

大豆异黄酮对小鼠肝癌移植瘤血管生成的抑制作用

郑 峰,崔香丹,朱洁波,尹学哲

(延边大学附属医院,吉林 延吉 133000)

摘 要:为了探讨大豆异黄酮对肝癌移植瘤血管生成的抑制作用,建立小鼠 H₂₂肝癌皮下移植瘤模型。用大豆异黄酮干预 10 d,利用免疫组化染色法检测肿瘤组织内微血管密度,利用免疫印迹法检测肿瘤组织内血管内皮细胞生长因子(VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和基质金属蛋白酶 2(MMP2)的水平。结果显示,大豆异黄酮组移植瘤细胞生长受到抑制,细胞坏死较严重。与模型组比较,大豆异黄酮组肿瘤组织内微血管密度降低;VEGF、VEGFR2 和 HIF1 α 的蛋白表达降低;TGF- β 1 及 MMP2 蛋白表达下降。提示,大豆异黄酮对小鼠 H₂₂移植瘤组织的血管生成具有抑制作用,机制可能与下调移植瘤组织 VEGF 和 TGF- β 1 蛋白表达有关。

关键词:大豆异黄酮;H₂₂;抗血管生成

中图分类号:S565. 1;R285. 5 文献标识码:A DOI:10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2018. 01. 0101

Anti-angiogenic Effect of Soy Isoflavones in H₂₂-transplanted Mice

ZHENG Feng, CUI Xiang-dan, ZHU Jie-bo, YIN Xue-zhe

(Yanbian University Hospital, Yanji 133002, China)

Abstract: The anti-angiogenic effect of soy isoflavones in hepatoma-transplanted mice was investigated. Mice bearing H₂₂ hepatoma cells were established and treated with soy isoflavones for 10 days. The microvessel density was detected using immunohistochemical staining, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor2 (VEGFR2) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) was detected by the western blot method, and the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and matrix metalloproteinase2 (MMP2) were analyzed with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Soy isoflavones decreased the microvessel density of tumor tissue, and down-regulated the protein expression of VEGF, VEGFR-2, HIF-1 α , TGF- β 1 and MMP2 in transplanted tumor tissue. Taken together, soy isoflavones could exhibit the anti-angiogenic effect in H₂₂-transplanted mice, and its mechanism is probably related to down-regulation of VEGF and TGF- β 1 proteins.

Keywords: Soy isoflavones; H₂₂; Anti-angiogenic

抑制肿瘤血管生成对肿瘤的治疗具有重要意义。当肿瘤长到一定程度时,由新生血管提供肿瘤生长所需的营养物质;同时由于肿瘤组织新生血管壁薄、基膜不完整,导致肿瘤细胞易透入到血管内^[1]。因此,肿瘤血管生成既是肿瘤无限生长的基础,也为肿瘤细胞浸润与远处转移创造条件^[1-3]。如何抑制肿瘤血管生成已是当前肿瘤治疗的热点之一。微血管密度是反映肿瘤血管生成活跃程度的指标,可利用 FⅧ因子、CD34、CD31 等特异抗体标记血管内皮细胞来测定^[1]。微血管密度在临床

实践中也可作为肿瘤治疗的预后指标,对肿瘤生长以及转移可能性的预测有一定的指导作用^[2]。肿瘤血管生成是由血管生成的刺激因子和抑制因子共同调控的复杂过程^[3]。其中,血管内皮细胞生长因子(VEGF)是目前发现最强和最关键的促血管生成因子,而 VEGFR2 是 VEGF 发挥血管生成作用的主要受体,二者结合可促进血管内皮细胞增殖,诱导新生血管形成,在肿瘤血管生成过程中发挥核心作用^[4]。其上游缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)则可通过多种途径上调下游靶蛋白 VEGF 表达,进而诱导

收稿日期:2017-10-02
基金项目:国家自然科学基金(81360651;81760659)。
第一作者简介:郑峰(1986 -),男,博士,主要从事分子肿瘤学研究。E-mail:zhengfeng008@126.com。
通讯作者:尹学哲(1962 -),男,博士,教授,主要从事分子肿瘤学研究。E-mail:yinxz@ybu.edu.cn。

