DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.027
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
62 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0062-04

论著

Genistein体外抑瘤效应及其对不同细胞作用选择性的研究

杨峥嵘,程天民,粟永萍,郭朝华 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,400038 重庆)

提 要:目的 研究Genistein与放射是否具有协同抑瘤作用及其毒副作用如何。方法 利用MTT法和集落计数研究Genistein对5种不同细胞的选择性抗增殖作用,在此基础上运用活细胞计数、^{3}H-TdR掺入法、流式仪检测等技术分析Genistein和/或放射对肿瘤细胞增殖的影响及可能的机制。结果 与对造血等正常细胞比较,Genistein对肿瘤细胞有较好的选择性;Genistein照后给药可引起明显的G_2/M细胞周期阻滞,并诱发大量细胞凋亡,其抑瘤作用大于两单一措施之和,并显著高于照前给药组。结论 Genistein对骨髓造血细胞有着突出的安全低毒的优点,其照后给药与γ射线具有协同抑瘤效应。

关键词:Genistein;乳腺癌;电离辐射;细胞周期;细胞凋亡
中图法分类号:R730.54;R737.9;R977.1 文献标识码:A

Study on anti-proliferation effects of genistein on MCF-7 and its selective effects on different cells

YANG Zheng-rong, CHENG Tian-min, SU Yong-ping, GUO Chao-hua (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the possible coordinated effect of genistein and irradiation on tumor cells and the toxic effect of the agent. **Methods** The IC_{50} values of MCF-7, MDA-MB-231, IEC-6, CFU-F and CFU-GM after the treatment of genistein were measured with MTT and colony forming assay. Furthermore, cell counting, flow cytometry, cell cycle, ^{3}H-TdR incooperation were used to study the possible coordinated effects of genistein combined with ^{60}Co γ radiation on cultured MCF-7 cells, and further explore possible molecular mechanisms. **Results** ① The selective inhibitory effects of genistein on the proliferation of different cells were as follows: MDA-MB-231> MCF-7> IEC-6> CFU-GM> CFU-F. ② Genistein(20 μmol/L) or ^{60}Co-irradiation(18 Gy) alone exerted inhibitory effects on cell proliferation and inhibited DNA synthesis. Compared with other groups, the group treated with genistein after ^{60}Co γ irradiation showed significantly tumor growth inhibition. Furthermore, flow cytometry showed G_2/M arrest and a great deal of apoptotic cells in this group. Genistein after irradiation exerted much higher anti-tumor effect than the agent alone or being giving before irradiation. **Conclusion** Genistein has an inhibitory effect on tumor cell proliferation and may be an effective anti-cancer drug with very low toxicity. Genistein treatment after irradiation may have coodanated effects with ^{60}Co γ radiotherapy. G_2/M arrest and cell apoptosis induced by genistein after irradiation are much stronger and it may be one of its possible molecular mechanisms.

Key words: genistein; human breast cancer; ionizing radiation; cell cycle; apoptosis

植物雌激素Genistein(5,7,4' 一三羟基异黄酮,又名金雀异黄素)是大豆异黄酮类的主要成分之一,近年来其抗氧化、防紫外辐射损伤方面作用颇受关注[1,2]。但也有学者报道了在X线照射后的瘤细胞中加入Genistein,可使照射致死效果成倍提高的现象[3]。上述两方面作用看似对立,其机制不清,颇多争议。本研究拟在分析Genistein对不同细胞作用选择性的基础上,研究Genistein和/或γ射线照射对人乳腺癌细胞增殖的影响及可能机制,以阐明该药与放射是否具有协同抑瘤效应、毒副作用如何等问题,为临床肿瘤治疗寻找新型有效药物。

1 材料与方法

1.1 主要药物与试剂

Genistein(Sigma),溶于二甲基亚砜,加RPMI 1 640配成100 μg/ml,0.22 μm微孔滤膜过滤(现用现配)。^{3}H-TdR购自中科院原子核研究所。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株MCF-7(ER+)、MDA-MB-231(ER-),本室徐辉博士惠赠。培养条件:RBMI1 640,10%NBS,100 U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素,5%CO_2、饱和湿度37 ℃;正常人小肠上皮细胞株IEC-6,本室刘晓宏老师惠赠。培养条件基本同上,8%CO_2;小鼠骨髓基质祖细胞(CFU-F)、粒巨系祖细胞(CFU-GM),按文献[4]方法自行分离培养。

