DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.004
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0663-04

论著

三羟异黄酮对脐静脉内皮细胞ECV304增殖影响与VEGFR的关系

余小平,糜漫天,朱俊东 (第三军医大学预防医学系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)抗肿瘤血管生成的机制。方法 通过绘制生长曲线和流式细胞仪检测三羟异黄酮和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对脐静脉内皮细胞ECV304增殖的影响,应用免疫沉淀和激酶活性分析方法检测ECV304细胞血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)磷酸化水平和蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)活性。结果 VEGF单独处理能使ECV304细胞增殖,VEGFR磷酸化水平和PTK活性升高,而三羟异黄酮单独处理能抑制ECV304细胞生长,细胞周期主要被阻止在G_2/M期,并出现细胞凋亡现象,VEGFR磷酸化水平和PTK活性降低($P<0.01$),三羟异黄酮和VEGF同时处理时,细胞周期主要仍被阻止在G_2/M期,但凋亡率下降,VEGFR磷酸化水平和PTK活性与VEGF单独处理组相比降低。结论 三羟异黄酮能下调ECV304细胞VEGFR的磷酸化水平及PTK活性,从而阻断胞外生长刺激信号向胞内转导的级联反应,阻遏血管内皮细胞生长,抑制肿瘤血管生成。

关键词:三羟异黄酮;血管内皮细胞生长因子受体;蛋白酪氨酸激酶
中图法分类号:R322.123;R329.25;R914.4 文献标识码:A

Effects of genistein and VEGFR on proliferation of ECV304 cells

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 investigate the mechanisms of genistein in the growth inhibition in the tumor angiogenesis. Methods The effects of genistein and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) on the proliferation of ECV304 cells were observed by cell growth curves and flow cytometry. The level of the phosphorylation of VEGFR and the activity of protein tyrosine kinase (PTK) in ECV304 cells were detected by immunoprecipitation and kinase activity analysis. Results Vascular endothelial growth factor (VEGF) alone could facilitate the proliferation of ECV304 cells, up-regulate the phosphorylation and PTK activity of VEGFR, but genistein alone could inhibit the growth of ECV304 cells, stop the cell cycle mainly at the phase of G_2/M, induce apoptosis, and down-regulate the phosphorylation and PTK activity of VEGFR ($P<0.01$). Treatment with genistein and VEGF together could stop the cell cycle at the phase of G_2/M, decrease the apoptotic rate, and decrease the level of phosphorylation and the activity of VEGFR, as compared with the group treated with VEGF alone. Conclusion Genistein is able to down-regulate the phosphorylation and PTK activity of VEGFR, restrain the cascade reaction of exo-cell signal transduction, and inhibit the proliferation of vascular endothelial cells, resulting in inhibition of tumor angiogenesis.

Key words: genistein; vascular endothelial growth factor receptor, protein tyrosine kinase

二百多年前,英国外科医生Hunter在描述发育期驯鹿角中新生血管的生长时率先提出了"血管生成"(angiogenesis)这一术语。上世纪70年代Folkman等[1]首先发现在实体肿瘤生长和转移过程中新生血管发挥着重要作用,最近又有报道白血病等非实体瘤的血管生成发生在骨髓内[2]。目前普遍认为肿瘤的抗血管生成治疗具有高效、迅速、副作用少、一般不会产生抗药性等优点,该方法联合放疗、化疗成为肿瘤治疗的新模式。影响肿瘤内新生血管形成主要有两方面因素:一是肿瘤血管内皮细胞的增殖;二是肿瘤组织细胞以及血管内皮细胞表达分泌促血管形成相关因子的能力。我们先前研究发现三羟异黄酮在体内能有效抑制乳腺癌细胞移植瘤血管生成。鉴于新生血管形成的最初事件是血管内皮细胞生长增殖,血管内皮细胞在肿瘤血管新生中发挥着重要作用。三羟异黄酮是否能通过抑制血管内皮

