

混菌发酵豆豉中异黄酮含量及对小鼠肺癌细胞的抑制作用

刘锦绣,陈伟,李靖,程芳

(山东农业大学 食品科学与工程学院,山东 泰安,271018)

摘 要 选用高产蛋白酶菌株枯草芽孢杆菌 D2 和 β -葡萄糖苷酶产生菌枯草芽孢杆菌 U35 进行单菌种、混合菌种发酵生产豆豉,测定大豆异黄酮含量及其抗肿瘤能力,分析异黄酮含量和抗肿瘤能力的关系。用 HPLC 法测定豆豉提取物异黄酮含量,采用 MTT 比色法检测异黄酮含量对细胞增殖的影响,并在荧光显微镜下观察小鼠肺癌(LLC)细胞形态变化。结果表明,D2U35 混菌豆豉苷元型异黄酮含量分别比 D2、U35 单菌豆豉高 101.95 $\mu\text{g/mL}$ (2.38 倍)和 35.48 $\mu\text{g/mL}$ (1.25 倍),D2U35 混菌豆豉对肿瘤细胞的抑制率分别比 D2、U35 单菌豆豉高 15.79% 和 7.02%,说明混菌发酵不仅提高了苷元型异黄酮含量,还提高了豆豉提取物的抗肿瘤能力。对肿瘤抑制作用,苷元苷型异黄酮 > 总异黄酮 > 糖苷型异黄酮。

关键词 豆豉,大豆异黄酮 MTT,抗肿瘤能力

豆豉是我国传统大豆发酵制品,有很高的营养价值,含有豆豉纤溶酶、大豆异黄酮、大豆低聚糖、大豆皂苷等多种功能因子,此外还含有丰富的蛋白质、多肽和氨基酸^[1]。

大豆异黄酮被称为“健康促进剂”^[2],适当地摄入能减少患乳腺癌、结肠癌、冠心病等的发病几率^[3]。研究发现,大豆异黄酮对癌细胞株有体外抗肿瘤作用,是一种潜在的抗肿瘤预防剂^[4-5]。目前,普遍认为单独服用异黄酮或配合化疗可能是一种有效的抗癌方法^[6-7]。大豆异黄酮分为游离型苷元和结合型糖苷两大类。 β -葡萄糖苷酶可以水解糖苷型异黄酮,使其转化为苷元型异黄酮,更好发挥异黄酮的药理活性并提高豆豉的抗肿瘤能力^[8]。

目前国内外学者对豆豉抗肿瘤功能有所研究,但是对混菌发酵提高豆豉抗肿瘤能力的研究还不多见。本试验从自然发酵的细菌型豆豉中筛选出高产蛋白酶的菌株(D2)^[9]和产 β -葡萄糖苷酶的菌株(U35),在单菌发酵的基础上,进行混菌发酵,研究单菌、混菌豆豉提取物对抗肿瘤增殖的影响,并深入探讨混菌豆豉异黄酮各组分含量与豆豉抗肿瘤作用的关系,以期将豆豉开发成为新一代功能性食品。

1 材料与方法

1.1 材料

LLC 细胞株:小鼠肺癌细胞株,由中科院细胞库

提供;枯草芽孢杆菌 D2:蛋白酶产生菌,实验室筛选;枯草芽孢杆菌 U35: β -葡萄糖苷酶产生菌,实验室筛选;MTT:美国 Invitrogen 公司产品;DMEM 培养基、IMDM 培养基、标准胎牛血清:美国 Gibco 公司产品;二甲基亚砜(DMSO):北京化工厂产品。

1.2 主要仪器

SW-CL-LF 净化工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司生产;CO₂ 孵育箱,日本 SANYO 公司产品;PL-2002 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;SUNRISE 酶标仪,TECAN 公司产品;96 孔培养板,美国 eorning 公司;高效液相色谱仪(包括 LC-10AT 泵、SPD-10A 检测器、SCL-10A 控制器、CTO-10AS 柱温箱),日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 豆豉生产工艺及要点

