

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.008

金雀异黄素与 5-氟尿嘧啶单独或联合抑制人胃癌 BGC-823 细胞的体外研究

王正文¹, 龚 军², 朱明才³, 汤为学⁴, 崔海宁¹

(1. 海南医学院附属医院普外科, 海口 570102; 2. 四川省医学科学院、四川省人民医院肝胆胰外科, 成都 610072;

3. 重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 研究金雀异黄素(Genistein, Gen)与 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)联合应用对人胃癌细胞 BGC-823 的生长抑制是否具有协同作用及其可能的作用机制。方法: MTT 法检测 Gen、5-FU 单独及联合对 BGC-823 细胞生长的抑制作用并用中效原理定量分析两药合用的剂量-效应关系。Gen、5-FU 单独及联合处理 BGC-823 细胞 72 h 后, 流式细胞术检测细胞周期分布的变化, 并在透射电镜下观察细胞超微结构的改变。结果: Gen、5-FU 单用或联合应用对 BGC-823 细胞的生长均有显著的增殖抑制作用, 且呈剂量和时间依赖性。两药联合应用时, 当药物效应(抑制率)大于 50% 时, 具有协同作用($CI \leq 1$); 6.06 mg/L Gen 作用 72 h 后, 95.74% 的 BGC-823 阻滞在 G₂/M 期; 1.23 mg/L 5-FU 作用 72 h 后, G₀/G₁ 及 S 期细胞分别为 58.26% 和 41.59%, 0.81 mg/L Gen 与 1.01 mg/L 5-FU 联合应用 72 h 后, 67.99% 的 BGC-823 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。Gen、5-FU 单独或联合均可诱导 BGC-823 细胞凋亡。结论: Gen 和 5-FU 单独或联合应用, 均对 BGC-823 细胞具有抑制增殖的作用, 在一定浓度范围内, Gen 与 5-FU 联合应用对胃癌细胞的增殖具有协同抑制作用, Gen 与 5-FU 可能通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡而抑制胃癌细胞的生长。该研究为 Gen 与 5-FU 可能联合用于胃癌的治疗提供了依据。

【关键词】金雀异黄素; 5-氟尿嘧啶; 胃癌; 抑制作用; 细胞周期; 凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.35

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-14

作者介绍: 王正文(1974-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 胃肠道肿瘤的综合治疗、胃肠微创外科。

通信作者: 朱明才, 男, 教授, Email: cqzhume@163.com。

(0.924 800 4), 表明样本容量合适, 能够获得较好的数据结果。Amelogenin 基因座的检测结果与样品实际人群性别一致。结果表明, 本研究中 4 个非 CODIS 系统的 miniSTR 基因座 D2S441 在法医亲子鉴定及个体识别中有较高的应用价值, D1S1676、D3S4529、D22S10454 EP 略低, 亦可结合其他基因座分型, 作为法医学亲子鉴定及个体识别的补充与辅助, 丰富了法医学及人类遗传学数据, 还可作为商品化试剂盒的补充, 增加信息含量, 提高检验效能。

参 考 文 献

- [1] Whitaker J P, Clayton T M, Urquhart A J, et al. Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples[J]. Biotechniques, 1995, 18(4): 670-677.
- [2] Krenke B E, Tereba A, Anderson S J, et al. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system[J]. J Forensic Sci, 2002, 47(4): 773-785.
- [3] Micka K A, Amiot E A, Hockenberry T L, et al. TWGDAM valida-

tion of a nine-locus and a four-locus fluorescent STR multiplex system[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(6): 1243-1257.

[4] 高雅, 李生斌. STR 遗传多态性研究中样本数量对等位基因检出数量的影响[J]. 遗传, 2008, 30(3): 313-320.

Gao Y, Li S B. Effects of sample size on the observed number of allele of 9 STR loci with various genetic data[J]. Hereditas, 2008, 30(3): 313-320

[5] Thomsen A R, Hallenberg C, Simonsen B T, et al. A report of the 2002-2008 paternity testing workshops of the English speaking working group of the International Society for Forensic Genetics[J]. Forensic Sci Int Genet, 2009, 3(4): 214-221.

[6] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.

[7] Magnuson V L, Ally D S, Nylund S J, et al. Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning[J]. Biotechniques, 1996, 21(4): 700-709.

