

# 大豆抗癌肽的初步提取及抗癌活性

葛锡娟, 许岩, 杨丽丽, 吴非\*  
(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 确定大豆抗癌肽最佳提取条件, 并对其抗癌活性进行检测。大豆经乙醚、石油醚或正己烷脱脂预处理后, 分别对大豆粉过筛目数、脱脂粉添加量和超声波处理时间进行三因素三水平正交试验设计, 通过对胃癌细胞 SGC-7901 生长抑制率的影响, 探讨大豆抗癌肽的最佳提取条件; 采用四噻唑蓝比色法 (MTT 法) 对不同处理条件下的大豆提取物进行抗癌活性检测。结果表明: 大豆抗癌肽最佳提取条件为乙醚脱脂、过 80 目筛、脱脂粉添加量 3g/15mL PBS 缓冲液 (pH7.4)、超声波处理时间 80min, 经验证实验, 此条件下癌细胞增殖抑制率达到 39.03%。

**关键词:** 大豆; 抗癌肽; 提取; 生物学活性

## Extraction and Activity Evaluation of Anticancer Peptides from Soybean

GE Xi-juan, XU Yan, YANG Li-li, WU Fei\*  
(School of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Dried soybean powder was defatted with either petroleum ether, *n*-hexane or ethyl ether before the extraction of anticancer peptides with PBS buffer (pH 7.4) under ultrasonic assistance. In order to maximize the inhibitory rate of anticancer peptides against human gastric cancer cell line SGC-7901, a three-factor, three-level orthogonal array design was used to optimize three operating conditions including material particle size, solid-to-liquid ratio and ultrasonic treatment time. Anticancer activity evaluation of anticancer peptides extracted from defatted soybean was carried out using MTT assay. The optimal extraction conditions were determined as follows: material particle size 80 mesh, solid-to-liquid ratio 1:5 (g/mL) and ultrasonic treatment time 80 min. The inhibitory rate of the extract under these conditions against the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901 was 39.03%.

**Key words:** soybean; anticancer peptide; extraction; biological activity

中图分类号: TS214.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0027-04

近 10 年来, 流行病学研究显示, 癌症仍然是导致死亡的主要原因之一。我国每年新增癌症患者近 200 万人, 每年因癌症死亡约 150 万人, 位居各类死因第一位<sup>[1]</sup>。体外试验表明, 抗癌肽通过抑制癌细胞的 DNA 来诱导癌细胞凋亡, 这对抑制癌细胞发展和转移都有重要意义<sup>[2-3]</sup>。近期研究显示, 大豆中含有一种新型的预防癌症的物质——Lunasin。它是一种含有 43 个氨基酸的多肽, 主要通过抑制核心组蛋白乙酰化从而引起癌细胞凋亡<sup>[4-6]</sup>。De Mejia 等<sup>[7]</sup>、Jeong 等<sup>[8-9]</sup>都对这种肽的提取和抗癌活性进行了研究。国内对大豆多肽的研究主要集中在抗氧化性、抗高血压性、降血脂和降胆固醇方面<sup>[10-15]</sup>, 有关大豆抗癌肽的报道较少。其中, 大豆抗癌肽的提取主要经过酶解法或微生物分解法<sup>[16]</sup>, 酶解产物不但成

分复杂而且不易控制, 大大增加了加工成本。

本实验采用四噻唑蓝比色法 (MTT) 对抗癌活性进行体外试验研究, 探讨大豆粉脱脂溶剂、目数、脱脂粉添加量以及超声波处理时间对大豆抗癌肽提取的影响, 以胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制率为检测指标, 确定最佳的提取条件, 通过对大豆抗癌肽提取条件的研究, 以期为大豆抗癌肽在食品、医药等领域的应用提供试验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

大豆 市售; 人胃癌细胞系 SGC-7901 细胞 武汉博士得试剂公司; RPMI1640 上海索莱宝生物科技有限公

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才基金项目(2008RFQXN016); 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(11531016)

作者简介: 葛锡娟(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: xijuange@163.com

\* 通信作者: 吴非(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为大豆产品精深加工。E-mail: wfneau@163.com

司; 胎牛血清(FBS) 杭州四季青生物工程材料有限公司; 磷酸缓冲液(PBS, pH7.4) 哈尔滨鑫丰生物材料有限公司; 胰酶(Typein, 1:250) 美国 Amresco 公司; 噻唑蓝[3(4,5-dimethylthiazo2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT] 美国 Amresco 公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 分析纯) 中国医药集团(上海)试剂公司; 乙醚、石油醚、正己烷(均为分析纯) 天津市津东天正精细化学试剂厂; 青霉素-链霉素溶液等。

