

大豆异黄酮对长春瑞滨化疗兔鳞癌的干预作用

尹学哲¹, 赵文玺², 金爱花¹, 全吉淑^{2,*}

(1. 延边大学医院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 研究大豆异黄酮(ISF)联合长春瑞滨(NVB)化疗对兔VX2移植瘤的抑瘤作用及其可能机制。建立兔VX2肺移植瘤模型, 随机分为模型组、ISF组、NVB组和ISF+NVB组。观察各组荷瘤兔的生存情况, 计算生命延长度。另建立兔VX2皮下移植瘤模型, 观察各组荷瘤兔的肿瘤生长情况, 实验结束后, 称瘤质量和计算抑瘤率。比色法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)含量以及肿瘤组织Caspase-3和Caspase-8活化情况, 以DNA Laddering法检测肿瘤细胞DNA断裂情况。结果表明: 与模型组比较, ISF和NVB单独用药或二者联合用药能显著延长VX2肺移植瘤兔生存时间, 提高其生命延长度。两药单用或联用对VX2皮下移植瘤生长均有明显的抑制作用, 且两药联合应用时表现有协同作用。同时, 与模型组比较, NVB虽明显增高血清GSH-Px活性, 但SOD活性显著降低, MDA水平明显增高。而ISF组和ISF+NVB组均可明显升高血清GST、GSH-Px活性和TAOC水平, 降低MDA水平。ISF单独处理或ISF+NVB联合处理可增高肿瘤组织Caspase-3和Caspase-8活化水平, 并增高肿瘤细胞DNA断裂。提示ISF对VX2移植瘤具有明显的抑制作用, 且对NVB疗效有明显增强作用, 其作用可能与其增高机体抗氧化能力和诱导肿瘤细胞凋亡作用有关。

关键词: 大豆; 异黄酮; 长春瑞滨; VX2; 抗氧化; 凋亡

Effect of Soybean Isoflavone Combined with Vinorelbine on Transplanted Squamous Cell Carcinomas in Rabbits

YIN Xue-zhe¹, ZHAO Wen-xi², JIN Ai-hua¹, QUAN Ji-shu^{2,*}

(1. Yanbian University Hospital, Yanji 133002, China; 2. College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: The anti-tumor effect of soybean isoflavone (ISF) combined with vinorelbine (NVB) chemotherapy in VX2-bearing rabbits and the corresponding mechanisms were investigated. Rabbits implanted with VX2 tumor in the lung were divided into 4 groups including model, ISF, NVB, ISF+NVB (ISF combined with NVB) groups. The survival time of the rabbits was recorded and the extension rate of life was calculated. The rabbits from another group were transplanted with VX2 subcutaneously, and then the size and weight of tumor were estimated and the growth inhibition rate was calculated. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant activity (T-AOC), and the content of malondialdehyde (MDA) in serum, as well as the activation of Caspase-3 and Caspase-8 in tumor tissue were detected by colorimetric method, and the DNA fragmentation of implanted tumor cells was determined by DNA ladder method. The results showed that the administration with ISF and/or NVB prolonged the survival time and improved the extension rate of life in VX2-bearing rabbits. ISF and/or NVB inhibited the growth of VX2 tumor transplanted subcutaneously into rabbits, and a synergistic effect was detected for the combination of ISF and NVB in this model. In addition, NVB treatment increased serum MDA content, and reduced serum SOD activity despite of the increased activity of serum GSH-Px, while ISF and ISF+NVB treatments increased serum GST, GSH-Px and TAOC levels, and reduced serum MDA in VX2-bearing rabbits. Furthermore, ISF alone or ISF+NVB treatments increased the activation of Caspase-3 and Caspase-8, and elevated DNA fragmentation of implanted VX2 tumor cells in VX2-bearing rabbits. Therefore, ISF exhibits an inhibitory effect on the growth of transplanted VX2 tumor, and potentiates the chemotherapeutic effect of NVB probably via improved anti-oxidative capability and the induction of apoptosis in carcinoma cells.

