

朝鲜族大酱中异黄酮的提取工艺优化 及其抗肿瘤活性研究

齐欣,张露,齐仕博,宋鑫萍,崔承弼*

(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

摘要:为优化朝鲜族大酱异黄酮的提取工艺,并研究朝鲜族大酱中异黄酮的抗肿瘤活性,本实验用超声波法提取朝鲜族大酱中的异黄酮,通过单因素实验和正交实验优化其提取工艺,并通过 CCK-8 法对正常乳腺细胞、MDA-MB-231 和 MCF-7 两种乳腺癌细胞的增殖抑制情况进行了测定,用 Western Blot 法检测了朝鲜族大酱中异黄酮处理后的两种乳腺癌细胞凋亡相关蛋白的表达情况。通过单因素和正交试验确定其最佳提取条件为提取时间 80 min、料液比 1:24、温度 50 ℃,此时得率最高,为 0.802%。CCK-8 结果显示,不同浓度的朝鲜族大酱异黄酮对正常细胞无毒副作用,对 MDA-MB-231 和 MCF-7 两种乳腺癌细胞的增殖抑制情况均呈剂量-时间依赖性,且均有显著性差异($p < 0.05$)。对不同浓度朝鲜族大酱异黄酮处理过的两种细胞凋亡相关蛋白的检测结果显示,两种细胞随着异黄酮浓度的增加,其促凋亡蛋白 Bax, caspase-3 的表达量与空白对照组相比均显著上升($p < 0.05$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著下降($p < 0.05$),且呈现剂量依赖性。表明朝鲜族大酱异黄酮对乳腺癌细胞的生长能够起到抑制作用。

关键词:朝鲜族大酱,异黄酮,提取工艺,抗肿瘤

Study on Extraction Process Optimization and Antitumor Activity of Isoflavone from Korean Soybean Paste

QI Xin, ZHANG Lu, QI Shi-bo, SONG Xin-ping, CUI Cheng-bi*

(Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: In order to optimize the extraction process of isoflavones from Korean soybean paste and study the anti-tumor activity of isoflavones in Korean soybean paste, this experiment used ultrasonic method to extract isoflavones from Korean soybean paste, which was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. The extraction process was carried out, and the proliferation inhibition of normal breast cells, MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells was determined by CCK-8 method. Western Blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins in two breast cancer cells treated with isoflavone of Korean soybean paste. The optimum extraction conditions were determined by single factor and orthogonal experiments. The extraction time was 80 min, the ratio of material to liquid was 1:24, and the temperature was 50 ℃. The yield was the highest at 0.802%. The results of CCK-8 showed that different concentrations of Korean soybean paste isoflavone had no toxic side effect on normal cells. The proliferation inhibition of MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells was dose-dependent and there were significant differences ($p < 0.05$). The detection results of apoptosis-related proteins in two kinds of cells treated with different concentrations of Korean soybean paste isoflavone showed that the two kinds of cells increased with the concentration of isoflavone, the expression of Bax and caspase-3 significantly increased compared with the control group ($p < 0.05$), while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 significantly decreased ($p < 0.05$). With dose dependence. It indicates that Korean soybean paste isoflavone can inhibit the growth of breast cancer cells.

Key words: Korean soybean paste; isoflavone; extraction process; anti-tumor

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)15-0094-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.016

引文格式: 齐欣, 张露, 齐仕博, 等. 朝鲜族大酱中异黄酮的提取工艺优化及其抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 94-99.

朝鲜族大酱是朝鲜族特色食品之一,是由大豆经微生物(如米曲霉、毛霉等)发酵而得的一种发酵制品,因其具有独特的风味及营养价值^[1],被越来越

多的大众接受,近年来对朝鲜族大酱的研究也越来越多。

研究显示,大豆发酵产品的总酚、异黄酮含量均

收稿日期: 2018-12-27

作者简介: 齐欣(1992-),女,硕士研究生,研究方向: 功能性食品, E-mail: 727105885@qq.com。

* 通讯作者: 崔承弼(1968-),男,博士,教授,研究方向: 功能性食品及朝鲜族传统食品, E-mail: cuichengbi@ybu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(3156100329)。

