

金雀异黄素对不同淋巴转移能力的小鼠肝癌细胞株的抑制作用

阮姝琴 李继承*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031)

摘要 MTT法检测大豆提取物金雀异黄素(genistein, Gen)对不同淋巴转移能力的腹水型小鼠肝癌细胞株HepA-H和HepA-L的生长抑制作用。应用电镜观察细胞形态和流式细胞术检测细胞凋亡。将HepA-H和HepA-L接种NIH小鼠, 制备荷瘤动物模型, Gen腹腔给药后第14天取淋巴结观察, 并计算转移率。TUNEL法检测淋巴结凋亡细胞, 并计算凋亡指数。实验发现: (1)Gen对两株细胞均具有良好的生长抑制作用, 且对HepA-H的抑制优于HepA-L; (2)Gen在体外诱导两株细胞发生凋亡, 且HepA-H的凋亡率高于HepA-L, 并呈量效关系; (3)Gen抑制荷瘤动物肿瘤生长和肿瘤淋巴转移, 且对HepA-H的抑制强于HepA-L, 实验组H的凋亡指数(3.87%)也显著高于实验组L(1.69%)。故研究认为Gen显著抑制HepA-H和HepA-L肝癌细胞淋巴转移的作用机制, 可能与诱导细胞凋亡有关, 对高淋巴转移细胞的抑制作用强于低淋巴转移细胞, 提示Gen抗肿瘤作用具有一定的选择性。

关键词 金雀异黄素; 肿瘤; 淋巴转移; 凋亡

金雀异黄素(genistein, Gen), 即5,7,4'-三羟基黄酮, 主要来自于大豆类食物, 是大豆异黄酮类化合物的主要成分。研究资料显示, Gen对多种不同来源的肿瘤具有较好的防治作用^[1]。肿瘤细胞转移是肿瘤治疗中最大的难题, 而淋巴转移是肿瘤最常见转移途径。Schleicher等^[2]和Hillman等^[3]在各自的研究中均观察到Gen能抑制癌细胞淋巴转移, 但并未解释其原因。且以前均未报道Gen对同一来源但不同转移能力肿瘤细胞的研究。本实验采用的高淋巴转移细胞株HepA-H和低淋巴转移细胞株HepA-L, 是本所对小鼠肝癌HepA腹水瘤细胞进行单细胞分离(克隆)培养和局部淋巴结转移筛选而建立。该HepA-H和HepA-L细胞株, 在生长、游走和贴壁能力等生物学特性方面具有明显的差异, 是研究肿瘤淋巴转移的有力工具^[4]。本文研究Gen抑制不同淋巴转移能力的肿瘤, 探讨其机制, 为Gen对肿瘤的预防和治疗, 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Gen购自陕西慧科植物开发有限公司, 纯度为98.2%, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解配

制成20 mg/ml储备液, 用培养液稀释至所需浓度, DMSO在各组培养液中的终浓度均为0.1%。四甲基唑氮蓝(MTT)为上海生工生物工程公司产品。RPMI1640培养基为Gibco BRL公司生产。小牛血清为杭州四季青生物工程研究所产品。碘化吡啶(PI)购自北京鼎国生物试剂公司。细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.2 细胞株 腹水型小鼠肝癌细胞株HepA-H和HepA-L, 为浙江大学细胞生物学研究所建立, 并保存^[4]。

1.1.3 动物 成年健康雌性NIH小鼠, 体重18~22 g, 由浙江大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 MTT实验 取对数生长期细胞接种于96孔板, 每孔100 μ l, 密度为 1×10^5 个/ml。加入不同浓度的Gen, 使其在细胞培养孔中的终浓度分别为20 mg/L、50 mg/L和100 mg/L, 每个浓度及对照组均设6个复孔, 以加有细胞而不含药物的培养液孔(含0.1% DMSO)为对照孔, 与实验孔平行设不

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-28

* 通讯作者。Tel: 0571-87217451, Fax: 0571-87217145, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

加细胞和药物, 而只加培养液(含 0.1% DMSO)为空白孔。在 37 °C、5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中, 培养 48 h 后, 分别取出培养板, 弃上清液; 每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 20 μl MTT, 继续培养 4 h, 弃上清液; 每孔加 100 μl DMSO 细胞溶解液, 震荡 15 min, 完全显色后, 用 Clinibio 公司 128-C 酶联免疫检测仪测定各孔的 A 值, 波长 492 nm, 并按下列公式计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率(%)=(1- 实验组 A 值 / 对照组 A 值)× 100%

