

消化系统肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000435

染料木黄酮对 MKN45 胃癌细胞及其皮下移植瘤
抗血管生成作用的研究

邢扬帆, 刘旭杰, 王智彪, 李发琪

(超声医学工程重庆市市级重点实验室、重庆医科大学生物医学工程学院、

省部共建超声医学工程国家重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:验证染料木黄酮(Genistein)对人胃癌细胞 MKN45 及其皮下移植瘤模型的抗血管生成作用,并建立以光学分子影像对其抗血管生成作用进行监测的实验方法。**方法:**MTT 法检测 Genistein 对 MKN45 人胃癌细胞的增殖抑制作用;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-ELISA 验证 Genistein 对 MKN45 细胞及 MKN45 皮下移植瘤 VEGF 表达的抑制作用。免疫组化检测 Genistein 治疗后肿瘤 VEGF、CD31 及 Ki67 表达水平的变化;将近红外荧光染料分子 Dylight 680-NHS 与所制备的 F(ab')₂ 段贝伐单抗(Bevacizumab)偶联并纯化制得靶向 VEGF 的荧光分子探针:Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂, 并将其应用活体荧光显像检测 Genistein 对肿瘤 VEGF 的抑制效果。**结果:**MTT 及 Ki67 检测结果表明 Genistein 对 MKN45 人胃癌细胞及其皮下移植瘤无明显的增殖抑制效果(MTT 检测结果表明 Genistein 对 MKN45 人胃癌细胞增殖抑制作用不明显($P=0.118$));VEGF-ELISA 检测结果表明 Genistein 能够明显降低 MKN45 细胞($P=0.002$)及其皮下移植瘤($P=0.000$)VEGF 的表达水平。Genistein 对 MKN45 皮下移植瘤的治疗实验结果表明:Genistein 具有一定的抑瘤疗效($P=0.034$),通过免疫组化分析可知肿瘤 VEGF 及 CD31 表达水平明显降低;同时,荧光分子探针 Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ 应用于活体荧光成像能够有效地检测皮下肿瘤 VEGF 表达水平的变化。**结论:**Genistein 主要通过抑制 MKN45 肿瘤(细胞)VEGF 的表达产生抗血管生成作用而非直接抑制肿瘤(细胞)的增殖达到抑瘤效果。荧光分子探针 Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ 应用于活体显像能够对 Genistein 抗肿瘤血管生成的疗效进行早期预测,具有良好的临床转化前景。

【关键词】染料木黄酮;血管内皮生长因子;分子影像;抗血管生成作用

【中图分类号】R318.51

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-19

Genistein's anti-angiogenic effect on MKN 45 gastric cancer cells and
its subcutaneous xeno-transplanted tumors

Xing Yangfan, Liu Xujie, Wang Zhibiao, Li Faqi

(Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Medical Engineering; Department of Biomedical Engineering,
Chongqing Medical University; State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded
by Chongqing and MOST)

【Abstract】Objective: To verify genistein's anti-angiogenic effect on MKN 45 gastric cancer cells and its subcutaneous xeno-transplanted tumors and to develop an optical imaging method for monitoring this anti-angiogenesis. **Methods:** MTT assay and VEGF-ELISA were performed to test the inhibitory effect of genistein on proliferation of MKN45 human gastric cancer cells and VEGF expression. IHC was applied to detect VEGF, CD31 and Ki67 expression after MKN45 subcutaneous xeno-transplanted tumors being treated with genistein. The optical molecular probe targeting VEGF; Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ was firstly prepared by conjugating near-infrared fluorescent dye Dylight 680-NHS and bevacizumab's F(ab')₂ fragments. Then, it was applied in in vivo optical imaging to

verify tumor VEGF down regulation induced by genistein.