高于未发酵大豆,且随着发酵的进行,其中的活性成分也有所变化。朝鲜族大酱中具有多种对人体有益的营养成分^[2],其主要功能成分为大豆异黄酮,其具有防治癌症、抗氧化和改善妇女更年期综合症等多种生理功能^[3]。据 Messina 报告,欧美国家患乳腺癌、大肠癌的几率远远高出中国和日本等经常食用豆类食品的国家,据调查统计,在亚洲,每人每天所吸收的大豆异黄酮含量约为 40 mg,而美国和欧洲的吸量则远远小于 40 mg,仅为 3 mg 左右^[4-5],由此可见,经常食用豆类制品与降低癌症的发生率有明显的相关性,摄入足够的大豆类食物可大大降低女性患乳腺肿瘤疾病的风险^[6]。近年来,许多研究人员为了揭示大豆摄取量是否与癌症的发病率有关,对癌症发病率进行了调查,调查结果表明患病率极高的几种癌症,如:乳腺癌、肺癌、前列腺癌以及胃癌等疾病的发病率都与豆类食物的摄取量呈现一定的负相关性,由此认为通过摄入大豆异黄酮可以在一定程度上有效地预防和缓解癌症产生的风险。在有关朝鲜族大酱的研究中,已证明其具有抗突变性^[7]。为研究其在乳腺癌细胞增殖方面的作用,对其进行了本次试验研究。

目前大豆异黄酮的提取方法主要有溶剂萃取法,超声波萃取法,微波萃取法和超临界流体萃取法,而溶剂萃取法和超声波萃取法的使用较为广泛^[8],但仍存在有机溶剂不能高效利用、提取率达不到最佳水平等诸多问题,为能最大程度地利用所选有机溶剂,提高朝鲜族大酱中大豆异黄酮的提取率,本文对超声波提取异黄酮的工艺进行了优化,并检测了朝鲜族大酱中异黄酮对乳腺癌细胞的增殖抑制作用以及对凋亡相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

朝鲜族大酱 实验室自制^[9];MDA-MB-231、MCF-10A 正常乳腺细胞 韩国 PSA 公司;MCF-7 吉林大学。

无水乙醇 科密欧有限公司;DMEM、胎牛血清 美国 Gibco 公司;青-链霉素、胰酶、PBS 索莱宝公司;总蛋白定量(BCA)测定试剂盒 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;caspase-3 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、 β -actin 抗体 Abcam(上海)贸易有限公司;CCK-8 碧云天生物有限公司。

HH-6 数显恒温水浴锅 金坛市科析仪器有限公司;TG16A-WS 离心机 上海卢湘仪器有限公司;FA2004 分析天平 上海上平仪器有限公司;SP-Max3500FL 型多功能荧光酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司;KQ3200DE 超声波仪 昆山市超声仪器有限公司;EYELA OSB-2100 旋转蒸发仪 日本东京理化有限公司;Micro21 低温超速离心机 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;伯乐电泳仪、伯乐 510 凝胶成像系统 美国 UVP 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 朝鲜族大酱异黄酮的提取工艺 称取 10 g 烘干后的大酱粉,加入一定体积乙醇溶液,于一定温度

水浴锅中保温浸提一定时间后,以 4000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液测定大豆异黄酮含量。

1.2.2 单因素实验 分别考察提取时间、温度、料液比对朝鲜族大酱异黄酮得率的影响。在温度为 50℃、料液比为 1:24 时,分别超声提取 40、60、80、100、120 min,研究超声时间对朝鲜族大酱中异黄酮得率的影响;以料液比为 1:24、30、40、50、60、70℃下提取 80 min^[10],研究提取温度对朝鲜族大酱中异黄酮得率的影响;在温度为 50℃时,料液比分别为 1:8、1:12、1:16、1:20、1:24 超声提取 80 min,研究料液比对朝鲜族大酱中异黄酮得率的影响。

1.2.3 正交试验 以提取时间、提取温度、料液比为试验因素,设计三因素三水平的正交试验,如表 1 所示。用体积分数 75% 的乙醇作溶剂,考核指标为异黄酮得率,进行正交试验,选出最优组合。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Orthogonal experimental factors and levels

水平	因素		
	A 提取时间 (min)	B 提取温度 (℃)	C 料液比 (g: mL)
1	60	40	1:8
2	80	50	1:16
3	100	60	1:24

1.2.4 提取物中异黄酮得率的测定 参考 Jia 等^[11]方法并略有改动。取大酱异黄酮提取液 2.0 mL,加 40% 乙醇 3 mL。依次加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL、10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,新试剂加入前都需摇匀并静置 6 min。再加入 1 mol/L NaOH 溶液 4 mL,用 40% 乙醇 0.4 mL,混合均匀后静置 15 min。在 510 nm 处测量上述步骤中获得的混合液的吸光度。以芦丁为标品作标准曲线,样品中的异黄酮含量以芦丁计。异黄酮得率(%)以单位质量大酱粉中提取的异黄酮质量表示,计算公式如公式(1)所示:

$$\text{异黄酮得率}(\%) = \frac{\text{提取物的质量}}{\text{大酱粉总质量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.5 异黄酮溶液的配制 朝鲜族大酱异黄酮按正交试验的最优工艺参数进行提取,提取后冻干成粉,并按 1.2.4 方法测定粉末中异黄酮的质量分数。称取 10 mg 提取物粉末,溶于 0.1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,加入 9.9 mL 含血清培养基,制得母液浓度为 1000 ng/mL,依次稀释为 400、200、100、50、25 ng/mL 的药液,4℃保存备用。

