

VB₂联合五氟对结肠癌细胞 C26 及 Balb/c 荷瘤小鼠的协同抗肿瘤活性作用

陈茜, 李海涛

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 探究五氟尿嘧啶 (5-FU) 联用 VB₂ 对其体内和体外抗结肠肿瘤活性的协同作用。体外, 通过 MTT 和 Chou-Talalay Method 法定量分析二者联用指数 (CI) (CI=1 加和作用; CI<1 协同作用; CI>1 拮抗作用); 采用 Western blot、细胞流式研究联用对凋亡蛋白 PARP 切割以及细胞周期的影响。体内, 以结肠癌 Balb/c 荷瘤小鼠实验探究两药联用对小鼠肿瘤生长和免疫生理功能的影响。结果显示, 5-FU 与 VB₂ 联用, C26 细胞抑制率 50% 及 90% 时相应的 CI 值分别为 0.52 和 0.13, 具有协同效应。联用组较 5-FU 和 VB₂ 单用组的 PARP 蛋白切割条带增强显著, 周期实验联用组 G₁ 期比例为 75.12% 较 5-FU 单用组 64.02% 明显提高, 且差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。体内, 5-FU 与 VB₂ 联用后小鼠肿瘤抑制率从 51.53% 提高至 76.18%, 瘤体比指数从 0.16 下降为 0.071, 且差异均具有显著性 ($p<0.001$); 脾脏指数联用组与 5-FU 单用组相比显著降低; 肝肾指数以及血尿素氮和血浆肌酐含量各组并无统计学差异; 与 5-FU 治疗组血尿酸含量 108.50 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 联用组尿酸含量仅为 59.75 $\mu\text{mol/L}$, 显著下降 ($p<0.001$)。因此, 5-FU 与 VB₂ 联用对结肠癌细胞 C26 和 Balb/c 荷瘤小鼠具有协同抗肿瘤活性, 且与细胞 G₁ 期阻滞有关。

关键词: VB₂; 五氟尿嘧啶; 结肠癌; 协同作用; 抗肿瘤活性; 周期阻滞

文章编号: 1673-9078(2019)06-7-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.002

Synergistic Tumor Inhibition Effects of Vitamin B₂ and 5-fluorouracil on Colon Cancer Cell C26 and Balb/c Mice

CHEN Xi, LI Hai-tao

(Food Department of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aim of this research is to explore the synergistic effect of penta-fluorouracil (5-FU) combined with VB₂ on anti-colon tumor activity *in vivo* and *in vitro*. *In vitro*, the combined index (CI) was quantitatively analyzed by MTT assay and Chou-Talalay Method (CI=1 additive effect; CI<1 synergistic effect; CI>1 antagonism); the influence of drug combination on the cleavage of apoptotic protein PARP and cell cycle was studied through cell flow and Western blot experiments. *In vivo*, the animal experiments of colon cancer Balb/c tumor-bearing mice were used to explore the effect of combining two drugs on tumor growth and immune function. The results showed that 5-FU combined with VB₂, the corresponding CI values to 50% and 90% of C26 cell inhibition were 0.52 and 0.13 respectively, so the effect of these two drugs combination was synergistic. The PARP protein band was observed using 5-FU or VB₂ alone, but the band of the combined group was significantly enhanced. Besides, the percentage in the G₁ phase for the combining drugs group was 75.12%, while the 5-FU group was 64.02%, and the difference was statistically significant ($p<0.05$). *In vivo*, after combining two drugs, the tumor inhibition rate of mice increased from 51.53% to 76.18%, and the tumor body ratio index decreased from 0.16 to 0.07, and the difference was significant ($p<0.001$); spleen index of combination group was obviously lower than 5-FU single-use group; liver and kidney index and blood urea nitrogen and plasma creatinine levels were not statistically different; and compared with the 5-FU treatment group (its plasma uric acid content was 108.50 $\mu\text{mol/L}$), the uric acid content of the combination group was only 59.75 $\mu\text{mol/L}$, which was significantly decreased ($p<0.001$). Therefore, 5-FU combined with VB₂ has synergistic antitumor activity in colon cancer C26 cells and Balb/c tumor-bearing mice, and is associated with cell G₁ arrest.

Key words: vitamin B₂; 5 fluorouracil; colon cancer; synergistic effect; antitumor activity; cycle block

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31773064)

作者简介: 陈茜 (1993-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤膳食干预

通讯作者: 李海涛 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤化学预防

结直肠癌,是世界上发病率第三高的癌症之一,其死亡率仅次于肺癌和肝癌,近来在亚洲地区发病率有逐渐增长的趋势^[1,2]。饮食、烟酒、肥胖以及不良的生活习惯是导致结直肠癌的常见病因^[1]。目前,针对结直肠癌的治疗手段主要包括手术治疗、放射治疗以及化学药物治疗,其中五氟尿嘧啶(5-FU)是治疗结直肠癌的常见药物之一。但是临床表明,对中晚期结直肠癌患者应用 5-FU 单独治疗,治愈率仅为 10%~15%,并且易产生耐药性、毒副作用(如骨髓抑制和肝损伤)^[3,4]。

VB₂ (Vitamin B₂), 又称核黄素,属于 B 族维生素的一员,是一种必需维生素,呈黄褐色,微溶于水,易被光照和紫外线分解。食物中,动物肝脏、肾脏、蛋、奶以及绿叶蔬菜和豆类是 VB₂ 的广泛来源。VB₂ 在体内不会蓄积,而是通过尿液排出体外。在人体,VB₂ 主要是作为辅酶与蛋白质结合产生黄酶,传递氢参与呼吸过程^[5]。缺乏 VB₂ 会引起口眼等部分的炎症,如口角炎、眼结膜炎等^[5]。研究发现,VB₂ 还具有缓解偏头痛、抗血小板聚集降低脑卒中等^[6,7]心血管疾病患病风险的功能。此外,科学发现,VB₂ 存在潜在的抗癌性^[8]。中国四川盐亭县是食管癌高发地区,对该地区的研究证实 VB₂ 对降低食管癌的发生率有重要作用,对食管癌患者的血清取样分析,结果显示食管癌患者血浆中核黄素含量明显低于健康志愿者,食管癌组织中核黄素含量明显低于正常组织^[9,10]。除了食管癌,胃癌^[11]、子宫颈癌^[12]和乳腺癌^[13]等均有报道 VB₂ 能显著抑癌提高药物治疗效果。

为了提高癌症的疗效,近来研究发现,相比单独用药,将 5-FU 与一些功能活性物质联合使用能达到更好的治疗效果,例如 β -胡萝卜素、姜黄素、白藜芦醇以及多种维生素^[14-17]。有研究报道,维生素 D 与 5-FU 联用能提高 5-FU 的抗肿瘤活性^[18]。同时流行病学调查表明,叶酸、B 族维生素^[19,20]的饮食摄入量与结直肠癌的患病率相关。而临床上,癌症患者经常因化疗导致的口腔溃疡需要口服补充 VB₂^[21,22]。

研究药物联合作用的效果需要用科学的方法进行定量分析。Chou-Talalay Method 联合指数法^[23]又称中位药效法,是一种对药物联合作用进行定量分析的手段,2005 年开发出相应的药物联合作用的量-效分析软件,是应用最为广泛的评价药物联合作用的方法之一。

目前对 VB₂ 与抗癌药顺铂联合用药的探究较多^[24,25],而对 VB₂ 与五氟作用的实验研究较少,因此本文拟通过 Chou-Talalay Method 法评价 VB₂ 与 5-FU 联合用药在结肠癌细胞上的效果并采用体内动物实验进

