

· 基础研究 ·

金雀异黄素抑制大鼠膀胱肿瘤作用的实验研究

李晶磊, 何朝宏, 许长宝

(郑州大学第二附属医院泌尿外科 450014)

摘要:目的 探讨金雀异黄素对 N-甲基亚硝基脲(MNU)诱导的 SD 大鼠膀胱肿瘤的抑制作用。方法 将 60 只大鼠随机分成 3 组,用 MNU 诱导成膀胱肿瘤,实验 1 组和实验 2 组分别经腹腔注射金雀异黄素 0.5、1.0 mg/kg,每两日 1 次;对照组用同样的方式注射生理盐水。利用统计方法和病理分级来分析金雀异黄素对 MNU 诱导的 SD 大鼠膀胱肿瘤的抑制作用。结果 实验 1 组和实验 2 组与对照组比较,在体质量减少值、肿瘤个数、抑瘤率等方面,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验 1 组和实验 2 组的癌变率相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 金雀异黄素对大鼠膀胱肿瘤有抑制作用,剂量越大,对肿瘤癌变抑制作用越强。

关键词:金雀异黄素;膀胱肿瘤;N-甲基亚硝基脲;抑瘤率

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1957-02

The experimental study about genistein inhibition of rats bladder tumor

Li Jinglei, He Chaohong, Xu Changbao

(Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective Investigate the effects about genistein in inhibition of N-methyl nitrosourea (MNU)-induced SD rats bladder tumor. **Methods** 60 SD rats were divided into 3 groups randomly, and all of the 3 groups were treated with MNU to induce urinary bladder tumor. Experimental group 1 and 2, respectively, by intraperitoneal injection of genistein of 0.5, 1.0 mg/kg, every 2 days, the same way injection of saline control group. The statistical methods and pathology classification were used to analyze the effect of genistein on MNU-induced SD rat bladder tumor inhibition. **Results** Compared with control group, in four aspects which were eight loss value, tumour number, inhibition rate of tumor and pathology classification, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Experimental group 1 and experimental group 2 compared to rate of cancer, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Genistein inhibited rats bladder tumor, the greater the dose, the stronger the inhibition of tumor cancer.

Key words: Genistein; urinary bladder neoplasms; N-methyl-N-nitrosourea; inhibition rate of tumor

膀胱肿瘤是中国发病率最高的泌尿系肿瘤,有逐年增多的趋势^[1]。金雀异黄素是来源于豆类植物异黄酮类化合物,是大豆异黄酮的主要活性成分。近年来研究表明金雀异黄素具有抑癌及防癌作用,对乳腺癌、前列腺癌及结肠直肠癌等多种肿瘤细胞株都具有抑制作用^[2-5],但对膀胱肿瘤的作用研究较少,本实验通过研究金雀异黄素对 N-甲基亚硝基脲(MNU)诱导的 SD 大鼠膀胱肿瘤的抑制作用,以期对膀胱肿瘤的治疗提供一种新思路。

1 材料与方 法

1.1 动物 SPF 级饲养的 7~8 周 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量 100~160 g,由郑州大学实验动物中心提供(许可证号:2010B070)。饲养条件:YX 型实验动物洁净柜饲养,常规湿度(40%~50%),温度(22±2)℃。

1.2 试剂 MNU 购于美国 Sigma 公司,以 pH 6.0 的枸橼酸缓冲液为溶剂,配成浓度为 20 mg/mL 的诱导液,-20℃储存备用。金雀异黄素纯度大于或等于 98%,相对分子质量为 270.2,分子式 C₁₅H₁₀O₅,为白色粉末状,购于陕西慧科生物股份有限公司(批号:KHT2088766)。将金雀异黄素溶于 75%乙醇,浓度为 10 mg/mL 储存液,使用生理盐盐水稀释,乙醇最终浓度应低于 0.75%。

1.3 实验分组 按雌雄平分的原则随机分成 3 组,对照组、实验 1 组和实验 2 组,各 20 只。按照刘红耀等^[6]利用 MNU 诱导制备大鼠膀胱肿瘤的方法,在各组大鼠膀胱内注入 0.1 mL MNU 诱导液(20 mg/mL),每 2 周 1 次,共灌注 5 次。同时实

