维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0329－03

大豆异黄酮诱导人胃癌细胞株 SGC－7901 凋亡的研究

张俊文[1]，王丕龙[1]，汤为学[2]

(1.重庆医科大学临床学院消化内科，重庆 400016；2.重庆医科大学基础医学院病理生理教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨大豆异黄酮对体外培养的人胃癌细胞 SGC－7901 生长的抑制和诱导细胞凋亡的作用。方法：用 MTT 法检测药物效应，透射电镜及流式细胞仪观察大豆异黄酮处理 SGC－7901 细胞后细胞周期和细胞凋亡。结果：(1)MTT 法证实大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞生长有抑制作用，并呈剂量－效应关系。(2)流式细胞仪分析大豆异黄酮处理 SGC－7901 细胞后细胞滞留于 G2/M 期，并可见凋亡峰。(3)透射电镜可见 SGC－7901 细胞出现典型的凋亡细胞形态学改变。结论：大豆异黄酮对人胃癌细胞 SGC－7901 有抑制作用，抑制作用与诱导胃癌细胞凋亡、阻抑细胞周期进程有关，诱导胃癌细胞凋亡、阻抑细胞周期进程是大豆异黄酮抗胃癌作用的机制之一。

【关键词】大豆异黄酮；人胃癌细胞 SGC－7901；细胞凋亡；细胞周期：MTT 法

【中国图书分类法分类号】R151.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－17

The effect of soybean isoflavones on induction of apoptosis on gastric cancer cell SGC－7901

ZHANG Junwen, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibitory effects of soybean isoflavones and its induction of apoptosis of human gastric cancer cell SGC－7901. *Methods*: MTT, FCM and electron microscope were used to study the effects of soybean isoflavones on SGC－7901. *Results*: MTT showed that the soybean isoflavones inhibited SGC－7901 growth. It could arrest the cell in G2/M, electron microscope showed soybean isoflavones could reduce apoptosis. *Conclusion*: Soybean isoflavones inhibits SGC－7901 cells growth via apoptosis reduction.

【Key words】Soybean isoflavones; Gastric cancer cell SGC－7901; Apoptosis; Cell Cycle; MTT

大豆异黄酮(Soybean isflavones)是大豆中重要的非营养成分，主要包括以糖苷结合形式存在的染料木苷(Genistin)和黄豆苷(Daidzin)。经加工后两者糖苷部分脱离，释放能被机体有效吸收的三羟异黄酮(Genistin)和二羟异黄酮(Daidzein)。近年来，研究发现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]。本研究以人胃癌细胞株 SGC－7901 作为体外实验模型，研究大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用，以期进一步探讨大豆异黄酮的开发应用价值。

1 材料及方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC－7901(重庆医科大学病理生理教研室提供)。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%，(其中黄豆苷 16.45%，染料木苷 17.83%)，使用时用 20%乙醇配成(工作浓度 2.5、1.25、0.63、0.32、0.16)mg/ml；四甲基偶氮唑蓝(MTT)(购于上海华舜生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT[3]法检测大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞的抑制作用

将对数生长期的人胃癌细胞 SGC－7901 制成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液，每孔 200μl 加入 96 孔培养板内。实验设肿瘤细胞阴性对照组及设 5 个不同浓度的大豆异黄酮药物试验组，分别加在 96 孔板内，每孔加药量 20μl，每个剂量 8 个平行孔，重复 3 次。37℃、5% CO_2 箱孵育 68h。取出离心后吸弃上清，每孔加无血清 1640 200μl，MTT 20μl，再孵育 4h，离心、弃上清。每孔加二甲亚砜(DMSO)200μl，在自动酶标

作者介绍：张俊文(1965－)，男，主治医师，主要研究方向：消化道肿瘤防治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

读数仪(Bio－Rad－550 型,美国,波长 570nm)测定每孔 A 值。药物作用效应即抑制率(fa)=(1－实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。根据中效方程式[4] 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。

1.2.2 流式细胞仪分析大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞周期分布的影响

实验设对照组及药物组,药物组取 Dm/2 值药物浓度(0.95mg/ml)的大豆异黄酮处理 SGC－7901 细胞,72h 后 0.1% 胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗涤,70% 乙醇固定 1h,PBS 洗涤 2 次,将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合,4℃ 放置 30min,将样品放入 FCM 的样品室,以激发波长 488nm 测定细胞周期,并用 Modfit LT2.0 软件分析。