行验证,从而为进一步提高 5-FU 治疗结肠癌效果以及对癌症病人给予科学的临床膳食建议提供指导作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

VB₂ (Vitamin B₂), 即核黄素, BR, 纯度 98% (25 g), CAS 号 83-88-5、5-FU (5-Fluorouracil, 五氟尿嘧啶), 分析标准品, HPLC $\geq$ 98% (100 mg), CAS 号 51-21-8 均购于盈芯生物科技(上海)有限公司; 普通饲料, 购于江苏省协同医药生物责任有限公司; SPF 级 Balb/c 小鼠 (许可证号: 201723728), 雌性, 5 周龄, 体重 (18 $\pm$ 1) g, 购于苏州苏普思实验动物有限公司; C26 小鼠结肠癌细胞购于上海中科院细胞所。

PRMI1640 培养基、1%青链霉素、10 $\times$ 0.25% EDTA 胰酶消化液购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 10%胎牛血清 (FBS) 购于美国 Gibco 公司; DMSO、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、鼠二抗 (1:2000 稀释)、兔二抗 (1:2000 稀释)、PARP 兔一抗蛋白 (1:1000 稀释)、 β -actin 鼠一抗蛋白 (1:1000 稀释) 购于美国 Sigma 公司; 碧云天 BCA 蛋白提取试剂盒购于南京森贝伽生物科技有限公司; MTT 粉、10 $\times$ Loading Buffer、PI 染料购于南京福麦斯生物技术有限公司; BD 抗凝血管购于盈芯生物科技(上海)有限公司; 脱脂乳粉购于新西兰安佳乳业有限公司; 无水乙醇、95%乙醇、二甲苯、Tween-20、切片石蜡、中性树脂、苦味酸、无水甲醇、柠檬酸钠、甘氨酸、二硫苏糖醇 (DTT)、Tris、过硫酸铵、甘油、溴酚蓝、十二烷基硫酸钠 (SDS)、氯化钠等购于实验物资中心; 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 30%溶液购于中国生工生物工程股份有限公司。

1.1.2 实验仪器

CO₂ 细胞培养箱 (型号 Forma 371), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 生物安全柜 (型号 1300 系列 A2), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 超低温冰箱 (型号 HFU586), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 倒置显微镜 (型号 JSZ8), 南京江南永新光学有限公司; 液氮罐 (型号 YDS-10), 成都金凤液氮容器有限公司; 全波长酶标仪 (型号 1510 Multiscan GO), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 分析天平 (型号 EPB3002-N) 美国 METTER TOLEDO 公司; 冰柜 (型号 REC5004V23), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 离心机 (型号 LYNX 4000), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 台式冷冻离心机 (型号 Sorvall ST40R),

美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 微型离心机 (型号 Micro-17), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 化学发光凝胶成像系统 (型号 Fluor Chem FC3), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 鼓风干燥箱 (型号 ED720), 德国 BINDER 公司; 垂直电泳仪, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司; 流式细胞仪 (型号 Calibur), 美国 Becton, Dickinson and Company; 酸度计 (型号 FE20K-plus), 上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.1.3 实验细胞

C26 细胞 (小鼠结肠癌细胞) 购于上海中科院细胞所, 细胞贴壁生长, 形态特征是成纤维细胞样。培养条件: PRMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%双抗 (100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素), 95%空气+5% CO₂, 37 °C 恒温。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏与常规培养

提前把配好的 PRMI 1640 完全培养基 (PRMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%双抗) 放入 37 °C 水浴锅预热, 将细胞冻存管从液氮罐拿出来后, 用镊子夹住立马放入 37 °C 水浴锅轻轻摇晃加速解冻, 待冷冻的细胞液融化后, 在提前紫外消毒的生物安全柜中将冻存管的细胞液吸入离心管中, 然后加入 5 mL 的培养基, 放入离心机以 1000 r/min 低速离心 5 min 后, 倒掉上清, 加入 5 mL 完全培养基并轻缓吹打细胞沉淀待混匀后转移到 10 cm² 细胞培养皿内, 补充完全培养基至 10 mL, 皿上做好细胞系名称及复苏时间等标记, 然后放置在细胞培养箱中培养, 定期查看细胞状态进行细胞传代。

待细胞长至 80%~90% 密度时在生物安全柜中进行传代, 倒去上层培养基, 用预热的 PBS 冲洗培养皿三次后, 加入 2 mL 的胰蛋白酶, 转移至 37 °C 培养箱消化, 根据细胞特性消化 1~2 min。显微镜下观察待细胞变圆变亮开始脱落时, 向培养皿加入 6 mL 完全培养基终止消化, 将细胞液转移至 15 mL 离心管中, 放入离心机以 1000 r/min 低速离心 5 min, 舍弃上清, 加入合适体积的培养基将细胞吹打重悬均匀, 按照 1:3 的比例将细胞悬液转移至 10 cm² 培养皿中, 补充新鲜完全培养基至 10 mL, 最后将培养皿放置在细胞培养箱中备用。

1.2.2 MTT 细胞增殖毒性试验及药物联用指数的计算

1.2.2.1 药物分组

对 5-FU IC₅₀ 的 MTT 实验中, 分别设置五个浓度, DMSO 组 (不加药物处理); 5-FU 1 组 (浓度为 0.1

μmol/L); 5-FU 2 组 (浓度为 0.3 μmol/L); 5-FU 3 组 (浓度为 1 μmol/L); 5-FU 4 组 (浓度为 3 μmol/L); 5-FU 5 组 (浓度为 10 μmol/L)。对 VB₂ IC₅₀ 的 MTT 实验中, 设置浓度为 DMSO 组 (不加药物处理); VB₂ 1 组 (浓度为 0.005 mmol/L); VB₂ 2 组 (浓度为 0.01 mmol/L); VB₂ 3 组 (浓度为 0.03 mmol/L); VB₂ 4 组 (浓度为 0.05 mmol/L); VB₂ 5 组 (浓度为 0.07 mmol/L); VB₂ 6 组 (浓度为 0.1 mmol/L)。在药物联用实验中, 以单用 5-FU 组 (1/8 IC₅₀、1/4 IC₅₀、1/2 IC₅₀、IC₅₀、2 IC₅₀、4 IC₅₀)、单用 VB₂ 组 (1/8 IC₅₀、1/4 IC₅₀、1/2 IC₅₀、IC₅₀、2 IC₅₀、4 IC₅₀) 及其联用组为实验组。

1.2.2.2 MTT 检测及 CompuSyn 软件计算

MTT 实验可以检测出药物对细胞的作用浓度 IC₅₀ 以及药物对细胞的增殖毒性。将对数期的 C26 小鼠结肠癌细胞, 以 5000/孔的密度每孔 100 μL 接种到 96 孔板中。细胞贴壁生长过夜后更换药物培养基, 作用 48 h 后吸走孔里的上清, 加入 20 μL 配好的 MTT 试剂 (0.5 mg/L) 孵育 2~3 h 后吸走上清, 排枪每孔加入 150 μL DMSO, 酶标仪 490 nm 波长下的 OD 值。将 OD 数据输入 Graph Pad Prism 计算药物 IC₅₀, 确定药物联用比。