豆豉:黑豆→筛选→浸泡(3 倍的水,35 ℃ 浸泡 16 h)→蒸煮(121 ℃,35 min)→冷却至室温→接种(接种量 2%)→恒温制曲(37 ℃ 下发酵 72 h,每 6 h 翻曲 1 次)→配制(食盐、老姜、花椒等)→入坛发酵→成品豆豉

混菌豆豉:接种(接种比例 D2:U35 = 1:1,接种量 2%),其余同豆豉生产。

1.3.2 异黄酮提取物的制备及含量检测

豆豉→干燥→粉碎→过 60 目筛→称取粉末 100 g→石油醚脱脂→60% 乙醇超声提取 2 h(重复 3 次),料液比 1:20(g:mL)→过滤→合并滤液→浓缩→异黄酮提取物^[10]

色谱条件^[11]:

第一作者:硕士研究生(陈伟副教授为通讯作者,E-mail:chenwei@sdaa.edu.cn)。

收稿日期:2012-12-11,改回日期:2013-01-26

色谱柱: Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙酸-水 (45:0.5:55); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样量: 2.0 μL; 检测波长: 254 nm。

1.3.3 LLC 细胞的体外培养

将 LLC 的贴壁细胞接种在含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 在细胞培养瓶中吹打混匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 孵化箱中培养、传代。每日用倒置显微镜检查细胞, 如发现污染或细胞破碎, 必须丢弃。

1.3.4 染料排斥法测定豆豉异黄酮提取物的抗肿瘤作用

调节细胞浓度至 1×10^4 /mL, 取 50 μL 接种于 96 孔细胞培养板, 每组 3 个平行孔, 置于 37 ℃、5% 孵化箱中培养 24 h。将消毒处理过的豆豉异黄酮提取物用无水乙醇溶解, 配制 100, 30, 10, 3, 1 μg/mL 溶液分别加到不同孔中。每孔加入豆豉异黄酮提取液 50 μL, 置于 37 ℃、5% CO₂ 孵化箱中培养 72 h。

培养 72 h 后混匀, 加 Hoechst 溶液 33342 染液 0.5 mL, 0.9% 生理盐水 0.3 mL, 混匀, 室温下放置 10 min。荧光显微镜下计数活细胞数及死细胞数^[12]。

1.3.5 MTT 法测定豆豉提取物对肿瘤细胞的杀伤作用

调节细胞浓度至 1×10^4 /mL, 取 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板, 每组 3 个平行孔, 置于 37 ℃、5% 孵化箱中培养 24 h。将消毒处理过的豆豉异黄酮提取物用无水乙醇溶解, 在孔中分别加入浓度为 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μg/mL 豆豉异黄酮提取液 10 μL。对照孔中加入 10 μL 无水乙醇。置于 37 ℃、5% CO₂ 孵化箱中培养 72 h。MTT 用无血清 IMDM 培养液配成 1 mg/mL 溶液, 每孔中加入 50 μL, 置于 37 ℃、5% CO₂ 孵化箱中培养 4 h。吸出上清液, 加入 100 μL DMSO, 用摇床摇匀。测定吸光度 (OD₅₇₀ 值)^[13-14]。

1.3.6 MTT 法测定对 LLC 细胞增殖的抑制作用

试验分为豆豉组、溶剂对照组和空白对照组, 其中豆豉组异黄酮提取物各剂量组分别为 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 和 160 μg/mL; 溶剂对照组加入终浓度加 0.1% 的 DMSO; 空白对照组仅加入等体积培养液, 不加药物和细胞。

选用对数生长期的 LLC 细胞, 经 0.25% (g/v) 胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔培养板内, 预培养 24 h, 待细胞贴壁后吸出全部上清, 按实验分组加入不同浓度的各种受试物 (总体积 200 μL/孔), 每组 3 个平行。分别培养 72 h 和 96 h, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/

mL 的 MTT, 继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加 DMSO 200 μL, 平板摇床摇震 10 min, 以 DMSO 调零, 用酶联免疫检测仪以 490 nm 波长测定各孔吸光值 (A), 计算平均 A 值和增殖率及抑制率^[13-15]。

$$\text{抑制率}/\% = 1 - \frac{\text{试验组平均 } A \text{ 值}}{\text{对照组平均}} \times 100$$

