

· 论 著 ·

不同结构大豆皂甙对人肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖抑制作用

陈兰兰, 罗海吉, 查龙应[△]

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院营养与食品卫生学系, 广州 510515)

摘要:目的 研究 3 种结构形式的大豆皂甙(大豆总皂甙、大豆皂醇 A 和 大豆皂醇 B)对人肝癌细胞增殖的抑制作用。方法 采用 MTT 比色法观察不同浓度(10~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 3 种大豆皂甙对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的影响,采用 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡法检测其对 HepG2 细胞凋亡的影响。结果 大豆总皂甙、大豆皂醇 A 和 大豆皂醇 B 均能呈时间和浓度依赖性地抑制 HepG2 细胞增殖和诱导细胞凋亡,其对 HepG2 细胞增殖的半数抑制浓度(IC_{50})分别为(1.96 \pm 0.51)mg/mL、(0.98 \pm 0.17)mg/mL 和(0.50 \pm 0.02)mg/mL。结论 大豆皂甙可通过诱导细胞凋亡而发挥抗肝癌作用,且大豆皂醇的抑癌活性高于大豆总皂甙。

关键词:大豆皂甙;结构;肝癌;HepG2 细胞;增殖抑制

中图分类号:R735.7;R73-361

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)11-1344-03

Inhibitory effects of soyasaponins with different chemical structures on human hepatoma HepG2 cell proliferation

CHEN Lan-lan, LUO Hai-ji, ZHA Long-ying[△]

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of soyasaponins with different chemical structures (total soyasaponin, soyasapogenol A and B) on HepG2 cell proliferation. **Methods** MTT assay was used to examine the proliferation of HepG2 cell. Annexin V-FITC/PI double staining technique was used for analysis of cell apoptosis. **Results** Total soyasaponin, soyasapogenol A and soyasapogenol B inhibited the proliferation and induced apoptosis of HepG2 cells in a time- and concentration-dependent manner. Further analysis showed a 72 h IC_{50} values of (1.96 \pm 0.51)mg/mL for total soyasaponin, (0.98 \pm 0.17)mg/mL for soyasapogenol A, and (0.50 \pm 0.02)mg/mL for soyasapogenol B. **Conclusion** Soyasaponins can produce an anti-hepatoma activity via induction of apoptosis. Moreover, soyasapogenols exhibit higher anti-hepatoma activities compared to total soyasaponins.

Key words: soyasaponin; structure; hepatoma; HepG2 cell; proliferative inhibition

大豆除了含有优质蛋白质之外,还含有丰富的生物活性物质^[1],其中大豆皂甙(soyasaponin, SS)是由萜类同系物与糖缩合形成的一类化合物(五环三萜类糖甙),主要分为 A、B、E 和 DDMP 类皂甙^[2]。SS 具有抗癌、抗突变以及抗氧化等作用,其中,SS 的抗癌作用尤为引人关注。有研究表明,SS 对肝癌、结肠癌、乳腺癌、皮肤癌以及前列腺癌等都具有抑制作用^[3-6]。近来研究表明,SS 的抑癌效果因其结构而异^[5,7]。SS 经肠道细菌糖苷酶水解后产生相应的代谢产物大豆皂醇(soyasapogenol, SG),主要包括 SG-A、SG-B 和 SG-E,SG 的生理活性与 SS 不同^[5]。本文主要研究大豆总皂甙(total soyasaponin, TS)、SG-A 和 SG-B 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖抑制作用,探讨其抑癌效果的差异。

1 材料与方 法

1.1 材料 TS 购自华北制药股份有限公司,纯度为 80%;人肝癌细胞株 HepG2 细胞株购自中科院上海生化细胞所;噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司;EPICU Elite 流式细胞仪购自美国 Beckman-coulter 公司;Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒购自北京创根胜泰科技有限公司;ELX-808 酶标分析仪购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 SG 制备 参考 Gurfinkel 等^[8]方法,用甲醇溶解 TS