再次以 5000/孔的密度接种到 96 孔板中, 以 DMSO 组 (培养基加 1% DMSO) 为阴性对照组, 以 5-FU 单用组、VB₂ 单用组及联用组为实验组。然后重复上述 MTT 实验, 得到不同组的 OD 值, 利用 CompuSyn 软件计算两药联用指数 (CI), 以及两个药物对细胞抑制率 50%、75% 及 90% 时单独及联用后相应的浓度比值表征。

$$CI(Combination \cdot index \cdot value) = \sum_{i=1}^n \frac{(D)i}{(DX)j}$$

式中: CI: 联合用药指数; D: 单用剂量; Dx: 联用剂量; CI=1 加和作用; CI<1 协同作用; CI>1 拮抗作用^[23]。

1.2.3 Western blot 实验检测凋亡蛋白 PARP 表达水平

把对数期的 C26 细胞以 1×10⁶/孔的细胞密度接种到 6 孔板中。贴壁过夜生长后倒掉上清换药物培养基, 设置四个浓度组, 分别是只含培养基的空白对照组, 单用 5-FU 1 μmol/L, VB₂ 0.02 mmol/L 以及联用组。药物作用 48 h, 使用配好的 RIPA 缓冲液 (蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂:细胞裂解液为 1:1:48) 裂解收好的细胞提取总蛋白, 然后在 4 °C、12000 r/min 的条件下离心 15 min。取离心后的上清用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。以 40 μg 上样量, SDS-PAGE 电泳, 湿转法转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 放置在低温冰箱 4 °C 摇床上一抗孵育过夜, TBST 洗膜三次, 室温孵育二

抗 2 h, TBST 洗膜三次, 加显影液, 摇晃混匀反应 1 min, 用 Fluor Chem FC3 化学发光凝胶成像仪显影, 通过 Image J 软件分析蛋白条带, 以 β -actin 为蛋白条带参照。

1.2.4 细胞流式周期 PI 单染实验

将对数期的 C26 细胞以 1×10^6 /孔的密度接种在 6 孔板, 贴壁过夜生长, 弃上清更换药物培养基, 设置 4 个浓度组, 不加药物的培养基对照组, 单用 5-FU $1 \mu\text{mol/L}$, 单用 VB₂ 0.02 mmol/L , 以及联用组, 药物作用 48 h, 用胰酶消化细胞, 预冷的 PBS 冲洗 2 次后, 将冲洗液和消化的细胞液梯度离心 (1000 r/min 、 1500 r/min) 两次, 每次离心 5 min, 弃上清加入预冷的 PBS 轻轻吹打细胞沉淀, 再度以 2000 r/min 离心后, 加入预冷的 75%乙醇固定重悬细胞, 4°C 固定 24 h。 1000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清用 PBS 洗一次, 再加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 吹打均匀转移到流式管中, 避光加入 $10 \mu\text{L}$ 的 PI 染液 (浓度至 $50 \mu\text{g/mL}$), 孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 Balb/c 小鼠结肠癌模型建立及药物抑瘤作用研究

1.2.5.1 C26 结肠癌细胞接种及结肠癌模型建立

将传代好的 C26 细胞用血球计数板计数, 用 PBS 重悬稀释至 10^7 个/mL。对无菌环境下饲养一周的 Balb/c 小鼠皮下接种 C26 细胞, 每只 0.1 mL 。定期测量小鼠瘤体积和体重。肿瘤 2 周后选择瘤体积在

$250 \sim 350 \text{ mm}^3$ 大小的小鼠随机分组, 进行相应的药物处理。

瘤体积(V)计算公式= $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$

1.2.5.2 药物干预分组和给药

对所有小鼠随机分组, 空白对照组 5 只 (生理盐水溶液); 荷瘤阴性对照组 10 只 (生理盐水溶液); 单独 5-FU 给药组 8 只 (5-FU: 50 mg/kg ^[26]); 单独 VB₂ 给药组 8 只 (VB₂: 20 mg/kg); 联合用药组 8 只, 肿瘤 2 周后, 对于单独 5-FU 给药组及联合用药组每周一次每只腹腔注射 5-FU 0.1 mL , 单独 VB₂ 给药组及联合用药组每天一次每只灌胃 VB₂ 0.1 mL , 空白组和阴性对照组每天每只灌胃 0.1 mL 。定期测量小鼠瘤体积和体重。

1.2.5.3 瘤重及瘤体比指数等生理生化指标检测计算

连续用药 2 周后, 收集小鼠尿液和粪便, 将小鼠眼球取血后断颈处死, 称取瘤重及肝重脾重。计算瘤体积变化率、瘤体比指数、抑瘤率和免疫指数等, 小鼠尿液和血清送样至无锡第四人民医院检测血尿生化指标。

$$\text{瘤体比指数} = \frac{\text{瘤重}}{\text{体重}} \times 10$$

$$\text{肝脏指数} = \frac{\text{肝重}}{\text{体重}} \times 10$$

$$\text{脾脏指数} = \frac{\text{脾重}}{\text{体重}} \times 10$$

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{荷瘤阴性对照组小鼠平均瘤重} - \text{药物处理组平均瘤重}}{\text{荷瘤阴性对照组小鼠平均瘤重}} \times 100\%$$

1.2.6 数据统计分析

所有数据通过 Graphpad Prism 5 软件进行制图与分析, Tukey's t 检验用作对比两组间的数据, One-way ANOVA 用与比较 3 组及以上组件数据。数据结果以平均值 $\pm$ 标准差为表示, $p < 0.05$ 表示具有统计学意义。“*”表示 $p < 0.05$; “**”表示 $p < 0.01$; “***”表示 $p < 0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 体外细胞实验结果

2.1.1 VB₂ 可显著抑制 C26 细胞生长活力

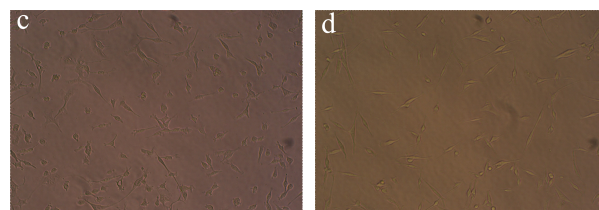
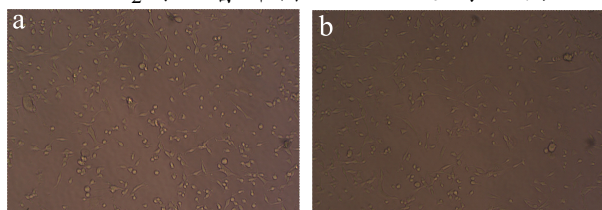


图 1 不同药物浓度 VB₂ 对结肠癌细胞 C26 生长状态的影响

Fig.1 Influence of treatment from different concentration VB₂ on growth condition of colon cancer cell C26

注: a: Control; b: VB₂ (0.01 mmol/L); c: VB₂ (0.1 mmol/L); d: VB₂ (1 mmol/L)。

对同一代 C26 细胞加以不同浓度的 VB₂ 药物处理后, 放置在细胞培养箱中培养 48 h, 在倒置显微镜下以 40×10 倍数观察细胞的生长状况及形态变化。

结果如图 1 所示, 空白 DMSO 组细胞生长状态良好, 而经过药物处理的细胞, 生长状态和密度与 VB₂ 浓度呈剂量依赖, 低浓度 VB₂ 下细胞状态与空白组差

异不大,而中高浓度 VB₂ 下细胞密度小,细胞网状分化明显,生长活力差,当浓度高达 1 mmol/L 时,细胞分散,数量少,呈短小棒状,生长增殖受到明显抑制,Iftekhar Hassan 等人^[24]曾提到,VB₂ 是辅助顺铂化疗的潜在药物,能够杀死癌细胞。分析以上实验结果,说明一定浓度的 VB₂ 对结肠癌细胞 C26 有细胞毒性作用,低浓度 VB₂ 对结肠癌细胞作用太弱,无法达到抑制增殖的作用。