肿瘤新生血管的形成^[2-5]。转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)是细胞增殖的重要调控因子,通过刺激血管生成和合成细胞外基质来提供适宜肿瘤生长及侵袭转移的微环境^[6]。在血管生成过程中 TGF- $\beta 1$ 及其下游 MMP2 上调是其重要的特征^[7]。大豆异黄酮是大豆胚轴的重要生物活性成分,近年来研究发现它可以诱导多种肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和抑制肿瘤血管生成^[8-10]。但其作用机制有待进一步探讨。本课题组新近研究表明,大豆异黄酮对小鼠肝癌移植瘤有明显抑瘤作用,显著增加肿瘤组织内坏死区面积^[9-10],这也许与移植瘤组织内新生血管数量少、营养供应不足有关。提示,大豆异黄酮可能通过减少移植瘤组织内新生血管密度而发挥其抑瘤作用。为了验证这个假设,本试验用小鼠 H₂₂肝癌细胞建立小鼠肝癌移植瘤模型,观察大豆异黄酮对肝癌移植瘤微血管密度以及血管生成相关因子水平的影响,探讨大豆异黄酮抗肿瘤新生血管生成作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆异黄酮(纯度 $\geq 80\%$)购自华北制药集团有限责任公司,主要成分及含量如下:大豆苷 45.9%;黄豆苷 1.0%;染料木苷 13.4%;大豆苷元 0.96%;黄豆苷元 0.05%;染料木素 0.02%。小鼠 H₂₂肝癌细胞由延边大学医学院韩春姬教授惠赠。5-氟尿嘧啶(5-Fu)购自上海旭东海普药业有限公司;兔 CD34 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;兔 VEGF 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;小鼠 HIF-1 α 抗体购自美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠以及绵羊抗兔 IgG 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;小鼠基质金属蛋白酶 2 (MMP2)ELISA 试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司;小鼠 TGF- $\beta 1$ ELISA 试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 建立 H₂₂小鼠肝癌移植瘤模型及分组处理

将 H₂₂细胞在小鼠腹腔内传代,取第 2 代腹水,将细胞密度调至 1×10^7 个 \cdot mL⁻¹,将 0.2 mL 的细胞悬液接种到小鼠右窝皮下^[11]。第 2 天将 30 只荷瘤小

鼠随机分为模型组、大豆异黄酮组 (ISOF 组)和 5-Fu 组 (阳性对照组),每组 10 只。大豆异黄酮组小鼠按 200 mg \cdot kg⁻¹剂量连续灌胃 10 次,每日 1 次;5-Fu 组小鼠按 25 mg \cdot kg⁻¹剂量腹腔注射 5 次,隔日 1 次;模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,每日 1 次。末次给药 16 h 后处死动物,取出移植瘤组织。取部分瘤体进行固定、石蜡包埋和切片。剩余部分保存于 -80℃ 以备用。

1.2.2 免疫组化染色法检测移植瘤组织微血管密度 采用免疫组化染色法检测移植瘤组织 CD34 阳性表达,CD34 表达于血管内皮细胞膜和胞浆,呈棕黄色为阳性结果^[11-12]。移植瘤组织微血管密度按 Weidner^[12]方法测定,在低倍镜下观察微血管密集区,在高倍镜下计微血管数目^[11-12]。

1.2.3 免疫印迹法检测移植瘤组织 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 的蛋白表达 将肿瘤组织裂解并提取总蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭和一抗、二抗孵育。ECL 显色后采集图像并进行灰度比值分析^[11]。

1.2.4 ELISA 法检测移植瘤组织 TGF- $\beta 1$ 和 MMP2 蛋白水平 按 ELISA 试剂盒说明书进行所有操作,在酶标仪上测定 450 nm 处吸光度,并计算蛋白含量。

1.3 数据分析

数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 20.0 统计软件进行数据比较,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 移植瘤组织微血管密度检测结果