1.2.2 细胞形态学观察 取对数生长期细胞与 Gen (50 mg/L) 共培养 48 h 后, 收集细胞, 按扫描电镜及透射电镜标本制样要求取材, 常规制样, 用 CAMBRIDGE STEREOSCAN 260 扫描电子显微镜和 PHILIPS TECNAI 10 透射电子显微镜观察和摄影。

1.2.3 细胞周期时相中 DNA 含量测定 取对数生长期细胞, 以 10⁵ 个/ml 密度接种于 50 ml 培养瓶中培养, 加入 Gen, 终浓度为 20 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L, 作用 48 h, PBS 洗涤, 4 °C 70% 乙醇固定 20 min, PBS 洗涤, PI(内含 RNase)染色 1 h, 过 400 目筛网, LSR 流式细胞仪测定(B-D 公司), 激发波长 488 nm。

1.2.4 动物实验分组及荷瘤动物模型的建立 清洁级 NIH 小鼠 48 只, 随机分为对照组 H、实验组 H(高淋巴转移)和对照组 L、实验组 L(低淋巴转移), 每组 12 只。Gen 以 2% 卵磷脂混悬, 于接种肿瘤细胞前一天小鼠腹腔给药, 剂量为每天 200 mg/kg, 共 14 天, 两对照组用等量生理盐水腹腔注射。以 HepA-H 和 HepA-L 细胞株, 小鼠腹腔传代。取腹腔接种 7 天的瘤性腹水, 用 D-Hanks 液洗涤 2 次, 细胞密度调至 1 × 10⁸ 个/ml, 给药第 2 天接种在小鼠左侧足垫内, 制作荷瘤动物模型。给药后第 7 天和第 14 天, 同一实验者用游标卡尺测量小鼠足垫肿瘤直径、横径和厚度(活体)。

肿瘤体积=(直径×横径×厚度)× π/6

给药后第 14 天处死小鼠, 取同侧膈窝淋巴结, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜观察, 并计算膈窝肿瘤转移率, 同时用 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)法检测凋亡细胞。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 按细胞凋亡检测试剂盒说明操作。光镜观察, 凋亡细胞核染色呈棕黄色。在 5 个高倍视野记数 1000 个肿瘤细胞中的阳性细胞, 每个视野细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)按以下公式计算:

AI=TUNEL 阳性细胞数 / 检测的总细胞数 × 100%(AI<1.5% 属低凋亡指数, AI ≥ 1.5% 属高凋亡指数)。

1.2.6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 统计软件对实验数据进行统计分析, 根据统计对象的特征选择统计方法。具有正态分布和方差齐性特征的数据组, 进行方差分析(多组均数的两两比较用 LSD-*t* 检验), 其余进行秩和检验, 率的比较用 χ^2 检验, *P*<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 Gen 对 HepA-H 和 HepA-L 的生长抑制作用

Gen 对 HepA-H 和 HepA-L 均具有较强的生长抑制作用, 呈量效关系(*P*<0.05)。Gen 对 HepA-H 抑制作用强于 HepA-L(图 1)。

2.2 Gen 对 HepA-H 和 HepA-L 凋亡的诱导作用

2.2.1 电镜下细胞形态的改变 正常对照的 HepA-H 比 HepA-L 细胞表面具有更丰富的微绒毛(图 2A, 图 2B)。在 50 mg/L Gen 作用 48 h 后, 两株细胞均发生收缩, 微绒毛显著减少甚至消失, 扫描电镜下可见细胞膜表面有泡状突起, 并可见分离出的凋亡小体(图 2C)。透射电镜下可见细胞膜完整, 胞浆空泡化, 核缩小变形, 染色质固缩, 常聚集于核膜(图 2D)。

2.2.2 细胞周期时相中 DNA 含量变化 HepA-H 和 HepA-L 凋亡率与 Gen 呈量效关系(*P*<0.01)(表 1), HepA-H 细胞的凋亡率明显高于 HepA-L 细胞(*P*<0.01), 100 mg/L 作用 48 h 后, HepA-H 的凋亡率达到 7.19%, 而 HepA-L 的凋亡率仅为 1.86%, 但细胞周期改变不明显。

