

植物雌激素大豆苷原 (daidzein) 对结肠癌 LoVo 细胞生长的影响

赖依峰¹, 郭俊明², 肖丙秀², 陈枢青¹ (1. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310009; 2. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:目的 了解植物雌激素大豆苷原 (daidzein) 对结肠癌细胞生长的影响。方法 取对数生长期的人结肠癌细胞株 LoVo 细胞, 以不同浓度的大豆苷原处理细胞 2, 3, 4 和 6 d, 然后应用 MTT 法测定细胞的生长率。结果 大豆苷原在高浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 时在体外对 LoVo 有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 而在低浓度 $< 5 \mu\text{mol/L}$ 时对 LoVo 细胞又具有促增殖作用。结论 大豆苷原在体外对 LoVo 细胞的生长具有促进和抑制的双向作用。

关键词:染料木黄酮; 大豆苷原; LoVo 细胞

中图分类号: R329.2; R917.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)03-0176-03

Effect of daidzein on the growth of LoVo cells *in vitro*

LAI Yr-feng¹, GUO Jun-ming², XIAO Bing-xiu², CHEN Su-qing¹ (1. Medical school, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Ningbo University, Ningbo 315211, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of daidzein, one of the phytoestrogen, on the growth of human colonic cancer cell line LoVo cells. **METHOD** LoVo cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum and were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 24h, daidzein was added at a varied concentration and detected the growth of LoVo cells by MTT method at 2, 3, 4 and 6 days. **RESULTS** A dose-dependent inhibition of growth of LoVo cells was observed between 5 $\mu\text{mol/L}$ to 100 $\mu\text{mol/L}$, whereas at the concentration below 5 $\mu\text{mol/L}$, the daidzein could stimulate the growth of LoVo cells. **CONCLUSION** Daidzein have a biphasic effect on the growth of LoVo cells.

KEY WORDS: genistein; daidzein; LoVo cell

植物雌激素是存在于多种植物中具有雌激素样作用的一类化合物的总称。大豆异黄酮 (soybean isoflavones) 就是存在于人类食物大豆中的一类植物雌激素。大豆异黄酮共 12 种, 其中具有生物学活性的主要成分是染料木黄酮 (genistein) 和大豆苷原 (daidzein)。鉴于植物雌激素对人类的明显保健作用, 大豆异黄酮特别是其中的染料木黄酮已成为近年

来研究的热点。染料木黄酮对于人体广泛的生理作用及其生物学特性在国内外都已有了大量的报道, 它对部分肿瘤细胞生长的抑制作用及能引起调亡和诱导分化作用都已得到了确认^[1]。然而, 对于同样存在于大豆及其它豆类食品中的另一种植物雌激素大豆苷原的相关研究报道极为鲜见。因此, 本研究探讨了大豆苷原在体外对结肠癌 LoVo 细胞生长

基金项目: 宁波大学人才启动基金 (014-471036) 和浙江省教育厅科研基金 (20010217)

的影响,并测定了其抑制作用的最佳浓度及作用时间,现报道如下。

1 材料及方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株 LoVo (浙江大学医学院第一附属医院赠送);培养液 RPMI-1640(美国 LIT 公司);小牛血清(杭州四季青公司);MTT(美国 LIT 公司);大豆苷原(南京农业大学动物生理生化实验室韩正康教授惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LoVo 细胞常规培养于含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,5% CO₂, 37°C 贴壁培养,48h 后弱光下换液一次,取对数生长期细胞进行实验,用 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化传代收集细胞。调整细胞浓度为 1×10^4 / mL,加入 96 孔培养板中,每孔 200 μ L。

1.2.2 药物配制 用二甲基亚砜(DMSO)溶解大豆苷原,然后用培养液制备成终浓度分别为 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 μ mol/L 的含药培养液,调整二甲基亚砜的体积百分比,使其始终为 1%。

