliferation of human hepatic cancer cell line SMMC-7721

ZHENG Weiping, et al

(*Department of Function, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:*To investigate the proliferation inhibitory effect of Genistein on human hepatic cancer cell line SMMC-7721. *Method:*The MTT method was used to assay the biologic activities of Genistein on SMMC-7721 at different times and in different doses. The cell cycle distribution and cell apoptotic rate were detected by flow cytometric analysis. The cell ultrastructure was observed by electron microscope. The apoptosis associated protein was detected with immunohistochemical technique.*Result:*Genistein could effectively inhibit SMMC-7721 in a dose and time dependent manner.IC50 (72h) of Genistein to SMMC-7721 was 29.0760 μmol/L .The cell growth was arrested at G2/M stage and the apoptotic rate was 8.81%.Genistein could lead to apoptosis, which was confirmed by electron microcope. The expression of Bax, Fas, Myc, iNOS, NF-kB were up-regulated,while the expression of Bcl-2, MTP53 were down-regulated. *Conclusion:* Genistein could inhibit the proliferation of SMMC-7721 in vitro ,which is due to the arrest at G2/M stage and the apoptosis is related to the up-regulation of Bax, Fas, Myc, iNOS, NF-kB and down-regulation of Bcl-2, MTP53.

【Key words】Genistein; Hepatic-cancer; Apoptosis

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,近 20 年来肝癌的病死率有上升趋势,已成为我国第二位恶性肿瘤致死的原因。已有化疗药物毒性大、易耐药等缺点,寻找新的化疗药物并研究其作用机理,一直是人们所关注的。Genistein(又称金雀异黄素)是异黄酮中活性较强的一种,广泛存在于天然植物中,具有多种生物学作用,而且对多种肿瘤细胞都具有抑制作用[1]。Genistein 对人肝癌作用报道很少,本实验检测 Genistein 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖抑制作用及探讨其可能的机理,以评价 Genistein 在肝癌化疗中的应用前景。

作者介绍:郑维萍(1959-),男,实验师,主要研究方向:肿瘤病理生理

1 材料与方法

1.1 材 料

人肝癌细胞株 SMMC-7721 为重庆医科大学病理生理教研室提供,RPMI-1640(Gibco 美国),新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),MTT(美国 sigma 公司),二甲亚砜(DMSO 苏州工业园区正兴化工研究院);兔抗 iNOS、NF-kB(P65)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;单克隆抗体 Bax、Bcl-2、Fas、Myc、突变型 p53 (MTP53)、S-P 试剂盒、

维普资讯 http://www.cqvip.com

DAB 显色液购自北京中山生物技术有限公司。Genistein 由陕西赛得高科生物股份有限公司侯肇彬先生馈赠

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法[2] 检测药物的抑制增殖作用 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞 5×10^4 个 /ml，接种于 96 孔板(200μl/ 孔)，实验设空白对照组(只加培养液)、细胞对照组(只加细胞)、溶剂对照组(1% 乙醇 + 细胞)、药物实验组(实验时用 75% 乙醇溶解 Genistein，配制成 18.5μmol/l、37μmol/L、74μmol/L、148μmol/L、296μmol/L 五个终浓度，每孔加药 20μl)，每实验组设 8 个平行孔，重复 3 次。药物作用 72h 后去上清液，每孔加 200μl 无血清及 5mg/miMTT20μl 继续评阅 4h 后，离心去上清液，每孔加 DMSO200μl，在酶标仪上检测每孔吸光度值(A)，波长 570nm。计算各种药物浓度的抑制率。抑制率 =1 - 药物实验组平均 A 值 / 细胞对照组平均 A 值，根据中效方程式[fa/fu=(D/Dm)m]计算出中效浓度(IC50)(72h)[3]。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)分析药物作用后细胞周期分布及凋亡率 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞 1×10^6 个 / 20ml 接种于 200ml 培养瓶内，实验设细胞对照组和药物作用组(1/2 IC50)，于 72h 终止培养，0.1% 胰酶消化收集细胞，PBS 液清洗，用 70% 预冷乙醇 1ml 固定 1h，PBS 液洗 2 次，加入 PI 染液放置 30min，以激发波长 488nm 测定，并用 Modfit LTV2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡率。

