

<http://www.journals.zju.edu.cn/med>

异黄酮增加前列腺癌细胞放射敏感性

严森祥, 郑树森

(浙江大学医学院 附属第一医院, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 研究异黄酮(genistein)与辐射联合应用对 DU145 前列腺癌细胞放射敏感性的影响。方法: 雄激素非依赖型 DU145 前列腺癌细胞在克隆形成试验中, 接受不同浓度的 genistein 和/或合用辐射, 比较 DU145 细胞的存活率; 用 DNA Ladder 检测细胞凋亡, 并辅以 TUNEL 法观察凋亡形态; 流式细胞仪和免疫印迹法分别观察细胞周期改变和相关蛋白表达。结果: 克隆形成试验显示, genistein 在较低或中等浓度($5 \sim 15 \mu\text{mol/L}$)时, 即可提高 DU145 细胞的放射敏感性; 单独辐射和/或合用 genistein 24 h 后, 细胞凋亡主要见于高浓度 genistein ($> 30 \mu\text{mol/L}$)处理组, 72 h 后凋亡亦见于较低浓度 genistein 组; 当 genistein 与辐射合用时, 可产生 G2/M 细胞周期阻滞, 72 h 后得到大部维持并伴有凋亡和超二倍体细胞群的出现; 细胞周期相关蛋白分析提示, 随着 genistein 浓度的提高, 周期素 B1 呈明显双相改变, cdc-2 亦呈类似改变, 但较轻微, 而 p21^{cip1}则稳步上升。结论: genistein 可提高 DU145 前列腺癌细胞的放射敏感性, 其机理可能与凋亡细胞的增加, 细胞周期阻滞和细胞修复功能障碍有关。

[关键词] DU145; 前列腺癌细胞; 异黄酮; 辐射效应; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R 737.25; R 730.55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)03-0239-06

Enhancing effect of isoflavonoid genistein on radiosensitivity of DU145 prostate cancer cells

YAN Sen-xiang, ZHENG Shu-sen (*The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the enhancing effect of isoflavonoid genistein in irradiation (IR) on prostate DU145 cancer cells. **Methods:** Prostate cancer cell line DU145 was used in this experiment. Clonogenic assay was applied to compare the survival fractions of DU145 cells after treatments with genistein alone and/or graded IR. DNA electrophoresis and TUNEL method were applied to detect cell apoptosis. Cell cycle was observed using flow cytometry and related protein expressions by immunoblotting. **Results:** Clonogenic assay demonstrated that genistein, even at low to medium concentrations, enhanced the radiosensitivity of DU145 cells. After treatments with IR and/or genistein for 24 h, apoptosis was mainly seen with genistein at high concentration and was minimally dependent on IR. Apoptosis also occurred after treatments for 72 h with lower concentrations of genistein, especially when combined with IR. While IR or genistein led to a G2/M cell cycle arrest, combination of them could further increase DU145 cells at G2/M phase. This G2/M arrest was largely maintained at 72 h, and accompanied by increasing apoptosis and hyperdiploid cell populations. Cell-cycle related protein analysis disclosed biphasic changes in cyclin B1, less markedly increased cdc-2 and stably elevated p21^{cip1} levels with increasing genistein concentrations. **Conclusion:** Genistein could enhance the radiosensitivity of DU145 prostate cancer cells. The mechanisms might be involved in the increased apoptosis, prolonged cell cycle arrest and impaired damage repair induced by the combined treatment.

[Key words] DU145; Prostatic neoplasms; Flavins; Irradiation; Apoptosis; Cell cycle

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004, 33(3): 239-244.]

流行病学调查显示, 前列腺癌的发病率亚洲国家明显低于西方发达国家, 其原因之一被认为与亚洲人大量摄取富含异黄酮的豆制品有关^[1]。调查显示, 日本人血清中异黄酮的主要成