1.3 实验方法

1.3.1 Genistein对5种不同组织细胞作用选择性的研究

MTT法:MCF-7、MDA-MB-231、IEC-6细胞以5×10^3/孔接种于96孔培养板,调Genistein终浓度为0~200 μmol/L,常规MTT法测各孔OD值,计算细胞存活率。集落形成法:调整小鼠骨髓基质细胞密度为2×10^6/ml,取细胞悬液加入35 mm培养皿中,每皿2 ml,分别按前述CFU-F、CFU-GM培养条件加入培养体系,并加入Genistein溶液(终浓度0~200 μmol/L),CO_2孵箱内培养相应时间后镜下计数细胞集落数。计算各组IC_{50}值。

1.3.2 Genistein与^{60}Coγ射线对MCF-7细胞增殖抑制作用的影响

基金项目:重庆市院士基金资助项目(6317)
作者简介:杨峥嵘(1973-),男,湖南省邵阳市人,博士研究生,主要从事肿瘤生物治疗、防原医学方面的研究。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-06-20;修回日期:2001-09-12

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

1.3.2.1　细胞生长曲线的测定　　MCF-7 细胞以 5×10^4/孔接种 24 孔板, 常规培养 24 h 细胞贴壁后, 设正常对照、单纯给药、单纯照射、照前给药、照后给药 5 组, 每组 6 个以上平行孔。给药方式: Genistein 100 μmol/L 处理 24 h; 给药时间: 单纯给药、照前给药组为照前 24 h(0 h), 照后给药组于照后 30 min 内立即给药; 照射方式: ^{60}Coγ 射线 18 Gy 一次性照射, 距离 1 m, 剂量率 0.589 Gy/min。分别于 0、24、48、72、96 h 用台盼蓝染色, 计数活细胞数量, 绘制生长曲线。

1.3.2.2　^{3}H-TdR 掺入实验　　细胞培养与分组同上, 按文献[5]方法, 分别于上述时相点常规收获细胞, 每个时相收获细胞前 6 h 加入 ^{3}H-TdR (0.5 μg/孔), 液体闪烁计数仪测定每分脉冲数(cpm)。

1.3.2.3　流式细胞仪分析　　细胞培养与分组基本同上, 单纯给药组设为 20、50、100 μmol/L 三个浓度。分别在照后 12、24、48、72 h 消化收集细胞, 70%冷乙醇固定, 碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪(FACStar, USA)488 nm 常规检测细胞周期、细胞凋亡情况。

1.4　统计学处理

文中计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 统计软件进行统计处理, 作方差齐性检验、方差分析、t 检验等。

2　结果

2.1　Genistein 对 5 种不同组织细胞杀伤作用的选择性

如图 1、2, Genistein 对 IEC-6、MCF-7、MDA-MB-231、CFU-F 与 CFU-GM 的 IC_{50} 分别为 30.8、23.1、12.7、63.8、52.32 μmol/L。按选择性大小排序为: MDA-MB-231 > MCF-7 > IEC-6 > CFU-GM > CFU-F。

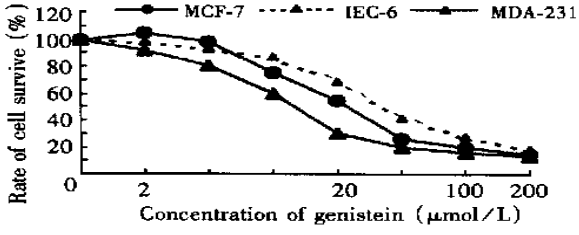


图 1　选择性抗增殖实验(MTT 法)

Fig 1　Test of selective anti-proliferation (MTT method)

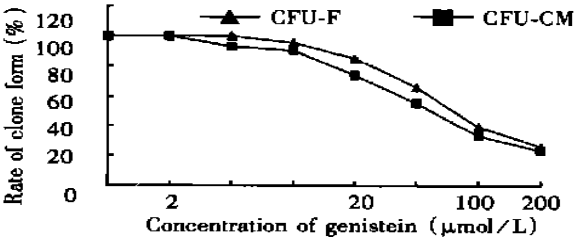


图 2　选择性抗增殖实验(集落形成法)

