

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00359

Genistein 对受辐射 L-02 人肝细胞增殖和 DNA 损伤的影响

类春燕¹, 沈秀华², 张乃宁¹, 丛峰松³, 马俐君^{4*}, 宋立华^{1,5*}

1. 上海交通大学农业与生物学院食品科学与工程系, 上海 200240
2. 上海交通大学医学院营养系, 上海 200025
3. 上海交通大学生命科学技术学院实验教学中心, 上海 200240
4. 上海交通大学医学院附属仁济医院长宁分院肿瘤科, 上海 200050
5. 上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240

[摘要] **目的** 探讨金雀异黄素(genistein, GEN)对 L-02 人肝细胞 DNA 辐射损伤的防护作用。**方法** (1)L-02 细胞经不同浓度(1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) GEN 预处理 24 h 后,接受不同剂量(6、8、12、16、20 Gy) X 线照射,利用 MTT 法检测细胞增殖情况。(2)L-02 细胞经不同浓度 GEN 预处理后接受 8 Gy (300 cGy/min) X 线照射,利用单细胞凝胶电泳检测照射后不同时间(24、48、72 h)细胞 DNA 损伤情况。另设正常对照(N)、单纯 GEN 处理(G)及单纯照射(R)组作为参照。**结果** (1)当照射剂量为 6、8 及 12 Gy 时,5 $\mu\text{mol/L}$ GEN 预处理组细胞增殖率显著高于 R 组($P < 0.05$),而照射剂量为 16 Gy 和 20 Gy 时,各浓度 GEN 预处理组细胞增殖率与 R 组相比未见明显升高。(2)DNA 损伤检测结果显示,N 组和不接受照射的各浓度 G 组细胞均未见彗星拖尾。经 8 Gy X 线照射后 24 h, R 组及各浓度 GEN 预处理组彗星出现率均小于 1%,各组间彗星尾长差异无统计学意义;照后 48 h, R 组彗星出现率达(24.2 \pm 1.2)%,彗星尾长达(283.6 \pm 22.3) μm ,而各浓度 GEN 预处理组的彗星出现率和彗星尾长均较 R 组明显降低($P < 0.05$);照后 72 h, R 组彗星出现率较 48 h 明显下降($P < 0.05$)、彗星尾长明显缩短($P < 0.05$),1、5 $\mu\text{mol/L}$ GEN 预处理组彗星出现率和彗星尾长仍明显低于 R 组($P < 0.05$),但 10、20 $\mu\text{mol/L}$ GEN 预处理组彗星出现率则明显升高($P < 0.05$),彗星尾长明显增长($P < 0.05$)。**结论** 低浓度(1、5 $\mu\text{mol/L}$) GEN 能有效减轻较低剂量(8 Gy)照射对 L-02 人肝细胞的 DNA 辐射损伤。

[关键词] 金雀异黄素;肝细胞;X 线;辐射损伤;DNA 损伤

[中图分类号] R 818.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0359-05

Effects of genistein on proliferation and DNA damage of irradiated human liver L-02 cells

LEI Chun-yan¹, SHEN Xiu-hua², ZHANG Nai-ning¹, CONG Feng-song³, MA Li-jun^{4*}, SONG Li-hua^{1,5*}

1. Department of Food Science and Engineering, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
2. Department of Nutrition, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China
3. Experimental Teaching Center, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
4. Department of Oncology, Changning Branch, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200050, China
5. Bor S. Luh Food Safety Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective** To investigate the radioprotective effects of genistein (GEN) against radiation-induced DNA damage in human liver cell line L-02. **Methods** (1)L-02 cells were treated with different concentrations of GEN (1, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, and then irradiated with X-ray at the doses of 6, 8, 12, 16, and 20 Gy. Forty-eight hours after irradiation, MTT method was applied to examine the proliferation of L-02 cells. (2)L-02 cells were treated with different concentrations of GEN (1, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, and then irradiated with X-ray at the doses of 8 Gy (300 cGy/min). Single cell gel electrophoresis was used to determine the DNA damage after radiation. **Results** (1)After irradiation with 6, 8 and 12 Gy of

[收稿日期] 2011-10-31 **[接受日期]** 2012-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30972460),上海市自然科学基金(09ZR1415400). Supported by National Natural Science Foundation of China (30972460) and Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1415400).

