

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)23-2120-04

Genistein 对人卵巢癌细胞系 3AO 抑制增殖的作用及机制的探讨

田爽¹, 辛晓燕¹, 黄艳红¹, 高旭², 张淮¹, 袁鹏¹(¹ 第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033; ² 第四军医大学唐都医院神经外科, 陕西 西安 710038)

Inhibitory effects of genistein on proliferation in human ovarian carcinoma cell line 3AO and related mechanism

TIAN Shuang¹, XIN Xiao-Yan¹, HUANG Yan-Hong¹, GAO Xu², ZHANG Wei¹, YUAN Peng¹¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China,²Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effects of genistein on proliferation inhibition and apoptosis induction in human ovarian carcinoma cell line 3AO and to explore its anti-cancer mechanism.

METHODS: After cultured with different doses of genistein for different time periods, the cells were tested by MTT assay. Study on the ultrastructure of 3AO cells was performed by transmission electron microscope (TEM) after the administration of genistein. Apoptosis was detected by means of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method. Apoptosis rate and cell cycle distribution of 3AO cells were measured by flow cytometry (FCM). The expression of estrogen receptor β protein was measured by immunocytochemical technique. **RESULTS:** After 3AO cells were treated with different concentrations of genistein, dose- and time-dependent growth inhibition was demonstrated. Inhibition percentage in cells exposed to 10 mg/L and 20 mg/L genistein for 72 h were, respectively, 54.24% and 65.99%. Also, genistein could block 3AO cells in the G2/M phase of cell cycle, and a typical sub-diploid apoptosis peak was demonstrated before G1/G2 phase. Moreover the apoptosis was time-dependent. The characteristic morphological changes of apoptosis in genistein-treated 3AO cells were observed by TEM. TUNEL staining revealed apoptosis-positive cells. Genistein could up-regulate the expression of ER β . **CONCLUSION:** Genistein can dose- and time-dependently inhibit growth and induce apoptosis in ovarian carcinoma cell line

3AO the potential pathway of ER β .

【Keywords】 genistein; ovarian neoplasms; cell line; apoptosis

【摘要】目的: 研究植物雌激素染料木黄酮对人卵巢癌细胞系 3AO 细胞增殖的抑制作用和凋亡的诱导作用, 探讨其抗癌作用的机制。方法: 应用 MTT 法检测不同浓度染料木黄酮对 3AO 细胞的生长抑制作用, 电镜观察药物作用后细胞的超微结构改变, TUNEL 法确定凋亡, 流式细胞仪检测细胞周期、定量分析凋亡, 免疫细胞化学技术检测雌激素 β 受体的表达。结果: 3AO 细胞经不同浓度染料木黄酮处理后, 细胞生长明显受到抑制, 且这种抑制作用随时间延长及浓度增高而增强, 10 mg/L 和 20 mg/L 染料木黄酮作用 72 h 后, 抑制率分别达到 54.24% 和 65.99%。染料木黄酮阻断 3AO 细胞生长于 G2/M 期, 在 G0/G1 前出现典型亚二倍体凋亡峰, 且凋亡呈时间依赖性。电镜观察到用药后凋亡细胞典型的形态学特征。TUNEL 法观察到大量阳性凋亡细胞。免疫细胞化学法检测到用药后 ER β 表达明显加强。结论: 染料木黄酮对 3AO 细胞的生长有明显的呈时间及浓度依赖性的抑制作用, 并诱导其发生凋亡。染料木黄酮可能通过雌激素 β 受体途径发挥药理作用, 诱导卵巢癌细胞发生凋亡。

【关键词】 染料木黄酮; 卵巢肿瘤; 细胞系; 细胞凋亡

【中图分类号】 R969.4 **【文献标识码】** A

0 引言

染料木黄酮是异黄酮类化合物, 化学名为 4', 5', 7-三羟基异黄酮, 它广泛存在于包括大豆在内的多种蔬菜和水果中^[1]。实验研究显示, 染料木黄酮在乳腺癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤等多种肿瘤的发生、发展中有多重抑瘤效应^[2], 已成为国际抗癌药物的研究热点。其主要抗癌机制为调节雌激素受体、抑制细胞代谢关键酶活性、增加抗氧化酶的活性及抑制血管生成作用等^[3-7]。因而, 染料木黄酮对肿瘤的化学预防及治疗作用受到人们的广泛关注。卵巢癌是激素相关性肿瘤, 是一种常见且恶性程度较高的妇科肿瘤。本实验采用人卵巢粘液性囊腺癌细胞系 3AO, 研究染料木黄酮对该细胞系增殖和凋亡的影响, 为其应用于卵巢癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期 2005-12-21; 接受日期 2006-03-28