Fig 2　Test of selective anti-proliferation (Colony forming assay)

2.2　Genistein 及γ射线对 MCF-7 细胞生长状况的影响

图 3 可以看出, 48 h 以后, 照后给药(100 μmol/L)组 MCF-7 细胞的增殖明显受到抑制, 细胞数较其它各组均明显减少($P<0.01$), 且时间越长, 相对减少越明显。而照前给药与单纯照射或单纯给药比较, 细胞数无显著性差异($P>0.05$)。

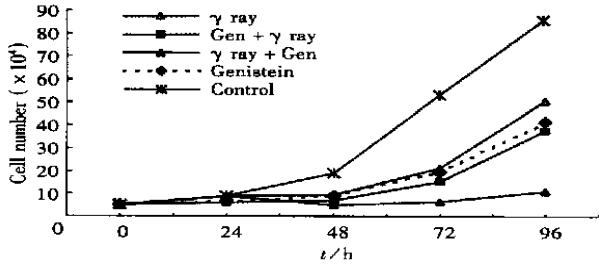


图 3　Genistein 与γ射线对 MCF-7 生长曲线的影响

Fig 3　Effect of genistein and γ ray irradiation on the growth curve of MCF-7

2.3　Genistein 及γ射线对 ^{3}H-TdR 掺入率的影响

由表 1 可知, Genistein 给药 100 μmol/L 明显抑制 MCF-7 细胞 DNA 合成; 48 h 以后, 照后给药组细胞的 ^{3}H-TdR 掺入率仍明显低于其它各组, 且时间越长相对降低越明显。照前给药与单纯照射或等剂量单纯给药组比较无显著性差异($P>0.05$)。

表 1　Genistein 及γ射线对 ^{3}H-TdR 掺入率的影响($\times10^3$ cpm/10^6 cell)

Tab 1　Effect of genistein and γ ray in the incorporative rate of ^{3}H-TdR ($\times10^3$ cpm/10^6 cell)

Treatment	Control	γ ray	Genistein	γ ray+Genistein	Genistein+γ ray
0 h	1.44±0.14	1.42±0.18	1.42±0.15	1.43±0.15	1.45±0.09
24 h(Irradiate)	2.52±0.25	2.56±0.21	0.83±0.22	2.60±0.18	0.84±0.20
48 h	4.87±0.31	2.69±0.26	1.18±0.20	0.63±0.18**	0.95±0.23
72 h	5.43±0.49	4.22±0.88	2.66±0.62	0.70±0.19**	2.57±0.26
96 h	5.56±0.62	5.46±0.97	4.43±1.05	1.38±0.37**	4.25±0.45

**: $P<0.01$ *vs* other groups

2.4　Genistein 单纯给药的流式仪分析

如表 2, 与对照组相比, 20~100 μmol/L 不同浓度 Genistein 处理 24 h 后, G_2/M 期细胞显著增多(由 7.78%→54.35%), S 期细胞显著减少(54.84%→21.02%), 且 Genistein 浓度越高, 作用时间越长, 这种作用越强; 其中较低浓度(20~50 μmol/L)处理 24 h, G_1 期细胞比例有所上升, 但较高浓度(100 μmol/L)下则主要表现为 G_2/M 期细胞的大量增多, 同时出现细胞凋亡(10.84%)见图 4。各组细胞换回正常培养液 24 h 后均开始向正常周期分布恢复。

2.5　γ射线照射的流式仪分析

如表 3、图 4, 各照射组照后可观察到 S 期比例下降、G_1 期上升趋势, 以照后 24 h 最明显。与未处理组比较, 单照组细胞 S 期比例显著下降(54.84%→8.48%), G_1 期显著增高(37.38%→69.07%), 并出现少量细胞凋亡(0.84%), 至照后 72 h 又基本恢复正常对数期的周期分布。与单照、照前给药组比较, 照后给药组照后 24 h 内 G_2/M 期细胞明显增高, 至照后 72 h 仍显著高于其它组, 同时照后 24~48 h G_1 期细胞明显少于单纯照射组, 并出现较大数量的细胞凋亡(最高达 24.40%); 照前给药组主要表现为存活的 S 期细胞明显多于单照与照后给药组(22.50% *vs* 8.48%、11.07%), 同时, 照后 24~48 h 亦出现一定数量的细胞凋亡。