[作者简介] 类春燕, 硕士. E-mail: leichunyan1987@126.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-62524259-3506, E-mail: ljma5@yahoo.com; Tel: 021-34205717, E-mail: yslihua@hotmail.com

X-ray, the cell proliferation rate of 5 $\mu\text{mol/L}$ GEN-pretreated group was significantly increased compared to radiation alone (R) group ($P < 0.05$). But no significant increase was observed in GEN-pretreated groups irradiated with 16 Gy and 20 Gy of X-ray compared with R group. (2) As for the DNA damage, no comet cells were detected in normal control group or all GEN-treated groups without irradiation. After irradiation with 8 Gy of X-ray for 24 h, comet incidences were less than 1% in all GNE-pretreated groups and R group, and comet tail length showed no significant difference between different groups. At 48 h after irradiation, the comet incidence of R group was $(24.2 \pm 1.2)\%$ and the comet tail length was $(283.6 \pm 22.3) \mu\text{m}$, while both comet incidence and tail length of GEN-pretreated groups were significantly lower than those of R group ($P < 0.05$). The comet incidence and tail length of R group were significantly decreased 72 h after irradiation compared with 48 h after irradiation ($P < 0.05$), and those in 1 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$ GEN-pretreated groups were still significantly lower than those of R group ($P < 0.05$), but the comet incidence and tail length of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ GEN-pretreated groups were significantly increased compared to those of R group ($P < 0.05$). **Conclusion** Low concentration of GEN (1 and 5 $\mu\text{mol/L}$) can effectively protect the human liver cells L-02 against X-ray (8 Gy)-induced DNA damage.

[Key words] genistein; hepatocytes; X-rays; radiation injuries; DNA damage

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 359-363]

放疗是针对肿瘤的重要治疗手段之一,但其在杀伤肿瘤细胞的同时,也对肿瘤组织周围邻近的正常组织细胞造成一定的损伤。长期以来,如何减轻放疗对正常组织细胞的辐射损伤一直是临床上有待解决的问题之一。目前,辐射防护剂如半胱胺、胱胺和 WR2721 等由于有效防护期短、口服效果差及毒副作用大等因素限制了其在临床上的应用^[1]。食物中具有抗氧化功能的活性成分毒性较低,因此,其在抗辐射方面的应用逐渐受到重视^[2-4]。金雀异黄酮(genistein, GEN), 又称 5,7,4'-三羟基异黄酮,是大豆异黄酮的主要生物活性成分之一。近年来体内及体外实验研究表明,GEN 具有抗氧化、抗菌、雌激素样等多种生物学活性^[5-7],并且已有研究表明其对辐射造成的肺脏等损伤具有防护作用^[8-10],我们的前期动物实验也表明大豆异黄酮具有较强的抗氧化活性,能显著减轻受辐射小鼠的肝脏损伤^[11-12],但机制尚不清楚。因此,本实验选用 L-02 人肝细胞作为靶细胞,研究不同浓度 GEN 对辐射造成的肝细胞 DNA 损伤的防护效果,并确定其辐射防护的有效浓度,为后续研究 GEN 的抗辐射分子机制提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂与仪器 L-02 细胞株(人正常永生化肝细胞,中国科学院上海细胞库),RPMI 1640 培养液、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、DMSO(上海索宝生物科技有限公司),GEN(美国 Sigma 公司,纯度 98%),MTT 试剂盒、单细胞凝胶电泳试剂盒(南京凯基科技发展有限公司)。二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司),Olympus-B701 光学显微镜(日本

Olympus 公司),Varian 2100 C/D 直线加速器(美国 Varian 公司),Model-550 型酶标仪、水平电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 细胞培养及条件 L-02 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 5%CO₂、37℃条件下培养。将 GEN 溶解于 DMSO 制备成 0.1 mol/L 储备液,使用前用培养液稀释成所需的终浓度(DMSO 浓度 $\leq 0.04\%$)。