Key words: soybean; isoflavones; vinorelbine; VX2; anti-oxidative; apoptosis

中图分类号: R151.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)15-0236-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201315049

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30360113); 吉林省科技发展计划项目(200705428)

作者简介: 尹学哲(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肺部疾病及肿瘤学。E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

*通信作者: 全吉淑(1968—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为分子肿瘤学。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn

大豆异黄酮(soybean isoflavones, ISF)是大豆主要功能成分之一,具有抗癌、降脂、抗动脉硬化、抗氧化、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合征等多种生理功能^[1]。目前发现的大豆异黄酮共有12种,分为游离型的苷元和相应的糖苷^[2]。近年来,大豆异黄酮的抗癌研究成为热点,已证实大豆异黄酮对人乳腺癌、前列腺癌等多种激素相关性肿瘤细胞以及肺癌、肝癌等非雌激素依赖性肿瘤细胞均有明显的生长抑制作用^[3-5]。本实验观察大豆异黄酮对兔VX2鳞癌移植瘤的生长抑制作用和荷瘤兔血清抗氧化能力以及移植瘤组织细胞凋亡的影响,旨在为大豆异黄酮在肿瘤的预防和早期治疗中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与动物

兔VX2鳞癌细胞由第四军医大学附属唐都医院介入放射科张洪新副教授惠赠。日本大耳白兔,普通级,4月龄,体质量2.0~2.5kg,雌雄不限,由延边大学实验动物中心提供。基础饲料由延边大学实验动物中心提供。饲料中的豆粕成分按食物成分表^[6]替换成酪蛋白和淀粉。

1.2 试剂与仪器

ISF(纯度80%) 西安中鑫生物技术有限公司; RPMI 1640培养基 美国Gibco公司; 长春瑞滨(NVB) 江苏豪森药业股份有限公司; 总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及丙二醛(MDA)试剂盒 南京建成生物工程研究所; Caspase-3活性测试盒、Caspase-8活性测试盒、DNA Laddering测试盒 南京凯基生物科技发展有限公司。

HITACHI himac cp 100α超速离心机 日本日立公司; U-2010紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 荷瘤兔生命延长度的测定

剥离种兔皮下实体瘤,剪碎后制备VX2瘤细胞悬液。台盼蓝染色计活细胞数,配成 1×10^7 个/mL VX2瘤细胞悬液^[7]。选取动物右侧腋后线第7肋间为穿刺点,沿穿刺点进针约2cm种植0.4mL细胞悬液,建立VX2鳞癌肺移植瘤动物模型^[8]。肌注青霉素预防感染。将40只肺移植瘤兔随机分为模型组、ISF组、NVB组和ISF+NVB组,每组10只,雌雄各半。于造模术后第8天开始给药,模型组和NVB组每日灌胃给予生理盐水共21d,ISF组和ISF+NVB组分别灌胃给予100mg/(kg·d)ISF共21d,NVB组和ISF+NVB组于造模第15、22天静脉注射给予2.5mg/kg NVB共2次。其中,ISF的剂量是根据预实验结果而定的^[9-11]。停药后继续饲养至自然死亡,记录各组荷瘤兔的存活时间,按式(1)计算各组荷瘤兔生命延长度。

$$\text{生命延长度}/\% = \frac{t_1 - t_2}{t_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: t_1 为治疗组平均存活时间/d; t_2 为模型组平均存活时间/d。

1.3.2 VX2移植瘤的生长抑制作用检测

取 1×10^7 个/mL VX2瘤细胞悬液0.5mL,接种于兔右侧后腿皮下,并肌注青霉素预防感染。1周后长成直径约1cm大小生长旺盛的实体瘤^[12]。将40只荷瘤兔随机分为模型组、ISF组、NVB组和ISF+NVB组,每组10只,雌雄各半。第8天开始给药,给药剂量及途径同上。另取10只正常兔灌胃给予生理盐水作正常组。记录各组移植瘤瘤体长径(a)和短径(b),按式(2)计算瘤体体积(V)。

$$V = \frac{a \times b^2 \pi}{6} \quad (2)$$

末次给药20h后,处死动物,分离血清。剥离瘤体,称瘤质量,按式(3)计算各组肿瘤增长抑制率,按式(4)计算 Q 值并判断两药联合的相互作用。实验期间自然死亡的动物属于有效标本。

$$\text{肿瘤生长抑制率}/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (3)$$

式中: m_1 为模型组平均瘤质量; m_2 为治疗组平均瘤质量。

$$Q = \frac{E_{(A+B)}}{E_A + (1 - E_A) \times E_B} \quad (4)$$

式中: $E_{(A+B)}$ 为两药合用的抑制率/%; E_A 、 E_B 为两药单用的抑制率/%。 $Q=0.85 \sim 1.15$ 表示两药作用相加; $Q>1.15$ 表示两药作用协同; $Q<0.85$ 表示两药作用相互拮抗。

