

大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞增殖和凋亡的研究

金梅花,许惠仙,金花,全吉淑,尹学哲

(延边大学医学院,吉林 延吉 133000)

摘要:从大豆胚轴提取大豆异黄酮和皂甙,研究大豆异黄酮和皂甙抑制结肠癌细胞的增殖和促进其凋亡的作用。采用MTT比色法观察大豆异黄酮和皂甙抑制结肠癌细胞增殖,采用流式细胞仪检测大豆异黄酮和皂甙对HT-29细胞周期分布的影响,免疫细胞化学法检测凋亡相关蛋白bax、bcl-2和p53的表达。结果表明:大豆异黄酮和皂甙可时间和浓度依赖性地抑制结肠癌细胞增殖;诱导细胞凋亡和改变细胞周期分布,多数细胞阻滞于G2/M期;与对照组比较,细胞凋亡率显著增加;用药前后凋亡相关基因bax蛋白表达显著增加,bcl-2表达显著降低。提示,大豆异黄酮和皂甙可通过改变细胞周期分布和诱导结肠癌细胞凋亡,发挥抗结肠癌作用。

关键词:大豆;异黄酮;皂甙;过氧化脂质;氧化易感性;脂蛋白

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1028-04

Effect of Soybean Isoflavones and Saponins on Proliferation and Apoptosis of Human Colon Carcinoma Cell Line Ht-29

JIN Mei-hua, XU Hui-xian, JIN Hua, QUAN Ji-shu, YIN Xue-zhe

(Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

Abstract: Soybean isoflavones and saponins have been observed to limit many kind of tumor cell proliferation by inducing apoptosis. Soybean isoflavones and saponins were extracted from soybean hypocotyl, then investigated for the inhibition on proliferation and apoptosis of human colon carcinoma HT-29 cell. MTT assay was used to examine the proliferation of HT-29, flow cytometry was used for analysis of cell cycle distribution, and immunohistochemical method was used for the determination of bax, bcl-2 and p53 expression. The results showed that soybean isoflavones and saponins inhibited the proliferation of colon carcinoma cell in a time- and concentration-dependent manner, induced apoptosis and lead to G2/M arrest. The apoptotic ratio of treatment group was significantly lower than that of control group, the expression of bax increased and bcl-2 decreased significantly. It is suggested that soybean isoflavones and saponins could exert an anti-colon cancer effect via cell cycle arrest and induction of apoptosis.

Key words: Soybean; Isoflavones; Saponins; Colon cancer; Cell cycle; Apoptosis

流行病学调查证实,常食大豆对预防癌症和心血管疾病发生、增进人体健康有益。这些功效均与大豆中的异黄酮和皂甙等生物活性物质密切相关。大豆异黄酮是一类从大豆中分离的活性成分,具有异黄酮类化合物的典型结构。目前发现的大豆异黄酮共有十二种,分为游离型的苷元(大豆苷元 daidzein、染料木酮 genistein、黄豆苷元 glycitein)和相应的糖苷(大豆苷 daidzin、染料木苷 genistin、黄豆苷 glycitin)以及它们的丙二酰化形式和乙酰化形式^[1-2]。近年来,大豆异黄酮抗癌作用研究成为热点,有报道开始探索大豆异黄酮的抗氧化作用,发

现大豆异黄酮具有清除氧自由基能力,并能阻抑低密度脂蛋白的氧化修饰作用^[3-4]。大豆皂甙是存在于大豆中的一类五环三萜的糖甙,主要分为A类、B类、E类和DDMP皂甙。已有很多研究表明,大豆皂甙具有多种药理作用,如抗癌、防治心血管疾病、抗病毒及保肝等作用^[5-9],其中皂甙的抗癌作用尤其引人注目。因此,从大豆胚轴提取大豆异黄酮和皂甙为原料,研究大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞增殖及细胞周期分布和凋亡的影响,同时对其机制进行初步探讨。

