

# 金雀异黄素对胃癌细胞 iNOS 表达影响与抑癌作用研究

宋丹凤<sup>1</sup>, 王新建<sup>2</sup>, 张晓娟<sup>3</sup>, 崔洪斌<sup>1</sup>

Study on the effect of genistein on iNOS expression and anticancer in human gastric carcinoma cells

SONG Dan-feng, WANG Xin-jian, ZHANG Xiao-juan, et al

Public Health School, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

**Abstract:** **Objective** To study the effects of genistein on the proliferation and the iNOS expression of human gastric carcinoma SGC-7901 cells. **Methods** Cell mitosis test was used to investigate the effect of genistein on cell proliferation. Western blot and RT-PCR were used to observe the effects of Gen on iNOS gene expression. **Results** Genistein inhibited the proliferation of tumor cells significantly and increased iNOS mRNA transcription and protein expression in the dose-dependent and time-dependent manners. **Conclusion** Proliferation inhibition of human gastric carcinoma cells after treated with genistein may be due to the up-regulation expression of iNOS.

**Keywords:** Genistein; Gastric carcinoma cells; Induced nitric oxide synthase

**摘要:** **目的** 研究金雀异黄素(Genistein, Gen) 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 增殖影响和对诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS) 基因表达的影响。**方法** 应用分裂指数法观察 Gen 抑制癌细胞生长, Western Blot 及 RT-PCR 方法检测 iNOS 的表达情况。**结果** Gen 显著抑制了 SGC-7901 细胞的增殖, 并可显著诱导 iNOS mRNA 转录, 增加 iNOS 蛋白表达, 呈剂量效应和时间效应关系。**结论** Gen 抑制胃癌细胞增殖的机制之一可能与其上调 iNOS 基因表达有关。

**关键词:** 金雀异黄素; 胃癌; 诱导型一氧化氮合酶

中图分类号: R730.54; R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2003)01-0029-03

## 0 引言

目前从天然动、植物中寻找毒性低、疗效高的抗癌活性成分仍是近年国内外科学工作者研究的热点之一。金雀异黄素就是大豆中具有以上特点的一种重要的非营养性抗癌成分。流行病学调查、动物实验和体外实验研究资料显示 Gen 对多种肿瘤细胞具有较好的抑制作用<sup>[1,2]</sup>, 但其抑癌机理尚未清楚阐明。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 iNOS 在 Gen 抑制肿瘤细胞生长中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Genistein、胰蛋白酶、丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司; 亚甲双丙烯酰胺、DAB 购自 AMRESCO 公司; RPMI1640 培养基、Hepes、Trizol Reagent 购自美国 Gibco 公司; 小鼠抗人单克隆抗体 iNOS、山羊抗小鼠二抗为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品, 购自北京中山生物技术有限公司。逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒、iNOS 及  $\beta$ -actin 引物、Oligo(dT)<sub>15</sub> 购自宝生物工程(大连)有限公司。

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 培养液中。二甲基亚砜(DMSO) 溶解 Gen, 配制成 20mg/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%。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 分裂指数** 细胞接种于 24 孔板内, 每孔  $2 \times 10^4$  个细胞, 每组 4 个平行孔, 培养 24h 后更换分别含 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu$ g/ml Gen 的培养液。加入 Gen 培养 24h、48h 后, 甲醇固定, Giemsa 染色, 计数

收稿日期: 2002-04-01; 修回日期: 2002-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970637)

作者单位: 1. 150001 哈尔滨医科大学公共卫生学院; 2. 黑龙江省龙丹乳业科技股份有限公司; 3. 哈尔滨医科大学附属第一医院

2000 个细胞中含分裂相的细胞数,计算抑制率。

抑制率(%) = (1-给 Gen 组含分裂相细胞数/对照组合分裂相细胞数) ×100%

1.2.2 Westernblot 检测 常规收集不同浓度 Gen 处理 24h、48h 和 20.0 μg/ml Gen 处理不同时间的细胞。按《分子生物学实验指南》方法<sup>[3]</sup>,裂解细胞,考马斯亮蓝法于 DU640 型核酸蛋白分析仪下测定样品的蛋白含量。100μg 细胞总蛋白热变性后,经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳装置为 Bio-Rad 公司的 Mini-PROTEAN 型电泳槽。30V 电压低温转膜过夜,将硝酸纤维素膜分别于含 iNOS,GAPDH 一抗的封闭液孵育 2h,清洗后再分别于辣根过氧化物酶标记的二抗封闭液中孵育 1h。最后通过 DAB 显色,ChemiImager<sup>TM</sup>4000 型数字成像仪记录结果,蛋白峰面积灰度扫描分析。

