



大豆苷元及其苯磺酸酯衍生物对肺癌细胞增殖和凋亡的影响

王晓波¹, 熊小伟¹, 朱玉华^{1,3}, 彭游², 汪鑫¹, 黄邵鑫¹

(1. 九江学院 基础医学院, 江西 九江 332000; 2. 九江学院 江西省生态化工工程技术研究中心, 江西 九江 332005; 3. 九江学院 临床医学院, 江西 九江 332000)

摘要:为研究大豆苷元及其3种苯磺酸酯衍生物对非小细胞肺癌细胞的增殖和凋亡的影响,利用CCK-8检测大豆苷元及衍生物处理A549、H1299和HELFL细胞后细胞活性的时间-效应关系和剂量-效应关系,并通过Tunel流式细胞术检测衍生物B处理的细胞凋亡情况,RT-qPCR分析TP53和Caspase9 mRNA表达。结果表明:在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围时,加入大豆苷元的浓度每增加10倍,肺正常HELFL细胞的活性增加16.11% [95% CI 13.74, 18.49] ($P < 0.001$),肺癌A549与H1299细胞活性则分别降低3.26% ($P < 0.001$)、3.33% ($P < 0.001$);加入衍生物B的浓度每增加10倍,HELFL细胞的活性增加9.92% ($P < 0.001$),A549和H1299细胞活性降低5.23% ($P < 0.001$)、4.32% ($P < 0.001$)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆苷元浓度下,作用时间每延长1 h,HELFL细胞活性增加1.87% ($P < 0.001$),A549和H1299细胞活性分别降低1.30% ($P < 0.001$)、1.75% ($P < 0.001$),苯磺酸酯衍生物B对HELFL细胞活性增加1.72% ($P < 0.001$),A549和H1299细胞降低1.46% ($P < 0.001$)、2.07% ($P = 0.001$)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的衍生物B处理6 h后,HELFL细胞相对数量增加了42.66% ($P = 0.03$),A549和H1299细胞相对数量减少20.67% ($P = 0.035$)、18.33% ($P = 0.043$)。衍生物B促进A549和H1299细胞的凋亡的作用约为对照组的1.15倍 ($P < 0.001$)、1.24倍 ($P = 0.001$),抑制HELFL细胞的凋亡作用为对照组的0.84倍 ($P = 0.005$)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 衍生物B处理时肺癌和肺正常细胞的TP53和Caspase9的mRNA表达比对照组高。研究表明:大豆苷元及其3种苯磺酸酯衍生物能够抑制肺癌细胞的增殖活性的同时,增加肺正常细胞增殖活性,大豆苷元苯磺酸酯衍生物B能促进肺癌细胞凋亡并抑制肺正常细胞凋亡,其机制可能与通过P53通路诱导癌细胞凋亡有关。

关键词:大豆苷元;苯磺酸酯衍生物;肺癌细胞;增殖;凋亡

Effects of Daidzein and Its Phenylsulfonate Derivatives on Proliferation and Apoptosis of Lung Cancer Cells

WANG Xiao-bo¹, XIONG Xiao-wei¹, ZHU Yu-hua^{1,3}, PENG You², WANG Xin¹, HUANG Shao-xin¹

(1. School of Basic Medical Science, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China; 2. Jiangxi Province Engineering Research Center of Ecological Chemical Industry, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 3. Clinical College of Medicine, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China)

Abstract: In order to study the effects of daidzein and their three phenylsulfonate derivatives on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, *in vitro* experiments were conducted on the treatment of A549, H1299 and HELFL cells by daidzein and their three derivatives with $1.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 0-24 h treatment. CCK-8 was used to detect cell activity and apoptosis was detected by Tunel assay. RT-qPCR was used to verify the speculate that these effects maybe involved in TP53 and Caspase9. The results showed that, for the concentration range of $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, when the concentration of daidzein and derivative B was increased 10 times repectively, the proliferation of lung cancer cells could be inhibited to 3.26% ($P < 0.001$), 5.23% ($P < 0.001$) in A549 cells and 3.33% ($P < 0.001$), 4.32% ($P < 0.001$) in H1299 cells, while they were promoted 16.11% [95% CI 13.74, 18.49] ($P < 0.001$), 9.92% ($P < 0.001$) in HELFL cells. By treatment with 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of daidzein and derivative B from 0 to 24 h, HELFL cells were promoted to 1.87% ($P < 0.001$), 1.72% ($P < 0.001$) for every hour extent, while A549 cells were inhibited to 1.30% ($P < 0.001$), 1.46% ($P < 0.001$) and H1299 cells were inhibited to 1.75% ($P < 0.001$), 2.07% ($P = 0.001$) respectively. The relative counts of HELFL cells increased by 42.66% ($P = 0.03$), and the counts of H1299 cells decreased by 18.33% ($P = 0.043$) and A549 cells decreased by 20.67% ($P = 0.035$), when treated with 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ derivative B for 6 h. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ derivative B could promote A549 and H1299 cells to apoptosis with 1.15 times ($P < 0.001$) and 1.24 times ($P = 0.001$), and protect HELFL cells out of apoptosis with 0.84 times ($P = 0.005$). The mRNA expression of TP53 and Caspase9 were up-regulation in three cells. To a conclusion, daidzein and their 3 derivatives can inhibit the proliferation of lung cancer cells, and the effect is related to the concentration and time of treatment. derivative B can promote the apoptosis of lung cancer cells. The proliferation of lung cancer cells may be associated with the induction of apoptosis such as TP53 and Caspase9.