收稿日期: 2003-02-26 修回日期: 2004-03-21

基金项目: 日中 川医学奖学金资助。

作者简介: 严森祥(1967 年—), 男, 博士生, 从事放射学诊断及治疗研究。

分 genistein 的平均值大约是英国人的 15 倍^[2],并发现 genistein 能使细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡,直接抑制许多实体肿瘤细胞的生长。但 genistein 作用于肿瘤细胞的机理尚未完全明了。放射治疗作为前列腺癌的治疗手段之一,可单独或与化学、激素及手术疗法联合使用,但上述治疗措施均难于获得满意效果。为此,本研究试图通过使用 genistein 观察激素非依赖型 DU145 前列腺癌对放射敏感性的影响,并对其可能的作用机理进行探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞株和培养条件 前列腺癌 DU145 细胞获自 American Type Culture Collection (Rockville, MD),保存于附加 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,并置于 5%CO₂ 和 37℃ 的孵育箱。DU145 细胞为 p53 变异型,在密码子 223 和 274 显示两处变异^[3]。

1.2 试剂与辐射 genistein 购自 Calbiochem 公司,并以 DMSO 溶解配制成 100 mmol/L 浓度,保存于-20℃ 备用。genistein 对照细胞使用类似浓度的 DMSO 作为载体。辐射使用东芝 KXC-18-2 型 X 线机,剂量为 1.67 Gy/min。

1.3 克隆形成试验 当 6 cm 培养皿内 DU145 细胞达 70%~80%融合时,分成①单独 genistein 处理组:接受 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μmol/L 不等浓度的 genistein 处理;②单独辐射组:接受 0、1、3、5、7 Gy 不等辐射量;③辐射加 genistein 组:辐射前 24 h 培养液内加入 5、15 μmol/L 不等 genistein,分别接受 0、1、3、5 Gy 辐射后,根据细胞毒性大小将 100~10 000 个细胞平铺于 6 cm 培养皿,培养液内 genistein 浓度与辐射前保持一致。孵育 10 d 后,用 10%福尔马林和晶体蓝溶液进行细胞固定和染色,计算克隆(定义为>50 个细胞集落)数。根据单击多靶(SHMT)模型制作细胞生存曲线: $S/S_0 = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$,其中 S/S_0 为生存率, D 为辐射剂量。每组实验重复 3 次。

1.4 细胞凋亡分析 采用 Ladder 法。10 cm 培养皿内细胞接受辐射和/或 genistein 处理后,在规定时间点回收细胞并提取 DNA 断片,后者分别与 RNA 酶 A 和蛋白酶 K 在 37℃ 下

孵化 1 h,然后加入氯化钠和异丙醇,并于-20℃ 下保存过夜。电泳时 DNA 试料内加入 TE 缓冲液(含 10 mmol/L Tris-盐酸和 1 mmol/L EDTA)。电泳后接受紫外线照射,由 Polaroid CRT 相机摄取 DNA 条带。细胞凋亡形态学观察采用 TUNEL 法^[4]。

1.5 流式细胞仪细胞周期分析 6 cm 培养皿内细胞接受辐射和/或 genistein 处理后,在规定时间点回收细胞,用 70%乙醇固定后保存于-20℃ (不超过一周)。在流式细胞仪(Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ)分析前,离心除去乙醇,将细胞重新悬浮于细胞周期缓冲液(含 400 μl PBS, 0.5 mg RNA 酶和 0.5 μl Triton X),后者通过尼龙纤维条过滤后注入 Falcon 2052 型试管。将 10 μl PI(5 mg/ml)加入试管并孵化 10 min 后,利用 DNA 含量判断各个细胞所处周期位置。ModFit 软件用于统计分析,每组实验至少重复 3 次。

1.6 免疫印迹 10 cm 培养皿内细胞接受不同处理后,在规定时间点回收、匀浆并提取蛋白。岛津 UV-1600 型分光光谱仪用于总蛋白定量。将 50 μg 蛋白作 SDS-PAGE 电泳。电泳后转膜,膜上非特异性结合点用 3%牛血清蛋白封闭,然后分别与一抗(稀释约 200~1000 倍)和辣根过氧化物酶标记二抗(稀释约 1000 倍)孵化。利用化学发光剂 ECL(Amersham 公司)产生荧光并记录于 X 线胶片。

