

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.011

# Genistein 对卵巢癌铂类耐药细胞株 CP70 增殖凋亡的影响 及与细胞内 ROS 的相关性

魏燕 熊佳易 王蔼明 赵军 王宁 张兰梅<sup>△</sup>

(海军总医院妇产科 北京 100048)

**摘要 目的:**探讨 Genistein 对卵巢癌铂类耐药细胞 CP70 增殖、凋亡的影响及与细胞内活性氧水平的关系。**方法:**采用 MTT 法检测 Genistein 对 CP70 细胞增殖的影响;流式细胞仪分析不同药物处理后对细胞凋亡的影响,线粒体膜电位及细胞内 ROS 水平的变化情况。**结果:**Genistein 对 CP70 细胞增殖表现出剂量和时间依赖性的抑制作用,并能诱导其凋亡;Genistein 作用于 CP70 细胞后,可使其线粒体膜电位降低,并引发了细胞内 ROS 水平的显著升高;ROS 抑制剂 NAC 预处理 CP70 细胞后,有效抑制了 ROS 的产生,并降低了细胞凋亡率,与未加 NAC 组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。**结论:**Genistein 能抑制铂类耐药卵巢癌细胞 CP70 的增殖,并促进其凋亡,这与细胞内 ROS 水平的升高有关,可能是 Genistein 抗肿瘤诱导细胞凋亡的机制之一。

**关键词:** Genistein; 活性氧; 卵巢癌; 细胞凋亡; NAC

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)05-841-05

## Effects of Genistein on Proliferation, Apoptosis and the Level of ROS in Human Ovarian Carcinoma Cell CP70

WEI Yan, XIONG Jia-yi, WANG Ai-ming, ZHAO Jun, WANG Ning, ZHANG Lan-mei<sup>△</sup>

(Department of Obstetrics and Gynecology, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of Genistein on proliferation, apoptosis and the level of ROS in drug resistant Human Ovarian Carcinoma Cell CP70. **Methods:** The growth inhibitory effect of different drugs on CP70 cells was detected by MTT assay. The apoptosis rate was determined by flow cytometry. Mitochondrial membrane potential and the level of ROS were measured by flow cytometry. **Results:** The exerted inhibitory effect of Genistein on CP70 cells in a time and dose dependent manner, and it could induce the apoptosis of CP70 cells. Genistein reduced the mitochondrial membrane potential and increased the level of ROS. After pretreatment with antioxidant NAC, the level of ROS was effectively inhibited, meanwhile mitochondrial membrane potential increased and apoptotic rate decreased. **Conclusion:** Genistein inhibited the proliferation and induced apoptosis, and is related to the increased of ROS in cisplatin-resistant ovarian cancer cell CP70. It may be one of the mechanism of apoptosis induced by Genistein in CP70 cells.

**Key words:** Genistein; Reactive oxygen species; Ovarian carcinoma; Apoptosis; NAC

**Chinese Library Classification(CLC):** R737.31 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)05-841-05

### 前言

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病和难治性疾病,目前高效低毒的抗肿瘤药物甚少,发掘中药资源,从中寻找出高效低毒的抗肿瘤药物,将会对人类健康作出巨大贡献。Genistein (4',5,7-三羟基异黄酮,即染料木黄酮)作为一种天然无毒的植物多酚类化合物,主要存在于豆类植物中。因其结构与雌二醇相似,也称之为植物雌激素。Genistein 具有广泛的生物学活性,包括抗肿瘤,抗氧化,抗炎,改善心血管功能等,尤其在抗肿瘤方面,具有很大的潜能。关于 Genistein 的体内外实验及流行病学资料均表明,Genistein 对多种肿瘤细胞均有抑制作用<sup>[1-5]</sup>,但其具体作用机制尚未完全阐明。本实验观察了 Genistein 对卵巢

癌铂类耐药细胞 CP70 增殖、凋亡的影响,并对活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的改变在其中的作用进行了初步研究,探讨其抗肿瘤的可能机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