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)68752291
收稿日期:2003-04-28;修回日期:2003-09-29

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

细胞的增殖,发挥抑血管新生效应?其作用的分子机制是什么?本研究针对这一问题进行探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞株来源与培养

人脐静脉内皮细胞株(ECV304细胞)由第三军医大学西南医院病理科蒋雪峰硕士惠赠。用含10%小牛血清的DMEM/F12高糖培养液培养人脐静脉内皮细胞株ECV304细胞,37 ℃,5% CO_2常规培养传代。细胞传代时,弃去培养液,用PBS漂洗1次,再用0.25%的胰酶(用pH 7.4的PBS配制,过滤除菌,4 ℃保存)消化3~5 min,加入1~2 ml新鲜培养基,用弯头吹管轻轻吹打瓶底数次至细胞完全脱落,然后分瓶传代培养。

1.2 实验分组

实验分以下4组:①对照组;②VEGF处理组;③genistein处理组;④genistein和VEGF处理组。根据研究资料genistein的作用浓度定为5× 10^{-5} mol/L,VEGF的作用浓度定为5 μg/ml,处理时间分别为24,48,72 h,对照组用溶剂DMSO作对照,各组培养液中DMSO的终浓度≤0.05%。

1.3 细胞生长曲线绘制

以5× 10^4/ml密度接种ECV304细胞于24孔培养板中,每孔2 ml,加处理因素,培养1~4 d,每天各取3孔,台盼蓝染色,计数,绘制生长曲线,并按如下公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率(GI)} = \frac{Nc - Nt}{Nc} \times 100\%$$

Nc和Nt分别为某时相点对照组和处理组细胞数。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期相分布

ECV304细胞经处理后,收获细胞,70%冷乙醇固定,RNase消化,碘化丙啶(PI)染色,送至本校中心实验室采用流式细胞仪检测细胞周期相分布和细胞凋亡率。

1.5 免疫沉淀法分析VEGFR磷酸化水平

1.5.1 总蛋白提取及含量测定 常规方法提取ECV304细胞实验各组的总蛋白,用Lowry法测浓度,用蛋白提取液调整实验各组蛋白含量为5 μg/μl,分装,-70 ℃保存备用。

1.5.2 p-Tyr抗体免疫沉淀 取各组蛋白提取液20 μl(含蛋白总量100 μg),加30 μl 0.1 g/ml Protein A-sepharose混悬液预处理1~2 h,离心后小心吸取上清液,加5 μl p-Tyr抗体0 ℃震摇1 h或者4 ℃过夜,加30 μl 0.1 g/ml Protein A-sepharose混悬液沉淀抗原抗体复合物1 h,RIPA缓冲液漂洗Protein A-sepharose-抗原抗体复合物3次,最后用含0.1% NP-40的10 mmol/L Tris·HCl(pH 7.4)漂洗1次。

1.5.3 免疫印迹检测 在上述免疫沉淀的p-Tyr蛋白样品中加入30 μl 1× SDS凝胶加样缓冲液,煮沸变性后,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VEGFR单抗,4 ℃过夜;PBST漂洗,10 min× 3;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;1∶40稀释HRP标记的链霉卵白素三抗工作液,室温振摇1 h;PBST漂洗,10 min× 3;DAB显色;自来水冲洗并照相。

1.6 VEGFR的PTK活性分析

常规方法提取ECV304细胞实验各组总蛋白,调整总蛋白浓度为5 μg/μl后严格按照Premoga公司提供的试剂盒说明书步骤测定PTK活性。

1.6.1 配置20个反应ATP复合物 0.5 mmol/L ATP 20 μl;[γ-^{32}P] ATP(1.11× 10^{14} Bq/mmol,3.7× 10^5 Bq/μl)1.0 μl;双蒸水29 μl,总体积50 μl。