收稿日期:2008-06-03

基金项目:吉林省教育厅科技计划资助项目(2006自4);国家自然科学基金资助项目(30360113)。

作者简介:金梅花(1971-),女,讲师,硕士,主要研究方向为肿瘤生物化学。E-mail: kimmeihua@ybu.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 细胞株

HT-29 细胞购于南京凯基生物技术公司。

1.2 药物和试剂

大豆为中国东北产大豆。噻唑兰购自美国 Sigma 公司,DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,小牛血清购自北京华美生物工程公司,胰蛋白酶购自美国 DIFCO 公司,鼠抗 bax、bcl-2 和 p53 单克隆抗体购自福州迈新生物有限公司。

1.3 仪器设备

YAMATO GA32 型喷雾干燥机、IWAKI REN-1 型旋转蒸发仪、EYELA FDU-830 型冷冻干燥仪、HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪、HITACHI 高效液相色谱系统和 Waters 高效液相色谱系统、OLYMPUS 倒置显微镜、RT-2100 型酶标仪、FACS Calibur 流式细胞仪、JEM-1200EX 透射电子显微镜和 PD-2000 真彩色病理细胞图像分析仪。

1.4 方 法

1.4.1 大豆异黄酮和皂甙的提取及其水解 参照尹学哲等^[10]的方法,将大豆研磨粉碎,用 15 L 50% 甲醇提取,提取液经喷雾干燥得粗粉。将粗粉用等体积正丁醇-水溶液萃取,取正丁醇层,经减压蒸馏、冷冻干燥,得富含大豆异黄酮和皂甙的总糖甙试样。总糖甙试样用 6 倍体积 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液水解 4 h,水解产物经乙酸乙酯提取、蒸馏、冷冻干燥,得大豆异黄酮和皂甙元样品(以下简称 SH)。大豆异黄酮和皂甙元含量采用高效液相色谱法检测。

1.4.2 MTT 比色 结肠癌细胞贴壁生长,培养于含 10% 灭活小牛血清的 DMEM 培养液中,置 37℃、相对湿度 90%、5% CO₂ 孵箱内培养。取对数生长期的 HT-29 细胞按每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL。待细胞贴壁后,SH 组加入 SH 使其终浓度分别为 40、80 和 160 mg·L⁻¹,另设不加药物的阴性对照组以及不接种细胞的空白对照组。分别培养 24、48 和 72 h,每个浓度每个时点均设 4 个复孔。于终止前 4 h,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μL,继续孵育 4 h 后弃去上清液,加入 150 μL DMSO,轻轻振荡 10 min,使结晶物完全溶解,于 490 nm 波长处在酶联分析仪上测光吸收值(A 值),计算生长抑制率。

抑制率(%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%

1.4.3 HT-29 细胞形态学变化 取对数生长期 HT-29 细胞按每瓶 1 × 10⁵ 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,24 h 后换液,加入含不同浓度 SH(40、80、160 mg·L⁻¹) 的 10% 新生小牛血清 DMEM 培养液 200 μL,另设不加药物的阴性对照组。置 5% CO₂ 孵箱内培养 24 和 48 h。每天在倒置显微镜下观察细胞生长状态,48 h 时进行常规 HE 染色。

1.4.4 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期分布 对照组和 80 mg·L⁻¹ SH 组细胞培养 48 h 后,收集各组细胞悬液 1 mL,浓度约为 10⁶ 个·mL⁻¹,离心(1 000 r·min⁻¹,5 min),弃掉培养液,70% 冷乙醇固定,4℃ PI 暗染 30 min,用流式细胞仪检测,采用 ModfitL T3.0 软件对各组样本进行 DNA 含量及细胞周期分析。