1.7 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同处理结果采用单因素方差分析;其中单独 genistein 处理组与对照组,辐射加 genistein 组与单独辐射组采用两两比较 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 genistein 能增强 DU145 细胞的放射敏感性 在 genistein 单独作用下,DU145 细胞的生存率与对照组相比,genistein 在 5 μmol/L 时 DU145 细胞生存率开始降低($P < 0.01$),在 50 μmol/L 时生存率降为 0(图 1)。在 genistein 合用辐射组,经 5~15 μmol/L genistein 即能降低辐射后 DU145 细胞的生存率(图 2,表 1),其中 1、3、5 Gy 辐射合用 5 μmol/L genistein 与

单纯辐射组比 P 分别为 >0.05 、 <0.05 和 >0.05 ; 1、3、5 Gy 辐射合用 15 $\mu\text{mol/L}$ genistein 与单纯辐射组比 P 分别为 <0.01 、 <0.001 和 <0.001 。genistein 和辐射联合使用后可在形态学上未能形成克隆的细胞中可见明显的胞浆肿胀、空泡变性、核浓缩和凋亡征象。

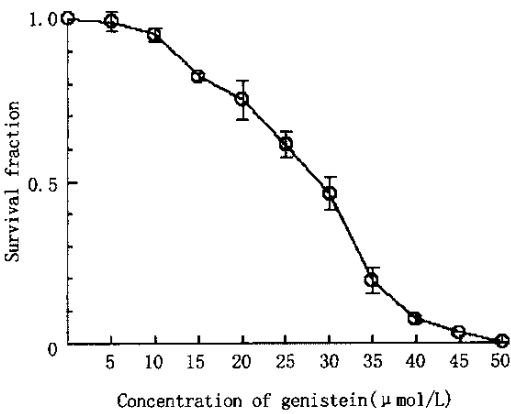


图 1 genistein 单独使用时 DU145 细胞的生存曲线
Fig. 1 Survival Fraction of DU145 cells treated with genistein only

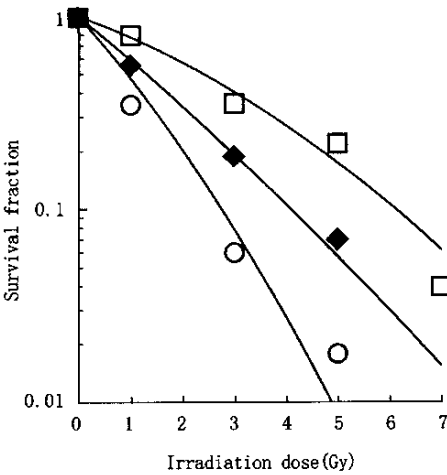


图 2 单独辐射或合用 genistein 对 DU145 细胞生存曲线的影响
Fig. 2 Survival fractions of DU145 cells treated with irradiation only and plus genistein
□: Irradiation only; ◆: Irradiation plus 5 $\mu\text{mol/L}$ genistein; ○: Irradiation plus 15 $\mu\text{mol/L}$ genistein

2.2 细胞凋亡 早期凋亡主要依赖 genistein 作用。在不同浓度 genistein 处理和/或辐射组, 24 h 后 DNA Ladder 分析显示, 凋亡仅见于高

表 1 单独辐射或与 genistein 合用后 DU145 细胞的生存曲线

Table 1 Survival fraction of DU145 cells after treatment with graded IR without or with genistein

Genistein ($\mu\text{mol/L}$)	1 Gy	3 Gy	5 Gy
0	0.75 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.1 ± 0.03
5	0.62 ± 0.12	$0.23 \pm 0.05^{\blacktriangle}$	0.08 ± 0.00
15	$0.35 \pm 0.06^{\blacktriangle\blacktriangle}$	$0.06 \pm 0.01^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$	$0.01 \pm 0.01^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$

vs 0 $\mu\text{mol/L}$, $\blacktriangle P < 0.05$; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$

浓度 ($>30 \mu\text{mol/L}$) genistein 组, 而延长观察时间 (48~72 h) 后凋亡亦见于低浓度 genistein 组。这在辐射合用时更为明显 (图 3、4)。