1.3 GEN 对受辐射 L-02 细胞增殖的影响 实验分为正常对照(N)组、单纯 GEN 处理(G)组、单纯照射(R)组及 GEN 预处理+照射(G+R)组。N 组细胞培养液中仅含 0.02%DMSO;G 组分别加入 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ GEN;G+R 组先用不同浓度 GEN(同 G 组)处理 24 h 后,采用 X 线(6 MV)照射,剂量分别为 6、8、12、16、20 Gy,剂量率为 300 cGy/min,源皮距 100 cm;R 组不加 GEN,照射方法和剂量同 G+R 组。采用 MTT 法检测细胞增殖情况:将 L-02 细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 10^4 个/孔,体积为 100 μl 。培养 6 h,待细胞贴壁后弃去旧培养液,每孔加入 100 μl 含各浓度受试物的培养液。每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后细胞接受不同剂量 X 线照射;继续培养 48 h 后更换不含受试物的新鲜培养液 90 μl /孔,并加入 MTT 10 μl /孔,继续孵育;4 h 后终止培养,每孔加入 110 μl DMSO,振荡 10 min,用 Model-550 型酶标仪于 490 nm 波长处测各孔光密度(D)值。实验在相同条件下重复 3 次。细胞增殖率(proliferation rate, PR)计算公式:PR(%)=(实验组光密度值/正常对照组光密度值)×100%。

1.4 GEN 对受辐射 L-02 细胞 DNA 损伤的影响 实验分组方法基本同 1.3 所述,仅照射剂量限

定为 8 Gy。采用单细胞凝胶电泳 (SCGE) 技术进行检测; L-02 细胞接受 8 Gy X 线照射后, 继续用不同浓度 GEN 培养, 分别于照射后 24、48、72 h 收集细胞, 用 PBS 重悬使其密度为 1×10^6 个/ml。1% 低熔点琼脂糖 (LMA) 在 70°C 水浴溶解后放入 37°C 水浴恒温箱内备用。将 100 μ l LMA 与 30 μ l 细胞悬液混匀, 取 70 μ l 混合液均匀铺于 24 孔板盖上。4°C 放置 15 min。将胶板置于平皿中, 倒入预冷的裂解缓冲液 (使用前每 9 ml 加入 1 ml DMSO), 4°C 裂解 2 h, 取出胶板用 PBS 漂洗。裂解后将胶板置于水平电泳槽内, 倒入新配制的碱性电泳缓冲液 (1 mmol/L EDTA, 300 mmol/L NaOH), 覆过胶面约 0.25 cm 左右, 室温放置 30 min, 使 DNA 双链充分解开, 电泳 30 min (电压 25 V)。电泳后将载玻片置于平皿内, 加入 0.4 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 使胶板没入, 4°C 中和 3 次, 每次 10 min。弃去 Tris-HCl 缓冲液, 每载玻片加 20 μ l PI 染液, 避光染色 10 min。

在荧光显微镜下, 观察 SCGE 图像 (放大 200 倍), 每组计数 300~400 个细胞, 计算细胞拖尾率。每组随机观察 30 个细胞, 采集图像, 计算尾长 (即彗星细胞核中心至彗星尾前端的距离^[13])。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异行方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 不同浓度 GEN 对 X 线照射前 L-02 细胞增殖的影响 如图 1 所示, 与 N 组相比, 1、5、10 μ mol/L

GEN 处理组 L-02 细胞增殖呈增加趋势, 其中 5 μ mol/L 组与 N 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 20 μ mol/L GEN 处理组细胞呈增殖减少趋势。

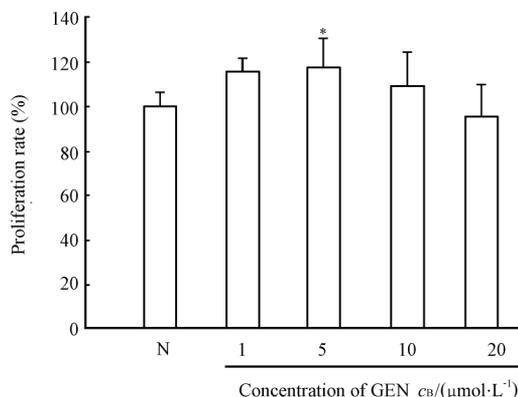


图 1 不同浓度 GEN 对 L-02 细胞增殖的影响

Fig 1 Concentration effects of genistein (GEN) on proliferation of L-02 cells

* $P < 0.05$ vs normal control (N) group; $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