1.2.3 透视电镜观察药物作用后细胞形态改变 细胞处理同流式细胞仪，用 PBS 液洗 2 次，2.5% 戊二醛固定，继用 2% 四氧化锇固定、脱水、包埋、切片和染色均按常规处理，透视电镜观察、拍照。

1.2.4 免疫细胞化学法(SP)检测 Bax、Fas、Myc、iNOS、NF-kB、Bcl-2 及 MTP53 蛋白的表达 取对数生长 SMMC-7721 细胞 5×10^4 个 /1ml/ 孔接种于预先放置小玻片的 24 孔板内，实验设细胞对照组和药物作用组(1/2 IC50)，于 72h 终止培养。免疫细胞化学法操作按试剂说明书进行，中性树胶封片，光镜下观察并照相。免疫细胞化学法结果判断根据 HSCORE 评分法[4]，10 × 20 镜下随机选择 5 个细胞分布均匀的视野，每个视野计数 50 个细胞，按细胞着色强弱分为 4 个等级：无着色 0 分、淡黄色 1 分、棕黄色 2 分、棕褐色 3 分。根据公式 $HSCORE=\sum Pi(i+1)$，(i=0、1、2、3，Pi 表示评分为 i 的比例)，计算 HSCORE 得分。此评分方法考虑到了单个细胞是否阳性及其强弱，更具体更真实地反映细胞的蛋白表达情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包分别作方差分析，独立样本的 t 检验。

2 实验结果

2.1 MTT 法检测 Genistein 抑制增殖结果(见表 1)

从表 1 中发现随着药物浓度的增加，作用时间的延长，Genistein 对 SMMC-7721 细胞的抑制率增加。药物作用 72h 后，对细胞的抑制效果最好，根据中效方程式，计算出 IC50。

溶剂对照组与细胞对照组 A 值无差异。

表 1 MTT 法检测 Genistein 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制率

浓度(μmol/L)\时间	24h	48h	72h	
18.5	0.1004 ± 0.002	0.2234 ± 0.034	0.3787 ± 0.015	F'=630.028
37	0.2274 ± 0.013	0.3615 ± 0.042	0.5262 ± 0.041	P'<0.01
74	0.3478 ± 0.020	0.5319 ± 0.044	0.7851 ± 0.024	
148	0.4718 ± 0.013	0.6217 ± 0.020	0.8552 ± 0.015	
296	0.6034 ± 0.005	0.7926 ± 0.023	0.9279 ± 0.029	
F=670.020 P<0.01				

注：F、P 为不同浓度之间比较方差分析结果，F'、P' 为不同时间各组之间的方差分析结果。(IC50)(72h) = 29.0760μmol/L，a=-1.6408，b=1.1211，γ =0.9923。

表 2 Genistein 对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

时间\细胞周期	G0/G1期	S期	G2/M期	apoptosis
细胞对照组	63.03 %	26.75 %	10.22 %	
72h药物作用组	60.95 %	23.69 %	15.36 %	8.81 %

2.2 流式细胞仪分析 Genistein 作用 72h 后细胞周期分布变化及凋亡率(见表 2)

FCM 分析发现，1/2 IC50 Genistein 作用 72h 后可以改变 SMMC-7721 细胞的周期分布，使细胞生长停滞于 G2/M 期，并有诱导细胞凋亡的作用。

2.3 透视电镜观察 Genistein 作用后细胞形态的改变

透视电镜下可见对照组 SMMC-7721 细胞形态较幼稚，细胞表面有微绒毛，核大，细胞核内可见双核仁(图 1)；药物组细胞电子密度增加，核碎裂，可见凋亡细胞及凋亡小体(图 2)。