## 1.2 仪器与设备

酶联免疫检测仪 美国 BIO-RAD 公司; 超声波振荡仪、电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; IMT-413 倒置荧光显微镜 日本 Olympus 公司; GL-21M 高速冷冻离心机 上海市离心机机械研究所; CO<sub>2</sub> 培养箱 上海博迅实业有限公司; pH S-3C 型 pH 计 上海伟业仪器厂; 手提式粉碎机 上海晴友实业有限公司; 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂; 电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; 0.22 μm 细菌过滤器等。

## 1.3 方法

### 1.3.1 大豆抗癌肽提取

干燥的大豆 1kg 粉碎后进行脱脂, 脱脂粉烘干后过筛, 备用。取一定量的脱脂大豆粉, 加入 pH7.4PBS 缓冲溶液 15mL, 40℃超声波处理一定时间, 每隔 10min 搅拌一次, 取出, 4℃、20000 × g 离心 30min, 转移上清液, 备用。采用 MTT 法研究不同提取条件对癌细胞增殖的影响, 确定最佳提取条件。

### 1.3.2 大豆抗癌肽提取条件的优化

将粉碎后的大豆粉, 分别用乙醚、石油醚、正己烷进行脱脂。根据脱脂溶剂的不同, 将试验分成 3 组并编号, 分别为乙醚脱脂处理组、石油醚脱脂处理组、正己烷脱脂处理组。研究在同一脱脂剂处理条件下, 改变提取条件时, 癌细胞的增殖情况。以目数、脱脂粉添加量和超声波处理时间作为正交因素, 经过预试验(单因素)考虑确定其试验因素的范围; 设计一个三因素三水平的正交试验, 以癌细胞增殖抑制率为考察指标, 确定大豆抗癌肽提取的最佳条件。各组的试验因素水平见表 1。

表 1 大豆抗癌肽提取条件优化正交试验因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in orthogonal array design for optimizing extraction of anticancer peptides from defatted soybean powder

水平	因素		
	A 目数	B 脱脂粉添加量/g	C 超声波处理时间/min
1	40	1	40
2	80	2	60
3	100	3	80

### 1.3.3 MTT 法<sup>[17]</sup>检测大豆抗癌肽对人胃癌细胞 SGC-7901 生长的影响

#### 1.3.3.1 培养细胞

将复苏后的 SGC-7901 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(pH7.4)中, 于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞铺满瓶底 80% 左右时用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化传代。2~3d 换液并传代, 取处于对数生长期的同一代细胞进行实验。

#### 1.3.3.2 接种细胞

质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁生长的细胞, 用含体积分数 10% FBS(胎牛血清)、100mg/L 青霉素和 100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液吹打成单细胞悬液, 以每孔 200μL(共 4000~5000 个细胞)接种于 96 孔培养板中。

#### 1.3.3.3 培养细胞

将培养板移入 CO<sub>2</sub> 培养箱, 在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下, 培养 24h。

#### 1.3.3.4 加入提取物

将不同处理的大豆提取液过 0.22 μm 滤膜除菌, 每孔分别加入滤液 100 μL, 同时设置 5 个平行孔, 空白对照为 RPMI 1640 培养液。

#### 1.3.3.5 呈色

加药完毕继续孵育 48h 后, 每孔加入 5mg/mL MTT 溶液 20 μL, 37℃继续孵育 4h, 小心吸弃孔内培养上清液, 控干后每孔加入 150 μL DMSO, 轻轻振荡 15min, 使蓝紫色甲瓊结晶物充分溶解。

#### 1.3.3.6 比色

选择波长 490nm, 在酶标仪上测定各孔光密度值(OD<sub>490</sub>), 记录结果。

#### 1.3.3.7 抑制率计算公式

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) - (\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100$$

## 1.3.4 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 17.0 对试验数据进行统计分析, 组间检验用 ANOVA 方差分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 方差齐性时用最小显著差法(least significant difference, LSD)检验, 方差不齐时用 Tamhane's 检验; 检验的显著性水平为  $\alpha=0.05$ (显著水平)和  $\alpha=0.01$ (极显著水平)。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醚脱脂处理大豆抗癌肽提取正交试验

MTT 法检测结果表明, 目数、脱脂粉添加量、超

声波处理时间正交试验的9组大豆提取物对胃癌细胞抑制作用表现为：细胞折光性增加，壁厚、变圆、黏连、破碎、脱落，OD值明显下降。从表2中R值可以看出因素主次顺序为： $C > B > A$ 从K值可知，最佳组合为 $C_3B_3A_2$ ，即在乙醚作为脱脂剂的条件下，大豆抗癌肽的最佳提取条件为超声波处理时间80min、脱脂粉添加量3g、过筛目数80目。经验证实验此时癌细胞生长抑制率达到39.03%。