验 1 组和实验 2 组的大鼠经腹腔内注射金雀异黄素,剂量分别是:实验 1 组 0.5 mg/kg,实验 2 组 1.0 mg/kg,每 2 日 1 次,连续给药 10 周;对照组用同样的方式注射生理盐水。15 周时,乙醚麻醉处死动物,完整切取膀胱,切开膀胱,观察黏膜形态,记录肿瘤数目,用游标卡尺测量肿瘤直径,精密秤称质量,石蜡包埋,切片 HE 染色病理分析。

1.4 观察指标 每日观察并记录大鼠的饮食及活动一般情况,给药前称体质量并记录。经腹腔给药时因操作失误,实验 1 组和实验 2 组各死亡 1 只大鼠,在实验过程中,死亡的大鼠,不在统计之列。实验结束时,剥取肿瘤组织称肿瘤质量,按以下公式计算各组抑瘤率(IR): $IR = (\text{对照组肿瘤质量} - \text{实验组肿瘤质量}) / \text{对照组肿瘤质量} \times 100\%$

1.5 统计学处理 用 SPSS 11.5 软件进行分析,计量资料采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验前、后大鼠体质量变化情况 各组大鼠实验前、后体质量减少情况见表 1。

表 1 各组大鼠实验前、后体质量减少情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量减少值(g)
对照组	20	5.25±0.39
实验 1 组	19	3.77±0.38 ^a
实验 2 组	19	3.18±0.22 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

表 2 各组大鼠膀胱成瘤情况

组别	n	成瘤大鼠(n)	肿瘤个数 (n)	肿瘤直径总和 (mm)	平均每只大鼠产生的 肿瘤数(n)	平均每只大鼠产生的 肿瘤直径和(mm)
对照组	20	19	137	280.1	4.57±2.65	12.3±10.14
实验 1 组	19	13	54	73.5	2.08±1.90 ^a	2.83±2.72 ^a
实验 2 组	19	12	47	68.5	1.90±1.34 ^a	2.33±1.59 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 各组大鼠膀胱成瘤情况 对照组有 19 只大鼠膀胱有肿瘤形成(成瘤率 95.00%), 主要表现为结节形、菜花状, 多为数个结节, 并伴有出血溃疡。实验 1 组有 8 只大鼠膀胱有肿瘤形成(成瘤率 68.00%), 表现为结节状, 无溃疡形成; 而未形成肿瘤的 6 只大鼠膀胱黏膜表现出空虚状、增厚、粗糙。实验 2 组有 12 只大鼠膀胱有肿瘤形成(成瘤率 63.00%), 肿瘤均为小结节状; 而未形成肿瘤的 7 只大鼠膀胱黏膜色泽鲜艳、粉红、内壁粗糙、轻度增厚。见表 2。

2.3 各组大鼠膀胱所形成肿瘤体积、质量和抑瘤率比较 实验 1 组、实验 2 组在肿瘤体积和质量上和对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 实验 1 组在肿瘤体积和质量上与实验 2 组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠膀胱所形成肿瘤体积、质量和抑瘤率比较

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤质量(g)	抑瘤率(%)
对照组	750.82±95.19	1.57±0.09	—
实验 1 组	382.42±45.09 ^a	0.74±0.07 ^a	52.87
实验 2 组	214.50±26.60 ^{ab}	0.48±0.05 ^{ab}	69.43

—: 表示此项无数据; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与实验 1 组比较。

2 讨论

本实验利用的 MNU 诱导的 60 只 SD 大鼠膀胱肿瘤方法是目前研究膀胱肿瘤比较常用和标准的方法, 具有意外死亡率低、感染率低、诱癌时间短、病理类型中的移行细胞癌比例较高及更接近于人类的膀胱肿瘤等特点^[7]。膀胱肿瘤是泌尿系统中最常见的肿瘤, 肿瘤细胞侵袭力很强, 易复发和转移, 研究可用于预防、诊治膀胱肿瘤的方法, 具有重要的临床价值和科研意义^[8]。

