

# 大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡作用研究

马吉祥 苏军英 马金姝 李会庆 颜云

**【摘要】** 目的 在体外实验中,探讨大豆异黄酮诱导食管癌细胞发生凋亡的可能性,揭示该凋亡发生与 bcl-2 和 bax 之间的关系。方法 采用 MTT 比色法测定大豆异黄酮对食管癌细胞的生长抑制率,以透射电镜和 TUNEL 染色法,定性、定量地研究大豆异黄酮与食管癌细胞凋亡的关系,通过免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 的表达。结果 大豆异黄酮对食管癌细胞有明显抑制作用,随大豆异黄酮浓度增加和培养时间的延长而增强,透射电镜可见食管癌细胞出现典型的凋亡细胞形态,如细胞核染色质致密浓缩,或聚集于核膜呈新月形小体;TUNEL 染色法可见,经大豆异黄酮处理 24、48、72、96 h 后,食管癌 EC-9706 细胞凋亡数明显随时间延长而增加。免疫组织化学法发现经大豆异黄酮处理 24、48、72、96 h 后,食管癌 EC-9706 细胞的 bcl-2 蛋白阳性率减少, bax 蛋白阳性率增加。经大豆异黄酮处理 24、48、72、96 h 后,经 RT-PCR 检测发现食管癌 EC-9706 细胞 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达阳性,并显示 bcl-2 mRNA 条带密度随时间的延长而递减, bax mRNA 条带密度随时间的延长而增强。结论 诱导食管癌细胞发生凋亡是大豆异黄酮抗食管癌作用的机制之一,大豆异黄酮可能通过下调 bcl-2 的表达和上调 bax 的表达而诱导食管癌细胞发生凋亡。

**【关键词】** 大豆异黄酮;食管肿瘤;细胞凋亡;细胞株

## Study on the molecular mechanism of apoptosis in esophageal cancer cells induced by soybean isoflavone

MA Ji-xiang\*, SU Jun-ying, MA Jin-shu, LI Hui-qing, YAN Yun. \*Public Health College of Shandong University, Jinan 250012, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the function of apoptosis in esophageal cancer cells induced by soybean isoflavone and the relation between this apoptosis and expression of bcl-2 and bax. **Methods** In vitro experiments, MTT assay was used to determine the cell growth inhibitory rate. Transmission electron microscope and TUNEL staining method were used to quantitatively and qualitatively detect the apoptosis status of esophageal cancer cell line EC-9706 before and after the soybean isoflavone treatment. Immunohistochemical staining and reverse transcription-polymerase chain reaction were used to detect the expression of apoptosis-regulated gene bcl-2 and bax. **Results** Soybean isoflavone inhibited the growth of esophageal cancer cell line EC-9706 in a dose- and time-dependent manner. Soybean isoflavone induced EC-9706 cells to undergo apoptosis with typically apoptotic characteristics including morphological changes of chromatin condensation, chromatin crescent formation, nucleus fragmentation and apoptotic body formation by transmission electron microscope and staining positive cells, using TUNEL assay. Soybean isoflavone reduced the expression of apoptosis-regulated gene bcl-2, and improving the expression of apoptosis-regulated gene bax. **Conclusion** Soybean isoflavone seemed to be able to induce the apoptosis in esophageal cancer. This type of apoptosis might be mediated by down-expression of apoptosis-regulated gene bcl-2 and up-expression of apoptosis-regulated gene bax.

**【Key words】** Soybean isoflavone; Esophageal neoplasms; Apoptosis; Cell line

食物中非营养成分的抗癌作用研究是近年来肿瘤预防研究的重要领域。大量资料表明大豆具有抗癌作用,初步认为大豆中非营养成分大豆异黄酮可能是其主要抗癌有效成分,但其作用机制尚不清

楚<sup>[1-3]</sup>。寻找有效的防癌、抗癌药物一直是肿瘤防治研究的一个重要内容,本研究通过透射电镜和 TUNEL 染色法,在体外定性、定量地研究大豆异黄酮与食管癌细胞凋亡的关系;通过免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 的表达,研究大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡发生的可能机制。

作者单位 250012 济南,山东大学公共卫生学院(马吉祥);山东省疾病预防控制中心(苏军英);济南市疾病预防控制中心(马金姝);山东省医学科学院(李会庆);潍坊市人民医院(颜云)