2.1.2 MTT 法检测 VB₂ 与 5-FU 联用的细胞毒性作用以及联合用药指数 CI 值计算

为了研究 VB₂ 与 5-FU 单用及联用对 C26 结肠癌细胞增殖活力的影响,通过 MTT 实验检测药物的细胞毒性作用及相应的 IC₅₀ (细胞致死率为一半时的药物浓度),使用 Graph Pad Prism 5.0 计算所得 5-FU 的 IC₅₀ 为 1.13±0.80 μmol/L (图 2a),VB₂ 的 IC₅₀ 为 19.20±4.16 μmol/L (图 2b)。

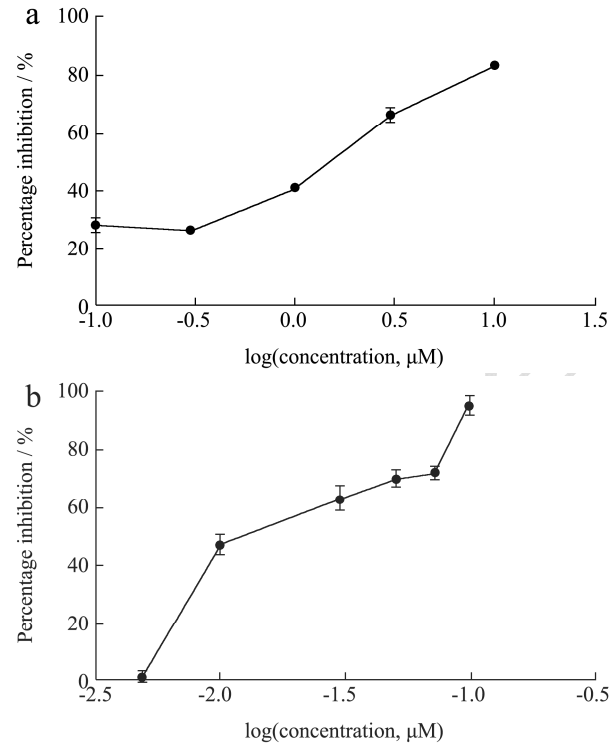


图 2 不同药物对结肠癌细胞 C26 的抑制率

Fig.2 The inhibition rate of different drugs on colon cancer cell C26 (mean±SD)

注: a: 5-FU; b: VB₂。

通过两药的 IC₅₀ 确定 VB₂ 与 5-FU 药物联用的浓度比为 20:1; 按照 IC₅₀ 的浓度比进行倍比稀释, 浓度范围为 1/8 IC₅₀~4 IC₅₀。MTT 法检测药物单用及联用后的 OD 值, 利用 CompuSyn 软件计算联用指数(CI)。

结果表明 (表 1 及图 3), VB₂ 与 5-FU 联用, 对 C26 细胞抑制率为 50%、75%及 90%时, 对应的 CI

值为 0.518、0.260 及 0.130。达到 75%抑制率, 单用 5-FU 浓度是复配浓度的 8 倍, 单用 VB₂ 是复配浓度的 16 倍。CI 值表征药物间作用强度, 当 CI 值在 0.7~1 区间为轻微协同作用, 0.3~0.7 为协同作用, 小于 0.3 则为强协同作用^[23], 因此联用 CI 值的结果说明 VB₂ 与 5-FU 联用后产生协同抗结肠肿瘤作用, 协同抑制结肠癌细胞 C26 的增殖, 降低癌细胞的生存率。

表 1 VB₂ 与 5-FU 联合用药指数 CI 值

Table 1 The combination index value of the mixture of VB₂ and

Drug	5-FU		
	CI Value (ED ₅₀)	CI Value (ED ₇₅)	CI Value (ED ₉₀)
VB ₂ &5-FU	0.518	0.260	0.130

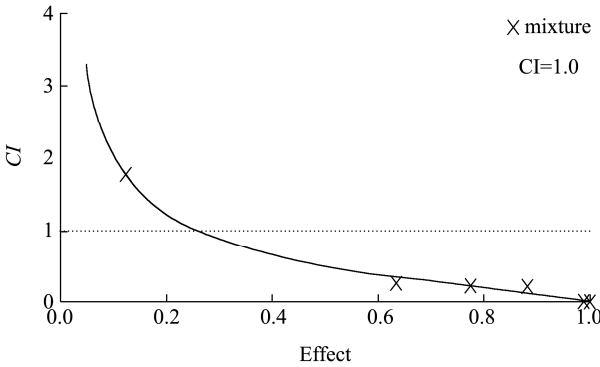


图 3 Fa-CI 图, 联合用药的效应与 CI 指数之间的关系

Fig.3 Fa-CI picture, the relationship between effect of the mixture and value of the combination index

2.1.3 Western blot 实验检测 VB₂ 与 5-FU 联用后对凋亡蛋白 PARP 切割的影响

在证实 VB₂ 与 5-FU 联用能协同抑制结肠癌细胞增殖后, 需进一步探究背后的原因。因此通过 Western blot 分析联用药物作用下结肠癌细胞的死亡形式。

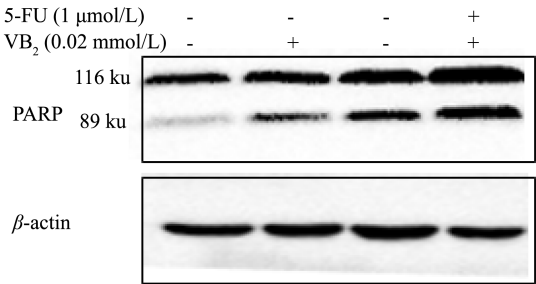


图 4 VB₂ 与 5-FU 联用对 PARP 蛋白切割的影响

Fig.4 Influence of combination of VB₂ and 5-FU on cutting

PARP protein

PARP 蛋白是细胞凋亡的标志性蛋白^[27], 它是一种 DNA 修复酶, 当细胞处于凋亡晚期时, 被激活的核酸内切酶会选择性地降解 DNA, 形成长度为 50~300 bp 的较大片段, 这些片段在核小体断裂成更小的寡核

昔酸片段^[27], 从而激活 PARP 被 Caspase 剪切, 其羧基端结构域和氨基端分离, 116 ku 裂解成 89 ku 和 24 ku, 因此 PARP 剪切通常被视为细胞发生凋亡的重要指标^[27]。

