DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.032
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
434 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0434-03

大豆异黄酮抑制 Bcap-37 细胞增殖与 TGF-β 关系的研究

杨镇洲[1],糜漫天[1],朱俊东[1],张乾勇[1],熊继光[2] ([1]第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038;[2]重庆市药剂学校药用植物教研室,重庆 400030)

提 要:目的 探讨大豆异黄酮抑制 Bcap-37 人乳腺癌细胞增殖时 TGF-β 和 TGF-β 受体表达的改变。方法 以二羟异黄酮、三羟异黄酮处理 Bcap-37 细胞,采用 TGF-β 拮抗试验、免疫细胞化学和逆转录聚合酶链式反应等实验方法,检测大豆异黄酮作用后 Bcap-37 人乳腺癌细胞 TGF-β_1、TGF-β_2 及受体表达的变化。结果 3×10^{-5} mol/L 三羟异黄酮作用后 Bcap-37 细胞 TGF-β_1、TGF-β_2 及受体表达增强,而二羟异黄酮处理组其表达无明显改变。结论 三羟异黄酮抑制 Bcap-37 细胞增殖同时伴有 TGF-β_1、TGF-β_2 及受体表达增强。

关键词:大豆异黄酮;乳腺癌;转化生长因子β
中图法分类号:R151.2;R329.25 文献标识码:A

Antiproliferative effect of soybean isoflavone on Bcap-37 cells and its relation with transforming growth factor β

YANG Zhen-zhou, MI Man-tian, ZHU Jun-dong, ZHANG Qian-yong, XIONG Ji-guang (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of TGF-β and TGF-β receptor in human breast cancer cell Bcap-37 inhibited by soybean isoflavones. Methods mRNA and protein of TGF-β_1、TGF-βRⅠ in Bcap-37 cells were examined with reverse transcription ploymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry after cells were treated with daidein or genistein for 1—4 d. The expression of TGF-β_1 and TGF-β_2 was determined with TGF-β resistance test. Results The TGF-β_1, TGF-β_2 and TGF-β recepor increased in Bcap-37 cells at a concentration of 3×10^{-5} mol/L of genistein. No changes was found when treated with daidzein. Conclusion Genistein may inhibit the proliferation of Bcap-37 cells and accompany with increasing expression of TGF-β_1, TGF-β_2 and TGF-β receptor.

Key words: soybean isoflavones; breast cancer; TGFβ

食物中非营养成分的抗癌作用研究是近年来肿瘤预防研究的重要领域。大量资料表明大豆具有抗癌作用,尤其是对乳腺癌的预防作用引人注目,初步认为大豆中的非营养成分大豆异黄酮(Soybean isoflavones)可能是其主要抗癌有效成分,但其作用机制尚不清楚[1~3]。业已发现大豆异黄酮是肿瘤细胞增殖信号传导通路中生长因子受体酪氨酸蛋白激酶(TPK)的抑制剂[4],然而肿瘤细胞的增殖信号传导是一个极其复杂的信号网络,已经证实含丝氨酸蛋白激酶(SPK)活性的TGF-β 受体信号系统中TGF-β 是一类重要的生长负调节因子,其缺乏在乳腺癌的发展过程中起重要作用[5]。现已进入临床试用的抗雌激素药物他莫西芬治疗乳腺癌的作用机制之一就是诱导乳腺癌细胞自分泌TGF-β,刺激 TGF-β 受体表达[6]。提示同样具有抗雌激素性质的大豆异黄酮抑制乳腺癌细胞增殖可能也与TGF-β 系统有关。本研究选择国内建株的人乳腺癌细胞 Bcap-37 为实验对象,通过对两种大豆异黄酮:二羟异黄酮(Daidzein)和三羟异黄酮(Genistein)抑制乳腺癌细胞增殖过程中 TGF-β 及受体表达变化的研究,阐明TGF-β 系统在大豆异黄酮抑制人乳腺癌细胞增殖中的作用,对揭示大豆异黄酮抗癌的作用机制有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 二羟异黄酮和三羟异黄酮(Sigma 公司产品),兔抗TGF-β_1和 TGF-β_2、兔抗 TGF-βRⅠ(Santa Cruz 公司产品),通用型 S-P 试剂盒(Zymed 公司产品),TriPureTM 分离试剂、RT-PCR 一步法 C. Therm. Polymerase 试剂盒(Boehringer Mannheim 公司产品),β-Actin 和 TGF-β_1 引物(由上海 Sangon 公司合成),GeneRulerTM 50bp DNA Ladder。

