

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.12.1355

· 论 著 ·

金雀异黄素与5-氟尿嘧啶联用对肝癌的化疗增敏作用

郭玉玲¹, 颜裴松², 宋立华^{1*}

1. 上海交通大学农业与生物学院食品科学与工程系, 上海 200240

2. 复旦大学基础医学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过体内和体外实验, 探讨金雀异黄素 (Gen) 与5-氟尿嘧啶 (5-FU) 联用对肝癌的化疗增敏效果。**方法** 体外实验中根据干预方法分别将人肝癌细胞株 Bel-7404、SMMC-7721 和 HepG2 分为溶剂对照 (NC) 组、10 μmol/L Gen 处理组、2 μmol/L 5-FU 处理组及 Gen+5-FU 联合处理组, 利用 CCK-8 法及流式细胞技术研究 Gen 与 5-FU 联用对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。体内实验分别构建 Bel-7404 肿瘤细胞系异种移植 (CDX) 和 Liver-0117 人源肿瘤组织异种移植 (PDX) 裸小鼠模型, 然后将荷瘤裸小鼠模型分为 4 组: NC 组、Gen 处理组、5-FU 处理组和 Gen+5-FU 联合处理组, 观察不同剂量 Gen 与 5-FU 单独或联合处理肝癌模型对肿瘤生长的影响。**结果** 在处理 24、48、72 h 后, Gen+5-FU 联合处理组 Bel-7404、SMMC-7721 和 HepG2 细胞增殖率均低于 NC 组、Gen 处理组及 5-FU 处理组 (P 均 <0.01); 处理 72 h 后 Gen+5-FU 联合处理组 Bel-7404、SMMC-7721 和 HepG2 细胞凋亡率均高于 NC 组、Gen 处理组及 5-FU 处理组 (P 均 <0.01)。对于 Bel-7404 荷瘤裸小鼠, 给药 28 d 后 NC 组、Gen (15 mg/kg) 处理组、5-FU (30 mg/kg) 处理组、Gen (15 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组肿瘤相对体积 (RTV) 分别为 15.35 ± 2.92 、 17.51 ± 3.11 、 12.93 ± 4.88 、 13.67 ± 3.54 , 组间差异无统计学意义 ($F=1.822$, $P>0.05$); 提高 Gen 剂量至 40 mg/kg 干预 21 d 后, Gen (40 mg/kg) 处理组的 RTV 低于 NC 组 (9.73 ± 5.85 vs 17.54 ± 5.06), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对于 PDX 模型 Liver-0117 荷瘤裸小鼠, 给药 18 d 后, Gen (15 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组的 RTV 低于 5-FU (30 mg/kg) 处理组 (12.64 ± 0.92 vs 18.76 ± 0.68), 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 相对肿瘤抑制率 (T/C) 为 0.576。**结论** Gen 与 5-FU 联用在体表现出较好的化疗增敏效果, 但对于不同荷瘤裸小鼠模型其增敏效果不同。

[关键词] 金雀异黄素; 5-氟尿嘧啶; 化疗增敏作用; 肝细胞癌

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)12-1355-07

Chemosensitization effects of genistein combined with 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma

GUO Yu-ling¹, YAN Pei-song², SONG Li-hua^{1*}

1. Department of Food Science & Technology, Shanghai Jiao Tong University School of Agriculture and Biology, Shanghai 200240, China