基金项目 国家自然科学基金(30472226)

通讯作者: 辛晓燕. Tel (029) 84775387 Email gynobs@fmmu.edu.cn

作者简介: 田爽. 博士生(导师辛晓燕). Tel (029) 84775391

Email tiansh@fmmu.edu.cn

1.1.1 细胞培养 人卵巢粘液性囊腺癌细胞系 3AO 由第四军医大学西京医院妇产科实验室常规保存,用含 100 mL/L 新生牛血清(杭州四季青)的 DMEM(美国 Gibco)培养基培养细胞,于 37℃,含 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养传代,选用对数生长期细胞实验。

1.1.2 实验试剂 染料木黄酮购于美国 Sigma 公司,纯度为 98%,用分析天平称取染料木黄酮,用 DMSO 配成储备液,置于 -20℃ 冷冻保存。细胞给药前,用 DMEM 培养液稀释至所需浓度,并调整 DMSO 在各组培养液中的终浓度均为 5.1 mmol/L。TUNEL 试剂盒购于德国 Roche 公司;兔抗雌激素性 β 受体(estrogen receptor β, ERβ)购于美国 Chemicon 公司;二抗 SP 试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.1.3 爬片制备 对数生长期细胞接种于 24 孔板中进行爬片,培养 24 h 后细胞全部贴壁,实验分空白对照组和实验组(染料木黄酮终浓度为 10 mg/L),加入不同处理因素共孵育,于 48 h 收集爬片, PBS 洗涤 2 次, 950 mL/L 乙醇固定爬片 10 min, 晾干备用。

1.2 方法

1.2.1 形态学观察 倒置显微镜下动态观察培养瓶中卵巢癌细胞在用药前后的变化。

1.2.2 四唑盐(MTT)比色试验测定生长抑制率 对数生长期 3AO 细胞以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔培养板。细胞贴壁培养 24 h 后,加入染料木黄酮(终浓度分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/L)共孵育进行 MTT 实验。对照组只加培养液, DMSO 溶剂对照组只加 5.1 mmol/L DMSO。每组设 6 个复孔。与实验组平行设只加培养液不加细胞的空白对照孔,比色时以此孔调零。酶连免疫检测仪测定不同药物浓度及不同时间下(24, 48, 72 h)的吸光度值 $A_{490\text{nm}}$ 。以每组 6 个孔 $A_{490\text{nm}}$ 的平均值作为各组的平均 $A_{490\text{nm}}$ 值。记录结果,计算染料木黄酮对 3AO 细胞的抑制率:细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{药物组 } A_{490\text{nm}} / \text{对照组 } A_{490\text{nm}}) \times 100\%$ 。IC₅₀ 表示半数抑制浓度。

1.2.3 透射电镜下观察细胞凋亡 对数生长期细胞加入 10 mg/L 染料木黄酮共孵育 48 h 消化收集细胞, PBS 洗 2 次,离心后加入 4℃ 预冷的 40 g/L 戊二醛固定, 10 g/L 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,制成超薄切片,透射电镜下观察。

1.2.4 TUNEL 法检测确定凋亡 随机选取对照组和实验组爬片,严格按照说明书流程操作,水化、封闭、渗透,滴加 TUNEL 反应混合液, 37℃ 暗湿环境中

孵育 60 min, 漂洗,加 Converter-POD 液 37℃ 湿盒孵育 30 min, DAB 显色,光镜下观察。细胞凋亡有一项重要的特征为细胞内的 DNA 会碎裂成片断, TUNEL 可以有效地去探测 DNA 片段的产生。因此其表达定位于核,阳性反应为核被染棕褐色。随机取 10 个高倍镜视野进行阳性细胞计数,计算平均值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期,定量分析凋亡 对数生长期细胞贴壁后,与浓度为 5, 10 mg/L 的染料木黄酮共孵育,空白对照组不加药,分别于 12, 24, 48 h 离心收集细胞, PBS 洗涤并制成单细胞悬液。①PI 单染色法检测细胞周期变化;②Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.6 免疫细胞化学法检测 ERβ 爬片依步骤处理后加入一抗, 4℃ 过夜,次日滴加二抗, SP 法染色, DAB 显色,苏木精复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,光镜下观察。

