

异黄酮 genistein 对小鼠恶性黑色素瘤转移的实验性治疗

颜春洪, 韩 锐*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 研究异黄酮 genistein 对肿瘤转移的治疗作用。方法: B16-BL6 细胞由尾静脉注入 C57BL/6 小鼠体内, 于 d 15 观察动物肺转移灶。genistein 混悬于 2% 卵磷脂中, 从接种瘤细胞前 1 天开始 ip, 剂量为 100 和 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。结果: genistein 可抑制肺转移灶形成, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 用药组小鼠转移灶数目明显减少; 作为对照, 腹腔给予环磷酰胺 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 形成的转移灶数目无明显变化, 但形成的转移瘤灶体积减小。当 genistein 和环磷酰胺合用时, 转移小鼠的存活时间明显延长。结论: genistein 可抑制肿瘤转移, 其作用与细胞毒药物不同, 与细胞毒药物合用可提高其抗肿瘤转移的作用。

关键词 4', 5, 7-三羟基异黄酮(genistein); 小鼠黑色素瘤; 肿瘤转移; 抗肿瘤药物

在我国、日本等亚洲国家, 乳癌、结肠癌及前列腺癌等肿瘤的发病率较低, 这可能与亚洲人大量食用豆类食物有关^[1]。豆类食物中富含异黄酮化合物, 其中最主要的一种是 genistein(4', 5, 7-三羟基异黄酮)。此化合物可抑制实验性乳癌的发生, 并有多种抗肿瘤药理活性, 如: 抑制肿瘤细胞生长、诱导恶性细胞分化、抑制血管新生等^[2]。我们曾报道这一化合物可明显抑制小鼠黑色素瘤 B16-BL6 细胞及人纤维肉瘤 HT1080 细胞的侵袭^[3-5], 提示该化合物有用于治疗肿瘤转移的前景。本文报道 genistein 对恶性黑色素瘤 B16-BL6 细胞实验性肺转移的治疗作用。

材 料 与 方 法

动物 C57BL/6 小鼠, ♀, 18 ~ 20 g, 购自中国医学科学院动物研究所。

药物 Genistein 系从植物中提取, 由本所植化室林茂教授提供。

细胞株及小鼠黑色素瘤实验性肺转移模型的建立^[6] B16-BL6 小鼠黑色素瘤细胞由 Fidler 教授(美国 M. D. Anderson 癌症中心)赠送。细胞常规培养于 RPMI1640 培养基(含 10% 小牛血清)中。接种动物前, 培养细胞用 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA/PBS 从培养瓶壁解离, 磷酸缓冲液(PBS)洗涤数次后, 重

悬于 PBS 中, 细胞密度为 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。上述细胞悬液 0.1 mL 给 C57BL/6 小鼠尾静脉注入。接种瘤细胞 d 15 处死动物, 剥离小鼠肺, 于解剖镜下观察并计形成的转移瘤灶数目。

Genistein 对黑色素瘤细胞肺转移的实验性治疗 Genistein 以 2% 卵磷脂混悬, 于接种黑色素瘤细胞的前 1 d 开始 ip 给药, 剂量分别为 100 和 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 14 \text{ d}$ 。动物于 d 15 处死, 计形成的肺转移灶数目。另外设置环磷酰胺(CTX)对照处理组, 环磷酰胺溶于生理盐水中, 以 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量分别于肿瘤接种前 1 d, 接种后 d 6, d 13(即一周 1 次)各 ip 给药 1 次; 同上的于 d 15 计肺转移灶数。

Genistein 与环磷酰胺合用对肺转移小鼠生命延长作用观察 同上方案合用 genistein 及环磷酰胺, 即从接种肿瘤前 1 d 至接种后 d 14 ip 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ genistein, 并于接种前 1 d, 接种后 d 6, d 13 同时 ip 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环磷酰胺; 停药后继续饲养动物, 记录各组动物的死亡时间, 观察药物对荷瘤小鼠的生命延长作用。