运用曲线回归分析, 求出剂量反应关系方程及回归系数。

1.4 荧光显微镜下观察细胞形态的变化

将细胞接种于 96 孔培养板内, 预培养 24 h, 溶剂对照组 (0.1% DMSO) 和实验组豆豉异黄酮提取物 (100 μg/mL) 培养 24、48、72 和 96 h, Hoechst33342 染色后倒置荧光显微镜下观察^[16]。

1.5 实验数据处理

数据结果及图形均采用 Microsoft Excel 2003 软件进行处理、制作, 结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据分析采用 SAS v9.0 软件, 异黄酮含量对 LLC 细胞抑制的影响采用逐步回归分析^[17] (SRA, stepwise regression analysis)。

2 结果与分析

2.1 豆豉提取物异黄酮各组分含量的测定结果

不同豆豉的糖苷型异黄酮、苷元型异黄酮含量的差异达到显著水平 ($P < 0.05$) (图 1)。D2、U35 单菌豆豉和 D2U35 混菌豆豉的异黄酮总含量基本相同, D2U35 混菌豆豉的苷元型异黄酮含量比 D2 单菌豆豉高 101.95 μg/mL, 比 U35 单菌豆豉高 35.48 μg/mL。说明混菌发酵提高了苷元型异黄酮含量。

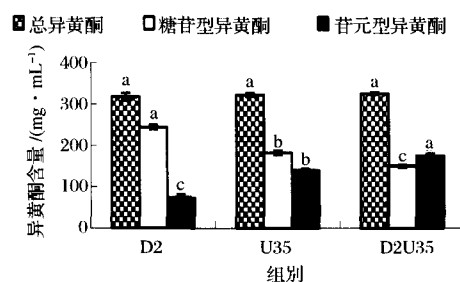


图 1 不同豆豉提取物异黄酮各组分的含量
Fig. 1 Isoflavones content of each component in different groups

2.2 豆豉异黄酮提取物对 LLC 细胞的体外抑瘤作用

利用染料排斥法测定豆豉异黄酮提取物的抗肿瘤作用, LLC 细胞株的活细胞率见表 1。在 LLC 细胞

中接入不同浓度的异黄酮提取物,随着浓度的升高, LLC 细胞存活率不断下降。当异黄酮提取物浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对肿瘤细胞的抑制能力最强, D2、U35

单菌豆豉的活细胞率分别比 D2U35 混菌豆豉高约 6.99 和 4.12%。说明 D2U35 混菌豆豉的抗肿瘤能力分别比 D2、U35 单菌豆豉高约 6.99% 和 4.12%。

表 1 LLC 细胞株的活细胞率
Table 1 LLC living cells rate

豆豉 组别	不同浓度异黄酮提取物的活细胞率/%				
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D2	94.88 \pm 2.13 ^a	92.26 \pm 1.44 ^a	79.54 \pm 2.11 ^a	65.15 \pm 1.66 ^a	31.57 \pm 2.01 ^a
U35	94.64 \pm 2.57 ^a	91.05 \pm 2.92 ^a	75.39 \pm 2.43 ^b	62.94 \pm 2.14 ^b	28.58 \pm 0.81 ^b
D2U35	95.12 \pm 2.09 ^a	92.92 \pm 2.74 ^a	74.16 \pm 1.95 ^b	59.17 \pm 1.82 ^c	24.46 \pm 1.47 ^c

注:每列内相同字母表示在 5% 水平上差异不显著。

2.3 MTT 法测定豆豉异黄酮提取物对 LLC 细胞的体外杀伤作用

豆豉异黄酮提取物溶液作用于 LLC 细胞 72h 后,各剂量孔的吸光度(OD_{570} 值)见表 2。随着豆豉异黄酮提取物浓度的升高,A 值逐渐减小,说明异黄

酮提取物浓度越高对 LLC 细胞杀伤作用增大。当异黄酮提取物浓度升高到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, D2、U35、D2U35 豆豉对 LLC 细胞杀伤作用出现明显差别。D2U35 混菌豆豉对 LLC 细胞杀伤最大,分别比 D2、U35 单菌豆豉高约 27.75% 和 12.14%。

