DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.013
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0973-04

论著

Genistein对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响

李 昱[1],米 粲[1],吴永忠[2],杨正钦[3] (重庆医科大学:[1]病理学教研室,[2]附属一院肿瘤科,[3]药理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 观察PTK抑制剂Genistein对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响。方法 对30例裸鼠建立人卵巢癌皮下移植瘤模型,共分为5组:对照组(含0.04%DMSO的生理盐水)0.2 mg/kg Genistein治疗组0.4 mg/kg Genistein治疗组(皮下注射),Cisplatin(4 mg/kg,静脉推注)治疗组,Genistein与Cisplatin联合治疗组。观察不同药物治疗后第7、14、21、28 d各组裸鼠皮下移植瘤生长情况及裸鼠体重的变化,并进行病理组织学检查。结果 0.4 mg/kg Genistein皮下注射,对$SKOV_3$裸鼠移植瘤的生长有明显抑制作用,与对照组相比,瘤体重量降低,肿瘤体积减小,坏死面积显著增加,但对裸鼠体重无明显影响。应用0.4 mg/kg Genistein与4 mg/kg Cisplatin(静脉推注)联合处理$SKOV_3$裸鼠移植瘤有增强抑制作用。结论 Genistein具有抑制人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤生长的作用;Genistein与化疗药物联合应用可增强抑瘤作用。

关键词:Genistein;卵巢肿瘤;肿瘤移植
中图法分类号:R73-352;R737.31;R914.4 文献标识码:A

Effects of genistein on the growth of human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice

LI Yu[1], MI Can[1], WU Yong-zhong[2], YANG Zheng-qin[3] ([1]Department of Pathology; [2]Department of Oncology, First Affiliated Hospital; [3]Department of Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of genistein used alone and in combination with cisplatin on the treatment of human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice. Methods Nude mouse model of human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously was established. A total of 30 mice were divided into 5 groups: control group (0.04% saline), genistein group (subcutaneous injection of genistein at 0.2 mg/kg and 0.4 mg/kg), cisplatin group (intravenous injection of cisplatin at 4 mg/kg), and genistein plus cisplatin group. The growth of the subcutaneously transplanted tumor and changes of mouse body weight in each group after treatment using different medication regimens were observed at 7, 14, 21, and 28 d. Histopathological examination was also conducted. Results Genistein (0.4 mg/kg) had significantly inhibitory effect on the transplanted xenograft growth *in vivo*. Tumor volume, tumor weight, and T/C ratio (mean volume of treated group/mean volume of control group) decreased. Significantly enlarged necrotic areas were found in genistein-treated group. The weight loss of nude mice after treatment with genistein was not significantly different from in the control group. Conclusion Genistein has the inhibitory effect on the growth of human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice. Genistein (0.4 mg/kg) in combination with cisplatin (4 mg/kg) has a synergistic effect on xenograft of human ovarian cancer cell line $SKOV_3$ in nude mice. The results provide the evidence for the potential usefulness of genistein for the prevention and treatment of human ovarian carcinoma.

Key words: genistein; ovarian tumor; neoplasm transplantation

Genistein是从大豆中提取的一种黄酮类有效成分。近年来国内外研究表明它可抑制乳腺癌、前列腺癌、肺癌、大肠癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤等多种肿瘤的生长[1,2],其主要防癌机制为调节雌激素受体、增加抗氧化酶的活性、抑制细胞代谢关键酶活性及抑制血管生成作用[3],目前成为一种很有潜力的抗肿瘤药物。我们的研究表明,Genistein可抑制人卵巢癌细胞系$SKOV_3$的体外增殖[4]。对于体内实验的研究尚少

作者简介:李 昱(1973-),女,重庆市合川市人,博士,讲师,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68485789,E-mail:liyu100@126.com

收稿日期:2003-12-17;修回日期:2004-02-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

见报道。本实验通过建立人卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞系SKOV$_3$裸鼠皮下移植瘤模型，观察PTK抑制剂Genistein对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响，为其应用于卵巢癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系

人卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞系SKOV$_3$购自中科院上海细胞生物学研究所，由病理生理学教研室汤为学教授惠赠，用RPMI1640(含10%小牛血清)培养基于37 ℃、5% CO_2条件下培养。

