

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.007

Genistein 抑制卵巢癌细胞的侵袭转移及其机制

熊宙芳, 王泽华

Molecular Mechanism of Invasion Inhibitory Effects of Genistein on Human Ovarian Cancer Cells

XIONG Zhou-fang, WANG Ze-hua

Department of Obstetrics and Gynecology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of genistein on the invasion potential of human ovarian cancer cell line SKOV3 *in vitro* and its mechanisms. **Methods** The SKOV3 cell line was exposed to various concentration of genistein. The growth activities of cancer cells were detected by trypan blue staining method. Wound-healing assay and Transwell assay were used to evaluate the migration and invasion ability of SKOV3 cell line. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to observe the change of MTA1 mRNA expression. **Results** Genistein could effectively inhibit the *in vitro* growth of human ovary cancer cell line SKOV3 in time and dose-dependent manners. After 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ Genistein treatment for 48 h, the growth inhibition rates of cancer cells reached 23.5%, 50.1% and 59.1%, respectively($P < 0.05$). The migration capabilities of SKOV3 cells were inhibited significantly after 24 h treatment with Genistein at 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). And the inhibition rates were 20.80%, 45.66% and 74.69%, respectively. After 72 h incubation with 0, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Genistein, the number of cells that passed through the transwell chamber polycarbonate membrane were (127.9 ± 14.5) , (109.6 ± 11.8) , (64.4 ± 8.3) and (33.5 ± 4.4) , respectively($P < 0.01$). Compared with control group, MTA1 mRNA expression were down-regulated in Genistein groups ($P < 0.05$). The relative MTA1 mRNA expression levels were (0.608 ± 0.039) , (0.515 ± 0.057) , (0.442 ± 0.443) and (0.294 ± 0.035) respectively, after 0, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Genistein treatment for 72 h. **Conclusion** Genistein could effectively inhibit the growth and invasion ability of ovarian cancer in dose dependent pattern *in vitro* and decreased MTA1 expression may play an important role in this process.

Key words: Genistein; Ovarian tumor; Invasion; MTA1

摘要:目的 探讨 Genistein 对卵巢癌细胞株 SKOV3 侵袭转移能力的抑制作用及其机制。**方法** 用不同浓度的 Genistein 处理 SKOV3 细胞,采用锥虫蓝活细胞拒染法检测癌细胞体外生长活性,划痕损伤实验及 Transwell 小室观察其对细胞运动及侵袭能力的影响,利用 RT-PCR 技术检测 Genistein 对 SKOV3 细胞中 MTA1 mRNA 表达的影响。**结果** Genistein 抑制 SKOV3 细胞的生长,并呈剂量依赖性($P < 0.05$);其对 SKOV3 细胞的运动及侵袭能力均有明显抑制作用($P < 0.05$);并且能显著降低 MTA1 mRNA 的表达($P < 0.05$)。**结论** Genistein 在体外剂量依赖性地抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 的侵袭转移,其作用机制可能与通过降低 MTA1 的表达有关。

关键词: Genistein; 卵巢肿瘤; 侵袭; MTA1

中图分类号: R737.31; R730.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0633-03

0 引言

卵巢恶性肿瘤是女性生殖器常见肿瘤之一,其

发病隐匿,极易发生转移而广泛播散,早期临床诊断率低,70%患者就诊时已属晚期,预后极差,抑制肿瘤的侵袭和转移是提高患者生存率的关键。研究表明金雀异黄酮(Genistein)具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞衰老和细胞凋亡等作用^[1],但其对卵巢癌细胞转移性的影响尚不明确。本研究通过观察 Genistein 对卵巢癌细胞系 SKOV3 侵袭和转移的

收稿日期:2009-10-26;修回日期:2010-03-01

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科

作者简介:熊宙芳(1974-),女,博士,主治医师,主要从事妇科肿瘤学的研究

影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

SKOV3 为卵巢腺癌细胞系,本科冻存,培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中,在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。以不含 Genistein 的培养液为空白对照组,依据参考文献设计实验组用药剂量^[2],并以含 12.5、25、50 μmol/L Genistein 的培养液设为实验组,每次实验均重复 3 次。

1.2 主要试剂

Genistein 购自 Sigma 公司,用 DMSO 溶解,配制成贮存液,抽滤,分装保存于 -20℃ 冰箱,Transwell 小室,Matrigel 购自美国 BD 公司。MTA1 及 β-actin 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 癌细胞生长活性检测