2.3 Gen 在体内抑制 HepA-H 和 HepA-L 肝癌细胞淋巴转移的作用

2.3.1 Gen 对小鼠肿瘤体积的影响 实验第 7 天,

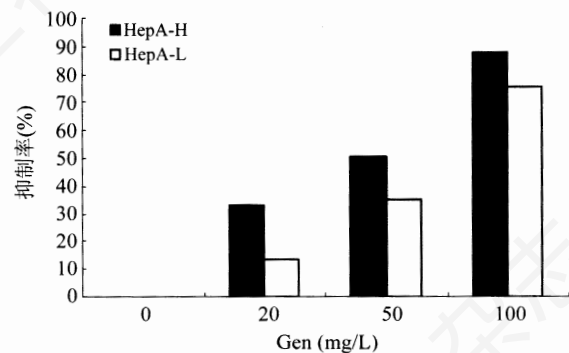


图1 Gen 对 HepA-H 和 HepA-L 增殖的抑制作用

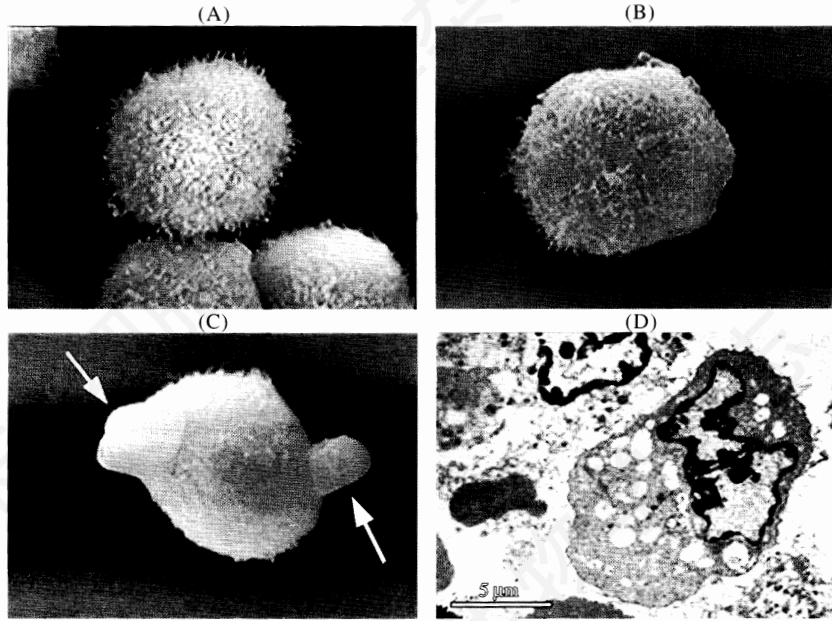


图2 电镜下的细胞形态

(A)正常 HepA-H 细胞, SEM, 6290 ×; (B)正常 HepA-L 细胞, SEM, 5950 ×; (C)50 mg/L Gen 处理 48 h 后, 凋亡小体形成(箭头所示), SEM, 6630 ×; (D)50 mg/L Gen 处理 48 h 后, 细胞染色质固缩, 细胞表面微绒毛消失, TEM, 3700 ×。

表1 HepA-H 和 HepA-L 细胞经不同浓度 Gen 作用 48 h 后的流式细胞术分析结果(%)

Gen(mg/L)		G ₁	S	G ₂	凋亡率(%)
0.00	H	27.19	43.78	29.03	0.00
	L	16.98	53.14	29.88	0.00
20.0	H	32.09	42.49	25.42	2.04
	L	11.48	60.35	28.17	1.19
50.0	H	32.11	42.67	25.23	2.41
	L	31.56	36.65	31.79	1.28
100.00	H	36.61	38.53	24.87	7.19
	L	34.54	46.70	18.75	1.86

表2 Gen 对腋窝淋巴结转移率的影响

分组	腋窝淋巴结转移	转移率(%)
对照组 H	11/12	91.67
实验组 H	3/12	25.00
对照组 L	3/12	25.00
实验组 L	1/12	8.33

实验组 H 与对照组 H 比较, 肿瘤体积有显著性差异 ($P < 0.05$)。第 14 天两实验组与各自的对照组比较, 均有显著性差异(实验组 H $P < 0.01$, 实验组 L $P < 0.05$), 且 Gen 对实验组 H 肿瘤体积的抑制作用大于实验组 L (图 3)。

