

大豆异黄酮甙元对结肠癌 HT-29 细胞增殖和凋亡的影响

汪霞,许惠仙,全吉淑,尹学哲

(延边大学医学部,吉林 延吉 133000)

摘要:大豆异黄酮通过促进肿瘤细胞凋亡可抑制多种肿瘤细胞的增殖。从大豆提取大豆异黄酮糖甙,再将其部分水解成其甙元,研究大豆异黄酮甙元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甙元对结肠癌 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,采用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:大豆异黄酮甙元可在 $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时间和浓度依赖性地抑制结肠癌 HT-29 细胞增殖和诱导细胞凋亡。用 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆异黄酮甙元作用结肠癌 HT-29 细胞 72 h 时,细胞生长抑制率为 $(57.1 \pm 4.9)\%$,其对肿瘤细胞凋亡率为 $(20.9 \pm 2.1)\%$ 。免疫组化结果还显示,大豆异黄酮甙元可显著性增加 HT-29 细胞凋亡相关基因 bax 蛋白表达和降低 bcl-2 表达。提示,大豆异黄酮甙元可通过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;甙元;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)02-0310-04

Effect of Soybean Isoflavone Aglycones on Proliferation and Apoptosis of Colon Carcinoma Cell HT-29

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

(Yanbian University Health Science Center, Yanji 133000, Jilin, China)

Abstract: Soybean isoflavones have been observed to limit the proliferation of tumor cell by inducing apoptosis. Soybean isoflavone glycosides were extracted from soybean hypocotyl, then isoflavone aglycones were prepared by hydrolysis of isoflavone glycosides and its 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, and immunohistochemical method was used for the determination of bax, bcl-2 and p53 expression. The results showed that soybean isoflavone aglycones inhibited the proliferation and induced apoptosis of colon carcinoma HT-29 cell in a time- and concentration-dependent manner in the concentration of $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Inhibitory ratio of isoflavone aglycones on carcinoma cell proliferation was $(57.1 \pm 4.9)\%$ and apoptosis ratio was $(20.9 \pm 2.1)\%$. Immunohistochemical results also showed that isoflavone aglycones significantly increased bax protein expression and decreased bcl-2 level. It is suggested that soybean isoflavone aglycones could exert an anti-colon cancer effect via induction of apoptosis.

Key words: Soybean; Isoflavones; Aglycone; Colon cancer; Apoptosis

大豆是人类的重要食物资源,大豆异黄酮是其主要功能成分之一,具有防治癌症、降低血脂、防止动脉粥样硬化、抗氧化、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合症等多种生理功能^[1]。目前发现的大豆异黄酮共有十二种,分为游离型的甙元(大豆甙元 daidzein、染料木甙 genistein、黄豆甙元 glycitein)和相应的糖甙(大豆甙 daidzin、染料木甙 genistin、黄豆

甙 glycitin 以及它们的丙二酰化形式和乙酰化形式)^[2]。近年来,大豆异黄酮的抗癌研究成为热点,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,能阻抑低密度脂蛋白的氧化修饰作用^[3-4]。体内外研究已证实大豆异黄酮对人乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种细胞有明显的抑制作用^[5-7]。从大豆提取大豆异黄酮糖甙为

收稿日期:2008-07-25

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:汪霞(1978-),女,硕士研究生。研究方向为肿瘤生化研究。

通讯作者:全吉淑,副教授。E-mail:quanjs@ybu.edu.cn。

原料,经水解得异黄酮甙元,并研究其对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响。

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。

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,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 型冷冻干燥机、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 大豆异黄酮的提取及其水解 将大豆研磨粉碎,用 50% 甲醇常温提取,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,得富含大豆异黄酮糖甙和皂甙试样。将其用 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,收集富含大豆异黄酮的 30% 甲醇流出部分。经减压蒸馏、冷冻干燥得干粉,称为 F_{30} 。将 F_{30} 用甲醇溶解后用 6 倍体积 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液加热水解 4 h,水解产物经乙酸乙酯提取、蒸馏、冷冻干燥,得大豆异黄酮甙元样品。大豆异黄酮含量采用高效液相色谱法检测^[8]。

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 μL 。待细胞贴壁后,大豆异黄酮甙元组加入 SH 使其终浓度分别为 20、40 和 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,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 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 1×10^5 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,24 h 后换液,加入含不同浓度大豆异黄酮甙元(20、40、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 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% CO_2 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。

