

特异乳酸菌对环磷酰胺抗人大肠癌HCT116细胞作用的影响^Δ

刘华清^{1*}, 林 蕤¹, 陈 永², 刘 睿¹, 黄 慧¹, 罗晓玲¹(1. 惠州市中医医院药学部, 广东惠州 516001; 2. 广东药学院附属第一医院药学部, 广州 510000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0047-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.15

摘要 目的: 研究特异乳酸菌(Lb-f)对环磷酰胺(CTX)体内外抗人大肠癌HCT116细胞作用的影响。方法: 体外培养HCT116细胞, MTT法考察4、2、1 μg/ml CTX与加入10 μg/ml Lb-f联用后对HCT116细胞存活率的影响。复制HCT116细胞异种移植瘤裸鼠模型, 考察100、50、25 mg/kg CTX与加入180 mg/kg Lb-f联用后对荷瘤鼠瘤体积、瘤质量及二者相对抑瘤率、化疗增敏效果(以 q 值表示)、外周血白细胞及血小板数量的影响。结果: 与单用CTX比较, CTX联用Lb-f对HCT116细胞的存活率, 对荷瘤裸鼠瘤体积相对抑瘤率、瘤质量相对抑瘤率和 q 值均无明显影响($P>0.05$), 能增加外周血白细胞及血小板数量($P<0.05$)。结论: Lb-f对CTX体内外HCT116细胞的抑制生长作用未见协同效应; 对CTX引起的HCT116细胞异种移植瘤裸小鼠外周血白细胞及血小板减少具有抑制作用。

关键词 特异乳酸菌; 环磷酰胺; 人大肠癌HCT116细胞; 裸小鼠; 细胞存活率; 抑瘤率

Effects of *Lactobacillus fermentum* on the Inhibition of Cytoxan on Human Colorectal Cancer HCT116 Cells

LIU Huaqing¹, LIN Rui¹, CHEN Yong², LIU Rui¹, HUANG Hui¹, LUO Xiaoling¹(1. Dept. of Pharmacy, Huizhou Hospital of TCM, Guangdong Huizhou 516001, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Lactobacillus fermentum* (Lb-f) on inhibition of cytoxan (CTX) on HCT116 cells of human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. METHODS: HCT116 cells were cultured *in vitro*. MTT assay was used to investigate the effects of 4, 2, 1 μg/ml CTX and combined with 10 μg/ml Lb-f on the survival rate of HCT116 cells. HCT116 cell xenograft tumor nude mice model was induced to investigate the effects of 100, 50, 25 mg/kg CTX and combined with 180 mg/kg Lb-f on tumor volume, tumor weight, relative tumor inhibition rate, the sensitization effect of chemotherapy (by q value), the number of peripheral blood leucocyte and platelet. RESULTS: Compared with CTX alone, CTX combined with Lb-f had no significant effect on survival rate of HCT116, relative inhibition rate of tumor volume in nude mice, relative inhibition rate of tumor weight and q value ($P>0.05$), but increased the number of peripheral blood leucocyte and platelet ($P<0.05$). CONCLUSIONS: No synergistic effects of Lb-f is found on the inhibition of CTX on the growth of HCT116 *in vitro* and *in vivo*; Lb-f can inhibit the decrease of peripheral blood leucocyte and platelet of HCT116 cell xenograft tumor nude mice induced by CTX.

KEYWORDS *Lactobacillus fermentum*; Cytoxan; Human colorectal cancer HCT116 cell; Nude mice; Survival rate; Inhibition rate

cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat [J]. *J Control Release*, 2012, 161(1): 132.

[8] Tang J, Zhang L, Liu Y, *et al.* Synergistic targeted delivery of payload into tumor cells by dual-ligand liposomes co-modified with cholesterol anchored transferrin and TAT [J]. *Inter J Pharm*, 2013, 454(1): 31.

[9] Gao H, Yang Z, Cao S, *et al.* Tumor cells and neo-vasculature dual targeting delivery for glioblastoma treatment [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2 374.

