金雀异黄素对 iNOS 表达影响与抑制胃癌细胞增殖作用研究*

宋丹凤　崔洪斌
(哈尔滨医科大学公卫学院,黑龙江　哈尔滨　150001)

摘　要:为研究金雀异黄素对人胃腺癌细胞 SGC-7901 增殖、DNA 合成、一氧化氮产生量、一氧化氮合酶活性及其对诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase,iNOS)基因表达的影响,应用 MTT、^{3}H-TdR掺入、DNA 琼脂糖电泳、分光光度法、免疫组化及 RT-PCR 方法,研究 Gen 抑制癌细胞生长的机制。结果表明 Gen 抑制 SGC-7901 细胞的增殖、DNA 合成,诱导细胞凋亡,并可显著诱导 iNOS mRNA转录、增加 iNOS 蛋白表达,促进一氧化氮产生,提高一氧化氮合酶活性。为将 Gen 应用于胃腺癌的化学防治提供了实验依据。

关键词:异黄酮类;癌;一氧化氮合酶;一氧化氮
中图分类号:R15;Q946　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004-8456(2002)03-0010-04

金雀异黄素(genistein,Gen),即 5,7,4'-三羟异黄酮,是大豆异黄酮类化合物的主要成分,主要来自大豆膳食。Gen 具有雌激素活性,故被称作植物雌激素。流行病学调查、动物实验和体外实验研究资料显示,Gen 对性激素依赖的肿瘤具有较好的抑制作用。[1,2] 目前国外 Gen 抗癌作用研究主要集中在乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等性激素依赖的肿瘤,对抑制胃癌生长作用研究较少。[3~5] 而胃癌在我国高发,且其发病与饮食关系密切,故本研究拟使用 SGC-7901 细胞株,深入研究 Gen 对肿瘤细胞生长抑制的机理,并重点探讨 NO、iNOS 在 Gen 抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡中的作用。

1　材料方法

1.1　主要试剂　Genistein(纯度不低于 98%)、噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶、PPO、POPOP 均为美国 Sigma 公司产品;RPMI1640 培养基、Hepes、Trizol Reagent 为美国 Gibco BRL 公司产品;^{3}H-TdR 购自中国原子能科学研究院同位素所;Apoptotic DNA Ladder Kit 为 Roche 公司产品;SP-9000 试剂盒为美国 Zymed 公司产品,小鼠抗人单克隆抗体 iNOS 为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品,购自北京中山生物技术有限公司。NOS 和 NO 测试盒购自南京建成生物工程公司。逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒、iNOS 及β-actin 引物、Oligo(dT)$_{15}$购自上海博彩生物科技有限公司。

1.2　细胞培养及药物处理　SGC-7901 细胞来自人胃低分化腺癌细胞系,引自北京市肿瘤研究所。细胞常规培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基中。二甲基亚砜(DMSO)溶解 Gen,配制成 20 mg/mL 的储备液,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%。

1.3　MTT 试验　细胞接种于 96 孔板(5×10^{3}个/孔),培养 24 h 后,加入 Gen 使终浓度分别为 5、10、20 μg/mL,设 4 个平行孔,另设溶剂对照组,于第五天加入 5 mg/mL MTT 20 μL,再培养 4h 后倒尽板中的培养液,加 150 μL DMSO,轻轻振动后用酶标仪(波长 570 nm)测定各孔的吸光值(*A*)值,求得各组平均 *A* 值。根据下列公式计算 Gen 对 SGC-7901 细胞的抑制率:(1-实验组 *A*/对照组 *A*)×100%。

1.4　^{3}H-TdR掺入液闪计数法　细胞接种于 24 孔板(5×10^{4}个/孔),培养 24 h 后加入不同剂量 Gen,设 4 个平行孔。继续分别培养 18 h、42 h。加入^{3}H-TdR,终浓度为 0.5 μci/mL,再培养 6 h 后,用多头细胞收集仪将细胞抽滤收集至玻璃滤膜上,干燥后置入闪烁瓶中,加入 PPO/POPOP/二甲苯闪烁液,液闪计数仪测定 *CPM* 值,计算抑制率。