2. School of Basic Medicine, Fudan University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the chemosensitization effects of genistein (Gen) combined with 5-fluorouracil (5-FU) on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Methods** In the *in vitro* experiments, human hepatocellular carcinoma cell lines (Bel-7404, SMMC-7721 and HepG2) were used in negative control (NC) group, Gen group (10 μmol/L), 5-FU group (2 μmol/L) as well as Gen+5-FU group according to the intervention methods. The effects of Gen combined with 5-FU on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells were analyzed by cell counting kit 8 (CCK-8) method and flow cytometry. Bel-7404 cell line-derived xenograft (CDX) and Liver-0117 patient-derived xenograft (PDX) mouse models were constructed *in vivo*. Then the tumor-bearing mouse models were divided into 4 groups: NC group, Gen group, 5-FU group and Gen+5-FU group. The effects of different treatment methods on tumor growth were observed. **Results** The proliferation rates of Bel-7404, SMMC-7721 and HepG2 cells in the Gen+5-FU group were significantly lower than those in the Gen group and 5-FU group (all $P<0.01$) after 24, 48 and 72 h of treatment; the average apoptosis rates of these cells were significantly higher in the Gen+5-FU group than in the NC group, Gen group and 5-FU group after 72 h of culture (all $P<0.01$). The relative tumor volumes (RTVs) of the Bel-7404 CDX tumor-bearing mice in the NC group, Gen (15 mg/kg) group, 5-FU (30 mg/kg) group and Gen (15 mg/kg)+5-FU (20 mg/kg) group 28 d after administration were 15.35 ± 2.92 , 17.51 ± 3.11 , 12.93 ± 4.88 and 13.67 ± 3.54 , respectively, showing no significant difference ($F=1.822$, $P>0.05$); after

[收稿日期] 2020-09-29

[接受日期] 2021-03-04

[作者简介] 郭玉玲, 硕士生. E-mail: guo200611301@foxmail.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-34206919, E-mail: lihuas@sjtu.edu.cn

increasing the dose of Gen to 40 mg/kg for 21 d, the RTV of the Gen (40 mg/kg) group was significantly lower than that of the NC group (9.73 ± 5.85 vs 17.54 ± 5.06 , $P < 0.05$). The RTV of the Liver-0117 PDX tumor-bearing mice in the Gen (15 mg/kg)+5-FU (20 mg/kg) group 18 d after administration was significantly lower than that in the 5-FU (30 mg/kg) group (12.64 ± 0.92 vs 18.76 ± 0.68 , $P < 0.05$), and the ratio of RTV between treatment group and control group was 0.576. **Conclusion** Gen combined with 5-FU shows good chemosensitization effects *in vitro*, which are varied on different models of tumor-bearing mice.

[**Key words**] genistein; 5-fluorouracil; chemosensitization; hepatocellular carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(12): 1355-1361]

2018年统计数据显示,肝癌已成为全球第四大癌症死因,每年约有84.1万例新增病例和78.2万例患者死亡^[1]。我国是肝癌大国,肝癌病例近全球病例总数一半,发病率及死亡率均很高^[2],严重威胁我国人民的健康。由于肝癌早期诊断困难,大多数肝癌患者确诊时已属晚期,能够手术治疗的患者术后也易复发。全身化疗是治疗晚期肝癌的主要手段之一^[3]。

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是治疗胃肠道恶性肿瘤、肝癌、卵巢癌、膀胱癌等常用的化疗药物^[4],研究显示其临床疗效不乐观,治疗失败的主要原因在于肝癌获得性耐药的产生^[5];增加5-FU的使用剂量会加重不良反应^[4]。因此,将5-FU与天然植物抗肿瘤活性成分联合应用,是否可在同样或较低剂量下既能减轻患者的不良反应又提高治疗效果,值得进一步研究。

金雀异黄素(genistein, Gen)是大豆中一类具有广泛营养学价值和健康保护作用的多酚化合物,具有抗炎、抗氧化、降血脂及抗癌等多种活性^[6-9],研究表明其对前列腺癌、乳腺癌、结肠癌及胃癌等患者具有一定的抗肿瘤作用^[10-12]。在肝癌的治疗方面,已有体外研究发现Gen作为一种化学预防和/或化疗药物对肝癌有效^[13-14];体内研究表明Gen(15 mg/kg)可激活肝癌大鼠caspase 3的活性,并降低增殖细胞核抗原水平^[15]。我们前期将Gen与放疗联用,发现其在不同剂量下分别具有辐射防护及放疗增敏作用^[16-17]。体外研究证明,将Gen与5-FU联合应用于结肠癌可协同抑制结肠癌细胞的生长^[18],但Gen与5-FU联用对肝癌的作用效果报道不多。本研究通过体外和体内实验,观察Gen与5-FU联合应用对肝癌细胞株与荷瘤小鼠的干预效果,为将其应用于肝癌治疗、增强肝癌化疗效果提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 PBS和DMEM购自上海博光