1.2.3 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 antisense、sence primer 作为特异性引物<sup>[4]</sup>,扩增产物长度为 352bp。PCR 扩增条件:变性 94℃,45s;退火 60℃,45s;延伸 72℃,1min;循环 35 次。为相对定量检测表达量,以 -actin 作为内参照<sup>[4]</sup>,扩增产物长度为 532bp。PCR 扩增条件:变性 94℃,30s;退火 55℃,30s;延伸 72℃,45s;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 分裂指数 Gen 各剂量组与对照组相比,对胃癌细胞分裂指数均有抑制作用(P<0.05);且随剂量增加,作用时间延长,抑制作用增加。10.0 μg/ml、20.0 μg/ml 剂量组与较低剂量组间均有显著差异(P<0.05)。当金雀异黄素剂量为 20.0 μg/ml,作用 48h,抑制率达 79.5%,见表 1。

表 1 Gen 对 SGC-7901 细胞分裂指数的影响(n=4)

剂量 (μg/ml)	分裂相细胞数( $\bar{x} \pm s$ )		抑制率(%)	
	24h	48h	24h	48h
0.0	124 ±7.8	120 ±6.4	—	—
2.5	109 ±5.9 <sup>a</sup>	98 ±7.4 <sup>a</sup>	11.64	18.8
5.0	105 ±4.2 <sup>a</sup>	82 ±2.9 <sup>a,b</sup>	14.87	32.1
10.0	92 ±6.7 <sup>a,b,c</sup>	71 ±5.0 <sup>a,b,c</sup>	25.87	41.2
20.0	30 ±4.6 <sup>a,b,c,d</sup>	25 ±3.1 <sup>a,b,c,d</sup>	75.75	79.5

a: 与对照组相比, P<0.05, b: 与 Gen2.5 μg/ml 组相比, P<0.05 c: 与 Gen5.0 μg/ml 组相比, P<0.05 d: 与 Gen10.0 μg/ml 组相比, P<0.05

2.2 Westernblot 检测 iNOS 蛋白 如图 1、2 所示,在胃癌细胞中有 iNOS 蛋白表达,随着 Gen 剂量增加,在 24h、48h 组 iNOS 蛋白表达都呈增加趋势。凝

胶数字成像系统对上图进行光密度扫描,20.0 μg/ml -Gen 处理组 iNOS 蛋白表达较对照组增加 2 倍以上。各组看家基因 GAPDH 表达一致,保证了上样量一致。

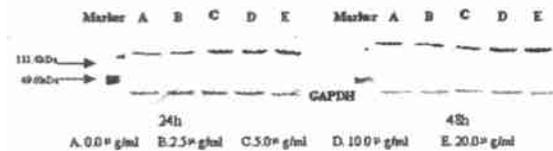


图 1 不同剂量 Gen 作用的 iNOS 蛋白表达情况

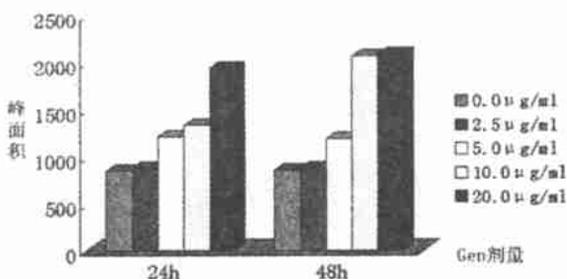


图 2 凝胶数字成像系统光密度扫描的 iNOS 蛋白峰面积

对 20.0 μg/ml Gen 作用不同时间的 iNOS 的蛋白结果如图 3、4。最初 Gen 对 iNOS 蛋白表达无明显影响,作用 12h 后,蛋白表达增加明显。



图 3 20.0 μg/ml Gen 作用不同时间的 iNOS 蛋白表达情况

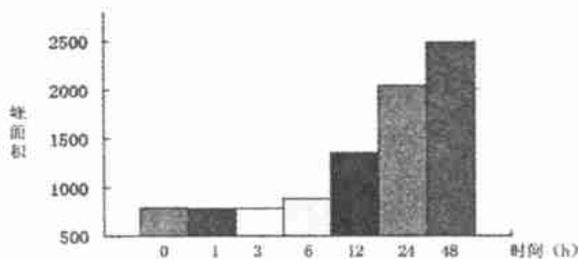


图 4 凝胶数字成像系统光密度扫描的 iNOS 蛋白峰面积

2.3 RT-PCR 结果

如图 5、6 所示,经 2% 琼脂糖凝胶电泳显示,人胃癌 SGC-7901 细胞中有 iNOSmRNA 表达。Gen 作用 SGC-7901 细胞 48h 后,不同剂量的 Gen 组与未经 Gen 处理组相比,iNOSmRNA 在 10.0、20.0 μg/ml 组表达明显增高,较对照组增加 2 倍以上。各组看家基因 -actin 表达一致,保证了上样量一致。