Results: Results of MTT ($P=0.118$) and Ki67 IHC showed that genistein had no significant inhibitory effect on the proliferation of MKN45 human gastric cancer cells and its subcutaneous xeno-trans-planted tumors. VEGF-ELISA results showed genistein could significantly down regulate VEGF expression of MKN45 cells and its xeno-transplanted tumors ($P=0.000$). Results of genistein treatment indicated that genistein had a

作者介绍:邢扬帆, Email: 526327182@qq.com,

研究方向:生物医学工程。

通信作者:王智彪, Email: wangzbpaper@haifu.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:11274404);973 计划
资助项目(编号:2011CB707900);重庆市科委自然科学基金
资助项目(编号:CSCT2010BB5368);巴渝海外引智计划
资助项目(编号:渝教外[2013]65 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20141229.1109.001.html>

certain anti-tumor effect ($P=0.034$). IHC results showed tumor VEGF and CD31 expressions were both reduced after genistein treatment. In addition, DyLight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ applied to in vivo optical imaging could effectively detect reduced VEGF expression. **Conclusion:** The inhibitory effect of genistein is mainly realized by genistein's anti-angiogenesis, which significantly inhibit tumor VEGF expression, rather than genistein's direct tumor proliferation inhibition. Optical molecular probes DyLight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ applied in vivo optical imaging, with favorable clinical prospect, could predict anti-angiogenic effect of genistein at early stage.

【Key words】genistein; vascular endothelial growth factor; molecular imaging; anti-angiogenic effect

染料木黄酮(三羟异黄酮, Genistein)是大豆在水解、发酵等过程中染料木黄酮苷脱离而释放出的游离异黄酮。研究发现, Genistein 具有抗氧化、抗肿瘤、保护心血管、防治骨质疏松等作用^[1]。近十几年来的研究表明, 染料木黄酮防治肿瘤的机制主要为调节凋亡因子、抑制 DNA 甲基化、增加癌细胞中肿瘤抑制基因的表达、抑制癌细胞多种信号转导途径、阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞活性及增殖、降低抗肿瘤化疗药物用量等^[2-7]。

美国科学家 Folkman^[8]于 1971 年提出所有的癌症、肿瘤的发生发展均依赖于其自身血管生成的理论: 肿瘤的侵袭和转移明显影响患者的预后, 而肿瘤的血管生成是肿瘤生长、侵袭、转移的基础条件, 绝大多数恶性实体肿瘤如卵巢癌、肝癌、宫颈癌和乳腺癌都是血管依赖性肿瘤。其后, 此理论被科学界广泛接受, 并已发展为 2 种主要的抗血管生成治疗策略: 直接靶向内皮细胞, 间接干预肿瘤或基质细胞释放血管生成因子等^[9-10]。在肿瘤血管生成过程中, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)起到了至关重要的作用。VEGF 的作用包括维持内皮细胞存活, 诱导内皮细胞增殖和迁移, 募集骨髓源性造血祖细胞、诱导血管形成等^[9]。本实验的研究目的之一是通过体外肿瘤细胞实验及体内荷瘤动物模型治疗实验检测 Genistein 对肿瘤 VEGF 表达的影响以验证 Genistein 的抗血管生成作用。

分子影像学是一门从基因、蛋白质水平反映组织、细胞、分子产物的变化, 实现在体、连续、微无创的特异性医学检测, 为疾病发生发展机理、药效及药代动力学、特定基因功能等研究提供准确信息的新兴综合学科。其能够在疾病尚无解剖结构、组织形态发生改变之前检测出异常, 预测疾病的走向, 判断药物的疗效^[11-15]。以光学分子探针为检测工具的光学分子影像由于具有操作安全、简便, 无放射性辐射和污染等诸多优点, 目前已成为分子影像学

的研究热点^[16], 并已成为医学基础研究必不可少的研究工具之一^[17]。

本实验的另一研究目的是制备靶向 VEGF 的荧光分子探针应用于活体显像, 建立以分子影像对抗血管生成作用进行在体、无创的检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

单抗 F(ab')₂ 制备盒(F(ab')₂ Preparation Kits)、活性荧光染料(DyLight 680-NHS)及 PD MidiTrap™ columns 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, DyLight 680-NHS 溶解于 DMF 中(10 μg/μl); 贝伐单抗(Bevacizumab)购自上海罗氏制药有限公司; MKN45 人胃癌细胞系由重庆医科大学生物医学工程学院细胞室保存并提供; RPMI1640 细胞培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25%胰酶及胎牛血清购自 Hyclone 公司; CD31、Ki67 单克隆抗体购自于 Abcam 公司; VEGF 单克隆抗体均购自于上海碧云天生物技术有限公司; Human VEGF-ELISA 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; MTT(噻唑蓝)及 Genistein 购自 Sigma 公司; IVIS Spectrum 小动物活体成像系统购自美国 Caliper Life Sciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测 以 0.25%胰酶消化 MKN45 人胃癌细胞并接种 96 孔板(5×10^3 个/孔), 过夜培养后置换含梯度浓度的 Genistein 细胞培养液(Genistein 梯度浓度分别为: 500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9、2、1、0 μmol/L)继续细胞培养, 并于培养 48 h 后进行 MTT 检测。