统计学处理:采用统计软件 SPSS 12.0 进行分析,试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间 $A_{490\text{nm}}$ 比较用析因设计的方差分析,组间两两比较用 SNK 法。TUNEL 法阳性细胞计数,采用两样本均数 t 检验, $P < 0.01$ 差别有显著意义。

2 结果

2.1 染料木黄酮对 3AO 细胞形态的影响 倒置显微镜下可见 3AO 细胞呈单层生长,细胞呈椭圆形或多角形,胞核圆形或椭圆形,胞质透亮。经染料木黄酮处理后,细胞形状变窄,胞质透亮度下降,颗粒感增强,部分细胞突回缩变圆,脱落呈悬浮状,并见细胞碎片。且这些变化随染料木黄酮剂量的增加和作用时间的延长而加重。至 72 h,细胞回缩成不规则圆形,可见大量细胞碎片。电镜下可见细胞超微结构发生典型的凋亡形态学改变。

2.2 染料木黄酮对 3AO 细胞生长的抑制作用 MTT 试验表明染料木黄酮对 3AO 细胞的抑制作用随浓度的升高和用药时间延长而增强,经计算 IC₅₀ 为 10 mg/L,药物浓度与作用时间之间有交互作用($P < 0.01$, 表 1)。

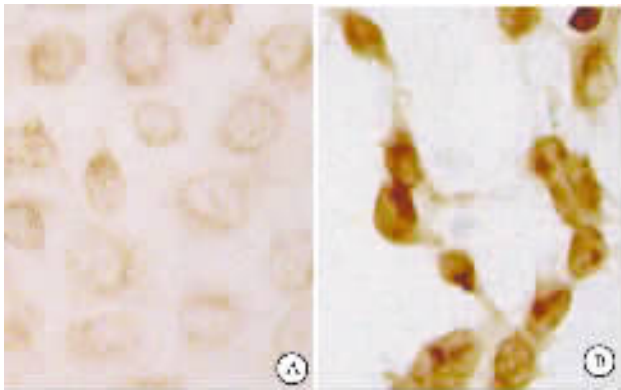
2.3 TUNEL 法检测确定凋亡 光镜下, 10 mg/L 染料木黄酮作用 48 h 后,出现大量阳性凋亡细胞,核深染,成斑点状或斑块状;而对照组细胞核几乎无着色(图 1)。加药组阳性细胞数量平均为 14.32 ± 2.56 , 而对照组中阳性细胞数量仅为 1.28 ± 1.55 , 二者差异显著($t = 13.78, P < 0.01$)。

表1 MTT 法检测染料木黄酮对 3AO 细胞增值的影响

($\bar{x} \pm s$)

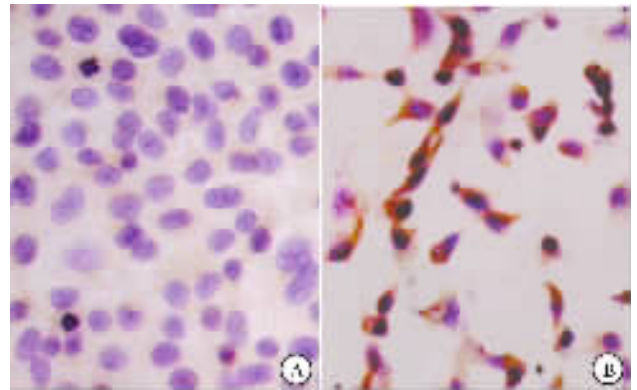
组别	24 h		48 h		72 h	
	$A_{490 \text{ nm}}$	抑制率(%)	$A_{490 \text{ nm}}$	抑制率(%)	$A_{490 \text{ nm}}$	抑制率(%)
对照	0.858 ± 0.054	0	0.966 ± 0.108	0	1.142 ± 0.074	0
DMSO 对照	0.845 ± 0.058	1.52	0.944 ± 0.065	2.28	1.089 ± 0.104	4.64
0.625 mg/L	0.940 ± 0.098 ^a	-9.56	0.899 ± 0.066 ^a	6.98	0.861 ± 0.076 ^a	24.59
1.25 mg/L	0.903 ± 0.096 ^a	-5.25	0.838 ± 0.132 ^a	13.22	0.724 ± 0.065 ^a	36.60
2.5 mg/L	0.854 ± 0.089 ^b	0.47	0.793 ± 0.149 ^b	17.91	0.674 ± 0.035 ^b	40.95
5.0 mg/L	0.808 ± 0.041 ^b	5.79	0.619 ± 0.059 ^b	35.96	0.608 ± 0.054 ^b	46.76
10 mg/L	0.773 ± 0.071 ^b	9.94	0.484 ± 0.061 ^b	49.90	0.522 ± 0.041 ^b	54.24
20 mg/L	0.745 ± 0.031 ^b	13.17	0.416 ± 0.122 ^b	56.91	0.388 ± 0.019 ^b	65.99

^a $P < 0.01$ vs 对照和各浓度各时间点组间比较; ^b $P < 0.01$ vs 对照和各时间点组间比较。



A: 对照组; B: 10 mg/L 染料木黄酮 48 h.