**表2 乙醚脱脂条件大豆抗癌肽提取正交试验设计及结果**  
Table 2 Orthogonal array design for optimizing extraction of anticancer peptides from ether-defatted soybean powder and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	D空白	癌细胞生长抑制率/%
1	1	1	1	1	5.54
2	1	2	2	2	13.40
3	1	3	3	3	41.13
4	2	1	2	3	19.14
5	2	2	3	1	21.68
6	2	3	1	2	42.13
7	3	1	3	2	34.63
8	3	2	1	3	28.58
9	3	3	2	1	14.01
$K_1$	60.069	59.310	76.251		
$K_2$	82.950	63.660	46.551		
$K_3$	77.220	97.269	97.440		
$k_1$	20.023	19.770	25.417		
$k_2$	27.650	21.220	15.517		
$k_3$	25.740	32.423	32.480		
R	7.627	12.653	16.963		

2.2 石油醚脱脂处理大豆抗癌肽提取正交试验

**表3 石油醚脱脂条件大豆抗癌肽提取正交试验设计及结果**  
Table 3 Orthogonal array design for optimizing extraction of anticancer peptides from petroleum ether-defatted soybean powder and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	D空白	癌细胞生长抑制率/%
1	1	1	1	1	1.02
2	1	2	2	2	14.22
3	1	3	3	3	6.67
4	2	1	2	3	29.46
5	2	2	3	1	25.17
6	2	3	1	2	17.99
7	3	1	3	2	10.81
8	3	2	1	3	8.85
9	3	3	2	1	19.59
$K_1$	21.909	41.289	27.861		
$K_2$	72.621	48.240	63.270		
$K_3$	39.249	44.250	42.651		
$k_1$	7.303	13.763	9.287		
$k_2$	24.207	16.080	21.090		
$k_3$	13.083	14.750	14.217		
R	16.904	2.317	11.803		

经过石油醚脱脂，超声波处理的大豆提取物对体外培养的人胃癌细胞有抑制作用。加入不同处理样，其胃癌细胞的抑制作用明显不同。由表3中R值可知因素主次顺序为： $A > C > B$ 。从K值可知，最佳组合为 $C_2A_2B_2$ ，即在石油醚作为脱脂剂的条件下，大豆抗癌肽的最佳提取条件为超声波处理时间60min、过筛目数80目、脱脂粉添加量2g。经验证实验此时癌细胞生长抑制率达到25.59%。

2.3 正己烷脱脂处理大豆抗癌肽提取正交试验

试验以对胃癌细胞SGC-7901的生长抑制作用作为反映抗癌活性的指标。由表4中R值可知因素主次顺序为： $C > B > A$ ，从K值可知，最佳组合为 $C_1B_1A_1$ ，即在正己烷作为脱脂剂的条件下，大豆抗癌肽的最佳提取条件为超声波处理时间40min、脱脂粉添加量1g、过筛目数40目。验证实验表明，此时癌细胞生长抑制率达到19.21%。

**表4 正己烷脱脂条件大豆抗癌肽提取 $L_9(3^3)$ 正交试验设计及结果**

Table 4 Orthogonal array design for optimizing extraction of anticancer peptides from *n*-hexane-defatted soybean powder and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	D空白	癌细胞生长抑制率/%
1	1	1	1	1	22.26
2	1	2	2	2	10.51
3	1	3	3	3	8.4
4	2	1	2	3	2.13
5	2	2	3	1	9.63
6	2	3	1	2	3.34
7	3	1	3	2	15.28
8	3	2	1	3	18.09
9	3	3	2	1	0.09
$K_1$	41.409	39.669	43.689		
$K_2$	15.099	38.229	12.729		
$K_3$	33.459	12.069	33.549		
$k_1$	13.803	13.223	14.563		
$k_2$	5.033	12.743	4.243		
$k_3$	11.153	4.023	11.183		
R	8.770	9.200	10.320		

大豆提取液作用48h后，乙醚、石油醚、正己烷3组试验在最佳提取条件下癌细胞的抑制率依次是(39.03 ± 3.86)%、(25.59 ± 2.64)%、(19.21 ± 3.19)%。通过方差分析，正交试验的各试验组别之间差异不显著( $P > 0.05$ )；大豆脱脂预处理脱脂剂各组间两两比较表明，细胞抑制率均不同，差异显著( $P < 0.05$ )，进一步作两两比较，LSD及SNK(student-newman-keuls)检验表明：乙醚脱脂与石油醚脱脂处理之间差异显著， $P=0.013 < 0.05$ ；乙醚脱脂处理与正己烷脱脂之间差异极显著， $P = 0.004 < 0.01$ ；石油醚脱脂与正己烷脱脂处理之间 $P = 0.629 > 0.05$ ，差异不显著。表明不同脱脂预处理对癌细胞生长