[8] Brownstein M J, Carpten J D, Smith J R. Modulation of non-template nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping[J]. Biotechniques, 1996, 20(6): 1004-1006, 1008-1010.

(责任编辑: 关蕴良)

Combined or exclusive application of Genistein and 5-fluorouracil in inhibiting human gastric carcinoma cell line BGC-823 in vitro

WANG Zhengwen¹, GONG Jun², ZHU Mingcai³, Tang Weixue⁴, Cui Haining¹

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Hainan Medical University; 2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Sichuan Academy of Medical Science, Sichuan Provincial People's Hospital; 3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

4. Teaching and Research Section of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether combined application of Genistein (Gen) and 5-fluorouracil (5-FU) exerts synergistic effect on growth inhibition of human gastric carcinoma cells BGC-823 and their possible mechanisms in vitro. **Methods:** Human gastric carcinoma cell line BGC-823 was exposed to Gen and 5-FU exclusively or in combination at different concentrations for 24, 48 h and 72 h. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was employed to investigate the inhibitory effect of Gen and 5-FU, exclusively or in combination on BGC-823 cells. Furthermore, method of median-effect principle was utilized to quantitatively analyze the dose-effect relationship of the combined effects of Gen and 5-FU. Then, BGC-823 cells were exposed to Gen and 5-FU, exclusively or in combination for 72 h, the ultramicrostructure changes of cancer cells were observed by transmission electron microscopy (TEM) and the distribution of cell cycles was detected by flow cytometry (FCM). **Results:** Combined or exclusive application of Gen and 5-FU exerted significant inhibitory effect on the proliferation of BGC-823 cells in both time and dose dependent manner. When inhibition rate (IR) exceeding 50%, combined application of Gen and 5-FU displayed synergistic effect on growth inhibition of BGC-823 cell line. Being exposed to 6.06 mg/L Gen, 1.23 mg/L 5-FU and 0.81 mg/L Gen combined with 1.01 mg/L 5-FU for 72 h, 95.74% BGC-823 cells were arrested at G₂/M phases, 58.26% and 41.59% BGC-823 cells were arrested at G₀/G₁ and S phases and 67.99% BGC-823 cells were arrested at G₀/G₁ phases, respectively. Gen and 5-FU, used exclusively or in combination, could induce apoptosis and arrest cell cycle of BGC-823 cells. **Conclusions:** Combined or exclusive application of Gen and 5-FU can suppress the proliferation of BGC-823 cells in vitro. Through arresting cell cycle and inducing cell apoptosis, combined application of Gen and 5-FU can inhibit the growth of BGC-823 cells. Combined application of Gen and 5-FU exerts synergistic effect on growth of human gastric carcinoma cells within certain range of concentration. The study provides evidences for the potential combined application of Gen and 5-FU in the treatment of human gastric cancer.

[Key words] Genistein; 5-fluorouracil; gastric cancer; inhibitory effect; cell cycle; apoptosis

胃癌是严重危害人类健康最常见的恶性肿瘤之一^[1],我国的胃癌死亡率居各种恶性肿瘤的首位^[2]。目前,进展期胃癌全身化疗客观有效率仍较低,生活质量改善欠理想,药物毒副反应仍较多。因此,为胃癌化疗寻找低毒、高效的化疗药物和新的化疗方案具有重要意义。金雀异黄素(Genistein, Gen)是大豆异黄酮类化合物的主要成分,对多种肿瘤具有较好的预防及治疗作用^[3]。Gen对胃癌作用的报道很少,更少有其他化疗药物联合对胃癌作用的报道。本研究通过体外实验,研究 Gen、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)单独或联合应用对胃癌细胞株 BGC-823 的生长抑制作用,研究两药是否具有协同作用,并初步探讨可能相关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