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

表 2 Genistein 给药对 MCF-7 细胞周期的影响(%)

Tab 2 Effect of genistein in the cell cycle of MCF-7 cells(%)

Concertration(μmol/L)	0			20.0			50.0			100.0		
	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M
12 h	36.35	55.67	7.98	39.18	48.76	12.06	41.84	44.68	15.48	30.31	38.63	31.06
24 h	37.38	54.84	7.78	42.51	39.86	17.63	48.10	23.90	28.00	24.63	21.02	54.35
48 h	40.82	45.56	13.62	40.67	42.94	16.49	44.88	24.05	31.07	28.46	35.37	36.17
72 h	44.78	49.26	5.96	43.01	48.73	8.26	41.77	33.95	24.18	38.35	45.69	15.96

表 3 Genistein 结合 ^{60}Co γ 射线 18 Gy 照射对 MCF-7 细胞周期分布的影响(%)

Tab 3 Effect of genistein combined irradiation of γ ray (^{60}Co, 18 Gy) in cell cycle of MCF-7(%)

	Control			γray			Genistein+ γray			γray+ Genistein		
	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M	G_1	S	G_2/M
12 h	43.35	49.67	6.98	58.84	26.47△△	15.69△△	49.29	28.50	22.31	49.75	26.29	23.96
24 h	37.38	54.84	7.78	69.07△△	8.48△△	22.45△△	60.58	22.50▲▲	11.92▲	48.80▲	11.07▲	40.13**▲
48 h	40.82	49.56	9.62	65.05	15.96△△	18.99	54.76	42.45▲▲	16.79	43.27▲	28.75	26.97▲
72 h	44.78	49.26	5.96	38.12	52.64	9.24	37.61	52.63	10.76	42.18	39.75	18.07▲▲

△△ $P<0.01$ *vs* control; ** : $P<0.01$ *vs* Genistein+γ ray; ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* γ ray