数据统计 数据表示成 $\bar{x} \pm s$, 数据差异性分别采用 χ^2 检验(转移发生率)、Mann-Whitney U 检验(转移灶数目、存活期)及 Student *t* 检验(体重)。

结 果

1 Genistein 对黑色素瘤细胞转移的治疗作用

B16-BL6 黑色素瘤细胞恶性程度高, 给 C57BL/6 小鼠尾静脉注入后约 2 周左右可在小鼠肺部形成转移瘤灶^[6]。在我们的实验中小鼠的肺转移发生率

约 90 % (8/9), 接种黑色素瘤细胞 15 d 后肺转移灶平均数目为 116 ± 58 ; 由于肿瘤细胞的异质性, 形成的转移灶大小差异较大, 其中, 较大转移灶 (直径大于 0.7 mm) 的比例约为 18.7%。在 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, genistein 可降低小鼠的肺转移灶数目 (82 ± 60), 但 $P > 0.05$ 。在 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, genistein 可使肺转移发生率降低至约 70 % (6/9), 虽然 $P > 0.05$, 但是在发生转移的动物中肺转移灶的数目降低至 33 ± 23 , 与对照组相比, 差异极显著 ($P < 0.01$), 见表 1。在 genistein 组动物中, 虽然肺转移灶数目明显减少, 但仍形成许多大的转移瘤灶; 直径

大于 0.7 mm 的较大转移灶的比例在 20 % 以上, 此比例甚至高于对照组 (表 1)。上述结果说明, genistein 可抑制肺转移灶形成, 但对肺转移瘤灶的生长无明显的抑制作用。环磷酰胺在 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量下, 可使肺转移形成率降至 80 % (7/9, $P > 0.05$), 但肺转移灶的平均数目仍为 101 ± 79 , 与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$); 但肺部形成的转移瘤灶明显较小, 绝大多数 (>97%) 瘤灶的直径小于 0.7 mm, 提示环磷酰胺可抑制转移瘤灶的生长, 这一作用与 genistein 明显不同。但两药均可致小鼠体重明显下降。

Tab 1 Effects of genistein on experimental tumor metastasis in mice

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Incidence	Number of metastases	Metastases larger than 0.7 mm / %
Control		8/9	116 ± 58	18.7 ± 5.6
Genistein	100	9/9	82 ± 60	28.4 ± 8.6
	200	6/9	$33 \pm 23^{**}$	24.6 ± 8.6
CTX	100	7/9	101 ± 79	3.0 ± 3.5

Genistein was suspended in 2 % lecithin and administered ip once every day, while CTX was administered ip once a week. The animals were sacrificed for counting the number of metastases on day 15 relative to the day of tumor cell injection. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$, $** P < 0.01$ vs control group.

2 Genistein 与环磷酰胺合用对肺转移小鼠存活时间的影响

图 1 显示, genistein 与环磷酰胺合用可明显

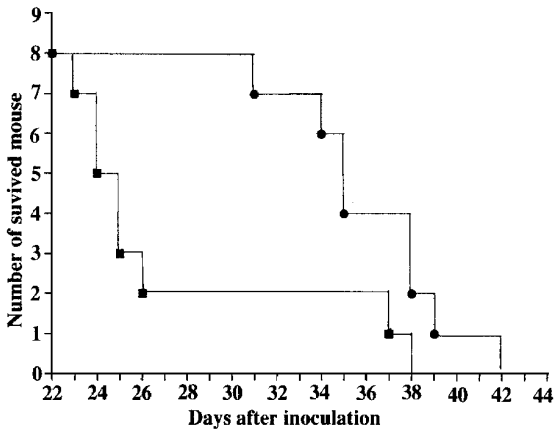


Fig 1 Effect of genistein co-administered with cyclophosphamide on the survival time of tumor-inoculated mice. B16-BL6 melanoma cells were injected into C57BL/6 mouse via tail lateral vein. Genistein ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was administered ip once a day since the day before tumor cell inoculation while CTX ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was co-administered on day-1, 6 and 13 relative to the day of cell inoculation. The animals were bred for recording the survival time of each animal. $n = 8$. ■—■ Control group; ●—● Genistein + CTX group.