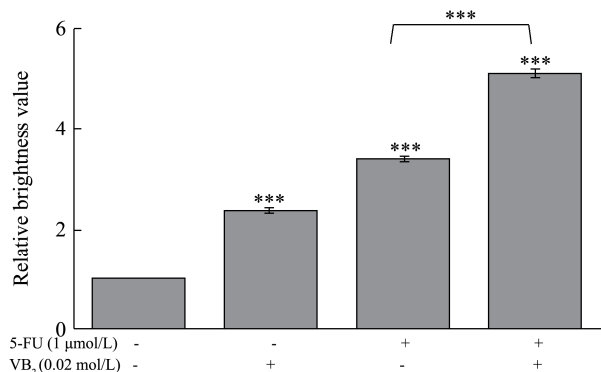


图5 VB₂与5-FU联用对PARP蛋白切割条带灰度值的影响

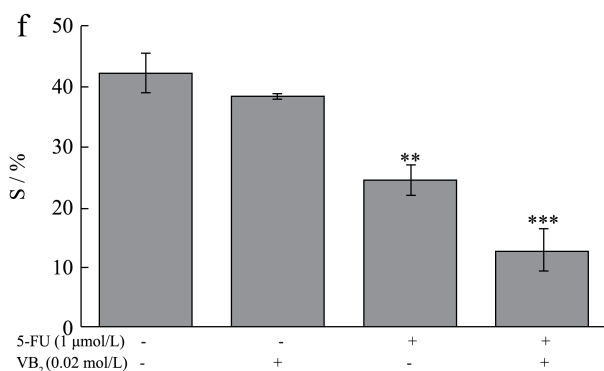
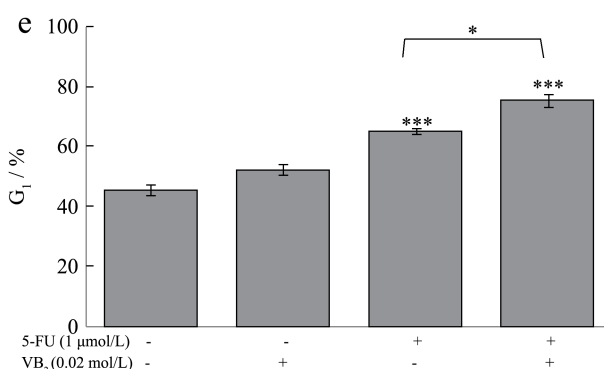
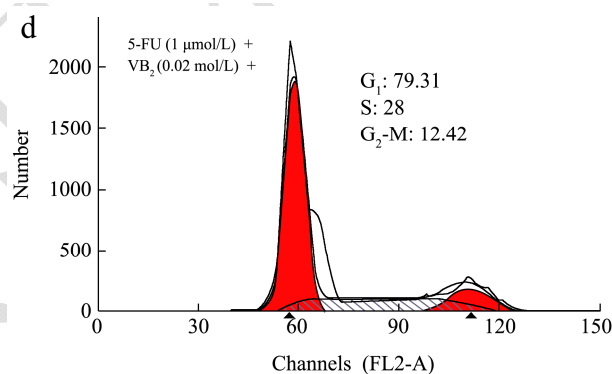
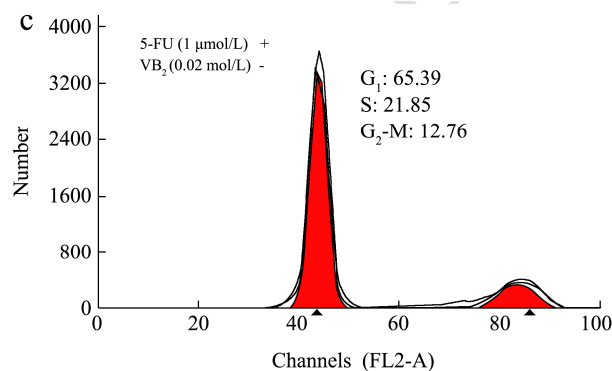
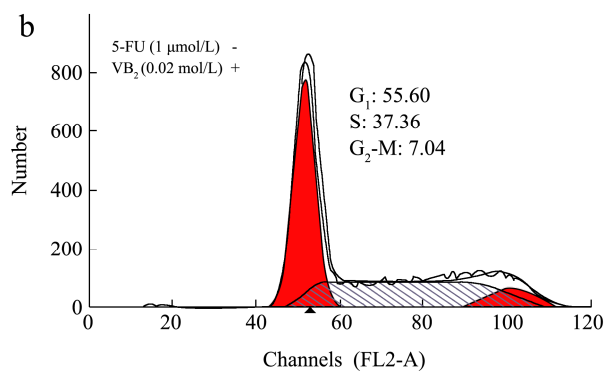
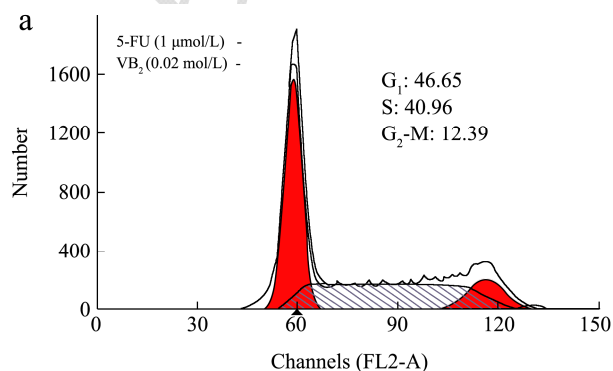
Fig.5 Effect of combination of VB₂ and 5-FU on brightness value of PARP cutting band

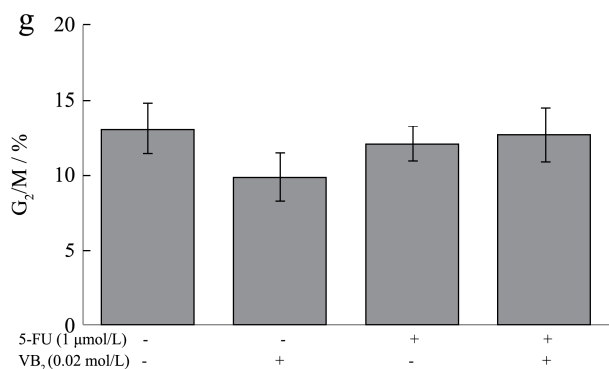
注: ***: $p < 0.001$ 。

Western blot 实验结果如图4、图5所示, VB₂和5-FU单独都能使PARP发生切割, 5-FU的切割条带更深, 两药联用后的切割条带比两组单用的条带均强。分析以上结果, 说明IC₅₀浓度下的VB₂和5-FU单用也具有促使结肠癌细胞凋亡的作用, 且5-FU作为抗癌药的作用更强, 联用VB₂后能够有效提高5-FU对结肠癌细胞的凋亡作用, 抑制肿瘤活性。

2.1.4 细胞流式PI单染实验检测VB₂与5-FU联用对细胞周期的影响

确定VB₂与5-FU联用能促进结肠癌细胞凋亡抑制癌细胞增殖后, 本研究通过细胞周期PI单染实验探究联用药物对周期的影响。细胞增殖需要进行细胞分裂, 这个分裂过程就是细胞周期, 包括两个准备阶段G₁、G₂期和功能阶段S期、M期, 过程为G₁期准备过渡到S期DNA合成然后G₂期准备到M期进行有丝分裂。因此如果癌细胞被抑制增殖, 则所处不同细胞周期的数量会发生变化。朱相展等人^[29]通过β-胡萝卜素对食管鳞癌EC1细胞周期的影响实验发现药物组细胞被阻滞在G₁期, 使得癌细胞增殖受到抑制。



图6 VB₂与5-FU对细胞周期的影响Fig.6 Effect of combination of VB₂ and 5-FU on cell cycle

注: a、b、c、d: 不同药物组细胞周期变化; e: 不同药物组 G₁ 期变化; f: 不同药物组 S 期变化; g: 不同药物组 G₂/M 期变化; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$ 。

如图6所示,随着VB₂的添加,5-FU对细胞G₁期阻滞作用明显加强,G₁期比例从65.39%上升到79.31%,且二者的差异具有统计学意义。药物组相比于空白对照组S期比例都有一定下降,其中5-FU和药物联用组均显著下降,联用组较5-FU组下降更多,但未达到统计学差异。这些说明,VB₂与5-FU联用能增强对结肠癌细胞C26 G₁期阻滞作用。