2.4 免疫细胞化学法检测结果

1/2 IC50 Genistein 作用 SMMC-7721 细胞 72h 可引起 Bax、Fas、Myc、iNOS、NF-kB 表达增加，

维普资讯 http://www.cqvip.com

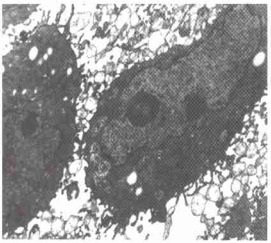


图 1 对照组 SMMC-7721 细胞×500

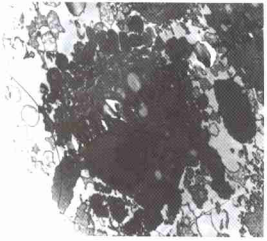


图 2 Genistein 处理 72h 后细胞×500

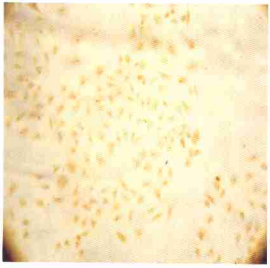


图 3 Bax 表达(×200)细胞对照组

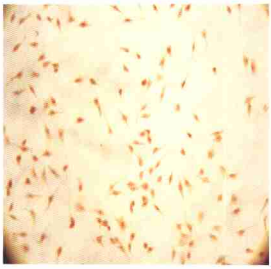


图 4 Bax 表达(×200)药物作用组(72h)

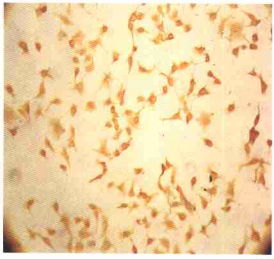


图 5 细胞对照组 Bcl-2 表达(×200)

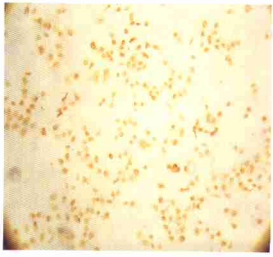


图 6 药物作用组(72h)Bcl-2 表达(×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 Genistein 作用前后 SMMC-7721 细胞表达 Bax、Fas、Myc、NOS、NF-kB、MTP53、Bcl-2 的 HSCORE 得分($\bar{x}\pm s$) $n=5$

组别 / 表达蛋白	Bax	Fas	Myc	iNOS	NF-kB	Bcl-2	MTP53
细胞对照组	2.1881 ± 0.0303	2.0434 ± 0.0456	1.9322 ± 0.0228	1.4282 ± 0.1397	2.6564 ± 0.0729	2.9242 ± 0.0488	3.0601 ± 0.0735
药物作用组	2.8762 ± 0.1020	2.9925 ± 0.0363	2.8122 ± 0.0856	2.4321 ± 0.0976	3.1762 ± 0.0363	2.1285 ± 0.0729	2.1360 ± 0.0590
t 值	11.6848	29.6250	29.2810	10.4127	14.7727	6.1849	19.8621
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.005	<0.001

Bcl-2、MTP53 表达下降，与细胞对照组之间比较有显著性差异。各种蛋白表达 HSCORE 评分的得分见表 3 及图 3、4、5、6。

3 讨 论

Genistein 是近年来从大豆中提取的异黄酮类化合物，其化学名称是 4,5,7- 三羟异黄酮。研究表明它能抑制多种肿瘤细胞的生长，日益引起人们的重视，成为研究的热点。本实验结果表明 Genistein 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 抑制作用明显呈剂量、时间依赖关系，这与国内外报道 Genistein 抑制其它肿瘤细胞增殖情况一致[5,6]。Genistein 抑制 SMMC-7721 细胞增殖可能的机理如下：