1.2.2 VEGF-ELISA 检测 以 0.25%胰酶消化 MKN45 人胃癌细胞并接种 24 孔板(2×10^4 个/孔), 过夜培养后置换含浓度梯度的 Genistein 细胞培养液(Genistein 浓度分别为: 125、62.5、0 μmol/L)继续细胞培养。于培养 48 h 后吸取细胞培养液上清, 12 000 r/min × 10 min 离心去除细胞碎片, 并进行 ELISA 检测。

1.2.3 皮下移植瘤的治疗实验 以 0.25%胰酶消化 MKN45 人胃癌细胞并重悬于 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中, 将收集的 MKN45 细胞皮下接种 16 只 4 周龄裸鼠右侧大腿外侧, 接种细胞数量为每只 2×10^6 个/100 μl。每日以电子游标卡尺测量肿瘤体积大小, 肿瘤体积计算公式为: 肿瘤体积(mm³)=长

径(mm)×短径(mm)×短径(mm)/2。当肿瘤体积增长至约 300 mm³ 时,将实验动物随机分为 2 组,治疗组于瘤周每日给予剂量为 100 μg/100 μl 的 Genistein,对照组给予等量生理盐水。共治疗 14 d,每日测量肿瘤体积大小评价治疗效果。

1.2.4 免疫组化染色 常规切片后,62 ℃烤片 4 h,二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min。100%、90%、80%、70%梯度酒精依次脱水,每次 2 min,蒸馏水洗涤 2 次,每次 2 min。灭菌锅内煮沸柠檬酸缓冲液,放入切片,煮沸 15 min。自来水冲洗 10 min。3%过氧化氢封闭 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,避光。PBS 缓冲液洗涤 2 次,每次 5 min。蛋白封闭液封闭 1 h,室温,弃多余液体,不洗。滴加稀释的兔抗人一抗(VEGF、CD31、Ki67),置湿盒中 4 ℃孵育过夜。PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。滴加辣根过氧化物酶标记多聚物结合羊抗兔 IgG,置湿盒中 37 ℃孵育 1 h。PBS 缓冲液洗涤 2 次,每次 5 min。每张切片滴加 100 μl 新鲜配制的显色液,显微镜下控制 3~10 min,显色完成后终止,蒸馏水洗涤。蒸馏水冲洗,苏木素复染,冲洗。梯度乙醇脱水,每次 10 min,二甲苯透明,自然干燥后中性树胶封固^[18-19]。

1.2.5 荧光分子探针的制备及鉴定 依据 F(ab')₂ Preparation Kits 说明书,将 Bevacizumab 处理为 F(ab')₂ 段抗体;Bevacizumab-F(ab')₂₀ 以 1:10 的摩尔比例混合 Bevacizumab-F(ab')₂ 及 Dylight 680-NHS 于 0.5 mol/L 硼酸钠溶液中室温避光反应 2.5 h 后,将反应液经 PD MidiTrap™ columns 纯化,得到荧光分子探针:Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂₀。

将制得的荧光分子探针稀释 100 倍后,紫外分光光度计测定 280、684 nm 处荧光分子探针的吸收峰值。并根据以下公式计算蛋白(抗体)浓度及抗体标记率。

$$\text{蛋白浓度 (M)} = \frac{[A_{280 \text{ nm}} - (A_{684 \text{ nm}} \times 0.128)]}{149\,000} \times 100$$

$$\text{单个蛋白标记的荧光染料量} = \frac{A_{684 \text{ nm}} \times 1\,000}{149\,000 \times \text{蛋白浓度 (M)}} \times 100$$