图1 TUNEL 法检测确定凋亡 ×400



A: 对照组; B: 10 mg/L 染料木黄酮 48 h.

图2 免疫细胞化学法检测 3AO 细胞中 ERβ 的表达 SP × 100

2.4 染料木黄酮对 3AO 细胞周期和凋亡率的影响

流式细胞仪结果显示, 和对照组相比, 染料木黄酮处理的 3AO 细胞出现细胞周期中 G2/M 期细胞显著增多, S 期细胞显著减少, 表现出 G2/M 期阻滞; 此外, 10 mg/L 染料木黄酮给药 48 h 在 G0/G1 前出现典型亚二倍体凋亡峰。与对照组相比, 5 mg/L 与 10 mg/L 染料木黄酮作用 12、24、48 h 后抑制率两两之间均差异显著 ($P < 0.01$)。药物处理不同时间各组间抑制率亦均有显著差异 ($P < 0.01$)。表明染料木黄酮诱导 3AO 细胞凋亡随浓度增高和时间延长而增强, 其中 10 mg/L 染料木黄酮作用 48 h 后抑制率达 38.1%。卵巢癌中 ERβ 蛋白表达定位于胞核, 阳性反应为核深染成深棕色。光镜下可见染料木黄酮作用后, ERβ 表达明显增强(图 2)。

3 讨论

本实验采用了多种检测细胞增殖活性及凋亡的方法, 检测了染料木黄酮对 3AO 细胞凋亡作用的量效和时效关系, 较肯定地证明了一定浓度的染料木黄

酮可诱导 3AO 细胞凋亡, 抑制其增殖。MTT 试验中, 随着染料木黄酮浓度的升高, 3AO 细胞的生长均受到不同程度的抑制。当剂量达 10 mg/L 和 20 mg/L 时, 抑制作用明显, 表明染料木黄酮对 3AO 细胞的抑制作用随浓度的升高和用药时间延长而增强。作为一种植物雌激素, 染料木黄酮结构与 17β-雌二醇相似^[8], 可与雌激素受体(ER)结合, 结合后的潜在健康效应表现为 U 型剂量-效应关系, 表现为类雌激素活性和抗雌激素活性。染料木黄酮的雌激素作用和抗雌激素作用, 取决于剂量及机体体内雌激素状态, 具有双向调节平衡功能。此结论与李昱等结论不同^[9]。

实验中观察到染料木黄酮作用于 3AO 细胞系后, 诱导卵巢癌细胞发生凋亡, 从而抑制细胞生长。倒置显微镜下可见酷似凋亡的细胞, 电镜下可见典型的细胞凋亡形态学改变。TUNEL 法更直观地观察到大量阳性凋亡细胞。

卵巢癌是性激素依赖性肿瘤, 雌激素有利于卵巢癌的发生, 雌激素通过与 ERα、ERβ 的同二聚体及异

二聚体结合发挥生物学作用。Rutherford 等^[10]发现,在卵巢癌中,ER α /ER β mRNA 的比率升高,ER α 相对于 ER β 的过表达是卵巢癌发生的标志,而此结果系 ER β 表达下调所致。本实验免疫细胞化学结果显示染料木黄酮作用后,ER β 表达明显加强。说明染料木黄酮作为一种植物雌激素,当达到一定浓度时,与雌激素竞争性结合 ER β , 表现为抗雌激素活性,从而诱导卵巢癌细胞发生凋亡,发挥抗肿瘤作用。因此染料木黄酮可能通过 ER β 途径发挥药理作用。并且染料木黄酮可能独立的通过雌激素受体途径抑制细胞增殖和因子的表达。我们的发现揭示了染料木黄酮化学预防卵巢癌的可能机制,且染料木黄酮几乎无毒性^[11],为染料木黄酮临床治疗卵巢癌提供一定的实验依据。

【参考文献】

- [1] Griffiths K, Morton MS, Denis L. Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer[J]. Eur Urol, 1999, 35: 443-455.
- [2] Arai N, Strom A, Rafter JJ, et al. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: Growth effects of estrogen and genistein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 425-431.
- [3] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential tar-

get for diagnosis and therapy[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(21): 4368-4380.

