论著

文章编号:1000-5404(2005)19-1946-04

大豆异黄酮在缺氧条件下诱导食管癌细胞凋亡及对HIF-1α表达的影响

段 红[1],张俊文[2] (重庆医科大学:[1]基础医学院病理生理学教研室,[2]附属第一医院消化内科,重庆 400016)

提 要:目的 研究在缺氧条件下大豆异黄酮(soybean isoflavone)对人食管癌细胞株ECa109生长抑制作用及可能机制。**方法** 运用产气袋法(GasPaK)制造缺氧条件,实验分为对照组、大豆异黄酮组、缺氧对照组、缺氧大豆异黄酮组,用MTT法检测常氧和缺氧条件下药物效应。流式细胞仪分析各组细胞周期分布,透射电镜观察细胞超微形态的改变,S-P免疫组化法检测各组细胞HIF-1α和Fas的表达。**结果** 不同浓度大豆异黄酮不同氧条件下对人食管癌细胞株ECa109生长均有抑制作用,并呈剂量-效应关系。缺氧条件下大豆异黄酮对人食管癌细胞株ECa109生长抑制作用增加。常氧和缺氧条件下大豆异黄酮处理后细胞均滞留于G_2/M期,缺氧大豆异黄酮组凋亡率增加。透射电镜观察常氧下及缺氧条件下大豆异黄酮处理后细胞出现凋亡和坏死细胞的形态学改变。大豆异黄酮不同氧条件下均上调Fas表达,并能下调因缺氧表达增加的缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)的表达。**结论** 大豆异黄酮对人食管癌细胞生长有抑制作用,其抑制作用可能通过阻抑细胞周期进程,上调Fas蛋白表达,从而诱导食管癌细胞凋亡而实现的。缺氧条件下大豆异黄酮抑制作用增强,抑制HIF-1α的表达可能是其重要机制。

关键词: 缺氧;大豆异黄酮;人食管癌细胞株ECa109;缺氧诱导因子-1α

中图法分类号: R730.23; R735.1; R977.12 **文献标识码:** A

Induction of apoptosis and influence of HIF-1α expression on esophageal carcinoma cell ECa109 by soybean isoflavone during hypoxia

DUAN Hong[1], ZHANG Jun-wen[2] ([1]Department of Pathophysiology, [2]Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the mechanisms and effect of soybean isoflavone on esophageal carcinoma cell ECa109 during the normoxia and hypoxia. **Methods** The environment of hypoxia was established by GasPak method. The ECa109 cells were assigned into normal control group, soybean isoflavones group, hypoxia group, and soybean isoflavones plus hypoxia group. The effect of soybean isoflavones was determined by MTT, and FCM was used for detecting the apoptosis and cell cycle of ECa109. Electron microscope was used to observe the ultrastructural changes of ECa109 induced by soybean isoflavone. Immunohistochemistry was used to detect the changes of HIF-1α and Fas. **Results** Soybean isoflavone could inhibit significantly the growth of ECa109 cells in a concentration-dependent manner, and arrest the cells in G_2/M phase during normoxia and hypoxia. The inhibitory effect was elevated significantly during hypoxia, and the cell apoptosis and necrosis were observed by electron microscope. The Fas expression was elevated by soybean isoflavone during the normoxia and hypoxia, and the HIF-1α expression was down-regulated during hypoxia. **Conclusion** Soybean isoflavone can inhibit ECa109 cells growth by delaying the progress of cell cycle, up-regulating the Fas expression. Soybean isoflavone can inhibit the expression of HIF-1α that was increased during hypoxia, which may be the mechanism that the inhibitory effect was enhanced significantly during hypoxia.