1.5　DNA Ladder　按试剂盒说明提取 DNA。2%琼脂糖凝胶 50 V 电泳 1 h,将凝胶置于紫外灯下显影,呈像系统保存图片、摄影。冷冻干燥的凋亡 U937 细胞为阳性对照。

1.6　NO 和 NOS 检测　一氧化氮(NO)检测,采用硝酸还原酶法。将细胞悬液移入 24 孔板(1×10^{5}个/孔),取 Gen 处理 24、48 h 的细胞无酚红培养液,按试剂盒说明书操作流程进行操作,以 722 型分光比色计比色,在 550 nm 波长读取空白管、标准管与测定管吸光度值。计算样本 NO 含量(μmol/L)。

一氧化氮合酶(NOS)检测,通过测定单位时间、单位质量蛋白的细胞裂解液催化 *L*-精氨酸产生的

*国家自然科学基金资助(NO 39970637)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

NO 来反应细胞的 NOS 活性。按试剂盒说明书操作流程进行操作,将 Gen 处理培养 24、48 h 的 SGC-7901(1×10^7)细胞组织粉碎,考马斯亮蓝法测蛋白含量,以 722 型分光比色计比色,在 530 nm 波长下测定吸光度,计算 NOS 活力。

1.7 **免疫组化** Gen 处理细胞 24、48 h 后,收集细胞,4 %多聚甲醛固定、石蜡包埋,切片;常规脱蜡、脱水;微波修复抗原,与 1∶50 稀释的鼠抗人单克隆抗体在 4 ℃孵育过夜。按 SP 试剂盒进行检测,DAB 显色,甲基绿复染。于显微镜下观察,计数 1 000 个细胞中胞浆染色为棕黄色的阳性细胞个数。

1.8 **RT-PCR 检测 iNOSmRNA** 用 Trizol Reagent 试剂盒提取细胞总 RNA,以其为模板逆转录合成 cDNA,以 iNOS 的 antisence、sence primer 作为特异性引物,[6] 扩增产物长度为 352 bp。PCR 扩增条件:变性 94 ℃,45 s;退火 60 ℃,45 s;延伸 72 ℃,1 min;循环 35 次。为相对定量检测表达量,以β-actin 作为内参照,扩增产物长度为 532 bp。[6] PCR 扩增条件:变性 94 ℃,30 s;退火 55 ℃,30 s;延伸 72 ℃,45 s;循环 35 次。扩增产物以 2 %琼脂糖凝胶电泳,图像分析系统进行光密度扫描,观察结果。

2 结果

2.1 **MTT 法结果** Gen 明显抑制 SGC-7901 细胞的恶性增殖,存在剂量 - 效应关系。5、10、20 μg/mL Gen 处理后,细胞生长抑制率达分别为 20 %、50 %、62 %。

2.2 **Gen 对人胃癌细胞 DNA 合成的影响** Gen 对 SGC-7901 细胞 DNA 合成有明显抑制作用,且随剂量增加、作用时间延长,抑制作用增强。给药 24 h 后,10 μg/mL、20 μg/mL Gen 组 *CPM* 值显著下降,与对照组相比差异有显著意义($P < 0.01$)。给药 48 h 后,各剂量组 *CPM* 值均显著低于对照组($P < 0.05$);10 μg/mL、20 μg/mL 剂量组与较低剂量组间 *CPM* 值差异均有显著意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 Gen 对 SGC-7901 细胞的 DNA 合成的影响($n = 4$)

剂量	^{3}H-TdR 合成量 *CPM*, $\bar{x} \pm s$		抑制率 %	
μg/mL	24h	48h	24h	48h
0	2687 ±787	3959 ±270	—	—
5	2097 ±373	3163 ±456(1)	22.0	20.1
10	1257 ±320(2,3)	1819 ±117(2,3)	53.2	54.1
20	1076 ±116(2,3)	1134 ±162(2~4)	60.0	71.4

注:(1) 与对照组相比,$P < 0.05$;(2) 与对照组相比,$P < 0.01$;(3) 与 Gen 5 μg/mL 组相比,$P < 0.01$;(4) 与 Gen 10 μg/mL 组相比,$P < 0.01$;—:无。