Keywords: Daidzein; Phenylsulfonate derivatives; Lung cancer cells; Proliferation; Apoptosis

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(81360447, 81660535, 81660541)。

第一作者简介: 王晓波(1990-), 男, 硕士, 主要从事流行病学与卫生统计学研究。E-mail: 1181894471@qq.com。

通讯作者: 汪鑫(1966-), 男, 硕士, 教授, 主要从事分子流行病学研究。E-mail: wangxin0072@126.com;

黄邵鑫(1985-), 男, 博士, 副教授, 主要从事化合物健康评价研究。E-mail: 517159865@qq.com。

大豆异黄酮(soybean isoflavones)是大豆生长过程中形成的次级代谢产物,是大豆中重要的生理活性物质^[1]。大豆异黄酮主要以游离型的苷元和结合型的糖苷2种形式存在,其中苷元占总量的2%~3%,包括染料木素(genistein)、大豆苷元(daidzein)和黄豆黄素(glycitein)^[1]。

大豆苷元具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多项功能^[2-3]。大豆苷元进入体内后,7位羟基能够和葡萄糖结合,然后转化为大豆苷元-7-O-葡萄糖苷酸失去活性,保护大豆苷元中的羟基就有可能提高疗效^[4]。同时大豆苷元(daidzein,4',7-二羟基异黄酮)具有明显的抗肿瘤、抗高脂血症、抗炎等功效^[5]。

虽然大豆苷元具有诸多生物学功效,但是大豆苷元水溶性差,生物利用度低,难以达到理想的效果。因此,以大豆苷元为先导化合物,利用药团变换原理对其进行修饰,能够从根本上改善其溶解性和代谢稳定性,对于增强其活性具有重要的意义^[4]。为了提高大豆苷元的水溶性进而提高其生物利用度,实验室前期利用大豆苷元为原料,利用药团变换原理对其进行修饰,对分子结构进行修饰,合成了大豆苷元苯磺酸的3种衍生物,改变其溶解性^[6]。经修饰后的大豆苷元苯磺酸酯,提高了大豆苷元的水溶性和生物利用度。增加了药物的脂溶性,使其易于穿越组织细胞和血脑屏障,提高了药物的生物利用度^[7]。

近年来,大豆苷元的抗肿瘤效应受到广泛关注^[8]。肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,也是恶性肿瘤死亡的主要原因^[9]。非小细胞型肺癌是肺癌最常见的类型,约占所有肺癌患者的80%~85%^[10]。膳食因素在肿瘤的发生与发展过程中起着重要作用,其中大豆及其制品对肿瘤的影响成为目前研究的热点^[11]。研究显示,食用大豆及其制品可能是导致亚洲国家居民恶性肿瘤发病率低的主要原因^[12]。大豆中的植物化学物大豆异黄酮游离糖苷一大豆苷元是其保护作用的主要活性成分^[13]。大豆苷元能够抑制乳腺癌、结直肠癌及胃癌的发生,而且大豆苷元在乳腺癌、胃癌和前列腺癌发生发展的多个过程中都有抑制作用^[2,11]。也有研究认为大豆苷元能促进肿瘤细胞的凋亡,可能是抑制肿瘤增殖的机制有关,Giuseppa等^[14]认为癌细胞程序性凋亡是抑制肿瘤的抑制重要的途径。*TP53*和*Caspase9*基因是重要的抑癌基因,*TP53*是肿瘤抑制基因,并通过其通路一系列调控过程发挥抗肿瘤功

能^[15]。*Caspase9*是线粒体凋亡通路的凋亡启动子蛋白酶,在多蛋白激活通路上被激活^[16]。

本研究探索大豆苷元及其3种苯磺酸酯衍生物的抗肿瘤作用效应,通过分析大豆苷元及其3种衍生物对肿瘤细胞增殖和凋亡的效用,初步确定大豆苷元及其3种苯磺酸酯衍生物的作用浓度和作用时间,探索大豆苷元及苯磺酸酯类衍生物抗肿瘤作用与常见的凋亡通路基因的表达差异,为进一步深入探索大豆苷元抗肿瘤的具体作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 大豆苷元(陕西慧科植物开发有限公司,纯度>98%);DMEM高糖培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司);0.25%胰酶-EDTA消化液(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司);红色荧光Tunel细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司);PCR试剂盒(北京全式金生物)。

1.1.2 细胞株 人非小细胞肺癌A549、H1299细胞和肺正常细胞HELFI细胞株由武汉大学提供,培养液选择含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖培养基,培养于含5%CO₂的37℃培养箱中。

1.1.3 仪器 CO₂恒温培养箱(美国ESCO公司),倒置相差显微镜(日本Olympus Corporation),Biotek Eon酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),QPCR仪(德国艾本德Eppendorf公司),实时荧光定量PCR仪(美国伯乐公司),电泳仪(北京六一生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 大豆苷元苯磺酸酯衍生物的合成 大豆苷元苯磺酸酯衍生物由本实验室合成^[7],取0.1016g大豆苷元于10mLDMF中,加入0.01g叔丁醇钾,于-20℃在Ar保护下分别滴加0.1694g苯磺酰氯。保温2.5h后过滤,滤液减压旋干,柱层析纯化得到纯品的衍生物A。减量滴加苯磺酰氯选择性酯化达到衍生物B。取0.1576g衍生物B于10mL丙酮中,加入0.1g碳酸钾、0.15mL硫酸二甲酯,在45℃反应5h后过滤,滤液减压旋干,柱层析纯化得到纯品C。