生物科技有限公司, FBS购自美国ThermoFisher Scientific公司, CCK-8试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司, Gen(纯度 $\geq 97\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 膜联蛋白V/PI凋亡试剂购自美国BD公司, 5-FU购自上海旭东海普药业有限公司, DMSO购自美国Sigma公司。

Varioskan Flash型多功能酶标仪购自美国ThermoFisher Scientific公司, MACSQUANT型流式细胞仪购自德国Miltenyi Biotech公司, NAPCO6500细胞培养箱购自基因有限公司, SZX16体视荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 细胞与动物 人肝癌Bel-7404、SMMC-7721和HepG2细胞株由中国科学院细胞库提供,用含10% FBS的DMEM培养。6~8周龄SPF级雌性BALB/c裸小鼠,体重18~20 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供[实验动物生产许可证号SCXK(沪)2013-0016]。人源肝癌Liver-0117模型肿瘤组织由上海药明康德新药开发有限公司提供。

1.3 药物配制 Gen储备液:用DMSO溶解Gen配制得到储备液(2 g/mL),使用前以生理盐水稀释,DMSO的终浓度应低于0.4%。5-FU储备液:母液质量浓度为25 mg/mL,使用前以无菌生理盐水稀释,即用即配,如有必要可进行过滤除菌。

1.4 细胞形态观察 按每孔 1×10^5 个细胞的密度将Bel-7404、SMMC-7721和HepG2细胞分别接种于6孔板。将不同药物加入培养基中,并根据药物干预方式分为溶剂对照组(NC组)、10 $\mu\text{mol/L}$ Gen处理组、2 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU处理组及Gen+5-FU联合处理组。干预72 h后分别在光镜下观察细胞形态。

1.5 细胞增殖率检测 将对数生长期细胞接种至96孔板($2 \times 10^4/\text{mL}$),分为NC组、Gen处理组、5-FU处理组及Gen+5-FU联合处理组,每组细胞接种5个复孔。细胞贴壁后除去培养板中的原有培养基,每孔加入200 μL 新培养基,然后将待测药物

加入各对应孔内: Gen 处理组和 Gen+5-FU 联合处理组分别加入 Gen 至其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$; 5-FU 处理组和 Gen+5-FU 联合处理组分别加入 5-FU 至其最终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$; NC 组加入等量 DMSO。

处理 24、48、72 h 后除去细胞培养板内培养基, 加入 100 μL 含 CCK-8 试剂的培养基, 继续培养 1.5 h, 分别测定波长 450 nm 和 630 nm 处的光密度 (D) 值。实验重复 3 次, 计算不同药物干预后细胞的增殖率。

1.6 细胞凋亡分析 将处于对数生长期的细胞接种至 6 孔板 ($5 \times 10^4/\text{mL}$), 分组及药物处理同 1.4 节。处理 72 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制备成单细胞悬液, 800 $\times g$ 离心 5 min 后去上清, 重复 1 次。洗涤后, 将细胞重悬于适当体积的结合缓冲液中制成 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液。取 100 μL 的细胞悬液 (约 1.5×10^5 个细胞), 加入 0.5 μg 膜联蛋白 V 轻轻混匀, 在室温下避光静置孵育 15 min, 加入 5 μL 的 PI 轻轻混匀, 在室温下避光放置 5 min 后加入 400 μL 结合缓冲液, 快速用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.7 Gen 与 5-FU 联用对 Bel-7404 荷瘤裸小鼠的药效检测 用 PBS 制备对数生长期的 Bel-7404 细胞悬液 ($3 \times 10^7/\text{mL}$), 取 0.1 mL 皮下接种于 BALB/c 裸小鼠右后背部, 建立人源肝癌 Bel-7404 肿瘤细胞系异种移植 (cell line-derived xenograft, CDX) 模型。