人卵巢癌细胞系顺铂耐药株 CP70,由西京医院妇产科实验室保存。Genistein、二甲基亚砷(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、NAC 均购自 Sigma 公司;顺铂(齐鲁制药厂);DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(四季青);活性氧检测试剂盒(南京凯基生物技术公司);全自动酶标仪;流式细胞仪。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 卵巢癌耐药细胞株 CP70 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中,DMEM 中加入青链霉素的浓度为 100 U/mL,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中,2-3 天传代 1 次,所有实验操作均采用对数生长期的细胞。

**1.2.2 Genistein 对 CP70 细胞增殖的影响** 取对数生长期的

作者简介:魏燕(1983-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:010-66958518, E-mail: swallow\_08@163.com

<sup>△</sup>通讯作者:张兰梅,女,硕士研究生导师, E-mail: zzlmm1100@163.com

(收稿日期:2013-03-19 接受日期:2013-04-10)

CP70 细胞,  $4 \times 10^3$  个 / 孔接种于 96 孔培养板, 置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养 12 小时, 细胞贴壁后弃去培养液, 然后加入含不同浓度药物的培养基  $200\mu\text{L}$ , 对照组只加 DMEM 培养基, Genistein 组浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g/ml}$ ; 每组均设 6 个复孔。分别培养至加药后 24 h, 48 h, 72 h。每孔加入 MTT (5 mg/ml,  $20\mu\text{L}$ ), 继续孵育 4 h 后弃培养液, 每孔加入 DMSO  $150\mu\text{L}$ , 振荡 10 min, 用酶标仪检测 570 nm 处吸光值, 按以下公式计算: 细胞增殖抑制率 = (对照组平均值 - 实验组平均值) / 对照组平均值  $\times 100\%$ , 并绘制曲线。

1.2.3 Genistein 对细胞凋亡的影响 调整细胞密度为  $10^5$  个 / mL, 接种于 6 孔培养板中, 每孔 3 mL, 培养 24 h 后弃培养液。每孔加入 Genistein 终浓度分别为 0, 10, 20, 40  $\mu\text{g/ml}$ , 同时设不加药物的对照组, 于 48 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。按 Annexinv-FITC 试剂盒说明操作, 利用流式细胞仪上机检测各组凋亡情况。

1.2.4 Genistein 对细胞内 ROS 水平的影响 调整 CP70 细胞密度为  $10^5$  个 / mL, 接种于 6 孔培养板中, 每孔 3 mL, 分别加入终浓度 0, 10, 20 和 40  $\mu\text{g/ml}$  的 Genistein, 在加药处理后 12 h, 收集细胞, 用预冷的 PBS (pH 7.2) 洗涤后, 各不同处理组分别加入终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DCFH-DA  $500\mu\text{L}$  重悬细胞, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 离心, 弃上清。每管沉淀内加 PBS  $500\mu\text{L}$  重悬细胞, 流式细胞仪检测分析荧光强度。

1.2.5 Genistein 对细胞内线粒体膜电位的影响 调整 CP70 细胞密度为  $10^5$  个 / mL, 接种于 6 孔培养板中, 每孔 3 mL, 分别加入终浓度为 0, 10, 20 和 40  $\mu\text{g/ml}$  的 Genistein, 在加药处理后 12 h, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 遍后, 按线粒体膜电位检测试剂盒操作, 加入 JC-1, 继续在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内避光孵育 20 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 离心, 弃上清。每管沉淀内加 PBS  $500\mu\text{L}$  重悬细胞, 流式细胞仪检测分析平均荧光强度。

1.2.6 ROS 抑制剂 NAC 预处理 CP70 细胞后分别用流式细胞仪检测各指标的变化 NAC(N-乙酰-L-半胱氨酸), 为 ROS 抑制剂, 终浓度为 5 mmol/L, 预先处理 CP70 细胞 2 小时后, 再分别加入 20  $\mu\text{g/ml}$  的 Genistein, 分别检测细胞内 ROS 水平, 凋亡率及线粒体膜电位的变化。

1.3 统计学处理

所有数据均以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 对实验结果进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  认为两者间存在显著差异。