1.4.5 细胞凋亡相关基因 bcl-2、p53 蛋白检测 取对数生长期的 HT-29 细胞,以 1 × 10⁵ 个·mL⁻¹ 的浓度接种于放有多聚赖氨酸预处理的无菌盖玻片的 6 孔培养板,每孔 2 mL。待细胞贴壁生长良好,吸除上清液,加入 SH 使终浓度为 80 mg·L⁻¹,继续培养 48 h 后取出细胞爬片,应用免疫细胞化学方法检测 bax、bcl-2 和 p53 蛋白的表达。选取 bax、bcl-2 和 p53 阳性细胞密度最高的部位在真彩色病理细胞图像分析系统分析,每例随机 5 个统计场,取其平均值作为凋亡相关基因蛋白的阳性表达率。

1.4.6 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行 *t*-检验和方差分析。

2 结果与分析

2.1 对 HT-29 细胞增殖的影响

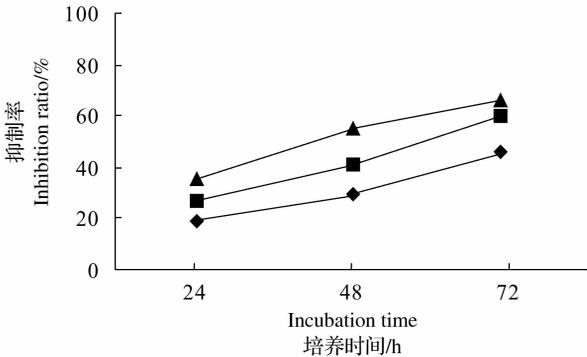
结果见图 1。不同浓度 SH 处理组分别培养 24、48 和 72 h 时,对 HT-29 细胞生长有抑制作用,抑制率呈时间和浓度依赖性。随着时间的延长和浓度的增加,细胞抑制效果更明显,药物对肿瘤细胞生长有量效和时效关系。当 SH 浓度为 80 mg·L⁻¹,作用时间为 48 h 时,抑制率为 37.2%。

2.2 HT-29 细胞的形态学观察

倒置显微镜观察显示对照组 HT-29 细胞生长旺盛,折光率较高,胞体大。细胞呈延展、扁平,细胞均质而透明,细胞间结构紧密,随时间延长变化不大。SH 组细胞增殖减慢,折光率降低,细胞间接触变松,胞质中颗粒增多,部分脱落漂浮于培养瓶中,但细胞膜完整,最后裂解。SH 浓度越高,作用时间

越长,上述表现越明显,漂浮细胞越多。

HE染色结果表明,对照组正常细胞核均匀着色,呈淡蓝色或蓝色,未见凋亡小体。SH组出现较多的凋亡细胞,表现为细胞体积缩小,核固缩、碎裂、深染,部分裂解形成凋亡小体。另可见肿胀的坏死细胞,细胞膜呈连续性破坏,核呈淡蓝色,甚至蓝色消失。



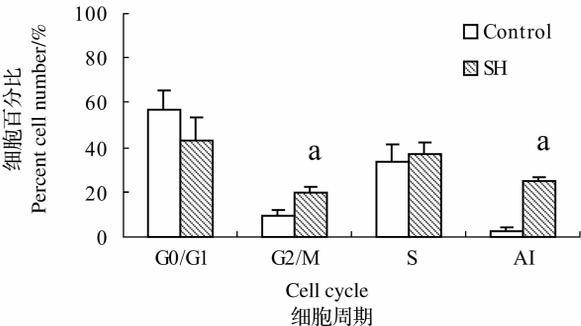
细胞分别用 40 (◆)、80 (■)、160 mg · L⁻¹ (▲) SH 处理 24、48 和 72 h
Cells were incubated with 40 (◆), 80 (■) and 160 mg · L⁻¹ (▲) of SH for 24, 48 or 72 h

图1 SH对HT-29细胞生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of SH on HT-29 cell growth