将 SKOV3 细胞以 1 × 10⁴ / ml 的密度接种于 24 孔培养板,每组 5 个复孔,待细胞贴壁后加入 12.5、25、50 μmol/L Genistein,分别于加药后 0、24、48、72 h 用 0.25% 胰酶消化细胞,锥虫蓝染色,于倒置显微镜下计数活细胞,每次计数重复 3 次。

1.4 Genistein 对卵巢癌细胞移行的影响

细胞悬液接种于 6 孔板,汇合成单层后,用 tip 头制作宽约 1 mm 的条形损伤区,PBS 漂洗 3 次去除悬浮细胞,对照组加不含 Genistein 的培养液,实验组加 12.5、25、50 μmol/L Genistein,培养 24 h 后,2% 结晶紫染色 30 min,在倒置相差显微镜下随机选取每孔 5 个低倍视野(100 倍),计数越过划线生长的细胞数,取平均值作为移行细胞数,并照相,检测 Genistein 对卵巢癌细胞系 SKOV3 移行的影响。

1.5 细胞侵袭降解实验

细胞侵袭实验使用 24 孔的滤膜孔直径为 8 μm 的 Transwell 小室,先用 Matrigel 基质胶按每孔 50 μl 均匀铺在 Transwell 小室底部的多聚碳酸酯膜上,37℃ 放置 3 h,然后转入室温下干燥过夜。SKOV3 细胞在加有 Genistein(终浓度 0~50 μmol/L) 的细胞培养液中培养 72 h 后,0.25% 胰酶消化,收获各组细胞,分别用无血清培养液调整细胞密度为 3 × 10⁵ / ml,加入上室,置培养箱培养,观察细胞的穿膜情况。并用棉签拭去滤膜上的细胞,将膜置于 4% 多聚甲醛中固定 20 min,2% 结晶紫染色 30 min,随机计数 5 个高倍镜视野下的穿膜细胞数,取其平均值。

1.6 RT-PCR 检测 MTA1 mRNA 的表达水平

收集经用 0、12.5、25、50 μmol/L 的 Genistein 处理 72 h 后的 SKOV3 细胞,以 Trizol 提取各组细胞总 RNA,逆转录反应后,加入引物进行 PCR 扩增。MTA1 上游引物序列:5'-AGCTACGAG-CAGCACAACGGGGT-3',下游引物序列:5'-CACGCTTGGTTTCCGAGGAT-3',扩增片段长度为 290 bp。以 β-actin 为内参照,序列为:上游,5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3',下游 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAG-3',扩增出 618 bp 片断。反应条件为 94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照。凝胶图像分析仪检测 MTA1 与 β-actin 扩增片段灰度的比值。

1.7 统计学方法

运用 *t* 检验和方差分析,采用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理。

2 结果

2.1 Genistein 对 SKOV3 细胞生长活性的影响

12.5、25、50 μmol/L Genistein 实验组从第 48 h 开始受到明显的抑制作用,细胞抑制率分别为 23.5%、50.1%、59.1%,与对照组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。12.5、25、50 μmol/L Genistein 对 SKOV3 细胞的增殖均有抑制作用,并呈时间和剂量依赖性,在同一药物浓度下,细胞的抑制率随药物作用时间的延长而有增加趋势。

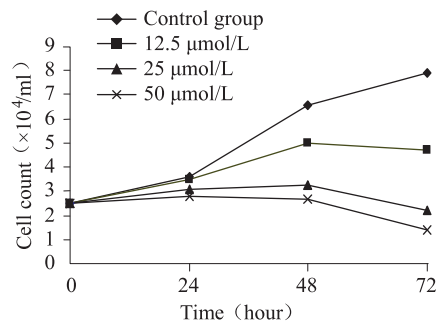


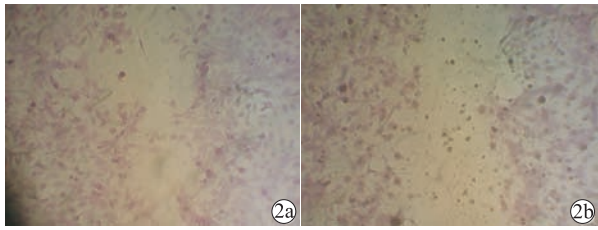
图 1 Genistein 对 SKOV3 细胞生长活性的影响

Figure 1 Effects of Genistein on the growth activities of SKOV3 cells

2.2 Genistein 对 SKOV3 卵巢癌细胞移行的影响

24 h 后,对照组及 12.5、25、50 μmol/L Genistein 组越过划线生长的细胞数目分别为 266.78 ± 13.59、211.45 ± 27.44、145.37 ± 16.40 和 67.59 ± 10.00,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见图 2。12.5、25、50 μmol/L Genistein SKOV3 对 SKOV3 细胞移行的抑制率分别为 20.80%、45.66% 和 74.69%。结果表明 Genistein 抑制 SKOV3 卵巢癌