1.2.6 活体荧光成像 于 Genistein 治疗的第 7 天从对照组及治疗组中各取 3 只肿瘤体积相近的荷瘤裸鼠。对每只荷瘤裸鼠尾静脉注射 500 pmol Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂₀, 探针注射 4 h 后腹腔注射 1%戊巴比妥那 0.15 ml 进行麻醉,待实验动物麻醉后置于 IVIS 小动物活体成像系统进行活体荧光显像。调试 IVIS 小动物活体成像系统的参数,并确定最佳激发波长为 675 nm,发射波长为 720 nm。为计量肿瘤对荧光分子探针的摄取值,使用实时 Imaging Living 软件(Xenogen, Alameda, CA)绘出治疗组与对照组中每个肿瘤感兴趣区域(region of interest, ROI)并计算其平均荧光强度值(average radiant efficiency),单位为:p/s/cm²/sr。

显像结束后,切取皮下肿瘤,称其质量后,加入 9 倍质量的生理盐水(含 1% PMSF)后充分研磨,12 000 r/min 离心 15 min 后取上清进行肿瘤 VEGF 的 ELISA 检测。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 统计分析制图软件分析数据并制图,MTT 及 VEGF-ELISA 数据采用单因素方差分析,同时进行两两比较,genistein 肿瘤抑制结果采用重复测量资料的方差分析,活体荧光显像部分荧光数据及 VEGF 数据采用 *t*

检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Genistein 对 MKN45 人胃癌细胞的增殖抑制

MTT 检测结果表明:从低浓度(1.0 μmol/L)到高浓度(500 μmol/L)梯度浓度的 Genistein 对 MKN45 细胞均无明显的增殖抑制作用(表 1)($F=1.842, P=0.118$)。

表 1 Genistein 处理 MKN45 细胞 48 h MTT 检测结果

Tab.1 Results of MTT after MKN45 cells being treated with genistein for 48 h

药物浓度	例数	MKN45细胞
500	3	0.787 0 ± 0.100 5
250	3	0.683 3 ± 0.025 4
125	3	0.844 7 ± 0.151 8
62.5	3	0.837 0 ± 0.085 4
31.25	3	0.688 3 ± 0.047 7
15.6	3	0.777 3 ± 0.024 8
7.8	3	0.930 7 ± 0.172 8
3.9	3	0.785 7 ± 0.055 9
2	3	0.819 0 ± 0.004 4
1	3	0.762 0 ± 0.019 7
0	3	0.765 0 ± 0.103 2

2.2 Genistein 抑制 MKN45 人胃癌细胞 VEGF 的表达

对照组 MKN45 细胞 VEGF 的表达量的平均值为:33.47 pg/ml,浓度分别为 125 及 62.5 μmol/L 的 Genistein 处理 MKN45 细胞 48 h 后, MKN45 细胞 VEGF 的表达量分别为:17.27、18.55 pg/ml。结果表明:Genistein 能够显著抑制 MKN45 细胞 VEGF 的表达,在 Genistein 的作用下 MKN45 细胞 VEGF 表达量降低了近一半,差异具有统计学意义($F=21.360, P=0.002$)。对数据进行两两比较得知,浓度 125 及 62.5 μmol/L 组之间,无统计学差异($P=0.658$),与 0 μmol/L 对比均有差异,其中 $P_{(125 \mu\text{mol/L})}=0.001, P_{(62.5 \mu\text{mol/L})}=0.002$ (表 2)。

表 2 Genistein 处理 MKN45 细胞 48 h VEGF-ELISA 检测结果

Tab.2 Results of MTT and VEGF-ELISA after MKN45 cells being treated with genistein for 48 h

药物浓度	例数	VEGF
125	3	17.27 ± 0.77
62.5	3	18.55 ± 0.24
0	3	33.47 ± 5.79

2.3 Genistein 对 MKN45 移植瘤增殖的抑制作用

皮下接种 MKN45 细胞 8 d 后可明显观察到所有实验动物中均有皮下肿瘤的形成(图 1)。皮下接种 15 d 后所有肿瘤体积平均值约为 300 mm³,于此时开始 Genistein 治疗。在治疗过程中每日测量肿瘤体积、绘制肿瘤体积增长曲线。实验结果表明:在 Genistein 治疗 14 d 后,治疗组肿瘤体积增长总