1.6.2 1.5 ml离心管中酶与底物反应 5× PTK分析缓冲液100 μl;底物50 μl;钒酸钠50 μl;ATP复合物50 μl;双蒸水150 μl,总体积400 μl。轻轻混匀,30 ℃水浴5 min;吸取20 μl分装于20个0.5 ml离心管中,其中各实验组设有2个平行管;每只0.5 ml离心管加入5 μl待测样品,30 ℃水浴15 min,其中空白对照组以PTK分析缓冲液代替样品。

1.6.3 终止反应(B法) 加3.5 μl 43% TCA,混匀置于冰上;加1.5 μl 10 mg/ml BSA,冰上放置5 min;14 000× g离心,4 ℃放置5 min;取24 μl上清液移入另一离心管,加入6 μl 43% TCA,轻轻混匀;吸取12.5 μl点于SAM2™生物素膜上。另外,随机选取2管,吸5 μl液体点于SAM2™生物素膜上,不漂洗,干燥后直接加入5 ml闪烁液,测其cpm值。将SAM2™生物素膜置于清洗槽中,清洗SAM2™生物素膜,以去掉未参加反应的[γ-^{32}P] ATP,按以下顺序振摇清洗:2 mol/L NaCl,200 ml,1× 30 s;2 mol/L NaCl,200 ml,3× 2 min;2 mol/L NaCl,1% H_3PO_4,200 ml,4× 2 min;100 ml双蒸水,2× 30 s;干燥SAM2™生物素膜,室温10~15 min。

1.6.4 测定实验各组cpm值 用小剪刀分开各组间的SAM2™生物素膜,置于液闪管中,每管加入5 ml闪烁液,平衡过夜,送至本校西南医院核医学教研室测量各组cpm值。

1.6.5 结果计算 按如下公式计算[γ-^{32}P] ATP的特异活性。

$$\text{每 pmol[}\gamma\text{-}^{32}\text{P] ATP cpm 值} = \frac{(37.5/5) \times X}{500} = 0.015\ X(X\text{: cpm 值})$$

按如下公式计算实验各组PTK酶活性(单位:pmol·min^{-1}·μl^{-1})

$$\text{PTK 酶活性} = \frac{[\text{PTK 酶与底物反应的 cpm 值} - \text{空白对照 cpm 值}] \times 37.5}{12.5 \times 15 \times 5 \times [\gamma\text{-}^{32}\text{P] ATP 的特异活性}}$$

1.7 统计学处理

实验数据用$\bar{x} \pm s$表示,统计学方法采用方差分析。

2 结果

2.1 三羟异黄酮和VEGF对脐静脉ECV304内皮细胞增殖的影响

ECV304内皮细胞的生长曲线结果(图1)显示:5 μg/ml VEGF单独处理ECV304内皮细胞24~96 h能促进细胞生长,5× 10^{-5} mol/L genistein单独处理24~96 h,对该细胞生长有明显的抑制作用,抑制率为16.3%~96%,genistein和VEGF联合处理24~96 h也能有效抑制生长,抑制率为16.2%~78%。该结果提示VEGF能促进脐静脉ECV304内皮细胞增殖,而genistein能有效拮抗VEGF的这种促内皮细胞增殖作用。