1.2 化学试剂

Genistein(购于美国Sigma公司)用DMSO配成储备液，置于-20 ℃保存。实验时用RPMI1640培养基稀释，使DMSO终浓度为0.04%。浓度为0.2 mg/kg和0.4 mg/kg，顺铂(山东齐鲁制药厂产品)。

1.3 动物

BALB/c/nu/nu无胸腺裸小鼠4~6周龄30只，雌性，体质量17.5~22.5 g，购自四川抗生素研究所(动物合格证号：川动管90号)，本校实验动物中心饲养。

1.4 裸鼠卵巢癌SKOV$_3$细胞的制备

取对数生长期的SKOV$_3$细胞用胰酶消化后配成1.5×10^7个/ml单细胞悬液，在无菌条件下于裸鼠背侧近后肢处皮下接种0.2 ml/只(相当于3.0×10^6个细胞)，接种后5~6 d见肿瘤生长。

1.5 体内裸鼠移植瘤实验

肿瘤细胞植入皮下后第7天，用随机数字表法将裸鼠分为5组，每组6只：①对照组(含0.04% DMSO的生理盐水)；②Genistein治疗组(含0.2 mg/kg和0.4 mg/kg两种浓度)；③Cisplatin(4 mg/kg)治疗组；④顺铂Genistein与Cisplatin联合治疗组。接种后第7天Genistein组开始分别按0.2和0.4 mg/kg皮下注射，每天1次，共3周；Cisplatin治疗组于接种后第2周按4 mg/kg静脉注射，每7 d注射1次，共3次；联合治疗组用药方法同单用组；对照组皮下注射相当体积同pH值的含0.04% DMSO的生理盐水，每天注射1次。

1.6 肿瘤生长检测

分别于治疗后第7、14、21、28天测其体质量及肿瘤大小。停药次日终止观察，处死裸鼠，剥瘤块称瘤重，量瘤体积。用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b)，肿瘤的体积为V(mm^3)=$\pi ab^2/6$。

1.7 病理组织学检查

处死裸鼠后，取部分瘤组织用10%甲醛固定，常规脱水、石蜡包埋，HE染色后在光镜下进行组织学观察。

1.8 统计学处理

所有计量数据均以$\bar{x}\pm s$表示，采用统计软件包SPSS10.0进行分析多样本均数间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 Genistein对SKOV$_3$裸鼠移植瘤生长情况的影响

2.1.1 各组SKOV$_3$裸鼠移植瘤体积的变化 在不同药物治疗后第7、14、21、28天测量肿瘤长、短径，计算体积，各组体积随时间变化如表1、图1所示。由图1、表1可见，各治疗组肿瘤体积较对照组明显缩小($P<0.01$)，0.4 mg/kg Genistein治疗组移植瘤体积比0.2 mg/kg组小($P<0.05$)，而0.4 mg/kg Genistein治疗组与Cisplatin治疗组相比，移植瘤体积大小的差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 不同用药组对**SKOV$_3$**移植瘤体积的影响($\bar{x}\pm s$，**mm^3**)

Tab 1 Effects of different medication regimens on the volume of SKOV$_3$ xenograft ($\bar{x}\pm s$，mm^3)

Group	Xenograft volume			
	7 d	14 d	21 d	28 d
Control	96.7±13.4	143.5±20.1	224.8±41.6	312.5±58.9
0.2 mg/kg Genistein	80.2±10.1*	121.4±18.6*	173.5±37.4*	252.4±53.2*
0.4 mg/kg Genistein	69.5±8.7*△	82.6±16.5*△	120.6±30.4*△	204.1±47.1*△
Cisplatin	66.9±9.1*	78.4±15.7*	121.9±31.6*	196.1±45.2*
Genistein and Cisplatin	43.6±6.5*	58.8±10.4*	92.6±12.8*	118.5±21.6*