表 2 豆豉异黄酮提取物对 LLC 细胞的体外杀伤作用
Table 2 Inhibition of isoflavones on LLC *in vitro*

豆豉 组别	不同浓度异黄酮提取物的吸光度 A 值(OD_{570})				
	0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D2	0.267 \pm 0.023 ^a	0.243 \pm 0.014 ^a	0.223 \pm 0.012 ^a	0.214 \pm 0.007 ^a	0.173 \pm 0.011 ^a
U35	0.261 \pm 0.011 ^a	0.237 \pm 0.021 ^b	0.214 \pm 0.009 ^a	0.188 \pm 0.014 ^b	0.152 \pm 0.015 ^b
D2U35	0.264 \pm 0.016 ^a	0.236 \pm 0.013 ^b	0.209 \pm 0.017 ^a	0.166 \pm 0.011 ^c	0.125 \pm 0.006 ^c

注:每列内相同字母表示在 5% 水平上差异不显著。

2.4 MTT 法检测豆豉异黄酮提取物对 LLC 细胞抑制的影响

图 2、图 3 中,控制豆豉提取物浓度和作用时间,豆豉提取物作用于 LLC 细胞 72 h、96 h 后,随剂量的增加、时间的延长,LLC 细胞抑制率提高,表明 LLC 细胞的抑制活性提高。当浓度到达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着浓度增加,抑制率变化缓慢。D2U35 混菌豆豉对肿瘤的抑制率最高,分别比 D2、U35 单菌豆豉高 15.79% 和 7.02%,说明 D2U35 混菌豆豉的抗肿瘤能力最高,其次是 U35 单菌豆豉,再次是 D2 单菌豆豉。

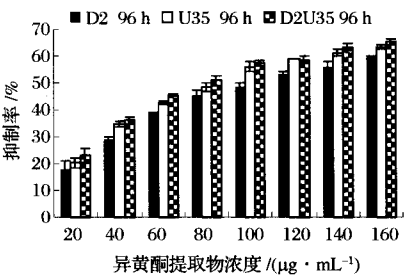


图 3 异黄酮提取物作用 LLC 细胞 96h 的抑制率
Fig 3 The effects of isoflavones on inhibitory rate in 96 h

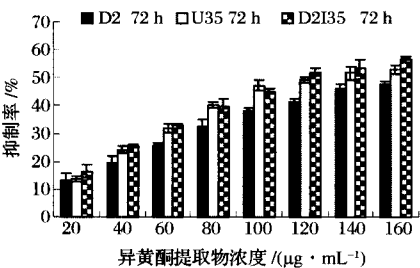


图 2 异黄酮提取物作用 LLC 细胞 72 h 的抑制率
Fig 2 The effects of isoflavones on inhibitory rate in 72 h

利用数学分析法分析了豆豉总异黄酮含量、糖苷型异黄酮含量和苷元型异黄酮含量对 LLC 细胞抑制的影响。通过统计学得出回归方程为 $Y = 12.6707 + 0.1819n + 0.2555k$, (n 为总异黄酮含量, $P < 0.001$; k 为苷元型异黄酮含量, $P < 0.001$), $P < 0.05$ 具有统计学意义, $R^2 = 0.9534$, $F = 214.62$ 。结果表明异黄酮各组分含量与 LLC 细胞增殖率成正相关,苷元苷型异黄酮含量对 LLC 细胞抑制影响较大,其次是总异黄酮含量。糖苷型异黄酮含量未被引入模型中,表明糖苷型异黄酮对 LLC 细胞的抑制影响较弱。

2.5 豆豉异黄酮提取物作用于 LLC 细胞的剂量反应关系、时间反应关系

对豆豉异黄酮提取物作用剂量分别与抑制率进行曲线回归分析,获得回归方程,豆豉提取物作用剂量与抑制率的曲线回归分析结果:D2 豆豉 72 h, $y = 12.865x^{0.649}$, $R^2 = 0.996\ 1$; D2 豆豉 96 h, $y = 19.081x^{0.573\ 1}$, $R^2 = 0.982\ 2$ 。U35 豆豉 72 h, $y = 14.75x^{0.666\ 9}$, $R^2 = 0.976\ 1$; U35 豆豉 96h, $y =$