2.2 体内抗结肠肿瘤实验结果

2.2.1 VB₂与5-FU联用抑制荷瘤小鼠肿瘤体积增长

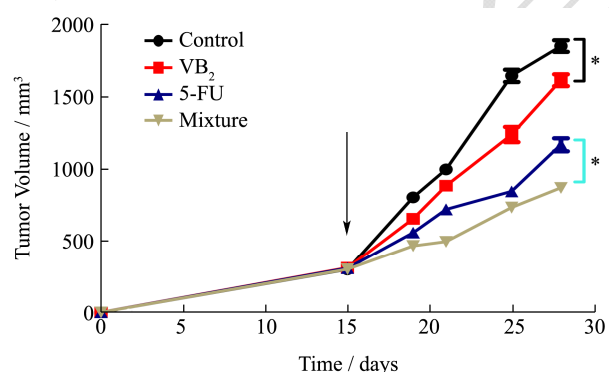


图7 不同组小鼠肿瘤体积生长曲线

Fig.7 Growing curves of tumor volume of different mice groups

注: *: $p<0.05$ 。

从图7可以看出,VB₂单独给药组和模型组相比肿瘤体积有差异且差异具有统计学意义,说明VB₂单独对结肠肿瘤体积生长具有抑制作用。联合用药组与单独VB₂用药组相比,肿瘤体积显著减小,而与单独5-FU用药组相比,肿瘤体积减小且差异具有统计学意义,说明与VB₂联合用药能增强5-FU对荷瘤小鼠肿瘤体积生长的抑制作用。

2.2.2 VB₂与5-FU联用对小鼠瘤重的影响

对小鼠体重定期测量,得到小鼠实验期间体重变化图。由图8可看出,药物处理后,小鼠体重增长速度急速下降,稳定两周后,药物联用组的体重和空白组接近,模型组不作药物处理,因为后期肿瘤体积增大,体重最大,与5-FU组相比,联用组肿瘤体积更小体重更轻。

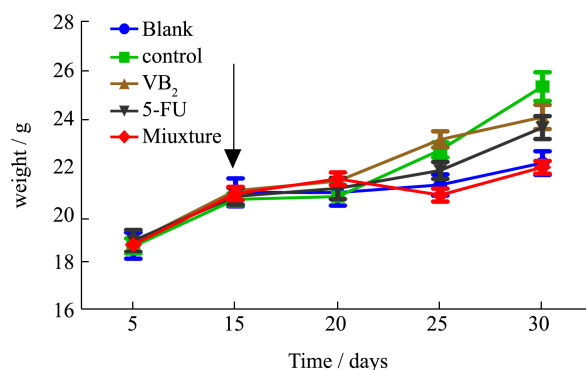


图8 不同组小鼠实验期间体重变化

Fig.8 Weight change of different mice groups during experiment

结合图9和表2对瘤体比指数与抑瘤率的比较,VB₂与5-FU联用后,瘤体比指数明显下降,且具有统计学意义,抑瘤率从51.53%±2.32%提高到76.18%±4.37%,说明VB₂与5-FU联用能协同抑制荷瘤小鼠结肠肿瘤生长,增强5-FU的体内抗肿瘤活性。

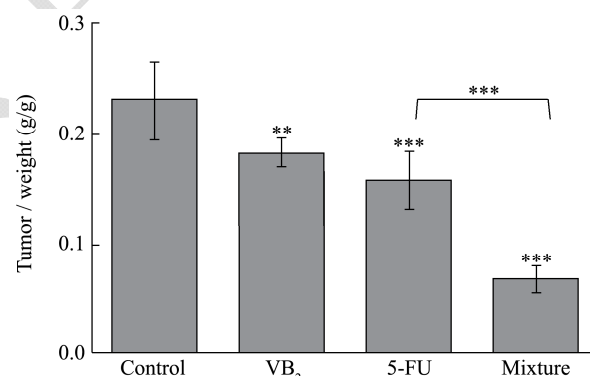


图9 不同组小鼠瘤体比指数

Fig.9 Rate of tumor/weight in different mice groups (mean±SD)

注: **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$ 。

表2 不同组 Balb/c 小鼠的抑瘤率

Table 2 The rate of tumor inhibition of different Balb/c mice

groups (mean±SD)		
组别	数量/只	抑制率/%
Control 组	8	-
VB ₂ 组	8	35.28±7.02***
5-FU 组	8	51.53±2.32***
Mixture 组	8	76.18±4.37***

注: ***: $p<0.001$ 。

2.2.3 VB₂与5-FU联用对免疫指数及血尿生

理生化指标的影响

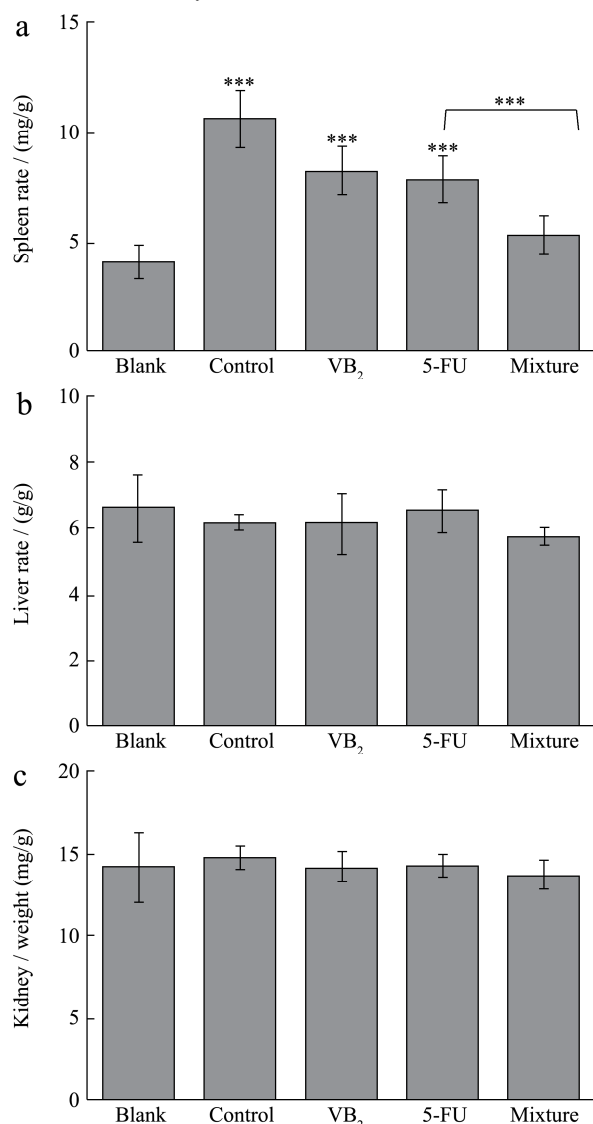


图10 不同组小鼠脾脏、肝脏指数以及肾脏指数

Fig.10 Spleen rate, liver rate and kidney rate of different mice groups (mean±SD)

