

Genistein与5-FU联合对人肝癌细胞MHCC97-L的抗增殖作用

刘丹, 赵忠新

■背景资料

中国是肝炎重灾国, 肝癌发病率高, 手术切除虽是治疗肝癌的最有效手段, 但术后较高的复发率成为影响肝癌预后的障碍。如何选择有效的化疗药物是临床面临的难题。

刘丹, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161006

赵忠新, 齐齐哈尔市建华医院普外科 黑龙江省齐齐哈尔市 161006

刘丹, 硕士, 主要从事细胞生物学和医学遗传学的教学和科研工作。

黑龙江省卫生厅科研课题基金资助项目, No. 2010-226

作者贡献分布: 此课题由刘丹设计; 研究过程由刘丹与赵忠新操作; 本论文写作由刘丹与赵忠新完成。

通讯作者: 刘丹, 讲师, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市建华区卜奎北大街333号, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室。

7896078_cn@sina.com

电话: 0452-2663174

收稿日期: 2012-06-04 修回日期: 2012-08-05

接受日期: 2012-08-11 在线出版日期: 2012-09-18

Genistein combined with 5-FU inhibits cell proliferation in human hepatocellular cancer cell line MHCC97-L

Dan Liu, Zhong-Xin Zhao

Dan Liu, Department of Biological Genetics, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Zhong-Xin Zhao, Department of General Surgery, Jianhua Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Scientific Research Fund of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2010-226

Correspondence to: Dan Liu, Department of Biological Genetics, Qiqihar Medical College, 333 Kuibei Street, Jianhua District, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. 7896078_cn@sina.com

Received: 2012-06-04 Revised: 2012-08-05

Accepted: 2012-08-11 Published online: 2012-09-18

Abstract

AIM: To explore whether genistein and 5-FU has synergistic inhibitory effect on the proliferation of human hepatic cancer cells (MHCC97-L).

METHODS: MTT method was used to assay the biological activities of different concentrations of genistein and 5-FU in MHCC97-L cells. The inverted microscope was used to observe the influence of combined genistein and 5-FU on the morphological changes of MHCC97-L cells. After the cells were stained with Hoechst 33342 and observed under a fluorescence microscope, apoptosis index was calculated.

apoptosis index was calculated.

RESULTS: Both genistein and 5-FU could effectively inhibit the proliferation of MHCC97-L cells in a dose- and time-dependent manner. When used alone, the IC_{50} (48 h) of genistein and 5-FU for MHCC97-L cells was 174.17 $\mu\text{mol/L}$ and 40.02 $\mu\text{mol/L}$, respectively. When used in combination, the IC_{50} of genistein and 5-FU was 66.03 $\mu\text{mol/L}$ and 16.51 $\mu\text{mol/L}$. The cell density in the combination group was lower than the two monotherapy groups. Morphologic characteristics of apoptotic cells, such as cytoplasmic clouding, cell shrinkage and cytoplasmic vacuolation, were observed. Typical apoptosis was confirmed by fluorescence microscopy. The apoptosis index was 17.55% in the genistein group, 15.63 in the 5-FU group, and 30.38% in the combination group.

CONCLUSION: Genistein and 5-FU can exert synergistic inhibitory effects on the growth of MHCC97-L cells possibly via mechanism associated with inducing apoptosis.

Key Words: Genistein; 5-FU; MHCC97-L cell line; Apoptosis

Liu D, Zhao ZX. Genistein combined with 5-FU inhibits cell proliferation in human hepatocellular cancer cell line MHCC97-L. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(26): 2474-2478

摘要

目的: 探讨Genistein与5-FU联合对人肝癌MHCC97-L细胞凋亡的诱导作用。

方法: 采用MTT法、倒置显微镜、Hoechst 33342荧光染色技术研究Genistein、5-FU、Genistein与5-FU联合3组药物不同浓度作用于体外培养的人肝癌MHCC97-L细胞后生长抑制及诱导凋亡的形态学变化。