后,加入浓硫酸进行热水解,经 Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱进行分离制备 SG-A 和 SG-B,纯度分别为 57.3% 和 62.6%。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 25 cm^2 培养瓶中进行培养和传代,将处于对数生长期的细胞按 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔细胞培养板,每孔 200 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h,细胞贴壁后,加入不同浓度(10~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 SS(SG-A、SG-B 和 TS),同时设不加药物的阴性对照和不接种细胞的空白对照。继续培养 24、48、72 h,每个浓度每个时间点设置 6 个重复孔。在每个时间点结束时于每孔培养板中加入 20 μL MTT,孵育 4 h 后小心吸去上清液,每孔加入 200 μL DMSO 后用酶标仪测定 490 nm 波长处吸光值(A),实验重复 3 次。细胞增殖抑制率按以下公式计算:抑制率=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.3 细胞凋亡检测 收集阴性对照组和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SG-A、SG-B 和 TS 分别作用于 24、48、72 h 后的细胞,按 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒说明用流式细胞仪(美国 EPICU Elite Beckman-coulter)进行细胞凋亡检测。

1.3 统计学方法 用 SPSS11.5 统计软件对数据进行单因素方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,用 SPSS11.5 的 Probit 程序计算细胞增殖半数抑制浓度(IC_{50})。

2 结 果

2.1 SS 对 HepG2 细胞增殖的影响 不同结构 SS 对 HepG2

[△] 通讯作者,电话:020-62789127。

表 1 不同结构 SS 对 HepG2 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	24 h			48 h			72 h		
	SG-A	SG-B	TS	SG-A	SG-B	TS	SG-A	SG-B	TS
10	5.3±0.6 ^a	5.4±0.3 ^a	4.0±0.2 ^b	8.1±0.9	7.2±0.4	6.5±0.4	9.5±0.4 ^a	8.3±0.5 ^b	7.4±0.1 ^c
20	7.5±0.6 ^a	8.8±0.6 ^b	6.7±0.1 ^a	10.5±0.7	11.2±1.1	10.1±0.4	12.3±0.3 ^a	11.7±0.6 ^a	9.5±0.4 ^b
40	8.2±0.7 ^a	10.3±0.5 ^b	7.6±0.4 ^a	12.0±0.5 ^a	14.4±0.5 ^b	11.2±0.9 ^a	14.0±0.7 ^a	17.0±0.5 ^b	13.2±0.6 ^a
80	10.7±0.1 ^a	12.5±0.7 ^b	8.8±0.2 ^c	14.9±0.3 ^a	17.3±0.4 ^b	14.1±0.8 ^a	17.2±0.8 ^a	18.6±0.6 ^b	15.1±0.6 ^c
100	11.5±0.6 ^a	15.0±0.3 ^b	11.1±0.7 ^a	16.4±0.6 ^a	20.0±0.6 ^b	15.9±0.2 ^a	22.9±0.7 ^a	26.0±0.4 ^b	19.2±0.6 ^c
160	13.9±0.9 ^a	18.6±0.6 ^b	12.6±0.6 ^a	19.6±0.6 ^a	24.4±0.3 ^b	17.4±0.4 ^c	27.4±1.0 ^a	31.8±2.0 ^b	22.7±0.9 ^c
200	19.1±0.5 ^a	21.7±1.4 ^a	16.2±0.2 ^b	24.2±0.4 ^a	27.7±0.9 ^b	19.7±0.4 ^c	34.3±1.4 ^a	39.4±1.1 ^b	27.2±0.6 ^c
400	22.9±2.0 ^a	24.5±0.6 ^a	18.5±1.5 ^b	30.2±1.5 ^a	30.7±0.6 ^a	21.4±0.3 ^b	37.4±1.9 ^a	48.2±1.4 ^b	31.3±1.7 ^c