延长小鼠的存活时间。对照组小鼠在 d 23 开始迅速死亡, d 26 对照动物 8 只只有 2 只存活, 这 2 只动物分别在 d 37 和 d 38 死亡。用药组动物则直到 d 31 才开始死亡, d 38 仍有 2 只存活, 至 d 42 用药组动物全部死亡。对照组动物平均存活时间为 (27.8 ± 6.1) d, 用药组动物平均存活时间显著延长至 (36.5 ± 3.4) d, $P < 0.01$ 。这一结果提示, genistein 与环磷酰胺合用可提高抗肿瘤转移的作用。

讨 论

异黄酮 genistein 是一种强的蛋白酪氨酸激酶抑制剂, 我们曾报道, 此化合物可通过阻断细胞与细胞外基质蛋白的相互作用, 从而有效抑制包括 B16-BL6 细胞在内的恶性细胞的侵袭^[3-5]。在本研究中, 我们则发现, 腹腔给予 genistein $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 可显著抑制 B16-BL6 小鼠黑色素瘤细胞的实验性肺转移, 不仅给药组的转移形成率有所下降, 而且形成的转移瘤灶的数目显著降低, 提示 genistein 也具有抗恶性肿瘤转移活性。肿瘤细胞由原发部位扩散, 转移至远处器官和组织是一个复杂的过程, 一般来说至少包括侵袭基底膜、逃避免疫监控、在转移

部位诱生新血管等几个过程。在实验性转移模型中,肿瘤细胞由静脉接种至动物体内,随血液循环至肺毛细血管后,肿瘤细胞粘附血管内皮细胞并侵袭穿过内皮下基底膜,这是形成肺转移灶的关键之一^[7]。曾有体外实验指出 genistein 是血管新生抑制剂^[8],由于微小转移灶生长依赖于新生血管网络的形成,因而 genistein 有可能抑制微小转移灶的生长^[9]。但在我们的实验中,在 genistein 处理组动物肺中仍形成许多较大的转移灶,其比例甚至略高于对照组。因此,genistein 不可能通过抑制血管新生而发挥抗转移活性。事实上,目前并没有直接的证据表明 genistein 在在体的情况下也能抑制新血管生成。虽然在体外实验中 genistein 对 B16-BL6 细胞的生长有一定抑制作用^[10],但本文结果显示,genistein 处理组中转移的细胞仍能迅速生长形成较大的转移瘤灶,提示 genistein 无明显抑制转移灶瘤细胞的生长。这一作用与细胞毒药物环磷酰胺明显不同,环磷酰胺处理组形成明显减小的肺转移灶,转移灶数目却没有明显减少。这一分析说明,抑制细胞生长作用可能不是 genistein 抗肿瘤转移的主要原因。我们曾报道,genistein 可抑制包括 B16-BL6 细胞在内的肿瘤细胞侵袭穿过重建基底膜,并改变侵袭相关性质,如粘附、运动、分泌基质蛋白水解酶^[3-5]。由于肿瘤细胞侵袭穿过血管内皮下基底膜是形成实验性肺转移灶的关键步骤之一,我们认为,genistein 可能通过抑制 B16-BL6 细胞侵袭穿过内皮下基底膜,从而抑制肺微小转移灶形成。genistein 抑制肿瘤细胞侵袭是其抗转移作用的主要机制。