结果: Genistein、5-FU单用及联用可抑制肝癌MHCC97-L细胞的增殖, 其抑制率与药物

■同行评议者

杨家和, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合治疗三科

剂量和作用时间呈依赖关系; 48 h单用时的 IC_{50} (Genistein)为174.17 $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} (5-FU)为40.02 $\mu\text{mol/L}$; 48 h联用时的 IC_{50} (Genistein)为66.03 $\mu\text{mol/L}$ 、 IC_{50} (5-FU)为16.51 $\mu\text{mol/L}$; 倒置显微镜结果显示, 药物组细胞密度均明显下降, 贴壁细胞出现皱缩、变圆、胞浆混浊及“空泡”现象, 尤以联用药物组变化最为明显; 荧光染色结果显示, 药物组部分细胞核呈现致密亮蓝色荧光的为凋亡细胞, 凋亡指数Genistein组为17.55%, 5-FU组为15.63%, 联用组为30.38%。

结论: 两种药物单独使用均可对人肝癌MHCC97-L细胞的生长具有明显抑制作用, 联合用药时, Genistein可以增强5-FU的疗效, 诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。

关键词: 染料木黄酮; 氟尿嘧啶; MHCC97-L; 细胞凋亡

刘丹, 赵忠新. Genistein与5-FU联合对人肝癌细胞MHCC97-L的抗增殖作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(26): 2474-2478
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2474.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一类高死亡率的恶性肿瘤。虽然手术切除仍被公认为是治疗肝癌的最有效手段, 但术后较高的复发率成为影响肝癌预后的主要障碍。5-FU是治疗消化系统肿瘤的常规药物, 因价格低廉, 不良反应相对较轻而广泛应用于临床, 肝癌对该药敏感性一般, 多采用动脉插管注药, 因此, 寻找一种高效、低毒、经济的抗肿瘤药物有重大的现实意义。染料木黄酮(Genistein)是大豆在生长过程中形成的次级代谢产物, 近年来研究显示其具有显著防治肿瘤的效果。Genistein通过包括抗雌激素样作用、引起肿瘤细胞凋亡、影响酪氨酸蛋白酶活性、抑制肿瘤血管新生、抗氧化作用、抑制DNA异构酶活性、抑制肿瘤的侵袭、诱导细胞分化等多样性的分子机制发挥抗肿瘤作用^[1-3], 其功效和利用潜力得到世界各国学者极大的关注。本研究将Genistein、5-FU单用和联用于体外肝癌MHCC97-L细胞, 探讨两种药物诱导细胞凋亡情况及Genistein对5-FU诱导肝癌细胞凋亡的增敏作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞MHCC97-L购自复旦大学

肝癌研究所。Genistein(纯度为98%)、MTT和EDTA(Sigma公司), 5-FU(天津金耀氨基酸公司), 优级胎牛血清(Hyclone公司), 胰蛋白酶和二甲基亚砷(DMSO)(Amresco公司), DMEM高糖培养基(Gibco公司), Hoechst33342(江苏碧云天公司), 余为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MHCC97-L细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养液置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 隔1 d换液, 细胞贴壁生长, 待满瓶底时, 用胰酶消化, 吹打成单细胞, 分瓶传代。

1.2.2 分组: 实验共分为培养基对照组、溶剂对照组(含0.04% DMSO)、Genistein组(10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)、5-FU组(2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)和联合组(10.0+2.5、20+5、40+10、80+20、160+40 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.3 MTT: 取对数生长期的MHCC97-L细胞, 以 4×10^3 个/孔细胞浓度于接种于3块96孔板, 每孔100 μL 细胞悬液, 每组设5个复孔。培养24 h后, 分别加入不同处理因素, 配至200 μL , 3块板分别培养24、48、72 h后, 加入MTT(5 g/L), 每孔20 μL , 继续孵育4 h。4 h后吸尽每孔中的培养液, 加DMSO 150 μL /孔, 振荡器上振荡10 min, 于自动酶标仪570 nm处测定每孔的吸光度(A)值, 实验重复3次, 计算抑制率(IR)。IR(%) = (1-药物组A值/对照组A值) \times 100%。