$22.294x^{0.539\ 9}$, $R^2 = 0.973\ 9$ 。D2U35 豆豉 72 h, $y = 16.703x^{0.609\ 3}$, $R^2 = 0.995\ 4$; D2U35 豆豉 96 h, $y = 24.762x^{0.414\ 9}$, $R^2 = 0.978\ 1$ 。从以上数据看出豆豉异黄酮提取物作用剂量与抑制率之间均呈现出良好的剂量-反应关系、时间-反应关系(图4)^[12]。随着豆豉异黄酮提取物浓度的增加,作用时间的延长,异黄酮提取物对 LLC 细胞的抑制能力增强。说明异黄酮提取物浓度越高,作用时间越长,抗肿瘤能力越强。

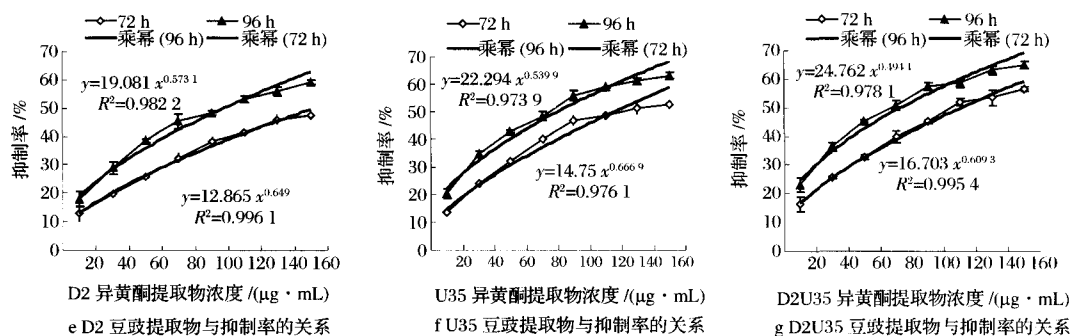


图4 豆豉异黄酮提取物对 LLC 细胞抑制率的剂量-反应曲线、时间-反应曲线

Fig. 4 Dose-response curve of cell inhibitory rate of isoflavones on LLC cells

2.6 荧光显微镜下细胞形态的变化

经过连续传代培养后,培养瓶中已见不到贴壁细胞,镜下所见均为饱满的悬浮细胞。用 Hoechst33342 染液染色后,活细胞为明亮蓝色,凋亡细胞更为明亮。

与对照组相比,D2、U35 单菌豆豉和 D2U335 混菌豆豉的异黄酮提取物作用于 LLC 细胞作用时间 24h 时,细胞均呈现饱满的圆形;48h 时,细胞呈现较饱满的圆形,细胞出现破碎;72h 时,破碎细胞增加,活细胞数明显减少;96h 时,细胞几乎全部破碎,并且活细胞数量非常少(图5)。随着豆豉异黄酮提取物作用于 LLC 细胞时间的延长,D2、U35 单菌豆豉和 D2U335 混菌豆豉对 LLC 细胞抗肿瘤能力逐渐增强。

3 讨论

分别用染料排斥法、MTT 法和细胞形态法 3 种方法测定了 LLC 细胞存活率、LLC 细胞抑制率以及

荧光显微镜下细胞形态的变化,得出结论:豆豉异黄酮提取物浓度越大,作用于 LLC 细胞的时间越长,对 LLC 细胞的抑制能力越强。通过逐步回归分析得出:异黄酮含量与 LLC 细胞肿瘤的抑制率成正比。对肿瘤抑制作用:苷元型异黄酮 > 总异黄酮 > 糖苷型异黄酮。