2.3 对细胞周期分布和凋亡的影响

结果见图2。可见80 mg · L⁻¹ SH处理HT-29细胞48 h后,G₂/M期细胞比率显著上升,多数细胞阻滞在G₂/M期。流式细胞仪检测结果SH组可见明显的凋亡峰,与对照组比较,凋亡率具有显著性差异(P < 0.05)。



a: P < 0.05, 与对照组相比

a: P < 0.05, as compared with control group

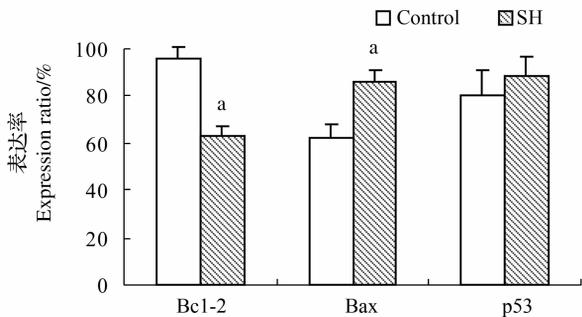
图2 SH对HT-29细胞周期分布及凋亡的影响

Fig. 2 Effects of SH on apoptosis and cell cycle of HT-29 cells

2.4 细胞凋亡相关基因 bcl-2、bax 和 p53 蛋白表达

结果见图3。镜下 bax、bcl-2 阳性部位主要在细胞浆,呈棕黄色。SH组细胞 bcl-2 表达明显下

降,阳性细胞减少,染色明显变浅;而 bax 蛋白表达明显增加,SH组 bcl-2/bax 比值明显降低,由对照组的 1.5 降至 0.8。p53 阳性细胞胞核染成深棕色,对照组与 SH 组细胞胞核着色细胞数无显著性差异。



a: P < 0.05, 与对照组相比

a: P < 0.05, as compared with control group

图3 SH对HT-29细胞中Bax、Bcl-2和p53表达的影响

Fig. 3 Effects of SH on the expression of Bax, Bcl-2 and p53 in HT-29 cells

3 讨论

细胞凋亡普遍存在于大多数肿瘤组织细胞中,与肿瘤的发生、发展及退化有密切的关系^[11]。大多数抗肿瘤药物都能诱导敏感肿瘤细胞发生凋亡,并且其抗肿瘤效能与肿瘤细胞在药物诱导下发生细胞凋亡的活性有关。因此,诱导瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的一个新热点,评价疗效的一项新指标^[12]。MTT结果显示SH对结肠癌细胞的增殖具有明显的抑制作用。其细胞生长抑制随着药物浓度的升高和时间的延长而增加,具有量效和时效关系。倒置显微镜、HE染色观察及流式细胞术检测结果说明,大豆异黄酮和皂甙可诱导结肠癌HT-29细胞凋亡,同时能明显抑制结肠癌细胞的周期分布,使其阻滞细胞停止于G₂/M期,促使细胞发生凋亡。

凋亡的过程是程序化的、多基因调控的。研究其分子调控机制对有计划地诱导肿瘤细胞凋亡有重要的指导作用^[14]。与细胞凋亡相关的基因大致有 bcl-2 家族、p53、fas、c-myc、k-ras 等,细胞是否进入凋亡通道取决于这些凋亡相关基因的综合调控结果。正常细胞中 p53 蛋白是无突变的野生型 p53 蛋白,具有肿瘤生长抑制功能,不易被检测。用免疫组化方法检测的 p53 蛋白是突变型 p53 蛋白。这种突变型 p53 已失去对细胞生长、凋亡和 DNA 修复的调控作用,因此其在细胞内积聚促进细胞转化和增殖可导致肿瘤发生^[15]。bcl-2 和 bax 是一对凋亡相关