1.2.3 细胞增殖测定 在细胞接种后 48h,去除培养液。加入含有不同大豆苷原浓度的培养液 200 μ L,分 8 组进行实

验。第 1 组为不含大豆苷原及 DMSO 的空白对照,第 2 组为含有 1% DMSO 的空白对照,3~8 组分别为含大豆苷原浓度为 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 μ mol/L 的培养液,用四块 96 孔板分别在培养 2, 3, 4, 6d 后,用快速翻转培养板的方法去除培养液,加入 MTT 液(MTT 溶解于 PBS 液中,浓度为 5 mg/mL)30 μ L/孔,培养 4h 后加入 DMSO 150 μ L/孔,室温下在微孔板震荡器上震荡 10 min,待成色产物溶解后用酶标仪测 A 值。($\lambda = 570\text{nm}, 630\text{nm}$ 双波长测定)。

1.2.4 统计学处理 用方差分析进行数据统计。

2 结果

2.1 细胞形态学变化

在大豆苷原作用下,结肠癌细胞的形态和数量发生了明显的变化。图 1 示大豆苷原浓度为 100, 50, 0.1 μ mol/L 以及不含药物的空白对照在培养 4d 后的结果。从图中可以看出,在 100 μ mol/L 和 50 μ mol/L 浓度作用下,细胞数量明显变少了,细胞形态变小变圆,呈多形型;而在 0.1 μ mol/L 下,细胞数量又较空白对照增多。这说明在高浓度时药物对 LoVo 细胞有抑制作用,而在低浓度时药物对细胞又具有促增殖作用。

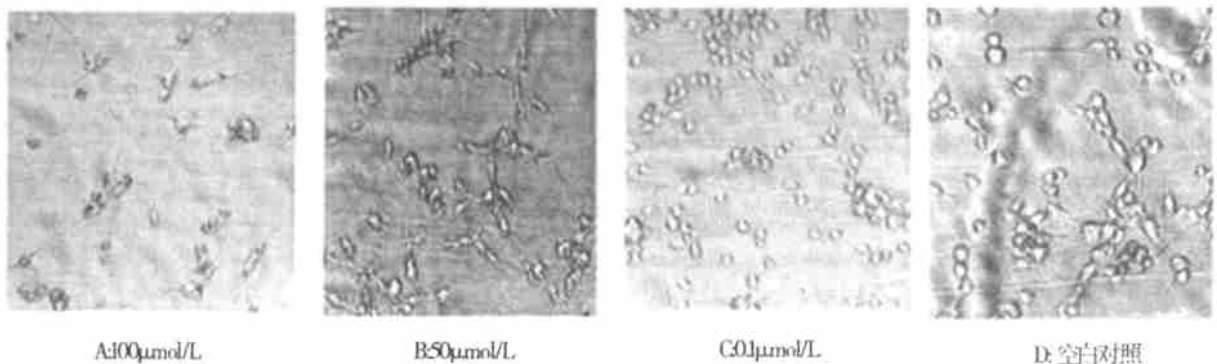


图 1 大豆苷原对 LoVo 细胞生长的影响

Fig 1 Effect of daidzein on growth of LoVo cells

注:A~C 分别为 100, 50, 0.1 μ mol/L 大豆苷原处理 LoVo 细胞 4d 后的照片,D 为含 1% DMSO 的空白对照 放大倍数为 20×10

Note: A~C are photographs of LoVo Cells cultured with Daidzein of 100, 50, 0.1 μ mol/L, D is control, magnification is 20×10

