

# 淡豆豉提取物对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

谭颖颖<sup>1,2\*</sup>, 张琪<sup>1</sup>

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. North Dakota State University, Fargo, ND 58105, USA)

**[摘要]** 目的:探讨淡豆豉提取物抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及其相关的氧化应激机制。方法:用不同剂量(100,200,400,800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )淡豆豉提取物作用于乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞,以 MTT 法检测细胞增殖率,流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的变化。结果:低剂量淡豆豉提取物抑制 MCF-7 细胞增殖,但无凋亡发生,伴随细胞内 ROS 降低。高浓度淡豆豉提取物作用后细胞增殖抑制率明显增加( $P < 0.01$ ),细胞出现大量凋亡,并伴随细胞内 ROS 明显升高。结论:淡豆豉提取物具有剂量依赖的抑制癌细胞增殖作用,不同剂量的淡豆豉提取物通过对乳腺癌细胞内氧应激状态的调节参与了其抗肿瘤细胞增殖作用的机制。

**[关键词]** 淡豆豉提取物;乳腺癌;活性氧;氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0220-03

淡豆豉(SSP)是由豆科植物大豆的成熟种子和青蒿、桑叶等经发酵加工而成,具有解表除烦、宣发郁热等功效,临床多用于治疗感冒发热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等症<sup>[1]</sup>。近年来,有研究发现大豆中异黄酮、皂苷等多种成分具有明显的抗肿瘤作用,对肝癌、前列腺癌及其他一些癌细胞系的生长、增殖具有抑制作用,是癌症天然的化学预防剂<sup>[2-3]</sup>。但淡豆

豉的提取物对乳腺癌细胞是否有作用尚未见报道,本文通过体外实验观察了淡豆豉提取物对乳腺癌细胞增殖的调节作用并探讨其可能作用机制,为扩展其临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药物及试剂** 淡豆豉由美国北达科他州立大学食品系提供。将淡豆豉干燥后粉碎,过 10 目筛,取 30 g 药材粉末置于 1 000 mL 三角瓶中,依次加入 70% 乙醇 300 mL,丙酮 300 mL,室温超声提取 3 次,每次提取 20 min,合并各提取液并减压浓缩,冷冻真空干燥得粉末状提取物。人乳腺癌细胞系 MCF-7 购自 ATCC 公司。培养液 DMEM 和胰蛋白酶为 Gibco 公司产品。2',7' 二乙酰二氯氟荧光素

**[收稿日期]** 2011-03-30

**[基金项目]** 陕西省中医管理局课题基金(2007-31). 陕西省教育厅重点学科建设专项资金

**[通讯作者]** \*谭颖颖,博士, Tel: 029-38185131, E-mail: yingyingtan2002@gmail.com

的清除氧自由基、抗脂质过氧化和减轻钙超载作用,对心肌有保护作用<sup>[6]</sup>。本实验采用冠状动脉结扎造成大鼠急性心肌缺血模型,实验结果显示抗毒补心胶囊可对抗冠状动脉结扎诱发大鼠所致的心肌损伤,使心肌缺血大鼠血清中 CK,LDH 活性降低,能显著降低 MDA 含量,增加 SOD 活力,从而抗脂质过氧化,减轻缺血心肌细胞损伤,达到保护心肌、抗心肌缺血作用。

## [参考文献]

[1] 吕立勋,吴范武,李洁,等. 抗毒补心胶囊治疗病毒性心肌炎的疗效观察[J]. 山东医药,2010,50(5):36.  
[2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:307.

[3] 付晓春,王希,郑辉,等. 藜草苷对缺血缺氧心肌的保护作用[J]. 南方医科大学学报,2007,27(8):1173.  
[4] Kin H, Zatta A J, Lofye M T, et al. Post conditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine[J]. Cardiovasc Res, 2005,67(1):124.  
[5] 王秋娟,潘志伟,杨涓,等. 淫羊藿总黄酮不同给药途径对实验性心肌缺血的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(9):794.  
[6] 周云枫,吴勇,欧阳静萍. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠肾组织胰岛素信号转导的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2005,26(2):139.