1.2.6 CCK-8 法检测朝鲜族大酱提取物对乳腺癌细胞的增殖情况 取对数生长期的 MCF-7 和 MDA-MB-231 以及正常乳腺细胞,PBS 洗涤三次,加入胰酶进行消化,再加入等体积含血清培养基终止消化,移液枪吹打,转入 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,离心后弃上清,加入 1 mL 新鲜培养基重悬,吸取 5 μ L 于细胞计数板中,进行计数,将细胞稀释成浓度为 5 $\times 10^4$ 个/mL 的细胞悬液,向 96 孔板中加入 100 μ L 细胞悬液,相当于每孔接种 5000 个细胞,放于 37℃含 5% CO₂ 的培养箱中过夜,使细胞贴壁。次日向各孔中加入不同浓度的药液(25、50、100、

200、400 ng/mL) 10 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 培养箱中分别孵育 24、48、72 h, 孵育后去除培养基, 用培养基洗涤细胞两次, 加入 100 μ L 新鲜培养基, 各孔再加入 10 μ L CCK-8, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 分别在 0.5、1、2、4 h 测定在 450 nm 处的 OD 值。细胞活力计算公式如公式(2):

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_1 - 加药组, 细胞、药物和 CCK-8; A_2 - 不加药组, 只加细胞和 CCK-8; A_0 - 空白, 只加培养基和 CCK-8。

1.2.7 异黄酮处理后对乳腺癌细胞凋亡相关蛋白表达量的影响

1.2.7.1 Western Blot 试剂准备 10 $\times$ 电泳缓冲液: 称取甘氨酸 144.0 g、Tris-base 20.3 g、SDS 10.0 g, 用三蒸水定容至 1000 mL; 10 $\times$ 转膜缓冲液: 称取甘氨酸 144.0 g、Tris-base 30.3 g, 用三蒸水定容至 1000 mL; 20% 甲醇: 100 mL 甲醇于容量瓶中, 三蒸水定容至 500 mL; 1 $\times$ 电泳液: 称取已配好的 10 $\times$ 电泳缓冲液 50 mL, 三蒸水定容至 500 mL; 1 $\times$ 转膜液: 称取已配好的 10 $\times$ 转膜缓冲液 50 mL, 100 mL 20% 甲醇, 用三蒸水定容至 500 mL; TBST: 20 $\times$ TBS 50 mL, 1 mL 吐温-20, 用三蒸水定容至 1000 mL; 5% 封闭液: 称取脱脂奶粉 1 g, 用 20 mL TBST 进行溶解, 在摇床上摇匀待用; 抗体: 参考说明书和预实验决定稀释比例, 用 TBST 进行稀释。

1.2.7.2 Western Blot 样品蛋白提取 取传代后处于对数生长期的细胞, 待铺满瓶底 70%~80% 时加入 400、100、25 ng/mL 大豆异黄酮提取物, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 取出后用胰酶进行消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每管加入 100 μ L 裂解液吹打, 转移到 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}$ C、12000 $\times$ g 离心 30 min, 取上清于 1.5 mL EP 管中, 只取清液, 宁少勿多。

1.2.7.3 Western Blot 蛋白含量测定 按照赛默飞世尔 BCA 蛋白含量检测试剂盒说明进行操作, 标准品及样品于 96 孔板进酶标仪测定, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线, 求样品浓度, 按 30 μ g 上样量计算上样体积, 剩余蛋白以 4:1 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液放入沸水煮 5 min, 分装后放入 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.7.4 Western Blot 电泳 按照 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒配制 12% 分离胶以无水乙醇压平液面, 30 min 后配制 5% 浓缩胶插入上样梳, 分离胶和浓缩胶的配制如表 2。

待浓缩胶都凝固后, 以 100 V 恒压, 电泳 120 min, 随后 100 V 转膜 60 min, 转膜结束后, 将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 相应条带以相应一抗用 TBST 按比例稀释后孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗孵育 2 h, 用 ECL 显色放入凝胶成像系统显影并拍照。