## 材料与amp;方法

### 一、材料来源

大豆异黄酮购自山东临沂三维公司(二甲基亚砷溶解)。食管癌细胞株 EC-9706 由中国医学科学院王明荣教授提供。细胞凋亡原位检测试剂盒、SABC 试剂盒和 bcl-2、bax 单抗,均为中山生物公司产品。bcl-2、bax 和  $\beta$ -actin 引物序列由上海生物工程公司合成。Trizol 试剂盒为 Gibco 公司产品, dNTPs、Taq DNA 聚合酶均为华美生物工程公司产品。

### 二、实验方法

1. MTT 比色法测定大豆异黄酮对食管癌细胞的生长抑制率:将 EC-9706 细胞以  $10^5$ /ml 浓度接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,24 h 后更换培养液,试验组分别加入含 20、40、80 及 160 mg/L 浓度的大豆异黄酮,空白对照只加培养液,每组设 3 个复孔,将培养板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下分别培养 24、48、72、96 h,将培养后的 96 孔板每孔加入 5 g/L 的 MTT 20  $\mu$ l,继续放入培养箱孵育 4 h 后,以 1 200 r/min 离心 10 min,小心吸出上清,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l,微量振荡器振荡 5 min 后,在全自动酶标仪读取试验波长 570 nm,参考波长 620 nm 的吸光度(A),计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照组 A 值} - \text{实验组 A 值})}{(\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值})} \times 100\%$$

### 2. 大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡的研究:

(1)透射电镜观察:将 EC-9706 细胞以  $10^5$ /ml,共 3 ml 铺入培养瓶中,37 $^{\circ}$ C 孵育,待细胞贴壁生长。另加含大豆异黄酮(80 mg/L)培养液 3 ml,孵育 24 h。洗下瓶内细胞,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗 2 次,细胞沉淀用 4% 戊二醛固定过夜。2 000 r/min 离心 10 min,加入 2% 琼脂糖搅匀,冷却后切成 1 mm<sup>3</sup> 小块,用 1% 四氧化锇固定 3 h,PBS 充分清洗,梯度乙醇脱水,包埋剂包埋,切片,醋酸双氧铀——柠檬酸铅双重染色透射电镜观察。

(2)TUNEL 染色法:置盖玻片于 6 孔细胞培养板内,取对数生长期的 EC-9706 细胞(细胞数为  $10^5$ /ml)0.4 ml 铺于盖玻片上。37 $^{\circ}$ C 孵育,待细胞贴壁生长,各孔内另加含大豆异黄酮(80 mg/L)培养液 3 ml,与细胞共育,时间分别为 24、48、72、96 h,每个时间组均设 PBS 对照孔。倒去孔内培养液,10% 甲醛固定,0.1 mmol/L PBS 缓冲液洗涤,0.3% 过氧

化氢-甲醇溶液及预冷的 0.1% Triton-X 100 处理细胞,以后步骤按中山生物公司 TUNEL 试剂盒操作说明进行。最后 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色,光镜下观测凋亡细胞数(图 1A)。

实验对照:阴性对照用去掉 TdT 酶的标记体系处理标本,阳性对照用以 TACS 核酶处理、蛋白酶消化后的标本,人为导致 DNA 断裂,通过此方法使一份标本上所有细胞均能低强度显弱棕黄色。

凋亡指数(AI)计算方法:染色后细胞核呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞。随机选取 5 个高倍镜视野(>1 000 个细胞),分别计数凋亡细胞数和总细胞数。AI 值按公式计算:AI=(凋亡细胞数 $\div$ 总细胞数) $\times$ 100%。

### 3. 大豆异黄酮调节 bcl-2 和 bax 表达的研究:

(1)免疫组织化学法检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达:置盖玻片于 6 孔细胞培养板内,取对数生长期的 EC-9706 细胞(细胞数为  $10^5$ /ml)0.4 ml 铺于盖玻片上。37 $^{\circ}$ C 孵育,待细胞贴壁生长,各孔内另加含大豆异黄酮(80 mg/L)培养液 3 ml,与细胞共育,时间分别为 24、48、72、96 h,设 PBS 对照孔。倒去孔内培养液,10% 甲醛固定。柠檬酸盐缓冲液洗涤后,微波处理 10 min,以后步骤按中山生物公司 SABC 试剂盒操作说明进行。最后 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色,光镜下观察(图 1B、C)。