[责任编辑 何伟]

(DCFH-DA)和噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司。

**1.2 仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(Sanyo,日本),Accuri's C6型流式细胞仪(Accuri Cytometers,美国),ELX800型酶标仪(Bio-Tek,美国)。

**1.3 细胞培养** MCF-7细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液在饱和湿度,37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养,每日观察生长情况,贴壁2~5d传代1次。传代时用0.25%胰酶消化后,加入培养液吹打制成细胞悬液,继续传代,并取对数生长期细胞进行实验。

**1.4 MTT法测细胞增殖抑制率** 取96孔培养板,每孔加入100μL细胞悬液,MCF-7细胞密度均为1×10<sup>5</sup>个/mL。96孔板放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中进行贴壁培养。培养24h后,弃去培养液,每孔加入100μL不同质量浓度淡豆豉提取物(100~800μg·mL<sup>-1</sup>),温箱孵育48h。每孔加入10μLMTT,培养4h,弃上清液,每孔加入100μLDMSO,酶标仪570nm处测定各孔吸光度(A),实验重复3次。计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{处理组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

**1.5 Annexin/PI法检测细胞凋亡** Annexin/PI流式细胞仪分析检测细胞的早期凋亡。不同剂量淡豆豉提取物处理的MCF-7细胞,于24h后离心收集,调整细胞密度为1×10<sup>6</sup>/mL,用PBS洗涤、重悬2次,加入10μLAnnexin和5μLPI混匀,避光室温反应15min,加入400μLbinding buffer,在1h内上机检测。

**1.6 荧光DCFH-DA法检测ROS水平** 对数生长期MCF-7细胞经不同剂量淡豆豉提取物处理后,胰酶消化并收集细胞,PBS冲洗1次,调整细胞密度至1×10<sup>6</sup>/mL,加入荧光探针DCFH-DA使其终浓度为5μmol·L<sup>-1</sup>,避光孵育30min后用PBS冲洗2次,流式细胞仪记录2',7'二氯氟荧光素(DCF)产生荧光量的变化(激发光波长488nm,发射光波长525nm)。每个样品测定1×10<sup>4</sup>个活细胞,分析DCF的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI),MFI间接反映细胞ROS的水平。

**1.7 统计学处理** 采用Sigma plot 12.0进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 对细胞增殖活性的影响** MTT检测,低剂量淡豆豉提取物即对细胞增殖有抑制作用( $P < 0.01$ ),

随淡豆豉提取物剂量的增加,细胞增殖抑制率明显增加;淡豆豉提取物作用于MCF-7细胞24h的IC<sub>50</sub>(378 ± 5.3)μg·mL<sup>-1</sup>。见表1。

表1 淡豆豉提取物对MCF-7细胞增殖影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	剂量/μg·mL <sup>-1</sup>	A	抑制率/%
空白对照	0	1.92 ± 0.02	0.25 ± 2.45
淡豆豉提取物	100	1.68 ± 0.01 <sup>1)</sup>	12.49 ± 1.73 <sup>1)</sup>
	200	1.48 ± 0.02 <sup>2)</sup>	21.64 ± 2.15 <sup>2)</sup>
	400	0.92 ± 0.02 <sup>2)</sup>	51.63 ± 1.37 <sup>2)</sup>
	800	0.64 ± 0.01 <sup>2)</sup>	67.32 ± 2.74 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表2~3同)。

**2.2 对细胞凋亡率的影响** 淡豆豉提取物低剂量组与对照组比较未见凋亡发生,400μg·mL<sup>-1</sup>作用时凋亡率显著增加。见表2。

表2 淡豆豉提取物对MCF-7细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	剂量/μg·mL <sup>-1</sup>	凋亡率/%
空白对照	0	1.73 ± 0.58
淡豆豉提取物	100	2.09 ± 1.24
	200	2.37 ± 0.84
	400	4.83 ± 1.02 <sup>1)</sup>
	800	19.43 ± 0.79 <sup>2)</sup>