肿瘤细胞接种入裸小鼠皮下第 11 天后 (给药当天), 测量并选取荷瘤体积适宜的裸小鼠 (肿瘤平均体积为 100~125 mm^3), 随机分为 4 组 ($n=6$): NC 组, 给予含 0.4% DMSO 的生理盐水 (10 mL/kg), 每天 1 次; Gen 处理组 (进行 2 次实验, 给药剂量分别为 15、40 mg/kg), 每天 1 次; 5-FU 处理组 (2 次实验给药剂量分别为 30、20 mg/kg), 每周给药 2 次; Gen+5-FU 联合处理组, Gen 给药剂量及次数同单独处理组, 5-FU 给药剂量均为 20 mg/kg, 给药次数同单独处理组。4 组均腹腔注射给药, 2 次实验分别连续给药 28、21 d。

1.8 Gen 与 5-FU 联用对人源肿瘤组织异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型 Liver-0117 异源移植肿瘤裸小鼠的药效检测 人源肝癌 Liver-0117 模型的建立最初来源于外科手术切除的

临床肿瘤组织样本, 将 20~30 mm^3 肿瘤组织块皮下接种于小鼠右后背部, 建立人源肝癌 Liver-0117 皮下移植 PDX 小鼠模型。

肿瘤组织接种入裸小鼠皮下第 15 天 (给药当天), 测量并选取荷瘤体积适宜的裸小鼠 (肿瘤平均体积为 95 mm^3), 随机分为 4 组 ($n=3$): NC 组, 腹腔注射含有 0.4% DMSO 的生理盐水; Gen 处理组, Gen 给药剂量为 15 mg/kg; 5-FU 处理组, 5-FU 给药剂量为 30 mg/kg; Gen+5-FU 联合处理组, Gen 给药剂量为 15 mg/kg, 5-FU 给药剂量为 20 mg/kg; 给药次数及方式同 1.7 节, 连续给药 18 d。

1.9 肿瘤体积及抑制率计算 在给药治疗期间, 每周测量 2 次动物的体重和荷瘤体积大小, 用电子数显游标卡尺测量皮下移植瘤体的长径 (a) 和宽径 (b), 计算肿瘤体积: 肿瘤体积 (V) = $0.5a \times b^2$ 。末次给药 2 h 后, 采用注射 CO_2 安乐死法处死小鼠, 完整剥取肿瘤组织, 称重后拍照。根据实验终点时数据计算各组的肿瘤生长抑制率。肿瘤相对体积 (relative tumor volume, RTV) = 给药后某天的肿瘤体积 / 给药当天肿瘤体积。相对肿瘤抑制率 (T/C) = 治疗组 RTV / 对照组 RTV。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用最小显著性差异法或 Games-Howell 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Gen 和 5-FU 联用对 3 种人肝癌细胞形态的影响 光学倒置显微镜下观察各组给药 72 h 后 Bel-7404、SMMC-7721 及 HepG2 肝癌细胞形态, 可见 NC 组细胞边界清晰, 形态均一, 呈较明显的多边形, 形状规则; 而 Gen 处理组、5-FU 处理组和 Gen+5-FU 联合处理组细胞边界均较模糊, 逐渐出现变圆、皱缩及溶解和死亡或凋亡现象。见图 1。

2.2 Gen 和 5-FU 联用对 3 种人肝癌细胞增殖率的影响 如图 2 所示, 3 种肝癌细胞在处理 24、48、72 h 后, 3 个药物干预组的细胞增殖率均低于 NC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Gen+5-FU 联合处理组细胞增殖率均低于 Gen 处理组和 5-FU 处理组 (P 均 < 0.01)。