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

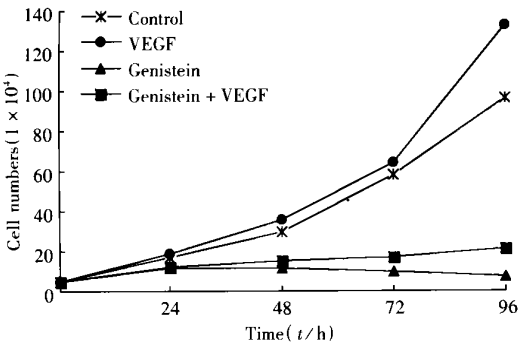


图 1　Genistein 和 VEGF 处理后 ECV304 细胞生长曲线

Fig 1　Growth curves of ECV304 cells after treatment with genistein and VEGF

2.2　三羟异黄酮和 VEGF 对 ECV304 细胞周期相分布的影响

ECV304 细胞经 genistein 或/和 VEGF 处理 24, 48, 72 h 后, 收获细胞, 流式细胞仪分析细胞周期相分布(n= 3), 结果显示: 5 μg/ml VEGF 单独处理 ECV304 细胞后 S 期细胞增加[由(23.86±5.73)%增加到(35.81±8.96)%, P< 0.01], G_2/M 期细胞减少[由(15.17±4.29)%减少到(6.82±2.53)%, P< 0.01], G_1/G_0 期细胞变化不具有显著性差异(P> 0.05), 同时细胞无凋亡现象; 5× 10^{-5} mol/L genistein 单独处理后与对照组相比 S 期和 G_1/G_0 期细胞减少[分别由(23.86±5.73)%和(60.98±10.32)%减少到(19.88±4.89)%和(19.44±4.38)%, P< 0.01], G_2/M 期细胞显著增加[由(15.17±4.29)%增加到(60.68±10.32)%, P< 0.01], 细胞出现凋亡(5.31±2.13)%; genistein 和 VEGF 联合处理 ECV304 细胞后, 与对照组相比 S 期和 G_1/G_0 期细胞减少[分别由(23.86±5.73)%和(60.98±10.32)%减少到(18.18±4.91)%和(15.27±3.85)%, P< 0.01], G_2/M 期细胞增加[由(15.17±4.29)%增加到(66.56±12.63)%, P< 0.01], 但与 genistein 单独处理组相比各期细胞百分率变化不显著, 但细胞凋亡率减少[由(5.31±2.13)%减少到(2.28±0.98)%, P< 0.01]。表明 VEGF 能促进 ECV304 细胞增殖, genistein 主要使 ECV304 细胞受阻于 G_2/M 期, 并能阻遏 VEGF 的促增殖效应。

2.3　三羟异黄酮和 VEGF 对 ECV304 内皮细胞 VEGFR 磷酸化的影响

ECV304 细胞的 VEGFR 磷酸化结果(图 2)显示, VEGF 处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 磷酸化水平均显著高于对照未处理组(P< 0.01), 但 VEGF 各处理组间的磷酸化水平变化没有显著差异性, 即 ECV304 细胞的 VEGFR 磷酸化水平并不随着 VEGF 作用时间的增加而升高; genistein 处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 磷酸化水平均显著低于对照未处理组(P< 0.01), 但 genistein 各处理组间的磷酸化水平不发生显著变化, 即 ECV304 细胞的 VEGFR 磷酸化水平并不随着 genistein 作用时间的延长而降低; genistein 和 VEGF 同时处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 磷酸化水平虽然高于对照未处理组和 genistein 处理组, 但显著低于 VEGF 处理组。该结果充分表明 VEGF 能升高 ECV304 内皮细胞 VEGFR 的磷酸化水平, genistein 能有效阻遏 VEGF 的这种促磷酸化作用。



1: Control; 2: VEGF treated 24 h; 3: VEGF treated 48 h; 4: VEGF treated 72 h; 5: Genistein treated 24 h; 6: Genistein treated 48 h; 7: Genistein treated 72 h; 8: Genistein and VEGF treated 24 h; 9: Genistein and VEGF treated 48 h; 10: Genistein and VEGF treated 72 h