1.1.2 仪器 Beckman 紫外分光光度计,PTC-100TM 型 PCR 仪,Olympus BH-2 型显微摄影仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Bcap-37 人乳腺癌细胞株购自中科院上海细胞所。细胞在含 10% 热灭活小牛血清、每毫升培养基中含 5 μl 胰岛素的 RPMI-1640 培养液中常规培养传代。二羟异黄酮和三羟异黄酮分别溶于二甲基亚砜(DMSO),处理细胞浓度为 3×10^{-5} mol/L,对照组培养液中仅含相应浓度的 DMSO(0.05%)。

1.2.2 TGF-β_1 和 TGF-β_2 拮抗试验 以 5×10^4/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板中,设对照组(C)、Genistein+抗 TGF-β_1 处理组(G+Anti 1)、Genistein+抗 TGF-β_2 处理组(G+Anti 2)、Daidzein+抗 TGF-β_1 处理组(D+Anti 1)、Daidzein+抗 TGF-β_2 处理组(D+Anti 2)(TGF-β_1、TGF-β_2 抗体终浓度均为2 mg/L),Genistein 处理组(G)、Daidzein 处理组(D)(Genistein 和 Daidzein 剂量是 30 μmol/L),处理 24、48、72、96 h,每一剂量组设 6 个平行孔,于每个时相收获细胞前 6 h 加入 ^{3}H-TdR(1.85×10^4 Bq/孔),常规收获细胞,测 dps 值(单位:Bq)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770649)
作者简介:杨镇洲(1970—),男,浙江省浦江人,硕士研究生,助教,主要从事营养与肿瘤方面的研究,现在附属大坪医院野战外科研究所血液肿瘤科,重庆 400042。电话:(023)68757449
收稿日期:2000-05-11;修回日期:2000-09-02

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

1.2.3　人乳腺癌细胞 TGF-βRⅠ蛋白检测　　用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(Streptavidin-peroxidase conjugated method)。取已处理 1~2 d 直接长于盖玻片上的对照组、二羟异黄酮和三羟异黄酮处理组 Bcap-37 细胞, 用中性树胶固定于载玻片。免疫细胞化学染色详细操作按试剂盒说明书进行。

阴性对照时一抗以 0.01 mol/L PBS 代替。结果判定: 免疫细胞化学阳性标记为棕黄色, TGF-βRⅠ阳性信号位于胞浆和胞膜上, 按显色的有无和强弱分为: 阴性(无显色); 阳性(个别视野有较弱的阳性反应); 强阳性(阳性细胞多见, 着色深)。

1.2.4　TGF-β_1 mRNA 检测　　TGF-β_1 引物根据 Aizen 等[7] 的设计合成: 上游引物 5' GCCCTGGACACCAACTATTGCT 3'; 下游引物 5' AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG 3'。用这对引物可特异性扩增出 161 bp 的 TGF-β_1 产物。为进行质控, 每次行 RT-PCR 时, 都对应扩增 348 bp 的人 β-Actin 作为内参照, β-Actin 引物序列为: 上游引物 5' TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 3'; 下游引物 5' TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'。参照 RT-PCR 一步法试剂盒操作说明书。将试剂盒中各反应管解冻后置于冰上, 短暂旋涡振荡后离心。加 100% DMSO 2.5 μl, 100 mmol/L DTT 2.5 μl, 40 U/μl RNAase 抑制剂 0.5 μl, dNTP 混合物(10 mmol/L/样) 2 μl, 上游引物、下游引物各 2 μl(终浓度 0.3 μmol/L), RNA 5 μl(5 μg), 5× RT-PCR 反应缓冲液(12.5 mmol/L $MgCl_2$、10% DMSO)10 μl, 1× C. Therm. Polymerase 混合物 2 μl, 无菌水 21.5 μl。短暂离心后用 30 μl 石蜡油覆盖, 72 ℃孵育 30 min 进行 RT 反应。PCR 反应所需变性、退火和延伸温度、时间分别为 94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min, 共 35 次循环, 首次循环 94 ℃需 2 min。最后 72 ℃延伸 7 min。反应完成后取 5 μl PCR 产物, 以 GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder 为分子量标准, 行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3　统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPLM 软件进行方差分析处理。