需要指出的是,由于肿瘤细胞的高度异质性,同一细胞群体各细胞间的转移潜能往往相差很大,这就不仅造成同一处理组动物间肺转移灶数目的较大差异(故在统计分析时应采用 Mann-Whitney U 检验),而且在同一动物的肺部形成大小相差较大的转移灶。我们注意到,虽然 genistein 可明显降低肺转移灶数目,但在 genistein 组动物肺部仍能观察到一些较大的转移瘤灶。这些较大转移灶的比例虽大于对照组,但其绝对数量仍明显少于对照组。尽管如此,由于这些较大转移灶可能仍可影响肺功能,而 genistein 给药后,小鼠体重也显著下降,因此,单用

genistein 可能并不能显著改善荷瘤小鼠的生活质量。我们的初步研究也表明,genistein 虽可在一定程度上延长小鼠存活时间,但这一作用并不明显(未发表)。环磷酰胺是一种细胞毒药物,该化合物不能抑制肺转移灶形成,但可明显抑制转移灶瘤细胞的生长,这一作用正与 genistein 的作用互补。两药合用可明显延长小鼠的存活时间,提示作用机制不尽相同的两种或多种药物联合应用对治疗肿瘤转移患者是有意义的。

References

- 1 Messina MJ, Persky V, Setchell KD, *et al.* Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer*, 1994, **21**: 113
- 2 Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr*, 1995, **125**: 784s
- 3 Yan C, Han R. Genistein suppresses adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation and invasion of B16-BL6 cells. *Cancer Lett*, 1998, **129**: 117
- 4 Yan C, Han R. Suppression of adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation decreases the invasive and metastatic potentials of B16-BL6 melanoma cells by protein tyrosine kinase inhibitor genistein. *Invasion Metastasis*, 1997, **17**: 189
- 5 Yan CH (颜春洪), Han R (韩锐). Protein tyrosine kinase inhibitor genistein suppresses *in vitro* invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 1999, **21**: 171
- 6 Hart IR. Selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am J Pathol*, 1979, **97**: 587
- 7 Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, *et al.* Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*, 1993, **71**: 1368
- 8 Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, *et al.* Genistein, a dietary derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 2690
- 9 Teicher BA, Holden SA, Ara G, *et al.* Comparison of several antiangiogenic regimes alone and with cytotoxic therapies in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, **38**: 169
- 10 Yan C, Chen X, Li Y, *et al.* Effects of genistein, a soybean derived isoflavone, on proliferation and differentiation of B16-BL6 mouse melanoma cells. *J Asian Nat Prod Res*, (in press)

EFFECTS OF GENISTEIN ON EXPERIMENTAL METASTASIS OF B16-BL6 MOUSE MELANOMA CELLS

Yan Chunhong(Yan CH) and Han Rui(Han R)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT **AIM:** To investigate the effects of genistein, an isoflavone, on mouse experimental metastasis in order to explore the possibility of developing genistein as a novel anti-cancer drug. **METHODS:** B16-BL6 mouse melanoma cells were injected into C57BL/6 mouse via tail lateral vein, which subsequently colonized into the animal lungs to form a large amount of pulmonary metastases after 15 days. Genistein was suspended in 2% lecithin and administered at 100 or 200 mg•kg⁻¹•d⁻¹ by intraperitoneal injection daily from the day before the cell injection. **RESULTS:** The mean number of metastases in the animal group that were given genistein 200 mg•kg⁻¹ was significantly reduced as compared with that of the control group ($P < 0.01$), suggesting the anti-metastasis effect of genistein. In contrast, cyclophosphamide 100 mg•kg⁻¹ ip did not significantly decrease the number of pulmonary metastases, while it was found to dramatically reduce the size of metastases. When genistein was administered with cyclophosphamide, the survival time of the metastatic mice was significantly prolonged. **CONCLUSION:** Genistein inhibited experimental metastasis through a mechanism different from that of cyclophosphamide. The stronger life-prolonging effect of co-administration of genistein with cyclophosphamide suggests that it may be valuable to combine genistein with another cytotoxic drug for cancer metastasis chemotherapy.

KEY WORDS genistein; mouse melanoma; tumor metastasis; anti-tumor drug