1.4.4 TUNEL 染色法检测细胞凋亡 取经 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆异黄酮甙元作用 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,计算凋亡率(AR)。

AR(%) = (凋亡细胞数 / 总细胞数) × 100%。

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 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 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,加入大豆异黄酮甙元使终浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养 72 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

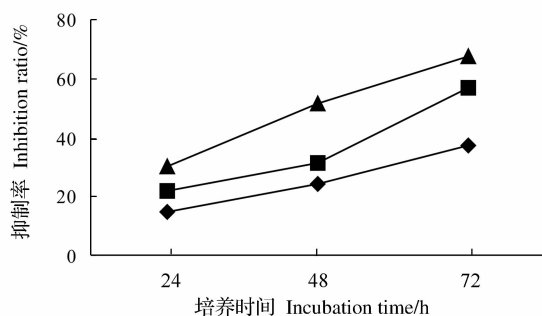
2.1 大豆异黄酮糖甙的提取及其水解

大豆粉用正丁醇/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。此步骤可从醇相得到大豆异黄酮和皂甙的混合试样,产品中含大豆异黄酮 11.4% 和皂甙 70.1%。此试样用 30% 甲醇充分溶解后上 C_{18} 层析柱,依次用不同浓度甲醇梯度洗脱,可按极性大小将丙二酰异黄酮糖甙和皂甙分开。试样 F_{30} 为较纯的异黄酮样品,为丙二酰异黄酮糖甙。50% 和 80% 甲醇洗脱部分分别含有双糖链

皂甙和单糖链皂甙,二者还分别含有少量异黄酮糖甙和甙元。以 F_{30} 为原料,通过盐酸水解制备大豆异黄酮苷元,产品收率为 44.1%,大豆异黄酮苷元含量为 79.7%,其中染料木黄酮、大豆甙元和黄豆甙元之比值为 5:4:1。

2.2 对 HT-29 细胞增殖的影响

结果见图 1。不同浓度大豆异黄酮甙元处理组分别培养 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。当大豆异黄酮甙元浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,作用时间为 72 h 时,抑制率为 57.1%。



细胞分别用 20 (◆)、40 (■)、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (▲) 大豆异黄酮甙元处理 24、48 和 72 h

Cells were incubated with 20 (◆), 40 (■) and 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (▲) of soybean isoflavone aglycones for 24, 48 and 72 h.

图 1 大豆异黄酮甙元对 HT-29 细胞生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of soybean isoflavone aglycones on HT-29 cell growth

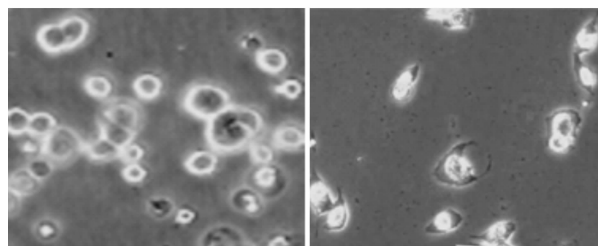
2.3 HT-29 细胞的形态学观察

倒置显微镜观察显示对照组 HT-29 细胞生长旺盛,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。大豆异黄酮甙元组细胞增殖减慢,折光率降低,细胞间接触变松,部分脱落漂浮于培养瓶中,但细胞膜完整(图 2)。大豆异黄酮甙元浓度越高,作用时间越长,上述表现越明显,漂浮细胞越多。

2.4 对 HT-29 细胞凋亡的影响

40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆异黄酮甙元处理 HT-29 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。大豆异黄酮甙元组与对照组的凋亡率分别为 $(20.9 \pm 2.1)\%$ 和 $(2.3 \pm 0.9)\%$,差异具有统计学意义(图 3)。

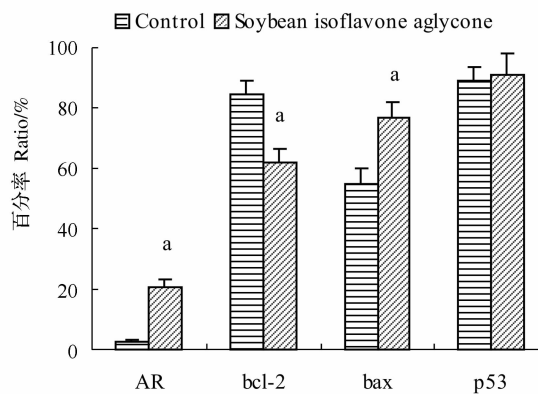
2.5 细胞凋亡相关基因 bcl-2、bax 和 p53 蛋白表达



对照组 Control group
大豆异黄酮甙元组 Isoflavone aglycone group

图 2 HT-29 细胞形态学改变

Fig. 2 Morphologic change of HT-29 cell



a: $P < 0.05$, 与对照组相比

a: $P < 0.05$, as compared with control group

图 3 大豆异黄酮甙元对 HT-29 细胞凋亡及其相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of soybean isoflavone aglycones on the apoptosis and the expression of apoptosis-associated proteins in HT-29 cell