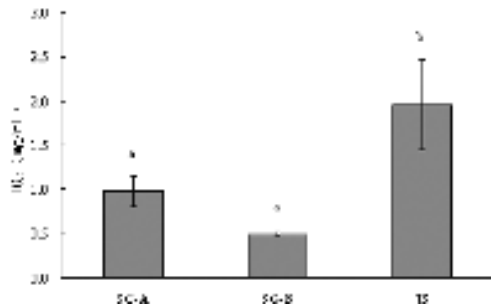
同一时间同一浓度时,不同上标字母(a, b, c)表示差异有统计学意义。

表 2 不同结构 SS 致 HepG2 细胞凋亡率变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	Annexin V ⁻ /PI ⁻			Annexin V ⁺ /PI ⁺			合计		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	7.4±2.1 ^d	7.8±0.9 ^c	5.7±2.0	1.1±0.4	9.4±2.6 ^b	14.9±2.1 ^c	8.5±1.8 ^d	17.1±2.4 ^d	20.5±0.4 ^e
SG-A 组	22.0±3.0 ^b	22.2±1.4 ^a	7.2±2.4	1.6±0.7	15.9±2.0 ^b	26.1±4.2 ^b	23.6±3.4 ^b	38.1±1.7 ^b	33.2±2.2 ^b
SG-B 组	30.6±2.2 ^a	17.4±0.8 ^b	10.5±2.9	2.0±0.5	32.4±3.3 ^a	51.6±3.3 ^a	32.6±2.7 ^a	49.7±2.8 ^a	62.1±5.4 ^a
TS 组	14.0±2.5 ^c	21.1±1.6 ^a	6.4±2.6	1.5±0.4	12.7±0.4 ^b	16.3±1.4 ^c	15.4±2.7 ^c	33.8±1.9 ^c	22.8±1.5 ^c

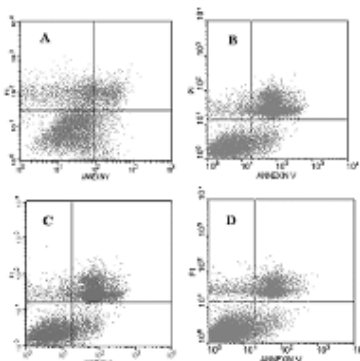
同一时间同一浓度时,不同上标字母(a, b, c)表示差异有统计学意义。

细胞增殖抑制率呈现时间和浓度依赖性,随着时间的延长和浓度的增加,抑制细胞增殖的效果更明显。SG-B 和 SG-A 对细胞增殖的抑制效果较 TS 明显,见表 1。



不同上标字母(a, b, c)表示差异有统计学意义。

图 1 不同结构 SS 对 HepG2 细胞增殖的 IC₅₀



A: 对照组; B: SG-A 组; C: SG-B 组; D: TS 组。

图 2 流式细胞术检测不同结构 SS(400 $\mu\text{g/mL}$) 作用 72 h 后致 HepG2 细胞凋亡结果

2.2 细胞增殖 IC₅₀ 不同结构 SS 作用 HepG2 细胞 72 h 后的 IC₅₀ 有明显差异(图 1), SG-A 和 SG-B 的 IC₅₀ 低于 TS, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 SS 对 HepG2 细胞凋亡的影响 SS 作用 HepG2 细胞后能检测到明显的细胞凋亡现象(表 2)。处理 24 h 后, SG-A、SG-B 和 TS 诱导的早期凋亡均显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 3 种不同结构 SS 诱导早期凋亡的作用呈现差异($\text{SG-B} > \text{SG-A} > \text{TS}$)。随着作用时间的延长, 以晚期凋亡(或坏死)为主(图 2)。

3 讨 论

SS 的抗癌活性已得到肿瘤细胞体外培养实验^[4-5]、动物实验^[9] 以及人群流行病学实验^[8-10] 的证实, 但这些实验多以 TS 提取物开展研究, 关于 SS 结构与抗癌活性关系的研究直到近几年才有报道^[2,5,7], 其主要原因在于受不同结构 SS 分离纯化技术的制约^[1]。本实验研究了 TS 以及两种形式的 SG-A 和 SG-B 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用, 结果发现, 3 种形式的 SS 均能有效抑制 HepG2 细胞的增殖, 呈浓度和时间依赖关系, 进一步分析 3 种 SS 对 HepG2 细胞增殖的 IC₅₀ 发现, SG-A [(0.98±0.17)mg/mL] 和 SG-B [(0.50±0.02)mg/mL] 的 IC₅₀ 值显著低于 TS 的 IC₅₀ 值 [(1.96±0.51)mg/mL], 差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明 SG-A 和 SG-B 抑制 HepG2 细胞的活性要强于 TS。Zhang 和 Popovich^[5] 报道, TS、SG-A 和 SG-B 作用 HepG2 细胞 72 h 后的 IC₅₀ 值分别为 (0.594±0.021)mg/mL、(0.052±0.011)mg/mL 和 (0.128±0.005)mg/mL。研究表明 SG-A 和 SG-B 抑制 HepG2 细胞增殖的活性高于 TS, 但不同的是 SG-A 的活性高于 SG-B, 这可能与 SG 的提取方法以及其纯度不一致有关^[11]。全吉淑等^[12] 研究了 TS 和 SG(含 28.2% 的 SG-A 和 41.9% 的 SG-B) 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用。结果同样发现, SG 的抑癌活性高于 TS。