**2.3 对ROS水平的影响** 不同剂量淡豆豉提取物处理24h后ROS水平呈现双相反应。不同剂量淡豆豉提取物处理MCF-7细胞24h后,800μg·mL<sup>-1</sup>组ROS水平比对照组增加约9倍( $P < 0.05$ ),而100μg·mL<sup>-1</sup>组却显著降低( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 淡豆豉提取物对MCF-7细胞ROS水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	剂量/μg·mL <sup>-1</sup>	ROS/FI
空白对照	0	14.13 ± 0.82
淡豆豉提取物	100	5.04 ± 1.09 <sup>1)</sup>
	200	9.17 ± 0.69
	400	16.27 ± 0.97
	800	37.61 ± 1.03 <sup>1)</sup>

## 3 讨论

淡豆豉是大豆的成熟种子经发酵而成,其有效成分为异黄酮,有类雌激素作用。已有研究发现,大豆中的异黄酮类等活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化等多方面功效。流行病学调查也发现,与激素密切相关的肿瘤如乳腺癌,前列腺癌和结肠癌等均与大豆制品的摄入量呈负相关<sup>[2-4]</sup>。本研究结果显示,淡豆豉提取物对MCF-7细胞的增殖有显著抑制作用,并随剂量增加抑制作用增强,表明淡豆豉有明显的抗

肿瘤作用。

已有的研究发现,生理水平的 ROS 可调控细胞的分裂增殖。但当细胞内 ROS 超过阈值后,则表现为抑制细胞周期,而更高浓度的 ROS 则导致 DNA 破坏、细胞老化和凋亡、坏死产生<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞内存在与正常细胞不同的氧化应激状态,表现为较高水平的自由基和较低的抗氧化酶活性。这种较高水平的 ROS,可激活敏感的转录因子和相关基因,从而保障肿瘤细胞的生存、增殖以及迁移。但同时,肿瘤细胞内 ROS 水平过度升高后,表现为肿瘤细胞的凋亡和坏死<sup>[6-7]</sup>。

本研究发现,低剂量淡豆豉提取物对 MCF-7 细胞的增殖有一定抑制作用,但未见凋亡发生,同时伴有细胞内 ROS 降低。细胞内 ROS 的降低可能通过抑制细胞周期、抑制转录因子水平等途径抑制肿瘤细胞的增殖。随着淡豆豉提取物剂量的加大,细胞内 ROS 升高,同时伴随凋亡的大量产生,细胞增殖明显抑制。表明不同剂量淡豆豉提取物可能通过对细胞内氧应激的调节,参与了其抗肿瘤作用。

## [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 1995:289.
- [2] 李娜,黄庆柏. 淡豆豉中的异黄酮成分及药理作用与临床应用[J]. 中国现代中药,2008,10(7):18.
- [3] 毛峻琴,宓鹤鸣,姜子洋,等. HPLC 法测定淡豆豉中异黄酮的含量[J]. 第二军医大学学报,2000, 21(10):955.
- [4] Kobayashi H, Namikoshi M, Yoshimoto T, et al. A screening method for antimetabolic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical marine fungi. D3 [J]. *Antibiotics*, 1996, 49 (9): 873.
- [5] Nicco C, Laurent A, Chereau C, et al. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59 (4): 169.
- [6] Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252 (1): 128.
- [7] Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(1): 53.

[责任编辑 何伟]

---

## 简 讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会 2009 年统计结果报道,2008 年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中,有 224 篇被美国化学文摘(CA)收录,标志着《中国实验方剂学杂志》已成为 CA 在国内的主要统计源期刊之一,也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此,谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢,向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意!