细胞的移行,且呈剂量相关性。



2a: control group(24 h); 2b: 50 μmol/L Genistein (24 h) (×100)

图 2 细胞划痕损伤模型中 SKOV3 细胞的迁移

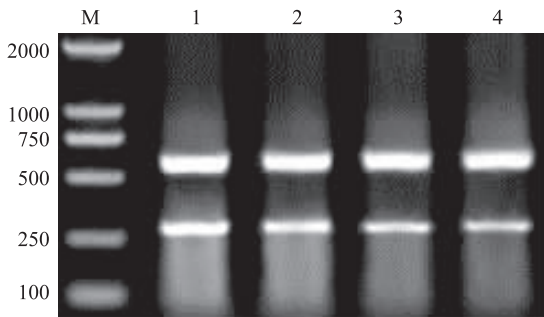
Figure 2 SKOV3 cell migration in wound-healing model

2.3 Genistein 对 SKOV3 细胞侵袭降解性的影响

SKOV3 细胞在加有 Genistein 的培养液中培养 72 h 后,对人工基底膜的侵袭能力显著下降,并呈剂量依赖性。对照组侵袭至滤膜下表面的细胞数为(127.9 ± 14.5),12.5、25、50 μmol/L Genistein 实验组侵袭至滤膜下表面的细胞数分别为(109.6 ± 11.8)、(64.4 ± 8.3)和(33.5 ± 4.4),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Genistein 对 SKOV3 细胞 MTA1 mRNA 表达的影响

用 0、12.5、25、50 μmol/L 的 Genistein 处理 SKOV3 细胞 72 h 后,RT-PCR 分析 MTA1 mRNA 的表达。结果发现 MTA1 mRNA 相对灰度值分别为 0.608 ± 0.039、0.515 ± 0.057、0.442 ± 0.443 和 0.294 ± 0.035,MTA1 mRNA 的表达逐渐减弱,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



M: marker; 1: control group; 2: 12.5 μmol/L;

3: 25 μmol/L; 4: 50 μmol/L

图 3 Genistein 对 SKOV3 细胞 MTA1 mRNA 表达的抑制作用

Figure 3 Effects of Genistein

on the expression of MTA1 mRNA

3 讨论

Genistein 是从大豆中提取的一种黄酮类有效成分,是一种广谱的蛋白酪氨酸激酶抑制剂,在体内可能通过抑制细胞 PTK 活性、诱导细胞分化及促进细胞凋亡等而产生抗肿瘤作用^[3-4]。核因子 kappaB (nuclear factor kappa B, NF-kappaB)是多极

性的转录因子,可转录调控一系列与细胞生存相关基因的表达而发挥抗凋亡作用^[5]。NF-kappaB 和 Akt 细胞信号转导通路在维持细胞存活和凋亡之间的平衡方面起关键作用,Genistein 能够抑制这两种信号转导通路并诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。研究表明,Genistein 在包括乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌及前列腺癌等多种肿瘤的发生、发展阶段存在着多重抑制效应^[7]。我们的研究结果表明 Genistein 能显著抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的生长,并呈剂量依赖性,其中 50 μmol/L 的 Genistein 作用 48 h 后,SKOV3 细胞抑制率可达 59.1%。