2.3 **DNA Ladder 结果** 不同浓度 Gen 处理细胞与对照相比,可见明显 DNA Ladder 条带(图 1)。

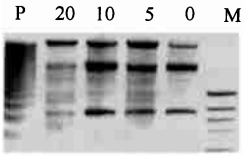

图 1 DNA Ladder 电泳图

P:阳性对照;M:marker;O:阴性对照;5、10、20 μg/mL 剂量组

2.4 **NO 含量和 NOS 活性结果** 仅高剂量(20 μg/mL)作用 24 h 组 NO 浓度与对照组比较差异有显著意义。NOS 活性检测中,各剂量组与对照相比差异均有显著意义,各剂量组间相比差异也有显著意义(表 2)。

表 2 NO 含量和 NOS 活性 ($\bar{x} \pm s$)

剂量	NO μmol/L		NOS 活性 U/mg prot	
μg/mL	24h	48h	24h	48h
0	583 ±38	653 ±73	1.407 ±0.098	0.564 ±0.154
5	554 ±23	730 ±37	2.018 ±0.401(4)	1.407 ±0.255(4)
10	619 ±88	706 ±20	3.153 ±0.393(4,5)	2.549 ±0.290(4,5)
20	761 ±57(1~3)	775 ±29(3)	3.381 ±0.326(4,5)	2.600 ±0.096(4,5)

注:(1) 与对照组比,$P < 0.05$;(2) 与 Gen 5 μg/mL 组比,$P < 0.05$;(3) 与 Gen 10 μg/mL 组比,$P < 0.05$;(4) 与对照组比,$P < 0.01$;(5) 与 Gen 5 μg/mL 组比,$P < 0.01$。

2.5 **免疫组化 iNOS 表达结果** Gen 处理后,iNOS 蛋白表达呈增加趋势。各剂量组与对照组间均有显著差异,不同剂量间也差异显著($P < 0.01$),见表 3。

表 3 Gen 对 SGC-7901 细胞 iNOS 蛋白表达的影响

剂量	24h	48h
μg/mL	阳性率 %	阳性率 %
0	31.6	43.9
5	40.3(1)	50.4(1)
10	67.2(1,2)	76.0(1,2)
20	87.4(1~3)	76.5(1,2)

注:(1) 与对照组相比,$P < 0.01$;(2) 与 Gen 5 μg/mL 组相比,$P < 0.01$;(3) 与 Gen 10 μg/mL 组相比,$P < 0.01$。

2.6 **RT-PCR 结果** 不同剂量 Gen 处理细胞 48 h,iNOSmRNA 逆转录 PCR 产物在 10、20 μg/mL 组表达明显增高。经光密度扫描,20 μg/mL 组是对照组的 2.65 倍,见图 2。

3 讨 论

目前,Gen 抑制雌激素依赖性肿瘤细胞恶性增殖的报道很多,但对非雌激素依赖性肿瘤,如胃癌的研究很少。本研究采用人胃腺癌 SGC-7901 细胞作为离体实验模型,发现 Gen 明显抑制其恶性增殖,呈剂量效应关系。且这种抑制作用与抑制细胞 DNA 合成作用呈正相关关系。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