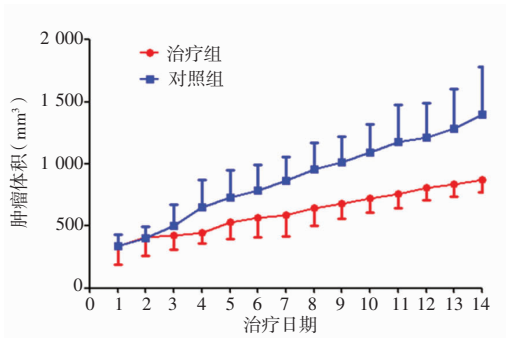
体得到明显的抑制($F=6.53, P=0.034$)。

分组效应、时间效应和分组 $\times$ 时间效应的统计量分别为 $F_{\text{分组}}=6.53, P_{\text{分组}}=0.034, F_{\text{时间}}=74.16, P_{\text{时间}}=0.000, F_{\text{交互}}=7.95, P_{\text{交互}}=0.000$, 说明分组效应、时间效应和分组 $\times$ 时间效应均具有统计学差异。时间效应说明 2 组中肿瘤体积都随着时间的延长而增加; 分组效应说明治疗组的数据相比对照组均较低; 分组 $\times$ 时间效应具有统计学差异说明分组和时间具有交互作用, 从数据中看出治疗组随时间延长数据增加的幅度比对照组增长的幅度小(表 3)。

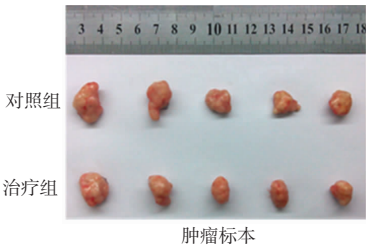
表 3 肿瘤体积的重复测量方差分析结果

Tab.3 Results of ANOVA for repeated measurement of tumor volume

时间	对照组	治疗组
1 d	337.59 $\pm$ 94.50	338.50 $\pm$ 151.45
2 d	404.77 $\pm$ 91.19	406.89 $\pm$ 148.69
3 d	498.58 $\pm$ 173.63	427.19 $\pm$ 115.86
4 d	654.04 $\pm$ 220.54	446.58 $\pm$ 90.15
5 d	729.33 $\pm$ 218.09	528.55 $\pm$ 136.21
6 d	787.43 $\pm$ 206.79	569.40 $\pm$ 158.35
7 d	864.54 $\pm$ 190.91	588.86 $\pm$ 174.24
8 d	953.88 $\pm$ 214.85	643.78 $\pm$ 143.87
9 d	1 014.71 $\pm$ 205.67	679.71 $\pm$ 119.96
10 d	1 088.67 $\pm$ 233.46	722.80 $\pm$ 117.56
11 d	1 177.72 $\pm$ 296.40	758.30 $\pm$ 111.54
12 d	1 212.53 $\pm$ 274.05	804.75 $\pm$ 93.60
13 d	1 286.69 $\pm$ 316.30	836.07 $\pm$ 96.17
14 d	1 395.16 $\pm$ 385.94	868.22 $\pm$ 93.59