CD34 阳性颗粒主要定位于血管内皮细胞膜及细胞质。如图 1 所示,模型组小鼠移植瘤组织微血管增生明显,移植瘤组织内可见形态不规则且无明显管腔的新生血管,血管分布以移植瘤组织的边缘处为多见。而与模型组比较,大豆异黄酮组和 5-Fu 组移植瘤组织边缘处微血管密度显著减小(图 2, $P < 0.05$)。与 5-Fu 组比较,大豆异黄酮组小鼠移植瘤组织微血管数量呈增高趋势,但染色却呈下降趋势。考虑到用药剂量和次数的差异,大豆异黄酮的抗血管生成作用可能较弱于 5-Fu。

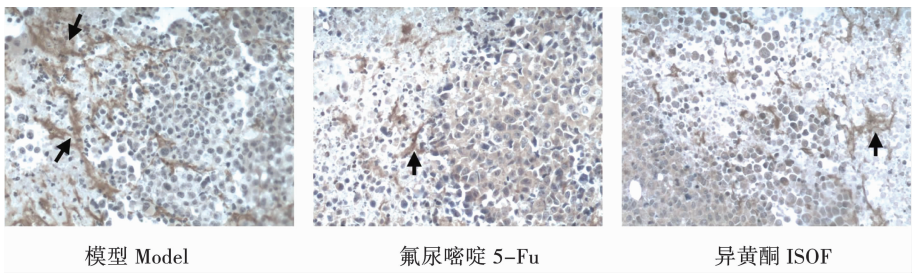


图 1 移植瘤组织 CD34 免疫组化染色结果 (× 100)

Fig. 1 Immunohistochemical observation of CD34 in transplanted tumor tissue (× 100)

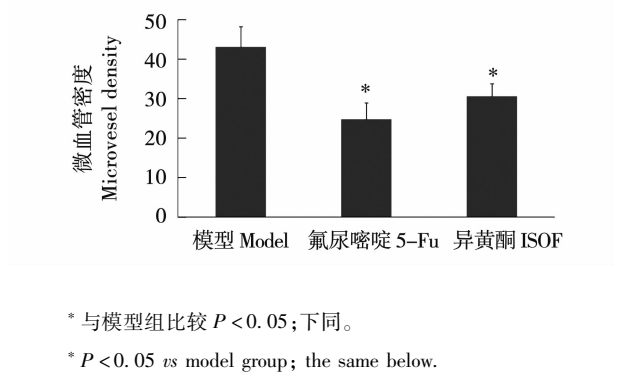


图 2 移植瘤组织内微血管密度检测结果

Fig. 2 Microvessel density of transplanted tumor tissue

2.2 移植瘤组织 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 蛋白的表达

如图 3 所示,移植瘤组织中均有血管生成刺激因子 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 蛋白大量表达;与模型组比较,大豆异黄酮组和 5-Fu 组小鼠移植瘤组织 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$);这与移植瘤组织微血管密度检测结果相吻合。与 5-Fu 组比较,大豆异黄酮组移植瘤组织 HIF-1 α 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),且 VEGF 蛋白表达也呈上升趋势,提示,大豆异黄酮抗肿瘤血管生成作用弱于 5-Fu。

2.3 移植瘤组织 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白的表达

为了进一步明确大豆异黄酮抗肿瘤血管生成作用机制,本实验检测肿瘤组织中 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白的表达情况。如图 4 所示,移植瘤组织中 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白也大量表达;与模型组比较,大豆异黄酮组和 5-Fu 组小鼠移植瘤组织 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),提示其机制可能与下调 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白表达有关。与 5-Fu 组比较,大豆异黄酮组小鼠移植瘤组织 TGF- β 1 蛋白表达基本相同,MMP2 蛋白表达却呈增高趋势,总体趋势与 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达一致,但差异均无统计学意义。