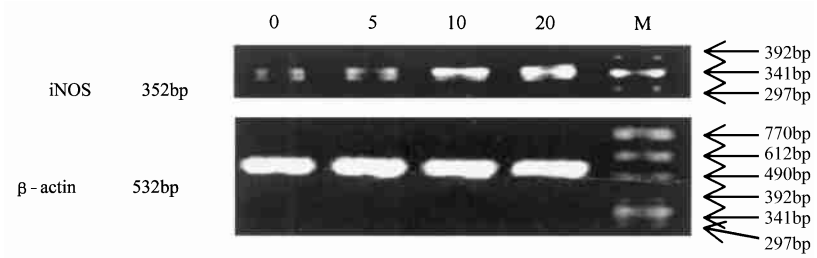

图 2　Gen 对 iNOSmRNA 表达的影响

0 阴性对照; 5、10、20 μg/mL 剂量组; M marker

流式细胞仪检测、电镜观察和 DNA 电泳分析是研究细胞凋亡较为常用的方法。其中细胞凋亡最显著、最具特征性的生化指标是 DNA 降解为大约由 180～200 bp 或其多聚体组成的寡核酸片段,琼脂糖凝胶电泳呈阶梯状(Ladder)图谱。本研究结果证实不同浓度 Gen 处理的胃癌 SGC-7901 细胞 DNA 均出现阶梯状电泳带,结合我们新近报道的流式细胞仪及电镜观察的特征性结果,说明 Gen 可诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

目前,关于 Gen 抑癌增殖、诱导癌细胞凋亡作用机制的研究报道较多,但尚未见到关于 Gen 抗肿瘤作用与 NO 之间关系的报道。而自 20 世纪 80 年代人们开始研究 NO 以来,已有证据表明,NO 在肿瘤发生发展中具有双重作用,即在低浓度时促进肿瘤生长,而在高浓度时则抑制肿瘤的生长。[7～9] 在生物体内,NO 由 *L* -精氨酸的胍基氮产生,催化这一反应的酶是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)。NOS 分为结构型 NOS 和诱导型 NOS(iNOS)两类。高浓度 NO 是由 iNOS 合成的。iNOS 在基态下不起作用,但一经诱导后即可持续较长时间,[10] 合成较生理状态高 1 000 倍水平的 NO。有关 NO 杀伤瘤细胞的精确机制尚不甚清楚,可能有多种机制参与:[7,11] NO 作用于铁硫基团,导致肿瘤细胞能量代谢障碍而死亡;NO 可通过抑制 80s 核糖体复合物等的形成,[12] 抑制蛋白质合成,从而抑制了细胞的增殖;NO 对 DNA 产生直接或间接的毒性,抑制 DNA 合成及其损伤修复;[13] NO 可以通过升高 P53、降低 Bcl-2、增强 caspase-3 样蛋白酶活性诱导肿瘤细胞凋亡,并可促进凋亡的细胞死亡,从而起到抗肿瘤的作用。[14,15] 因此,选择性诱导肿瘤细胞 iNOS,可成为抗癌药物的作用靶点。

本实验发现胃腺癌细胞株中有 NO 存在,经 Gen 处理后,细胞中 NO 水平有增加趋势,且与对照组相比差异有显著性。NO 的生成必须经 NOS 催化,因此,NOS 活性高低直接影响 NO 生成的多少。本实验还发现 Gen 处理组 iNOS 蛋白表达阳性率显著高于对照组。RT-PCR 检测 iNOS 基因表达结果显示,Gen 处理组较对照组细胞 iNOS mRNA 表达明显增强。由此推断,Gen 使细胞水平 NO 生成增加可能与 iNOS 基因表达增强有关。Gen 增强 SGC-7901 细胞 iNOS 基因表达,增加细胞 NO 水平可能是其发挥抗癌作用的分子机制之一,为进一步深入研究 Gen 抗癌作用机制提供了新思路。

以上研究证明,Gen 能有效抑制人胃癌细胞的恶性增殖,诱导 SGC-7901 细胞凋亡,提示 Gen 在胃癌防治中的应用大有前景。本研究不仅扩充了 Gen 对抗非雌激素依赖性肿瘤的研究领域,也为进一步解释大豆的抗癌作用,开发研究大豆食品提供了理论依据。

参考文献:

[1] Salti GI, Grewal S, Mehta RR, et al. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(6): 796—802.

[2] Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, et al. Genistein-induced upregulation of P21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells[J]. Nutr Cancer, 1998, 32(3): 123—131.

[3] Piontek M, Hengels KJ, Porschen R, et al. Antiproliferative effect of tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells[J]. Anticancer Res, 1993, 13(6): 2119—2123.

[4] Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, et al. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M[J]. Cancer Res, 1993, 53(6): 1328—1331.

[5] Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats[J]. Int J Cancer, 1999, 80(3): 396—399.