本研究利用大豆苷元和3种苯磺酸酯衍生物作为处理因素,分别为大豆苷元苯磺酸酯衍生物A(大

豆昔元-4',7-二苯磺酸酯)、大豆昔元苯磺酸酯衍生物 B(大豆昔元-4'-羟基-7-苯磺酸酯)、大豆昔元苯磺酸酯衍生物 C(大豆昔元-4'-乙酰氧基

-7-苯磺酸酯)(图 1)。以下简称为衍生物 A(DDA)、衍生物 B(DDB)和衍生物 C(DDC)。

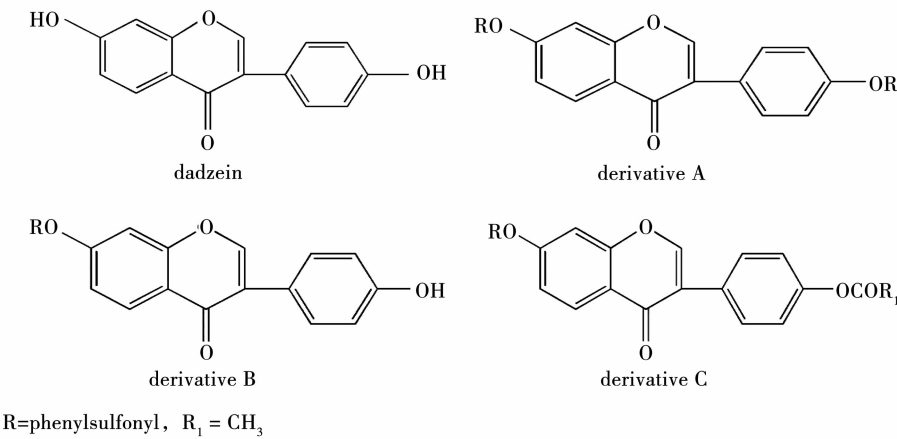


图 1 大豆昔元及 3 种苯磺酸酯衍生物结构图

Fig. 1 Structure diagram of daidzein and three phenylsulfonate derivatives

1.2.2 细胞培养 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化 A549、H1299、HEL F 细胞,用 DMEM 高糖培养基制备单细胞悬液,以 1×10^5 个·mL⁻¹ 的细胞悬液接种于 96 孔板,每孔共 100 μ L 的细胞悬液。将 96 孔培养板置于细胞培养箱中培养,培养 24 h。待细胞贴壁后,弃去培养基,每孔加入用培养基配制好的大豆昔元及 3 种衍生物溶液 100 μ L,大豆昔元及衍生物溶液的浓度分别为 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10, 100, 1 000 μ mol·L⁻¹。同时设置 DMSO 的对照孔,每个处理组分别设 5 个复孔,利用排枪上样,继续培养 6 h。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 细胞活力测定 分别以 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10, 100, 1 000 μ mol·L⁻¹ 的大豆昔元及 3 种苯磺酸酯衍生物处理肺癌 A549 细胞、H1299 细胞和肺正常细胞 HELF 细胞 6 h,用 10 μ mol·L⁻¹ 的大豆昔元及 3 种衍生物分别处理 A549 细胞、H1299 和 HELF 细胞 0, 1, 3, 6, 12, 24 h,采用 CCK-8 方法进行细胞活性检测。测量前更换新的培养基 90 μ L,每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,放入培养箱中 6 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度值,记录结果。细胞的存活率以 T/C% 表示,T 为加药细胞的吸光度值,C 为对照细胞的吸光度值。细胞存活率(%)=(加药细胞吸光度/对照细胞吸光度)×100。

1.3.2 大豆昔元对细胞凋亡的影响检测 收集对数期生长的 A549、H1299 和 HELF 细胞,将细胞接种至 96 孔板,细胞数量约为 4×10^4 个·孔⁻¹,培养 24 小时。以加入溶剂对照组(DMSO)的细胞为空白

对照,加入终浓度为 10 μ mol·L⁻¹ 的衍生物 B 处理细胞 6 h,每组重复 3 次。移去细胞培养基,每孔加入 100 μ L 的 4% 多聚甲醛固定缓冲液至 96 孔板,室温孵育 30 min,除去多聚甲醛固定缓冲液,PBS 冲洗 3 次。每孔加入反应混合液 50 μ L,37℃ 孵育 1 h,去掉反应混合液,PBS 冲洗 3 次,加入 200 μ L·孔⁻¹ 的 PBS,在 570 nm 波长下用酶标仪检测荧光强度。

1.3.3 RT-qPCR 将 3 种细胞培养于含 10 μ mol·L⁻¹ 的衍生物 B 的 6 孔板中处理 6 h,吸去培养液,用 PBS 冲洗 3 次,加入 1 mL 的 TRIzol 提取总 RNA。加入反应试剂合成 cDNA 后,加入试剂盒与引物进行 qPCR。引物序列: TP53, 正向: 5'-TTATCTGT-TCACTTGTGCCC-3', 反向: 5'-TCATGTGCTGTGAC-TGCTTG-3'; Caspase9, 正向: 5'-GCCAACCCTAGAA-AACCTTACCC-3', 反向: 5'-TCACCAAATCCTCCA-GAACCAA-3'; β -actin, 正向: 5'-GCCCAGAGCAA-GAGAGGTAT-3', 反向: 5'-GGCCATCTCTTGCTCG-AAGT-3'。反应后产物用 1% 琼脂糖凝胶、0.5% TBE、100 V、100 mA 电泳 50 min。

1.3.4 肺癌中 TP53 和 Caspase9 基因表达以及生存率分析 利用 oncolnc 网站(<http://www.oncolnc.org/>)分析 TCGA 数据库的信息,分别获得 TCGA 数据库中的具有完整的基因序列和拷贝数变异资料的 TP53 基因 491 例与 Caspase9 基因 492 例非小细胞肺癌患者,应用 survival 选项分析样本中的 TP53 和 Caspase9 基因表达与生存时间的 Kaplan-Meier 关系图。

1.4 数据分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,结果以均

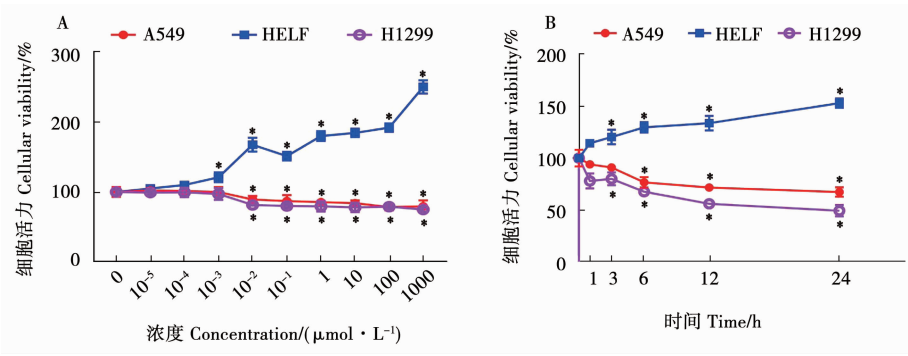
数[95% CI]表示,多组间比较采用重复测量方差分析、单因素方差分析和 q 检验,与对照组比较采用 Dunnett 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 检验法。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的判断标准。