2　结果

2.1　拮抗 TGF-β 对 Bcap-37 细胞 ^{3}H-TdR 掺入的影响

TGF-β 拮抗实验结果表明, TGF-β_1 和 TGF-β_2 拮抗组与处理组比较, 三羟异黄酮+抗 TGF-β 组 DNA 合成能力显著增强($P<0.01$), 而二羟异黄酮+抗 TGF-β 组 DNA 合成能力无明显改变($P>0.05$), 见图 1。

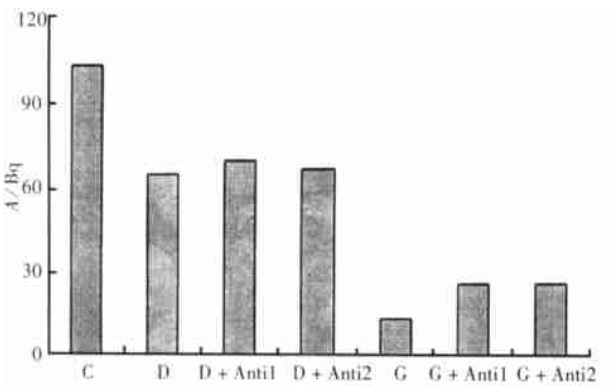


图 1　大豆异黄酮处理组拮抗 TGF-β 2 d 后 Bcap-37 细胞 ^{3}H-TdR 掺入率

Fig 1　^{3}H-TdR incorporation rate of Bcap-37 cells in soybean isoflavone groups after anti-TGF-β for 2 d

2.2　人乳腺癌细胞 TGF-βRⅠ蛋白变化的比较

三个处理组均表达 TGF-βRⅠ蛋白, 阳性细胞为细胞浆和胞膜着色, 对照组和二羟异黄酮处理组 TGF-βRⅠ蛋白呈阳性反应, 但未见明显差异; 而三羟异黄酮处理组表达 TGF-βRⅠ蛋白则明显增强, 呈强阳性反应。见图 2。

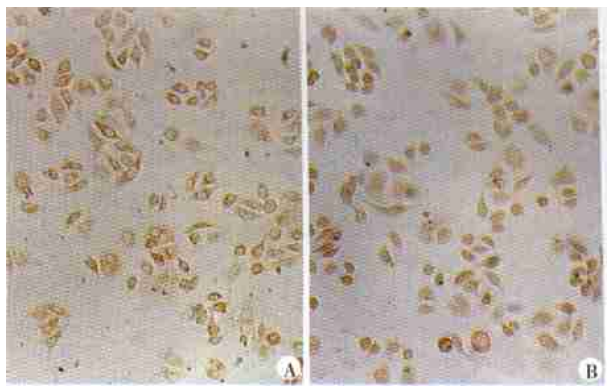


图 2　大豆异黄酮处理 2 d 后 Bcap-37 人乳腺癌细胞 TGF-βRⅠ免疫组化染色　(S-P× 200)

A: 二羟异黄酮; B: 三羟异黄酮

Fig 2　Immunohistochemical staining of TGF-βRⅠ in Bcap-37 cells treated with soybean isoflavone for 2 days　(S-P× 200)