[10] Yin Y, Wu X, Yang Z, *et al.* The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension[J]. *Pharm Res*, 2013, 30(8): 2 050.

[11] Du W, Fan Y, Zheng N, *et al.* Transferrin receptor specific nanocarriers conjugated with functional 7peptide for

oral drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(3): 794.

[12] 肖瑶, 柳琳, 朱潇冉, 等. 转铁蛋白受体单克隆抗体OX26修饰的眼镜蛇神经毒素脂质体的制备及其对小鼠的镇痛作用研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(13): 1 827.

[13] Morgan MA, Sill MW, Fujiwara K, *et al.* A phase I study with an expanded cohort to assess the feasibility of intraperitoneal carboplatin and intravenous paclitaxel in untreated ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(2): 264.

[14] Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, *et al.* Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(6): 2 032.

[15] Tian L, Bae YH. Cancer nanomedicines targeting tumor extracellular pH[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.10.039.

(收稿日期: 2015-06-30 修回日期: 2015-09-14)

(编辑: 邹丽娟)

Δ 基金项目: 惠州市科技计划项目(No.2015Y107)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药学。电话: 0752-2189211。

E-mail: liuhuaqing3715@163.com

大肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,我国结肠直肠癌发病率由20世纪70年代初的12/10万增长到目前的56/10万,增速约为每年4.2%,远超2%的国际水平^[1]。目前由于其早期诊断率低、复发及转移率较高,且常用化疗药物存在疗效欠佳、选择性低、毒性较大等缺点,故除手术治疗外,对大肠癌的药物治疗联合日益受到重视^[2]。因此寻找能提高现有大肠癌化疗药物疗效、降低其毒性的药物成为新的发展方向。目前,生物免疫治疗因其独特的优势成为肿瘤最有前景的治疗模式^[3]。乳酸杆菌作为新型生物反应调节剂,有研究表明其具有多种抗肿瘤作用^[4-5],可降低大肠癌的发生率^[6],亦具有改善肠道及机体免疫的功能^[7-8]。特异乳酸菌(Lb-f)是乳酸杆菌中的一种,文献报道其对机体有免疫调节作用,对人大肠癌具有抑制作用^[9-10]。环磷酰胺(CTX)为目前抗大肠癌体内外实验常用药物之一。本研究以Lb-f及CTX为作用药物,人大肠癌HCT116细胞及其裸鼠异种移植瘤为作用对象,从体内外研究Lb-f与CTX联用时是否存在协同作用,体内研究Lb-f对CTX引起的移植瘤裸鼠外周血白细胞及血小板减少是否具有抑制作用,以便为Lb-f在人大肠癌化学药物治疗方面提供理论和试验依据。

1 材料

1.1 仪器

ELx800型光吸收酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); AU5800型生化检测仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 药品与试剂

Lb-f(长沙高新开发区吉本生物技术研究所,批号:20150328,规格:1×10¹⁰个活菌/g);CTX注射剂(齐鲁制药有限公司,批号:04150101,规格:每支0.2g)。

1.3 细胞与动物

人大肠癌HCT116细胞系由广东药学院药物研究所购于中国典型培养物保藏中心,置于10%胎牛血清RPMI 1640培养液中,37℃、5%CO₂培养,2~3d传代1次,取对数生长期细胞用于试验。Balb/c裸小鼠,4~6周龄,SPF级,♀,体质量为25~30g,购于中国科学院上海实验动物中心,实验动物使用合格证号:SYXK(沪)2004-2005。

2 方法

2.1 体外细胞存活率的检测

参考文献[11]运用MTT比色法对每组细胞存活率进行检测。取HCT116细胞按每孔1×10⁴个细胞接种于96孔培养板中,随机分为调零(生理盐水)组、溶剂对照[0.2%二甲基亚砜(DMSO)]组、阳性对照(4、2、1μg/ml CTX)组、试验(4、2、1μg/ml CTX+10μg/ml Lb-f)组,每组设3个复孔,处理48h,每孔加入5g/L的MTT液20μl(调零组除外),置于培养箱中继续培养4h后,以离心半径5cm、1000r/min离心5min,弃上清,每孔加入DMSO 100μl,振荡10min使紫蓝色沉淀充分溶解。用酶标仪在490nm波长处测定光密度(OD),计算细胞存活率(%)=给药组OD/溶剂对照组OD×100%。

