

三羟基异黄酮对胶质瘤细胞放射敏感性影响

李振江 徐晨阳 丁炳谦 魏新亭 高明 薛亚珂 吴大鹏

475000 开封, 河南大学淮河医院神经外科(李振江、徐晨阳、丁炳谦、高明), 放疗科(吴大鹏); 450052 郑州大学第一附属医院神经外科(魏新亭、薛亚珂)

通信作者: 丁炳谦, Email: hhlzj009@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4221.2017.06.018

三羟基异黄酮(Genistein)是大豆异黄酮的主要成分,属于多酚类化合物,具有抑制心血管疾病发生、抗肿瘤等生物学作用;国外研究表明 Genistein 与放射联合可增强肿瘤放射敏感性,如肝癌、食管癌、前列腺癌和宫颈癌^[1-4]。但 Genistein 联合放射对胶质瘤放射敏感性的影响目前尚未有研究报道。本实验通过 Genistein 联合放射作用于 U251 细胞,观察其对 U251 细胞增殖与凋亡影响,研究 Genistein 对 U251 细胞放射敏感性影响,为 Genistein 应用于胶质瘤治疗提供可靠依据,以期提高胶质瘤的放疗效果。

一、材料与方法

1. 细胞系及试剂: U251 细胞购自中国典型培养物保藏中心; DMEM 和 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 瓦里安 2100C 直线加速器购自 Vaoam 公司; Genistein、胰蛋白酶购自 Sigma 公司; Anti-Bax、Anti-Bcl-2、 β -actin 和辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Abcam 公司。

2. 细胞培养: 将 U251 细胞培养在 DMEM 培养液中(含有 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清), 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 收集指数期细胞进行后续实验。

3. 克隆形成实验: 取指数生长期 U251 细胞加入终浓度为 40 μ mol/L 的 Geinstein 处理 24 h, 然后分别进行 0、2、4、6、8 Gy 照射, 照后 48 h 收集细胞接种到 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 10~14 d, PBS 清洗 3 次, 甲醇固定后用结晶紫染色并于显微镜下进行集落计数(>50 个细胞), 计算存活分数后采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线。

4. 流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期: 取指数生长期 U251 细胞分别接种于 5 ml 培养皿中分为对照组、Genistein 组、放射组、Genistein+放射组, 置于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养, Genistein 组和 Genistein+放射组加入 40 μ mol/L 的 Geinstein, 24 h 后给予放射组和 Genistein+放射组 8 Gy 照射, 继续培养 24 h 后收集细胞, 乙醇固定, 调整细胞浓度为 1 \times 10⁶/ml。使用 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 检测细胞凋亡率。使用 PI 避光染色 30 min, 检测各细胞周期比例。

5. 蛋白印迹法检测蛋白表达: U251 细胞处理方法如

1.5, 将处理的 U251 细胞进行培养, 提取待测细胞样本总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取等量蛋白用 8% 或 12% SDS-PAGE 中进行电泳分离, 转膜 2 h 后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗(anti-Bax 和 anti-Bcl-2)及内参(β -actin) 4℃ 孵育过夜, 使用 TBST 洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃ 孵育 1 h, 采用 ECL 法进行显色, 然后于凝胶图像分析系统拍照并分析蛋白表达量的差异。

6. 统计方法: 采用 GraphPad Prism 5 软件绘图, 两组样本差异比较采用成组 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. Genistein 单纯及联合放射对 U251 细胞存活影响: 40 μ mol/L 的 Genistein + 放射组生存分数低于单纯放射组, Genistein+放射组的放射生物学参数显著低于放射组, 以上结果说明 Genistein 对 U251 细胞的生长有明显的抑制作用。

2. Genistein 单纯及联合放射对 U251 细胞凋亡的影响: 凋亡检测显示单纯 Genistein、单纯放射、Genistein+放射组细胞凋亡率分别为 11.5%、28.2%、43.2%, 与对照组相比显著增加(5.1%, P=0.008)。