Gen 购于陕西赛得高科生物股份有限公司。5-FU 为南通精华制药有限公司生产。RPMI1640 培养基购于美国 HyClone 公司,胰酶及噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)] 购于美国 Sigma 公司。新生牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。人胃癌细胞株 BGC-823 由重庆医科大学病理生理学教研室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法^[4]检测 Gen 和 5-FU 对 BGC-823 细胞生长的抑制作用 常规在含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液、5% CO₂、95% 空气、饱和湿度、37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中培养细胞。取对数生长期 BGC-823 细胞,制成单细胞悬液,以 5×10⁴ 个/ml 细胞浓度接种于 96 孔培养板中,200 μl/孔。实验设试剂对照组、细胞对照组及 5 个不同浓度的药物实验组 (Gen 的浓度分别为 5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 mg/L; 5-FU 的浓度分别为 6.0、12.0、24.0、48.0、96.0 mg/L)。各组设 4 个平行孔。实验组每孔加药 20 μl; 两药合用的比例 (V:V) 为 1:1, 每孔加药总量仍为 20 μl (各加 10 μl, 浓度为单用时的 2 倍)。各组细胞分别于培养 24、48 h 及 72 h 后,1 000 r/min 离心 5 min, 换无血清的培养液,加入 MTT 继续培养 4 h 后,1 000 r/min 离心 5 min, 吸去每孔的液体,加入二甲基亚砷 200 μl/孔,微振荡器上振荡 5 min, 用自动酶标仪在 570 nm 波长处测出细胞对照组和各实验组的吸光度值 (A_{570nm})。计算各组的吸光度平均值。本实验重复 3 次,计算药物效应 (fa) 即抑制率 (Inhibition rate, IR)、存活率 (fu), 并根据中效原理及联合指数法^[5] fa/fu = (D/Dm)m, 两边取对数得 log fa/fu = m log D - m log Dm, 设 Y = log

$f_a/f_u, X=\log D, a=-m \log D_m, b=m$, 代入中效方程: $Y=bX+a$, 即建立了药物效应 f_a 和药物剂量 D 之间的函数关系, 根据上述公式计算药物的中效浓度 (D_m) 及合用指数 (Combination index, CI) $=D_1/(D_x)_1+D_2/(D_x)_2+\alpha D_1D_2/(D_x)_1(D_x)_2$ 。

其中 f_u (存活率) % = (实验组平均 $A_{570\text{ nm}}$ / 细胞对照组 $A_{570\text{ nm}}$) $\times 100\%$, $f_a=1$ - 存活率, D 为药物浓度, D_m 为中效浓度, m 为 Hill 型系数, $(D_x)_1, (D_x)_2$ 为两药单独使用时产生 X 效应时两药各自浓度, D_1, D_2 为两药合用使用时产生 X 效应时两药各自所需浓度, α 为常数, 如两药作用机理相同为 1, 如两药作用机理不相同为零。结果判断: $CI<1$, 表示两种药物合用产生协同作用 ($1+1>2$); $CI=1$, 表示两种药物合用产生相加作用 ($1+1=2$); $CI>1$, 表示两种药物合用产生拮抗作用。

1.2.2 流式细胞仪 (Flow cytometry, FCM) 检测细胞周期分布

实验分组: 设细胞对照组, Gen 组, 5-FU 组和 Gen+5-FU 组。收集对数生长期的 BGC-823 细胞, 各组接种细胞密度为 5.0×10^4 个/ml 的单细胞悬液 20 ml 于 100 ml 培养瓶中, 各药物组加药总量为 2 ml; Gen 组, 5-FU 组, Gen+5-FU 组处理浓度为 72 h 中效浓度的 1/2 即 Gen 为 6.06 mg/L, 5-FU 为 1.23 mg/L, Gen+5-FU 分别为 0.81、1.01 mg/L; 加药培养 72 h 后取出细胞, 0.1% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清液; 加 PBS (pH7.4) 将细胞打匀, 再将细胞悬液移入 EP 管中, 1 500 r/min 离心 2 min, 去上清液, 重复此步骤 1 次; 加入 -20 ℃ 预冷的 70% 乙醇固定, 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 单染色, FCM 测定。用 Modifit 1.0 软件分析细胞周期分布。

1.2.3 细胞超微结构的观察 实验分组及细胞处理同

1.2.2。加药培养 72 h 后取出细胞, 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清液; 加 PBS 将细胞打匀, 再将细胞悬液移入 EP 管中, 2 000 r/min 离心 2 min, 去上清液, 重复此步骤 1 次; 4% 戊二醛磷酸及 1% 锇酸后固定, 环氧树脂 618 包埋, 半薄切片定位, 超薄切片 (50 nm), 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, Hitachi-600 型透射电镜下观察。

1.3 统计学处理

采用统计软件包 SPSS 11.0 进行分析。MTT 结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用重复测量方差分析, 各组药物浓度两两之间的比较采用 LSD 法, 药物浓度和药物效应的关系采用双对数坐标相关性检验, 细胞周期结果采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 Gen、5-FU 单独或联合作用对胃癌细胞的抑制作用