2.2 不同浓度的大豆苷原对 LoVo 生长的影响

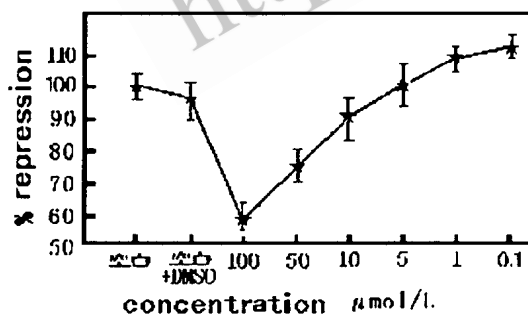


图 2 不同药物浓度对 LoVo 细胞作用的影响

Fig 2 Effect of different concentration of daidzein on LoVo Cells

注:纵坐标是以空白对照的吸收值为 100 而转化来的抑制率,其中每一组为 12 个孔的均值。

Note: Axis of ordinate is the inhibitory rate assuming that the absorbance

of the blank control is 100, which is the mean value of the group containing 12 wells.

不同大豆苷原浓度对 LoVo 细胞生长的影响不同,图 2 示不同药物浓度作用于 LoVo 3d 后的 MTT 实验结果。从图中可以看出,在 100 μ mol/L 下大豆苷原对细胞的生长具有强烈的抑制作用($P < 0.01$),并随着浓度的减少抑制作用逐渐降低,呈一定的浓度依赖性关系。而在 5 μ mol/L 浓度以下,大豆苷原对 LoVo 的生长则具有促进作用,以 0.1 μ mol/L 最为明显($P < 0.01$)。

2.3 不同作用时间对 LoVo 细胞生长的影响

为了解大豆苷原在不同处理时间对 LoVo 细胞生长的影响,选择了 6 种不同的浓度来观察药物作用下细胞 2, 3, 4d 和 6d 的生长情况。结果显示,在 50 μ mol/L 和 100 μ mol/L 大豆苷原处理 LoVo 细胞后 d2 开始细胞就受到抑制,随着作用时间的延长,抑制作用增强。当用 0.1 μ mol/L 的大豆苷原处

理细胞时, d₃ 开始细胞生长增长快。

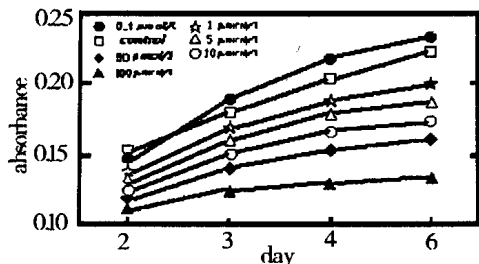


图 3 不同作用时间对 LoVo 细胞作用的影响

Fig 3 Effect of different reactional interval time on LoVo Cells

3 讨论

大豆苷原和染料木黄酮是共同存在于大豆中的一种结构十分相近的植物雌激素^[3]。它们和大豆中的其它类黄酮一起被统称为大豆异黄酮(isoflavones),是大豆具有广泛生理活性的主要物质。本次实验考察了其中的大豆苷原(D)在体外对结肠癌 LoVo 细胞生长的影响,第一次发现了 D 对结肠癌细胞的生长具有双相作用($P < 0.01$),在低浓度时($< 10 \mu\text{mol/L}$),细胞明显增多,高浓度时($10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$),细胞数量减少,细胞形态变小变圆,并呈一定的浓度依赖关系。

目前对于结肠癌是否为雌激素依赖性肿瘤尚无定论,但国内外有报道称结肠癌细胞中有雌激素受体 beta 的表达^[9], Arai 等^[10]做的实验中,雌激素 17- β -雌二醇(E)也可以刺激结肠癌 LoVo 细胞的生长,并且这种作用可以被雌激素受体阻断剂三苯氧胺阻断,这说明 E 刺激细胞生长是通过和雌激素受体结合而表现为雌激素样作用或抗雌激素样作用。比较我们的实验和以上雌激素 E 刺激结肠癌 LoVo 细胞的生长,我们可以这样推断,在低浓度时,大豆苷原可以和结肠癌细胞内的雌激素受体结合,以这种符合物进入核内,作用于 DNA 的某些部位,增加有丝分裂或增加 DNA 的合成,造成肿瘤细胞增殖^[11]。