表 1 Genistein 联合放射的单击多靶模型拟合参数

项目	D ₀ (Gy)	D _q (Gy)	SF ₂	SER
单纯放射	5.197	2.335	0.833	
Genistein+放射	2.274	1.383	0.627	2.285

3. Genistein 单纯及联合放射对凋亡相关蛋白表达影响: 蛋白印迹检测 Genistein 单纯及联合放射对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响, 结果如图 1A、1B、1C 所示, Genistein+放射组 Bax 蛋白表达量最大, 其次依次为放射组、Genistein 组和对照组, 相反 Genistein+放射组 Bcl-2 蛋白表达最低, 其次依次是放射组、Genistein 组和对照组, 各实验组的 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达与对照组相比均有差异。Genistein+放射组和放射组在 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平上也具有差异。

4. Genistein 单纯及联合放射对细胞周期的影响: Genistein 组与正常组细胞比较, 发生 G₀+G₁ 期阻滞, S 和 G₂+M 期下调。放射组与正常组细胞比较出现明显的 G₂+M 期阻滞, G₀+G₁ 期和 S 期下降。Genistein+放射组与放射组相比, G₂+M 期阻滞程度降低, G₀+G₁ 期比例增加, S 期比例下

降,详见表 2。蛋白印迹法检测周期蛋白 cyclin D₁ 的表达发现 Genistein 组、放射组、Genistein+放射组的 cyclin D₁ 表达量均明显降低,Genistein+放射组的 cyclin D₁ 表达量明显低于 Genistein 组和放射组(图 2)。

Zhang 等^[4]发现 Genistein 通过诱导细胞凋亡、减少生存素和延长细胞周期阻滞来提高宫颈癌细胞的放射敏感性。但其联合放射对胶质瘤的放射敏感性的影响目前尚未有研究报道。本实验克隆形成实验结果表明 Genistein+放射组的细胞存活分数明显低于单纯放射组;Genistein 联合放射组比单纯 Genistein 组和单纯放射组具有更高凋亡率;单纯 Genistein 和单纯放射组均降低 U251 细胞 Bcl-2 表达水平,明显增强 Bax 表达水平,联合放射组加剧这两种蛋白表达水平变化。此外,Genistein+放射组比单纯放射组 G₂+M 期阻滞程度降低,G₀+G₁ 期比例增加,S 期比例下降。Genistein 引起 G₀+G₁ 期阻滞、S 和 G₂+M 期下调,且 Genistein 组、单纯放射组、Genistein+放射组 cyclin D₁ 表达均降低,Genistein+放射组 cyclin D₁ 表达量又明显低于 Genistein 组和单纯放射组。总之,Genistein 在体外具有抗 U251 细胞作用,并增加了胶质瘤细胞放射敏感性。