1.2.3 透射电镜观察大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞超微形态的改变

取对数生长期的 SGC－7901 制成 5×10^4 个/ml×20ml 的细胞悬液,药物组大豆异黄酮(0.95mg/ml)×2ml 处理 72h。0.1% 胰蛋白酶消化,PBS 洗涤,3% 戊二醛 4℃ 固定 2h 2000r/min 离心弃上清后,用 0.1mol/L 磷酸缓冲液洗涤,1% 锇酸固定 2h,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。

2 结 果

2.1 MTT 试验结果

低浓度大豆异黄酮(0.16mg/ml)对 SGC－7901 细胞无抑制作用,其余浓度的大豆异黄酮对 SGC－7901 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($\gamma=0.996$,Dm=1.937±0.011)。见表 1。

表 1 不同浓度的大豆异黄酮对人胃癌细胞株 SGC－7901 生长的抑制率($\bar{x}\pm s$)

组别(mg/ml)	A 值	抑制率(%)
细胞对照组	1.079±0.042	—
0.16	1.152±0.017	—
0.32	0.907±0.028*	15.94±0.43
0.63	0.772±0.023*	28.45±0.26
1.25	0.633±0.031*	41.34±0.51
2.50	0.492±0.012*	54.40±40.87

*:同对照组比较有非常显著的差异($P<0.01$)。各组间比较有非常显著的差异($P<0.01$)。

2.2 流式细胞仪分析结果

流式细胞仪分析显示 0.95mg/ml 大豆异黄酮作用于 SGC－7901 细胞 72h,SGC－7901 细胞产生明显的亚 G_1 期峰。同对照组相比较,G2/M 期细胞百分比增加(对照组 4.96%,处理组 12.98%),G_0/G_1 期细胞百分比下降(对照组 69.98%,处理组 58.95%),S 期细胞两者百分比相近,细胞滞留于 G2/M 期。处理组凋亡细胞占 4.20%。(表 2,图 1,2)

表 2 大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞周期分布的影响(%)

	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
对照组	69.98	25.06	4.96	—
实验组	58.95	28.08	12.98	4.20

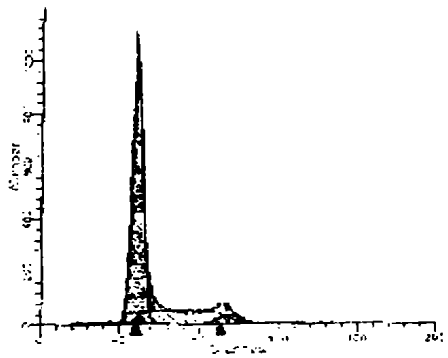


图 1 未经处理的细胞对照组 FCM 结果

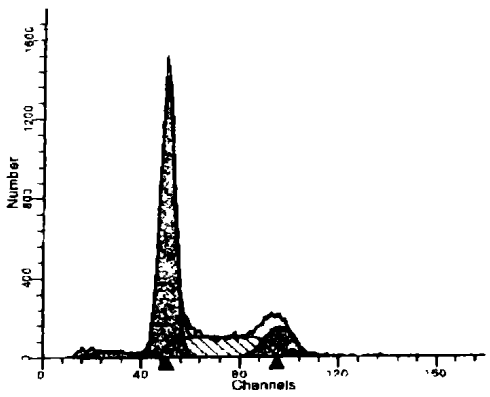


图 2 0.95mg/ml 大豆异黄酮作用 SGC－7901 细胞 72h 后 FCM 结果

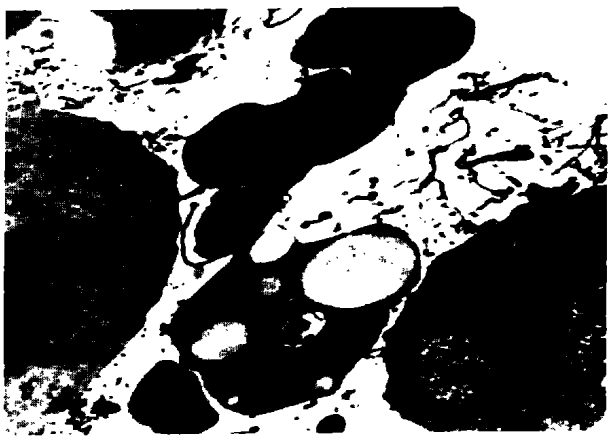


图 3 0.95mg/ml 大豆异黄酮作用于 SGC－7901 细胞 72h 电镜下可见典型的凋亡细胞形态改变。×5000

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 透射电镜观察结果

0.95mg/ml 大豆异黄酮作用于 SGC－7901 细胞 72h，可见细胞变小，电子密度加深，质膜内陷形成不规则的致密小体，胞质内可见大小不等的呈中等电子密度的脂滴(图 3)，呈典型的凋亡细胞的形态学改变。