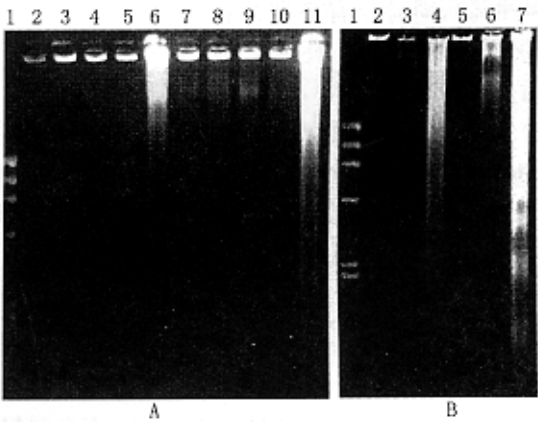


图 3 DNA Ladder 结果
Fig. 3 DNA Ladder results

A: 24 h after each treatment, 1~2: DNA marker, control; 3~6: 5, 15, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$ of genistein, respectively; 7: irradiation only (6 Gy); 8~11: irradiation plus 5, 15, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$ of genistein, respectively; B: 24~72 h after 30 $\mu\text{mol/L}$ of genistein only and plus irradiation (6 Gy), 1: DNA marker; 2~4: 24 h, 48 h, 72 h after genistein only; 5~7: 24 h, 48 h, 72 h after genistein plus irradiation

2.3 细胞周期改变 genistein 处理 24 h 后, G2/M 期细胞随着 genistein 浓度的增加而增加。辐射 (6 Gy) 亦能轻微增加 G2/M 期细胞。当 30 $\mu\text{mol/L}$ genistein 与辐射合用时, G2/M 期细胞上升至 89.2%, 远远超过两者单独使用时; 延长观察时间发现, 上述 G2/M 细胞周期阻滞得到大部维持, 同时伴有凋亡和超二倍体细胞群的明显增加 (图 5、6)。但当浓度上升至

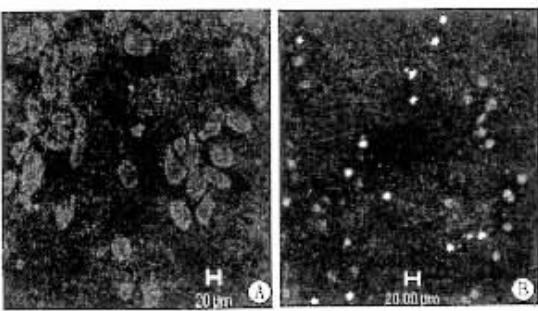


图 4 TUNEL 结果

Fig. 4 TUNEL results

A:Control; B: 24 h after 100 $\mu\text{mol/L}$ of genistein plus irradiation (6 Gy)

100 $\mu\text{mol/L}$ 时,相对于单独使用 genistein,辐射反而减少了 G2/M 期细胞(从 84.7%至 74.6%),同时伴有 S 期细胞的增加(从 12.8%至 24%,表 2、3)。

表 2 不同处理 24 h 后细胞周期分布

Table 2 Cell-cycle distributions 24 h after each treatment

Group	G0/G1	S	G2/M
Control	49.4±3.7	36.7±3.0	13.9±1.1
Genistein($\mu\text{mol/L}$)			
5	45.5±4.0	38.9±4.0	15.7±1.1
15	38.1±5.8▲▲	43.3±4.5	18.6±2.3
30	34.2±1.4▲▲▲	38.1±6.0	27.7±5.6▲▲▲
100	2.5±2.5▲▲▲	12.8±0.6▲▲▲	84.7±3.0▲▲▲
IR(6 Gy)	43.0±4.6	33.3±2.9	23.7±2.3
IR+genistein($\mu\text{mol/L}$)			
5	32.1±3.6▲▲	41.6±5.0▲▲	26.3±3.0
15	28.6±5.5▲▲▲	29.2±2.8	42.3±8.0▲▲▲
30	2.6±0.6▲▲▲	8.2±1.9▲▲▲	89.2±2.0▲▲▲
100	1.4±1.5▲▲▲	24.0±3.5▲▲	74.6±3.8▲▲▲

Genistein vs control and IR + genistein vs IR,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$

表 3 30 $\mu\text{mol/L}$ genistein 加 6 Gy 辐射 24~72 h 后细胞周期分布

Table 3 Cell-cycle distributions 24~72 h after 30 $\mu\text{mol/L}$ of genistein plus 6 Gy of IR treatment