1.3 统计分析

使用 SPSS 22.0 对试验数据进行统计学分析, 并以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。其他试验数据采用单因素方差分析法, 灰度值测定采用 Image J 进行测算。 $p < 0.05$ 表示具有显著性差异, $p < 0.01$ 表示具有极显著

表 2 分离胶和浓缩胶的配制

Table 2 Preparation of separation gel and concentrated gel

	12% 分离胶	5% 浓缩胶
总体积	10 mL	5 mL
30% Acr/Bis(29:1)	4 mL	0.83 mL
1 mol/L Tris-HCl(pH6.8)	0	0.625 mL
1.5 mol/L Tris-HCl(pH8.8)	2.5 mL	0
10% SDS	100 μ L	50 μ L
10% PAGE 胶凝固剂	100 μ L	75 μ L
PAGE 胶促凝剂	10 μ L	7.5 μ L
ddH ₂ O	3.3 mL	3.42 mL

性差异, $p > 0.05$ 表示无统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 大酱中异黄酮提取率随提取时间的变化 由图 1 可见, 提取时间 40~80 min 时, 提取率趋势为缓慢上升, 80~100 min 时开始下降, 100~120 min 缓慢上升。可能由于提取时间过短时, 异黄酮并未完全溶到有机溶剂中, 但随着时间的延长, 高温可能导致异黄酮结构受到了破坏, 从而提取率下降, 因此, 提取时间为 80 min 时朝鲜族大酱中异黄酮提取率最高。

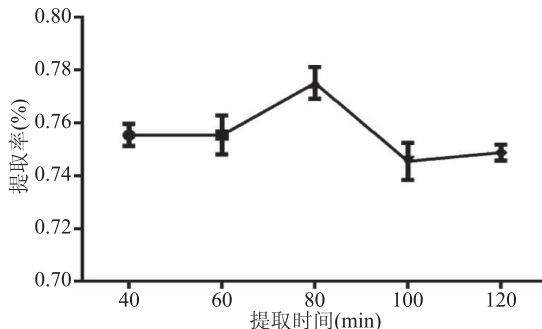


图 1 提取时间对提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on extraction rate

2.1.2 大酱中异黄酮提取率随提取温度的变化 由图 2 可见, 提取率的整体变化趋势为随着温度的升高, 先上升后下降, 温度较高时, 可能导致活性物质分解, 在温度为 50 $^{\circ}$ C 时提取率达到最大值 0.819%。因此, 朝鲜族大酱中异黄酮的最佳提取温度为 50 $^{\circ}$ C。

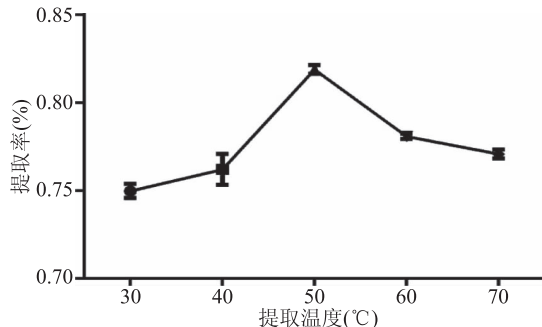


图 2 提取温度对提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on extraction rate

2.1.3 大酱中异黄酮提取率随料液比的变化 如图 3 可见, 提取率随着溶剂用量的增多而升高, 但料液比达到 1:20 后, 异黄酮的提取率趋于稳定, 说明异

黄酮的溶出已达平衡。但料液比为 1:24 时的提取率略高于料液比为 1:20 时的提取率,考虑到实验的可操作性以及节约药品,提取时选择 1:8、1:16、1:24 的料液比进行正交试验。

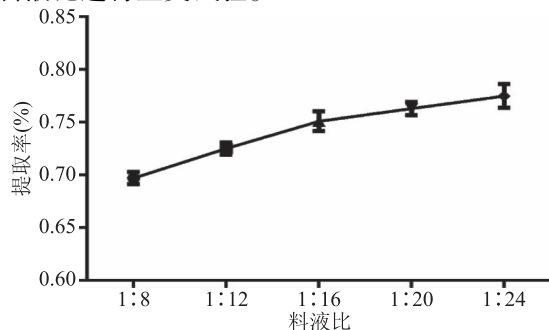


图3 料液比对提取率的影响

Fig.3 Influence of solid-liquid ratio on extraction rate

2.2 正交试验结果

在单因素实验的基础上,按照正交表 $L_9(3^4)$ 的因素水平组合进行正交试验,选用体积分数为 75% 的乙醇作溶剂,考察大酱中异黄酮的提取率,所得结果如表 3 所示。极差分析表明,对大酱中异黄酮提取率的影响最大的是料液比,其次是提取时间,最后为提取温度。最佳条件组合是 $A_2B_2C_3$,即提取时间

