

大豆胚轴体外诱导结肠癌细胞分化的研究

全吉淑¹, 许惠仙², 李 天¹, 尹学哲²

(1. 延边大学 基础医学院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 附属医院, 吉林 延吉 133000)

摘 要:用免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原 Ki-67 和 PCNA 蛋白表达, 分光光度法测定碱性磷酸酶(ALP) 和乳酸脱氢酶(LDH) 活性, ELISA 法测定癌胚抗原(CEA) 水平, 研究了富含大豆异黄酮和皂甙的大豆胚轴提取物(SHE) 对结肠癌细胞增殖和分化的影响。结果表明: 富含大豆异黄酮和皂甙的大豆胚轴提取物可时间和浓度依赖性降低结肠癌细胞 Ki-67 和 PCNA 表达, 增加细胞 ALP 活性。CEA 水平和 LDH 活性呈增高趋势, 但差异不具有统计学意义。表明富含大豆异黄酮和皂甙的大豆胚轴可抑制结肠癌细胞增殖和诱导细胞分化, 从而发挥抗结肠癌作用。

关键词:大豆; 胚轴; 异黄酮; 皂甙; 结肠癌; 增殖; 分化

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0121-03

Effect of Soybean Hypocotyls on Differentiation of Colon Carcinoma Cell HT-29 *in vitro*

QUAN Ji-shu¹, XU Hui-xian², LI Tian¹, YIN Xue-zhe²

(1. Basic Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin; 2. Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

Abstract: Soybean isoflavones and saponins have been observed to induce the differentiation of various tumor cells. The effects of soybean hypocotyl extract(SHE), rich in isoflavones and saponins, on the proliferation and differentiation of colon carcinoma HT-29 cells were investigated. The immunocytochemical method was used for the determination of Ki-67 and PCNA, the spectrometric method was used for the detection of alkaline phosphatase(ALP) and lactate dehydrogenase(LDH) activities, the ELISA method was used for the assay of CEA. Results showed that SHE reduced the expression of Ki-67 and PCNA, and increased the ALP activity of colon carcinoma cells in a time- and concentration-dependent manner. However, no significant treatment effect was found for CEA and LDH levels. It is suggested that soybean hypocotyl, rich in isoflavones and saponins, could exert an anti-colon cancer effect via inhibition of cell proliferation and induction of cell differentiation.

Key words: Soybean; Hypocotyls; Isoflavones; Saponins; Colon cancer; Proliferation; Differentiation

自 1978 年 Sachs^[1] 报告恶性肿瘤细胞可以转化为较成熟细胞以来, 诱导分化治疗已成为肿瘤学界关注的焦点之一, 有关分化诱导剂的研究及其应用已有大量报道。体外试验证明, 许多药理活性物质能够诱导多种癌细胞分化, 包括白血病和肺癌、绒毛膜癌、神经母细胞瘤等实体瘤细胞^[2-3]。大豆异黄酮和皂甙是大豆胚轴中重要生物活性成分。近年来, 大豆异黄酮和皂甙的药理作用研究成为热点, 有报道探索其抗氧化作用, 发现其具有清除氧自由基能力、抗病毒及保肝作用, 能防治心血管疾病^[4-5]。现已证实大豆异黄酮和皂甙均可诱导肿瘤细胞的周期改变和细胞凋亡, 从而抑制多种肿瘤细胞的增

殖^[6]。该文研究了大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞株 HT-29 的作用机制, 旨在探讨其对结肠癌细胞增殖及分化的影响, 为阐明大豆抗结肠癌的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 细胞株 HT-29 细胞购于南京凯基生物技术公司。

1.1.2 药物和试剂 大豆为中国东北产大豆。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

收稿日期: 2008-07-02

基金项目: 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)。

第一作者简介: 全吉淑(1968-), 女, 副教授, 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。

公司,兔抗人 Ki-67 单克隆抗体和 PCNA 单克隆抗体购自北京中衫金桥生物技术有限公司。碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒和乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,癌胚抗原 (CEA) ELISA 试剂盒购自上海锐聪科技发展有限公司。

1.1.3 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 高效液相色谱系统和 Waters 高效液相色谱系统、OLYMPUS 倒置显微镜、HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪、RT-2100 型酶标仪和 PD-2000 真彩色病理细胞图像分析仪。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆胚轴提取物的制备及其成分分析 将大豆胚轴用 50% 甲醇提取,提取液经喷雾干燥得粗粉。将粗粉用正丁醇萃取,得富含大豆异黄酮和皂甙的总糖甙试样。总糖甙试样用盐酸水,水解产物经乙酸乙酯提取,得富含大豆异黄酮和皂甙元的大豆胚轴提取物 (以下简称 SHE)。大豆异黄酮和皂甙元含量采用高效液相色谱法检测^[6]。