2 结果与分析

2.1 大豆苷元及衍生物对细胞活力的影响

2.1.1 不同大豆苷元浓度和时间处理对 3 种细胞活力的影响 在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围,大豆苷元的浓度每提高 10 倍,HEL F 细胞的活

力平均增加 16.11% [95% CI 13.74, 18.49] ($P < 0.001$),A549 细胞活力则降低了 3.26% [95% CI -4.07, -2.45] ($P < 0.001$),H1299 细胞活力则降低 3.33% [-4.28, -2.38] ($P < 0.001$)(图 2A)。在 0~24 h,大豆苷元对 HELF 细胞活力有促进作用,1 h 平均增长 1.87% [1.41, 2.32] ($P < 0.001$),对 A549 和 H1299 细胞活力有抑制作用,每增加 1 h,A549 细胞活力降低 1.30% [-1.73, -0.86] ($P < 0.001$),H1299 细胞活力降低 1.75% [-2.34, -1.17] ($P < 0.001$)(图 2B)。



A:处理 6 h 下 3 种细胞的活性; B:10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下的 3 种细胞活性随时间变化趋势。
“*”表示与相应的对照相比差异显著($P < 0.05$)。下同。
A:Trends of viability of three kinds of cells treated for 6 h; B:Trends of viability of three kinds of cells treated with 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ along with the time. “*” indicates that the difference of the corresponding control is significant ($P < 0.05$). The same below.

图 2 3 种细胞活力随不同浓度和时间处理的变化趋势

Fig. 2 Trends of the effects of daidzein on the activity of three kinds of cells along with different concentration and time treatments

2.1.2 不同衍生物 A 浓度和时间处理对 3 种细胞活力的影响 衍生物 A 对 HELF 的活力促进较强,平均每增加 10 倍浓度时,活力增强 9.15% [4.65, 13.65] ($P = 0.002$),对 A549 细胞的抑制作用约为 2.0% [-3.37, -2.16] ($P < 0.001$),对 H1299 细胞的抑制作用约为 2.91% [-4.14, -1.68] ($P =$

0.001)(图 3A)。时间趋势中,作用时间每增加 1 h,衍生物 A 对 HELF 细胞活力的促进作用约为 6.32% [2.72, 9.93] ($P = 0.008$),对 A549 细胞 (0.48%, $P > 0.05$) 和 H1299 细胞 (0.53%, $P > 0.05$) 的抑制作用无显著差异(图 3B)。

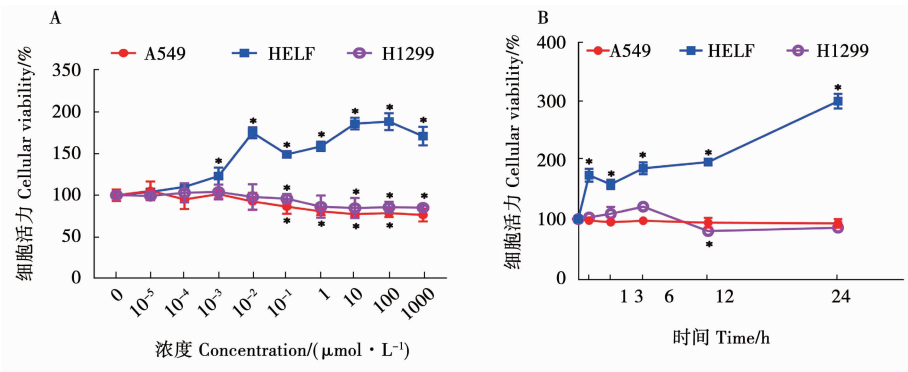


图 3 3 种细胞活力随衍生物 A 不同浓度和时间的变化趋势

Fig. 3 Trends of the effects of derivative A on the activity of three kind of cells along with different concentration and time treatments

2.1.3 不同衍生物 B 浓度和时间处理对 3 种细胞活力的影响 每增加 10 倍浓度的衍生物 B, HELF 细胞的活力增强 9.92% [7.49, 12.35] ($P < 0.001$)。衍生物 B 对肺癌细胞有活性抑制作用,对 A549 和 H1299 活力抑制效应分别为 5.23% [-5.93, -4.52] ($P < 0.001$)与 4.32% [-5.37,

-3.262] ($P < 0.001$) (图 4A)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度衍生物 B 作用 3 种细胞的不同时间中, HELF 细胞的活性平均 1 h 增加 1.72% [1.18, 2.27] ($P < 0.001$),对肺癌细胞 A549 和 H1299 的抑制效应分别为 1.46% [-1.88, -1.04] ($P < 0.001$)和 2.07% [-2.47, -1.67] ($P = 0.001$) (图 4B)。

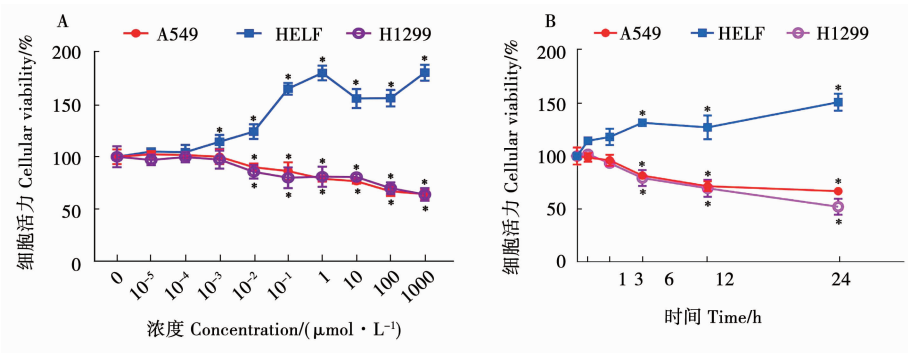


图 4 3 种细胞活力随衍生物 B 不同浓度和时间的变化趋势
Fig. 4 Trends of the effects of derivatives B on the activity of three kinds of cells along with different concentration and time treatments