为 80 min、料液比为 1:24、温度 50 ℃ 时提取率最佳,为 0.802%。测得芦丁的标准曲线为 $y = 0.699x + 0.036$, $R^2 = 1$,按最优条件提取的冻干后的粉末中总异黄酮含量为 (8.00 ± 0.03) mg/g,质量分数为 0.8%。

2.3 CCK-8 法检测朝鲜族大酱提取物对乳腺癌细胞的增殖抑制作用

为探究朝鲜族大酱提取物对乳腺癌细胞增殖的影响,在药物处理后,通过 CCK-8 法检测其对细胞的增殖抑制作用。结果如图 4 所示,在 24 h 时,浓度为 400、200、100、50、25 ng/mL 的药物处理后,MDA-MB-231 细胞的活力为 25.12%、46.67%、60.53%、84.55%、106.97%,MCF-7 细胞的活力为 18.07%、27.07%、51.54%、68.53%、99.58%,抑制率随着药物浓度的增加呈现上升趋势,两种细胞活力和抑制率在不同浓度药物作用下均有显著性差异 ($p < 0.05$),在 48 h 时,不同浓度的药物处理后,MDA-MB-231 细胞的活力为 15.28%、17.29%、42.65%、77.76%、89.03%,MCF-7 细胞的活力为 15.33%、22.73%、43.73%、62.66%、87.73%,抑制率逐渐上升,在不同浓度药物作用下,细胞活力及抑制率均有显著性差异 ($p < 0.05$),在 72 h 时,不同浓度的药物处理后,MDA-MB-231 细胞的活力为 14.28%、19.91%、