Key words: hypoxia; soybean isoflavone; esophageal carcinoma cell ECa109; hypoxia-inducible factor-1α

大豆异黄酮(soybean isoflavones, Soy)是豆制品中富含的植物雌激素。近年的研究表明大豆异黄酮对乳腺癌、前列腺癌细胞株有体外抗肿瘤作用,是一种潜在的抗肿瘤预防剂[1,2]。实质性肿瘤内血管生长的相对滞后以及肿瘤细胞的快速增殖所致的肿瘤细胞氧耗增加[3~5]导致肿瘤细胞缺氧。缺氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一。缺氧导致肿瘤细胞对放、化疗的抗拒性增加。缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor, HIF-1α)是细胞适应缺氧过程中起中枢作用的调节基因。本研究以人食管癌细胞株ECa109作为体外

基金项目: 重庆市首批骨干师资资助项目(2003)
Supported by the First Funds for the Talent Teachers of Chongqing (2003)

作者简介: 段 红(1966-),女,四川省新都县人,硕士,副教授,主要从事肿瘤药学方面的研究。电话:(023)68485478

收稿日期: 2004-07-07; **修回日期:** 2004-10-20

实验模型，探讨大豆异黄酮对不同氧浓度下培养的 ECa109 细胞生长抑制作用及其与 HIF-1α 表达的关系，以了解其在食管癌治疗中的价值。

1　材料与方法

1.1　材料

人食管癌细胞株 ECa109（本室提供）。大豆异黄酮（购于浙江欣欣生化科技有限公司，含大豆异黄酮 40%，淀粉 60%，其中黄豆苷 16.45%，染料木苷 17.83%），使用时配成工作浓度 2.5、1.25、0.63、0.32、0.16 mg/ml；鼠抗 HIF-1α 单抗（购于晶美生物工程公司，工作浓度 1∶25）；兔抗人 Fas 多克隆抗体（工作浓度 1∶200）（购于北京中山生物技术有限公司）。

1.2　方法

1.2.1　缺氧条件的制造　　运用产气袋法（GasPaK）制造缺氧条件。通过血气分析仪监测含小牛血清的 RPMI1640 培养液中 PO_2、PCO_2 和 pH 的变化，本装置在 0.5 ~ 48 h 内 PO_2、PCO_2 和 pH 稳定，并能达到缺氧细胞培养的条件（1 ~ 5% 氧、5% 二氧化碳及 90% 氮）。

1.2.2　MTT 法[6] 检测大豆异黄酮对 ECa109 细胞生长的抑制作用　　将对数生长期的人食管癌细胞 ECa109，用含 10% 小牛血清 1640 培养液制成 5×10^4/ml 的细胞悬液，每孔 200 μl 加入 96 孔培养板内。实验设药物实验组及肿瘤细胞阴性对照组，将大豆异黄酮的 5 个不同浓度分别加在 96 孔板内，每孔加药 20 μl，每个剂量 8 个平行孔，重复 3 次。96 孔培养板分为缺氧组和常氧组。常氧组在 CO_2 箱内培养（20% O_2、5% CO_2、75% N_2）68 h，缺氧组先入缺氧密封盒并放入 37 ℃恒温水浴箱孵育 16 h，取出在 CO_2 箱内培养 52 h。两者同时取出离心，弃上清，每孔加无血清 1640 200 μl，MTT 20 μl。CO_2 箱孵育 4 h 弃上清，每孔加二甲亚砜（DMSO）200 μl，用自动酶标读数仪（Bio-Rad-550 型，美国伯乐公司，波长 570 nm）测定每孔 $D(570)$ 值。药物作用效应即抑制率（fa）=［1 - 实验组 $D(570)$ 值/对照组 $D(570)$ 值］× 100%。根据中效方程式[7] $fa/fu = (D/Dm)^m$（fu 为 1 - fa，D 为药物浓度，m 为斜率，Dm 为中效浓度，即 0.5 效应时的药物浓度），计算 Dm 值。