2.1.4 不同衍生物 C 浓度和时间处理对 3 种细胞活力的影响 衍生物 C 浓度平均每增加 10 倍, HELF 细胞活力增强 4.82% [4.46, 5.19] ($P < 0.001$), H1299 细胞活力被抑制 5.65% [-7.48, -3.81] ($P < 0.001$),对 A549 细胞的抑制作用无显著差异 0.51% ($P > 0.05$) (图 5A)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓

度衍生物 C 处理中,衍生物 C 每增加 1 h, HELF 细胞活力增加 2.14% [-2.47, -1.67] ($P < 0.001$),同时, H1299 的细胞活力降低 1.78% [-2.72, -0.84] ($P = 0.001$), A549 的细胞活力降低 0.43% [-0.85, -0.01] ($P = 0.049$) (图 5B)。

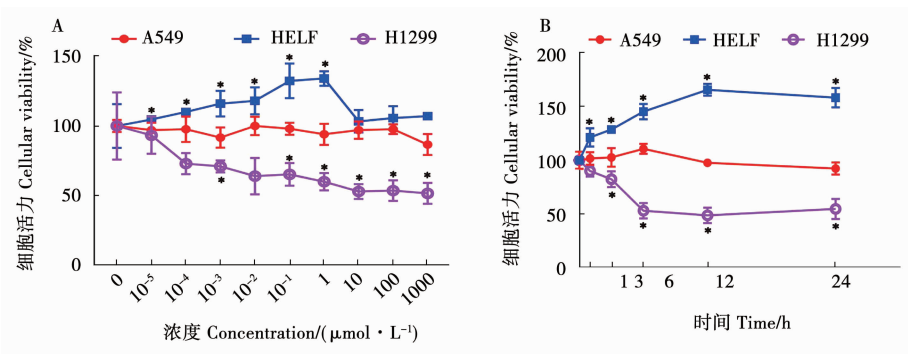


图 5 3 种细胞活力随衍生物 C 不同浓度和时间的变化趋势
Fig. 5 Trends of the effects of derivatives C on the activity of three kinds of cells along with different concentration and time treatments

由以上试验结果显示,相比大豆苷元,衍生物 B 对 A549 和 H1299 细胞增力抑制作用更明显。合成的大豆苷元苯磺酸酯衍生物 B 的水溶性改变后,其仍对肺正常细胞有增殖促进作用、对肺癌细胞有增殖抑制作用。

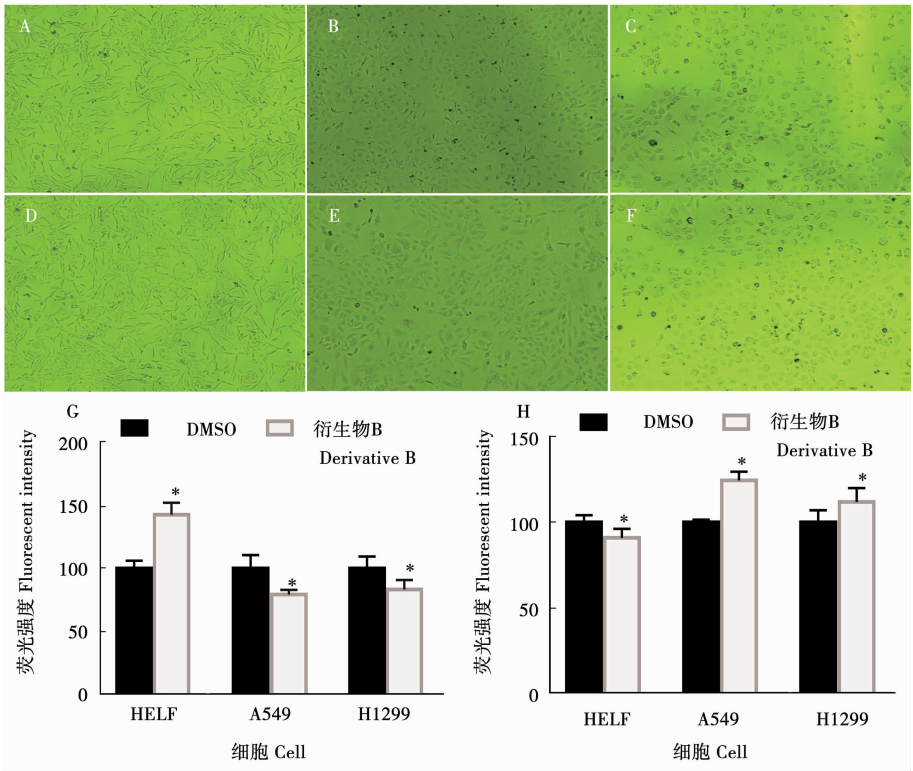
2.2 大豆苷元苯磺酸酯衍生物 B 对 3 种细胞增殖和凋亡的影响

加入 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 衍生物 B 处理 6 h 后, HELF

细胞生长密度增多, A549 细胞和 H1299 细胞相对密度明显减少。衍生物 B 处理的 HELF 细胞相对数量增加了 42.66% [33.05, 52.28] ($P = 0.030$), A549 细胞相对数量减少了 20.67% [-24.46, -16.88] ($P = 0.035$), H1299 细胞相对数量减少了 18.33% [-23.46, -13.20] ($P = 0.043$) (图 6G)。衍生物 B 能够促进肺癌 A549 细胞的凋亡,同时抑制了 HELF 细胞的凋亡。促进 A549 细胞的凋亡的

