

大豆皂醇抗结肠癌作用的研究

全吉淑, 汪霞, 许惠仙, 尹学哲

(延边大学医学院, 吉林 延吉 133000)

摘要:大豆皂甙通过促进肿瘤细胞凋亡可抑制多种肿瘤细胞的增殖。采用 C_{18} 反相柱层析法从大豆胚轴提取大豆皂甙, 再将其部分水解成其甙元大豆皂醇, 研究其抗结肠癌细胞增殖作用。采用 MTT 比色法观察大豆皂醇对结肠癌 HT-29 细胞增殖的影响, 采用 TUNEL 染色法检测其对 HT-29 细胞凋亡的影响。结果表明: 大豆皂醇在 $40-160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内可时间和浓度依赖性地抑制结肠癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。用 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆皂醇 A 和 B 作用结肠癌细胞 72 h 时, 细胞生长抑制率分别为 $(48.7 \pm 1.3)\%$ 和 $(42.6 \pm 2.0)\%$; 其对肿瘤细胞凋亡率分别为 $(37.0 \pm 1.2)\%$ 和 $(29.5 \pm 0.7)\%$ 。提示, 大豆皂醇可通过诱导细胞凋亡发挥抗结肠癌作用。

关键词:大豆; 皂醇; 结肠癌; 细胞凋亡

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)01-0144-04

Anti-Colon Tumor Effect of Soyasapogenols

QUAN Ji-shu, WANG Xia, XU Hui-xian, YIN Xue-zhe

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

Abstract: Soyasaponins have been observed to limit many kind of tumor cell proliferation by inducing apoptosis. Soyasaponins were isolated from soybean hypocotyl with C_{18} reversed phase column chromatography, then soyasapogenols were prepared by hydrolysis of soyasaponins and their inhibitory effect on proliferation of colon carcinoma cell was investigated. MTT assay was used to examine the proliferation of HT-29 cell, TUNEL method was used for analysis of cell apoptosis. The results showed that soyasapogenols inhibited the proliferation and induced apoptosis of colon carcinoma cells in a time- and concentration-dependent manner in the concentration of $40-160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The inhibitory ratio of soyasapogenol A and B on cell proliferation was $(48.7 \pm 1.3)\%$ and $(42.6 \pm 2.0)\%$, respectively; the apoptosis ratio on carcinoma cell was $(37.0 \pm 1.2)\%$ and $(29.5 \pm 0.7)\%$, respectively. It is suggested that soyasapogenols could exert an anti-colon cancer effect via induction of apoptosis.

Key words: Soybean; Sapogenols; Colon cancer; 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, 其中 A 类为双糖链皂甙, B 类、E 类和 DDMP 皂甙为单糖链皂甙。已有研究表明, 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^[1-5], 其中皂甙的抗癌作用尤其引起人们的注目。已证实大豆皂甙可抑制 S180、YAC-1 和 P815 细胞的 DNA 合成, 并对人红白血病细胞系 K562 及 YAC-1 细胞

有明显的细胞毒作用^[6-7]。大豆皂醇是大豆皂甙在肠道中的分解产物, 主要有大豆皂醇 A、B 和 E。大豆皂甙糖链经大肠细菌糖苷酶水解后形成的大豆皂醇 A 和 B, 比相应糖甙多一个酚羟基, 因此其生理活性有别于糖甙^[8]。因此, 以大豆胚轴提取大豆皂甙为原料, 研究大豆皂醇对结肠癌细胞增殖及细胞凋亡的影响。

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。

收稿日期: 2008-07-02

基金项目: 吉林省教育厅科技计划资助项目(2006 自 4); 吉林省科技发展计划资助项目(200705428); 国家自然科学基金资助项目(30360113)。

作者简介: 全吉淑(1968-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事天然产物与功能食品领域的研究工作。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn。

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,细胞凋亡原位检测试剂盒购自北京中金桥生物技术有限公司。

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、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 试验方法

1.4.1 大豆皂甙的提取及水解 将大豆胚轴研磨粉碎,用 50% 甲醇加热提取,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。将总糖甙用 30% 甲醇溶解,上 C_{18} 层析柱(YMC, ODS-A60-S150, 5 cm × 74 cm),依次用 30%、50% 和 80% 甲醇梯度洗脱,收集富含大豆皂甙的 50% 和 80% 甲醇流出部分。经减压蒸馏、冷冻干燥得干粉,分别称为 F_{50} 和 F_{80} 。将 F_{50} 和 F_{80} 用甲醇溶解后加浓硫酸溶液加热水解 4 h,水解产物经加水稀释放置使之沉淀,得大豆皂醇 A 和 B 试样,分别称为 FH_{50} 和 FH_{80} 。大豆皂甙的分析采用薄层色谱法(MERCK, Kieselgel 60 F_{254})和高效液相色谱法(YMC, ODS-AM-303, 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)^[9]。