2.2 异种移植瘤裸小鼠模型的建立

参考文献[12]建立HCT116细胞裸小鼠异种移植瘤模型。将培养的HCT116细胞用无菌磷酸盐缓冲液调整细胞密度为1×10⁷ml⁻¹,在45只裸小鼠背部皮下接种HCT116细胞(每只0.2ml),待出现肉眼可见移植瘤后,测量移植瘤最长径(L)和最短径(W),按公式 $V=L \times W^2 \times 0.52$ 计算瘤体积。待移植瘤体

积达100mm³左右时给药。

2.3 化疗效果的检测

取移植瘤裸小鼠24只,每组3只,按瘤体积和体质量均衡原则分为空白对照(生理盐水100mg/kg)组、阳性对照(100、50、25mg/kg CTX)组、药物对照(180mg/kg Lb-f)组、实验(100、50、25mg/kg CTX+180mg/kg Lb-f)组,ip相应药物,均隔日给药1次,共计给药9次。Lb-f剂量按人临床常用剂量换算,CTX低、中、高剂量按人临床常用剂量1、2、3倍换算。给药期间每5日测量1次L和W,计算瘤体积。末次给药48h后测定移植瘤体积;脱颈臼处死裸小鼠,切除移植瘤,称瘤质量。计算抑瘤率(%)=(1-给药组均值/空白对照组均值)×100%和相对抑瘤率(%)=(1-实验组均值/相应浓度阳性对照组均值)×100%。按金氏公式计算q值,以此评价化疗增敏作用, $q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a E_b)$,其中E_{a+b}为两药合用抑制率,E_a和E_b为各药单用的抑制率,q>1时,表示两药有协同作用。

2.4 外周血白细胞及血小板的数量测定

取移植瘤裸小鼠21只,每组3只,按瘤体积和体质量均衡原则分为空白对照(生理盐水100mg/kg)组、阳性对照(100、50、25mg/kg CTX)组、实验(100、50、25mg/kg CTX+180mg/kg Lb-f)组,ip相应药物,隔日给药1次,共计给药9次。给药期间每5日称量裸小鼠体质量1次;末次给药48h后摘除眼球采血1.0ml,取20μl血按常规法在显微镜下用血细胞计数板行外周白细胞及血小板计数。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 14.0软件进行统计学分析。经正态性检验和方差齐性检验满足正态分布和方差齐同后作单因素方差分析,组间差异用SNK方法检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率变化

与溶剂对照组比较,单用CTX和CTX联用Lb-f均能降低HCT116细胞的存活率(P<0.05)。与单用CTX比较,相应剂量的CTX联用Lb-f对HCT116细胞的存活率无明显影响(P>0.05)。各组细胞存活率的测定结果见表1。

表1 各组细胞存活率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 The survival rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	OD值	细胞存活率,%
0.2%DMSO	1.16±0.02	
4 μg/ml CTX	1.05±0.03*	9.77±1.80
2 μg/ml CTX	0.89±0.02*	23.57±1.52
1 μg/ml CTX	0.78±0.04*	33.03±2.30
10 μg/ml Lb-f+4 μg/ml CTX	1.05±0.02*	9.50±0.30
10 μg/ml Lb-f+2 μg/ml CTX	0.88±0.03*	23.53±2.35
10 μg/ml Lb-f+1 μg/ml CTX	0.78±0.02*	32.77±1.05

