

大豆异黄酮对 A549 细胞化疗协同作用*

尹学哲, 金延华, 许惠仙

摘要:目的 探讨大豆异黄酮(ISF)联合长春瑞滨(NVB)化疗对 A549 肺癌细胞增殖影响。方法 采用噻唑兰法观察 ISF 和 NVB 联用对 A549 肺癌细胞增殖影响,采用 Weeb 系数法判定联合用药相互作用,同时采用透射电镜检测 A549 细胞形态学变化。结果 ISF 和 NVB 单独使用均可时间和浓度依赖性抑制肺癌 A549 细胞增殖;20~80 mg/L ISF 作用 48 h, A549 细胞增殖抑制率为 15%~23%;8~32 mg/L NVB 作用 48 h, A549 细胞增殖抑制率为 53%~80%;ISF 浓度在 40 mg/L 时, ISF 和 NVB 联用后抗 A549 细胞增殖作用增强,对肺癌细胞生长抑制作用呈量效关系;且 NVB 浓度在 8~32 mg/L 时,抑制率为 71%~93%,二者有相加或协同作用。结论 ISF 和 NVB 联用可增强对肺癌 A549 细胞增殖抑制,二者具有协同作用。

关键词:大豆异黄酮(ISF);长春瑞滨(NVB);肺癌;增殖;形态学

中图分类号: R 155.5⁺3

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2012)11-1465-03

Synergistic antitumor effect of soybean isoflavones combined with chemotherapy on A549 cell

YIN Xue-zhe, JIN Yan-hua, XU Hui-xian (Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin Province 133000, China)

Abstract: Objective To assess the inhibitory effect and mechanism of soybean isoflavones (ISF) combined with vinorelbine (NVB) on proliferation of A549 lung carcinoma cells. **Methods** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was used to examine the effects of ISF and NVB on proliferation of A549 cells, and their combined effect was analyzed by Weeb's method. Transmission electron microscopic technique was used for the determination of morphology of A549 cell apoptosis. **Results** ISF and NVB inhibited the proliferation of lung carcinoma cells in a time- and concentration-dependent manner. The inhibitory indexes of ISF at the concentration of 20~80 mg/L were 15%~23%, and the inhibitory indexes of NVB at the concentration of 8~32 mg/L were 53%~80% at 48 hours. The concentration-dependent pattern in the combination of ISF and NVB were also detected with 40 mg/L ISF. The synergistic or additive effect on inhibition of A549 cell proliferation was detected for NVB at the concentration from 8 to 32 mg/L with the inhibitory indexes of 71%~93%. **Conclusion** ISF combined with NVB can enhance the growth inhibition of A549 lung carcinoma cells and play a synergistic antitumor effect.

Key words: soybean isoflavones; vinorelbine; lung cancer; proliferation; morphology

大豆是人类重要食物资源,大豆异黄酮(soybean isoflavones ISF)是其重要功能成分之一,具有防治癌症、降低血脂、抗氧化、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合症等多种生理功能^[1]。近年来,ISF 抗癌研究成为热点,已证实 ISF 对人乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种细胞有明显抑制作用^[2-4]。长春瑞滨(vinorelbine NVB)是一种细胞周期特异性药物,主要通过抑制着丝微管蛋白聚合,使细胞分裂停止于有丝分裂中期,其终末半衰期为 40 h,适用于非小细胞肺癌和乳腺癌患者等,具有血液、神经、胃肠道和呼吸道毒性^[5]。肿瘤化疗作为全身性治疗手段具有不良反应且毒性较大等问题。因此,探索药物替代或联合应用以期减少用量或能够延缓、逆转其耐药药物,成为目前研究热点。本研究通过观察 NVB 和

ISF 单用或联合应用时对肺腺癌 A549 细胞增殖影响,为二者在临床上联合应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 A549 细胞(中国科学院上海细胞研究所),大豆(中国东北产),噻唑兰(美国 Sigma 公司);NVB(江苏豪森药业股份有限公司),RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司),小牛血清(北京华美生物工程公司),胰蛋白酶(美国 DIFCO 公司)。U-2100 紫外分光光度仪(日本岛津公司),OLYMPUS 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),RT-2100 酶标仪(深圳雷杜公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮提取及分析 将大豆胚轴用 50% 甲醇提取,上 C18 层析柱,依次用不同浓度甲醇溶液梯度洗脱,收集大豆异黄酮丙二酰化糖苷,经酸解得大豆异黄酮苷元。通过薄层层析和高效液相色谱法分析产品组成和纯度^[6]。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 肺癌细胞贴壁生长,培