Gen、5-FU 单独或联合作用对 BGC-823 细胞的生长均有抑制作用, 随着药物浓度的增加其效应也相应增加, 且随着时间的延长, 药物效应也相应增加, 即呈剂量-效应关系和时间-效应关系。Gen、5-FU 单独或联合作用不同时间之间的总差异有统计学意义 (Gen: $F=0.004\ 025, P<0.001$; 5-FU: $F=0.002\ 433, P<0.001$; Gen+5-FU: $F=84.192, P<0.001$), 不同剂量和对照组的不同时间之间的总差异有统计学意义 (Gen: $F=3.661, P<0.01$; 5-FU: $F=3.305, P<0.01$; Gen+5-FU: $F=3.697, P<0.01$)。两药合用时与单药相比, 其 IR 较高。见表 1~3。

表 1 不同浓度的 Gen 处理 BGC-823 细胞 24、48 h 及 72 h 后的抑制率测定结果

Tab.1 IRs of BGC-823 cells exposed to Gen at different concentrations for 24, 48 h and 72 h

Gen (mg/L)	例数(n)	$A_{570\text{ nm}}(\bar{x} \pm s)$			IR (%)		
		24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}	24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}
0.0	3	0.714 $\pm$ 0.058	0.871 $\pm$ 0.038	1.508 $\pm$ 0.074	0.00	0.00	0.00
5.0	3	0.628 $\pm$ 0.028 ^a	0.692 $\pm$ 0.026 ^a	0.993 $\pm$ 0.063 ^a	12.04	20.55	34.15
10.0	3	0.574 $\pm$ 0.033 ^a	0.677 $\pm$ 0.023 ^a	0.857 $\pm$ 0.067 ^{ab}	19.61	31.11	43.17
20.0	3	0.466 $\pm$ 0.031 ^{ab}	0.543 $\pm$ 0.025 ^{abc}	0.721 $\pm$ 0.053 ^{abc}	34.73	37.66	52.19
40.0	3	0.421 $\pm$ 0.028 ^{abc}	0.474 $\pm$ 0.019 ^{abcd}	0.433 $\pm$ 0.065 ^{abcd}	41.04	45.58	87.29
80.0	3	0.242 $\pm$ 0.041 ^{abcde}	0.140 $\pm$ 0.003 ^{abcde}	0.068 $\pm$ 0.018 ^{abcde}	66.11	93.93	95.49

a: $P<0.05$, 与细胞对照组比较; b: $P<0.05$, 与 5.0 mg/L Gen 组比较; c: $P<0.05$, 与 10.0 mg/L Gen 组比较; d: $P<0.05$, 与 20.0 mg/L Gen 组比较; e: $P<0.05$, 与 40.0 mg/L Gen 组比较; A: $P<0.01$, 与 Gen 作用 24 h 后比较; B: $P<0.01$, 与 Gen 作用 48 h 后比较

表 2 不同浓度的 5-FU 处理 BGC-823 细胞不同时间后的抑制率测定结果

Tab.2 IRs of BGC-823 cells exposed to 5-FU at different concentrations for 24, 48 h and 72 h

5-FU (mg/L)	例数(n)	$A_{570\text{ nm}}(\bar{x} \pm s)$			IR (%)		
		24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}	24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}
0.0	3	0.714 $\pm$ 0.058	0.871 $\pm$ 0.038	1.508 $\pm$ 0.074	0.00	0.00	0.00
6.0	3	0.449 $\pm$ 0.010 ^a	0.396 $\pm$ 0.016 ^a	0.417 $\pm$ 0.020 ^a	37.11	54.54	72.35
12.0	3	0.415 $\pm$ 0.033 ^a	0.360 $\pm$ 0.036 ^a	0.178 $\pm$ 0.018 ^{ab}	41.88	58.67	78.20
24.0	3	0.347 $\pm$ 0.036 ^{ab}	0.276 $\pm$ 0.027 ^{abc}	0.088 $\pm$ 0.010 ^{abc}	51.40	74.05	94.16
48.0	3	0.253 $\pm$ 0.037 ^{abcd}	0.134 $\pm$ 0.012 ^{abc}	0.060 $\pm$ 0.014 ^{abc}	64.57	84.62	96.02
96.0	3	0.189 $\pm$ 0.032 ^{abcd}	0.101 $\pm$ 0.015 ^{abcd}	0.052 $\pm$ 0.010 ^{abcd}	75.53	88.40	96.55