实验对照:①阳性对照,以已知阳性染色的大肠癌组织做阳性对照,结果阳性;②阴性对照,以已知阴性染色的大肠癌组织做阴性对照,结果阴性;③空白对照,PBS 代替一抗,结果阴性。

结果判定:bcl-2 和 bax 阳性反应为黄色到棕褐色,定位于胞浆亦可见于胞膜和核膜。随机选取 5 个高倍镜视野(>1 000 个细胞),分别计数阳性细胞数和总细胞数。阳性细胞指数按公式计算:阳性细胞指数=(凋亡细胞数 $\div$ 总细胞数) $\times$ 100%。

(2)RT-PCR 检测 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达:取对数生长期的 EC-9706 细胞(细胞数为  $10^5$ /ml)0.4 ml 置于 6 孔细胞培养板内。37 $^{\circ}$ C 孵育,待细胞贴壁生长。各孔内另加含大豆异黄酮(80 mg/L)培养液 3 ml,与细胞共育,时间分别为 24、48、72、96 h,收集细胞。

总 RNA 的提取:用 Trizol 试剂盒按说明书操作。

cDNA 合成:1  $\mu$ g 总 RNA 加入 50 pmol/L 反义链引物,70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,冰上骤冷后加入 5 $\times$ RT 缓

冲液 4  $\mu$ l, 1 mmol/L dNTP 2  $\mu$ l, RNAsin 40 U 及 MMLV 逆转录酶 200 U, 加去离子水至 20  $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min。

PCR : 25  $\mu$ l 反应体系中含模板 cDNA 2  $\mu$ l, 正义

链和反义链引物各 25 pmol/L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 1 U。bcl-2 和 DNA 分子量标准的热循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。bax 的热循环条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环。取 10  $\mu$ l PCR 扩增产物, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳。紫外透射分析仪下观察结果并拍照。照片经薄层扫描求得每个待测产物与  $\beta$ -actin 的产物吸光度 (A) 之比, 进行半定量分析。

4. 统计学分析: 两因素方差分析、t 检验。

### 结 果

#### 一、大豆异黄酮对食管癌细胞的生长抑制作用

20、40、80 及 160 mg/L 浓度的大豆异黄酮对食管癌细胞均有明显抑制作用, 与对照组相比差异有非常显著性 ( $P < 0.01$ ), 随大豆异黄酮浓度增加和培养时间的延长, 抑制作用逐渐增强 (表 1)。

表1 大豆异黄酮对食管癌 EC-9706 细胞的生长抑制作用

时间 (h)	RPMI-1640 (对照组)	抑 制 率 (%)			
		20 mg/L	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L
24	0.0	7.8*	19.4**	24.8**	33.3**
48	0.0	18.2**	24.1**	38.4**	46.8**
72	0.0	25.3**	38.6**	48.5**	59.5**
96	0.0	36.6**	45.8**	59.6**	85.1**