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% CO_2 孵箱内培养。取对数生长期的 HT-29 细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μ L。待细胞贴壁后,大豆皂醇组加入药物使其终浓度分别为 40、80 和 160 $mg \cdot L^{-1}$,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 $g \cdot L^{-1}$ MTT 溶液 20 μ L,继续孵育 4 h 后弃去上清液,加入 150 μ L 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 1×10^5 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,24 h 后换液,加入含 80 $mg \cdot L^{-1}$ 大豆皂醇的 10% 新生小牛血清 DMEM 培养液 200 μ L,另设不加药物的阴性对照组。置 5% CO_2 孵箱内培养 72 h。在倒置显微镜下观察细胞生长状态,并进行常规 HE 染色。

1.4.4 TUNEL 染色法检测细胞凋亡 取经 80 $mg \cdot L^{-1}$ 大豆皂醇作用 72 h 的细胞爬片,按试剂盒操作说明进行处理,光镜下观察凋亡细胞并计数。染色后细胞核呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞。随机选取 5 个高倍镜视野,分别计数凋亡细胞数和总细胞数,计算凋亡指数(AI)。

AI(%) = (凋亡细胞数 / 总细胞数) × 100%。

1.4.5 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 大豆皂醇的提取

大豆胚轴提取粉用正丁醇/水 = 1:1 溶剂体系萃取时,粗粉中含有的大量糖类将进入水相,达到除亲水性杂质的目的。此步骤得到含大豆皂甙和大豆异黄酮的总糖甙,产品中含大豆异黄酮 19.4% 和皂甙 58.1%。总糖甙用 30% 甲醇充分溶解后上 C_{18} 层析柱,依次用 30%、50% 和 80% 甲醇梯度洗脱,可按极性大小将大豆异黄酮、双糖链皂甙与单糖链皂甙分开,使其依次分别分布在 F_{30} 、 F_{50} 和 F_{80} 中(表 1)。试样 F_{30} 为较纯的异黄酮样品,其异黄酮主要形式为丙二酰化糖苷; F_{50} 富含双糖链皂甙(主要为 A 类),含少量异黄酮糖苷; F_{80} 富含单糖链皂甙(主要为 B 类),含微量异黄酮苷元。与常温提取相比, F_{80} 中 DDMP 皂甙含量明显减少,这可能是加热使 DDMP 皂甙中 DDMP 结构以麦芽醇形式降解掉有关。富含大豆皂甙的 F_{50} 和 F_{80} 经充分酸解和稀释沉淀最后得到大豆皂醇试样 FH_{50} 和 FH_{80} ,分别含有大豆皂醇 A 84.7% 和大豆皂醇 B 91.2%。

表 1 C₁₈柱层析分离大豆总糖甙结果Table 1 Isolation of soybean glycosides with C₁₈ column chromatography

洗脱部分 Fraction	主要组成成分 Major components	收率 Yield /%
F30	丙二酰化异黄酮糖甙 Malonyl isoflavone glycosides 少量异黄酮糖甙、A 类皂甙	23.0
F50	A small amount of isoflavone glycosides, Group A soyasaponins	13.6
F80	B 类皂甙、少量 DDMP 皂甙 Group B soyasaponins, a small amount of DDMP soyasaponins	26.7

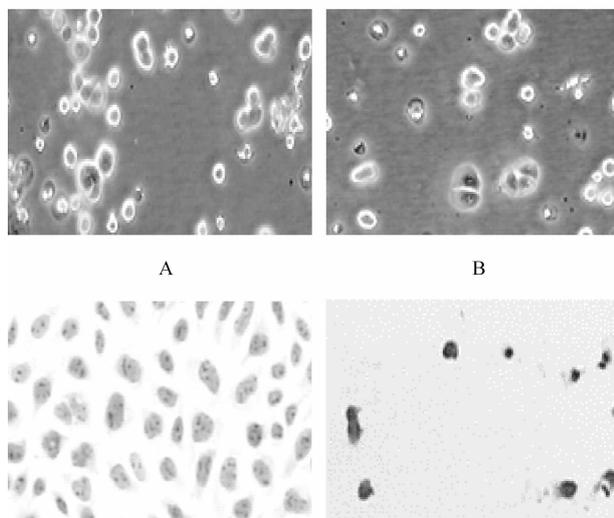
表 2 大豆皂醇对 HT-29 细胞增殖的抑制作用

Table 2 Inhibition of soyasapogenols on proliferation of HT-29 cell

组别 Group	主要成分 Component	剂量 Concentration/mg · L ⁻¹	抑制率 Inhibition ratio/%		
			24 h	48 h	72 h
FH50	大豆皂醇 A Sapogenol A	40	11.3 ± 1.3	26.4 ± 1.4b	34.4 ± 1.0b
		80	28.4 ± 1.7a	35.3 ± 1.7a	48.7 ± 1.3ab
		160	34.9 ± 0.8a	50.4 ± 0.8ab	69.0 ± 2.2ab
FH80	大豆皂醇 B Sapogenol B	40	12.2 ± 1.0	24.4 ± 2.3b	31.9 ± 1.2b
		80	24.5 ± 1.1a	30.6 ± 1.8a	42.6 ± 2.0ab
		160	30.5 ± 0.8a	49.2 ± 1.4ab	67.3 ± 2.1ab