作用约为对照组的 1.15 倍 [20.00, 28.66] ($P < 0.001$),促进 H1299 细胞的凋亡的作用为对照组的 1.24 倍 [19.57, 29.80] ($P = 0.001$),抑制 HELF 细

胞的凋亡作用为对照组的 0.84 倍 [- 14.58, - 3.42] ($P = 0.005$) (图 6H)。



A ~ F 为 100 倍显微镜下细胞形态图。A:未处理的 HELF 细胞;B:未处理的 A549 细胞;C:未处理 H1299 细胞 ;D:衍生物 B 处理后的 HELF 细胞;E:衍生物 B 处理后的 A549 细胞;F:衍生物 B 处理后的 H1299 细胞;G:3 种细胞相对细胞计数;H:Tunel 法检测 3 种细胞的凋亡。

A-F are the morphology of the cells seen under a 100-fold microscope. A:Untreated HELF cells;B: Untreated A549 cells;C:Untreated H1299 cells;D:HELF cells treated with 10 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ derivative B for 6 h;E:A549 cells treated with 10 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ derivative B for 6 h;F:H1299 cells treated with 10 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ derivative B for 6 h;G:The relative cell count;H:The apoptosis of the three cells detected by the derivative B TUNEL method.

图 6 衍生物 B 对肺癌及肺正常细胞生长与凋亡的影响

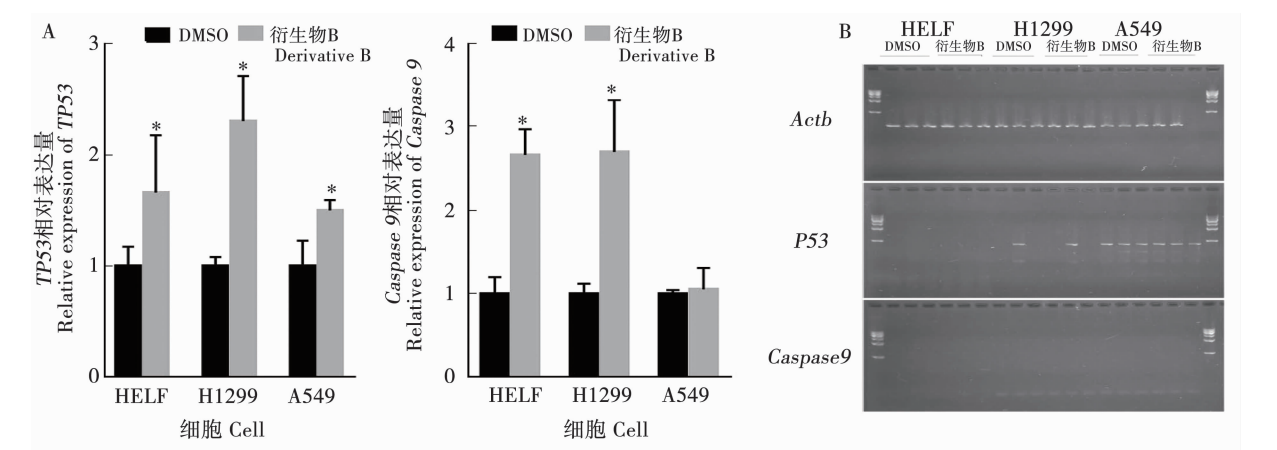
Fig. 6 Effect of derivative B on growth and apoptosis of lung cancer and normal lung cells

2.3 衍生物 B 对 P53 凋亡通路中 TP53 和 Caspase9 基因的影响

在衍生物 B 处理后,HELF、H1299 和 A549 细胞中 TP53 mRNA 的表达量是对照组的 1.6 倍 [1.12, 2.14] ($P < 0.05$)、2.3 倍 [1.47, 3.57] ($P < 0.05$)和 1.5 倍 [1.07, 3.57] ($P < 0.05$)。与对照组相比,Caspase9 在 HELF 细胞中的表达量为 2.66 倍 [1.56, 2.03] ($P < 0.05$),在 H1299 细胞中为 2.7 倍 [1.56, 4.97] ($P < 0.05$) (图 7A)。反应产物在 1%

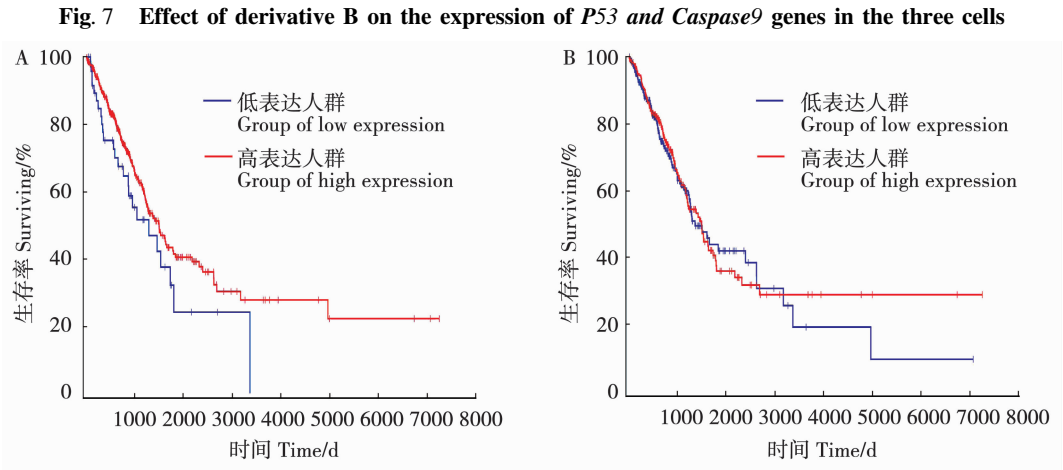
琼脂糖凝胶中电泳结果与 PCR 结果的趋势一致(图 7B)。

TP53 和 Caspase9 基因是肿瘤 P53 凋亡通路中的重要基因。通过 TCGA 数据库的数据分析,在肺癌患者中,TP53 和 Caspase9 基因 mRNA 高表达与低表达组之间的生存曲线如图 5 所示。TP53 基因的高表达组与低表达组相比生存时间更长(Logrank $P = 0.0832$) (图 8A)。不同处理间 Caspase9 的表达量没有明显的差异(Logrank $P = 0.767$) (图 8B)。



A: RT-qPCR results; B: 10% agarose gel electrophoresis results of PCR products. * means there exist significant difference between treatments.