A: Daidzein; B: Genistein

2.3　各组 TGF-β_1 mRNA 变化的比较

对照组 TGF-β_1 mRNA 的表达较弱, 二羟异黄酮处理组的信号强度与对照组类似, 而三羟异黄酮处理组, 其表达显著增强, 见图 3。

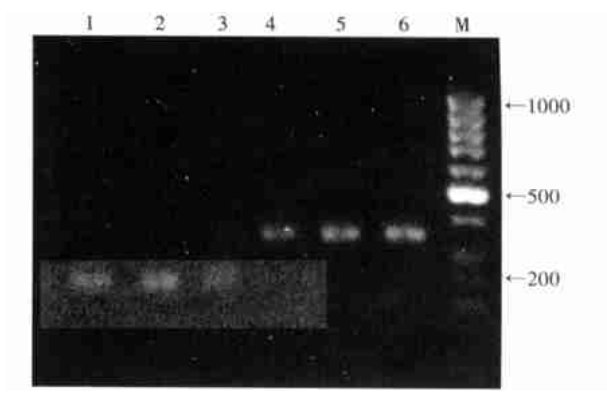


图 3　大豆异黄酮作用后人乳腺癌细胞 TGF-β_1 mRNA 的表达

Fig 3　Expression of TGF-β_1 mRNA in Bcap-37 cells treated with isoflavones　1: Daidzein; 2: Genistein; 3: Control; 4, 5, 6: β-Actin; M: Marker

3　讨论

流行病学调查资料显示, 亚洲地区人群的乳腺癌、前列腺癌和结肠癌的发病率显著低于西方发达国家, 近年来有研究者提出, 大豆消费量增加是这类癌症低发的主要原因[8]。目前认为大豆的抗癌作用主要归因于其中所含的非营养成分异黄酮的效应[9]。大豆的异

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

黄酮类主要是糖苷结合形式的染料木苷和黄豆苷两种，机体摄入豆制品后，染料木苷和黄豆苷在肠道细菌作用下脱去糖苷配基部分，释放出有生物活性的三羟异黄酮和二羟异黄酮，然后被机体肠道有效吸收。有关大豆异黄酮的抗癌作用研究主要是围绕三羟异黄酮进行的，对二羟异黄酮的作用研究较少。本研究通过TGF-β 拮抗试验、免疫细胞化学和逆转录聚合酶链式反应等方法研究了二羟和三羟异黄酮对国内建株的Bcap-37 人乳腺癌细胞表达 TGF-β 的影响，目的在于阐明TGF-β 系统在大豆异黄酮抑制人乳腺癌细胞增殖中的作用。结果表明 3×10^{-5} mol/L 三羟异黄酮作用后，Bcap-37 细胞 TGF-β_1、TGF-β_2 及受体表达显著增强。

自 1987 年 Akiyama[4] 首次报道了三羟异黄酮是一种有效的酪氨酸蛋白激酶(PTK)抑制剂以来，关于大豆异黄酮抗癌的动物和体外实验资料激增，但是迄今为止其作用机制尚未完全阐明。转化生长因子-β(TGF-β)是一类具有多种生物学功能的细胞因子，它参与并调节许多生物学反应过程。TGF-β 受体是组成型具有丝氨酸蛋白激酶(SPK)活性的受体，在调控细胞增殖过程中有重要作用。TGF-β 的重要生物学功能之一就是抑制肿瘤细胞增殖，目前已进入临床试用的抗雌激素药物他莫西芬(Tamoxifen)治疗乳腺癌的作用机制之一就是诱导乳腺癌细胞自分泌 TGF-β，刺激 TGF-β 受体表达，从而抑制乳腺癌细胞增殖，阻止乳腺癌进一步发展。这提示同样具有抗雌激素性质的大豆异黄酮抑制乳腺癌细胞增殖可能也与 TGF-β 系统作用有关。前面我们的实验已证实大豆异黄酮对 Bcap-37 乳腺癌细胞的增殖具有抑制作用，本结果显示，三羟异黄酮在相同的作用剂量(3×10^{-5} mol/L)下可使 Bcap-37 细胞 TGF-β_1、TGF-β_2 及受体表达增强，提示大豆异黄酮通过诱导 TGF-β 和 TGF-β 受体表达的增加而抑制人乳腺癌细胞 Bcap-37 增殖是一可能的重要分子机制。

参考文献：

[1] Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, *et al*. Genistein arrest cell cycle progression at G2-M[J]. Cancer Res, 1993, 53(6): 1 328—1 331.

[2] Pagliacci M C, Smacchia M, Migliorati G, *et al*. Growth inhibitory effect of the natural phyto-estrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Eur J Cancer, 1994, 30A(11): 1 675—1 682.