Cell-cycle	24 h	48 h	72 h
G0/G1	2.6±0.6	4.1±1.4	7.1±1.2▲▲
S	8.2±1.9	11.6±0.6▲	16.1±2.3▲▲▲
G2/M	89.2±2.0	84.3±1.4▲▲	76.8±1.4▲▲▲

vs 24 h,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$

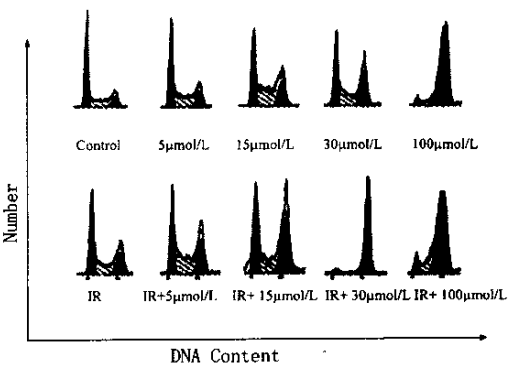


图 5 不同处理 24 h 后细胞周期分布的流式细胞仪代表图

Fig. 5 Representative flow-cytometry graphs of cell-cycle distributions 24 h after each treatment

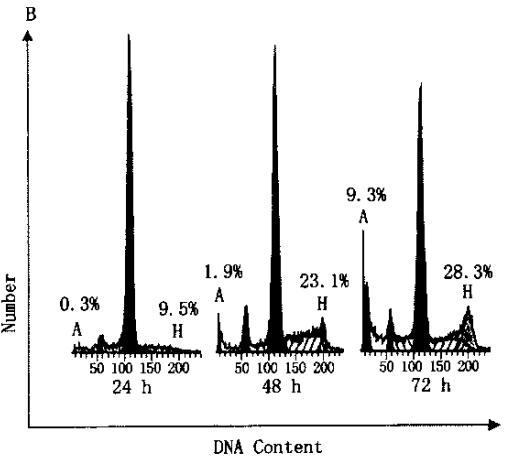


图 6 30 $\mu\text{mol/L}$ genistein 加 6 Gy 辐射 24~72 h 后细胞周期分布

Fig. 6 Cell-cycle distributions 24~72 h after 30 $\mu\text{mol/L}$ of genistein plus 6 Gy of IR treatment. A and H represented apoptosis and hyperdiploid cells, respectively

2.4 细胞周期相关蛋白表达 genistein 单独处理 24 h 后,周期素 B1 呈现双相变化,即随着 genistein 浓度的上升而增加,约在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到峰值,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时则明显减少。辐射单独亦能显著增加周期素 B1,辐射与 genistein 合用时其变化类似于 genistein 单独使用时。相对于周期素 B1,cdc-2 变化较小(图 7-A)。p21^{cip1}则随 genistein 浓度的上升而稳步增加(图 7-B),且不依赖于 p53 表达。单独辐射亦能轻微增加 p21^{cip1},两者合用时其变化类似于 genistein 单独使用时。

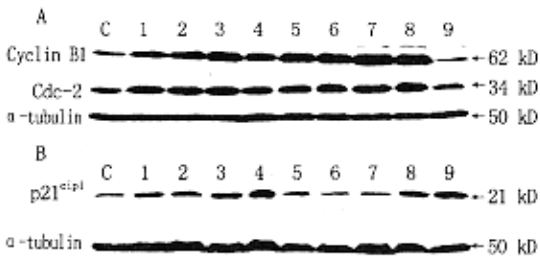


图 7 不同处理 24 h 后周期素 B1、cdc-2 和 p21^{cip1} 蛋白水平

Fig. 7 Cyclin B1, cdc-2 and p21^{cip1} protein levels 24 h after each treatment

C: Control; 1~4: 5, 15, 30, 100 μmol/L genistein; 5~9: 0, 5, 15, 30, 100 μmol/L of genistein plus irradiation (6 Gy)