细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及退化有密切的关系^[13-14],也是许多植物、化学物质抑癌活性的机制之一^[15-16]。有研究表明,SS能够诱导不同类型的肿瘤细胞凋亡^[3-5]。本实验用 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡法检测发现,TS、SG-A 和 SG-B 均能诱导 HepG2 细胞发生凋亡,作用 24 h 后主要发生早期凋亡(Annexin V⁺/PI⁻),且 SG-B 诱导细胞早期凋亡的活性显著高于 SG-A,差异有统计学意义($P < 0.05$),后者则又显著高于 TS,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着作用时间的延长,细胞主要以晚期凋亡或坏死(Annexin V⁺/PI⁺)为主。

本实验结果表明,SG(SG-A 和 SG-B)抑制人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的活性高于 TS,诱导细胞凋亡可能是其机制之一,且 SG 诱导细胞凋亡的活性同样高于 TS。同时,SG-A 和 SG-B 诱导细胞凋亡的活性也有差异,其诱导细胞凋亡的信号通路调控机制有待于进一步研究。此外,SG 为 SS 的肠道分解产物,而肠道微生物菌群是否会影响 SS 的分解代谢,并进而影响 SS 抗癌活性的效果尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Guclu-Ustunda O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007, 47(3): 231.
- [2] Hu J, Reddy MB, Hendrich S, et al. Soyasaponin I and Saponogenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women[J]. J Nutr, 2004, 134: 1867.
- [3] Fournier DB, Erdman JW, Gordon GB. Soy, its components and cancer prevention; a review of the in vitro, animal, and human data[J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 1998, 7: 1055.
- [4] Xiao JX, Huang GQ, Zhang SH. Soyasaponins inhibit the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis[J]. Exp Toxicol Pathol, 2007, 59: 35.
- [5] Zhang W, Popovich DG. Effect of soyasapogenol A and soyasapogenol B concentrated extracts on Hep-G2 cell proliferation and apoptosis[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 2603.
- [6] Ellington AA, Berhow MA, Singletary KW. Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(1): 159.
- [7] Gurfinkel DM, Rao AV. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity[J]. Nutr Cancer, 2003, 47(1): 24.
- [8] Gurfinkel DM, Reynolds WF, Rao AV. The isolation of soyasaponins by fractional precipitation, solid phase extraction and low pressure liquid chromatography[J]. Int J Food Sci Nutr, 2005, 56(7): 501.
- [9] Bennink MR. Dietary soy reduces colon carcinogenesis in human and rats, soy and colon cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 492: 11.
- [10] Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens[J]. J Nutr, 1995, 125: 717.
- [11] Zhang W, Yeo MC, Tang FY, et al. Bioactive responses of Hep-G2 cells to soyasaponin extracts differs with respect to extraction conditions[J]. 2009, 47: 2202.
- [12] 全吉淑,徐俊萍,许惠仙,等.大豆皂甙及甙元抗结肠癌作用的实验研究[J].食品科技,2009,34(2):176.
- [13] 李青国,陈龙舟,周士福.新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响[J].重庆医学,2009,38(1):58.
- [14] 姜果,张建华,姜荣健,等.膀胱移行细胞癌 survivin 表达临床特征及与肿瘤细胞增殖和凋亡的关系[J].重庆医学,2006,35(16):1468.
- [15] Melet A, Song K, Bucur O, et al. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 47.
- [16] 刘晓春,蓝娇,潘莉莉,等.芸豆皂甙诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡及其对细胞内钙含量的影响[J].广西医学,2009,31(5):616.

(收稿日期:2009-11-02 修回日期:2010-03-23)

(上接第 1343 页)

参考文献:

- [1] 姚雯,孙自敏.脐带血干/祖细胞的体外扩增实验研究进展[J].国际儿科学杂志,2007,34(3):202.
- [2] 刘斌,廖灿,魏佳雪,等.3种不同方法分离脐血造血细胞的比较[J].中华血液学杂志,1999,20(5):271.
- [3] Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. Superior ex-vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cell[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 37(4): 359.
- [4] 岑洪,林茂芳.脐带血造血前体细胞在间质干细胞微环境中的增殖和分化特性研究[J].中国病理生理杂志,2007, 23(5):995.
- [5] 李玉艳,梁志清,李彩霞,等.人脐带血 CD34⁺细胞的提取及慢病毒载体转染的初步研究[J].重庆医学,2008,37(14):1570.

(收稿日期:2009-08-13 修回日期:2010-01-13)