金雀异黄素是酪氨酸激酶抑制剂的一种, 酪氨酸激酶抑制剂作为一大类抗肿瘤药物, 在基础和临床研究中越来越受到人们的重视^[9-10]。金雀异黄素抑制了膀胱组织生长因子的受体酪氨酸激酶, 特别是抑制表皮生长因子受体(EGF-R)和血小板衍生的生长因子受体(PDGF-R)酪氨酸激酶的活性, 却很少影响丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性, 能竞争性地抑制 ATP 结合到酪氨酸激酶催化结构域, 从而特异地抑制酪氨酸激酶的活性^[11-13], 这一性质会减少生长因子对非正常细胞刺激而避免过度增生, 从而使肿瘤组织在体积上和质量上减轻。本实验中可以看出, 金雀异黄素抑制 MNU 诱导的大鼠膀胱肿瘤的作用较明显, 主要表现在金雀异黄素能够延缓患瘤大鼠体质量的下降, 使肿瘤的体积、质量、数量减少, 也能使肿瘤的成瘤率下降。虽然不同剂量金雀异黄素之间在抑制肿瘤的数量、体积等方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 但是在病理分级中, 剂量大的金雀异黄素组能明显降低成瘤率, 剂量越大, 抑瘤作用越强。

在膀胱肿瘤的血管形成过程中金雀异黄素能够减少血管内皮细胞分泌碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)^[14-15], 抑制膀胱肿瘤发展过程中微血管的形成, 降低膀胱肿瘤血管密度(MVD), 从而减缓肿瘤的发展。

参考文献:

- [1] 黄玉华, 严春寅, 温端改, 等. 膀胱癌合并上尿路上皮癌的诊断与外科治疗[J]. 山东医药, 2009, 49(22): 13-14.
- [2] Wei H, Bowen R, Cai Q, et al. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1): 124-130.
- [3] Osalla S, Terashima Y, Kimura G, et al. Antitumour effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine [J]. Br J Urol Int, 1999, 83(5): 123-128.
- [4] Ji S, Willis GM, Frank GR, et al. Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis[J]. J Nutr, 1999, 129(7): 1291-1297.
- [5] Bei H, Bowen R, Cai Q, et al. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1): 124-130.
- [6] 刘红耀, 李晓东, 米振国, 等. N-甲基亚硝基脲的制备及其诱导膀胱肿瘤的作用[J]. 基础医学与临床, 2000, 17(6): 548-549.
- [7] 钱立新, 刘训良, 丁鸿, 等. N-甲基亚硝基脲诱导大鼠膀胱肿瘤作用的动态观察[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(5): 563-564.
- [8] 黄世明, 倪江雯, 魏学武, 等. 膀胱癌的诊断与治疗[J]. 山东医药, 2009, 49(22): 111-112.
- [9] Davis JN, Kucuk O, Sarkar FH. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate Cancer cells [J]. Nutr Cancer, 1999, 35(2): 167-174.
- [10] Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in Cancer[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43(1): 1-67.
- [11] 金永生, 刘超美. 金雀异黄素的药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2002, 17(5): 190-193.
- [12] 刁理强, 张智清, 郭应禄. 抗肿瘤血管再生的临床应用前景[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(12): 727. (下转第 1961 页)

关于 EPO 对脑缺血-再灌注后炎症损伤的抑制作用,尤其是对于诱导炎症反应的关键物质黏附分子的抑制作用,国内外鲜有报道。

本实验通过线栓法制作成年大鼠局灶性脑缺血-再灌注模型,观察 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白在脑缺血-再灌注损伤中的作用,以及 EPO 对此过程的抑制作用。研究结果显示,在大鼠局灶性脑缺血-再灌注 6 h,即有 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的少量表达,不论是阳性细胞数还是表达量都较假手术组有所增加,之后表达量逐渐增多,VCAM-1 的表达高峰出现在再灌注 24~48 h,而 ICAM-1 的表达则在再灌注 12~48 h 一直持续较高,以后表达量有所减少。需要指出的是,内皮细胞无论在未被激活还是被激活后表达的 ICAM-1 均高于 VCAM-1,并且 ICAM-1 在脑损伤后的上调表达要早于 VCAM-1,而其下降又稍晚于 VCAM-1。可见 ICAM-1 相对于 VCAM-1 容易表达且较稳定,也说明前者在脑损伤发生中起主要作用。