大豆苷原(D)在结构上和染料木黄酮相似,但不具有抑制酪氨酸蛋白激酶 PTK 和抑制 top_{II} 的活性,它在高浓度时也表现出抑制细胞,这说明了大豆苷原和染料木黄酮在抑制细胞生长方面的作用机制不同,或者是它们通过其它共同的作用机制来抑制细胞的生长。

大豆苷原的抗氧化性在抑制肿瘤细胞的生长过程中不容被忽视,活性氧尤其是被激活的免疫系统在癌变的发生过程中起着重要的作用,特别是促癌阶段。最近发现^[14]它能减少肿瘤细胞和免疫系统细胞活性氧 ROS 的含量。大豆苷原的抗癌作用也许跟它能使 DNA 变性有关,鉴于自由基在癌变过程中的重要作用,结合大豆苷原自身的抗氧化以及可以诱导机体抗氧化酶活性增加的特性,可以认为大豆苷原的抗癌作用也许部分是通过抗氧化机制实现的。另外,Shertzer 等^[15]认为,G 和 D 都可以抑制 CYP1A1 酶的活性,并认为这可能是大豆苷原抗癌的机制之一。D 抑制结肠癌 LoVo 细胞是否通过抑制 CYP1A1 酶活性而起作用还需要进一步验证。

因为我们实验中的低浓度($< 10 \mu\text{mol/L}$)正好是大豆苷原在人体内的血浆生理浓度,在这个浓度下它对结肠癌细胞

有刺激生长的作用,这和流行病学的调查资料相矛盾,就其原因可能是大豆苷原在结肠部位的浓度远远大于在血浆中的浓度,表现出在高浓度下抑制细胞的作用,或者可能是大豆苷原在体内的作用机制和其在体外的完全不同,有可能是在低浓度下就对癌细胞有阻遏的作用。

参考文献

- [1] Yanagihara K, Ito A, et al. Antiproliferation effect of isoflavone to human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract [J]. Cancer Res, 1993, 53(23): 5815.
- [2] Lu LJ, Gree M, et al. Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16 α -hydroxyestrone in premenopausal women during a soya diet containing isoflavones [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1299.
- [3] Anderson RL, Wolf WJ. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing [J]. J. Nutr, 1995, 125(35): 581.
- [4] An J, Tzagarekis Foster C, Scharschmidt TC, et al. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens [J]. J. Biol. Chem, 2001, 276: 17808.
- [5] Zava DT, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro* [J]. Nutr Cancer, 1997, 27: 31.
- [6] Howe GR. Age at first pregnancy and risk of colorectal cancer, A case-control study [J]. JNCI, 1985, 74: 1155.
- [7] Potter JD. Large bowel cancer in women relation reproductive and hormonal factors: a case-control study [J]. JNCI, 1983, 71: 703.
- [8] Singh S, Sheppard MC, Langman MJ. Sex differences in the incidence of colorectal cancer, messenger RNA for progesterone receptors [J]. Gut, 1993, May, 34(5): 36.
- [9] Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, et al. Estrogen metabolism in human colorectal cancer cells [J]. J. Steroid Biochem. Mol. Biol, 2002, 81(3): 281.
- [10] Arai N, Strom A, Rafter JJ, et al. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 425.
- [11] Matsui M, Kojima O, Uehara Y, et al. Characterization of estrogen receptor in human gastric [J]. Cancer, 1991, 68: 305.
- [12] Ji S, Willes GM, Frank GR, et al. Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis [J]. J. Nutr, 1999, 129(7): 1291.
- [13] Peterson G. Evaluation of biochemical targets of genistein in tumor cells [J]. J. Nutr, 1995, 125: 784.
- [14] Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, et al. Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. J. Hypertens, 2000, Dec, 18(12): 1833.
- [15] Shertzer HG, Puga A, Chang C, et al. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones [J]. Chem Biol Interact, 1999, 123(1): 31.

收稿日期: 2002-07-08