注:与0.2%DMSO比较,*P<0.05

Note: vs. 0.2%DMSO,*P<0.05

3.2 化疗效果

与生理盐水比较,单用CTX与CTX联用Lb-f均能抑制荷瘤裸小鼠移植瘤的生长(P<0.05或P<0.01)。与单用CTX比较,相应剂量的CTX联用Lb-f对荷瘤裸小鼠的瘤体积相对抑瘤率、瘤质量相对抑瘤率和q值均无明显差异(P>0.05)。各组荷瘤裸小鼠瘤体积、瘤质量、相对抑制率及q的测定结果见表2。

表2 各组荷瘤裸小鼠瘤体积、瘤质量、相对抑制率及q的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of the tumor volume, tumor weight, relative inhibition rate and q value of tumor-bearing nude mice in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	体积				质量			
	瘤体 积,mm ³	抑瘤 率,%	相对抑 瘤率,%	q	瘤质 量,mg	抑瘤 率,%	相对抑 瘤率,%	q
生理盐水	575±103				285±56			
100 mg/kg CTX	48±11**	91.7			42±9**	85.3		
50 mg/kg CTX	218±51**	62.1			88±21**	69.1		
25 mg/kg CTX	366±79**	36.4			175±35**	38.6		
180 mg/kg Lb-f	516±92 [†]	10.3			256±47 [†]	10.2		
180 mg/kg Lb-f+100 mg/kg CTX	45±14**	92.2	6.3	0.926	40±8**	86.0	4.8	0.991
180 mg/kg Lb-f+50 mg/kg CTX	209±41**	63.7	4.1	0.965	82±19**	71.2	6.8	0.985
180 mg/kg Lb-f+25 mg/kg CTX	348±66**	39.5	4.9	0.920	167±28**	41.4	4.6	0.923

注:与生理盐水比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal saline, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.3 外周血白细胞及血小板数量变化

与单用CTX比较,相应剂量的CTX联用Lb-f能增加荷瘤裸小鼠的外周血白细胞及血小板数量($P<0.05$)。各组荷瘤裸小鼠外周血白细胞及血小板数量的测定结果见表3。

表3 各组荷瘤裸小鼠外周血白细胞及血小板数量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of the number of peripheral blood leucocyte and platelet of tumor-bearing nude mice in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	白细胞计数($\times 10^9 L^{-1}$)	血小板计数($\times 10^9 L^{-1}$)
生理盐水	7.15±0.76	556±163
100 mg/kg CTX	3.84±0.89	405±127
50 mg/kg CTX	5.40±1.40	485±149
25 mg/kg CTX	6.21±1.85	542±165
180 mg/kg Lb-f+100 mg/kg CTX	4.87±1.40 [†]	467±137 [†]
180 mg/kg Lb-f+50 mg/kg CTX	6.05±1.82 [†]	565±162 [†]
180 mg/kg Lb-f+25 mg/kg CTX	6.83±1.81 [†]	601±126 [†]

注:与同剂量CTX单用比较,* $P<0.05$

Note: vs. CTX with same dose, * $P<0.05$

4 讨论

通过MTT比色法测定各组HCT116细胞存活率,结果显示,与溶剂对照组比较,其他各加药组都不同程度抑制了HCT116细胞的生长,且具有显著性差异($P<0.05$);但Lb-f联用CTX与单用CTX比较,两者对HCT116细胞存活率的差异无统计学意义($P>0.05$),表明Lb-f对CTX体外抑制人大肠癌HCT116细胞生长作用未见确定性协同效应。

通过建立HCT116细胞裸小鼠异种移植瘤模型,给予不同处理后,与空白对照组比较,其余各组都不同程度抑制了HCT116细胞在裸小鼠体内的生长($P<0.05$ 或 $P<0.01$);但Lb-f联合CTX与单用CTX比较,两者对HCT116细胞在裸小鼠体内生长的抑制作用差异无统计学意义($P>0.05$),表明Lb-f与CTX联用未见协同抑瘤作用。