结果见图 3。镜下 bax、bcl-2 阳性部位主要在细胞浆,呈棕黄色。大豆异黄酮甙元组细胞 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,大豆异黄酮甙元组 bcl-2/bax 比值明显降低,由对照组的 1.54 降至 0.81。p53 阳性细胞胞核染成深棕色,对照组与大豆异黄酮甙元组细胞胞核着色细胞数无显著性差异。

3 讨论

大豆中多酚类成分主要有大豆异黄酮和大豆皂甙。大豆中大豆异黄酮主要以糖甙形式存在,并且大部分异黄酮糖甙均与丙二酰基结合形成丙二酰化大豆异黄酮糖甙。其极性介于低聚糖和皂甙之间。本法利用此极性特点进行异黄酮糖甙的分离。首先用正丁醇萃取大豆异黄酮和皂甙,后

采用 C_{18} 反相柱层析法分离大豆异黄酮糖甙。再将糖甙水解制备大豆异黄酮甙元,结果试样中异黄酮甙元纯度较高。

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^[9]。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^[10]。MTT 结果显示大豆异黄酮甙元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。倒置显微镜观察及 TUNEL 检测结果说明,大豆异黄酮甙元可诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡,促使结肠癌细胞发生凋亡。

凋亡的过程是程序化的、多基因调控的^[11]。与细胞凋亡相关的基因大致有 bcl-2 家族、p53、fas、c-myc、k-ras 表示等,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^[12]。在试验中,HT-29 细胞 p53 阳性率很高,大豆异黄酮甙元处理对其表达无影响;未测定磷酸化 p53 蛋白水平,所以不能排除大豆异黄酮甙元通过 p53 蛋白的磷酸化而调节其活性的可能性。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,bcl-2 基因及其蛋白产物都是重要的凋亡调节因素。bcl-2 蛋白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]。结果显示大豆异黄酮甙元组 bcl-2 蛋白表达明显减弱,bax 蛋白表达明显增强,bcl-2/bax 比值明显降低,说明大豆异黄酮甙元可下调 bcl-2 而上调 bax 的表达。这可能为大豆异黄酮甙元诱导结肠癌细胞凋亡的机制之一。

参考文献

- [1] 周建芹. 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究[J]. 大豆科学,2007,26(2):276-279. (Zhou J Q. Optimization of extraction technology of soybean isoflavones and its physiological activity analysis[J]. Soybean Science,2007,26(2):276-279.)
- [2] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone contents in commercial soybean foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(8):1666-1673.
- [3] Vedavanam K, Sriyanta 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] Tophkhane C, Yang S, Bales W, et al. Bcl-2 overexpression sensitizes MCF-7 cells to genistein by multiple mechanisms[J]. International Journal of Oncology, 2007, 31(4):867-874.
- [6] Chodon D, Ramamurty N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line[J]. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA, 2007, 21(5):887-891.
- [7] Dewell A, Weidner G, Sumner M D, et al. Relationship of dietary protein and soy isoflavones to serum IGF-1 and IGF binding proteins in the prostate cancer lifestyle trial[J]. Nutrition and cancer, 2007, 58(1):35-42.
- [8] 全吉淑, 沈明花, 柳明珠, 等. 大豆异黄酮苷元的提取及其抗血浆脂蛋白氧化作用[J]. 食品科技, 2008, 33(1):126-128. (Quan J S, Shen M H, Liu M Z, et al. Isolation of soy isoflavone aglycones and inhibition on oxidation of plasma lipoproteins[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(1):126-128.)
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Lu Q L, Poulosom R, Wong L, et al. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues[J]. The Journal of Pathology, 1993, 169(4):431-437.
- [12] Korsmeyer S J. Bcl-2 gene family and regulation of programmed cell death[J]. Cancer Research, 1999, 59(7s):1693-1700.
- [13] Song G, Mao Y B, Cai Q F, et al. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression[J]. Brazilian journal of Medical and Biological Research, 2005, 38(12):1791-1798.