调控基因,而 bcl-2 是凋亡调控的中心环节,在生理和病理状态下,bcl-2 基因及其蛋白产物都是重要的凋亡调节因素。bcl-2 主要通过与其家族成员 bax 形成二聚体而发挥作用,当 bcl-2 表达量较高时,bcl-2 和 bax 形成异源二聚体而抑制凋亡;当 bax 表达较高时,bax 之间形成同源二聚体而促进凋亡^[13]。在试验中,对照组 HT-29 细胞 p53 阳性率很高,SH 组 p53 蛋白表达率稍微上升,但与对照组相比,无显著性差异。而 SH 组 bcl-2 蛋白表达则明显减弱,bax 蛋白表达明显增强,bcl-2/bax 比值明显降低,说明 SH 中大豆异黄酮和皂甙等有效成分可下调 bcl-2 而上调 bax 的表达。这可能为大豆异黄酮和皂甙诱导结肠癌细胞凋亡的机制之一。

参考文献

- [1] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone contents in commercial soybean foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(8):1666-1673.
- [2] Branham W S, Dial S L, Moland C L, et al. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(4):658-664.
- [3] Vedavanam K, Sriyayanta S, O'Reilly J, et al. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract(SPE)[J]. Phytotherapy Research, 1999, 13(7):601-608.
- [4] Kerry N, Abbey M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxyl radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro[J]. Atherosclerosis, 1998, 140(2):341-347.
- [5] Konoshima T. Anti-tumor-promoting activities or triterpenoid glycosides;cancer chemoprevention by saponins[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1996, 404:87-100.
- [6] Rodrigues H G, Diniz Y S, Faine L A, et al. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose toler-

- ance and risk factors for atherosclerosis[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005, 56(2):79-85.
- [7] Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, et al. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts[J]. Planta Medica, 1996, 62(3):252-255.
- [8] Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N, et al. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro[J]. Planta Medica, 1997, 63(2):102-105.
- [9] Kinjo J, Imagire M, Udayama M, et al. Structure- hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone[J]. Planta Medica, 1998, 64(3):233-236.
- [10] 尹学哲,许惠仙,金花. 大豆异黄酮和皂苷对糖尿病大鼠脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J]. 大豆科学, 2008, 27(1):170-172. (Yin X Z, Xu H X, Jin H. Inhibition of soybean isoflavones and saponins on oxidation of lipoproteins in diabetic rats[J]. Soybean Science, 2008, 27(1):170-172.)
- [11] Melet A, Song K, Bucur O, et al. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2008, 615:47-79.
- [12] Tan T T, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2008, 615:81-104.
- [13] Korsmeyer S J. Bcl-2 gene family and regulation of programmed cell death[J]. Cancer Research, 1999, 59(7s):1693s-1700s.
- [14] Lu Q L, Poulosom R, Wong L, et al. Bcl-2 expression in adult and embryonic non- haematopoietic tissues[J]. Journal of Pathology, 1993, 169(4):431-437.
- [15] 姚保泰,吴敏,王博. 盐酸小檗碱抑制实验性大鼠胃癌前病变细胞 bcl-2 表达作用的研究[J]. 中国中医药杂志, 2005, 20(3):186-187. (Yao B T, Wu M, Wang B. Experimental research on repairing myocardial cells of viral myocarditis by study on inhibiting action of hydrochloric berberine on expression of bcl-2 in cells of precancerous lesion in experimental rat model[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2005, 20(3):186-187.)

参考文献著录格式

5. 标准(包括国际和国家标准、规范、法规等)

著录格式:

[序号] 主要责任者(任选). 标准编号,标准名称[S]. 出版地(任选):出版者(任选),出版年(任选).

例:

[1] GB/T 7714-2005,文后参考文献著录规则[S].

[2] JT/T 623-2005,集装箱吊具[S]. 北京:人民交通出版社出版,2005.

6. 专利

著录格式:

[序号] 专利申请者或所有者. 专利题名:专利国别,专利编号[P]. 公告日期或公布日期.

例:

[1] 姜锡洲. 一种温热外敷药制备方案:中国,88105607.3[P]. 1989-07-26.