1.2.4 IC_{50} : 根据回归方程: $\log D_m = -a/b(D_m \text{为抑瘤率为50\%时的药物浓度, 即} IC_{50})$, 计算Genistein、5-FU单用和联用时的中效浓度(IC_{50})。

1.2.5 倒置显微镜观察细胞的形态学变化: 取对数生长期的MHCC97-L细胞, 以 3×10^5 个/孔细胞浓度接种于2块6孔板, 每孔2 mL细胞悬液, 每组设3个复孔, 培养24 h后, 加入含0.04% DMSO培养液、80 $\mu\text{mol/L}$ Genistein、20 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU和80 $\mu\text{mol/L}$ Genistein+20 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU联合培养液, 处理72 h后, 倒置显微镜下观察细胞的浓度及形态学变化。

1.2.6 Hoechst 33342荧光染色观察细胞凋亡: 取对数生长期的MHCC97-L细胞接种, 以 2×10^5 个细胞浓度接种于直径为2.5 cm的4个培养皿中, 培养24 h后, 加入含0.04% DMSO培养液、80 $\mu\text{mol/L}$ Genistein、20 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU和80 $\mu\text{mol/L}$ Genistein+20 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU联合培养液, 处理48 h后, PBS洗3次, 加入1 mL Hoechst 33342染液, 避光作用10 min后, PBS洗2次, 置于荧光显微镜下,

■ 研发前沿

5-FU是治疗消化系统肿瘤的常规药物, 因价格低廉, 不良反应相对较轻而广泛应用于临床, 肝癌对该药敏感性一般, 多采用动脉插管注药。因此, 寻找一种高效、低毒、经济的抗肿瘤药物有重大的现实意义。

■相关报道

近年来,为增强化疗药物的敏感性和减轻其不良反应,国内外学者对Genistein联合多种化疗药物进行了大量的实验研究,发现联合用药能有效抑制多种癌细胞在体外的生长,促进细胞凋亡。

表 1 Genistein、5-FU单用及联用对肝癌细胞MHCC97-L增殖的影响 (mean ± SD)

分组 ($\mu\text{mol/L}$)	A值			抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.297 ± 0.017	0.309 ± 0.016	0.330 ± 0.029	—	—	—
溶剂对照组	0.295 ± 0.023	0.305 ± 0.018	0.323 ± 0.026	0.67	1.3	2.12
Genistein						
10	0.288 ± 0.030	0.279 ± 0.009	0.279 ± 0.013	3.03	9.62	15.45
20	0.268 ± 0.006	0.264 ± 0.016 ^a	0.243 ± 0.025	9.76	14.48	26.36
40	0.261 ± 0.012 ^a	0.251 ± 0.013 ^b	0.236 ± 0.022 ^b	12.12	18.69	28.48
80	0.251 ± 0.014 ^a	0.208 ± 0.012 ^a	0.133 ± 0.015 ^b	15.49	32.62	59.70
160	0.232 ± 0.008 ^a	0.146 ± 0.019 ^b	0.122 ± 0.017 ^b	21.89	52.70	63.03
5-FU						
2.5	0.276 ± 0.020	0.281 ± 0.002	0.266 ± 0.008	7.07	8.97	19.39
5	0.271 ± 0.011	0.267 ± 0.009	0.235 ± 0.034	8.75	13.51	28.79
10	0.270 ± 0.016	0.247 ± 0.012 ^a	0.227 ± 0.027 ^a	9.09	19.99	31.21
20	0.253 ± 0.037	0.200 ± 0.010 ^b	0.189 ± 0.016 ^a	14.81	35.21	42.73
40	0.230 ± 0.017 ^b	0.149 ± 0.027 ^a	0.137 ± 0.012 ^a	22.56	51.73	58.48
Gen+5-FU						
10+2.5	0.272 ± 0.010	0.261 ± 0.012	0.232 ± 0.011 ^a	8.42	15.45	29.70
20+5	0.262 ± 0.022	0.241 ± 0.009 ^a	0.220 ± 0.005 ^a	11.78	21.93	33.33
40+10	0.255 ± 0.008	0.232 ± 0.014 ^a	0.190 ± 0.015 ^b	14.14	24.85	42.42
80+20	0.242 ± 0.016 ^a	0.148 ± 0.020 ^a	0.108 ± 0.014 ^a	18.52	52.06	67.27
160+40	0.223 ± 0.010 ^a	0.117 ± 0.020 ^b	0.079 ± 0.015 ^b	24.92	62.10	76.06

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

选用340 nm的激发蓝光观察细胞凋亡情况,实验重复3次,随机计数不同视野的1 000个细胞核,计算凋亡指数(AI). AI(%) = 具有明显凋亡特征的细胞核总数/1 000 × 100%.