骨髓抑制通常发生在化疗后,因粒细胞平均生存时间最短,约为6~8 h,因此骨髓抑制常最先表现为白细胞下降;血小板平均生存时间约为5~7 d,其下降出现较晚较轻;而红细胞平均生存时间为120 d,受化疗影响较小,下降通常不明显。CTX的骨髓抑制以白细胞下降为主,可伴有血小板下降^[13-14]。

有文献报道,放化疗前应用嗜酸乳酸杆菌可保护造血干细胞,使内源性脾脏集落刺激形成单位提高3.4~6.7倍,并减轻由放化疗所致的骨髓抑制或白细胞减少,同时不影响放化疗效果^[15]。故本研究在建立HCT116细胞异种移植瘤模型后,通过检测白细胞和血小板的计数比较各组骨髓抑制的差异。结果显示,Lb-f与不同剂量CTX联用比单用CTX时出现的白细胞下降、血小板减少等毒性反应较轻($P<0.05$)。本实验表明,Lb-f对CTX引起的人大肠癌HCT116细胞异种移植荷瘤鼠外周血白细胞及血小板降低具有抑制作用。

综上所述,Lb-f对CTX体内外HCT116细胞的抑制生长作用未见协同效应;对CTX引起的HCT116细胞异种移植瘤裸小鼠外周血白细胞及血小板减少具有抑制作用。

参考文献

- [1] 邓银香,高洪涛,舒鹏.转移性大肠癌的内科治疗进展[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(3):221.
- [2] 肖冰,王媛媛.大肠癌的药物治疗[J].胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(3):206.
- [3] 逯彩虹,李保红,周艾琳,等.乳酸杆菌增强树突状细胞诱导的CTL细胞抗宫颈癌移植瘤作用[J].第三军医大学学报,2011,33(16):1764.
- [4] 袁起伟,郝凤奇,杨文涛,等.乳酸菌抗肿瘤作用的研究进展[J].食品科学,2011,32(9):303.
- [5] 王青元,周颖,凌斌.乳酸杆菌及其体外表达系统在临床中的应用及其前景[J].医学综述,2011,17(17):2561.
- [6] 万莹.乳酸杆菌发酵液对人结肠癌细胞的抑制作用及其机理[D].大连:大连医科大学,2012.
- [7] 张婵,文姝,唐立.乳酸杆菌发酵滤液中核酸抗肿瘤效应及对荷瘤鼠免疫功能的影响[J].中国微生物学杂志,2011,23(7):577.
- [8] 陈招雨,陈运彬,王艳丽,等.口服干酪乳酸杆菌对新生小鼠TH17细胞的影响及其免疫调节机制的研究[J].中国新生儿科杂志,2013,28(3):195.
- [9] 冯少敏,夏红.特异乳酸菌对机体免疫调节作用的研究[J].临床医学,2010,30(7):102.
- [10] 唐三元,曹建国,徐阳炎,等.免疫调节介导特异乳酸杆菌抑制人结肠癌裸鼠异种移植瘤生长[J].美国中华临床医学杂志,2006,8(1):38.
- [11] 张艳霞,吴勇杰,李文广.蛇葡萄素钠协同卡铂对人肺癌GLC-82细胞增殖的抑制作用[J].中国药房,2015,26(4):488.
- [12] 贾倩倩,朱艳,龙海波,等.小白菊内酯对核转录因子κB的抑制作用及相关动物模型的研究进展[J].中国药房,2012,23(47):4500.
- [13] 武迎磊,崔向丽,袁耀辉,等.抗肿瘤药物引起骨髓抑制的预防及治疗[J].药品评价,2010,7(14):30.
- [14] 程诗迪,娄世锋.利妥昔单抗联合氟达拉滨、环磷酰胺治疗慢性淋巴细胞白血病的临床观察[J].中国药房,2014,25(28):2631.
- [15] 托娅,张和平.乳酸杆菌Lactobacillus casei. Zhang的抗肿瘤作用及机制[J].分子诊断与治疗杂志,2010,2(6):394.

(收稿日期:2015-09-01 修回日期:2015-10-28)

(编辑:邹丽娟)