2.3.2 Gen 对小鼠腋窝淋巴结转移的影响 两实验组的腋窝淋巴结肿瘤转移率, 比对照组明显降低, 有显著性差异 ($P < 0.01$) (表 2), 且 Gen 抑制实验组 H 淋巴转移的能力强于实验组 L。

2.3.3 腋窝淋巴结一般形态学观察 对照组肿瘤

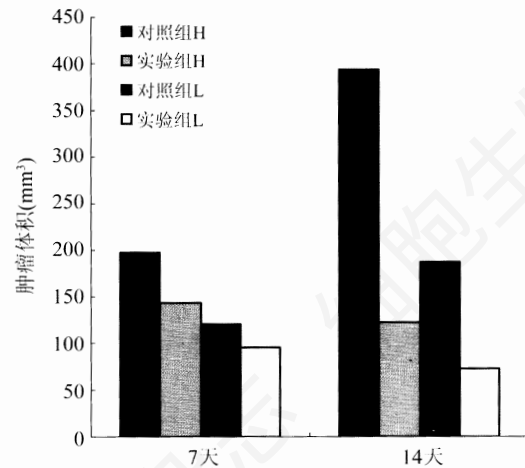


图3 Gen 对肿瘤体积的影响

细胞淋巴结转移时, 呈圆形或多边形, 体积较大, 大小较一致, 呈片状生长(图 4A); 在实验组, 有转移的淋巴结可见肿瘤细胞缩小, 呈圆形或卵圆形, 核浓缩, 呈巢状或散在生长(图 4B)。

2.3.4 细胞凋亡的原位检测 光镜下可见对照组肿瘤细胞圆形或多边形, 体积较大, 胞浆丰富, 核大, 核鲜见棕黄色, 细胞呈片状生长(图 5A); 实验组可见大量凋亡细胞呈圆形或卵圆形, 有的呈板块状或月牙状, 胞核浓缩, 呈棕黄色, 细胞周边无炎症反应, 散在分布或成簇分布(图 5B)。

两实验组细胞凋亡指数明显高于各自的对照组 (图 6), 且具有显著性差异 ($P < 0.01$), 实验组 H 凋

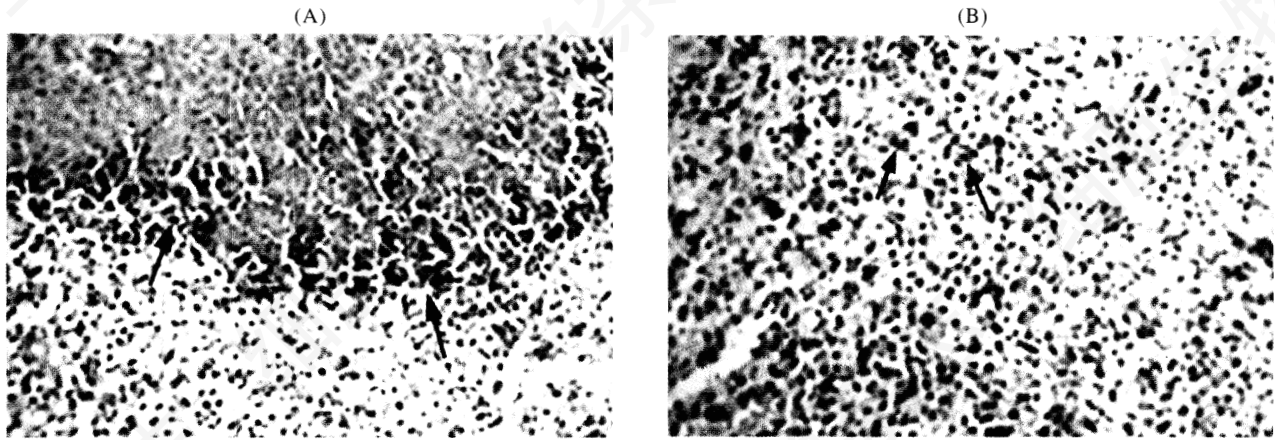


图4 HepA-H细胞发生膈窝淋巴结转移(HE染色, 200×)