1.3.3 荷瘤兔血清解毒及抗氧化性指标的测定

按试剂盒的操作方法测定血清GST、T-AOC、SOD、GSH-Px活性以及MDA含量。

1.3.4 荷瘤兔肿瘤细胞凋亡的测定

4℃裂解移植瘤细胞,离心取上清,按试剂盒的操作方法测定各组移植瘤组织以及癌旁组织在波长405nm处的吸光度。通过计算 $A_{\text{测定组织}}/A_{\text{癌旁组织}}$ 来测定各组移植瘤组织Caspase-3和Caspase-8的相对活化程度。另提取肿瘤细胞DNA,上琼脂糖凝胶电泳,检测肿瘤细胞DNA断裂情况。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Prism 5.0统计软件处理,以单因素方差分析进行统计,以 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 ISF对肺移植瘤兔生存时间的影响

由表1可知,与模型组比较,各治疗组兔的平均生存时间均有延长,各治疗组兔的生命延长度明显增高($P<0.05$)。与NVB单纯化疗比较,ISF联合NVB用药可明显延长生存时间($P<0.05$),但ISF组与联合用药组之间差异却无统计学意义($P>0.05$)。

表1 ISF对VX2荷瘤兔生存时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of ISF on survival time of VX2-bearing rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	生存时间/d	生命延长度/%
模型组	—	32.4±3.0	—
NVB组	2.5	36.6±2.2 ¹⁾	13.0
ISF组	100	38.5±4.6 ¹⁾	18.8
ISF+NVB组	100+2.5	44.2±4.1 ^{1,2)}	36.4

注：1) 与模型组相比，有显著性差异($P<0.05$)；2) 与NVB组相比，有显著性差异($P<0.05$)。—，无处理。下同。

2.2 ISF对兔VX2皮下移植瘤生长的影响

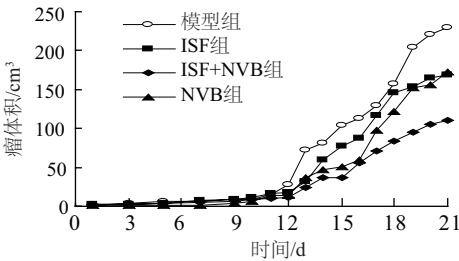


图1 移植瘤体积变化曲线
Fig.1 Change curve of tumor size

表2 ISF对VX2荷瘤兔的抑瘤效应($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 Inhibitory effect of ISF on tumor growth in VX2-bearing rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	体质量/g	瘤长径/cm	瘤体积/cm ³	瘤质量/g	肿瘤抑制率/%
模型组	—	2.26±0.25	9.1±1.1	229.8±31.5	14.2±2.6	—
NVB组	2.5	2.32±0.26	7.3±1.6 ¹⁾	172.2±26.8 ¹⁾	11.8±1.9 ¹⁾	16.9
ISF组	100	2.50±0.31	6.8±1.5 ¹⁾	169.8±25.1 ¹⁾	11.2±2.1 ¹⁾	21.1
ISF+NVB组	100+2.5	2.43±0.22	5.6±2.0 ¹⁾	109.1±20.7 ^{1,2,3)}	8.3±1.8 ^{1,2,3)}	41.5

注：3) 与ISF组相比，有显著性差异($P<0.05$)。下同。

由图1可知，实验期间各治疗组VX2移植瘤生长较模型组缓慢，瘤体积与模型组比较均有降低趋势。由表2可知，在实验末期各治疗组瘤质量、瘤体积和长径与模型组比较均显著降低($P<0.05$)；与ISF单独用药和NVB单纯化疗比较，两药联合应用时可明显减轻瘤质量($P<0.05$)，且两药联合应用时 Q 值为1.21，表现有协同作用。

2.3 ISF对荷瘤兔血清抗氧化和解毒相关酶活性的影响

表3 ISF对VX2荷瘤兔血清抗氧化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of ISF on serum antioxidant indexes in VX2-bearing rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	n	GST活力/(U/mL)	SOD活力/(U/mL)	GSH-Px活力/(U/mL)	T-AOC活力/(U/mL)	MDA含量/(μ mol/L)
正常组	—	10	96.9±12.9	176.9±15.1	324.6±26.1	8.2±0.90	21.3±1.1
模型组	—	8	137.6±21.6 ⁴⁾	152.7±12.4 ⁴⁾	114.5±15.5 ⁴⁾	6.3±0.51 ⁴⁾	26.3±2.0 ⁴⁾
NVB组	2.5	9	122.5±12.0 ⁴⁾	128.5±12.8 ^{1,4)}	213.5±25.3 ^{1,4)}	6.1±0.82 ⁴⁾	41.6±2.9 ^{1,4)}
ISF组	100	9	163.6±26.7 ^{1,2,4)}	189.1±15.8 ^{1,2)}	226.4±20.9 ^{2,4)}	8.0±1.4 ^{1,2)}	20.6±2.5 ^{1,2)}
ISF+NVB组	100+2.5	10	188.2±24.3 ^{1,2,4)}	145.7±12.5 ^{1,3,4)}	169.6±28.2 ^{1,2,3,4)}	7.9±1.0 ^{1,2)}	30.2±2.1 ^{1,2,3,4)}