a: $P<0.05$, 与细胞对照组比较; b: $P<0.05$, 与 6.0 mg/L 5-FU 组比较; c: $P<0.05$, 与 12.0 mg/L 5-FU 组比较; d: $P<0.05$, 与 24.0 mg/L 5-FU 组比较; e: $P<0.05$, 与 48.0 mg/L 5-FU 组比较; A: $P<0.01$, 与 5-FU 作用 24 h 后比较; B: $P<0.01$, 与 5-FU 作用 48 h 后比较

表 3 不同浓度的 Gen 和 5-FU 处理 BGC-823 细胞不同时间后的抑制率测定结果

Tab.3 IRs of BGC-823 cells exposed to Gen and 5-FU in combination at different concentrations for 24,48 h and 72 h

Gen+5-FU (mg/L)	例数(n)	$A_{570nm}(\bar{x} \pm s)$			IR (%)		
		24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}	24 h	48 h ^A	72 h ^{AB}
① 0.0+0.0	3	0.714 ± 0.058	0.871 ± 0.038	1.508 ± 0.074	0.00	0.00	0.00
② 5.0+6.0	3	0.390 ± 0.046 ^a	0.354 ± 0.032 ^a	0.424 ± 0.024 ^a	45.37	59.36	71.88
③ 10.0+12.0	3	0.299 ± 0.037 ^{ab}	0.323 ± 0.025 ^a	0.208 ± 0.044 ^{ab}	58.12	62.92	86.21
④ 20.0+24.0	3	0.190 ± 0.023 ^{ab}	0.061 ± 0.016 ^{abc}	0.050 ± 0.009 ^{abc}	73.39	93.00	96.68
⑤ 40.0+48.0	3	0.174 ± 0.014 ^{abc}	0.034 ± 0.005 ^{abc}	0.039 ± 0.010 ^{abc}	75.63	96.10	97.41
⑥ 80.0+96.0	3	0.039 ± 0.016 ^{abcde}	0.029 ± 0.008 ^{abcd}	0.034 ± 0.010 ^{abc}	94.53	96.67	97.75

a: $P < 0.05$, 与①(细胞对照组)比较; b: $P < 0.05$, 与②组比较; c: $P < 0.05$, 与③组比较; d: $P < 0.05$, ④组比较; e: $P < 0.05$, 与⑤组比较; A: $P < 0.01$, 与 Gen+5-FU 作用 24 h 后比较; B: $P < 0.01$, 与 Gen+5-FU 作用 48 h 后比较

2.2 Gen、5-FU 单用及合用时的中效浓度、剂量效应曲线

根据表 1~3 及中效方程式求得 Gen、5-FU 单用时的直线回归方程分别为 $Y=1.240X-2.049$, $Y=0.853X-0.884$, Dm 分别为 12.11、2.45 mg/L, 相关系数 r 分别为 0.951、0.955; 合用时的回归方程为 $Y=1.076X-1.434$, Dm 为 3.63 mg/L (其中 Gen 为 1.61 mg/L, 5-FU 为 2.02 mg/L), 相关系数 r 为 0.959。因此, 由 Dm 可知, Gen 单用时的剂量是合用时剂量的 7.5 倍, 5-FU 单用时的剂量是合用时剂量的 1.22 倍。单用及合用时, 相关系数 r 均大于 0.95, 表示药物浓度与药物效应之间有很好的线性相关, 即药物浓度与药物效应成正比。以效应为横坐标, 各效应对应的 CI 为纵坐标绘制合用指数-效应曲线(图 1)。如图所示, 当效应小于 50% 时, 两药合用产生拮抗作用($CI > 1$), 当效应大于 50% 时, 两药合用产生协同作用($CI < 1$)。