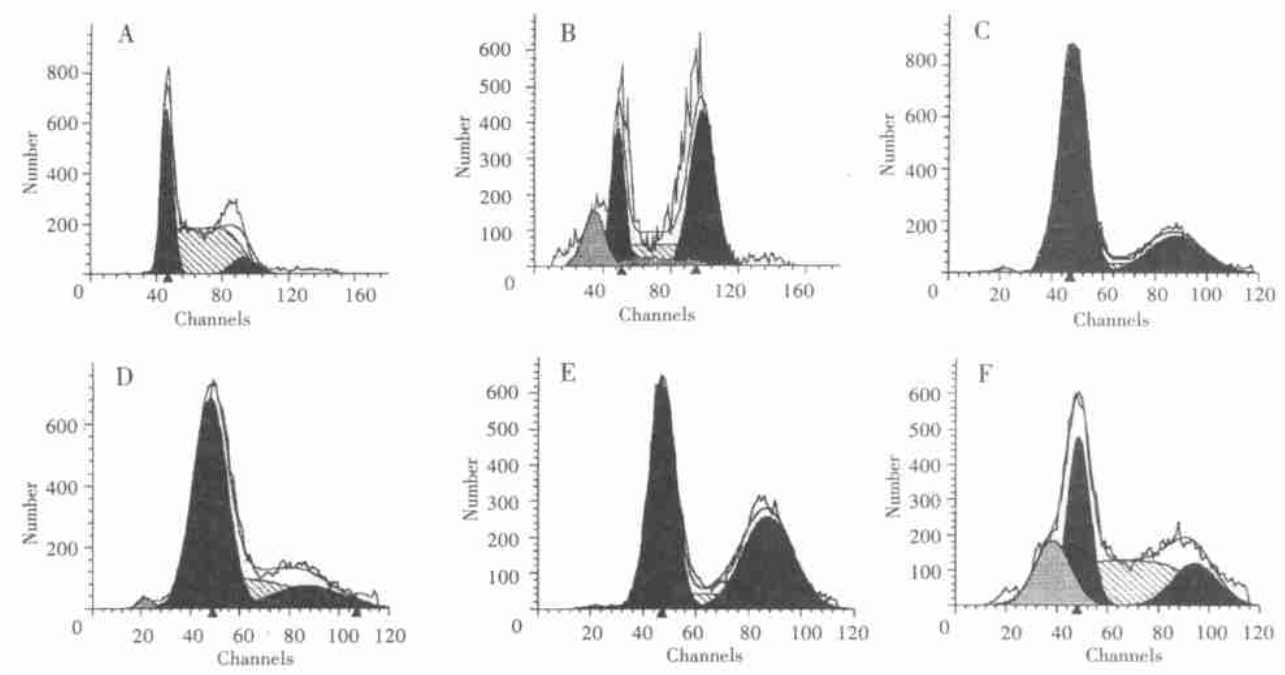


图 4 MCF-7 细胞周期和凋亡流式仪分析图

Fig 4 Cell cycle and cell apoptosis of MCF-7 with FCM analyses

A: Normal MCF-7 cell; B: 24 h after genistein administration (G_2/M 54.35%, apoptosis 10.84%); C: 24 h after irradiation (G_1 69.07%, S 8.48%); D: 24 h after Genistein+ γ ray (G_1 66.58%, G_2/M 13.79%); E: 24 h after γ ray+ Genistein (G_2/M 40.13%); F: 48 h after γ ray+ Genistein (Apoptosis 24.40%)

3 讨论

肿瘤化疗中常见副作用是药物对正常组织的毒性。造血组织、小肠上皮等增殖活性高,往往是抗癌药毒性的主要靶细胞,因此,测定其体外培养条件下的增殖能力可反映药物对正常组织的毒性作用[5]。本实验结果证实 Genistein 对乳腺癌细胞有良好的选择性。综合已有文献报道,在浓度达到 20~30 μmol/L 以上时,Genistein 对多种肿瘤细胞可产生明显的生长抑制作用[6~10],远低于本实验测得其对 CFU-F、CFU-GM 的 IC_{50} 值,说明该药物对骨髓造血的毒副作用非常小。我们也注意到:与造血组织比较,肠上皮细胞 IEC-6 在离体实验中对 Genistein 相对敏感,提示在体实验中应加强对肠上皮组织的观察,以进一步分析 Genistein 对肠上皮可能的抑增殖作用。此外,本实验还证实 Genistein 对 ER− 的 MDA-MB-231 细胞亦有抑制作用,说明 Genistein 抑瘤范围并不仅限于 ER+ 的细胞。

近年来,许多文献报道 Genistein 有中等强度氧自

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

由基清除能力及一定的抗辐射致突、致癌作用, 适当浓度 Genistein 预处理可减轻 DNA 因紫外氧化受损, 抑制 c-fos、c-Jun 等原癌基因表达[1,2,9]。但 1997 年 Van 等报道了在 X 线照射后的肝细胞瘤细胞 H35 中加入 Genistein, 可使照射致死效果大幅提高的现象, 并推测系 Genistein 抑制了 topoisonerase Ⅱ酶活性, 减少了辐射损伤 DNA 的修复和复制所致[6]。Van 与其他学者的结果之间似乎有些矛盾, 但并未引起足够重视, Genistein 与辐射联合究竟什么情况下保护细胞免遭氧化损伤, 什么情况下起杀伤作用, 至今未见系统报道。基于临床 ER+乳腺癌占 60%以上, 本实验中, 我们选择 ER+乳腺癌细胞 MCF-7 为研究对象, 利用细胞计数及 ^{3}H-TdR 掺入法对照前、照后不同浓度 Genistein 给药结合 γ 射线 18Gy 一次性照射的体外抑瘤效果进行了一系列对比, 结果证实: Genistein 照后给药抑制 MCF-7 细胞 DNA 合成与细胞增殖的作用远大于等剂量照前给药、单纯照射及单纯给药。但照前给药组与单纯照射、单纯给药组间差别不显著。因而我们初步认为: Genistein 照后给药与 γ 射线照射可能具有协同效应。