2 结果

2.1 Genistein 对卵巢癌顺铂耐药株 CP70 细胞增殖的影响

结果显示, 同一时间, 随着 Genistein 浓度的增加, 其对 CP70 细胞的增殖抑制作用也逐渐增强; 同一浓度, 随着作用时间的延长, Genistein 对 CP70 细胞的增殖抑制作用也增加。由此可见, Genistein 对 CP70 细胞增殖抑制作用具有时间 - 剂量依赖性(图 1)。

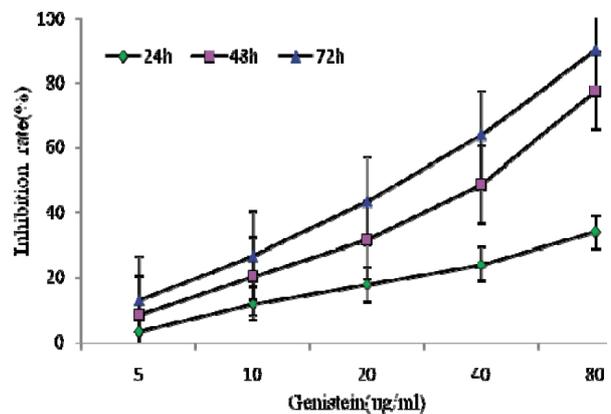


图 1 Genistein 对 CP70 细胞的增殖抑制作用

Fig.1 Effect of Genistein on cell proliferation of CP70 cells

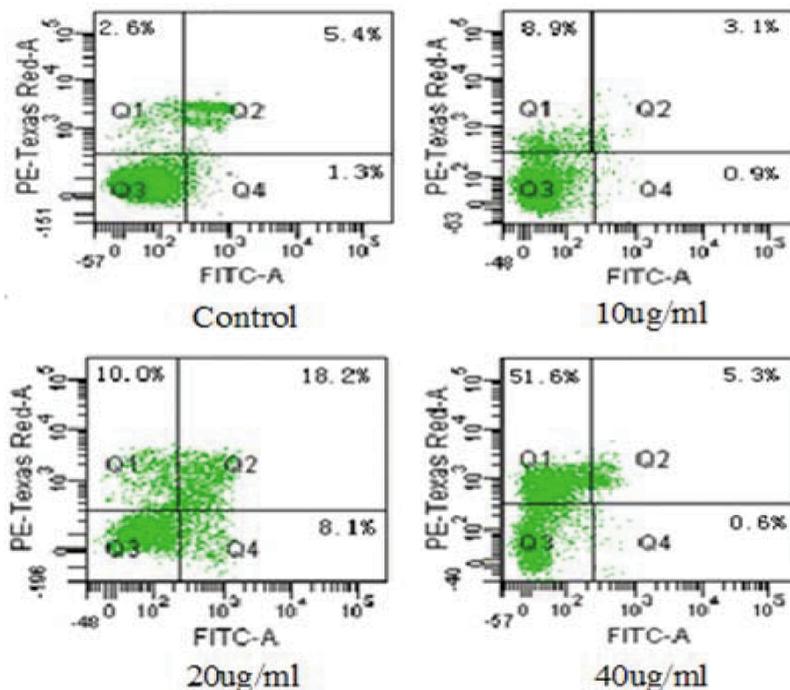


图 2 流式检测 Genistein 对 CP70 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of Genistein on cell apoptosis of CP70 cells detected by flow cytometry

### 2.2 Genistein 对 CP70 细胞凋亡的影响

不同浓度的 Genistein 分别作用于 CP70 细胞 48 h 后,应用流式细胞仪检测其凋亡率(图 2);与空白对照组相比,各浓度的 Genistein 均能引起 CP70 细胞的凋亡( $P < 0.05$ ),并且凋亡率随其浓度的增加而增大,呈明显的剂量依赖性(图 3)。