统计学处理 数据用mean ± SD表示,采用SPSS16.0软件进行统计分析,两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT DMSO对肝癌细胞的增殖无明显的抑制作用,随着Genistein、5-FU浓度的增加和作用时间的延长,其对肝癌细胞的抑制作用逐渐增强,呈现明显的剂量和时间依赖性(表1).

2.2 IC_{50} 48 h单用时的 IC_{50} (Genistein)为174.17 $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} (5-FU)为40.02 $\mu\text{mol/L}$,联用时的 IC_{50} (Genistein)为66.03 $\mu\text{mol/L}$ 、 IC_{50} (5-FU)为16.51 $\mu\text{mol/L}$. Genistein单用浓度是联用浓度的2.64倍,5-FU单用浓度是联用浓度的2.42倍(表2).

2.3 倒置显微镜观察的细胞凋亡的形态学变化倒置显微镜下单用和联用药物组处理72 h后与对照组比较,结果显示,药物组细胞密度均明显下降,贴壁细胞出现皱缩、变圆,可见较多漂浮

表 2 48 h Genistein、5-FU单用及联用的回归方程及 IC_{50}

分组	回归方程	$\text{IC}_{50}(\mu\text{mol/L})$	r 值
Genistein	$Y = 0.83X - 1.86$	174.17	0.99
5-FU	$Y = 0.88X - 1.41$	40.02	0.99
Gen+5-FU	$Y = 1.08X - 2.07$	66.03+16.51	0.95

的死亡细胞,胞浆透明度下降,颗粒感增强,并见“空泡”现象,且联用药物组变化最为明显,而对照组未出现上述改变(图1).

2.4 Hoechst 33342荧光染色 荧光显微镜下单用和联用药物组处理48 h后与对照组比较,结果显示,药物组部分细胞核呈现致密亮蓝色荧光的为凋亡细胞,对照组细胞呈现弥散均匀低蓝色荧光,可见少许荧光染料分布在细胞膜周围;凋亡指数计算结果,Genistein组为17.55%,5-FU组为15.63%,联用组为30.38%(图2).

3 讨论

近几年来由于全球环境污染日益严重、人们饮食不规律、不健康等因素,导致消化系统恶性肿瘤的发病率逐年上升,严重威胁着人类的健康. Genistein是多效的天然活性物质,基本无毒性^[4],