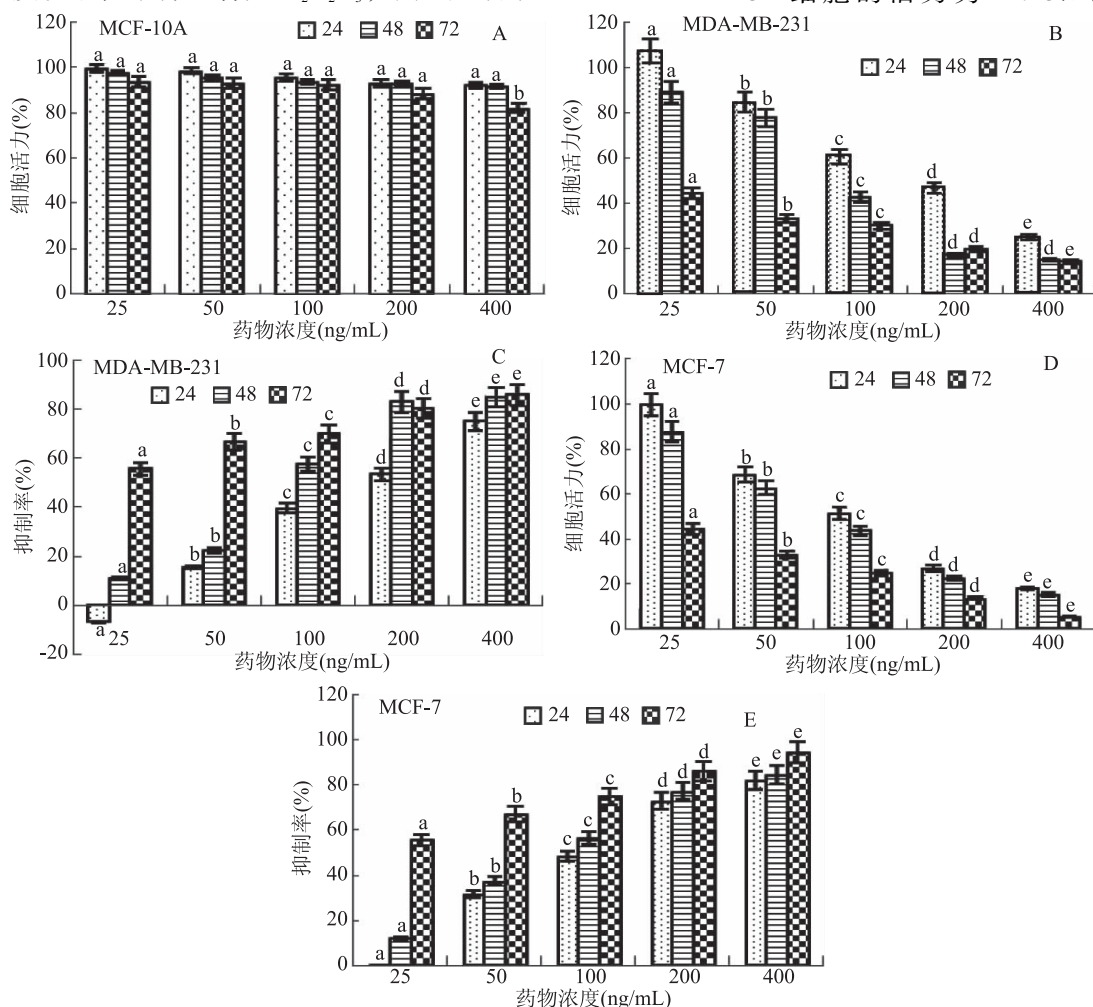


图4 朝鲜族大酱提取物对 MCF-10A、MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

Fig.4 The inhibitory effect of Korean soybean paste extract on MCF-10A,MDA-MB-231 and MCF-7 cells

表3 正交实验设计与结果

Table 3 Orthogonal experimental design and results

试验号	A	B	C	得率(%)
1	1	1	1	0.653
2	1	2	2	0.737
3	1	3	3	0.753
4	2	1	2	0.688
5	2	2	3	0.802
6	2	3	1	0.716
7	3	1	3	0.668
8	3	2	1	0.641
9	3	3	2	0.695
K ₁	2.143	2.009	2.010	
K ₂	2.206	2.120	2.120	
K ₃	2.004	2.164	2.250	
k ₁	0.714	0.700	0.670	
k ₂	0.735	0.707	0.707	
k ₃	0.668	0.721	0.750	
R	0.067	0.021	0.080	

30.23%、33.36%、44.48%，MCF-7 的细胞活力为 5.41%、13.58%、25.05%、32.97%、44.38%，抑制率呈上升趋势，两种细胞随着药物浓度的递增，细胞活力和抑制率均有显著性差异($p < 0.05$)。而正常乳腺细胞 MCF-10A 中，除 400 ng/mL 处理 72 h 外，不同浓度药物作用均无显著性差异($p > 0.05$)，且细胞活力在药物作用 24、48 h 后均在 90% 以上，在作用 72 h 后细胞活力均在 80% 以上，已知细胞活力在 90% 以上为无细胞毒性，细胞活力在 80%~90% 为亚毒性，可见朝鲜族大酱提取物在作用 24、48 h 时各浓度对正常乳腺细胞无毒性，根据以上数据确定后续试验中使用的高、中、低剂量浓度分别为 400、100、25 ng/mL，作用时间选定 48 h，通过以上数据可以看出，随着药物浓度的增加，细胞活力越来越低，抑制率越来越高，随着作用时间的延长，抑制率显示出增加的趋势，由此可见朝鲜族大酱提取物以剂量和时间依赖性的方式抑制乳腺癌细胞增殖。

2.4 药物处理后对乳腺癌细胞凋亡相关蛋白表达量的影响

图 5(A) 朝鲜族大酱异黄酮为 MCF-7 和 MDA-MB-231 两种乳腺癌细胞经低、中、高浓度药物处理 48 h 后 Western Blot 检测凋亡相关蛋白的表达情况，图 5 中(B)、(C) 为经 ImageJ 分析的条带量化图，结果显示，药物处理组中促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 的表达量与空白对照组相比均显著上升($p < 0.05$)，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显下降，且呈现剂量依赖性。

3 讨论

目前国内外对异黄酮的提取方法主要有以下几种，溶剂萃取法^[12]、微波辅助萃取法^[13-15]、超声辅助萃取法^[16-19]、超临界流体萃取法^[20]以及高压浸提法^[21]和连续逆流法^[22-23]。超声波提取与传统工艺加热回流提取相比，具有省时、节约溶剂、提取率高的