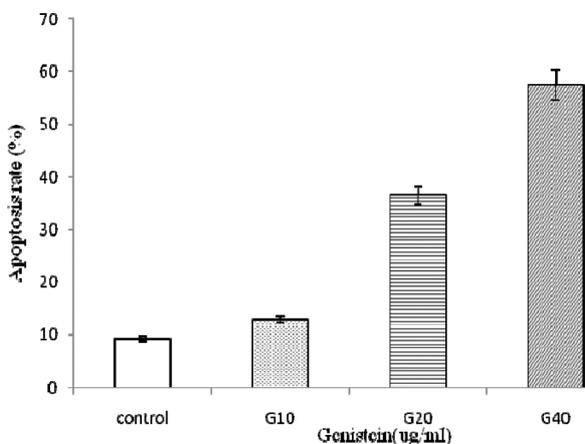


图 3 不同浓度的 Genistein 作用于 CP70 细胞 48 h 后的凋亡率  
Fig.3 Apoptosis rate of CP70 cells treated with Genistein for 48 hours

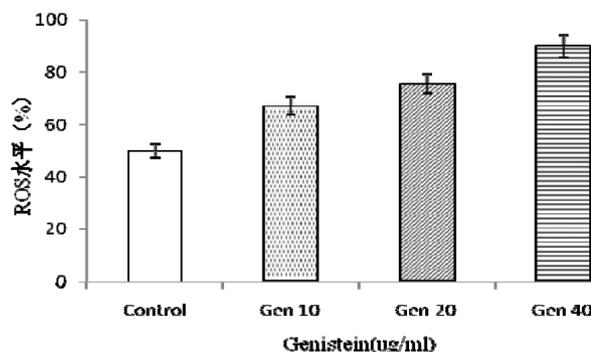


图 4 Genistein 对 CP70 细胞内 ROS 水平的影响  
Fig.4 Effect of Genistein on the level of ROS in CP70 cells

### 2.3 Genistein 对 CP70 细胞内 ROS 水平的影响

ROS 检测结果显示,10、20 和 40 μg/ml 的 Genistein 分别作用于 CP70 细胞 12 h 后,与空白对照组相比,细胞内的 ROS 水平明显升高,并且随其浓度增加,ROS 的水平也增加(图 4)。

### 2.4 Genistein 对 CP70 细胞内线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位检测结果显示(图 5),不同浓度的 Genistein 处理 CP70 细胞 12 h 后,其线粒体膜电位均明显降低,低于对照组,且呈一定的量效关系。

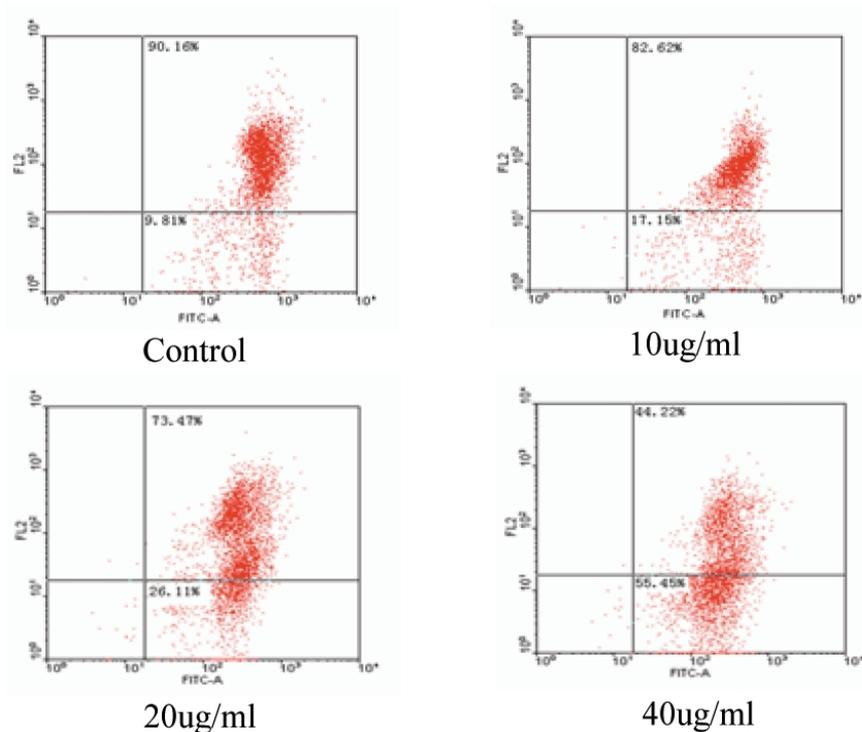


图 5 不同浓度的 Genistein 对线粒体膜电位的影响  
Fig.5 Effect of Genistein with different concentrations on mitochondrial membrane potential in CP70 cells