A. Genistein 对肿瘤体积增长的抑制曲线

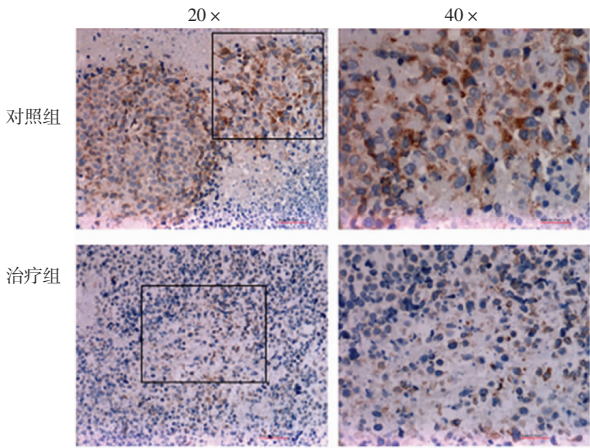


B. Genistein 治疗 14 d 后离体肿瘤组织照片

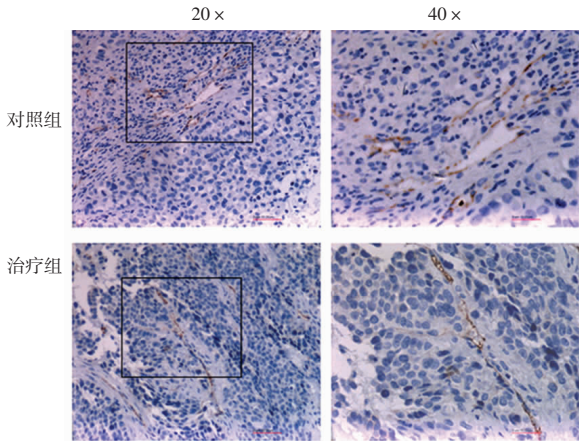
图 1 肿瘤生长抑制曲线及治疗周期结束后肿瘤标本直观图
Fig.1 Curve of tumor growth inhibition and visual photo of isolated tumor specimens after genistein treatment

2.4 免疫组织化学分析

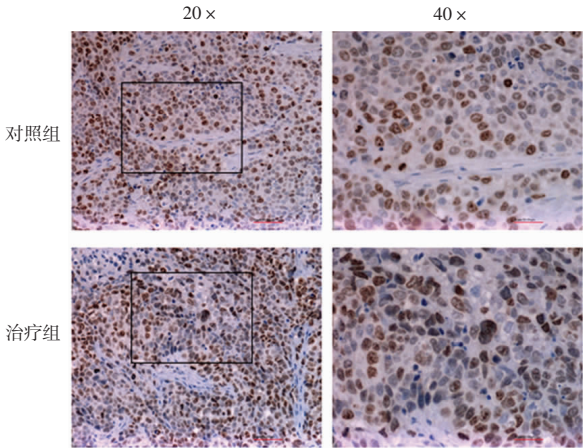
阳性信号呈棕色细颗粒状, CD31 阳性结果分布于血管周围, VEGF 及 Ki67 在肿瘤组织中散在分布(图 2)。免疫组织化学实验结果: 治疗组肿瘤的 CD31 及 VEGF 表达水平较对照组肿瘤明显降低, 2 组肿瘤 Ki67 的表达水平无统计学差异(图 2)。实验结果表明: Genistein 作用于 MKN45 皮下移植瘤具有明显抗血管生作用, 但对肿瘤增殖无明显的抑制作用。



A. 免疫组化检测治疗组与对照组肿瘤 VEGF 表达水平



B. 免疫组化检测治疗组与对照组肿瘤 CD31 表达水平



C. 免疫组化检测治疗组与对照组肿瘤 Ki67 表达水平

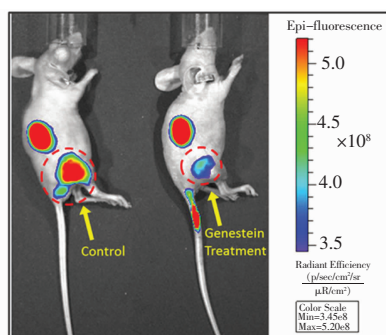
图 2 免疫组化结果
Fig.2 Immunohistochemical results

2.5 荧光分子探针的鉴定

于紫外分光光度计下测出所制备的荧光分子探针 $A_{280\text{ nm}}=0.0094$, $A_{694\text{ nm}}=0.0139$ 。代入上文所述的公式中,计算得到结果:蛋白浓度为 $5.11 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,单个蛋白标记的荧光染料量为 1.94 个。即平均每个 Bevacizumab-F(ab')₂ 分子约偶联上 2 个 Dylight 680 荧光染料分子。