混菌豆豉苷元型异黄酮含量分别比 D2、U35 单菌豆豉高 101.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 35.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,是 D2 单菌豆豉的 2.38 倍,是 U35 单菌豆豉的 1.25 倍。D2U35 混菌豆豉对肿瘤细胞的抑制率分别比 D2、U35 单菌豆豉高 15.79% 和 7.02%。说明混菌发酵不仅提高了苷元型异黄酮含量,还提高了豆豉提取物抗肿瘤能力。通过混菌发酵生产豆豉,提高苷元型异黄酮含量的同时提高了豆豉抗肿瘤能力,为将豆豉开发成为新一代功能性食品提供重要的参考。

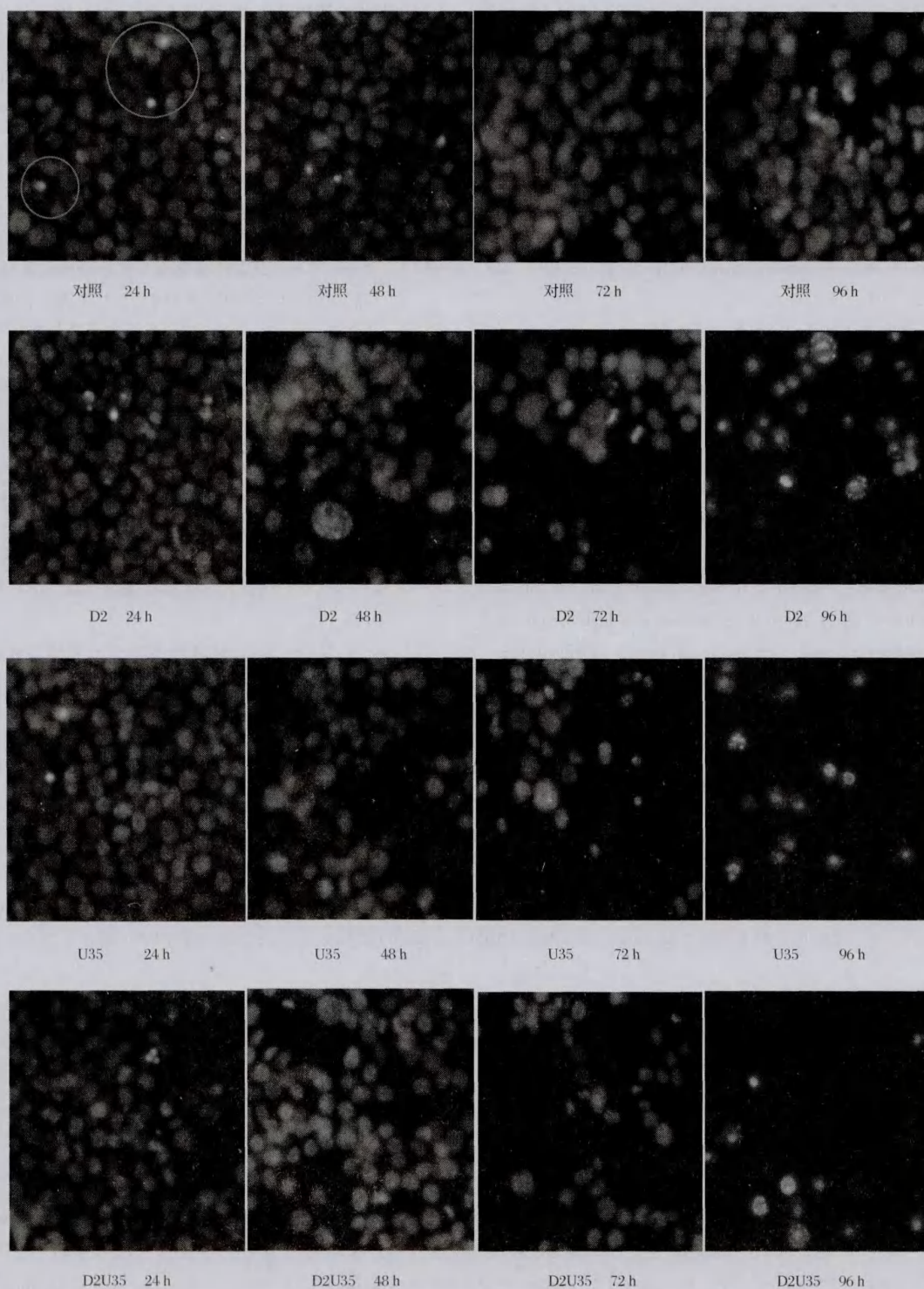


图5 豆豉异黄酮提取物作用于 LLC 细胞不同时间的细胞形态变化

Fig. 5 Morphologic change of LLC cells exposed to different treatments

参 考 文 献

[1] Anderson R L, Wolf W J. Compositional changes in trypsin

inhibitors, phytic acid, saponin and isoflavones related to soybean processing[J]. Nutr, 1995, 125(2): 24-31.