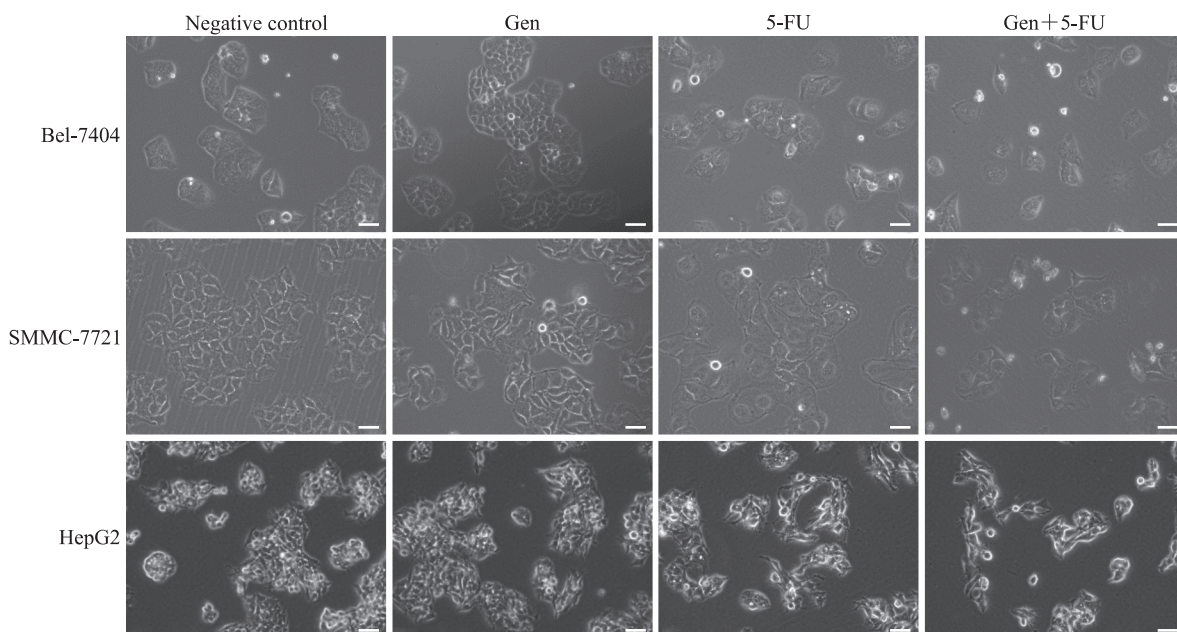


图1 Gen与5-FU联用对肝癌细胞Bel-7404、SMMC-7721和HepG2形态的影响

Fig 1 Effect of Gen combined with 5-FU on morphology of hepatocellular carcinoma cells Bel-7404, SMMC-7721 and HepG2

Scale bar=50 μm. Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil.

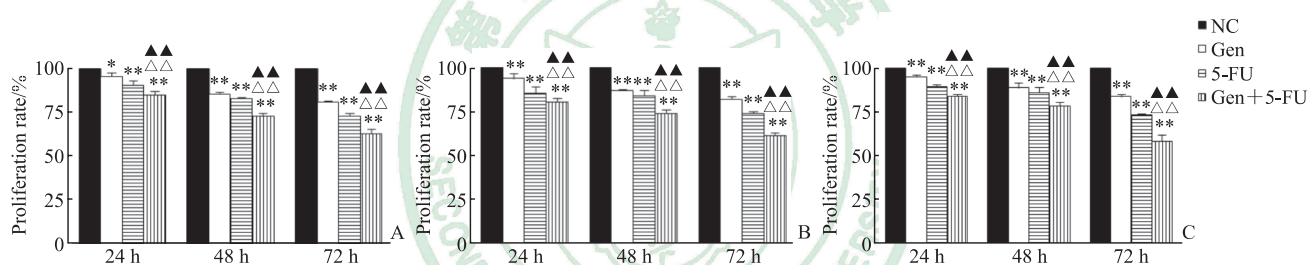


图2 Gen与5-FU联合干预不同时间对肝癌细胞Bel-7404(A)、SMMC-7721(B)和HepG2(C)增殖率的影响

Fig 2 Effect of Gen combined with 5-FU on proliferation rate of hepatocellular carcinoma cells

Bel-7404 (A), SMMC-7721 (B) and HepG2 (C) at different time points

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs Gen group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 5-FU group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. NC: Negative control; Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil.