*：$P<0.01$，*vs* control；△：$P<0.05$，*vs* 0.2 mg/kg Genistein

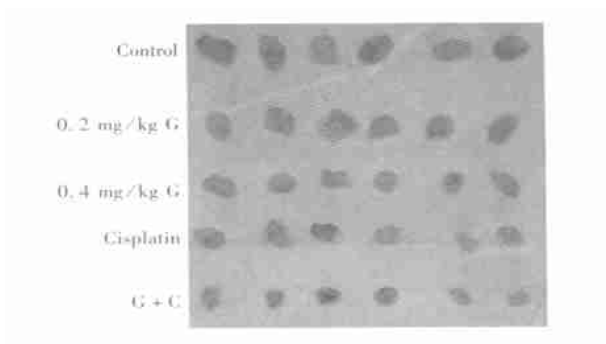


图1 不同用药组对裸鼠移植瘤体积的影响：对照组瘤体积较大；**Genistein**治疗组瘤体积较小；**Genistein**与**Cisplatin**联合治疗组瘤体积更小

Fig 1 Effects of different medication regimens on the volume of xenograft of nude mice: volume of the xenograft is big in the control group, small in genistein-treated group, and the smallest in genistein plus cisplatin-treated group

2.1.2 各组SKOV$_3$裸鼠移植瘤T/C比值的变化 不同药物治疗组的肿瘤T/C比值体积结果表明：给药组T/C比值明显降低，治疗28 d后0.2 mg/kg Genistein治疗组T/C比值为0.39，0.4 mg/kg Genistein治疗组为0.36，Cisplatin治疗组为0.34，联合治疗组为0.27。

2.1.3 各组SKOV$_3$裸鼠移植瘤瘤重的变化 活杀取材后称取瘤重，结果显示：0.4 mg/kg Genistein治疗组为(2.42±0.18) g，Cisplatin治疗组为(2.36±0.22) g，联合治疗组为(1.54±0.13) g，而对照组为(4.73±0.35) g。各治疗组与对照组相比有显著性

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

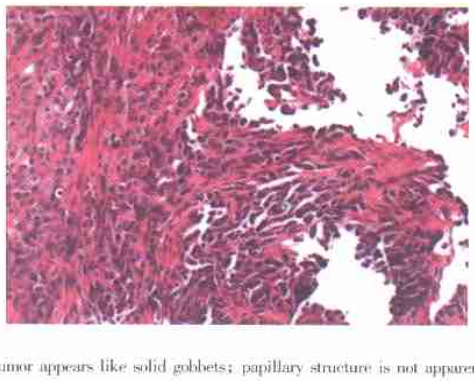
差异($P<0.01$)。

2.1.4　各组 $SKOV_3$ 裸鼠体质量的变化　　各实验组裸鼠体重的结果: 处死前对照组体质量为(21.5±1.2)g, 0.2 mg/kg Genistein 治疗组为(20.7±1.4)g, 0.4 mg/kg Genistein 治疗组为(19.9±1.5)g, Cisplatin 治疗组为(20.1±1.4)g, 联合治疗组为(19.1±1.1)g。各治疗组裸鼠体重与对照组相比无显著性差异($P>0.05$), 且未观察到药物相关毒副作用, 如活动迟缓、腹泻、厌食、脱毛等症状。

2.2　Genistein 对 $SKOV_3$ 裸鼠移植瘤组织形态学观察

生理盐水对照组: 镜下主要表现为低分化癌的特点: 肿瘤呈实性团块状, 乳头结构消失, 癌细胞密集, 呈成片状分布, 细胞有明显异型性, 核大深染, 染色质呈团块状, 有明显核仁, 胞浆丰富, 可见较多核分裂像与微血管形成, 间质极少。瘤细胞呈浸润生长, 可见坏死灶, 坏死面积占肿瘤面积的 0%～4%(图 2)。