肿瘤的转移机制是一个多种基因参与的复杂过程,主要包括肿瘤细胞从原发灶分离、浸润血管和淋巴、到远处和内皮细胞黏附、分解基质、外渗、导致血管生成并逃避抗肿瘤免疫应答,最终在转移部位生长^[8]。肿瘤转移相关基因 1 (metastasis-associated gene 1, MTA1)是近年来发现的一个与肿瘤转移密切相关的基因,人 MTA1 位于染色体 14q 32.3,其 cDNA 全长 2756 bp,其编码的蛋白质有 715 个氨基酸残端,分子量为 82 kD。MTA1 蛋白是 NuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylase, 核小体重构及组蛋白脱乙酰基酶复合物)的一个亚单位,并且和组蛋白脱乙酰基酶 1 相互作用。研究表明组蛋白乙酰转移酶和组蛋白脱乙酰基酶能够通过改变染色质结构在调控基因的转录表达中起重要作用。目前研究已证实 MTA1 和组蛋白脱乙酰化相关,具有较强的抑制转录活性功能^[9]。研究表明 MTA1 在口腔鳞状细胞癌中的表达水平较正常口腔组织的高,同样的,MTA1 在胃癌、食管癌中高表达,而且 MTA1 高表达和肿瘤的局部浸润、淋巴结转移及血管受累相关。在口腔鳞癌细胞系中,MTA1 的表达水平越高,肿瘤细胞系的转移潜能越高。这表明 MTA1 基因的表达和肿瘤的侵袭与转移密切相关^[10]。Hofer 等^[11]建立了稳定表达 MTA1-增强型绿色荧光蛋白 (EGFP-MTA1)融合基因的 PANC-1 胰腺癌细胞株,结果表明 EGFP - MTA1 显著增强 PANC-1 细胞的运动及侵袭能力。EGFP-MTA1 的表达对 PANC-1 细胞非底物依赖性的细胞生长无影响,但减弱底物依赖性的细胞增殖。EGFP-MTA1 表达能够显著改变 PANC-1 细胞中角蛋白微丝蛋白系统的结构及细胞骨架相关蛋白如 IQGAP1 的定位。这提示 MTA1 的高表达可通过提高胰腺癌细胞侵袭转移的能力,并通过细胞骨架的改变增加胰腺癌细胞的恶性程度。本研究发

行,可冷冻储藏,稳定性高,体积小易清除,无繁殖能力等优点,有可能成为优质的肿瘤疫苗。exosome 的提取和免疫相关蛋白组成的初步研究为进一步运用生物技术研究其在体内外的靶向性、生物学功能和作用机制奠定了基础,为膀胱移行细胞癌的免疫治疗提供了新的可能途径。

参考文献:

[1] Iero M, Valenti R, Huber V, et al. Tumor-released exosomes and their implications in cancer immunity[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1):80-88.

[2] Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells[J]. *Immunol Meth*,2002, 270(2):211-226.

[3] Li XB, Zhang ZR, Schluesener H, et al. Role of exosomes in immune regulation[J]. *J Cell Mol Med*,2006,10(2),364-375.

[4] Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexo-some immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Transl Med*,2005,3(1):9.

[5] Wolfers J,Lozier A,Raposo G,et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming[J]. *Nat Med*, 2001,7(3):297-303.

[6] Andre F, Schartz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumor-derived exosomes[J]. *Lancet*, 2002,360(9329):295-305.

[7] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells; chaperoning of the innate and adaptive immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002,20(4):395-425.

[8] Robert G, Mathias G, Maria AB, et al. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells [J]. *Cancer Res*, 2005,65(12):5238-5247.

[9] Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, et al. Urinary Cytokeratin 20 as a Marker for Transitional Cell Carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2000,37(5):601-604.

[10] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, Intracellular Sorting, and processing of Exosomes by Dendritic Cells [J]. *Blood*,2004,104(10):3257- 3266.

[编辑:周永红;校对:安 凤]

(上接第 635 页)

力,并显著降低 MTA1 mRNA 的表达,这表明 Genistein 可能通过降低 MTA1 的表达水平从而抑制卵巢癌的侵袭转移,说明 Genistein 有望开发成有效的抗卵巢癌转移的药物。

参考文献:

[1] Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(5): 260-277.

[2] Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein[J]. *Cancer Lett*, 2008,69(2):226-242.

[3] 袁鹏,黄艳红,辛晓燕,等. Genistein 对耐药卵巢癌细胞 SK-OV3 增殖、凋亡和顺铂敏感性的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(3):187-190.

[4] 宋丹凤,王新建,张晓娟,等. 金雀异黄素对胃癌细胞 iNOS 表达影响与抑癌作用研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2003,30(1): 29-31.

[5] 刘国红,王波. NF-κB 抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷提高卵巢癌细胞顺铂化疗的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008,15(4):356-360.

[6] Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, et al. The role of genistein

and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(4):401-407.

[7] Büchler P, Gukovskaya AS, Mouria M, et al. Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid[J]. *Pancreas*, 2003, 26(3): 264-273.

[8] Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2002,35(2):149-154.

[9] Toh Y, Ohga T, Endo K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2004,110(3):362-367.

[10] Kawasaki G, Yanamoto S, Yoshitomi I, et al. Overexpression of metastasis-associated MTA1 in oral squamous cell carcinomas: correlation with metastasis and invasion[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008,37(11):1039-1046.

[11] Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC21 pancreatic carcinoma cells[J]. *British J Cancer*, 2004, 90(2): 455-462.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]