Genistein 是酪氨酸蛋白激酶的抑制剂[7]，许多生长因子如 EGF、FGF、PDGF、IGF-Ⅰ等的受体都含有酪氨酸蛋白激酶结构域，当生长因子与靶细胞上受体结合，激活酪氨酸蛋白激酶，从而导致下游信号系统激活，刺激细胞生长。Genistein 能竞争性地抑制 ATP 结合到酪氨酸蛋白激酶催化结构域，从而抑制酪氨酸蛋白激酶活性，抑制细胞生长。

Genistein 作用肿瘤细胞后，使细胞停滞在 G_2/M 期，细胞有丝分裂不能进行，阻滞了细胞周期进程，从而抑制细胞生长。有学者[8,9]研究发现 Genistein 造成 G_2/M 期停滞是由于抑制 cyclinB1 表达、增强 P21 表达、使 CDC2 磷酸化失活有关。本实验流式细胞结果分析也发现细胞停滞在 G_2/M 期。

Genistein 对多种肿瘤细胞有明显抑制增殖，主要是通过诱导细胞凋亡来实现的[10,11]。Wang[12]等报道 Genistein 通过对酪氨酸蛋白激酶的抑制，上调 bax 基因、下调 bcl-2 基因而诱导细胞凋亡发生。研究表明激活的 NF-kB 有活化凋亡基因 c-myc 作用[13]，Myc 蛋白表达增加引起细胞凋亡可能与 c-myc 基因可上调 Fas 表达，通过 fas/fasL 凋亡途径发挥诱导细胞凋亡作用。激活的 NF-kB 也能启动诱导型一氧化氮合酶（iNOS）基因的转录[14]，因而造成细胞内 NO 增多加速细胞凋亡的发生，NO 诱导凋亡基因 bax [15]、p53 的表达及降低 bcl-2 的表达[16]，从而促进细胞凋亡。bcl-2 基因表达产物 (Bcl-2) 称为抗凋亡蛋白，bax 基因表达产物(Bax) 称为凋亡蛋白，Bcl-2 和 Bax 的比例是决定细胞是否发生凋亡的重要调控因素，Bcl-2 过度表达与 Bax 形成异二聚体，抑制细胞凋亡，相反过度表达，Bcl-2 表达下降，Bax 形成同源二聚体促进细胞凋亡。p53 是细胞生长负调节基因，与细胞周期调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等重要生物学功能有关，突变型 p53 基因（MTp53）是细胞增殖基因，抑制细胞凋亡发生，已被证实是许多肿瘤发生、发展的原因，而 MTP53 蛋白的下降也可诱导细胞凋亡。本实验细胞免疫化学法发现 Genistein 诱导 SMMC-7721 细胞 Bcl-2、TMP53 下调，Bax、Fas、Myc、iNOS、NF-kB 上调细胞发生凋亡；流式细胞结果分析发现 Genistein 处理 SMMC-7721 的细胞凋亡率达 8.81%；透视电镜观察到 Genistein 处理的 SMMC-7721 细胞存在凋亡细胞及凋亡小体。

总之，通过实验已证实 Genistein 能抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖，它毒性低，因此它可作为防癌、抑癌物质，具有广泛临床应用价值。

（通讯作者：汤为学 023-68485478）

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Tanos V, Brzezinski A, Drize O, et al. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial hreast cells in vitro[J].Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002; 102(2): 188-194.

[2] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪.人实体瘤药物敏感试验 MTT 法的建立[J].重庆医科大学学报,1992;17(2):103-108.

[3] Chou TC,Talalay P.Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J].Adv Enzyme Regul, 1984; 22:27-55.

[4] Harrington DJ,Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressedinendometriumandendometriosis [J].J Pathol,1999;187(2):242-248.

[5] Cappelletti V,Fioravanti L,Miodini P, et al. Genistein blocks breast cancer cells in the G2/M phrase of the cell cycle[J]. J Cell Biochem, 2000; 79(4):594-600.