2.2 不同浓度 GEN 对 X 线照射后 L-02 细胞增殖的影响 如图 2 所示, L-02 细胞接受 6、8 Gy X 线照射后 48 h, 1 μ mol/L 和 5 μ mol/L GEN 预处理组细胞增殖率明显高于 R 组 ($P < 0.05$); 照射剂量为 12 Gy 时, 5 μ mol/L GEN 仍显示出较好的保护效果, 细胞增殖率明显高于 R 组 ($P < 0.05$), 而高浓度 (10、20 μ mol/L) GEN 预处理组细胞增殖率与 R 组比较差异无统计学意义; 当照射剂量 ≥ 16 Gy 时, 与 R 组相比, 各 GEN 预处理组细胞增殖率均未见明显升高。

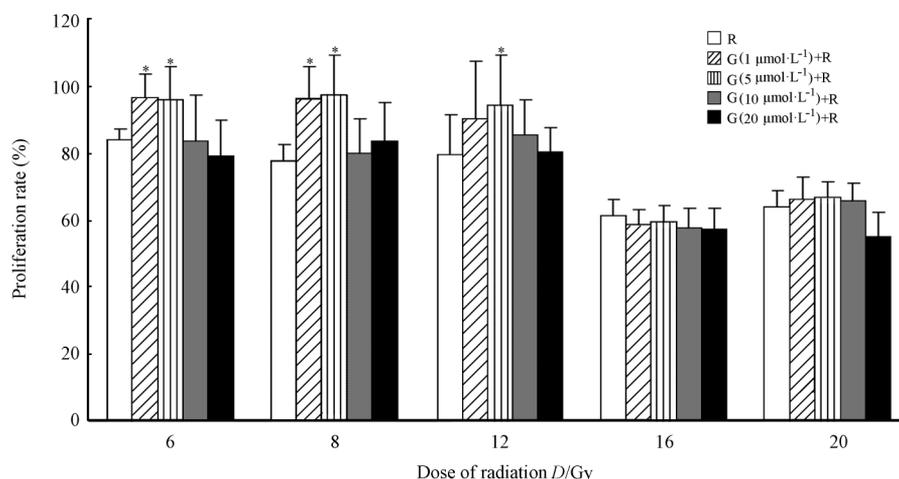


图 2 GEN 对不同剂量 X 线照射后 L-02 细胞增殖的影响

Fig 2 Effects of genistein on proliferation of L-02 cells after radiation with different doses of X-ray

R: Radiation alone; G: Genistein. * $P < 0.05$ vs R group at the same dose of radiation; $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

2.3 GEN对X线照射后L-02细胞DNA断裂损伤的影响 SCGE检测结果显示,照射处理组可见彗星拖尾,而未接受照射的N组及各浓度G组细胞在24、48及72h时均未见彗星拖尾(图3A)。如表1所示,经8 Gy X线照射后24h,R组及各浓度GEN预处理组细胞彗星出现率均小于1%;照后48h,R组彗星出现率达到(24.2±1.2)%,而各浓度GEN预处理组彗星出现率均明显低于R组($P<0.05$);照后72h,R组彗星出现率较48h显著下降($P<0.05$),低浓度(1、5 μmol/L) GEN预处理组彗星出现率较R组明显下降($P<0.05$),而高浓度(10、20 μmol/L)预处理组却较R组明显升高($P<$

0.05),且显著高于照射后48h的水平($P<0.05$)。

如图3B所示,细胞经8 Gy X线照射后24h,各实验组彗星尾长差异无统计学意义;照后48h,R组彗星尾长达(283.6±22.3) μm,1、5、10、20 μmol/L处理组彗星尾长均明显短于R组($P<0.05$),缩短率分别为58.2%、65.3%、69.5%和69.6%;照后72h,R组彗星尾长较48h明显缩短($P<0.05$),缩短率为41.1%,此时1、5 μmol/L G+R组彗星尾长仍明显短于R组($P<0.05$),缩短率分别为18.1%和9.3%,而10、20 μmol/L G+R组尾长较R组明显增长($P<0.05$),增长率分别为14.3%和18.5%,但低于R组照射后48h的尾长($P<0.05$)。