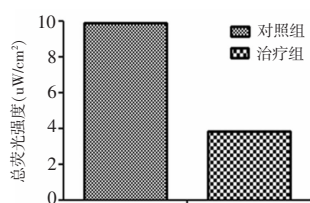
2.6 活体荧光成像

在 IVIS 小动物活体成像系统激发波长 675 nm,发射波长 720 nm 模式下对实验动物进行成像。显像结果表明:在 Genistein 治疗 7 d 后,肿瘤 VEGF 含量明显降低(图 3A),并且根据感兴趣区域(ROI)的荧光发射强度计算出对照组与实验组间 VEGF 含量比值为 2.6:1,结果差异具有统计学意义 ($t=40.41$, $P=0.000$)(图 3B)。肿瘤 VEGF-ELISA 结果表明,对照组肿瘤与治疗组肿瘤 VEGF 表达量分别为:733.46、414.52 pg/ml,具有统计学差异($t=22.96$, $P=0.000$)(图 3C)。

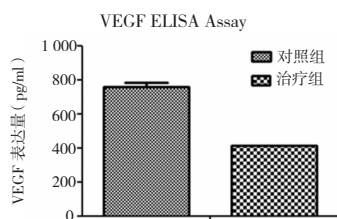


	Control	Genistein treatment
Avg Radiant Efficiency [pW/cm ² /sr] [μW/cm ²]	4.411e+08	3.662e+08

A. 小动物活体荧光成像检测 Genistein 治疗第 7 天肿瘤部位 VEGF 的表达水平



B. Genistein 治疗第 7 天治疗组与对照组肿瘤摄取的分子探针荧光强度值



C. VEGF-ELISA 检测 Genistein 治疗第 7 天的肿瘤 VEGF 的表达水平 ($P=0.000$)

图 3 小动物活体成像及肿瘤 VEGF-ESLIA 检测结果

Fig.3 In vivo optical imaging and ex vivo tumor VEGF-ESLIA test results

3 讨论

MTT 及 Ki67 免疫组化检测结果表明 Genistein 对 MKN45 胃癌细胞及其皮下移植瘤无直接、明显的增殖抑制作用。VEGF-ELISA、VEGF、CD31 免疫组化实验及活体荧光显像结果表明 Genistein 能够通过明显降低 MKN45 细胞及其皮下移植瘤 VEGF 的表达产生抗血管生成作用达到抑制皮下肿瘤增殖的疗效。同时,所制备的荧光分子探针 Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂ 应用于活体荧光显像能够在体、无创、准确地检测 Genistein 治疗下肿瘤 VEGF 表达水平的变化,从而对抗肿瘤血管化疗药物的疗效进行早期评价,具有良好的临床转化前景。

目前,已有大量文献^[20-24]报道了 Genistein 的抑瘤疗效,部分研究^[19-22]证实了 Genistein 具有明显的细胞增殖抑制作用。然而在本研究中,MTT 实验结果表明浓度梯度的 Genistein 对 MKN45 肿瘤细胞的增殖并无显著、直接的抑制作用。然而,在低浓度 Genistein 的作用下(Genistein 浓度为 62.5 μmol/L),MKN45 肿瘤细胞 VEGF 的表达量即呈明显下降趋势。这一实验结果提示:对于某些对 Genistein 治疗不敏感的肿瘤细胞,Genistein 能够通过抗血管生成作用达到抑瘤疗效。对于这一推断,本研究从体内动物实验中获得了更充足的证明。皮下移植瘤模型的治疗实验结果表明:虽然 Genistein 具有一定的、客观的抑瘤疗效,然而,经统计学分析 2 组肿瘤的体积并不总具有统计学差异, t 检验分析仅在治疗过程中第 7、9、10、11、12、14 天 2 组肿瘤间体积大小存在差异。同时,肿瘤 VEGF-ELISA 及小动物活体荧光显像实验结果均表明 Genistein 治疗组肿瘤的 VEGF 表达量明显降低,CD31 免疫组化表明肿瘤新生血管减少。以上实验结果均提示 Genistein 对 MKN45 肿瘤无直接的细胞毒性作用,而是主要通过抑制肿瘤 VEGF 的表达及肿瘤新生血管形成达到抑瘤效果。

本研究中,尽管通过 VEGF-ELISA 方法能够准确测定肿瘤 VEGF 的表达量,然而 ELISA 检测须要首先分离离体肿瘤进行体外检测,无法在体、实时、无创地检测肿瘤 VEGF 表达水平变化。由于抗血管生成作用并不直接杀死肿瘤细胞而是抑制肿瘤新生血管生成,阻断营养供应、延缓肿瘤的增长,一般在抗血管生成治疗的用药初期对肿瘤的抑制效果并不十分显著。因此,有必要建立一种在体、实时检测抗血管生成疗效的实验方法。通过制备靶向 VEGF