通过 FCM 分析我们进一步发现: ①γ 射线 18Gy 一次性照射主要引起 MCF-7 细胞 G_1 期阻滞, 较低浓度(20 ~ 50 μmol/L)Genistein 单纯给药可导致 G_1、G_2/M 期细胞同时增多, 较高浓度(100 μmol/L 以上)时则主要引起 G_2/M 期阻滞, 并诱发细胞凋亡; ②与照前给药组和单纯照射组相比, 照后 24 ~ 48 h, Genistein 照后给药组的 G_1 期细胞比例更低, 引起的 G_2/M 周期阻滞更明显, 而诱发细胞凋亡作用也更强, 与药物抑瘤效果直接相关。提示这可能也是照后给药显著提高照射抑瘤效果的分子机制之一。关于 Genistein 照前、照后给药为何在影响 MCF-7 细胞周期分布上出现差别的原因, 我们认为客观上与照前给药是在 G_2/M 期阻滞基础上发生 G_1 期阻滞, 而照后给药为先 G_1 期阻滞后 G_2/M 期阻滞有关。

综上所述, Genistein 照后给药在离体实验中可显著提高照射抑瘤效果, 并对造血细胞有着突出的安全低毒的优点。与目前临床常用的肿瘤化疗药物如环磷酰胺、顺铂等比较, 虽然抑瘤作用较弱, 但其毒副作用远低于上述药物, 且作用途径广泛, 理论上可对所有肿瘤起作用, 不易产生耐药性[9], 故可能有着良好的开发应用前景。我们推测: Genistein 照后给药可能与放射有协同效应, 作用机制部分与照后给药引起了显著的 G_2/M 期抑制及细胞凋亡有关。当然, 由于体内影响因素众多, 非单纯体外实验所能代替, 此推测尚待动物实验的进一步证实。

参考文献:

[1] Wei H, Cai Q, Rahn R O, *et al*. Inhibition of UV light and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(1): 73－77.

[2] Wang Y, E Y, Zhang X, *et al*. Inhibition of ultraviolet B(UVB)-induced c-fos and c-jun expression in vivo by a tyrosine kinase inhibitor genistein [J]. Carcinogenesis, 1998, 19(4): 649－654.

[3] Van Rijn J, van den Berg J. Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(10): 1 775－1 785.

[4] 罗成基, 裴雪涛, 主编. 造血微环境－基础与临床[M]. 北京: 世界医药出版社, 2001. 448－502.

[5] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996. 193－194.

[6] Shao Z M, Wu J, Shen Z Z, *et al*. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells[J]. Cancer Research, 1998, 58(1): 4 851－4 859.

[7] Joanne N, Brahmchetna S, Mahbubur B, *et al*. Genistein-induced upregulation of p21waf1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate calls[J]. Nutrition And Cancer, 1998, 32(2): 123－131.

[8] 杨峥嵘, 粟永萍. Genistein 与肿瘤防治[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(s6): 17－19.

[9] Constantinou A I, Krygier A E, Mehta R R. Genistein induces maturation of human cancer cells and prevents tumor growth in nude mice[J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(6 Super1): s1 426－s1 430.

[10] Kaufmann W K. Human topoisomerase Ⅱ function, tyrosine phosphorylation and cycle checkpoints[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(3): 327－334.

(编辑　潘式文)

(上接 61 页)

性贫血, 严重时三系亦同时降低, 与感染时的毒性作用有关, 同时, 粒细胞可能对血管壁具有粒附亲和性, 造成粒细胞的外源性减少。

综上, 感染患者的全血有形成份降低, 以较重的结核及伤寒多见, 其发病原因与结核菌素及伤寒杆菌的内毒素作用于骨髓造血细胞或微环境, 造成骨髓造血功能受毒性抑制。重症败血症由于粒细胞耗竭、细菌毒素作用使血象下降, 但 NAP 的高积分及粒细胞的中毒样改变仍提示严重感染, 且红系及巨核系的改变亦提示骨髓功能受损。

关键词: 全血有形成份; 感染; 结核; 伤寒; 败血症

中图法分类号: R552　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 宋文秀, 周振业, 主编. 贫血基础与临床[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1994. 90－91.

[2] Krantz S B. Pathogenesis and treatmeat of the anemia of chronic disease [J]. Am J Med Sci, 1994, 307(5): 353.

[3] 戴自英, 陈灏珠, 丁训杰, 主编. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 127.

[4] 宋文秀, 陈宗铠, 王晓明, 等. 发热、贫血、外周血出现原始及幼稚粒细胞[J]. 中华血液学杂志, 1998, 2(19): 105－106.

[5] 丁训杰, 沈　迪, 林宝爵, 等. 主编. 实用血液病学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1992. 419－420.

(编辑　刘　鹏)

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