[6] 颜春洪、韩 锐. Genistein 抑制 HT1080 人纤维肉瘤细胞的体外侵袭作用[J].中华肿瘤杂志. 1999;20(3):170-174.

[7] Akiyama T, Ishida J,Nakagawa S, et al. Genistein a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinase[J].J Biol Chem. 1987; 262(12):5592-5595.

[8] Chang KL,kung ML,Chow NH,et al. Genistein arrest hepatoma cells at G2/M phrase:involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1[J].Biochem Phamacol, 2004; 67(4):717-726.

[9] Frey RS, Li J,Singletary KW. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells:involvement of Cdc2. p21(waf1/cip1), p27(kip1), and Cdc25C expression[J]. Biochem Pharmacol. 2001; 61(8):979-989.

[10] Zhou JR, Mukher-jee P, Gugger ET, et al. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavone via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis[J]. Cancer Res, 1998; 58(22):5231-5238.

[11] Carroll HP, Ali S, Kirby JA, et al. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance[J]?Clin Exp Immunol. 2001; 72(8):1423-1432.

[12] Wong BR, Besser D,Kim N,et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through signaling complex involving TRAF6 and c-src [J]. Molecular cell, 1999; 17(4):1041-1049.

[13] 宋丽萍,邱曙东,李明众,等. 放疗诱导宫颈癌细胞凋亡与 c-myc 蛋白表达[J].第四军医大学学报,2003,124(011):1045-1046.

[14] Michael JH,Ghosh S.Signal transduction through NF-kB[J].Immunol Today,1998; 2:80-88.

[15] 陆东东. 肝癌中 iNOS 与 P16、Bax 的表达及其与细胞凋亡关系[J].临床肝胆病杂志,2003;019(001):58-59.

[16] HO YS, Wang YJ,Lin JY.Induction of P53 and P21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells[J].Mol Carcinog,1996; 16(1):20-31.

(上接第 823 页)

坏;如果 SDS-PAGE 胶的浓度过大,对绝大多数蛋白质的分离效果均不太理想,经过比较,我们选择 10%的胶浓度。

实验中的其它一些条件和方法,如等电聚焦的电压设置、垂直板 SDS-PAGE 电泳的电流设置、染色方案等均是经过反复比较、优化调整而得到。

总之,我们对 2-DE 的条件、标本预处理等各个环节进行了调整、优化,建立了相对稳定的血清蛋白质 2-DE 技术,2-DE 图谱斑点匹配率为 85%, 为进一步分离、鉴定、分析疾病相关血清蛋白质,开展疾病的血清蛋白质组学具体研究打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] AebersoldR, MannM.Mass spectrometry-based proteomics [J].Nature, 2003; 422(6928): 198-207.

[2] Xiao hai Li, Yan Gong, Ying Wang, et al.Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project[J].Proteomics, 2005; 5: 3423-3441.

[3] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004; 4(12):3665-3685.

[4] Mortz E, Krogh TN, Vorum H, et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight analysis [J].Proteomics, 2001; 1(11): 1359-1363.

[5] Wang Y. Y., Cheng, P., Chan D.W.A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis [J].Proteomics, 2003; 3(3): 243-248.

[6] Fountoulakis M., Juranville, F., Jiang L., et al.Depletion of the high-abundance plasma proteins[J].Amino Acids, 2004; 27(3-4): 249-259.

[7] Fujii K., Nakano T., Kawamura T., et al.Multidimensional Protein Profiling Technology and Its Application to Human Plasma Proteome [J]. Proteome Res, 2004; 3(4): 712-718.

[8] Bjorhall K., Miliotis T., Davidsson P.Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of serum samples[J]. Proteomics, 2004; 5: 307-317.

[9] Gilbert S, Omenn, David J. States, Marcin Adamski1, et al , Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset [J]. Proteomics, 2005; 5: 3226-3245.