注：4) 与正常组相比，有显著性差异($P<0.05$)。下同。

由表3可知，与正常组比较，模型组兔血清GST活性升高，血清SOD、GSH-Px活性和T-AOC水平降低，而MDA水平增高。与模型组比较，NVB化疗虽增高血清GSH-Px活性，但是降低SOD活性和增高MDA水平($P<0.05$)；而ISF单独用药和ISF与NVB联合用药均可明显升高血清GST、GSH-Px活性和T-AOC水平($P<0.05$)，降低MDA水平($P<0.05$)。与NVB组比较，联合用药组血清GST和T-AOC水平明显升高($P<0.05$)，MDA水平明显降低($P<0.05$)。联合用药组血清SOD水平虽与模型组比较无显著差异($P>0.05$)，却显著高于NVB组($P<0.05$)。说明ISF可增高荷瘤兔血清抗氧化能力，同时一定程度上可恢复因化疗引起的血清抗氧化能力的下降。ISF或和NVB干预虽均可增高荷瘤兔血清GSH-Px活性，而ISF与NVB联合组血清GSH-Px活性却低于NVB或ISF单独干预($P<0.05$)。

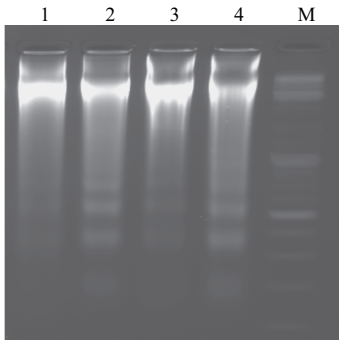
2.4 ISF对兔VX2皮下移植瘤组织Caspase-3和Caspase-8活化的影响

表4 ISF对VX2移植瘤细胞Caspase-3和Caspase-8活化的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 4 Effect of ISF on Caspase-3 and Caspase-8 activation in implanted VX2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	Caspase-3	Caspase-8
模型组	—	1.14±0.16	1.11±0.15
NVB组	2.5	1.29±0.18	1.22±0.13
ISF组	100	1.67±0.27 ^{1,2)}	1.39±0.22 ¹⁾
ISF+NVB组	100+2.5	2.18±0.32 ^{1,2,3)}	1.62±0.28 ^{1,2,3)}

由表4可知，与其他组比较，ISF与NVB联合用药组可升高细胞Caspase-3和Caspase-8相对活性($P<0.05$)，而ISF组Caspase-3和Caspase-8相对活性与模型组比较显著升高($P<0.05$)。

2.5 ISF对兔VX2皮下移植瘤细胞DNA断裂的影响



1. 模型组；2. ISF组；3. NVB组；4. ISF+NVB组；M. Marker。

图2 ISF对VX2移植瘤细胞DNA断裂的影响

Fig.2 Effect of ISF on DNA fragmentation of implanted VX2 cells

由图2可知，各实验组均有特异性的“Ladder”出现，而ISF组和ISF与NVB联合用药组兔VX2移植瘤组织DNA灰

度明显高于模型组($P<0.05$), 而NVB组的DNA灰度较模型组有升高趋势, 但差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

生命延长度和抑癌率是抗肿瘤药物药效学研究方面的重要和基础性指标, 生命延长度是验证一种药物是否有效的一个整体评估指标。抑制肿瘤的生长速度或使肿瘤的瘤体缩小, 是评估某种抗肿瘤药物对肿瘤治疗是否有效的重要客观指标。一种药物是否具有抗肿瘤作用首先表现在这两个方面^[12]。本实验结果表明, ISF和NVB单独或联合应用均能显著延长VX2荷瘤兔生存时间, 同时可明显抑制VX2移植瘤生长, 尤其两药联合应用时表现有协同作用, 即ISF具有增强NVB化疗作用。