### 2.5 ROS 抑制剂 NAC 预处理 CP70 细胞后各指标的变化情况

NAC 预处理 CP70 细胞 2 h 后,再分别加入 20 μg/mL 的 Genistein,检测细胞内 ROS 水平,细胞凋亡率及线粒体膜电位的变化(图 6)。结果显示,Genistein 处理组与 NAC 预处理组相比,CP70 细胞内的 ROS 水平明显降低,凋亡率也随之降低,而线粒体膜电位水平则升高(图 7)。

## 3 讨论

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,发病率仅次于宫颈癌,病死率高居榜首<sup>[6]</sup>。以顺铂为基础的联合化疗在卵巢癌的综合治疗中占有重要的位置,但由于肿瘤细胞耐药性的产生,限制了它的临床应用,铂类耐药给临床上卵巢癌的治疗也带来了困扰,这表明寻找新的方法克服卵巢癌铂类耐药对于提高患者的整体生存率是非常重要的<sup>[7]</sup>。

Genistein(4',5,7-三羟基异黄酮,即染料木黄酮)属于异黄酮类化合物,主要存在于豆类植物中。由于其结构与雌二醇相

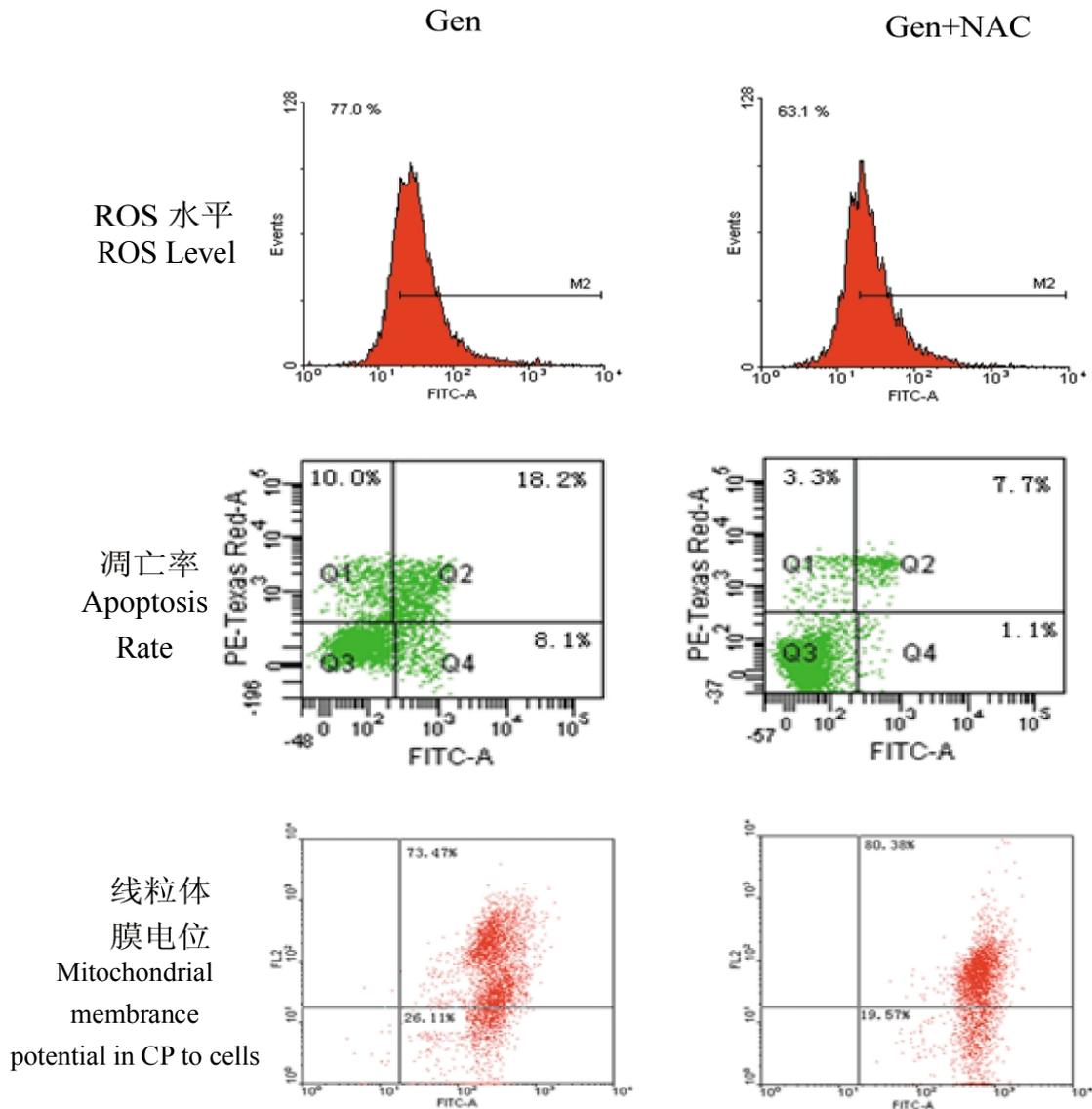


图 6 N-乙酰-L-半胱氨酸预处理后流式检测各指标的变化

Fig.6 Effect of the pretreatment of NAC on CP70 cells detected by flow cytometry

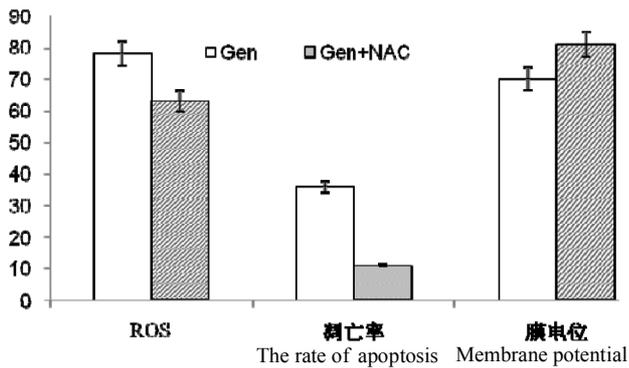


图 7 N-乙酰-L-半胱氨酸预处理后各指标的变化

Fig.7 Effect of the pretreatment of NAC on CP70 cells detected by flow cytometry