图 2　Genistein 和 VEGF 对 ECV304 细胞 VEGFR 磷酸化的影响

Fig 2　Effects of genistein and VEGF on VEGFR phosphorylation in ECV304 cells

2.4　三羟异黄酮和 VEGF 对 ECV304 细胞 VEGFR PTK 活性的影响

Genistein 和 VEGF 对 ECV304 细胞 VEGFR 的 TPK 活性影响结果提示, VEGF 处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 的 TPK 活性均显著高于对照未处理组, 且随着 VEGF 作用时间的延长其 PTK 活性升高, 由(0.593±0.139) pmol·min^{-1}·μl^{-1}分别增加到(0.646±0.165)、(0.705±0.197)、(0.938±0.214) pmol·min^{-1}·μl^{-1}, P< 0.01; genistein 处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 的 PTK 活性显著低于对照未处理组, 由(0.593±0.139) pmol·min^{-1}·μl^{-1}分别减少到(0.486±0.106)、(0.358±0.087)、(0.253±0.064) pmol·min^{-1}·μl^{-1}, P< 0.01; genistein 和 VEGF 同时处理 ECV304 细胞 24、48、72 h 后, VEGFR 的 PTK 活性分别为(0.598±0.147)、(0.522±0.163)、(0.610±0.162) pmol·min^{-1}·μl^{-1}, 在每个时相点其活性分别高于 genistein 处理组, 低于 VEGF 处理组。该结果充分表明 genistein 能阻断胞外生长刺激信号向胞内转导的级联反应, 阻遏血管内皮细胞生长, 从而抑制肿瘤血管生成。

3　讨论

3.1　三羟异黄酮拮抗 VEGF 促 ECV304 内皮细胞增殖的作用及其意义

机体在正常情况下, 血管内皮细胞处于静息状态, 其更换周期大约为 10 年。但是在创伤、恶性肿瘤、糖尿病性视网膜病变等病理条件下以及女性月经周期子宫内膜修复等正常生理条件下血管内皮细胞可激活增殖, 形成新的血管。肿瘤血管生成是肿瘤持续生长、侵袭转移的物质基础。血管内皮细胞增殖是血管生成的一个重要环节, 许多生长因子对血管内皮细胞增殖有调节作用, 其中以 VEGF 的作用最为重要。有关 genistein 的抗肿瘤作用及相关机制研究报道较多, 大

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

量资料显示 genistein 能抑制肿瘤细胞增殖，并诱导肿瘤细胞发生凋亡，近年来有少数研究报道指出抑制肿瘤血管生成可能是 genistein 发挥抗癌作用的途径之一。我们先前研究发现 genistein 对原癌基因 HER-2/neu 高表达乳腺癌裸鼠移植瘤血管生成有显著抑制作用，并认为这一效应与其降低 HER-2/neu 高表达乳腺癌细胞的 VEGF 表达水平有关。为深入探讨 genistein 抗乳腺癌血管生成的作用机制，本研究进一步观察了 genistein 对 VEGF 调节血管内皮细胞增殖作用的影响，实验结果显示 5 μg/ml VEGF 能促进 ECV304 内皮细胞生长，5×10^{-5} mol/L genistein 对该细胞生长有明显的抑制作用（抑制率为 16.3%～96%），细胞生长主要受阻于 G_2/M 期，并能诱导细胞凋亡[凋亡率（5.31±2.13）%]。Genistein 和 VEGF 联合处理时也能有效抑制血管内皮细胞生长（抑制率为 16.2%～78%）。该结果提示 genistein 拮抗 VEGF 促血管内皮细胞增殖的作用可能也是其抑制乳腺癌血管生成的机制之一。

3.2 三羟异黄酮抑制细胞增殖作用的可能机制

细胞外信号通过细胞膜上的受体及胞内信号转导通路，引发细胞发生各种生物学效应。目前认为细胞外有丝分裂刺激信号（如 EGF、VEGF、FGF、PDGF 等）与相应受体结合后，受体形成同源二聚体或异源二聚体，发生自身磷酸化而活化，然后磷酸化下游效应蛋白从而将胞外刺激信号传入胞内[3]。胞内信号转导主要是通过效应蛋白 Grb2、SOS→Ras→Raf→MEK→ERK→转录因子 AP-1 信号级联途径，诱导即刻早期反应基因（*c-fos*、*c-myc*、*c-jun* 等）表达增加[4]，即刻反应基因蛋白表达增加一方面使转录因子 AP-1 复合物形成增多，导致基质蛋白酶、促血管生成因子、生长因子以及细胞周期调节蛋白表达上调，另一方面调节细胞周期相关基因（细胞周期素 Cyclin、细胞周期依赖性激酶 CDK 以及 CDK 抑制因子 CKI）的表达，细胞产生增殖效应[5]。