养瓶中,但细胞膜完整,最后裂解(图 1)。大豆皂醇作用时间越长,上述表现越明显。

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。大豆皂醇组表



A: 对照组光镜片; B: 皂醇组光镜片; C: 对照组 HE 染色; D: 皂醇组 HE 染色

A: Micrograph of control group; B: Micrograph of saponin group;

C: HE staining of control group; D: HE staining of saponin group

图 1 HT-29 细胞形态学改变

Fig. 1 Morphologic changes of HT-29 cells

2.2 对 HT-29 细胞增殖的影响

不同浓度大豆皂醇处理组分别培养 24、48 和 72 h 时,对 HT-29 细胞生长有明显抑制作用(表 2)。大豆皂醇对肿瘤细胞生长的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。

2.3 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,呈高折光率,胞体大,随时间延长变化不大。药物组细胞增殖减慢,随着药物浓度增大和时间延长,细胞逐渐变小,折光率减弱,部分脱落漂浮于培

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(图 1)。

2.4 对 HT-29 细胞凋亡的影响

结果见表 3。用 80 mg · L⁻¹大豆皂醇处理细胞 72 h 后,细胞凋亡数明显增加,棕褐色染色颗粒定位于细胞核内。大豆皂醇组凋亡指数与对照组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 大豆皂醇对 HT-29 细胞凋亡的影响

Table 3 Effect of soyasapogenols on apoptosis of HT-29 cell

组别 Group	主要成分 Component	凋亡指数 Apoptosis index/%		
		24 h	48 h	72 h
FH50	大豆皂醇 A Sapogenol A	17.5 ± 2.1	22.3 ± 1.4a	37.0 ± 1.2a
	大豆皂醇 B Sapogenol B	15.9 ± 1.1	21.7 ± 1.3a	29.5 ± 0.7a

与前一时间相比, a: $P < 0.05$

a: $P < 0.05$, as compared with the shorter treatment time

3 讨论

在大豆胚轴中异黄酮和皂甙主要以糖苷形式存在,只有极少量异黄酮以游离苷元形式存在。利用

大豆异黄酮的皂甙的此组成特点,首先采用 C_{18} 反相柱层析法分离大豆胚轴中异黄酮糖甙和皂甙。胚轴提取物中主要含单糖链 A 类皂甙和双糖链 B 类皂甙。将二者分离并将其分别水解制备成大豆皂醇 A 和 B,结果试样中皂醇纯度较高。

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^[10]。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^[11]。本课题组前期实验结果显示大豆皂甙对结肠癌 HT-29 细胞的增殖具有明显的抑制作用,其作用机制为通过改变肿瘤细胞周期分布,促使肿瘤细胞发生凋亡(数据待发表)。实验中 MTT 结果显示,大豆皂醇对结肠癌细胞的增殖具有更加显著的抑制作用。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 TUNEL 检测结果说明,大豆皂醇可诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡,这可能是大豆皂醇抑制结肠癌作用的机制之一。

参考文献

- [1] Konoshima T. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemoprevention by saponins [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 404: 87-100.
- [2] Rodrigues H G, Diniz Y S, Faine L A, et al. Antioxidant effect of saponin; potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis [J]. *International Journal of*

- Food Sciences and Nutrition*, 2005, 56(2): 79-85.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 郁利平, 江曼涛, 赵清池, 等. 大豆皂甙的抑瘤效应 [J]. 白求恩医科大学学报, 1992, 18(4): 333-335. (Yu L P, Jiang M T, Zhao Q C, et al. Inhibiting effect of total soyasaponin on tumor cells [J]. *Journal of Norman Bethune University*, 1992, 18(4): 333-335.)
- [7] 郁利平, 鹿馨, 赵清池. 大豆皂甙对 P815 肿瘤细胞 DNA 合成的影响 [J]. 实用肿瘤学杂志, 1992, 6(1): 59-60. (Yu L P, Lu X, Zhao Q C. Effect of soyasaponin on DNA synthesis of P815 cell [J]. *Journal of Practical Oncology*, 1992, 6(1): 59-60.)
- [8] Gurfinkel D M, Rao A V. Soyasaponins; the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity [J]. *Nutrition and Cancer*, 2003, 47(1): 24-33.
- [9] 全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 大豆胚轴中大豆皂甙的提取及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10): 4-6. (Quan J S, Yin X Z, Kudou S. Isolation and purification of soyasaponins from soybean hypocotyl [J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(10): 4-6.)
- [10] 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.
- [11] 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.

学术交流的平台 科技致富的帮手

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元

欢迎订阅《北方园艺》(月刊)

《北方园艺》是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、黑龙江省优秀科技期刊,内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。

国内外公开发行,单月刊,每月 15 日出版,全国各地邮局均可订阅,邮发代号 14-150,或直接向编辑部汇款订阅,竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号 黑龙江省农业科学院《北方园艺》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86674276 E-mail:bfyybjb@163.com