似,能与雌激素受体结合,产生雌激素样效应,故又称为植物雌激素。Genistein 具有广泛的生理、药理学活性,尤其在肿瘤的预防和治疗方面,以其天然、低毒的特性得到了广泛的重视。关于 Genistein 的体内外实验及流行病学资料均表明,Genistein 对多种肿瘤细胞均有抑制作用,并且可以增加耐药肿瘤细胞对化疗

药物的敏感性<sup>[9]</sup>,但其具体作用机制尚未完全阐明。

本研究通过 MTT 比色法检测 Genistein 对卵巢癌顺铂耐药株 CP70 细胞增殖抑制情况,结果表明,不同浓度的 Genistein 对 CP70 细胞的增殖均表现出一定程度的抑制作用,并呈时间剂量依赖性趋势。不同浓度的 Genistein 作用于 CP70 细胞 48 h 后,诱导了 CP70 细胞的凋亡,并随其浓度的增加,细胞的凋亡率也增加,具有浓度依赖性。本研究结果表明 Genistein 可以通过抑制 CP70 细胞的增殖及诱导其凋亡来发挥抗肿瘤作用。ROS(reactive oxygen species)即氧自由基及其衍生物,是细胞代谢的正常产物,主要产生于线粒体氧化代谢中<sup>[9]</sup>。细胞内的氧化-还原状态对于细胞的生长、增殖、凋亡都至关重要,而 ROS 是维持细胞内这种氧化-还原状态平衡的主要因素<sup>[10]</sup>。过去 ROS 一直被认为只是一类损伤细胞的毒性物质,近来许多研究表明活性氧与细胞凋亡密切相关,ROS 在多种抗肿瘤药物诱导凋亡过程中起着介导和调节作用<sup>[11]</sup>,它可以起始和执行细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