图7 衍生物 B 对 3 种细胞中 P53 和 Caspase9 基因表达的影响



A 图低表达人群样本数为 N = 49, 高表达人群样本数为 N = 442; B 图低表达人群样本数为 N = 246, 高表达人群样本数为 N = 246。
Sample numbers of low and high expression group in A are N = 49 and N = 442 respectively; Sample number of low and high expression group in B are N = 246 and N = 246 respectively.

图8 TP53 (A) 与 Caspase9 (B) 基因表达的生存分析

Fig. 8 Survival analysis of TP53 (A) and Caspase9 (B) gene expression

3 讨论

相关研究表明:大豆异黄酮的摄入能够预防乳腺癌、胃癌、结直肠癌的发病^[5,17],郑峰等^[3]和曾靖等^[18]的研究均表明大豆苷元能够抑制肝癌、前列腺癌和乳腺癌细胞的增殖和促进细胞的凋亡。流行病学研究提示,豆类食品能够影响肺癌的发生和发病,然而通过体外试验探讨大豆苷元及其衍生物对肺癌细胞的影响目前鲜有报道。本研究探讨了大豆苷元及其 3 种苯磺酸酯衍生物对肺癌细胞增殖活性的剂量 - 效应关系以及时间 - 效应关系。研究结果显示,大豆苷元及 3 种衍生物对肺癌细胞活性有降低作用,能增加正常肺细胞的活性。且在大豆

苷元和 3 种衍生物中,大豆苷元对正常肺细胞增殖的功能最强,衍生物 B 对 A549 细胞增殖活性的抑制作用最强。衍生物 C 对 H1299 细胞活性抑制作用效应最大。大豆苷元和 3 种衍生物对正常肺细胞 HELF 细胞的增殖活性有促进作用,对肺腺癌细胞 A549 和 H1299 细胞的活性有抑制作用,且这种作用随浓度和时间的增加,效应也会随之增强。而且,和大豆苷元相比较,3 种衍生物的作用功效也有细微的变化。以上结果说明:大豆苷元分子结构改变,其功能强度也发生了变化,但是其对肺癌细胞的活性抑制和对正常肺细胞活性的促进功能并未发生本质的改变。尤其是衍生物 B,在弥补了大豆苷元水溶性差的基础上,其抑制肺癌细胞的功效得

到了加强。衍生物 C 对 A549 细胞的增殖活性失效,而依然具有明显的抑制肺癌 H1299 细胞增殖的效应,说明不同修饰结构的大豆苷元衍生物其功能效应不同,不同修饰结构可能会改变细胞信号通路的受体结合位点从而激活不同的信号通路。

大豆异黄酮能够抑制乳腺癌和结直肠癌的增殖并促进其凋亡^[19-20]。本研究显示:经大豆苷元苯磺酸酯衍生物 B 处理后的正常肺细胞 HELF 细胞生长密度增加,H1299 细胞和 A549 细胞增殖活性受到抑制,这与细胞活性检测结果一致。Tunel 法检测到衍生物 B 促进了 A549 和 H1299 细胞的凋亡,抑制 HELF 细胞的凋亡,说明大豆苷元对肺癌细胞的作用机制与凋亡有关。不同衍生物对 A549 和 H1299 肺癌细胞作用强度不同,可能与两种细胞的基因表达存在差异有关,因为 H1299 细胞是来源于淋巴结转移,细胞均一性的部分缺失 P53 蛋白,并缺少 P53 蛋白表达^[21-22]。

P53 凋亡通路与大豆苷元对非小型肺癌细胞和正常肺细胞的抑制增殖活性和促进凋亡作用有关联,其中 *TP53* 和 *Caspase9* 是常见的 P53 通路基因^[14,23]。大豆苷元对乳腺癌细胞的凋亡作用与 *Caspase* 有关联^[24]。通过 TCGA 数据库信息分析,绘制肺癌患者中 *TP53* 和 *Caspase9* 基因高表达和低表达组之间的生存曲线,*TP53* 高表达组的生存时间更长,而 *Caspase9* 基因的高表达与低表达组生存时间并未有明显的差异。研究表明:大豆苷元通过 P53 通路基因 - *Caspase* 与 *P53* 基因对乳腺癌细胞的增殖凋亡起作用^[17]。本次研究中,在 HELF、H1299 和 A549 细胞中加入大豆苷元苯磺酸酯衍生物 B 后,*TP53* 的 mRNA 的表达明显增高。*Caspase9* 的 mRNA 在 HELF 和 H1299 细胞中的表达同样是在衍生物 B 处理组增高,但是在 A549 细胞中衍生物 B 处理组与对照组之间并无差异。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳试验中,PCR 结果与电泳结果一致。以上结果说明,与对照组相比较,大豆苷元苯磺酸酯衍生物 B 处理后的 HELF、H1299 和 A549 细胞的 *P53* 和 *Caspase9* 基因表达确实发生了改变,大豆苷元和衍生物对肺癌细胞及肺正常细胞的增殖活性与凋亡作用的影响可能与 *TP53* 和 *Caspase9* 有关。

综上所述,本项研究发现大豆苷元及其 3 种衍生物能够降低非小型细胞肺癌细胞 A549 和 H1299 细胞的增殖活性,并促进肺正常细胞 HELF 细胞的

增殖活性,衍生物 B 能够促进肺癌细胞的凋亡和抑制肺正常细胞凋亡。结合 TCGA 数据库分析,对可能涉及的基因表达进行研究,将为进一步的研究提供理论依据。此项研究中大豆苷元苯磺酸酯衍生物对肺癌细胞的作用虽未达到成药浓度,但是该研究可以对肺癌人群膳食指导以及后期针对大豆苷元的苯磺酸衍生物的保健品开发提供理论基础。后续将结合动物试验和人群流行病学的数据进行进一步验证其作用效应,同时探讨其效应的分子学机制。