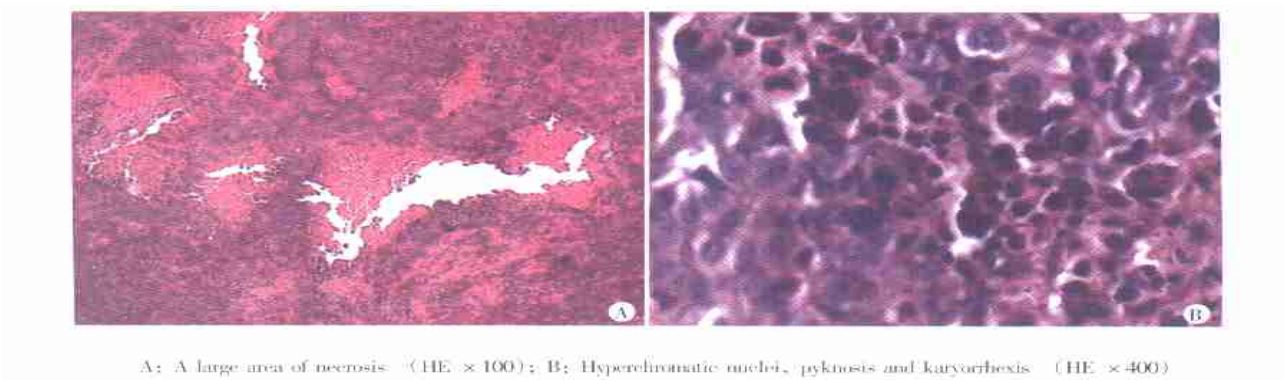
Genistein 治疗组: 细胞排列较稀疏, 可见大片红染无结构的坏死区, 其面积较对照组明显增大, 约为 20%～40%, 瘤细胞核深染、固缩(图 3)。Cisplatin 治疗组的瘤细胞改变基本同 Genistein 组。Cisplatin 与 Genistein 联合治疗组的瘤细胞改变基本同 Genistein 组, 但坏死面积更大, 约为 40%～50%(图 4)。



Tumor appears like solid gobbets; papillary structure is not apparent

图 2　对照组 $SKOV_3$ 移植瘤组织　(HE×100)

Fig 2　$SKOV_3$ xenograft tissue in the control group　(HE×100)



A: A large area of necrosis　(HE×100); B: Hyperchromatic nuclei, pyknosis and karyorrhexis　(HE×400)

图 3　Genistein 治疗组 $SKOV_3$ 移植瘤组织

Fig 3　$SKOV_3$ xenograft tissue in genistein-treated group



A large area of necrosis

图 4　Genistein and Cisplatin 联合治疗组 $SKOV_3$ 移植瘤组织　(HE×100)

Fig 4　$SKOV_3$ xenograft tissue in genistein plus cisplatin-treated group　(HE×100)

3　讨论

3.1　Genistein 对人 $SKOV_3$ 细胞体内裸鼠移植瘤生长的影响

Genistein 在体内抑制肿瘤生长的作用有较多研究[5]。每天给大鼠喂饲 Genistein(0.075～0.15 g/kg)可显著降低致癌剂氧化偶氮甲烷(Azo oxidized methyl hydride, AOM)诱发的结肠肿瘤。大鼠出生后分别皮下注射 Genistein 和 DMSO, 然后再用 7,12-二甲基苯并蒽(dimethyl benzo anthracene, DMBA)诱发乳腺癌, 结果 DMSO 组 100%诱发出肿瘤, Genistein 组肿瘤发生率为 88%; DMSO 组平均每只大鼠的肿瘤数为 6.35 个, 而 Genistein 组肿瘤数为 3.67 个, 两组有显著性差异。注射 Genistein 实验也发现类似结果。如给 F-344 大鼠 AOM 的前 1 周开始喂饲 Genistein, 5 周后结肠隐窝的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

癌前病变数比对照组明显减少。邵志敏等[6]发现，雌性裸鼠给予不同剂量(0.1、0.2、0.5 mg/kg) Genistein皮下注射2周后，可明显抑制MDA-MB-231和MCF-7乳腺癌细胞移植瘤的生长，其抑制作用具有剂量依赖性。本研究结果亦显示0.2 mg/kg和0.4 mg/kg Genistein对$SKOV_3$裸鼠移植瘤的生长有明显抑制作用，与对照组相比瘤重降低，肿瘤体积减小，坏死面积显著增加，但对裸鼠体重改变并不明显，亦未见Genistein导致明显的副作用。结合Genistein对$SKOV_3$细胞的体外抑制作用研究，我们认为其抑制作用是肯定的，且具有相对安全低毒的特点。

3.2 Genistein联合Cisplatin对$SKOV_3$体内移植瘤的影响

Cisplatin作为一种强有力的抗瘤剂，是临床常用的化疗药物，在妇科恶性肿瘤的联合化疗方案中也是必用药物之一。Genistein作为一种PTK特异性抑制剂和植物雌激素，在肿瘤发生发展阶段的抗肿瘤作用也有广泛报道。近年来有学者将Genistein与传统细胞毒药物如Cisplatin、阿霉素、环磷酰胺等联合应用于人癌细胞或其移植瘤，结果产生了较单独用药更为强烈的抗肿瘤作用[7]。Khoshyomn等[8]研究Genistein与Cisplatin联合应用对人髓母细胞瘤细胞的协同效应时，发现Genistein可显著增强Cisplatin抑制瘤细胞生长。