- [4] Chen X, Anderson JJ. Isoflavones inhibit proliferation of ovarian cancer cells *in vitro* via an estrogen receptor-dependent pathway[J]. Nutr Cancer, 2001, 41(1-2): 165-171.
- [5] Shao ZM, Wu J, Shen Z. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(21): 4851-4857.
- [6] Tanaka T, Kohno H, Tanino M, et al. Inhibitory effects of estrogenic compounds, 4-nonylphenol and genistein, on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2002, 52(1): 38-45.
- [7] Hong HJ, Chan P, Liu JC, et al. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(1): 159-168.
- [8] 黄艳红, 辛晓燕, 陈亚琼. 染料木素与 17 β 雌二醇对去势大鼠生殖系统的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(6): 551-553.
- [9] 李昱, 米黎. Genistein 对人卵巢癌细胞系抑制增殖和促进凋亡作用及机制探讨[J]. 肿瘤, 2003, 23(6): 490-493.
- [10] Rutherford T, Brown WD, Sapi E, et al. Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer[J]. Tet Gynecol, 2000, 9(3): 417-421.
- [11] 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[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(8): 761-763.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)23-2123-01

人工全髋关节置换术后护理

杨芳 杨文英 赵妮 李薇

(武警陕西省总队医院外科, 陕西 西安 710054)

【关键词】股骨颈骨折, 全髋关节置换术, 护理

【中图分类号】R473 【文献标识码】B

1 临床资料 武警陕西省总队医院外科 2002/2005 收治股骨颈骨折患者 126(男 95, 女 31)例, 年龄 55~92 岁, 平均年龄 65 岁。其中头下型股骨颈骨折 62 例, 颈中型 36 例, 基底部 28 例。所有患者均采用全麻或硬膜外麻醉行人工全髋关节置换手术。术后置患者于平卧位, 在两膝之间放一梯形枕, 保持患肢外展 30°中立位, 穿“T”字鞋^[1], 常规吸氧, 监测血压 24~48 h, 严密观察体温变化。术后第 2 日患者应进食高蛋白、高热量、高维生素和适当脂肪成分的饮食, 以加强营养, 术后 1~2 wk 由专人指导逐步进行功能锻炼等。经过耐心、细致的护理, 患者术后 3 wk 均可扶拐下地活动, 恢复行走功能, 生活能够自理, 未出现并发症。

收稿日期 2006-09-16; 接受日期 2006-11-30

作者简介 杨芳, 本科, 主管护师, Tel: (029) 82245242

2 讨论 人工全髋关节置换术是一项成熟的现代化高科技技术。最新权威机构的统计资料表明, 人工关节正常使用超过 10 a 以上者已占 95%^[2], 它能有效地恢复关节功能, 解除疼痛, 从而提高患者的生命质量。人工全髋关节置换术后感染是术后最严重的并发症^[2]之一, 也是造成手术失败的主要原因之一。预防感染的关键是加强手术前后各个环节的护理。注意手术切口局部及体温变化, 积极预防肺部感染、泌尿系感染以及褥疮的发生。术后应指导患者早期进行功能锻炼如: 踝关节的伸屈练习, 股四头肌的等长收缩, 配合应用足底静脉泵等^[3], 并协助医师做好预防性抗凝治疗, 可以有效地预防下肢深静脉血栓的形成。告诉患者要爱惜关节, 防止脱位, 不可以蹲便坑、坐矮凳、坐低软的沙发、跪姿、盘腿坐及翘二郎腿, 还要注意不要过度弯腰拾物, 爬山、爬楼梯等^[4], 跑步亦可损坏人工关节。因此, 选择适当的活动和运动方式, 不仅可以保持关节功能, 还可以增进健康, 控制体质量。

【参考文献】

- [1] 杨元娇, 朱庆. 老年股骨颈骨折患者行全髋关节置换术围手术期的护理体会[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2006(3): 283.
- [2] 吕厚山. 人工关节外科学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 44, 30, 226.
- [3] 殷晓红. 预防人工关节置换术后下肢深静脉血栓形成的护理对策[J]. 中华护理杂志, 2001(5): 331.
- [4] 陈丽. 人工全髋关节置换病人的康复指导[J]. 临床医学, 2005, 25(4): 93.

编辑 杨湘华