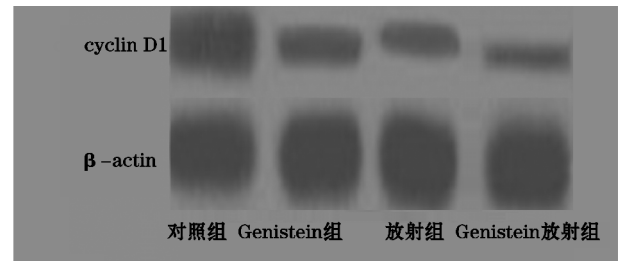


图 2 Genistein 单纯及联合放射对细胞周期相关蛋白表达的影响

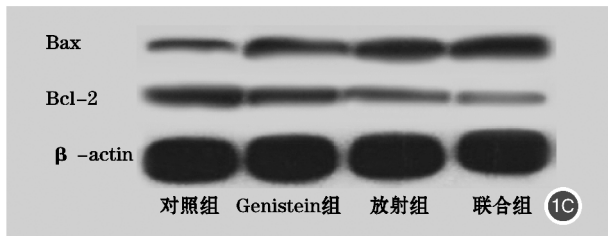
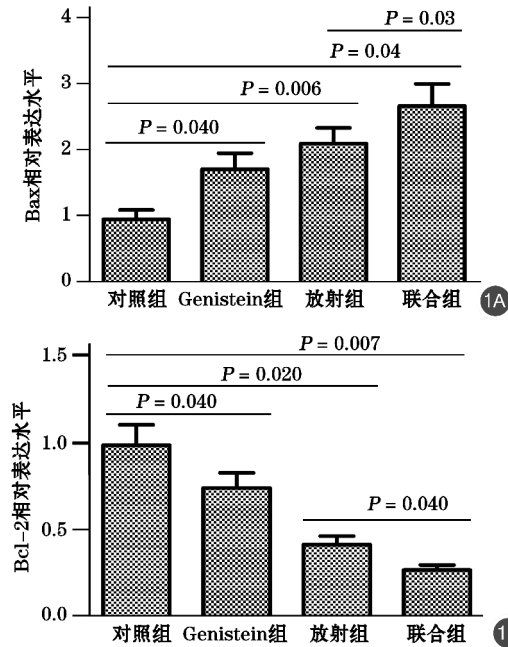


图 1 Genistein 单纯及联合放射对凋亡相关蛋白表达的影响(1A 为 Bax 蛋白表达,1B 为 Bcl-2 蛋白表达,1C 为免疫印迹检测)

表 2 胶质瘤 U251 细胞不同处理组的细胞周期分布($\bar{x} \pm s$)

项目	G ₀ +G ₁ 期	S 期	G ₂ +M 期
对照组	59.82±0.98	28.25±0.75	11.93±1.25
Genistein 组	65.21±1.78 ^a	25.45±0.35	9.34±1.08 ^a
放射组	46.25±1.52 ^{ab}	23.85±0.42	29.91±1.85 ^{ab}
联合组	55.78±2.15 ^{abc}	21.25±1.65 ^a	22.97±0.85 ^{abc}

注:^a 和对照组比较 $P < 0.05$;^b 和 Genistein 组比较 $P < 0.05$;^c 和放射组比较 $P < 0.05$

三、讨论

Liu 等^[5]发现 Genistein 可以诱导线粒体凋亡途径和抑制 DSB 修复途径来提高对肿瘤细胞的放射敏感性。Liu 等^[6]报道 Genistein 通过 ATM/Chk2/Cdc25C/Cdc2 通路诱导 G₂+M 期阻滞和线粒体介导的细胞凋亡,提高乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 的放射敏感

参 考 文 献

- [1] Akimoto T, Nonaka T, Ishikawa H, et al. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines *in vitro*; possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50 (1): 195-201. DOI: 10.1016/S0360-3016 (00) 01560-1.
- [2] Liu X, Sun C, Liu B, et al. Genistein mediates the selective radiosensitizing effect in NSCLC A549 cells via inhibiting methylation of the keap1 gene promoter region [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (19): 27267-27279. DOI:10.18632/oncotarget.8403.
- [3] Yashar CM, Spanos WJ, Taylor DD, et al. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 99 (2): 199-205. DOI: 10.1016/j.ygyno.2005.07.002.
- [4] Zhang B, Liu JY, Pan JS, et al. Combined treatment of ionizing radiation with genistein on cervical cancer HeLa cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 102 (1): 129-135. DOI: 10.1254/jphs.FP0060165.
- [5] Liu X, Sun C, Jin X, et al. Genistein sensitizes sarcoma cells *in vitro* and *in vivo* by enhancing apoptosis and by inhibiting DSB repair pathways [J]. *J Radiat Res*, 2016, 57 (3): 227-237. DOI: 10.1093/jrr/rrv091.
- [6] Liu X, Sun C, Jin X, et al. Genistein enhances the radiosensitivity of breast cancer cells via G (2) / M cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Molecules*, 2013, 18 (11): 13200-13217. DOI: 10.3390/molecules181113200.

(收稿日期:2016-07-05)