的荧光分子探针及活体光学显像,很好地解决了这个问题。本实验在 Genistein 治疗的第 7 天对实验动物进行活体光学成像,显像结果表明所制备的荧光分子探针能够灵敏、准确地检测 Genistein 对肿瘤 VEGF 的抑制效果。

本实验采用近红外荧光染料分子 Dylight 680-NHS 及商品化的抗 VEGF 单克隆抗体 Bevacizumab 的 F(ab')₂ 片段进行偶联及纯化制备成荧光分子探针:Dylight 680-Bevacizumab-F(ab')₂。活体荧光成像结果表明:该探针具有良好的靶向性和灵敏度。能够在体地、无创地早期检测 Genistein 抗肿瘤血管生成的疗效。本实验中将 Bevacizumab 进行剪切得到片段化的抗体:Bevacizumab-F(ab')₂ 的目的在于:通过减小单克隆抗体的分子量以加快分子探针在实验动物体内的代谢速率、并降低肿瘤组织及非靶组织对探针的非特异性摄取,从而获得更清晰的显像图像和更准确的定量分析。

参 考 文 献

- [1] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids[J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 90(2-3): 157-177.
- [2] Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390(1-2): 235-242.
- [3] Xie Q, Bai Q, Zou LY, et al. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(5): 422-431.
- [4] Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, et al. Genistein downregulates onco-miR-1260b and upregulates sFRP1 and Smad4 via demethylation and histone modification in prostate cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(6): 1645-1654.
- [5] Huang W, Wan C, Luo Q, et al. Genistein-inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 3432-3443.
- [6] Wang SD, Chen BC, Kao ST, et al. Genistein inhibits tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(1): 26.
- [7] Switalska M, Gryniewicz G, Strzadala L, et al. Novel genistein derivatives induce cell death and cell cycle arrest through different mechanisms[J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(6): 874-884.
- [8] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [9] Jain RK, Duda DG, Clark JW, et al. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, 3(1): 24-40.
- [10] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine[J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [11] O'Farrell AC, Shnyder SD, Marston G, et al. Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(4): 719-735.
- [12] Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies[J]. *Clin Radiol*, 2010, 65(7): 500-516.
- [13] Choy G, Choyke P, Libutti SK. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research[J]. *Mol Imaging*, 2003, 2(4): 303-312.
- [14] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier[J]. *Radiology*, 1999, 212(3): 609-614.
- [15] Weissleder R. Molecular imaging in cancer[J]. *Science*, 2006, 312(5777): 1168-1171.
- [16] Danthi SN, Pandit SD, Li KCP. A primer on molecular biology for imager: VII. Molecular imaging probes[J]. *Acad Radiol*, 2004, 11(9): 1047-1054.
- [17] Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, et al. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 313-320.
- [18] 杨晶磊, 徐欣. 涎腺腺样囊性癌免疫组化表达的临床意义[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2012, 50(6): 114-118.
- [19] 黄金燕. 人子宫内膜异位症血瘀证在位内膜差异蛋白质组学及免疫组化研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [20] Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, et al. Genistein up-regulates tumor suppressor microRNA-574-3p in prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58929.
- [21] Hussain A, Harish G, Prabhu SA, et al. Inhibitory effect of genistein on the invasive potential of human cervical cancer cells via modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 expression[J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36(6): e387-e393.
- [22] Khaw AK, Yong JW, Kalthur G, et al. Genistein induces growth arrest and suppresses telomerase activity in brain tumor cells[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51(10): 961-974.
- [23] Zhang L, Li L, Jiao M, et al. Genistein inhibits the stemness properties of prostate cancer cells through targeting Hedgehog-Gli1 pathway[J]. *Cancer Lett*, 2012, 323(1): 48-57.
- [24] Qi W, Weber CR, Wasland K, et al. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity[J]. *BMC Cancer*, 2011(11): 219.

(责任编辑: 冉明会)