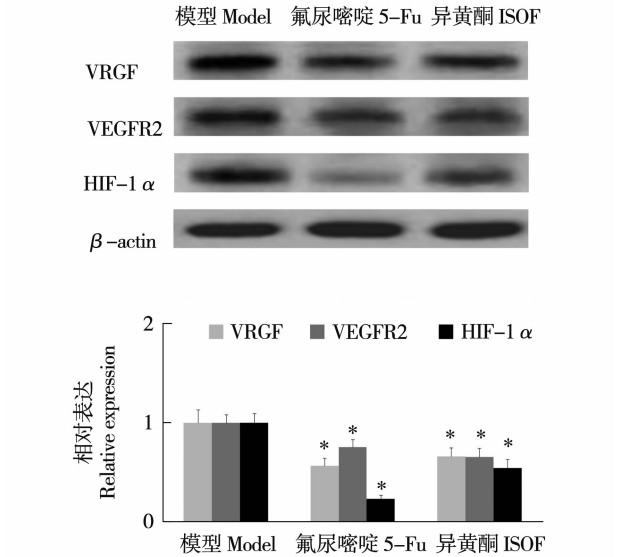


图 3 移植瘤组织 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of VEGF, VEGFR2 and HIF-1 α proteins in transplanted tumor tissue

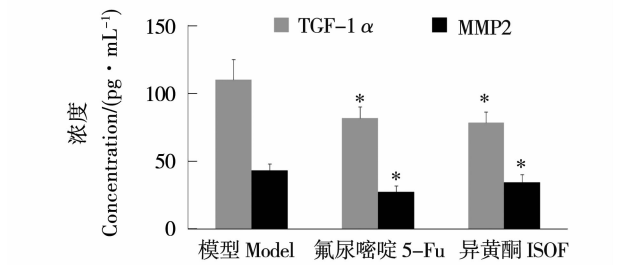


图 4 移植瘤组织 TGF- β 1 和 MMP2 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of TGF- β 1 and MMP2 proteins in transplanted tumor tissue

3 讨论

小鼠 H₂₂肝癌移植瘤模型肿瘤生长稳定,是筛选抗肿瘤新药的理想模型^[9]。本试验利用小鼠肝癌移植瘤模型观察大豆异黄酮对肿瘤新生血管生成的抑制作用。肿瘤新生血管生成是肿瘤细胞无限生长及侵袭、远处转移的必备条件,目前抑制肿瘤新生血管生成已成为肿瘤治疗的一种新策

略^[1-3]。微血管密度是反映肿瘤组织血管新生能力的重要指标,常用于衡量抗肿瘤药物的抗血管生成能力^[11-12]。本研究以 CD34 特异抗体标记肿瘤组织血管内皮细胞。结果显示,大豆异黄酮可降低移植瘤组织的微血管密度,抑制肿瘤新生血管形成,并下调移植瘤组织 VEGF、VEGFR2 和 HIF-1 α 的蛋白表达,下调 TGF- β 1 及 MMP2 蛋白表达。提示,大豆异黄酮可能是通过下调 HIF-1 α 蛋白表达使其下游 VEGF 蛋白表达下降,从而抑制血管内皮细胞增殖;同时,HIF-1 α 及 VEGF 蛋白水平的下降又使 VEGFR2 表达得到负反馈调节而降低,更加抑制血管内皮细胞增殖,最终阻碍肿瘤组织新生血管形成。HIF-1 α 可能参与了大豆异黄酮对 VEGF 表达的调控,尤其在肿瘤周围低氧条件时阻碍了 VEGF 持续表达。同时,大豆异黄酮可通过 TGF- β 1/MMP2 途径抑制肿瘤新生血管形成,同时还可影响肿瘤细胞和周围间质细胞对细胞外基质的合成而发挥抗血管生成的作用。本课题组前期研究中发现大豆异黄酮降低移植瘤组织坏死区面积,这可能与大豆异黄酮减少肿瘤组织新生血管密度,导致肿瘤组织营养供应不足有关,与本研究结果也相吻合^[9]。综上所述,大豆异黄酮的抑瘤作用可能在一定程度上与抑制肿瘤新生血管生成有关。肿瘤血管新生是一个复杂过程,而大豆异黄酮抑制肿瘤血管新生的具体机制仍不十分清楚,血管生长刺激因子和血管生成抑制因子如何共同调控肿瘤血管生成尚需进一步研究。但作为一种天然无毒的生物活性物质,大豆异黄酮将为肿瘤的治疗提供一个新的可能性。

4 结 论

大豆异黄酮抑制小鼠 H₂₂ 移植瘤的血管生成,其抑瘤作用在一定程度上可能与其抗肿瘤血管生成能力有关。大豆异黄酮抑制肿瘤血管生成机制可能与其下调肿瘤组织 VEGF 和 TGF- β 1 蛋白表达有关。

参考文献

[1] 河福金,王健,牛建昭,等. 大豆异黄酮抑制裸鼠移植瘤生长及其血管生成的实验研究[J]. 中国药理学通报,2003,19(1):73-76. (He F J, Wang J, Niu J Z, et al. Experimental study on growth inhibition and angiogenesis in transplanted tumor caused by genistein *in vivo*[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19(1):73-76.)