Genistein 一直被认为是天然的抗氧化剂,是 ROS 的清除剂<sup>[13]</sup>,但事实上 Genistein 具有氧化还原的双重功能,既可以抗

氧化,又可以促氧化<sup>[8]</sup>。一般认为在疾病的预防上,Genistein 通过抗氧化和清除自由基来发挥作用。但在抗肿瘤和诱导肿瘤细胞凋亡方面其促氧化作用更为重要<sup>[14,15]</sup>。Genistein 促进肿瘤细胞凋亡的作用可能与其介导的氧化应激有关,其可能作为一个促氧化的代表,通过刺激细胞内 ROS 的产生来促进肿瘤细胞的凋亡,发挥抗肿瘤的作用<sup>[16-18]</sup>。

为进一步验证 Genistein 引发的细胞内 ROS 水平升高与其诱导的 CP70 细胞凋亡之间的相关性,本研究进一步用 ROS 的抑制剂 NAC 预处理 CP70 细胞 2 h 后,再加入 Genistein,分别检测细胞内 ROS 水平,细胞凋亡率及线粒体膜电位的变化。结果表明,抗氧化剂 NAC 的预处理,降低了 Genistein 引发的 ROS 的产生,CP70 细胞的凋亡率也随之降低,而线粒体膜电位反而升高。这些结果表明,Genistein 通过引发 ROS 的产生诱导了 CP70 细胞的凋亡,ROS 在其诱导肿瘤细胞凋亡过程中发挥着重要的作用。

综上所述,Genistein 能够以时间剂量依赖的方式抑制卵巢癌顺铂耐药株 CP70 细胞的增殖,并能诱导 CP70 细胞的凋亡,在此过程中 ROS 发挥着重要的作用。

#### 参考文献(References)

- [1] Sahin K, Tuzcu M, Basak N, et al. Sensitization of Cervical Cancer Cells to Cisplatin by Genistein: The Role of NF $\kappa$ B and Akt/mTOR Signaling Pathways [J]. *J Oncol*, 2012, 2012: 461562
- [2] Li H, Xu W, Huang Y, et al. Genistein demethylates the promoter of CHD5 and inhibits neuroblastoma growth in vivo [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(5): 1081-1086
- [3] Ning Y, Li Q, Xiang H, et al. Apoptosis induced by 7-difluoromethoxy-5,4'-di-n-octyl genistein via the inactivation of FoxM1 in ovarian cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6): 1857-1864
- [4] Liang C, Li H, Shen C, et al. Genistein potentiates the anti-cancer effects of gemcitabine in human osteosarcoma via the downregulation of Akt and nuclear factor-kappaB pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(5): 554-563
- [5] Yu X, Zhu J, Mi M, et al. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 349-357
- [6] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60:277-300
- [7] Brown DP, Chin-Sinex H, Nie B, et al. Targeting superoxide dismutase 1 to overcome cisplatin resistance in human ovarian cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63(4): 723-730
- [8] Hormann V, Kumi-Diaka J, Durity M, et al. Anticancer activities of genistein-topotecan combination in prostate cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(11): 2631-2636
- [9] Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics [J]. *Toxicology*, 2002, 177(1): 91-104
- [10] Sakatani M, Suda I, Oki T, et al. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock [J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(3): 605-614
- [11] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7): 579-591
- [12] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 99-163
- [13] Si H and Liu D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(24): 2581-2589
- [14] Sakihama Y, Cohen M F, Grace S C, et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants [J]. *Toxicology*, 2002, 177(1): 67-80
- [15] Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, et al. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(4): 553-559
- [16] Sanchez Y, Amran D, de Blas E, et al. Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4) Protein kinase modulation and reactive oxygen species generation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(3): 384-396
- [17] Shin JI, Shim JH, Kim KH, et al. Sensitization of the apoptotic effect of gamma-irradiation in genistein-pretreated CaSki cervical cancer cells [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(3): 523-531
- [18] Das A, Banik NL, and Ray SK. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes [J]. *Cancer*, 2010, 116(1): 164-176