3 讨 论

多数前列腺癌在早期对雄激素剥夺疗法反应良好,但其最终发展为激素非依赖性,并对现有多数疗法产生抵抗。因此,寻找一种新的激素非依赖性前列腺癌的治疗方法具有重要意义。DU145 为雄激素非依赖性细胞株之一。本实验结果提示低浓度 genistein 即可增加 DU145 细胞的放射敏感性。但 genistein 作用于肿瘤的机理尚未完全阐明。有人认为 genistein 可抑制受体酪氨酸激酶,使肿瘤细胞跨膜信号传递受阻。在进展期激素非依赖性前列腺癌,表皮样生长因子家族 (erb1/EGFR, erbB2, erbB3) 常呈高度表达,辐射能诱导这些生存信号被进一步高表达^[5,6],genistein 可通过抑制这些所谓的生存信号,增加 DU145 细胞的放射敏感性。生存信号的抑制降低了细胞对辐射后潜在性致死损伤 (PLD) 的修复,这可能是放射敏感性增加的原因之一。

DNA Ladder 分析显示,早期细胞凋亡主要取决于 genistein 浓度而不是辐射,DU145 细胞对辐射诱导凋亡具有抵抗性,其机理尚未明了,可能与一些基因表达有关,如辐射可诱导 NF-kappaB 的产生,后者具有抗凋亡作用。有报道 genistein 可抑制前列腺癌 NF-kappaB 激活^[7,8]。本实验显示随着作用时间的延长,较低浓度 genistein 亦能诱导凋亡,尤其当与辐射合用时。有文献报道,在体外 genistein 对乳腺癌细胞有明显的抑瘤效果,且在药效浓度下抑

制骨髓造血细胞作用很轻^[9]。

当受到各种基因毒性应激时,肿瘤细胞通过已知的 G0/G1 (DNA 复制前) 和 G2/M (染色体分离前) 两个调停点来推迟细胞周期的进行,而 G2/M 调停点被认为是肿瘤细胞对辐射和化疗的敏感期^[10]。本实验显示 5~30 μmol/L genistein 与辐射 (6 Gy) 合用后可导致更多细胞阻滞于 G2/M 期。高浓度 genistein (100 μmol/L) 合用辐射不但不能增加,反而减少了 G2/M 期阻滞细胞,这可能由于合用时有更多的 G2/M 期阻滞细胞进入了凋亡 (如 DNA Ladder 所示),同时合用时 S 期细胞的增加可能部分反映了 G2 期前凋亡现象^[11,12]。另一发现是,当延长观察时间至 48 h 和 72 h,辐射合用 genistein 组不但有细胞凋亡,还有超二倍体细胞的明显增加。超二倍体现象可由于 DNA 损伤如辐射或抗癌药所致,有报道 genistein 能作用于乳腺和头颈部少数肿瘤细胞产生超二倍体细胞^[13,14]。超二倍体细胞可能由于修复机能缺陷而对 genistein 的损伤作用更为敏感^[15],这也许可以解释 genistein 在较低浓度 (但持续作用) 可明显减少辐射后 DU145 细胞的克隆形成能力。

周期素 B1/cdc-2 复合物是已知的细胞由 G2 期向 M 期推进的关键调节蛋白,p53 依赖或非依赖性 p21^{cip1} 高表达伴周期素 B1/cdc-2 复合物的抑制,被认为是 genistein 导致部分肿瘤细胞 G2/M 期阻滞的原因。本实验亦显示 p21^{cip1} 随着 genistein 浓度的上升而增加,且不依赖于 p53。除了 p21^{cip1},p53 依赖或非依赖性 Gadd45 (一族进化上高度保守的酸性核蛋白) 亦可在细胞受到基因毒性应激 (如紫外线) 后诱导表达,并特异性抑制周期素 B1/cdc-2 活性,从而引起 G2/M 期细胞阻滞^[16~18]。genistein 可在 mRNA 或蛋白水平抑制周期素 B1 表达,本实验发现随着 genistein 浓度的上升,周期素 B1 呈明显双相改变。这一现象也见于乳腺癌细胞^[19]。事实上,在 DNA 损伤时周期素 B1 在 mRNA 和蛋白水平的表达常不一致,如 HeLa 细胞在 γ-线照射后,尽管周期素 B1 mRNA 随着照射剂量的上升而减少,但周期素 B1 蛋白可在低剂量 (<5 Gy) 照射后反而增加^[20]。周期

素 B1 蛋白的高表达和 G2/M 期细胞阻滞的矛盾性共存实际上可能反映了以下事实:周期素 B1 蛋白不能与 cdc-2 结合形成复合物激活后者,从而在不能促进细胞分裂的同时,周期素 B1 由于不能借助 cdc-2 复合物形式被 ubiquitin 化后清除而导致细胞内积聚。此外,ubiquitin 化径路自身调节异常也可能是周期素 B1 蛋白积聚和细胞周期阻滞的原因。