1.2.3　流式细胞仪分析大豆异黄酮对 ECa109 细胞周期分布的影响　　用大豆异黄酮常氧下中效浓度的 1/2 浓度（0.95 mg/ml）为处理浓度（以下相同）。取对数生长期的人食管癌细胞 ECa109 制成 5×10^4/ml 的细胞悬液，分为对照组、大豆异黄酮组、缺氧对照组、缺氧大豆异黄酮组各 20 ml 细胞悬液入 100 ml 培养瓶，大豆异黄酮组和缺氧大豆异黄酮组分别加入 0.95 mg/ml 的大豆异黄酮 2 ml 处理 ECa109 细胞，缺氧对照组、缺氧大豆异黄酮组先入缺氧密封盒并放入 37 ℃恒温水浴箱孵育 16 h，取出在 CO_2 箱内继续培养 56 h。对照组、大豆异黄酮组在 CO_2 箱内培养。72 h 后 0.1% 胰蛋白酶消化收集细胞，PBS 洗涤，70% 乙醇固定 1 h，PBS 洗涤 2 次，将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合，4 ℃放置 30 min，将样品放入 FCM 的样品室，以激发波长 488 nm 测定细胞周期，并用 Modfit LT 2.0 软件分析。

1.2.4　透射电镜观察大豆异黄酮对 ECa109 细胞超微形态的影响　　细胞的分组及前处理同流式细胞仪分析，收集各组细胞，0.1% 胰蛋白酶消化，PBS 洗涤，3% 戊二醛 4 ℃固定 2 h，2 000 r/min 离心弃上清后，用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤，1% 锇酸固定 2 h，梯度乙醇丙酮脱水，常规包埋，聚合，超薄切片，铅染，透射电镜观察。

1.2.5　免疫细胞化学法检测大豆异黄酮对 ECa109 细胞 HIF-1α 和 Fas 表达的影响　　细胞的分组及前处理同流式细胞仪分析，72 h 后取出 6 孔板内已爬满细胞的盖玻片，PBS 洗涤，4% 多聚甲醛固定，按 S-P 试剂盒检测 HIF-1α 和 Fas，AEC 显色，水溶性封片剂封片。每次染色时均以 PBS 代替 I 抗作为阴性对照。排除爬片边沿细胞，10 × 10 低倍镜下随机选取 10 个细胞分布均匀的视野，10 × 20 中倍镜下每视野随机计数 50 个细胞。按着色强弱分 4 个等级，按公式 $HSCORE = \sum Pi(i+1)$（i = 0,1,2,3；Pi 表示评分为 i 的比例）计算 HSCORE 得分。

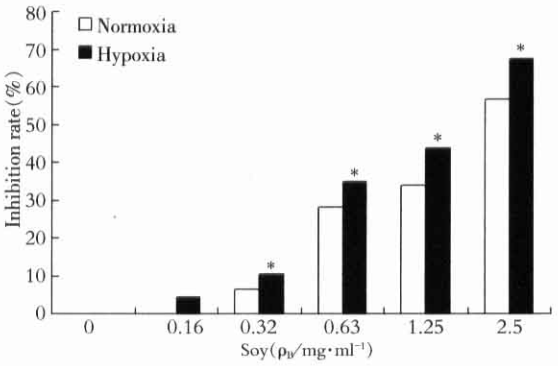
1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用统计软件包 SAS 8.0 进行，计量资料采用配对 t 检验和方差分析，计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　不同氧状态下大豆异黄酮对人食管癌细胞株 ECa109 生长的抑制作用变化

常氧下低浓度大豆异黄酮（0.16 mg/ml）对 ECa109 细胞无抑制作用，其余浓度的大豆异黄酮对 ECa109 细胞均有抑制作用，随着浓度的升高，抑制率增加，且呈剂量-效应关系［r = 0.961，Dm = (1.899 ± 0.021) mg/ml］。缺氧状态下，各浓度的大豆异黄酮均对人食管癌细胞株 ECa109 生长有抑制作用，也呈剂量-效应关系［r = 0.986，Dm = (1.373 9 ± 0.034) mg/ml］，各浓度的大豆异黄酮抑制率较常氧下明显上升（$P < 0.05$）。中效浓度下降（$P < 0.05$）。各浓度大豆异黄酮组同缺氧大豆异黄酮组间抑制率比较差异显著（$P < 0.05$），见图 1。