(A)肿瘤细胞呈片状生长(箭头所示); (B)经Gen作用后, HepA-H细胞发生的膈窝淋巴结转移, 肿瘤细胞缩小, 染色质固缩, 发生转移的细胞数较少且分散生长(箭头所指为散在的肿瘤细胞)。

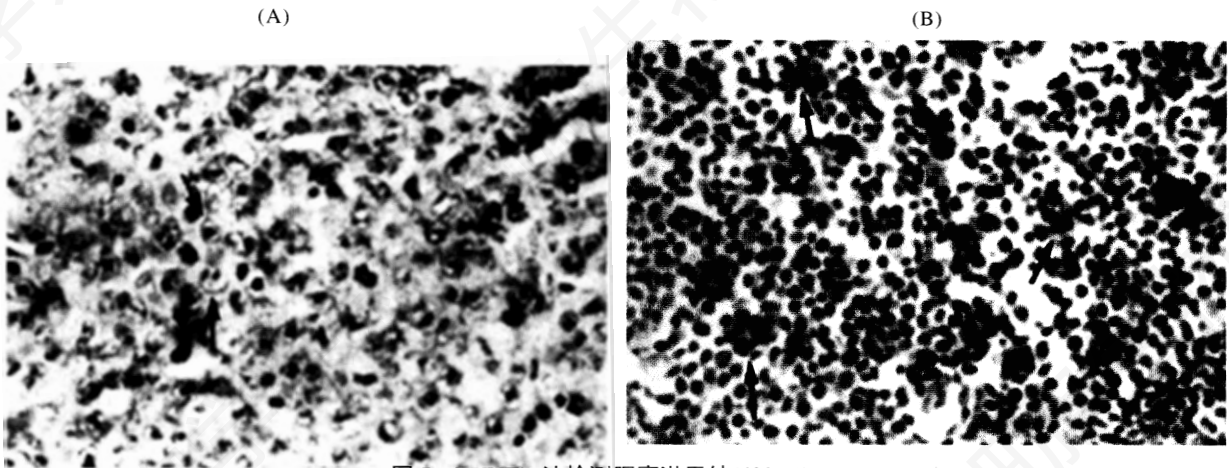


图5 TUNEL法检测膈窝淋巴结(400×)

(A)肿瘤细胞圆形或多边形, 体积较大, 胞浆丰富, 核大, 核鲜见棕黄色, 细胞呈片状生长(箭头所指为肿瘤细胞); (B)TUNEL法检测Gen作用后的膈窝淋巴结。凋亡细胞胞核为棕黄色, 染色质固缩, 呈分散或簇状分布(箭头所指为发生凋亡的肿瘤细胞)。

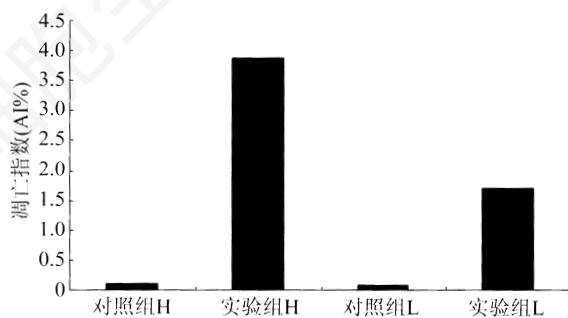


图6 TUNEL法检测Gen作用的肿瘤细胞凋亡指数

亡指数高于实验组L($P<0.01$)。

3 讨论

Gen是大豆异黄酮的主要成分, 具有较强的生物活性。以往的体外癌细胞培养研究证实, Gen对乳腺癌、胃癌、肝癌、白血病及其他一些癌细胞

系的生长、增殖具有抑制作用。现有的动物实验资料显示, 以含Gen的饲料喂养动物, 可降低乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌、皮肤癌和胃癌等肿瘤的发生率, 延长肿瘤的潜伏期, 减少肿瘤的发生。本研究也观察到Gen对体外生长的HepA-H和HepA-L细胞系均具有明显的抑制作用($P<0.01$), 呈量效关系。动物实验也发现, 用Gen腹腔给药的实验组小鼠肿瘤体积较对照组明显减小($P<0.01$)。