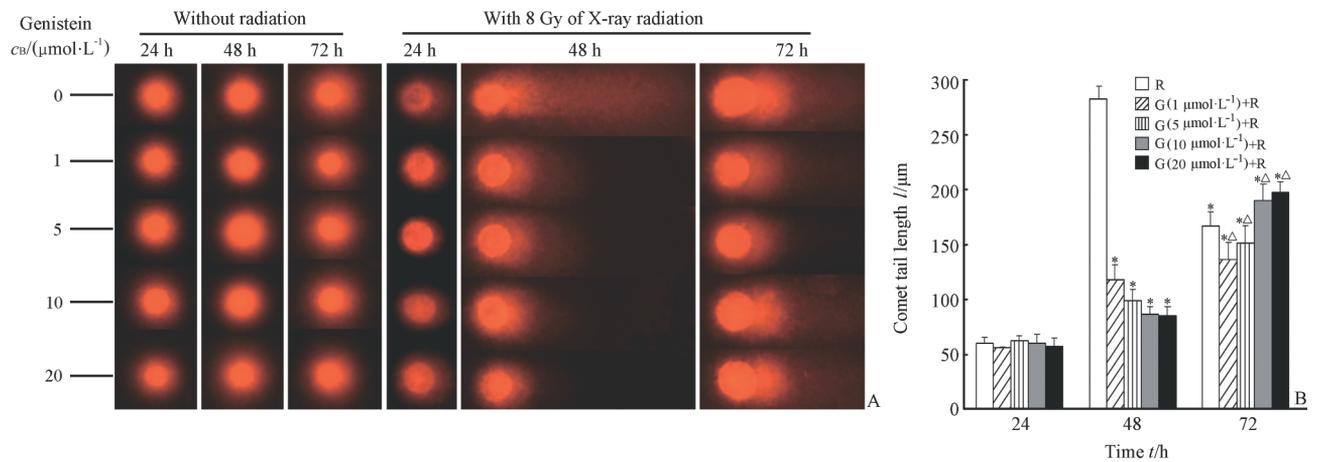


图3 GEN对X线照射后L-02细胞DNA损伤的影响

Fig 3 Effects of genistein on X-ray-induced DNA damage as determined by the single cell gel electrophoresis assay

A: The DNA fragmentation (comet tail) was observed under fluorescence microscope. Original magnification: ×200. B: The tail of the comet was measured in each cell under microscope and expressed in μm as a mean±SD from at least 30 cells in each treatment group. R: Radiation alone; G: Genistein. * $P<0.05$ vs R group at 48 h; Δ $P<0.05$ vs R group at 72 h

表1 GEN对X线照射后L-02细胞彗星出现率的影响

Tab 1 Effects of genistein (GEN) on X-ray-induced comet incidence of L-02 cells

Time after radiation <i>t</i> /h	Concentration of GEN $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$				
	0	1	5	10	20
24	<1	<1	<1	<1	<1
48	24.2±1.2	5.3±1.3*	7.1±1.4*	7.8±1.2*	7.8±0.7*
72	12.2±1.5Δ	8.5±1.2*	8.7±1.1*	16.4±0.8*Δ	33.4±4.6*Δ

* $P<0.05$ vs R (0 μmol/L GEN) group at the same radiation time; Δ $P<0.05$ vs 48 h at the same concentration

3 讨论

本研究采用细胞增殖实验探讨GEN对人肝细胞的辐射防护作用。实验结果显示,GEN对未经照射的L-02细胞增殖呈双向作用,即在低浓度时表现为促增殖作用,当浓度超过一定范围时则产生增殖抑制作用,这一现象与以往报道一致^[14]。本实验中

L-02细胞经6、8 Gy射线照射后继续培养48h,1、5 μmol/L GEN预处理组细胞增殖率明显高于单纯照射组($P<0.05$),与正常对照组(100%)接近;当GEN浓度≥16 μmol/L时,细胞增殖率低于低浓度组,与单纯照射组接近,提示GEN的抗辐射活性与其浓度有关。另一方面,经较大剂量(16、20 Gy)照射后,各浓度GEN预处理组及单纯照射组之间细胞

增殖率差异均无统计学意义,但均较低剂量照射时明显降低,提示 GEN 对大剂量的辐射防护效果尚不理想。因此,本研究后续实验选择 8 Gy 的照射剂量,采用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术观察 GEN 对 DNA 辐射损伤的保护效果。