凝胶数字成像系统对上图进行光密度扫描,可见 Gen 各剂量组对 iNOSmRNA 表达有增高趋势,呈现剂量-效应关系。

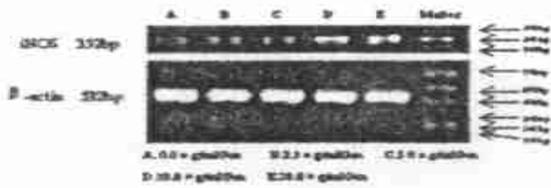


图 5 不同剂量 Gen 作用 48h 对 iNOSmRNA 表达的影响

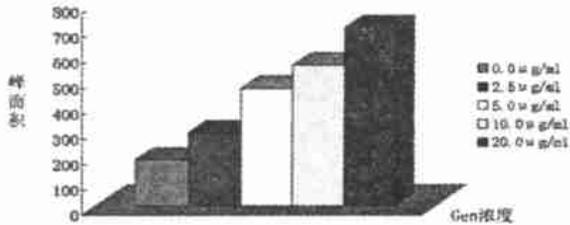


图 6 凝胶数字成像系统光密度扫描的 iNOSmRNA 峰面积

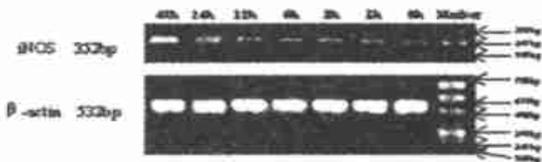


图 7 20.0 μg/ml Gen 作用不同时间的 iNOSmRNA 表达的影响

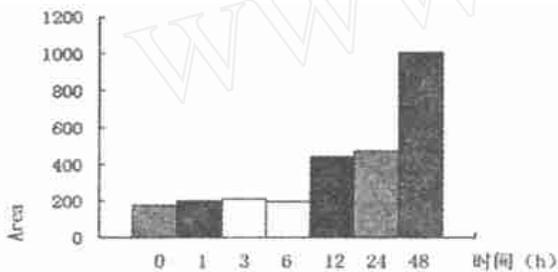


图 8 凝胶数字成像系统光密度扫描的 iNOSmRNA 峰面积

如图 7, 8 所示, 20.0 μg/ml Gen 组作用不同时间, 最初 Gen 对 iNOSmRNA 表达无明显影响。12h 后, 则出现 iNOSmRNA 表达增加趋势。

### 3 讨论

目前, 国外关于 Gen 抑制癌细胞增殖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 80 年代人们开始研究 NO 以来, 已有证据表明, 高浓度 NO 显著抑制肿瘤生长<sup>[5]</sup>。可能有多种机制参与了 NO 的杀瘤过程<sup>[6-9]</sup>: NO 作用于铁硫基团, 导致肿瘤细胞能量代谢障碍; NO 通过抑制核糖体复合物的形成, 抑制肿瘤细胞蛋白质合成; NO 通过基因毒性, 抑制 DNA 合成及其损伤修复; NO 诱导肿瘤细胞凋亡, 并促进凋亡的细胞死亡, 从而起到抗肿瘤的作用。在生物体内, 高浓度

NO 主要是由诱导型一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) 催化生成的。因此, 选择性诱导肿瘤细胞 iNOS, 可能成为抗癌药物的作用靶点。

本实验中, 随着 Gen 剂量增加、作用时间延长, Gen 对 SGC-7901 细胞核分裂抑制作用增强, 表明 Gen 抑制了胃癌细胞增殖的旺盛程度。实验还发现 Gen 处理组 iNOSmRNA、iNOS 蛋白表达增加呈现剂量效应及时间效应关系, 给予 12h 后 iNOSmRNA、iNOS 蛋白表达显著增加, 且两者增加程度相似。由此推断, Gen 主要在转录水平上增强了 SGC-7901 细胞 iNOS 表达, 这可能是其发挥抗癌作用的分子机制之一。关于 Gen 抗胃癌作用与 NO 之间关系的研究未见报道, 因此本研究为 Gen 抗癌作用机制研究开辟了新思路, 但究其增高的机制与生物学的作用等还有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Attenuation of gastric cancer progression by genistein sodium chloride enhanced gastric carcinoma genesis induced by N-methyl-N-nitrosoguanidine in Wistar rats [J]. *Int J Cancer*, 1999, 80 (3): 396-399.
- [2] Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71 (6S): 1705S-1707S.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫. 北京: 科学出版社, 1995. 889-898.
- [4] Lewis NP, Tsao PS, Rickenbacher PR, et al. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac aorta graft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle [J]. *Circulation*, 1996, 93 (4): 720-729.
- [5] Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113 (2): 147-156.
- [6] Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, 17 (1): 25-37.
- [7] 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-2α [J]. *Mol Med*, 1998, 4 (3): 179-190.
- [8] Ho YS, Wang YJ, Lin JY. 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.
- [9] Nishio E, Watamabe Y. Nitric oxide-induced apoptosis accompanying the change of oncogene protein expression and the activation of CPP32 protease [J]. *Life Science*, 1998, 62 (3): 239-245.

(安 凤校对)