* 基金项目:国家自然科学基金(30360113);吉林省科技发展计划(200705426)

作者单位:延边大学附属医院,吉林 延吉 133000

作者简介:尹学哲(1962-)男,朝鲜族,吉林延吉人,教授,博士,研究方向:基础医学与临床医学。

养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养液 (pH 7.2) 中,置 37 °C、相对湿度 90%、5% CO₂ 孵箱内培养。取对数生长期 A549 细胞按每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL。待细胞贴壁后,ISF 组加入 ISF 使其终浓度分别为 20、40、80 和 160 mg/L,NVB 组加入 NVB 使其终浓度分别为 2、4、8、16 和 32 mg/L,同时设对照组。每孔加药量 20 μL,分别培养 24、48 和 72 h。联合组先以 ISF 作用 24 h 后,再加入 NVB 使其终末浓度同单独用药组,继续培养 44 h。2 药合用时比例为 1:1,即每种单药剂量浓缩 1 倍,各加 10 μL。另设 ISF 作用 68 h 和 NVB 作用 44 h 组,计算预估抑制率。每个浓度每个时点均设 6 个复孔。于终止前 4 h,每孔加入 5 g/L 噻唑兰溶液 20 μL,继续孵育 4 h 后弃上清液,加入 150 μL 二甲亚砜,轻轻振荡 10 min,使结晶物完全溶解,于 490 nm 波长处测吸光度(A 值),计算生长抑制率。抑制率(%)=(对照组 A 值 - 给药组 A 值)/对照组 A 值 × 100%。

1.2.3 联合效应结果判定方法^[5] 采用 Weeb 系数判定联合用药相互作用,预估抑制率(%) = A + B - A × B,其中 A、B 分别为 ISF、NVB 单药作用抑制率。当实际抑制率 > 预估抑制率时,表明联合用药有协同作用;当实际抑制率 = 预估抑制率时,表明联合用药有相加作用;当预估抑制率 > 实际抑制率 > A 和(或)B 时,表明联合用药有次加作用。

1.2.4 A549 细胞形态学观察 取对数生长期 A549 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,24 h 后换液,加入含 40 mg/L ISF 或/和 3 mg/L NVB 的 10% 新生小牛血清 RPMI 1640 培养液 200 μL,另设不加药物对照组。置 5% CO₂ 孵箱内培养 24 h。在倒置显微镜下观察细胞生长状态,并收集细胞用 4% 戊二醛和 1% 锇酸固定、脱水、包埋、切片、染色,观察 ISF 及 NVB 单独和联合作用后 A549 细胞亚结构改变。

1.3 统计分析 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验和方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ISF 组成分析 大豆胚轴中异黄酮总含量达 3.5%,含大豆苷元、大豆黄素和染料木黄酮糖苷、丙二酰化糖苷和乙酰化糖苷。薄层层析和高效液相色谱法分析结果表明,未水解提取粉中异黄酮主要形式为丙二酰化糖苷,占异黄酮总量 70%,糖苷占 17%,乙酰化糖苷和游离苷元仅为 1% 和 11%。水解产品收率为 28.9%,纯度为 40.2%,其中大豆苷元、黄豆苷元和染料木酮之比约为 10:5:3。

2.2 ISF 与 NVB 单独应用对 A549 细胞增殖影响(表)

ISF 或 NVB 干预 A549 细胞后,二者对 A549 细胞生长均有抑制作用。ISF 和 NVB 对肿瘤细胞生长抑制呈时间和浓度依赖性,随着时间延长和浓度增加抑制效果更明显(t = 3.2 ~ 6.8 P < 0.05)。

表 1 ISF 及 NVB 对 A549 细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$ n = 6)