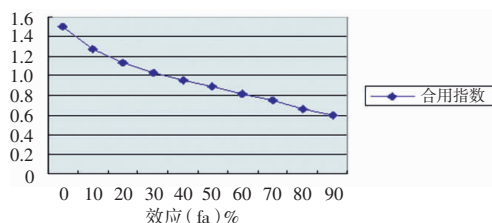


图 1 Gen 与 5-FU 合用时的合用指数-效应曲线

Fig.1 Combination index-effect curve of Gen and 5-FU

2.3 Gen、5-FU 对 BGC-823 细胞周期的影响

6.06 mg/L Gen 处理 BGC-823 细胞 72 h 后, 95.74% 的细胞阻滞在 G_2/M 期; 1.23 mg/L 5-FU 处理 BGC-823 细胞 72 h 后, G_0/G_1 及 S 期细胞增加; 0.81 mg/L Gen 与 1.01 mg/L 5-FU 联合处理 BGC-823 细胞 72 h 后细胞发生 G_0/G_1 期阻滞。各实验组细胞周期的改变具有统计学意义 ($\chi^2=57\ 272.734$, $P < 0.001$)。见表 4。

2.4 Gen、5-FU 对胃癌细胞超微结构的影响

透射电镜下见对照组 BGC-823 细胞大小不一, 形态多样, 细胞膜表面微绒毛较多, 核仁较大, 核/浆比例失常, 并可见双核(图 2)。Gen 或 5-FU 处理 72 h 后, BGC-823 细胞均可见凋亡细胞和凋亡小体: 细胞体积变小, 细胞质浓缩, 核仁变小, 核/浆比下降, 细胞核内染色质浓缩, 细胞浆中出现空

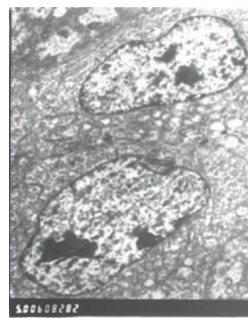
泡结构; 细胞核的染色质高度凝聚、边缘化; 细胞核裂解为碎片(图 3~5)。

表 4 Gen 和 5-FU 单用及合用对 BGC-823 细胞周期分布的影响 (%)

Tab.4 Effect of combined and exclusive application of Gen and 5-FU and on distribution of BGC-823 cell cycle (%)

组别	细胞数	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	16 433	52.11	36.95	10.94
Gen 组	16 054	3.87 ^a	0.39 ^a	95.74 ^a
5-FU 组	18 897	58.26 ^{ab}	41.59 ^{ab}	0.15 ^{ab}
Gen+5-FU 组	17 444	67.99 ^{abc}	32.01 ^{abc}	0.00 ^{abc}

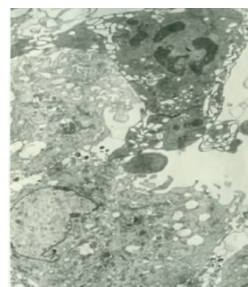
a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 Gen 组比较; c: $P < 0.01$, 与 5-FU 组比较



核内常染色质较多, 核仁明显, 表面可见较多微绒毛

图 2 对照组 BGC-823 细胞电镜图 (TEM, 8 000 ×)

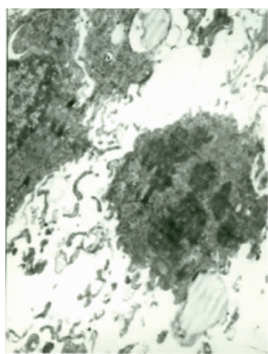
Fig.2 TEM illustration of BGC-823 cell in control group (TEM, 8 000 ×)



出现凋亡细胞: 胞质空泡化、核浓缩和凋亡小体

图 3 Gen 处理 BGC-823 细胞 72 h 后电镜图 (TEM, 8 000 ×)

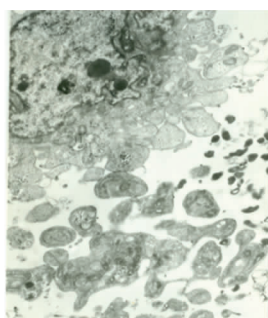
Fig.3 TEM illustration of apoptotic cells in BGC-823 cells at 72 h after being exposed to Gen (TEM, 8 000 ×)



出现凋亡细胞:胞质空泡化、核浓缩

图 4 5-FU 处理 BGC-823 细胞 72 h 后电镜图 (TEM,8 000 ×)

Fig.4 TEM illustration of apoptotic cells in BGC-823 cells at 72 h after being exposed to 5-FU(TEM,8 000 ×)