[6] Lewis NP, Tsao PS, Rickenbacher PR, et al. Induction of Nitric Oxide Synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle[J]. Circulation, 1996, 93(4): 720—729.

[7] Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible roles of nitric oxide in carcinogenesis[J]. Mutat Res, 1994, 305(2):

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

253 —264.

[8] Sagar S M, Singh G, Hodson DI, et al. Nitric oxide and anticancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 1995, 21(2): 159 —181.

[9] Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(2): 147 —156.

[10] Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide[J]. J Biol Chem, 1994, 269(19): 13725 —13728.

[11] 刘键,胥彬. 一氧化氮与肿瘤[J]. 肿瘤研究与临床, 1997, 9(1): 62 —64.

[12] Felley Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis[J]. Cancer Metastasis Rev, 1998, 17(1): 25 —37.

[13] Kim YM, Son K, Hong SJ, et al. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha [J]. Mol Med, 1998, 4(3): 179 —190.

[14] Ho YS, Wang YJ, Lin J Y. Induction of P53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells[J]. Mol Carcinog, 1996, 16(1): 20 —31.

[15] Nishio E, Watamabe Y. No induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease[J]. Life Science, 1998, 62(3): 239 —245.

Effect on iNOS expression by genistein and its relation to proliferatory inhibition of gastric carcinoma cells/ Song Danfeng, Cui Hongbin//Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002, 4(3): 10～13.

Abstract: To investigate the effects of genistein on the proliferation, DNA synthesis, NO production, NOS activity, iNOS gene expression of human gastric carcinoma cell line SGC-7901, MTT method, ^{3}H-TdR incorporation, DNA electrophoreses, spectrophotometer measurement, immunohistochemistry method and RT-PCR were used to evaluate the possible mechanism of cell growth inhibition. The Results show that genistein could inhibit the proliferation and DNA synthesis of SGC-7901 and induce apoptosis. Exposure of SGC-7901 cells to genistein resulted in statistically significant increased iNOSmRNA transcription, accompanied with increased iNOS protein expression, NO production and NOS activity. The increased expression of iNOS may contribute to the growth inhibitory as well as apoptotic effects of genistein on gastric carcinoma cells. The results provide evidence for the potential usefulness of genistein in the prevention and treatment of human gastric cancer.

Author's address: Song Danfeng, Department of Nutrition and Food Hygiene, Public Health School, Harbin Medical University, Harbin 150001, PRC.

Key Words: Isoflavones; Carcinoma; Nitric-Oxide Synthase; Nitric oxide

[**收稿日期**:2001 - 10 - 23]

《现代食品卫生学》征订启事

为探索、解决和阐明饮食与健康的关系,为适应我国社会经济发展和食品卫生工作的需要,本着突出先进性、科学性、实用性和系统性相结合的指导原则,通过介绍新理论、新观点、新技术和新方法,特编写出版本书。

全书共7篇49章,174万余字。内容包括食品卫生基本理论、食品污染问题、食品添加剂、各类食品问题及预防对策、有关研究食品与健康的方法与技术及食品卫生监督管理的理论与方法等,既把握本专业发展前沿,联系我国国情和卫生工作成就,又反映食品卫生学术进步的时代气息和我国食品卫生工作特征。参加编写本书的作者既有国内本科的老专家、学者和教授,又有优秀的中青年博士、硕士,他们都具有丰富的教学 科研和实践经验。

该书是从事食品卫生教学、科研、监督管理人员必备的阅读参考书,也是预防医学专业研究生及本科生学习参考书,同时对广大从事食品生产经营人员与企业家和广大食品消费者提供科学咨询与指导,欢迎踊跃订阅。

本书订价126元,加收邮挂费15元。邮局汇款或银行汇款均可。

联系人:刘瑕 **地址**:北京市朝阳区潘家南里7号 **邮编**:100021

电话:010 —87781383

银行汇款:北京市农业银行潘家园分理处 **帐号**:200201040000422

户名:卫生部食品卫生监督检验所 请注明"现代食品卫生学订阅款"

《中国食品卫生杂志》编辑部

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net