1.2.2 Ki-67 和 PCNA 的免疫细胞检测 结肠癌细胞培养于含 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,以 1×10^5 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。待细胞贴壁生长良好,吸去上清液,换含药培养基。SHE 组加入 SHE 使其终浓度分别为 40、80 和 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,阳性对照组和模型对照组分别加入 2% DMSO 和不含药物培养液。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各组细胞中 Ki-67 和 PCNA 表达。光镜高倍视野下观察切片,选取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,取其平均值作为各蛋白的阳性表达率。

1.2.3 ALP 活性的检测 取对数生长期的 HT-29 细胞按每孔 1×10^5 个接种于 24 孔板中。培养 24 h 待细胞贴壁后,将培养液吸出,换含药培养基。分别培养 48 和 72 h 后,倾去培养基,刮下细胞。然后用磷酸盐缓冲液洗 3 遍,加入裂解液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、1% Triton-X100),超声粉碎 1 min,低温离心取上清测定 ALP 活性,ALP 活性用蛋白质含量校正。

1.2.4 CEA 的 ELISA 检测 按照 1.2.3 节,在换含药培养基后,继续培养 48 和 72 h,收集细胞。裂解,离心,取上清。按试剂盒说明测定 CEA 含量,

CEA 用蛋白质含量校正。

1.2.5 LDH 活性的检测 另收集培养基,离心取上清。按照 LDH 试剂盒所示方法用乳酸脱氢酶释放法检测细胞毒活性。

1.3 数据分析

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 Ki-67 和 PCNA 表达的影响

Ki-67 和 PCNA 阳性表达定位于细胞核内,呈棕褐色。药物组细胞 Ki-67 和 PCNA 蛋白表达明显降低。即 Ki-67 和 PCNA 计数在对照组表达较多, SHE 组二者表达均有减少,以高剂量组表达最少,与对照组和中、低剂量组相比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。表明 SHE 可以抑制结肠癌细胞的增殖,并具有量效关系。

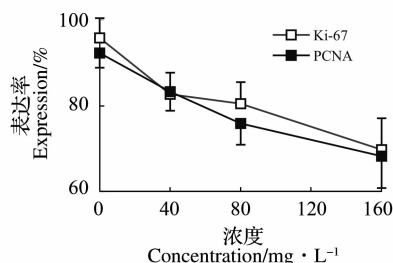


图 1 HT-29 细胞中 Ki-67 和 PCNA 的表达

Fig. 1 Expression of Ki-67 and PCNA in HT-29 cells

2.2 对 HT-29 细胞 ALP 活性的影响

分别培养 48 和 72 h 时,药物组 ALP 活性比对照组 (0 h) 明显增高,且表现出明显的时间和剂量依赖关系 (图 2)。上述 ALP 值在 65℃ 温育后即显著下降,表明升高的 ALP 为热不稳定型,即肠型 ALP。

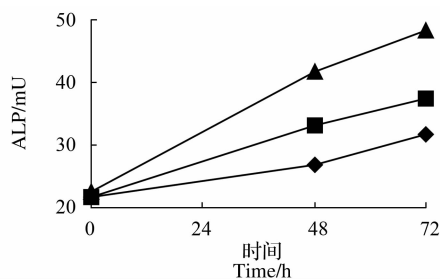
2.3 对 HT-29 细胞 CEA 水平的影响

SHE 对结肠癌细胞 CEA 水平的影响较小。随着时间的延长和浓度的增高,结肠癌细胞 CEA 水平有增高趋势,但差异不具有统计学意义,不呈现明显的时间和剂量效应 (表 1)。

表 1 SHE 对 HT-29 细胞 CEA 水平的影响

Table 1 Effect of SHE on CEA level of HT-29 cells

剂量 Concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CEA/ $\text{ng} \cdot \text{mg protein}^{-1}$	
	48 h	72 h
40	59.1 \pm 7.4	64.8 \pm 10.0
80	67.3 \pm 8.1	71.1 \pm 9.4
160	66.7 \pm 9.3	69.4 \pm 9.8



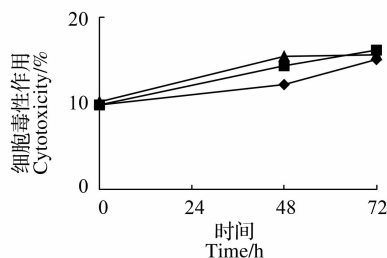
分别用 40(◆)、80(■)、160 mg·L⁻¹(▲)SHE 处理 0、48 和 72 h
Cells were incubated with 40(◆)、80(■) and 160 mg·L⁻¹(▲)
of SHE for 0,48 and 72 h