出现核碎裂和凋亡小体

图 5 Gen 和 5-FU 处理 BGC-823 细胞 72 h 后电镜图 (TEM,8 000 ×)

Fig.5 TEM illustration of nuclear fragmentation and apoptotic cells in BGC-823 cells at 72 h after being exposed to Gen and 5-FU(TEM,8 000 ×)

3 讨 论

Gen是大豆中一种低毒、高效的抗癌成分,对肿瘤具有多靶点的抑制作用,包括调节细胞周期、诱导凋亡、抑制 NF- κ B 的激活、调节 Akt 信号传导通路及 MAPK 通路、抗氧化作用、抑制肿瘤的血管生成和转移以及与抗癌药产生协同作用等^[6-10]。国内外尚未见 Gen 与化疗药物联合作用于胃癌的报道。近年,虽然奥沙利铂、伊立替康、紫杉醇、多西紫杉醇等新药用于胃肠道肿瘤的化疗,但 5-FU 老药新用,开拓新衍化药等使得胃癌联合化疗中含 5-FU 类(如替加氟、卡培他滨、优福啉及 S1)者仍占主要地位。选择研究 Gen 与 5-FU 联合作用于胃癌细胞具有较好的代表性。

Gen 可提高抗肿瘤药物如多西他赛、紫杉醇、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、顺铂、5-FU 等的抗肿瘤作

用^[11-17]。5-FU 是广泛使用的抗癌药物,也是胃癌化疗的核心用药,其常见的副作用包括白细胞减少、口腔炎、恶心、呕吐、腹泻及脱发等。本研究将 Gen 与 5-FU 联合作用于胃癌 BGC-823 细胞,合用时较单用时的中效浓度分别减少 88.67% 和 17.77%,即较小剂量的 5-FU 和很小剂量的 Gen,可以达到或者超过两药单用时的效应。两药联合的优点不仅可能达到更高的效应,而且减少 5-FU 的剂量后可以减少其毒副反应。通过对两药的量效关系定量分析,当效应大于 50% 时,两药合用产生协同作用,效应小于 50% 时,两药合用则产生拮抗作用。这对于进一步研究两药相互作用时的剂量配比、Gen 与其他化疗药物的相互作用及剂量配比均具有参考意义。

肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱,细胞失控性生长所致的一类疾病。研究发现,Gen 可以阻滞卵巢癌^[10]、乳腺癌^[18]等多种肿瘤细胞的细胞周期于 G₂/M 期,是其具有抗癌作用的机制之一。本研究表明,Gen 影响了人胃癌细胞 BGC-823 细胞的细胞周期分布,G₂/M 期细胞显著增多,即发生 G₂/M 期阻滞。G₂/M 期是细胞周期中决定细胞一分为二的一个控制点。因此,Gen 对 BGC-823 细胞的抑制作用可能是通过 G₂/M 期的阻滞作用而实现的。5-FU 可使胃癌细胞 MGC803^[19]、MKN-45^[20]发生 G₀/G₁ 期阻滞及人胃癌 S 期阻滞^[21]。本研究显示,5-FU 使 BGC-823 细胞株的 G₀/G₁ 期及 S 期细胞分别增加了 6.15% 和 4.64%,与前述研究结果类似,5-FU 可能因为阻滞 BGC-823 细胞于 G₁/S 期而发挥抗肿瘤作用。而 Gen 与 5-FU 联合干预 BGC-823 细胞,导致 67.99% 的细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞,较对照组及 5-FU 组的阻滞作用更显著($P < 0.01$)(表 4)。提示 Gen 与 5-FU 共同的 G₀/G₁ 期阻滞作用可能是其产生协同抗癌作用的机制之一。

很多化疗药物通过诱导凋亡来抑制肿瘤细胞的生长。因此,诱导肿瘤细胞凋亡成为抗肿瘤新药开发与评价的标准及恶性肿瘤化疗的目标之一^[22]。诱导凋亡亦是 Gen 抗肿瘤的作用机制之一,该实验用电镜研究 Gen 与 5-FU 单用及合用后 BGC-823 细胞超微结构的改变,都可见典型的凋亡细胞和凋亡小体,即都有诱导 BGC-823 细胞凋亡的作用。这可能是它们产生协同抗癌作用的又一机制。