3 讨 论

大豆异黄酮是大豆中重要的非营养成份，近年来的研究发现，大豆异黄酮不仅对激素相关的肿瘤(如乳腺癌和前列腺癌)有明显的抗肿瘤作用，同样对非激素相关的肿瘤也有抗肿瘤作用[5,6]，但对胃癌细胞的研究报道尚少。有关大豆异黄酮抗肿瘤作用的研究主要是围绕三羟异黄酮进行的，而对二羟异黄酮研究较少。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。

细胞凋亡是细胞的一种自杀过程，肿瘤无限制增生的恶性生物学特征与肿瘤细胞凋亡减少有关，随着对凋亡分子的深入研究，认识到增加肿瘤细胞凋亡是一种有效治疗肿瘤的途径[7,8]本实验通过 MTT 法观察大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞生长的影响。结果表明，大豆异黄酮对人胃癌细胞的生长有抑制作用，且随剂量增加，抑制作用增强，呈剂量－效应关系($\gamma=0.996$)。流式细胞仪分析显示处理组 SGC－7901 细胞滞留于 G2/M 期，出现明显的亚 G1 期峰(凋亡细胞占 4.20%)。透射电镜观察，可见细胞变小，电子密度加深，质膜内陷形成不规则的致密小体，胞质内可见大小不等的呈中等电子密度的脂滴等典型的凋亡细胞的形态学改变。上述实验结果表明，大豆异黄酮对 SGC－7901 细胞生长有抑制作用，抑制作用同三羟异黄酮相近[9]均与诱导胃癌细胞凋亡、阻抑细胞周期进程有关，诱导胃癌细胞凋亡、阻抑细胞周期进程是大豆异黄酮抗胃癌作用的机制之一。

大豆是同我国人民生活息息相关的传统食物，研究认为大豆中所含大豆异黄酮可能通过对酪氨酸蛋白激酶活性的抑制效应[10]、抑制抗凋亡基因 bcl－2 的表达[11]等机制诱导肿瘤细胞的凋亡。但迄今尚未完全阐明其确切作用机制，探讨其机制对阐明大豆及其制品的防癌抗癌作用有理论和实际意义。大豆异黄酮诱导 SGC－7901 细胞凋亡将有助于解释大豆的抑癌作用，本实验采用非纯晶的大豆异黄酮混合物对 SGC－7901 细胞的抑制及诱导细胞凋亡的研究，将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 KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health[J]. J Nutr, 1999; 129(3): 758－767.

[2] Su SJ, Yeh TM, Lei HY, 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] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪，等. 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(21): 103－108.

[4] Chou TC, Talalay E Quantitative analysis of dose－effects relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors[M]. Adv. enzyme Regul, 1984; 22: 37－55.

[5] Myoung H, Hong SP, Yun PY, et al. Anti－cancer effect of genistem in oral squanmous cell carcinoma with respect to angiogenesis and in vitro invasion[J]. Cancer Sci, 2003; 94(2): 215－220.

[6] Kawano K, Nakamura K, Hayashi K, et al. Liver targeting liposomes containing beta－sitosterol glucoside with regard to penetration－enhancing effect on HepG2 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2002; 25(6): 766－770.

[7] Hino N, Higashi T, Nouso K, et al Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Liver, 1996; 16(6); 123－129.

[8] Kerr GF, Wmterford CM, Hannon BV, et al. Apoptosis and its significance in cancer therapy[J]. Cancer, 1994; 73(8): 2013－2026.

[9] 刘 颖，张 牧，王小雪，等. 染料木黄酮对人胃癌细胞生长抑制作用研究[J]. 营养学报，2001; 23(1): 62－65.

[10] Wang S, DeGroff VL, Clinton SK, et al. Tomato and Soy polyphenols reduce insulin－like growth factor－I－stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracelltfiar signaling pathways involving tyrosine kinase[J]. J Nutr, 2003; 133(7): 2367－2376.

[11] Leung LK, Wang TT. Bcl－2 is not reduced in the death of MCF－7 cells at low genistem coneentration[J]. J Nutr, 2000; 130(12): 2922－2926.