SCGE 又称彗星试验(comet assay),是一种简便、快速、敏感、非放射性的 DNA 损伤检测方法,可为观察细胞 DNA 损伤情况提供直观的信息,且能够获得细胞 DNA 损伤的整体状况,为评价 DNA 损伤和细胞自身 DNA 的修复能力,以及评价其他介入因素的作用提供了一个很好的方法^[15]。本研究采用 24 孔聚苯乙烯培养板盖代替常规载玻片,利用孔凸边形成的规则的圆形凹槽进行单层铺胶,与传统方法相比,具有铺胶时间短,及在随后的裂解、解旋、电泳及中和等操作中不易脱胶等优点;同时,板面大小一致,胶面平整,反应条件相同,且单片上样品承载量大,实验结果可显示出清晰的 DNA 图像,利于批量样品的分析比较,从而提高组间数据的可比性^[16]。

从本实验结果看,单纯照射组细胞 DNA 损伤程度经历了“轻-重-恢复”的过程:在照射后早期(24 h)损伤不明显;照后 48 h, DNA 损伤程度达到最重;照后 72 h, DNA 损伤程度有所减轻,这是由于细胞自身存在一些 DNA 损伤修复相关酶类及相关蛋白(如 P21、P53 和 HSP70 等),细胞启动了自我修复系统而表现出一定的自我修复功能。而照后 48 h,各浓度 GEN 预处理组细胞 DNA 损伤程度均明显轻于单纯照射组($P < 0.05$);照后 72 h,低浓度(1.5 $\mu\text{mol/L}$)组 GEN 仍然显示出较好的保护效果,但高浓度(10、20 $\mu\text{mol/L}$)组 DNA 损伤较中期加剧,进一步提示 GEN 抗辐射活性的浓度效应和时效性,即随着作用浓度的升高和作用时间的延长,GEN 表现为辐射增敏^[17],这与高浓度 GEN 处理细胞后增殖率下降的变化相一致,有关分子机制需进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Weiss J F, Landauer M R. Radioprotection by antioxidants[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 899: 44-60.
- [2] Weiss J F, Landauer M R. Protection against ionizing radiation

- by antioxidant nutrients and phytochemicals[J]. *Toxicology*, 2003, 189: 1-20.
- [3] Coleman C N, Stone H B, Moulder J E, Pellmar T C. Medicine. Modulation of radiation injury[J]. *Science*, 2004, 304: 693-694.
- [4] Sarkar F H, Li Y. The role of isoflavones in cancer chemoprevention[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2714-2724.
- [5] Kruk I, Aboul-Enein H Y, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A. Scavenging of reactive oxygen species by the plantphenols genistein and oleuropein[J]. *Luminescence*, 2005, 20: 81-89.
- [6] Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. Cellular and physiological effects of soy flavonoids[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2004, 4: 881-887.
- [7] Hong H, Landauer M R, Foriska M A, Ledney G D. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein[J]. *J Basic Microbiol*, 2006, 46: 329-335.
- [8] Mahmood J, Jelveh S, Calveley V, Zaidi A, Doctrow S R, Hill R P. Mitigation of radiation-induced lung injury by genistein and EUK-207[J]. *Int J Radiat Biol*, 2011, 87: 889-901.
- [9] Landauer M R, Srinivasan V, Seed T M. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury[J]. *J Appl Toxicol*, 2003, 23: 379-385.
- [10] Moore J O, Wang Y, Stebbins W G, Gao D, Zhou X, Phelps R, et al. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27: 1627-1635.
- [11] Song L H, Yan H L, Cai D L. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2006, 47: 157-165.
- [12] Song L H, Yan H L, Cai D L. Gene expression profiles in the liver of mice irradiated with ⁶⁰Co gamma rays and treated with soybean isoflavone[J]. *Eur J Nutr*, 2006, 45: 406-417.
- [13] Katiyar S K, Mantena S K, Meeran S M. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e21410.
- [14] Chen A C, Donovan S M. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2BBe cell proliferation by causing G₂/M cell cycle arrest[J]. *J Nutr*, 2004, 134: 1303-1308.
- [15] Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects[J]. *Mutagenesis*, 2003, 18: 159-166.
- [16] 高建军, 丰盛梅, 金慰芳. 碱性单细胞凝胶电泳铺胶技术的改进[J]. *复旦学报(医学版)*, 2004, 33: 311-322.
- [17] 严森祥, 郑树森. 异黄酮增加前列腺癌细胞放射敏感性[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2004, 33: 239-244.