总之,本研究结果显示 genistein 可协同辐射提高 DU145 细胞的放射敏感性;早期细胞凋亡主要依赖于高浓度 genistein 作用,而迟发凋亡亦可在低浓度下发生,尤其当与辐射合用时;genistein 与辐射合用可使更多细胞阻滞于 G2/M 期,同时随着时间的延长伴有超二倍体细胞的明显增加,这也可能是 genistein 放射增敏的原因之一。

References:

- [1] MESSINA M J, PERSKY V, SETCHELL K D, et al. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data [J]. **Nutr Cancer**, 1994,21(2):113—131.
- [2] PUMFORD S L, MORTON M M, TURKES A, et al. Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. **Ann Clin Biochem**, 2002,39(Pt 3):281—292.
- [3] CARROLL A G, VOELLER H J, SUGARS L, et al. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines [J]. **Prostate**, 1993,23(2):123—134.
- [4] GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. **J Cell Biol**, 1992,119(3):493—501.
- [5] DENT P, REARDON D B, PARK J S, et al. Radiation-induced release of transforming growth factor α activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death [J]. **Mol Biol Cell**, 1999,10(8):2 493—2 506.
- [6] GOLDKORN T, BALABAN N, SHANNON M, et al. EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1997,1 358(3):289—299.
- [7] DAVIS J, KUCUK O, SARKAR F. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells [J]. **Nutr Cancer**, 1999,35(2):167—174.
- [8] LI Y, SARKAR F H. Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway [J]. **Clin Cancer Res**, 2002,8(7):2 369—2 377.
- [9] YANG Zheng-rong, CHENG Tian-ming, SU Yong-ping, et al(杨峥嵘,程天明,粟永萍,等). Study on anti-proliferation effects of genistein on MCF-7 and its selective effects on different cells [J]. **Acta Academ Med Milit Tert**(第三军医大学学报), 2002,24(1):62—65. (in Chinese)
- [10] RUSSELL K J, WIENS L W, DEMERS G W, et al. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-competent cells. **Cancer Res**, 1995,55(8):1639—1642.
- [11] PAPAZISIS K T, ZAMBOULI D, KIMOUNDRI O T, et al. Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with gamma-irradiation [J]. **Cancer Lett**, 2000,160(1):107—113.
- [12] SCHWARTZ L M, OSBORNE B A. **Cell Death** [M]. San Diego, USA:Academic Press,1995:77—97.
- [13] LIAN F, BHUIYAN M, LI Y, et al. Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line [J]. **Nutr Cancer**, 1999(5),34:12—19.
- [14] ALHASAN S A, ENSLEY J, SARKAR F H. Genistein induced molecular changes in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines [J]. **Int J Oncol**, 2000,16(2):333—338.
- [15] McDONALD E R, WU G S, WALDMAN T, et al. Repair defect in p21^{WAF1/CIP1}-/- human cancer cells [J]. **Cancer Res**, 1996,56(10):2 250—2 255.
- [16] JIN S J, ANTINORE M J, LUNG F D T, et al. The Gadd45 inhibition of cdc2 kinase correlates with Gadd45-mediated growth suppression [J]. **J Biol Chem**, 2000,275(22):16 602—16 608.
- [17] CHEN F, ZHANG Z, LEONARD S S, et al. Contrasting roles of NF-kappaB and JNK in arsenite-induced p53-independent expression of GADD45alpha [J]. **Oncogene**, 2001,20(27):3 585—3 589.
- [18] VAIRAPANDI M, BALLIF A G, HOFFMAN B, et al. Gadd45b and Gadd45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress [J]. **J Cell Physiol**, 2002,192(3):327—338.
- [19] BALABHADRAPATHRUNI S, THOMAS T J, YURKOW E J, et al. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells [J]. **Oncol Rep**, 2000,7(1):3—12.
- [20] MUSCHEL R J, ZHANG H B, GILLIES McKENNA W. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells [J]. **Cancer Res**, 1993,53(5):1 128—1 135.