4 结 论

(1)大豆苷元及其 3 种衍生物能够促进肺正常 HELF 细胞的增殖,抑制非小细胞肺癌 A549 和 H1299 细胞的增殖,其作用效应存在时间 - 剂量反应关系。

(2)大豆苷元衍生物 B 对肺正常 HELF 细胞、肺癌细胞 A549 细胞和 H1299 细胞的增殖凋亡作用与 *P53* 通路有关。且能够促进 HELF、A549 和 H1299 细胞的 *TP53* 基因的表达,并能够抑制 HELF 和 H1299 细胞 *Caspase9* 基因的表达。

(3)TCGA 数据分析发现 *TP53* 基因高表达的肺癌患者生存率更高,由此可推测大豆苷元及其衍生物能够提高肺癌患者的生存率。

参考文献

- [1] Szeja W, Gryniewicz G, Rusin A. Isoflavones, their glycosides and glycoconjugates. Synthesis and Biological Activity[J]. Current Organic Chemistry, 2017, 21(3): 218-235.
- [2] Zaheer K, Humayoun A M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1280-1293.
- [3] 郑峰,金延华,何鑫,等. 大豆异黄酮和皂甙对 H22 小鼠肝癌移植瘤的生长抑制及促细胞凋亡作用[J]. 大豆科学, 2016, 35(3): 494-497. (Zheng F, Jin Y H, He X, et al. Anti-tumor and pro-apoptotic effects of soy isoflavones and saponins on h22-bearing mice[J]. Soybean Science, 2016, 35(3): 494-497.)
- [4] Peng Y, Shi Y, Zhang H, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of daidzein and its sulfonic acid ester derivatives [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 635-640.
- [5] Reger M K, Zollinger T W, Liu Z, et al. Dietary intake of isoflavones and coumestrol and the risk of prostate cancer in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial[J]. International Journal of Cancer, 2018, 142(4): 719-728.
- [6] 彭游,付小兰,邓泽元. 新型大豆异黄酮磺酸酯的临床前药物动力学[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2932-2935.

- (Peng Y, Fu X L, Deng Z Y. Pre-clinical pharmacokinetics of novel soybean isoflavone sulfonate[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(12): 2932-2935.)
- [7] 彭游, 邓泽元, 叶兴琳. 异黄酮衍生物的设计, 合成与抗肿瘤活性[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 796-799. (Peng Y, Deng Z Y, Ye X L. Design, synthesis and anticancer activity of isoflavone derivatives[J]. Natural Product Research and Development, 2009, 21(5): 796-799.)
- [8] He Y, Wu X, Cao Y, et al. Daidzein exerts anti-tumor activity against bladder cancer cells *via* inhibition of FGFR3 pathway[J]. Neoplasia, 2016, 63(4): 523-531.
- [9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [10] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018; GLOBOCAN sources and methods[J]. International Journal of Cancer, 2019, 114(8): 1941-1953.
- [11] Applegate C, Rowles J, Ranard K, et al. Soy consumption and the risk of prostate cancer: An updated systematic review and meta-analysis[J]. Nutrients, 2018, 10(1): 40-65.
- [12] Zhao T, Jin F, Li J, et al. Dietary isoflavones or isoflavone-rich food intake and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective cohort studies[J]. Clinical Nutrition, 2019, 38(1): 136-145.
- [13] Jin H, Leng Q, Li C. Dietary flavonoid for preventing colorectal neoplasms[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2012, 8(8): D009350.
- [14] Pistrutto G, Trisciunglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. Aging, 2016, 8(4): 603-619.
- [15] Rasmussen M A, Holst B R, Tümer Z, et al. Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage[J]. Stem Cell Reports, 2014, 3(3): 404-413.
- [16] Kim B, Srivastava S K, Kim S H. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015, 19(1): 113-127.
- [17] Jiang X, Cao C, Sun W, et al. Scandanolone from *Cudrania tricuspidata* fruit extract suppresses the viability of breast cancer cells (MCF-7) *in vitro* and *in vivo*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 126(4): 56-66.
- [18] 曾靖, 魏桂林, 钟星明, 等. 3'-大豆苷元磺酸钠体外抗肿瘤活性的筛选[J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(3): 351-353. (Zeng J, Wei G L, Zhong X M, et al. *In vitro* anti-tumor activity screening of 3'-daidzein sulfonate sodium[J]. Journal of Gannan Medical University, 2017, 37(3): 351-353.)
- [19] Ahn S, Jo M S, Lee D, et al. Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 83(3): 135-144.
- [20] Ko K, Yeo Y, Yoon J, et al. Plasma phytoestrogens concentration and risk of colorectal cancer in two different Asian populations [J]. Clinical Nutrition, 2018, 37(5): 1675-1682.
- [21] Shokoochinia Y, Hosseinzadeh L, Alipour M, et al. Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: Osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells [J]. Advances in Pharmacological Sciences, 2014: 1-8.
- [22] Yun H S, Baek J, Yim J, et al. Knockdown of hepatoma-derived growth factor-related protein-3 induces apoptosis of H1299 cells *via* ROS-dependent and p53-independent NF- κ B activation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 449(4): 471-476.
- [23] Gadepalli V S, Deb S P, Deb S, et al. Lung cancer stem cells, p53 mutations and MDM2[J]. Subcellular Biochemistry, 2014, 85: 359-370.
- [24] 金时. 大豆苷元体外诱导乳腺癌细胞凋亡的线粒体 - caspase 途径研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2010. (Jin S. Daidzein induces breast cancer cell apoptosis *via* the mitochondrial-caspase dependent pathway[D]. Harbin: Harbin Medical University, 2010.)