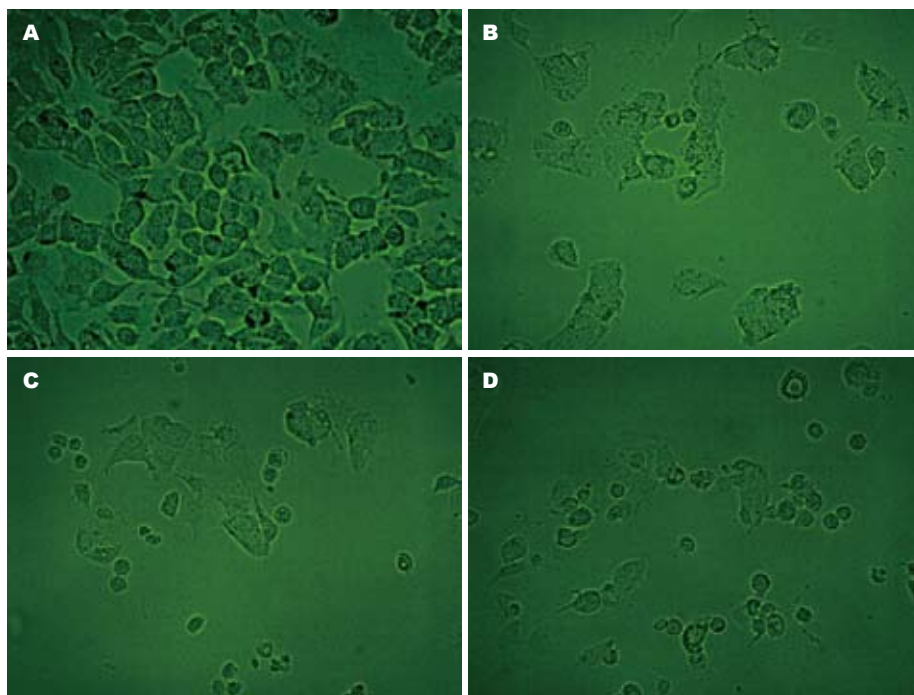


图 1 倒置显微镜下Genistein、5-FU单用及联用对MHCC97-L细胞形态的影响($\times 200$). A: 对照组; B: Genistein组; C: 5-FU组; D: 联合组.

■应用要点

本文通过Genistein、5-FU单用和联用作用于体外肝癌细胞, 探讨Genistein对5-FU诱导肝癌细胞凋亡的增敏作用, 为肝癌临床化疗方案的制订与化疗药物耐药逆转研究提供理论基础.

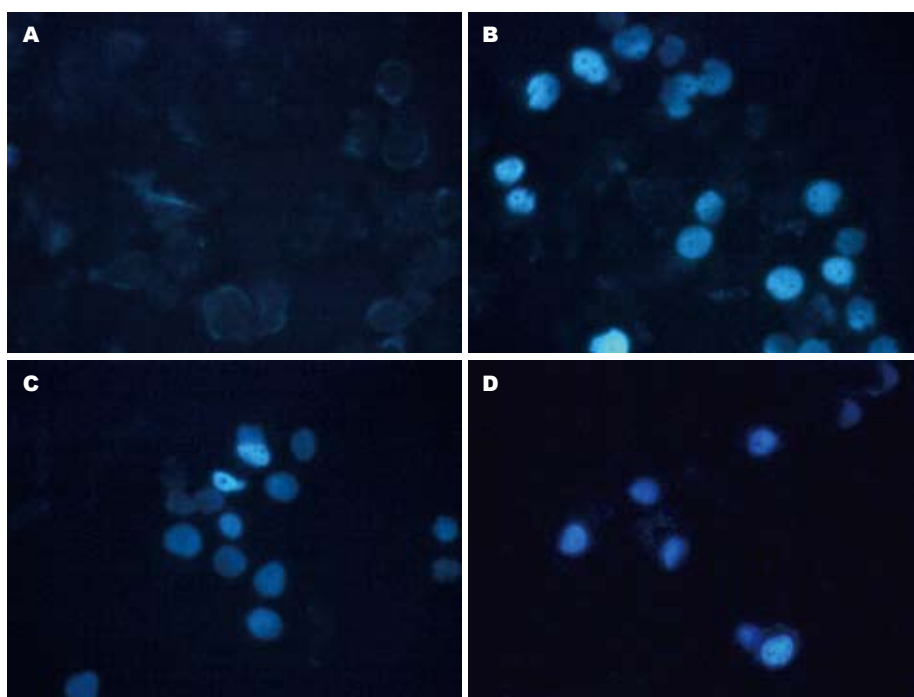


图 2 荧光显微镜下Genistein、5-FU单用及联用诱导MHCC97-L细胞凋亡的形态学变化($\times 400$). A: 对照组; B: Genistein组; C: 5-FU组; D: 联合组.

并具有较强的抗肿瘤活性, 而且他在大豆中的含量高, 较易供应, 价格低廉, 药源充足, 研究其同其他抗肿瘤药物的协同作用, 提高肿瘤预防和治疗的效果, 减少药物的不良反应, 成为国内外学者研究的热点之一. 诱导肿瘤细胞凋亡是很多抗肿瘤药物发挥作用的主要机制. 研究显示, Genistein可通过诱导乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌等^[5-8]多种肿瘤细胞的凋亡来实现其抗肿瘤作用, 目前尚无诱导肝癌MHCC97-L细胞凋亡的相关报道.