Genistein 抑制肿瘤细胞增殖是其抗癌机制之一。本部分实验结果显示，5 μg/ml VEGF 单独处理 24、48、72 h 后 ECV304 血管内皮细胞后能促进细胞生长，VEGFR 磷酸化水平增加，同时 VEGFR 的 PTK 活性也增加。单独用 5×10^{-5} mol/L genistein 处理内皮细胞后，VEGFR 磷酸化水平和受体的 PTK 活性降低。Genistein 和 VEGF 同时处理后，细胞的 VEGFR 磷酸化水平和受体的 PTK 活性比 VEGF 单独处理组低，而比 genistein 单独处理组高，提示 genistein 能有效拮抗 VEGF 促血管内皮细胞增殖，这种作用是通过抑制 VEGFR 的磷酸化水平及受体的 PTK 活性，从而抑制其下游信号转导分子的磷酸化水平和激酶活性，阻断胞外生长刺激信号向胞内转导的级联反应，阻遏细胞生长。Genistein 除了能有效抑制血管内皮细胞的增殖作用外，众多研究显示 genistein 还能通过生长因子信号途径抑制多种乳腺肿瘤细胞周期相关调节基因和调节蛋白的表达，影响肿瘤细胞的增殖。Frey 等[6] 发现 genistein 能使永生化的 MCF-10A 乳腺上皮细胞 p38MAPK 和 ERK1/2 失活，细胞增殖受抑，细胞周期主要受阻于 G_2/M 期。Katdare 等[7] 研究发现 genistein 能诱导人乳腺上皮细胞 184-B5/HER2 凋亡。Dampier 等[8] 研究发现 genistein 抑制佛波脂诱导乳腺癌 *c-fos* 表达，转录因子 AP-1 激活，细胞外信号调节激酶（extracellar signal-regulated kinase，ERK）磷酸化，使细胞周期受阻于 G_2/M 期。这些研究结果充分提示 genistein 能有效阻断胞外生长刺激信号向胞内转导的级联反应，阻遏血管内皮细胞生长，抑制肿瘤血管生成。

参考文献：

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182－1186.

[2] Saphir A. Angiogenesis: the unifying concept in cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(22): 1658－1659.

[3] Witmer A N, Vrensen G F, Van Noorden C J, *et al*. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(1): 1－29.

[4] Ciardiello F, Caputo R, Damiano V, *et al*. Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(4): 1546－1556.

[5] Tsuchida R, Miyauchi J, Shen L, *et al*. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and AP-1 coactivator p38/Jab1 correlates with differentiation of embryonal rhabdomyosarcoma[J]. Jpn J Cancer Res, 2002, 93(9): 1000－1006.

[6] Frey R S, Singletary K W. Genistein activates p38 mitogen-activated protein kinase, inactivates ERK1/ERK2 and decreases Cdc25C expression in immortalized human mammary epithelial cells[J]. J Nutr, 2003, 133(1): 226－231.

[7] Katdare M, Osborne M, Telang N T. Soy isoflavone genistein modulates cell cycle progression and induces apoptosis in HER-2/neu oncogene expressing human breast epithelial cells[J]. Int J Oncol, 2002, 21(4): 809－815.

[8] Dampier K, Hudson E A, Howells L M, *et al*. Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein[J]. Br J Cancer, 2001, 85(4): 618－624.

（编辑 刘洪娥）

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