[2] Zhang J, Yu O. Metabolic engineering of isoavone biosyn

- thesis in seeds [M]. American: American Society of Agronomy, 2008.
- [3] Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, et al. Effects of dietary components including lignans and phytoestrogens on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin [J]. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1987, 27(5): 135–141.
- [4] Setchell K D, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health [J]. *Nutr*, 1999, 129(3): 758–767.
- [5] Su S J, Yeh T M, Lei H Y, et al. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach of human urinary tract cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 230–236.
- [6] 李琳, 钱忠明. 大豆异黄酮的药理学作用和保健功能的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2002, 37(10): 724.
- [7] 葛喜珍, 王建华, 李恩. 中药大豆中异黄酮的制备及开发利用进展 [J]. *河北中医学报*, 2011, 16(2): 44–45.
- [8] Ming C H, Terrence L G. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates Biosei [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(7): 995–1005.
- [9] 李小永. 细菌型豆豉后发酵期间菌相分析及产蛋白酶菌种的筛选 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [10] Oyaizu M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography [J]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1986, 114(35): 771–775.
- [11] Gow-Chin Yen, Pin-Der Duh, Da-Yon Chuang. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone [J]. *Food Chemistry*, 2000, 70(6): 437–441.
- [12] 金莹. 浓缩苹果汁中棒曲霉毒素的降解及苹果多酚抗肿瘤作用的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [13] 郑永唐, 黄昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(3): 266–269.
- [14] 汤为学, 骆云鹏, 王瑞雪, 等. 人实体瘤抗癌药物敏感试 MTT 法的建立 [J]. *重庆医科大学学报*, 1992, 17(21): 103–108.
- [15] 黄领领. 桑橙异黄酮对肿瘤细胞增殖抑制作用的实验研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2009.
- [16] 张付利, 厉永强, 史齐, 等. 亚硝酸钠对人肝癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(2): 191–195.
- [17] 程芳, 陈伟. 不同储藏条件下玉米真菌多样性研究 [J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(10): 83–87.

Influence of isoflavone content in mixed fermentation douchi on proliferation of LLC cells

Liu Jin-xiu, Chen Wei, Li Jin, Cheng Fang

(College of Food Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT In order to increase the isoflavone content in fermented soy beans and improve the antitumor properties, soy beans were fermented by protease-producing strains *Bacillus subtili* D2 and β -glucosidase producing strain *Bacillus subtili* U35 through single and multi-strain fermentation. The contents of isoflavone were measured by HPLC. The relationship between isoflavone content and the antitumor properties was also analyzed. LLC cells were cultured to logarithmic growth time, and the isoflavone with different concentrations were added into the media. After the culture of 24h, 48h, 72h and 96h, the inhibiting rates of isoflavone to LLC cells were measured by MTT method. The morphological changes of the LLC cells were observed by fluorescence microscope. The results showed that isoflavone aglycones content of D2U35 multi-strain fermented soy beans were enhanced greatly, with 2.38 times (101.95 $\mu\text{g/mL}$) and 1.25 times (35.48 $\mu\text{g/mL}$) higher than that of D2 and U35 fermented soy beans, respectively. D2U35 fermented soy beans could also inhibit LLC cells, with 15.79% and 7.02% higher than that of D2 and U35 fermented soy beans, respectively. The multi-strain fermentation D2U35 not only improved the isoflavone aglycones content, but also improved the antitumor properties. The inhibition capacity of Isoflavone aglycones to LLC cells was higher than those of total isoflavones content and glycoside isoflavone.

Key words fermented soy bean, isoflavone, MTT method, antitumor ability