注: ***: $p < 0.001$; a: 脾脏指数图; b: 肝脏指数图; c: 肾脏指数图。

Caryne M. Bertollo 等人^[29]报道, 通过给不同炎症模型的小鼠灌胃 VB₂, 高剂量的 VB₂ 能够缓解其炎症反应。Iftexhar Hassan 等人^[24]发现 VB₂ 是一种有潜力的物质可辅助顺铂药治疗, 可改变化疗产生的氧化应激状态, 减轻化疗给患者带来的毒性反应。因此本研究检测不同组小鼠的免疫相关指数, 如脾脏、肝脏指数, 以进一步探究 VB₂ 联合 5-FU 用药后对小鼠免疫能力的影响。结果如图 10a、b、c 所示, 模型组比空白组的脾脏指数增加明显, 说明肿瘤使小鼠的脾脏肿大引起强烈的炎症反应, 而药物组小鼠较模型组脾脏指数有所下降且联合用药组比 5-FU 单用组下降显著, 具有统计学意义, 说明 VB₂ 与 5-FU 联合用药可能具

有协同减轻肿瘤导致的脾脏肿大、减缓癌症的炎症反应的功能。而肝脏指数上, 各组小鼠并无统计学差异, 分析原因, 可能是因为在药物处理期间 VB₂ 与 5-FU 用药并未对荷瘤小鼠肝重有太大影响。

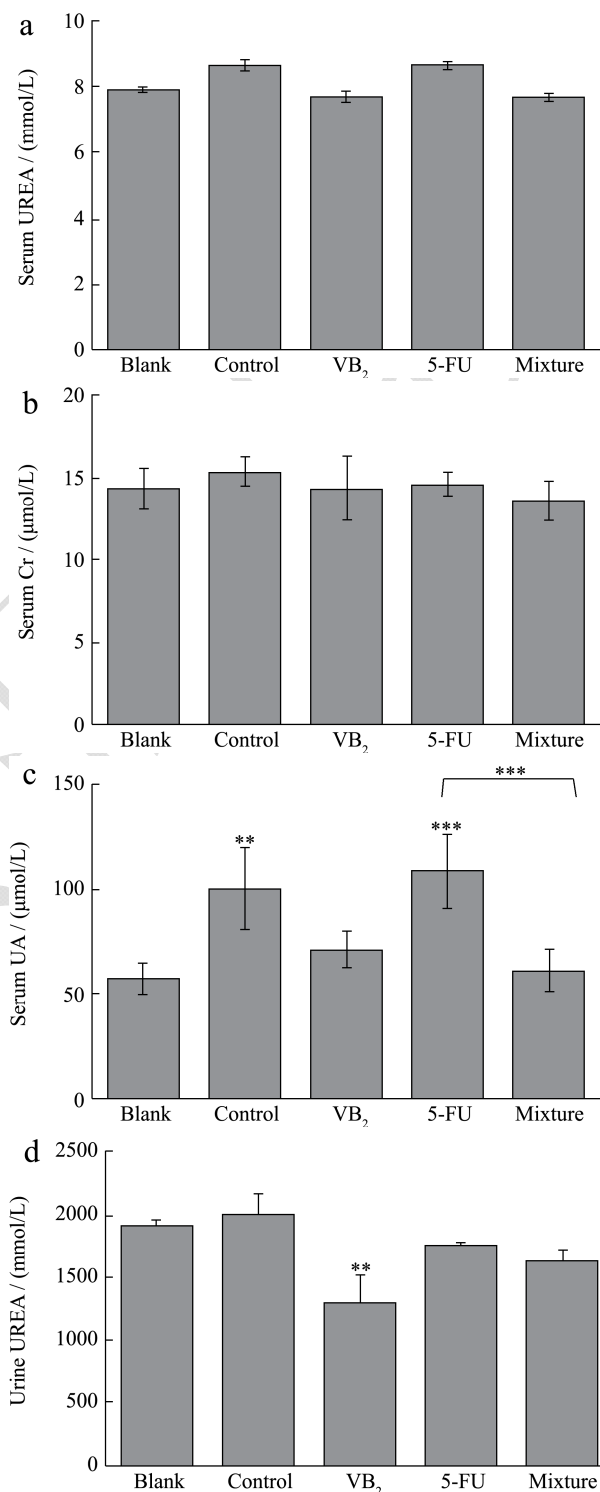


图11 不同组小鼠血尿中尿素氮、肌酐含量

Fig.11 UREA and Cr value of different mice groups in serum and urine

注: **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; a: 血液尿素氮含量; b: 血液肌酐含量; c: 血液尿酸含量; d: 尿液尿素氮含量。

另一方面, 中医治疗有报道, 给慢性肾炎水肿病人服用 VB₂ 辅助原有中药治疗 5 个月, 患者利尿消肿现象明显, 且未现副作用^[30]。所以本研究也对不同组小鼠肾脏能力相关指标进行比较, 探究 VB₂ 与 5-FU 联合用药对小鼠肾功能的影响。结果如图 10c 以及图 11, 肾重指数方面, 各组并无差异趋势, 血尿生化指标上, 药物组和空白组之间的血浆尿素氮 (Serum UREA)、肌酐 (Serum Cr) 含量无统计学差异, 尿液中尿素氮 (Urine UREA) 含量除了 VB₂ 单用组以外, 其他组小鼠并无统计学差异, 而血浆尿素氮和肌酐含量是表征肾小球滤过能力和肾脏功能的指标之一, 这说明药物并未对小鼠肾脏造成明显损伤。但是对于血浆尿酸 (Serum UA) 含量, 5-FU 组和模型组均较高, 而 VB₂ 单独用药组和药物联用组血浆尿酸含量相比之下显著降低, 联用组比 5-FU 单用组血浆尿酸含量明显降低, 且有统计学意义。临床上血浆尿酸偏高可能会引发痛风, 上述结果说明 VB₂ 与 5-FU 联用可能有协同降尿酸的作用。

3 结论

3.1 由于现代生活饮食习惯的改变, 近年来结直肠癌的患病率屡增不减, 单一抗癌药又存在疗效不高、易产生耐药性、毒副作用大的缺点。维生素是一种对人体较为安全毒副作用小的重要物质, 流行病学调查显示多种 B 族维生素摄入与结直肠癌的患病率相关。已有研究表明将维生素与抗癌药联用能提高抗癌药的疗效。

3.2 过去, VB₂ 主要被用来治疗口角炎, 现今多项研究发现 VB₂ 具有抗癌的潜力, 但是将 VB₂ 与 5-FU 联用治疗结肠癌的研究较少。本实验创新性地采用定量分析的手段评价 VB₂ 与 5-FU 体外抗结肠肿瘤活性的作用, 并用动物实验验证体外抗肿瘤的效果。体外实验中, 通过 MTT 细胞增殖实验分别确定 5-FU 和 VB₂ 对结肠癌细胞 C26 的 IC₅₀, 然后根据 Chou-Talalay Method 联合指数法运用 CompuSyn 软件计算联用的 CI (联合用药指数) 值, 结果显示, 当对癌细胞抑制率为 50% 及 90% 时相应的 CI 值分别为 0.52 和 0.13, 数值均小于 1 为协同作用。Western blot 实验进一步探究, 发现两药联用能增强癌细胞对 PARP 蛋白的切割, 促进癌细胞凋亡; 细胞流式周期实验结果显示药物联用后显著提高 G₁ 期细胞比例, 引起细胞 G₁ 期阻滞。但是本实验只探究了联用药物对凋亡特征蛋白 PARP 的作用, 具体联用药物背后的抗癌分子机制仍需后续实验探究。