*：$P < 0.05$，*vs* normoxia

图 1　不同氧状态下大豆异黄酮对人食管癌细胞株 ECa109 的抑制率比较

Fig 1　Inhibition effects of soy on the proliferation of ECa109 between the normoxia and hypoxia groups

2.2　流式细胞仪分析结果

流式细胞仪分析显示常氧下 0.95 mg/ml 大豆异黄酮作用于 ECa109 细胞 72 h，ECa109 细胞产生明显的亚 G_1 期峰。同对照组相比较，G_2/ M 期细胞百分比增加，细胞滞留于 G_2/ M 期。

处理组凋亡细胞占3.68%。缺氧大豆异黄酮组中,细胞仍滞留于G_2/ M期。凋亡细胞占6.43%(表1)。

表1 不同氧状态下大豆异黄酮对ECa109细胞周期分布及细胞凋亡率的影响(%)

Tab 1 Effects of soy on apoptosis rate and cell cycle of ECa109 (%)

Group	G_0/G_1	S	G_2/ M	Apoptosis rate
Control	64.73	23.96	6.31	—
Hypoxia	62.62	26.87	7.5[illegible]	—
Soy	58.95	28.08	12.98 *	3.68 **
Hypoxia + soy	61.09	23.81	15.10 *	6.43 **★

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ★: $P<0.05$, *vs* soy

2.3 透射电镜观察结果

电镜下,观察对照组ECa109细胞呈多角形,细胞核内染色质较密,细胞质和细胞核的膜比较完整,具有丰富的细胞器,包括线粒体、内质网、溶酶体、高尔基体(图2)。常氧下及缺氧状态下0.95 mg/ml大豆异黄酮作用于ECa109细胞72 h,可见典型凋亡细胞的形态学改变:细胞核及胞质电子密度增高,周围大量凋亡小体正在脱落(图3)。缺氧大豆异黄酮组细胞还可见部分细胞坏死:核肿胀,体积增大,核内染色质溶解,电子密度变浅(图4)。

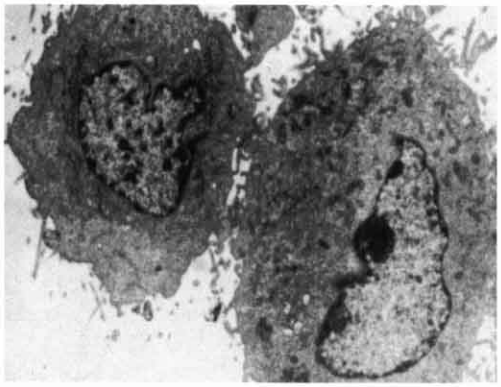


图2 对照组食管癌细胞 (TEM ×6 000)

Fig 2 ECa109 cells of control group (TEM ×6 000)

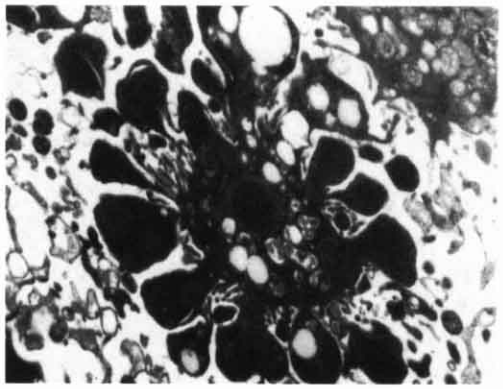


图3 大豆异黄酮处理72 h后出现典型的凋亡细胞形态改变 (TEM ×8 000)

Fig 3 Apoptotic ECa109 cells exposed to soy for 72 h (TEM ×8 000)