研究表明, 在各种物理、化学等环境因素造成机体损害或诱导细胞突变、癌变过程中, 自由基及其引发的脂质过氧化作用起着十分重要的媒介作用, 正常情况下, 自由基生成与清除之间的动态平衡是靠以SOD、GSH-Px为主的酶系统和非酶类抗氧化防御系统来维持。而GST是一组具有多种生理功能的同工酶家族, 是Ⅱ相解毒酶。本实验观察到, ISF组兔血清T-AOC、SOD、GST和GSH-Px活性显著高于模型组, MDA却明显低于模型组。提示其抗肿瘤作用可能与抗氧化作用有关。本研究发发现NVB使部分血清抗氧化性指标下降, 说明单纯NVB化疗降低荷瘤兔血清抗氧化水平。与NVB单独用药相比, NVB与ISF联合用药可明显提高荷瘤兔大部分血清抗氧化酶活性, 缓解因NVB化疗而引起的抗氧化能力的下降。值得注意的是, NVB单纯化疗或ISF单独用药可明显升高血清GSH-Px活性, 而联合用药组荷瘤兔血清GSH-Px活性却低于NVB或ISF单用组。此部分原因仍需进一步研究。

肿瘤的发生和发展还与肿瘤细胞凋亡异常有关^[13]。大多数抗肿瘤药物都能诱导敏感肿瘤细胞发生凋亡, 其抗肿瘤效能与肿瘤细胞在药物诱导下发生细胞凋亡的活性有关^[14]。细胞凋亡中明显的生化特征是形成180~200bp或者其多聚体组成的寡核苷酸片段^[15]。而胱天蛋白酶的级联反应是推动细胞凋亡程序的核心事件。Caspase-8为

凋亡启动因子, 位于凋亡过程的上游。而Caspase-3是细胞凋亡的執行者, 它可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白, 引起凋亡^[15]。本实验结果显示, ISF单独用药或与NVB联合用药可诱导移植瘤组织DNA断裂, 且增高移植瘤组织Caspase-3和Caspase-8相对活性, 提示ISF单独用药或与NVB联合用药可增高移植瘤组织的细胞凋亡。

综上所述, ISF对VX2兔鳞癌移植瘤具有明显的生长抑制作用, 且对NVB化疗具有明显的增强作用。其作用机制可能与其增强机体抗氧化能力和诱导肿瘤细胞凋亡作用有关。

参考文献:

- [1] 全吉淑, 程静, 刘春彦, 等. 大豆异黄酮联合顺铂对人肺腺癌A549细胞增殖与凋亡的影响[J]. 营养学报, 2011, 33(5): 506-509.
- [2] WANG H, MURPHY P A. Isoflavone content in commercial soybean foods[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(8): 1666-1673.
- [3] 封明霞, 朱俊东, 糜漫天, 等. 三羟异黄酮对人乳腺癌细胞端粒酶的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1083-1086.
- [4] 周海波, 杜勤, 颜云, 等. 三羟异黄酮诱导人胃癌原代细胞裸鼠移植瘤凋亡的研究[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(9): 550-553.
- [5] DEWELL A, WEIDNER G, SUMNER M D, et al. Relationship of dietary protein and soy isoflavones to serum IGF-1 and IGF binding proteins in the prostate cancer lifestyle trial[J]. Nutr Cancer, 2007, 58(1): 35-42.
- [6] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. 中国食物成分表[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2002: 40.
- [7] 苏畅, 张惠中, 李文海, 等. 兔VX2肿瘤的离体培养及有关生物学特性[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(9): 844-847.
- [8] 马连君, 张向华, 祁彦君. 兔VX2肺癌模型的建立及评价[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(9): 916-918.
- [9] 尹学哲, 许惠仙, 金爱花, 等. 大豆异黄酮苷元抗血浆脂蛋白脂质过氧化作用[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(4): 61-64.
- [10] QUAN Jishu, YIN Xuezhe, KANAZAWA T. Effect of soybean hypocotyl extract on lipid peroxidation in gk rats[J]. J Clin Biochem Nutr, 2009, 44(3): 212-217.
- [11] 尹学哲, 许惠仙, 金爱花, 等. 大豆异黄酮抗家兔动脉粥样硬化作用研究[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 220-223.
- [12] 尹学哲, 许惠仙, 金爱花, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌VX2荷瘤兔的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 134-137.
- [13] MELET A, SONG K, BUCUR O, et al. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 47-79.
- [14] TAN T T, WHITE E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 81-104.
- [15] 朴龙, 杨振凯, 杨阳, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对内毒素诱导D-半乳糖胺致敏小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 前沿科学, 2011, 5(2): 11-14.