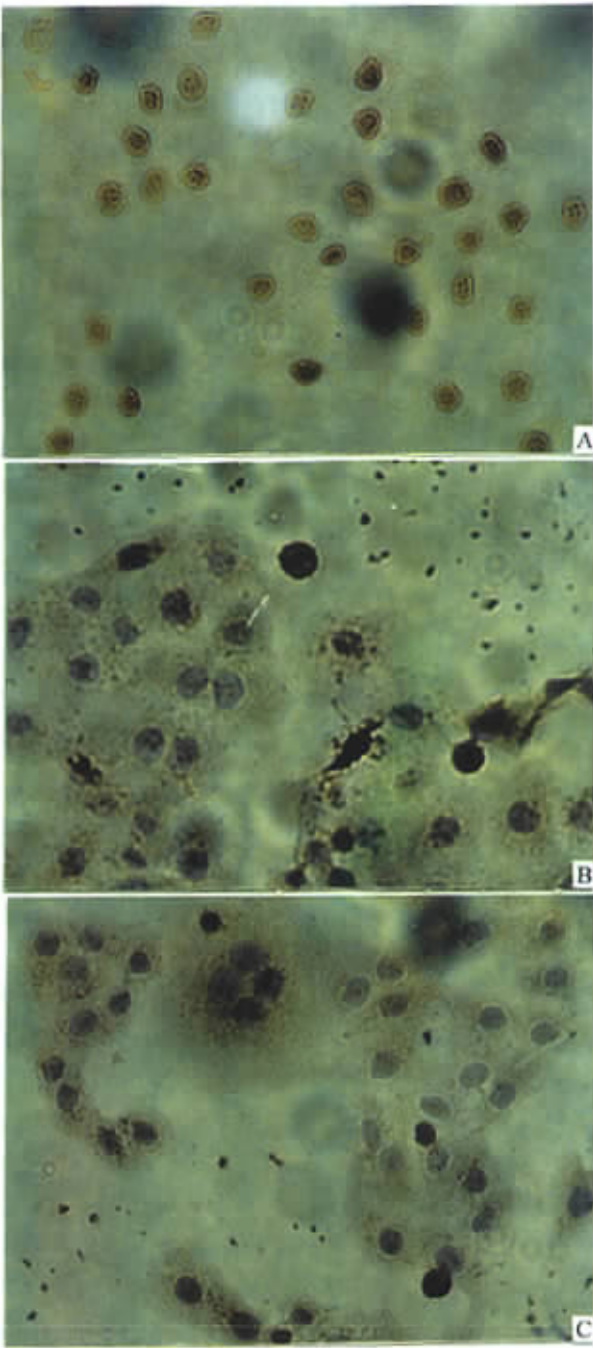
注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

#### 二、大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡的研究

1. 透射电镜观察: 经大豆异黄酮 (80 mg/L) 处理 24 h 后, 部分食管癌细胞出现典型的凋亡细胞形态, 如细胞核染色质致密浓缩, 或聚集于核膜呈新月形小体 (图 1)。

2. TUNEL 染色法: 光镜下检查可见, 经大豆异黄酮 (80 mg/L) 处理 24、48、72、96 h 后, 食管癌 EC-9706 细胞凋亡数明显增加。棕褐色染色颗粒定位于细胞核内。染色阳性的食管癌细胞出现细胞核碎裂, 核质固缩, 细胞膜突出形成质膜小泡等凋亡细胞形态学变化 (图 1A)。

大豆异黄酮未处理组的细胞凋亡指数为  $1.15\% \pm 1.04\%$ , 大豆异黄酮处理 24 h 组、48 h 组、72 h 组和 96 h 组的细胞凋亡指数分别为  $6.94\% \pm 2.17\%$ 、 $18.46\% \pm 1.78\%$ 、 $29.49\% \pm 3.23\%$  和  $38.67\% \pm 3.67\%$ 。t 检验结果显示, 各处理组与未处理组差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。



A. TUNEL 染色法检测食管癌 EC-9706 细胞凋亡, 细胞核染色为棕褐色者为阳性细胞 ( $\times 200$ ); B. 免疫组织化学法检测食管癌 EC-9706 细胞 bcl-2 蛋白表达, 细胞浆染色为棕褐色者为阳性细胞 ( $\times 200$ ); C. 免疫组织化学法检测食管癌 EC-9706 细胞 bax 蛋白表达, 细胞浆染色为棕褐色者为阳性细胞 ( $\times 200$ )

图1 食管癌 EC-9706 细胞凋亡与表达

### 三、大豆异黄酮调节 bcl-2 和 bax 表达的研究

#### 1. 免疫组织化学法检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达:

大豆异黄酮未处理组的 bcl-2 蛋白阳性细胞指数为  $37.43\% \pm 3.54\%$ , 大豆异黄酮处理 24 h 组、48 h 组、72 h 组和 96 h 组的阳性细胞指数分别为  $21.57\% \pm 2.25\%$ 、 $12.76\% \pm 2.23\%$ 、 $6.12\% \pm 1.25\%$  和  $3.04\% \pm 1.09\%$ 。t 检验结果显示, 各处理组与未处理组相比差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), 表明大豆异黄酮能使 bcl-2 蛋白产物表达减少。

大豆异黄酮未处理组的 bax 蛋白阳性细胞指数为  $8.43\% \pm 2.12\%$ , 大豆异黄酮处理 24 h 组、48 h 组、72 h 组和 96 h 组的阳性细胞指数分别为  $18.87\% \pm 2.54\%$ 、 $31.66\% \pm 3.28\%$ 、 $45.86\% \pm 6.25\%$ 、 $63.59\% \pm 5.63\%$ 。t 检验结果显示, 各处理组与未处理组相比差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), 表明大豆异黄酮能使 bax 蛋白产物表达显著增加。