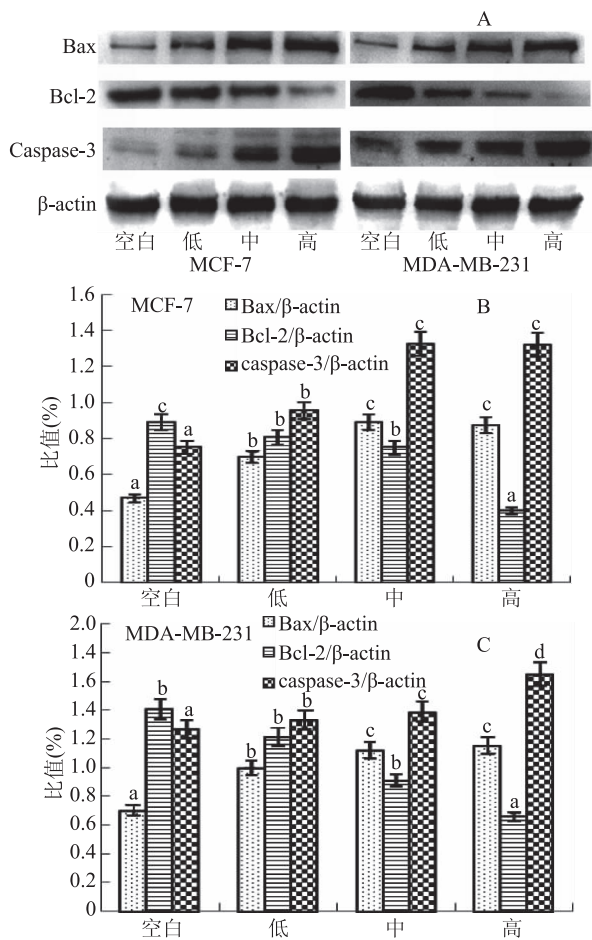


图5 药物处理后乳腺癌细胞中凋亡相关蛋白表达量的变化
Fig.5 Changes in expression of apoptosis-related proteins in breast cancer cells after drug treatment

优点，在谢明杰等^[24]人的研究中，通过对加热回流和超声波法的比较发现，超声波提取方法明显优于加热回流法，利用超声提取 30 min 所得大豆异黄酮的得率为 0.452%，加热回流提取 120 min 的得率为 0.310%，加热回流提取 2 次合计提取 240 min 的大豆异黄酮得率为 0.451%。本实验中通过单因素和正交试验，对超声波提取朝鲜族大酱中的大豆异黄酮进行了提取优化，最终异黄酮得率为 0.802%，进一步提高了其提取率，使原料和溶剂能够达到充分的利用。

现有研究已表明异黄酮具有抗癌的功效，其对肺癌、乳腺癌、肝癌等均能起到抑制肿瘤细胞生长，促进其凋亡的作用。有学者^[25]研究了 6328 个病例中患有乳腺癌的几率，从统计结果中发现常常从食物中摄取大豆异黄酮的人患有乳腺癌的几率与不摄取或偶尔摄取的人相比有明显的差异，不摄取或偶尔摄取大豆异黄酮的人患病的几率远远高于经常摄食的人，这就说明了大豆异黄酮能够有效地降低恶性乳腺肿瘤的患病几率。胡建伟等^[26]人研究了大豆异黄酮对大鼠乳腺癌发病率的影响，结果显示大豆异黄酮能够显著地降低乳腺癌发病率。这与本试验中大豆异黄酮能够抑制乳腺癌细胞增殖的结果相吻合。韦立群等^[27]人的研究指出染料木素对细胞的抑制率呈现一定的剂量和时间依赖性，在染料木素作用后，能够呈浓度依赖性上调 Bax、Caspase-3 蛋白的

表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达,本实验当中,ckk-8 法检测后发现朝鲜族大酱异黄酮能够抑制乳腺癌细胞的增殖,对正常乳腺细胞无毒副作用,Bax 和 caspase-3 的表达量在其作用后均有提升,Bcl-2 的表达量有所下降,这与韦立群等人的研究结果一致,可见朝鲜族大酱异黄酮在对乳腺癌细胞的增殖和凋亡上起到了一定的作用。

4 结论

通过单因素实验和正交试验得出,对大酱中异黄酮提取率的影响最大的是料液比,其次是提取时间,最后为提取温度。最佳提取条件为:提取时间 80 min、料液比 1:24、温度 50℃,此时得率为 0.802%。通过 CCK-8 实验可看出,朝鲜族大酱异黄酮对正常乳腺细胞无毒副作用,对 MCF-7 和 MDA-MB-231 两种乳腺癌细胞有抑制作用,且有剂量依赖性。经朝鲜族大酱异黄酮处理后的两种乳腺癌细胞当中,与凋亡相关蛋白的表达量均有所变化,其中促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量随着药物剂量的增加而升高,而抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量则随着药物剂量的增加而降低,由此可见,朝鲜族大酱中的异黄酮可以在一定程度上抑制乳腺癌细胞的增殖,并影响凋亡相关蛋白的表达,其对乳腺癌细胞的生长能够起到抑制作用。