图2 SHE 对 HT-29 细胞 ALP 活性的影响

Fig.2 Effect of SHE on ALP activity of HT-29 cells

2.4 对 HT-29 细胞毒作用的影响

通过检测细胞培养基上清液中 LDH 活力判断其释放率,评价对结肠癌细胞的毒性作用。在所选浓度范围内,SHE 对结肠癌细胞的毒性作用随浓度增高和时间延长呈增强趋势,但差异不具有统计学意义,不呈现明显的时间和剂量效应(图3)。



分别用 40(◆)、80(■)、160 mg·L⁻¹(▲)SHE 处理 0、48 和 72 h
Cells were incubated with 40(◆)、80(■) and 160 mg·L⁻¹(▲)
of SHE for 0,48 and 72 h

图3 SHE 对 HT-29 细胞毒性作用的影响

Fig.3 Effect of SHE on cytotoxicity of HT-29 cells

3 讨论

目前认为,恶性肿瘤是一种以分化障碍为特征的遗传性细胞过度、自律增殖性疾病。抑制或降低肿瘤细胞的增殖活性,是肿瘤治疗的基本策略之一。增殖细胞核抗原 PCNA 和 Ki-67 是细胞周期特异性抗原,其表达水平反映细胞的实际增殖程度^[7]。该研究结果显示,PCNA 和 Ki-67 表达以对照组最多,药物组明显减少,表明 SHE 具有抑制结肠癌细胞增殖的作用,这与 MTT 检测结果相一致^[6]。

诱导分化是继手术、放疗和化疗后治疗肿瘤的一种新方法。它的基本机制是使肿瘤细胞向正常细胞分化,从而降低其恶性度。肿瘤细胞经有效诱导后可以具有正常细胞的功能,因此,可通过检测其功能的变化来衡量诱导是否成功^[8]。肠型 ALP 可在

正常肠粘膜细胞表达,而许多肿瘤细胞低表达或不表达。结肠癌细胞低表达肠型 ALP,用丁酸钠等细胞分化诱导剂可使结肠癌细胞分泌 ALP 升高。目前肠型 ALP 活力的上升被认为是诱导分化结肠癌细胞的重要指标^[9-10]。该研究表明,用 SHE 诱导 HT-29 细胞可使肠型 ALP 持续性升高,表明肿瘤细胞很可能已向正常细胞分化。此外,黏蛋白表达的升高也是结肠癌细胞分化的重要标志。但该试验未能观察到结肠癌细胞 CEA 水平的明显变化。SHE 对结肠癌细胞的诱导分化作用还需进一步探讨。

参考文献

- [1] Sachs L. The differentiation of myeloid leukaemia cells: New possibilities for therapy[J]. British Journal of Haematology, 1978, 40: 509-517.
- [2] 刘晓霞, 丰有吉. Genistein 对绒毛膜癌细胞增殖、分化、细胞周期和凋亡的影响[J]. 肿瘤, 2006, 26(8): 748-750. (Liu X X, Feng Y J. Effects of genistein on proliferation, differentiation, cell cycle, and apoptosis of choriocarcinoma cell line JAR[J]. Tumor, 2006, 26(8): 748-750.)
- [3] 张世国, 于雪艳, 孔立新, 等. 9-顺维甲酸对肺鳞癌细胞生长、分化及凋亡的作用[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(1): 73-76. (Zhang S G, Yu X Y, Kong L X, et al. Effects of 9- cis- retinoic acid on biological characteristics of lung squamous cancer cells [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2003, 28(1): 73-76.)
- [4] Quan J S, Yin X Z, Kanazawa T. Effect of soybean hypocotyl extract on lipid peroxidation in GK rats[J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2009, 44(3): 212-217.
- [5] Ishii Y, Tanizawa H. Effects of Soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones[J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29: 1759-1763.
- [6] 金梅花, 许惠仙, 金花, 等. 大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞增殖和凋亡的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1028-1031. (Jin M H, Xu H X, Jin H, et al. Effect of soybean isoflavones and saponins on proliferation and apoptosis of colon carcinoma cell HT-29 [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1028-1031.)
- [7] Fan Y Z, Fu J Y, Zhao Z M, et al. Effect of norcantharidin on proliferation and invasion of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells[J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11: 2431-2437.
- [8] Friend C, Scher W, Holland J G, et al. Hemoglobin synthesis in murine virus- induced leukemia cells in vitro; stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971, 68: 378-379.
- [9] Herz F, Halwer M. Differential effects of sodium butyrate and hyperosmolarity on the modulation of alkaline phosphatases of LoVo cells[J]. Experimental Cell Research, 1990, 188: 50-54.
- [10] Stich H F, Brunnemann K D, Mathew B, et al. Chemopreventive trails with vitamin A and β- carotene; some unresolved issues[J]. Preventive Medicine, 1989, 18: 732-730.