的影响大于试验组别, 3种脱脂剂预处理中, 乙醚脱脂处理对癌细胞生长抑制率最高。

通过大豆抗癌提取物双缩脲反应和茚三酮反应均呈阳性, 说明该抗癌物为肽类物质。国内外学者研究表明大豆中一些具有抗癌活性的物质如大豆异黄酮、大豆皂甙、凝集素、蛋白酶抑制剂等, 其抗癌作用主要集中在抗乳腺癌、结肠癌、前列腺癌这一部分<sup>[18-20]</sup>。其中, 大豆异黄酮在体外主要是抑制前列腺癌细胞系的生长。而且只有其在超生理水平的条件下( $IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$ ), 即浓度达到能引起生长抑制时, 才能观察到前列腺癌细胞凋亡时出现的DNA片段<sup>[21]</sup>。相反, 在低浓度条件下, 大豆肽能抑制体外胃癌细胞的生长。Park等<sup>[22]</sup>研究表明大豆中存在一种名为Lunasin的抗癌肽, 这种肽具有强烈的抑癌作用。这对今后大豆抗癌肽的分离精制, 提取其高附加值部分有指导意义。

### 3 结论

通过体外细胞试验可以看出, 大豆抗癌肽的初步提取物有明显抑制癌细胞增殖的作用。在最优条件下3种脱脂剂预处理对癌细胞生长抑制率分别为39.03%、25.59%、19.21%。因此, 大豆抗癌肽的最佳提取条件为选用乙醚脱脂、过筛目数80目、脱脂粉添加量3g、超声波处理时间80min, 经验证实验, 此条件下, 癌细胞增殖抑制率达到39.03%。

### 参考文献:

- [1] 温再和, 苏秀兰, 欧阳晓晖. 抗癌活性肽抑制肿瘤生长和转移的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2005, 37(1): 34-36.
- [2] 全晓红, 苏秀兰. 抗癌活性肽对荷瘤小鼠抑瘤作用及诱导TNF的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(4): 301-302.
- [3] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, HSIEH C C, de LUMEN B O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention[J]. Peptides, 2009, 30(2): 426-430.
- [4] MORA-ESCOBEDO R, ROBLES-RAMIREZ M C, RAMON-GALLEGOS E, et al. Effect of protein hydrolysates from germinated soybean on cancerous cells of the human cervix: an *in vitro* study[J]. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64(4): 271-278.
- [5] GALVEZ A F, CHEN Na, MACASIEB J, et al. Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation[J]. Cancer Research, 2001, 61(21): 7473-7478.
- [6] LAM Y, GALVEZ A, de LUMEN B O. Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines[J]. Nutrition and Cancer, 2003, 47(1): 88-94.
- [7] De MEJIA E G, VASCONEZ M, de LUMEN B O, et al. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products[J]. Agricultural And Food Chemistry, 2004, 52(19): 5882-5887.
- [8] JEONG H J, LAM Y, de LUMEN B O, et al. Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 5903-5908.
- [9] JEONG H J, PARK J H, LAM Y, et al. Characterization of lunasin isolated from soybean[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(27): 7901-7906.
- [10] 王晓燕, 唐传核. 大豆抗氧化肽分子特征及制备技术概述[J]. 粮食与油脂, 2009(4): 1-3.
- [11] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
- [12] 张国胜, 孔繁东, 祖国仁, 等. 大豆蛋白抗高血压活性肽的研究[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(8): 12-14.
- [13] 张晓梅. 降血压和降胆固醇大豆肽的分离纯化[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [14] 嵇同友, 丛建民. 大豆生物活性肽的制备及其生物活性研究[J]. 中国酿造, 2007(8): 6-9.
- [15] 张晓梅, 钟芳, 麻建国. 大豆降胆固醇活性肽的初步分离纯化[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 33-37.
- [16] 吕方, 米沙, 王士贤, 等. 酶法制备大豆多肽的分子量分布和抑瘤实验观察[J]. 营养学报, 2008, 30(3): 274-277.
- [17] 曹静, 赵志华, 李道明. MTT法测定食管癌细胞株化疗药物敏感性[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(9): 1182-1184.
- [18] 杨镇洲. 大豆异黄酮的抗癌效应研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2001, 28(2): 107-110.
- [19] 荆剑, 赵翔, 张页. 大豆凝集素的纯化及其凝集不同肿瘤细胞的探讨[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 401-405.
- [20] 黄凯, 郑田要, 李聚海, 等. 大豆中植酸和胰蛋白酶抑制剂的抗营养和抗癌效应[J]. 中国油脂, 2008, 33(12): 28-31.
- [21] ZHOU Jinrong, GUGGER E T, TANAKA T, et al. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice[J]. J Nutr, 1999, 129(9): 1628-1635.
- [22] PARK J H, JEONG H J, de LUMEN B O. Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7686-7690.