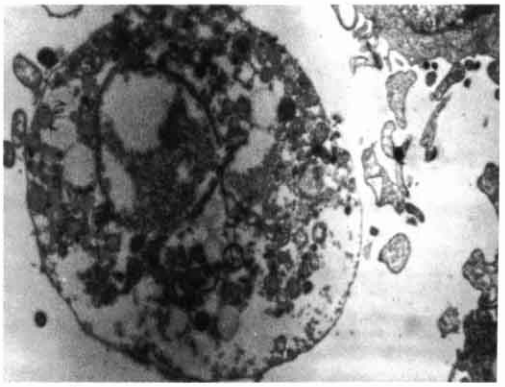


图4 缺氧大豆异黄酮组细胞坏死的形态改变 (TEM ×8 000)

Fig 4 Cellular necrosis in hypoxia plus soy group (TEM ×8 000)

2.4 细胞免疫化学结果

常氧下ECa109细胞有HIF-1α阳性表达,低氧处理16 h后HIF-1α表达上调,大豆异黄酮明显下调HIF-1α表达。同对照组比较,缺氧组Fas表达无显著增加,大豆异黄酮组Fas表达增加,缺氧大豆异黄酮组Fas表达较大豆异黄酮组增加(表2)。

表2 不同氧状态下大豆异黄酮对ECa109细胞HIF-1α、Fas表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of HIF-1α and Fas expression by Soy during normoxia and hypoxia ($\bar{x}\pm s$)

Items	Control	Soy	Hypoxia	Hypoxia + soy
HIF-1α	3.73 ±0.11	1.03 ±0.01	5.76 ±0.91 **	3.25 ±0.13#
Fas	2.51 ±0.22	3.91 ±0.18 *	3.06 ±0.21 **△	6.07 ±0.41#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.05$, *vs* soy; #: $P<0.05$, *vs* hypoxia

3 讨论

大豆异黄酮主要包括以糖苷结合形式存在的染料木苷(genistin)和黄豆苷(daidzin)。两者能释放被机体有效吸收的三羟异黄酮(genistein)和二羟异黄酮(daidzein)。许多学者认为大豆的抗癌作用主要归因于其中所含的非营养成分异黄酮的效应[8]。大豆异黄酮对多种癌细胞的生长具有抑制作用,其抗癌抑癌机制尚不完全明确。本研究采用的大豆异黄酮含有三羟异黄酮和二羟异黄酮,同时选用的药物含量更接近天然大豆中大豆异黄酮所占比例,因此在研究大豆及大豆制品的预防和抗肿瘤作用应用方面具有一定的指导价值。

本研究结果表明,大豆异黄酮能在不同氧浓度下抑制食管癌细胞ECa109的生长,且呈剂量-效应关系。并使细胞阻滞于G_2/ M期,透射电镜观察发现典型的凋亡和坏死细胞的形态学改变。细胞免疫化学显示大豆异黄酮在不同氧状态下均上调Fas蛋白表达(同各自对照组比较)。提示大豆异黄酮对食管癌细胞生长

具有抑制作用,其作用可能通过上调 Fas 表达而诱导食管癌细胞凋亡和坏死、阻抑细胞周期进程,抑制 ECa109 细胞增殖。

实质性肿瘤发生过程中,由于血管生长的相对滞后和肿瘤细胞的快速增殖导致肿瘤细胞缺氧。肿瘤的缺氧是导致实质性肿瘤微环境中缺血缺氧状态下的肿瘤细胞对包括阿霉素、氟尿嘧啶等许多化疗药产生耐受性的重要原因之一。因此,研究化疗药在缺氧状态下对肿瘤细胞的抑制作用是减弱或增强,对研究该药在实质性肿瘤的应用有重要意义。本研究中,大豆异黄酮对缺氧预处理的 ECa109 的抑制作用,同其在常氧下的抑制作用相比有明显的增加。表明大豆异黄酮在缺氧状态下对食管癌细胞的抑制作用增强,大豆异黄酮在对实质性肿瘤中的缺氧肿瘤细胞治疗中有一定的应用前景。