EPO 是由肾脏和胚胎肝脏产生的一种能促进红细胞生成的细胞因子,主要用于治疗各种原因所致的贫血。但近年的研究发现,在许多非造血细胞系如肾、心肌、平滑肌和神经原细胞中也存在 EPO 及其受体(erythropoietin receptor, EPOR)基因表达^[3]。动物实验和体外细胞培养已证实,EPO 对脑缺血具有神经保护作用^[4]。本实验于大鼠缺血后 2 h 给予 EPO 腹腔注射,研究结果显示,与模型组相比较,应用 EPO 后,EPO 干预组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的阳性细胞数和蛋白表达量均有所下降。而且需要指出的是,ICAM-1 于用药后 6 h 即开始下降,而 VCAM-1 于用药后 12 h 才开始下降,表明在诱导炎症作用时作用相对较大的 ICAM-1 对 EPO 的反应也相对较 VCAM-1 敏感。由此可见,EPO 可以通过抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达的上调(主要是 ICAM-1),实现对脑缺血-再灌注损伤后炎症损伤的抑制作用。

近几年来,关于 EPO 的神经保护作用研究方兴未艾,其机制除了抗炎作用以外,目前正在研究中的还有抗谷氨酸兴奋毒性^[5]、调节一氧化氮(NO)的合成^[6]、抗氧化作用、抗神经元凋亡^[7-8]、促进血管生成^[9]、促进神经元再生和神经营养作用等。其对脑血管的保护作用正逐渐成为临床和科研的新热点^[10]。尤其是近来的研究发现,脑缺血动物脑内可见 EPO 和 EPOR 表达^[11],外源性 EPO 可通过血脑屏障进入脑内^[12],为 EPO 的临床应用垫定了理论基础。因此,EPO 在脑缺血-再灌注损伤的应用方面有广阔的临床应用前景。

参考文献:

[1] O'Sullivan JB, Ryan KM, Harkin A, et al. Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-

10 and RANTES and cell adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 220(1/2):34-42.

[2] Li Y, Lu ZY, Keogh CL, et al. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(5):1043-1054.

[3] Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: A manifold task[J]. *Physiology*, 2008, 23:263-274.

[4] Liu R, Suzuki A, Guo Z, et al. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion in jury in vitro[J]. *J Neurochem*, 2006, 96(4):1101-1110.

[5] 侯红梅,董文斌.促红细胞生成素与脑保护[J]. *国外医学.神经病学神经外科学分册*, 2004, 31(5):494-497.

[6] Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 Suppl 1:37-44.

[7] Wiese L, Hempel C, Penkowa M, et al. Recombinant human erythropoietin increases survival and reduces neuronal apoptosis in a murine model of cerebral malaria [J]. *Malar J*, 2008, 7(2):3-11.

[8] Liao ZB, Jiang GY, Tang ZH, et al. Erythropoietin can promote survival of cerebral cells by downregulating Bax gene after traumatic brain injury in rats[J]. *Neurol India*, 2009, 57(6):722-728.

[9] Kato S, Amano H, Ito Y, et al. Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112(2):167-175.

[10] Sharples EJ, Christoph T, Yaqoob MM. Novel applications of recombinant erythropoietin[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(2):184-189.

[11] Kilic E, Kilic U, Soliz J, et al. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways [J]. *FASEB J*, 2005, 19(14):2026-2028.

[12] Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence [J]. *Clin Breast Cancer*, 2002, 3 Suppl 3:S109-115.

(收稿日期:2011-09-19 修回日期:2012-02-06)

(上接第 1958 页)

Wang Y, Raffoul JJ, Che M, et al. Prostate Cancer treatment is enhanced by genistein in vitro and in vivo in a syngeneic orthotopic tumor model[J]. *Radiat Res*, 2006, 166(1 Pt 1):73-80.

[14] Oki T, Sowa Y, Hirose T, et al. Genistein induces Gadd45 gene and G2/M cell cycle arrest in the DU145 human prostate Cancer cell line[J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1/2):

55-59.

[15] Zhao JH, Arao Y, Sun SJ, et al. Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat[J]. *Life Sci*, 2006, 78(8):812-819.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-01-06)