组别	剂量 (mg/L)	抑制率(%)		
		24 h	48 h	72 h
ISF 组	20	6.7 ± 1.0	14.7 ± 1.1 ^b	17.2 ± 1.6 ^b
	40	9.8 ± 1.3 ^a	21.3 ± 1.5 ^{ab}	22.8 ± 1.8 ^{ab}
	80	20.3 ± 1.8 ^a	22.6 ± 1.7 ^a	24.4 ± 1.5 ^{ab}
	160	28.1 ± 2.0 ^a	30.4 ± 2.1 ^a	33.4 ± 2.2 ^{ab}
NVB 组	2	15.9 ± 1.6	23.2 ± 2.4 ^b	30.7 ± 1.9 ^b
	4	23.4 ± 2.6 ^a	38.7 ± 3.1 ^{ab}	40.5 ± 2.7 ^{ab}
	8	41.3 ± 3.1 ^a	52.9 ± 4.6 ^{ab}	65.1 ± 3.4 ^{ab}
	16	53.7 ± 4.0 ^a	71.5 ± 5.3 ^{ab}	83.0 ± 6.4 ^{ab}
	32	63.5 ± 5.4 ^a	79.6 ± 5.7 ^{ab}	92.6 ± 5.9 ^{ab}

注:与前一剂量比较 ^a P < 0.05;与前一时间比较 ^b P < 0.05。

2.3 ISF 与 NVB 联合效应分析(表 2) 采用 Weeb 系数法计算预估抑制率,当 NVB 浓度为 2 和 4 mg/L 时 2 药联合对 A549 细胞增殖抑制有次加作用,当 NVB 浓度为 8、16 和 32 mg/L 时 2 药联合对 A549 细胞增殖抑制具有协同作用。

表 2 ISF 联合 NVB 对 A549 细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$ n = 6)

ISF (mg/L)	NVB (mg/L)	实际抑制率 (%)	预估抑制率 (%)	联合作用类型
40	2	20.8 ± 1.6	38.0	次加
40	4	29.3 ± 2.8 ^a	47.2	次加
40	8	70.7 ± 6.4 ^a	60.5	协同
40	16	82.0 ± 5.8 ^a	81.8	协同/相加
40	32	92.7 ± 6.7 ^a	88.0	协同

注:与前一剂量比较 ^a P < 0.05。

2.4 ISF 与 NVB 对 A549 细胞亚结构影响(图 1) 透射电镜观察结果显示,对照组细胞完整、核大,细胞表面有丰富微绒毛,可见凝集异染色质,细胞内有较多粗面内质网、线粒体、分泌颗粒。ISF 组 A549 细胞肿胀、空泡变性;NVB 组 A549 细胞胞质浓缩,胞体缩小,微绒毛减少,细胞内可见大量线粒体肿胀、嵴断裂和空化变性现象;联合用药组 A549 细胞

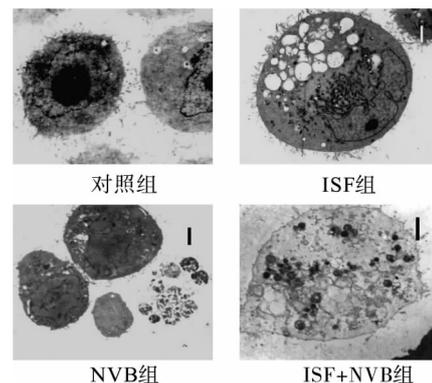


图 1 A549 细胞透射电镜结构观察(Bar = 2 μm)

亚结构与 NVB 组细胞相似,胞浆及核皱缩,可见细胞内线粒体肿胀和空化现象。

3 讨论

大豆异黄酮研究近年来不断受到重视,尤其在抗癌方面。已有研究证实 ISF 可诱导肿瘤细胞周期改变和细胞凋亡,从而抑制多种肿瘤细胞增殖^[7]。本研究结果显示,在所用浓度范围内 ISF 能有效抑制 A549 细胞增殖,其细胞生长抑制率随着药物浓度升高和时间延长而增加,具有量效和时效关系。同时,NVB 单独或与 ISF 联合应用时,随着 NVB 浓度增加,对肺腺癌 A549 细胞生长抑制效应也增加;当 NVB 浓度 > 8 mg/L 时,与 ISF 联合应用对肺腺癌 A549 细胞生长抑制效应明显强于 ISF 单独用药,表现有相加或协同作用。提示 ISF 与 NVB 联合用药时,只需小剂量 NVB 就达到抗细胞增殖高效应,可减少高剂量 NVB 所致药物不良反应。二者联合应用为肿瘤临床用药开拓了新思路,有望降低化疗药物不良反应。通常,两药呈现协同作用往往是因为二者具有不同作用机制。在与 NVB 协同作用中,