2. RT-PCR 检测 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达 经大豆异黄酮 (80 mg/L) 处理 24、48、72、96 h 后, 再经 RT-PCR 检测发现食管癌 EC-9706 细胞 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达阳性, 并显示 bcl-2 mRNA 条带密度随时间的延长而递减 ( $P < 0.05$ ), bax mRNA 条带密度随时间的延长而增强 ( $P < 0.05$ ), 表明大豆异黄酮可下调 bcl-2 的 mRNA 表达, 上调 bax 的 mRNA 表达。

### 讨 论

研究发现 20、40、80 及 160 mg/L 浓度的大豆异黄酮对食管癌细胞均有明显抑制作用, 抑制率与对照组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 且随大豆异黄酮浓度增加和培养时间的延长, 抑制作用增强。经大豆异黄酮 (80 mg/L) 处理 24 h 后, 部分食管癌 EC-9706 细胞的超微结构出现典型的凋亡细胞形态, 证实大豆异黄酮 (80 mg/L) 对食管癌细胞具有诱导凋亡作用。大豆异黄酮处理 24、48、72、96 h 后, TUNEL 染色法发现食管癌 EC-9706 细胞凋亡数量随着时间的延长明显增加, 进一步证实诱导细胞凋亡是大豆异黄酮杀伤食管癌细胞的作用机制之一。因此, 探讨大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡的分子机制具有重要意义。本研究采用免疫组织化学法检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达而且还利用 RT-PCR 检测 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达。为了避免 RNA 加样提取、cDNA 合成及 PCR 反应过程中的系统误差

和人为误差, 而较准确地确定 bcl-2 和 bax 的 mRNA 表达水平, 选用  $\beta$ -actin 基因作为内参照。人 bcl-2 基因是从 B 细胞淋巴瘤染色体 (14:18) 易位断点上发现的。在生理和病理状态下, bcl-2 基因及其蛋白产物都是重要的凋亡调节因素。bcl-2 倾向于分布在生长细胞、增殖细胞。体外实验表明, 当去除了细胞因子后, 正常细胞便逐渐转向凋亡; 而当 bcl-2 过度表达时, 这一凋亡现象便被抑制了。由此可见, bcl-2 通过抑制诱导凋亡而使细胞寿命延长, 细胞堆积, 在肿瘤的发生中起启动作用。bax 基因则倾向于分布在终末分化细胞、退化细胞, 在凋亡旺盛的细胞中表达更强, 在功能上与 bcl-2 相反, 其过度表达则触发凋亡。Li 等<sup>[4]</sup>提出 bcl-2 和 bax 的比率决定了细胞凋亡的发生与否。至于大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡, 本研究结果表明, 大豆异黄酮可使食管癌 EC-9706 细胞 bcl-2 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平下调, 并随着时间的延长下调更加明显, 而对 bax 则上调其 mRNA 表达水平和蛋白表达水平, 从而使 bcl-2/bax 比值下降。这可能是大豆异黄酮诱导食管癌 EC-9706 细胞凋亡的分子机制之一, 即通过介导 bcl-2 的表达下调和上调 bax 的表达而实现的。

总之, 本研究证实, 在体外实验条件下, 大豆异黄酮可在 mRNA 水平和蛋白水平下调食管癌 EC-9706 细胞 bcl-2 基因的表达而上调 bax 基因的表达, 然后食管癌 EC-9706 细胞即发生凋亡。这为阐明大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡的分子机制提供了初步的实验依据, 有关大豆异黄酮诱导食管癌细胞凋亡的确切机制, 有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, et al. Soybean isoflavone arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res*, 1993, 53: 1328-1331.
- 2 Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, et al. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen soybean isoflavone in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer*, 1994, 30A: 1675-1682.
- 3 Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, 1995, 125(suppl): s757-s770.
- 4 Li Y, Bhuiyan M, Mohammad RM, et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA. *Oncogene*, 1998, 17: 2915-2920.

(收稿日期: 2002-09-16)

(本文编辑: 尹廉)