Lei等[9]发现PTK抑制剂Genistein与传统化疗药物Cisplatin或阿霉素联合应用，可对表皮生长因子(Epidermal growth factor receptor, EGFR)高表达的非小细胞肺癌细胞系NCI-H596产生有效的治疗作用。

将Genistein与Cisplatin联合应用于人卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞系$SKOV_3$移植瘤，目前尚少见报道。本研究采用4 mg/kg体重静脉注射Cisplatin联合0.4 mg/kg体重皮下注射Genistein对$SKOV_3$细胞移植瘤的生长具有增强抑制作用，提示PTK抑制剂Genistein联合常规化疗药物可以增强对$SKOV_3$体内增殖的抑制作用。关于Genistein与Cisplatin联合应用产生协同抑制的机制已有一些研究。Cisplatin是通过激活免疫系统单核-巨噬细胞及其它细胞来刺激免疫反应。Shishodia等[10]发现在Cisplatin治疗过程中，小鼠巨噬细胞的一系列细胞内蛋白发生了快速的酪氨酸磷酸化，而这种初始磷酸化是介导细胞反应的主要细胞内信号事件。Cisplatin治疗过程中可致使Ras(一种低分子量的GTP结合蛋白)和ERK-1(一种MAP激酶)的表达呈剂量依赖性增加，而后者又是酪氨酸磷酸化依赖性的。Genistein作为PTK抑制剂，可抑制Cisplatin导致的Ras和ERK-1的表达，这可能为机制之一。此外，Marverti等[11]研究发现Genistein可明显抑制由EGFR激酶引起的蛋白酪氨酸的磷酸化，通过调节胞膜被动渗透性来促进Cisplatin在胞内的积聚，从而达到与Cisplatin的协同抑制作用。研究表明，从大豆中提取的黄酮类物质Genistein是临床很有前途的与Cisplatin配伍联合治疗肿瘤的优选抗瘤剂。

参考文献：

[1] Arai N, Strom A, Rafter J J, *et al*. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 425—431.

[2] 杨峥嵘，粟永萍. Genistein与肿瘤防治[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): S17—S19.

[3] Shao Z M, Shen Z Z, Fontana J A, *et al*. Genistein's "ER-dependent and independent" actions are mediated through ER pathways in ER-positive breast caranoma cell lines[J]. Anticancer Res, 2000, 20(4): 2409—2416.

[4] 李 昱，米 粲. Genistein抑制人卵巢癌细胞系$SKOV_3$增殖和诱导凋亡发生的研究[J]. 癌症, 2003, 22(6): 586—591.

[5] 郑 杰. 金雀异黄素[J]. 国外医学·卫生学分册, 1998, 25(5): 260—263.

[6] 邵志敏，吴 炅，沈镇宇. Genistein多途径抑制乳腺癌细胞生长和侵袭[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(5): 362—365.

[7] Siwinska A, Opolski A, Chrobak A. Potentiation of the antiproliferative effect *in vitro* of doxorubicin, cisplatin and genistein by new analogues of vitamin D[J]. Anticancer Res, 2001, 21(3B): 1925—1929.

[8] Khoshyomn S, Manske G C, Lew S M, *et al*. Synergistic action of genistein and cisplatin on growth inhibition and cytotoxicity of human medulloblastoma cells[J]. Pediatr Neurosurg, 2000, 33(3): 123—131.

[9] Lei W, Mayotte J E, Levitt M L. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Anticancer Res, 1999, 19(1A): 221—228.

[10] Shishodia S, Sodhi A, Shrivastava A. Involvement of Ras and MAP kinase (ERK-1) in cisplatin-induced activation of murine bone marrow-derived macrophages[J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 45(3): 527—534.

[11] Marverti G, Andrews P A. Stimulation of cis-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) accumulation by modulation of passive permeability with genistein: an altered response in accumulation-defective resistant cells[J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(6): 991—999.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net