Gen抑制肿瘤转移是其抗癌机制之一^[5]。在肿瘤组织中, 肿瘤细胞也同时存在增殖和凋亡状态, 目前认为细胞凋亡与转移抑制密切相关^[6,7], 细胞凋亡作为一种重要的位点控制机制参与肿瘤转移过程中的瘤细胞脱离原发瘤, 逃离免疫细胞杀伤及其远隔脏器的细胞积累等步骤, 抑制凋亡的作用可通过阻止细胞在非锚着状态下凋亡而促进转移^[8], 反之亦然。故诱导转移过程中的肿瘤细胞凋亡, 从而抑

制肿瘤转移具有可行性。Buchler 等^[9]的研究表明, Gen 在体外可诱导各胰腺癌细胞株的凋亡, 在体内能有效提高胰腺癌荷瘤小鼠的生存率, 几乎完全抑制肿瘤转移, 并诱导胰腺癌细胞发生凋亡, 提示 Gen 抑制肿瘤转移的作用, 可能与其能诱导肿瘤细胞发生凋亡有关。本研究采用的细胞株 HepA-H 和 HepA-L 是专一的淋巴道转移细胞, 具有不同的转移能力。本实验从细胞形态学观察和细胞周期时相中 DNA 定量分析, 证实了 Gen 在体外对 HepA-H 和 HepA-L 均具有诱导凋亡的作用。电镜下可观察到典型的凋亡细胞特征, 如凋亡小体出现, 染色质边集等。流式细胞术对细胞周期时相中 DNA 含量的检测结果也提示, Gen 能诱导 HepA-H 和 HepA-L 细胞凋亡, 且随浓度加大, 凋亡率升高。故 Gen 诱导 HepA-H 和 HepA-L 细胞凋亡, 可能是其抑制肿瘤转移的原因之一。

对多数癌症而言, 肿瘤细胞通过淋巴转移是肿瘤扩散的最常见途径之一, 肿瘤细胞经各级淋巴结向远隔器官转移, 淋巴结是肿瘤淋巴转移过程中的“中转站”, 如果能诱导淋巴结里肿瘤细胞的凋亡, 减少肿瘤细胞在淋巴结的累积, 就可能抑制远隔器官转移瘤的发生, 但以往对药物抑制肿瘤淋巴转移的研究甚少。Schleicher 等^[2]通过 Gen 体内抑制移植性小鼠附属性腺瘤 K1 的研究, 发现 Gen 能抑制 K1 细胞的多部位淋巴结转移。Hillman 等^[3]研究认为, Gen 能增强放射疗法对前列腺癌的治疗作用, 并抑制癌细胞淋巴结转移。但均未进一步探讨 Gen 抑制肿瘤细胞淋巴转移的机制。本研究以 HepA-H 和 HepA-L 细胞建立荷瘤动物模型, 研究 Gen 抑制 HepA-H 和 HepA-L 细胞淋巴转移的作用, 两实验组肿瘤膈窝淋巴结转移率明显降低。我们的实验指出, Gen 可有效抑制肿瘤的生长和淋巴转移。同时, 进一步探讨了 Gen 的作用机制, 实验用 TUNEL 法检测膈窝淋巴结肿瘤细胞凋亡, 两实验组凋亡指数明显高于对照组, 且具有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明 Gen 能诱导淋巴结内的肿瘤细胞凋亡。

目前在脑星形母细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌和食管癌研究中, 观察到肿瘤的凋亡指数和增殖指数与肿瘤的恶性程度呈正比, 且增殖大于凋亡, 故肿瘤细胞表现出较强的增殖能力^[10]。Gen 如果能够改变肿瘤细胞原有的增殖大于凋亡的相对平衡, 使凋

亡增加的程度大于增殖, 就可能抑制肿瘤细胞的生长。本研究中发现 Gen 对高淋巴转移的 HepA-H 细胞株抑制增殖和诱导凋亡的能力均强于低淋巴转移的 HepA-L 细胞株。用 50 mg/L Gen 作用 48 h, HepA-H 和 HepA-L 的抑制率分别为 50.70% 和 35.15%, 凋亡率分别为 2.41% 和 1.28%。在小鼠肿瘤模型中, Gen 给药后第 14 天, 对照组 H 和实验组 H 的肿瘤体积分别为 $(394.63 \pm 89.77) \text{ mm}^3$ 和 $(122.53 \pm 22.73) \text{ mm}^3$, 淋巴结转移率分别为 91.67% 和 25.00%; 对照 L 组和实验 L 组的肿瘤体积分别为 $(188.43 \pm 68.74) \text{ mm}^3$ 和 $(73.72 \pm 49.18) \text{ mm}^3$, 淋巴结转移率仅为 25.00% 和 8.33%。TUNEL 法也检测到实验 H 组的凋亡指数为 3.87%, 实验 L 组为 1.69%。实验结果表明, Gen 诱导淋巴结内肿瘤细胞凋亡的作用对高转移肿瘤细胞更敏感。对此, 作者认为, Gen 可能是分别作用于 HepA-H 和 HepA-L 细胞的不同靶点, 通过不同的信号转导途径或凋亡相关基因 (或抑癌基因), 激活两株细胞各自的内在凋亡机制^[11], 最终导致高转移肿瘤细胞的增殖/凋亡 < 低转移细胞的增殖/凋亡, 表现为对高转移的 HepA-H 细胞的作用更为明显。但尚有待实验进一步证实。