HIF-1 是在缺氧条件下广泛存在于人和哺乳动物体内的一种转录因子。HIF-1α 是 HIF-1 特有的受缺氧调控的亚基,决定 HIF-1 的活性。HIF-1α 调控糖分解代谢有关的基因和蛋白[9],以不同方式参与了肿瘤细胞对缺氧的适应过程,从而增强了肿瘤细胞在缺氧环境下的生存能力,HIF-1α 的缺陷可以明显地减慢肿瘤的生长速度[10]。本研究表明,食管癌细胞 ECa109 在常氧下表达 HIF-1α,低氧处理 16 h 后表达明显上调。主要是细胞氧浓度下降时,缺氧阻止了 HIF-1α 的降解,使在非缺氧时易降解的 HIF-1α 蛋白稳定性增加。同时 HIF-1α 表达明显上调抵抗缺氧所诱导的凋亡发生,故同对照组比较,缺氧组 Fas 表达无显著增加。本研究显示,大豆异黄酮能显著下调缺氧所致 HIF-1α 表达增加,从而增加缺氧所诱导的凋亡,阻断缺氧时食管癌细胞的能量代谢,导致大豆异黄酮在缺氧状态下对食管癌细胞 ECa109 的抑制作用增强,Fas 表达较常氧下大豆异黄酮处理组增加。大豆异黄酮下调 HIF-1α 表达,可能为进一步探索大豆异黄酮对肿瘤的预防和治疗提供新的思路和途径。有助于指导大豆的摄入量,为大豆食品的开发利用提供理论依据。

参考文献:

[1] Setchell K D, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health[J]. J Nutr, 1999, 129(3): 758S-767S.

[2] Su S J, Yeh T M, Lei H Y, *et al*. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach of human urinary tract cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 230-236.

[3] Sutherland R M. Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy[J]. Acta Oncol, 1998, 37(6): 567-574.

[4] Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.

[5] Dachs G U, Tozer G M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation[J]. Eur J Cancer, 2000, 36 (13 Spec No): 1649-1660.

[6] 汤为学, 骆云鹏, 王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1992, 17(2): 103-108

[7] Chou T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J]. Adv Enzyme Regul, 1984, 22: 27-55.

[8] Wang S, DeGroff V L, Clinton S K. Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance *in vitro* via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase[J]. J Nutr, 2003, 133(7): 2367-2376.

[9] Feldser D, Agani F, Iyer N V, *et al*. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1α and insulin-like growth factor 2[J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 3915-3918.

[10] Ryan H E, Poloni M, McNulty W, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1α is a positive factor in solid tumor growth[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4010-4015.

(编辑　刘洪娥)

欢迎订阅《实用医学杂志》

《实用医学杂志》创刊于 1972 年,现为半月刊,上半月以大内科稿件为主,下半月以大外科稿件为主。欢迎全国各地医务工作者踊跃投稿订阅。

本刊以临床实用为基础,提高与普及相结合,主要报道全国各地各级临床医生及医学科研工作者的最新研究成果,实用性较强的临床经验,医学新技术,新动态等。设有述评、专题笔谈、基础研究、实验研究、临床研究、临床总结、药物与临床、检验与临床、综述、中医中药、误诊分析、医院管理、临床护理、短篇报道、病例报告、临床病例讨论、医学消息等栏目。

本刊刊号 ISSN: 1006-5725, CODEN: SYZAFM, CN: 44-1193/R　2006 年每期订价 10 元,全年订价 240 元,内外科可分开订阅,可将汇款直接寄至本刊编辑部收。

地　址:广州市惠福西路进步里 2 号之四《实用医学杂志》编辑部　　邮　编:510180

电　话:(020)81872080　　E-mail:lq4644@163.net