[3] Adlercreutz H, Goldin B R, Gorbach S L, *et al*. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk[J]. J Nutr, 1995, 125(3 Suppl): 757s—770s.

[4] Akiyama T, Ishida J, Nakagama S, *et al*. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase[J]. J Biol Chem, 1987, 262(12): 5 592—5 595.

[5] Wakefield L M, Colletta A A, Mccune B K, *et al*. Roles for transforming growth factors-beta in the genesis, prevention, and treament of breast cancer [J]. Cancer Treat Res, 1992, 61: 97—136.

[6] Butta A, Maclennan K, Flanders K C, *et al*. Induction of transforming growth factor β_1 in human breast cancer *in vivo* following tamoxifen treatment [J]. Cancer Res, 1992, 52(15): 4 261—4 264.

[7] Aizen J M, Anupama M, Athir J M, *et al*. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-β as prognostic factors in breast carcinoma[J]. Int J Cancer, 1997, 74: 492—501.

[8] Setchell K D R, Borriello S P, Hulme P, *et al*. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease[J]. Am J Clin Nutr, 1984, 40(3): 569—578.

[9] Mousavi Y, Adlercreutz H. Genistein is an effective stimulator of SHBG production in Hep-G_2 human liver cancer cells and suppresses proliferation on these cells in culture[J]. Steroids, 1993, 58(7): 301—304.

（编辑 薛国文）

（上接 433 页）

白、细胞数正常，于 2000 年 4 月 28 日好转出院。

讨论

双侧周围性面瘫发病极少见(特指 4 周内相继出现的双侧面瘫)。据统计其发病率国外约占面瘫的 0.3%～2%；国内为 0.5%。多见于格林-巴利综合征、双侧中耳炎、脊髓前角灰质炎、进行性球麻痹、重症肌无力以及特发性面瘫。病毒感染是面瘫的常见致病因素之一，免疫学说认为：炎症过程和抗原抗体反应存在于贝尔氏面瘫，且由病毒启动[1]。动物实验发现[2]接种的病毒首先(前 3 d)影响同侧面神经，随之沿轴突上行至脑干，在脑子中弥散后影响对侧面神经(此需 4 d 以上时间)，此时中和抗体已产生，即免疫机制已形成。故用此可解释贝尔氏麻痹单侧多发、双侧罕见以及双侧发病有时间先后差别的原因。血管痉挛学说及神经源性学说认为：寒冷、病毒等使血管神经机能紊乱[1]，面神经肿胀、受压、缺血、髓鞘或轴索不同程度变性，神经内压明显升高，循环障碍而致面瘫。

我们观察到，急性期(即起病 7～14 d)，双侧面肌出现中、重度功能障碍，肌电图可见神经元性改变。面神经运动传导潜伏期延长。恢复期(2 周至 6 个月)，面肌功能不同程度恢复，但面神经运动传导潜伏期仍见延长，说明面肌功能恢复与电生理过程不完全同步。其原因可能是面神经失活是一种可逆的传导阻滞，当治疗解除神经失活后，面肌功能可恢复，此时神经末梢仍水肿，故电生理可见异常[3]。而双侧面瘫面肌恢复程度不同步。又与双侧发病先后、病程长短、神经变性程度、就诊是否及时密切相关。

双侧面瘫应重视原发病的治疗，由于发病率底，临床病理检查资料鲜见，其发病机制、预后以及与单侧面瘫的差别有待进一步观察。

关键词：双侧性；周围性面瘫；特点
中图法分类号：R745.12 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杜 洪，李哲生.169 贝尔氏面瘫的病因学说[J].国外医学：耳鼻咽喉科学分册，1993，17(3)：129—131.

[2] 孙臻峰，高志伟，许时晖.单纯疮疹病毒感染在鼠面神经瘫痪发病机理中的作用[J].国外医学：耳鼻咽喉科学分册，1997，21(4)：236.

[3] 敖华飞，王政敏.贝尔氏面瘫的时间过程[J].国外医学：耳鼻咽喉科学分册，1997，21(4)：236—237.

（编辑 潘式文）

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