本研究发现 Gen 在体外能通过诱导不同转移能力的 HepA-H 和 HepA-L 细胞凋亡, 而抑制其增殖, 在体内能抑制这两株细胞的淋巴转移, 并能诱导淋巴结内的肿瘤细胞凋亡。故 Gen 诱导肿瘤细胞的凋亡, 可能与抑制肿瘤淋巴转移有关。且 Gen 对高转移的 HepA-H 细胞的抑制作用强于 HepA-L, 提示 Gen 抗肿瘤作用具有一定的选择性。本研究为 Gen 治疗肿瘤提供了一条新的思路。

参考文献 (References)

- [1] Sarkar FH *et al. Cancer Metastasis Rev*, 2002, **21**: 265
- [2] Schleicher RL *et al. Cancer Lett*, 1999, **136**: 195
- [3] Hillman GG *et al. Mol Cancer Ther*, 2004, **3**: 1271
- [4] 杨泽然等. *实验生物学报*, 2003, **36**: 99
- [5] Wiseman H *et al. Am J Clin Nutr*, 2000, **72**: 395
- [6] Thompson CB *et al. Science*, 1995, **267**: 1456
- [7] Raff MC *et al. Nature*, 1992, **356**: 397
- [8] 王文萍等. *实用肿瘤转移学*, 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2003, 10
- [9] Buchler P *et al. Pancreas*, 2003, **26**: 264
- [10] 钟志光等. *癌症*, 2001, **20**: 932
- [11] Glinsky GV *et al. Cancer Lett*, 1997, **115**: 185

Effects of Genistein on the Proliferation and Metastasis of Murine Hepatocarcinoma Cell Line with Different Lymphatic Metastatic Potential

Shu-Qin Ruan, Ji-Cheng Li*

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract *In vitro*, the inhibitory effects of genistein (Gen) on the growth of murine hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic potential, HepA-H and HepA-L cells, were evaluated by MTT assay. Gen-inducing apoptosis was observed by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and flow cytometry (FCM). *In vivo*, Gen was administered at the concentration of 200 mg/(kg·d)⁻¹ by intraperitoneal injection daily from the day before HepA-H and HepA-L were injected subcutaneously to foot pad of NIH mice. The popliteal lymph nodes were taken and the metastatic rates were calculated after Gen treatment for 14 days. The apoptosis was checked by using TUNEL method. The results showed that *in vitro*, Gen exhibited antiproliferative activity. The proliferation inhibition rate of Gen on HepA-H was higher than that on HepA-L. The apoptotic rates induced by Gen were on dosage dependent by using FCM, and the apoptotic rates of HepA-H was higher than that of HepA-L. *In vivo*, Gen could inhibit the metastasis of tumor cells and reduce the volume of tumor. The prohibition of Gen on the tumor of HepA-H was better than that on the tumor of HepA-L. AI of tumor come from HepA-H (3.87%) was higher than that from HepA-L (1.69%). In conclusion, Gen has a remarkable antitumor activity and could inhibit the tumor cells from invading into lymphatic vessels, especially. The inhibition of Gen on HepA-H is better than that on HepA-L. The antitumor effect of Gen is relative to the induction of tumor cell apoptosis and the therapy of Gen on tumor has selectivity.

Key words genistein; tumor; lymphatic metastasis; apoptosis

Received: January 6, 2005 Accepted: February 28, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-571-87217451, Fax: 86-571-87217145, E-mail: lijichen@zju.edu.cn