本研究结果显示, Genistein、5-FU单用及联用可抑制肝癌MHCC97-L细胞的增殖, 其抑制率与药物剂量和作用时间呈依赖关系; 计算48 h中效浓度 IC_{50} , Genistein单用浓度是联用浓度的2.64倍, 5-FU单用浓度是联用浓度的2.42倍, 可见两药联用比单用各自达到相同抑制率的用量要小很多, 尤其减少5-FU的用量, 可以大大降低其不良反应. 形态学检测是鉴定细胞凋亡最可靠的方法之一^[9], 光镜下, 药物组细胞密度均明显下降, 贴壁细胞出现皱缩、变圆、胞浆混浊

■同行评价

本研究设计合理,方法恰当,结果可信,具有很强的实用价值。

及“空泡”现象,尤以联用药物组变化最为明显;荧光显微镜下,药物组部分细胞核呈现致密亮蓝色荧光的为凋亡细胞,凋亡指数Genistein组为17.55%, 5-FU组为15.63%, 联用组为30.38%, 联用组明显高于单用组。综上,在体外Genistein和5-FU均可诱导肝癌MHCC97-L细胞的凋亡, Genistein可明显提高5-FU诱导细胞凋亡的疗效,这与国内外报道Genistein抑制肝癌细胞增殖^[10-19]情况一致。

细胞凋亡具有严格的基因时效性和选择性。研究其分子调控机制对有计划地诱导肿瘤细胞凋亡有重要的指导作用。Genistein诱导肿瘤细胞凋亡的内在分子机制还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 王丽斌, 王玉华. 金雀异黄素抗肿瘤实验研究进展. 实用肿瘤杂志 2012; 27: 96-100
- 2 赵净洁, 俞鸣, 孟令章. 大豆异黄酮抗癌防癌机制的研究进展. 中国公共卫生 2010; 26: 1390-1392
- 3 魏华波, 马海蓉, 王振华. 植物雌激素抗肿瘤作用机制研究进展. 食品科学 2011; 32: 274-277
- 4 Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, Phelps R, Shyong E, Lebwohl MG. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr* 2003; 133: 3811S-3819S
- 5 Bayazit V. Cytotoxic effects of some animal and vegetable extracts and some chemicals on liver and colon carcinoma and myosarcoma. *Saudi Med J* 2004; 25: 156-163
- 6 Wang X, Clubbs EA, Bomser JA. Genistein modulates prostate epithelial cell proliferation via estrogen- and extracellular signal-regulated kinase-dependent pathways. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 204-210
- 7 余增丽, 张立实, 李群英, 吴德生. 大豆异黄酮和玉米赤霉烯酮对卵巢癌细胞株PEO4增殖的影响. 中华预防医学杂志 2003; 37: 154-157
- 8 Su SJ, Yeh TM, Lei HY, Chow NH. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 230-236
- 9 陈誉华. 医学细胞生物学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 345
- 10 田晓丰, 曹宏, 田力. 金雀异黄素对人肝癌SMMC-7721细胞生长抑制和凋亡的影响. 吉林大学学报(医学版) 2009; 35: 499-502
- 11 陈鹏, 邓小凡, 胡明道. Genistein与顺铂协同抗肝癌的体外研究. 昆明医学院学报 2010; 31: 79-83
- 12 金伟, 马力. 染料木黄酮对顺铂诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡的增敏作用. 第四军医大学学报 2005; 26: 761-763
- 13 魏思忱, 白文元, 王军民, 姚冬奇, 姚金峰, 戴胜兰. 三羟异黄酮诱导人肝癌细胞凋亡及对凋亡相关基因的影响. 基础医学与临床 2007; 27: 881-885
- 14 张继红, 梁力建, 黄洁夫, 王家泽. 三羟异黄酮上调肝癌HepG2细胞PTEN基因的表达及其诱导凋亡作用. 中山大学学报(医学科学版) 2006; 27: 285-288
- 15 Chodon D, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2007; 297: 73-80
- 16 Mansoor TA, Ramalho RM, Luo X, Ramalhe C, Rodrigues CM, Ferreira MJ. Isoflavones as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells. *Phytother Res* 2011; 25: 1819-1824
- 17 Gu Y, Zhu CF, Dai YL, Zhong Q, Sun B. Inhibitory effects of genistein on metastasis of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4952-4957
- 18 Jin CY, Park C, Kim GY, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH. Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chem Biol Interact* 2009; 180: 143-150
- 19 Chodon D, Ramamurthy N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 887-891

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊。中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高。精品科技期刊的遴选周期为三年。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)