3.3 体内动物实验探究 VB₂ 与 5-FU 联用对 Balb/c 荷

瘤小鼠的影响, 结果表明, VB₂ 与 5-FU 联用能抑制小鼠肿瘤体积生长, 且具有统计学意义。VB₂、5-FU 单用组瘤体比指数较模型组降低, 抑制了小鼠肿瘤活性, 并且联用后相比单用 5-FU 瘤体比指数下降明显, 具有统计学意义。计算各组小鼠肿瘤抑制率, 结果为: VB₂ 单用组 35.28%±7.02%, 5-FU 单用组为 51.53%±2.32%, 两药联用组比 5-FU 单用组抑制率提高到 76.18%±4.37%, 二者之间具有显著性差异, 因此 VB₂ 与 5-FU 联用具有协同抗体内肿瘤活性作用。此外, 5-FU 与 VB₂ 联用后能显著减轻脾脏肿大作用、缓解肿瘤引发的炎症反应, 并对小鼠肝肾能力未产生损伤, 副作用小。意外的是, VB₂ 与 5-FU 联用明显降低 5-FU 及肿瘤引发的尿酸升高, 且具有显著性差异。但是药物联用后对荷瘤小鼠的抗结肠肿瘤活性以及降尿酸作用背后的机制仍需要进一步验证探讨。

3.4 因此, 本实验研究结果说明 VB₂ 联合五氟对结肠癌细胞 C26 及 Balb/c 荷瘤小鼠具有协同抗肿瘤活性作用, 为今后提高 5-FU 抗结肠肿瘤活性减少毒副作用提供了新的方法, 同时为临床上给予癌症病人合理膳食建议提供理论参考。

参考文献

- [1] Yuk Kei Yee, Victoria P Y Tan, Pierre Chan, et al. Epidemiology of colorectal cancer in Asia [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009, 24(12): 1810-1816
- [2] Prescilla S Perera, Rachel L Thompson, Martin J Wiseman, et al. Recent evidence for colorectal cancer prevention through healthy food, nutrition, and physical activity: Implications for recommendations [J]. Current Nutrition Reports, 2012, 1(1): 44-54
- [3] Sharlene Gill, Charles L Loprinzi, Daniel J Sargent, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? [J]. Journal of Clinical Oncology, 2004, 22(10): 1797-1806
- [4] Bingna Cai, Hua Chen, Sun H, et al. Production of immunoregulatory polysaccharides from *Crassostrea hongkongensis* and their positive effects as a nutrition factor in modulating the effectiveness and toxicity of 5-FU chemotherapy in mice [J]. Food Function, 2016, 7: 390-397
- [5] Natalia W, Marcin Z, Andrzej K, et al. Vitamins B1、B2、B3 and B9-occurrence, biosynthesis pathways and functions in human nutrition [J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2017, 17: 1075-1111
- [6] N R Tavares, P A Moreira, T F Amaral. Riboflavin supplementation and biomarkers of cardiovascular disease in

- the elderly [J]. The Journal of Nutrition, Health and Aging, 2009, 13(5): 441-446
- [7] Mustafa Nazıroğlu, Ömer Çelik, Abdulhadi Cihangir Uğuz, et al. Protective effects of riboflavin and selenium on brain microsomal Ca^{2+} -ATPase and oxidative damage caused by glyceryl trinitrate in a rat headache model [J]. Biological Trace Element Research, 2015, 164(1): 72-79
- [8] 罗贤懋,崔剑峰.核黄素与癌症的预防[J].肿瘤防治与研究, 2006,33(7):543-548
LUO Xian-mao, CUI Jian-feng. Prevention of riboflavin and cancer [J]. Cancer Research and Prevention, 2006, 33(7): 543-548
- [9] 江岩,朱文艺,黄承钰,等.盐亭饮食及维生素对人食管癌细胞株生长增殖的影响[J].四川大学学报(医学版),2007, 38(4):624-628
JIANG Yan, ZHU Wen-yi, HUANG Cheng-yu, et al. Effects of Yanting diet and vitamins on growth and proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2007, 38(4): 624-628
- [10] 吴勇,余男彬.食管癌患者血浆及肿瘤组织中核黄素含量检测及其临床病理意义评估[J].海南医学院学报,2016,22(12): 1307-1310
WU Yong, YU Nan-bin. Detection of riboflavin in plasma and tumor tissues of patients with esophageal cancer and its clinical pathological significance [J]. Journal of Hainan Medical College, 2016, 22(12): 1307-1310
- [11] 穆艾太尔·麦提努日,玛依努尔·艾力.核黄素与胃癌[J].国际肿瘤学杂志,2015,42(7):706-709
METINU Mu Aitir, AI LI Ma Yinur. Riboflavin and gastric cancer [J]. International Journal of Oncology, 2015, 42(7): 706-709
- [12] Kabat G C, Miller A B, Jain M, et al. Dietary intake of selected b vitamins in major cancers in women [J]. British Journal of Cancer, 2008, 99(5): 816-821
- [13] Lanting Yu, Yuyan Tan, Lin Zhu. Dietary vitamin b2 intake and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis [J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2017, 295(3): 721-729
- [14] Karin Linnewiel-Hermoni, Marina Khanin, Michael Danilenko, et al. The anti-cancer effects of carotenoids and other phytonutrients resides in their combined activity [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 572: 28-35
- [15] Adeeb Shehzad, Fazli Wahid, Young Sup Lee. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials [J]. Archiv der Pharmazie, 2010, 343(9): 489-499
- [16] James M Smoliga, Joseph A Baur, Heather A Hausenblas. Resveratrol and health-a comprehensive review of human clinical trials [J]. Molecular Nutrition Food Research, 2011, 55(8): 1129-1141
- [17] Arroo Randolph R J, Beresford Kenneth, Bhambra Avninder S, et al. Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: towards a mechanistic model [J]. Phytochemistry Reviews, 2014, 13(4): 853-866
- [18] Milczarek M, Psurski M, Kutner A, et al. Vitamin D analogs enhance the anticancer activity of 5-fluorouracil in an *in vivo* mouse colon cancer mode [J]. BMC Cancer BMC Cancer, 2013, 13: 294-295
- [19] Stefan D V, Vasundhara Dindore, Manon van Engeland, et al. Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer [J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138: 2372-2378
- [20] Yeong S Y, Seungyoung J, Shuji O, et al. Vitamin B₂ intake and colorectal cancer risk: results from the nurses' health study and the health professionals follow-up study cohort [J]. International Journal of Cancer, 2016, 139: 996-1008
- [21] 姜敏,迟峰,吴荣.核黄素防治放射性口腔黏膜炎的疗效观察[J].实用药物与临床,2017,20(5):551-554
JIANG Min, CHI Feng, WU Rong. Observation on the efficacy of riboflavin in the prevention and treatment of radioactive oral mucositis [J]. Journal of Clinical Medicine and Clinic, 2017, 20(5): 551-554
- [22] 陈晓云,董静,张红.长效核黄素预防大剂量甲氨蝶呤化疗致口腔溃疡 31 例分析[J].中国误诊学杂志,2012,12(10): 2420
CHEN Xiao-yun, DONG Jing, ZHANG Hong. Analysis of 31 cases of oral ulcer induced by long-acting riboflavin in high dose methotrexate chemotherapy [J]. Chinese Journal of Misdiagnosis, 2012, 12(10): 2420
- [23] Ting-Chao Chou. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method [J]. Cancer Research, 2010, 57: 440-447
- [24] Iftkhar Hassan, Sandesh Chibber, Imrana Naseem. Vitamin B₂: A promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 59: 715-723
- [25] Iftkhar Hassan, Sandesh Chibber, Aijaz A Khan, et al. Riboflavin ameliorates cisplatin induced toxicities under photoillumination [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36273-e36281

现代食品科技