ISF 通过何种机制发挥其主要作用,2 种药物给药顺序对肿瘤细胞抑制率的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 周建芹. 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究[J]. 大豆科学 2007 26(2): 276-279.
- [2] Tophkhane C, Yang S, Bales W, et al. Bcl-2 overexpression sensitizes MCF-7 cells to genistein by multiple mechanisms[J]. International Journal of Oncology 2007 31(4): 867-874.
- [3] Chodon D, Ramamurty N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line[J]. Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA 2007 21(5): 887-891.
- [4] Dewell A, Weidner G, Sumner MD, et al. Relationship of dietary protein and soy isoflavones to serum IGF-1 and IGF binding proteins in the Prostate Cancer Lifestyle Trial[J]. Nutrition and Cancer 2007 58(1): 35-42.
- [5] 钱晓萍, 刘宝瑞, 万莉, 等. 长春瑞滨联合西妥昔单抗抑制血管生成作用的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(4): 253-257.
- [6] 全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 高效液相色谱法检测大豆异黄酮[J]. 中国公共卫生 2004 20(1): 104.
- [7] 金梅花, 许惠仙, 金花, 等. 大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞增殖和凋亡的研究[J]. 大豆科学 2008 27(6): 1028-1031.

收稿日期: 2011-11-08

(解学魁编辑 郑新校对)

• 实验研究 •

内毒素多克隆抗体制备及其在 ELISA 中应用*

周卓晟^{1,2}, 罗中捷^{1,3}, 郝春慧¹, 郭寅生¹, 刘红艳¹, 黄正¹

摘要:目的 制备抗大肠杆菌精制内毒素的兔多克隆抗体并建立检测内毒素的间接竞争性酶联免疫吸附试验(ELISA)方法。方法 大肠杆菌精制内毒素作为免疫原,采用逐渐加强免疫剂量的方法免疫家兔,制备抗体,将抗体用于 ELISA 检测精制内毒素;并与复合型内毒素进行反应。结果 随着免疫次数增加,抗血清效价逐渐提高,最后一次免疫后血清效价达到 1:6 400;在包被抗原浓度 100 μg/mL 和兔多抗稀释比 1:500 最佳使用条件下建立间接竞争性 ELISA,内毒素浓度与吸光度(A)值成反比例关系,线性回归方程为: $y = -0.1 \ln(x) + 0.765$,检测最低内毒素浓度为 50 ng/mL;兔血清与复合型内毒素反应效价为 1:16 000。结论 成功制备出抗精制内毒素兔多克隆抗体,且能与复合型内毒素反应。

关键词: 内毒素;多克隆抗体;酶联免疫吸附试验(ELISA)

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1467-03

Preparation of polyclonal antibody against *E. coli* endotoxin and application of icELISA

ZHOU Zhuo-sheng*, LUO Zhong-jie, HAO Chun-hui, et al (* Ministry of Education, Key Lab of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430030, China)

Abstract: Objective To prepare rabbit polyclonal antibody against *E. coli* endotoxin and to establish indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) for the detection of endotoxin. **Methods** Purified *E. coli*

* 基金项目: 国家自然科学基金(30771774)

作者单位: 1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院 教育部环境与健康重点实验室 湖北 武汉 430030; 2. 深圳市龙岗区龙岗卫生监督分所; 3. 广州市卫生监督所

作者简介: 周卓晟(1983-),男,广西全州县人,医师,硕士,主要从事卫生检验工作。

通讯作者: 黄正, E-mail: huangzhg@mails.tjmu.edu.cn