综上,本实验通过体外研究,初步证实 Gen 与 5-FU 在一定的剂量范围对胃癌 BGC-823 细胞的生长具有协同抑制作用,其剂量效应关系值得进一

步研究。Gen 与 5-FU 共同导致细胞周期 G_0/G_1 期阻滞、诱导细胞凋亡可能是其在抗肿瘤中发挥协同作用的机制之一。两药的协同抗癌作用及机制具有进一步研究的价值。该研究可能为胃癌化疗选择新药物、新方案提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Shin H R. Global activity of cancer registries and cancer control and cancer incidence statistics in Korea[J]. J Prev Med Pub Health, 2008, 41(2): 84-91.
- [2] Zhao G H, Li T C, Shi L H, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(5): 905-909.
- [3] Barnes. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer[J]. J Nutr, 1995, 125(3s): 777-783.
- [4] 汤为学, 骆云鹏, 王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1992, 17(2): 103-108.
- Tang W X, Luo Y P, Wang R X. Determination of anticancer drug sensitivity test by the MTT colorimetric assay for human solid tumors[J]. Journal of Chongqing Medical University, 1992, 17(2): 103-108.
- [5] Chou T C. Preclinical versus clinical drug combination studies[J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(11): 2059-2080.
- [6] 范玉贞, 李国辉, 王玉华, 等. 金雀异黄酮的体内与体外抗结肠癌作用及其机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(1): 4-9.
- Fan Y Z, Li G H, Wang Y H, et al. Effect of genistein on colon cancer cells in vitro and in vivo and its mechanism of action[J]. Chin J Oncol, 2010, 32(1): 4-9.
- [7] Pavese J M, Farmer R L, Bergan R C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(3): 465-482.
- [8] Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 226-242.
- [9] Sarkar F H, 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.
- [10] Ouyang G, Yao L, Ruan K, et al. Genistein induces G_2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways[J]. Cell Biol Int, 2009, 33(12): 1237-1244.
- [11] Burich R A, Holland W S, Vinall R L, et al. Genistein combined polysaccharide enhances activity of docetaxel, bicalutamide and Src kinase inhibition in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines[J]. BJU Int, 2008, 102(10): 1458-1466.
- [12] Tokalov S V, Abramyuk A M, Abolmaali N D. Protection of p53 wild type cells from taxol by genistein in the combined treatment of lung cancer[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(6): 795-801.
- [13] Lattrich C, Lubig J, Springwald A, et al. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(3): 253-261.
- [14] Park S J, Kim M J, Kim Y K, et al. Combined cetuximab and genistein treatment shows additive anti-cancer effect on oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2010, 292(1): 54-63.
- [15] Solomon L A, Ali S, Banerjee S, et al. Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein: the role of NF- κ B[J]. J Ovarian Res, 2008, 1(1): 9.
- [16] Hwang J T, Ha J, Park O J. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(2): 433-440.
- [17] Banerjee S, Zhang Y, Wang Z, et al. In vitro and in vivo molecular evidence of genistein action in augmenting the efficacy of cisplatin in pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 120(4): 906-917.
- [18] Li Z, Li J, Mo B, et al. Genistein induces G_2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2008, 24(5): 401-409.
- [19] 于全, 于健春, 刘玉琴, 等. 二十二碳六烯酸与氟尿嘧啶联合应用对人胃癌细胞株 MGC830 的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(1): 65-70.
- Yu Q, Yu J C, Liu Y Q, et al. Effect of combination of docosahexaenoic acid and fluorouracil on human gastric carcinoma strain MGC830[J]. Chinese Medical Sciences Journal, 2010, 32(1): 65-70.
- [20] 林填, 余江, 魏志刚, 等. 5-氟尿嘧啶气雾对人胃癌细胞 MKN-45 增殖、凋亡及周期的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(6): 1066-1068.
- Lin T, Yu J, Wei Z G, et al. Effect of 5-fluorouracil aerosol on the growth of human gastric cancer cell line MKN-45 in vitro[J]. Journal of Southern Medical University, 2011, 31(6): 1066-1068.
- [21] Suttie S A, Park K G, Smith T A. [18F]2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation by AGS gastric adenocarcinoma cells in vitro during response to epirubicin, cisplatin and 5-fluorouracil[J]. Br J Cancer, 2007, 97(7): 902-909.
- [22] Chodon D, Ramamurty N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line[J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(5): 887-891.

(责任编辑: 冉明会)