[2] 张云峰. 多硫酸化磷酸甘露寡糖的制备及其抗肿瘤血管生成作用的研究[D]. 济南:山东大学,2009. (Zhang Y F. Study on the preparation of polysulfated phosphomanno-oligosaccharides and

its anti-angiogenic effect [D]. Jinan: Shandong University, 2009.)

[3] 康欣梅,王慧,王丽,等. 大豆苷元对乳腺癌生长和血管生成的影响[J]. 癌变·畸变·突变,2015,27(1):16-20. (Kang X M, Wang H, Wang L, et al. Effect of daidzein on the growth and angiogenesis of breast carcinoma [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2015, 27(1):16-20.)

[4] 田刚,李华,史有才,等. 大豆异黄酮对大鼠脑胶质瘤血管生成的影响[J]. 中药药理与临床,2009,25(6):52-53. (Tian G, Li H, Shi Y C, et al. The effect of soybean isoflavones on angiogenesis of neurospongioma in rat [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2009, 25(6):52-53.)

[5] 隋文文,张维东,武利存,等. 蝎毒多肽促进 5-氟尿嘧啶抑制 H₂₂ 肝癌血管生成的作用机制研究[J]. 中草药,2014,45(3):392-397. (Sui W W, Zhang W D, Wu L C, et al. Inhibitory mechanism of polypeptide from scorpion venom combined with 5-fluorouracil on angiogenesis of H₂₂ hepatoma [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(3):392-397.)

[6] 李黎,沈波,陈海彬,等. 消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠外周血清转化生长因子 β 1 的影响[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(11):2283-2284. (Li L, Shen B, Chen H B, et al. Effects of Xiaocai Jiedu prescription on serum transforming growth factor- β 1 in H₂₂-bearing mice [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 38(11):2283-2284.)

[7] Pavese J M, Farmer R L, Bergan R C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein [J]. Cancer and metastasis reviews, 2010, 29(3):465-82.

[8] 邢扬帆,刘旭杰,王智彪,等. 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[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(12):1686-1691. (Xing Y F, Liu X J, Wang Z H, et al. Genistein's anti-angiogenic effect on MKN45 gastric cancer cells and its subcutaneous xeno-transplanted tumors [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2014, 39(12):1686-1691.)

[9] 郑峰,金延华,何鑫,等. 大豆异黄酮和皂甙对 H₂₂ 小鼠肝癌移植瘤的生长抑制及促细胞凋亡作用[J]. 大豆科学,2016,25(3):494-497. (Zheng F, Jin Y H, He X, et al. Anti-tumor and pro-apoptotic effects of soy isoflavones and saponins in H₂₂-bearing mice [J]. Soybean Science, 2016, 25(3):494-497.)

[10] 尹学哲,赵文玺,金爱花,等. 大豆异黄酮对长春瑞滨化疗兔鳞癌的干预作用[J]. 食品科学,2013,34(15):236-239. (Yin X Z, Zhao W X, Jin A H, et al. Effects of soybean isoflavones combined with vinorelbine on transplanted squamous cell carcinomas in rabbits [J]. Food Science, 2013, 34(15):236-239.)

[11] 尹学哲,朴龙,金爱花,等. 草苈蓉提取物对小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤血管生成的抑制作用[J]. 食品研究与开发,2016,37(14):1-3. (Yin X Z, Piao L, Jin A H, et al. Anti-angiogenic effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* in H₂₂-bearing mice [J]. Food Research and Development, 2016, 37(14):1-3.)

[12] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density with breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 1995, 36(2):169-180.