参考文献

- [1] 魏环宇.延边朝鲜族传统大酱理化及微生物特性分析[J].中国调味品,2015,40(11):38-42.
- [2] 赵九永.传统大豆发酵食品的营养价值与保健功能[J].粮食科技与经济,2017,42(2):71-73,76.
- [3] 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.
- [4] Messina M, Nagata C, Wu A H. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes[J]. Nutrition and Cancer, 2006, 55: 1-12.
- [5] Van Erp-baart M A, Brants H A, Kiely M. Isoflavone intake in four different European countries: The Venus approach[J]. British Journal of Nutrition, 2003, 89: 25-30.
- [6] Ting - Ting Zhao, Feng Jin, Ji - Guang Li, et al. Dietary isoflavones or isoflavone-rich food intake and breast cancer risk: A meta - analysis of prospective cohort studies [J]. Clinical Nutrition, 2017: 1-10.
- [7] 李雪,史得君,黄柏中,等.不同贮藏时期朝鲜族大酱致突变及抗突变作用[J].食品与机械,2016,32(6):123-127.
- [8] 钱丽丽,左锋,唐彦军.大豆异黄酮提取方法的研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2006,18(5):64-67.

- [9] 齐欣,史得君,崔清美,等.朝鲜族传统大酱抗疲劳作用的研究[J].食品与营养科学,2017,6(4):201-208.
- [10] 汪美汐,胡佳文,马丽,等.超声波法从酱油渣中提取异黄酮工艺条件研究[J].华中师范大学学报,2015,49(2):233-236.
- [11] Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on super-oxide radicals [J]. Food Chemistry, 1999, 64(4):555-559.
- [12] 刘玉兰,王坡,田原.醇洗大豆浓缩蛋白副产物糖蜜中提取大豆异黄酮的研究[J].中国油脂,2008,33(6):48-51.
- [13] 于海莲.微博辅助乙醇提取大豆异黄酮的研究[J].大豆科学,2011,30(1):144-146.
- [14] 钱丽丽,左锋,刘志明.微波预处理提取大豆异黄酮的研究[J].现代食品科技,2007,23(1):38-39.
- [15] 彭游,邓泽元,叶志刚,等.大豆异黄酮微波干法辅助提取及其机理研究[J].广西植物,2011,31(2):266-269.
- [16] 王丽娟,张永忠,张丽丽.超声波辅助法提取大豆酱渣饼中大豆异黄酮[J].中国油脂,2009,34(5):52-55.
- [17] 孟宪金,于国萍.超声波辅助提取发酵豆奶中的游离大豆异黄酮[J].东北农业大学学报,2008,39(9):93-95.
- [18] Rostagno M A, Palma M, Baroso C G. Ultrasound - assisted extraotion of soy isoflavones [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012: 119-128.
- [19] Rostagno M A, Palma M, Barroso C G. Ultrasound - assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruitjuices [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597: 265-272.
- [20] 黄池宝.大豆中大豆异黄酮提取分离的研究[D].广州:广东工业大学:2001:24-34.
- [21] 张风清,解丛林,张松龄.高压浸提法提取大豆异黄酮工艺[J].食品工业科技,2006,27(1):113-114.
- [22] 何隽婷,梁勇,梁斯,等.酱油渣中大豆异黄酮的动态逆流提取及分离纯化研究[J].华南师范大学学报,2010(4):80-86.
- [23] Wang S, Zhou R Q, Ding I. Study on the continuous counter-current extraction of soybean isoflavones [J]. Food Science and Technology, 2005(8):19-23.
- [24] 谢明杰,宋明,邹翠霞.超声波提取大豆异黄酮[J].大豆科学,2004,23(1):74-76.
- [25] 封传悦,朱俊东.大豆异黄酮摄入与乳腺癌发生风险的 Meta 分析[J].中华乳腺病杂志:电子版,2010,4(3):307-312.
- [26] 胡建伟,赵晓慧,张玉梅,等.大豆异黄酮对二甲基苯蒽诱导的大鼠乳腺肿瘤发生的影响[J].北京大学学报:医学版,2010,42(3):288-292.
- [27] 韦立群,李婉婷,李通,等.金雀异黄酮对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡及 EGFR/PI3K/Akt 通路的影响[J].中国药理学通报,2017,33(10):1376-81.

(上接第 93 页)

- [S].北京:中国农业出版社,2010.
- [25] 中国国家卫生和计划生育委员会.酒中乙醇浓度的测定:GB/T 5009.225-2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.食品中总酸的测定:GB/T 12456-2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [27] 中国国家卫生和计划生育委员会.食品中还原糖的测

- 定:GB/T 5009.7-2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [28] 中国国家食品药品监督管理总局.食品微生物学检验菌落总数测定:GB/T 4789.2-2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [29] 中国国家卫生和计划生育委员会.食品微生物学检验大肠菌群计数:GB/T 4789.3-2016[S].北京:中国标准出版社,2016.