2.3 Gen和5-FU联用对3种人肝癌细胞凋亡的影响 如图3所示,处理72 h后Gen+5-FU联合处理组3种肝癌细胞的凋亡率均高于NC组、Gen

处理组及5-FU处理组(P 均 < 0.01),表明Gen与5-FU联用能显著促进肝癌细胞凋亡。

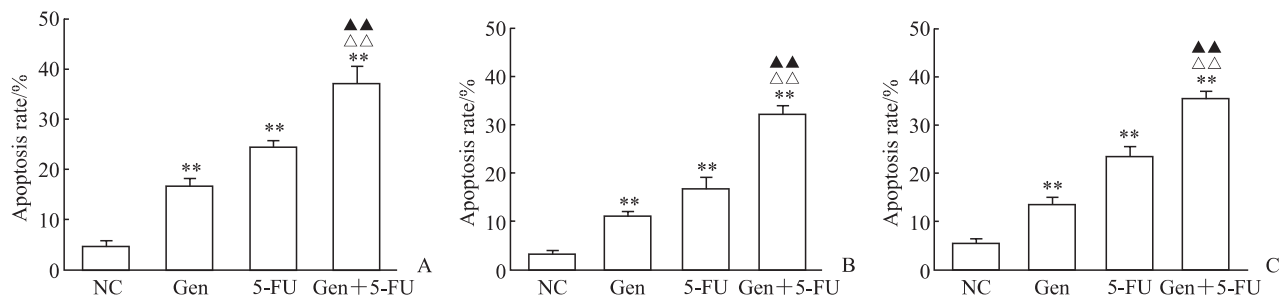


图3 Gen与5-FU联用对肝癌细胞Bel-7404(A)、SMMC-7721(B)和HepG2(C)凋亡的影响

Fig 3 Effect of Gen combined with 5-FU on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells Bel-7404 (A), SMMC-7721 (B) and HepG2 (C)

** $P < 0.01$ vs NC group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs Gen group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 5-FU group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. NC: Negative control; Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil.

2.4 Gen与5-FU联用对Bel-7404荷瘤裸小鼠肿瘤生长的影响 如表1所示, 给药28 d后, NC组、Gen (15 mg/kg) 处理组、5-FU (30 mg/kg) 处理组及Gen (15 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组的RTV差异无统计学意义 ($F=1.822, P=0.176$)。

Gen (15 mg/kg) 处理未对Bel-7404荷瘤裸小鼠肿瘤生长产生抑制作用, 其T/C为1.141, 5-FU (30 mg/kg) 处理产生经微肿瘤生长产生抑制作用, 其T/C为0.842; Gen (15 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组T/C为0.891, 未见Gen增强5-FU的抑瘤效果。

表1 Gen与5-FU联合干预28 d对Bel-7404荷瘤裸小鼠肿瘤的抑制作用

Tab 1 Inhibitory effect of Gen combined with 5-FU on Bel-7404 tumor-bearing nude mice after 28 d

Group	Tumor volume/cm ³ , $\bar{x} \pm s$		RTV, $\bar{x} \pm s$	T/C
	Day 0	Day 28		
Negative control	0.13 ± 0.02	1.92 ± 0.41	15.35 ± 2.92	
Gen (15 mg•kg ⁻¹)	0.13 ± 0.02	2.16 ± 0.32	17.51 ± 3.11	1.141
5-FU (30 mg•kg ⁻¹)	0.13 ± 0.01	1.57 ± 0.45	12.93 ± 4.88	0.842
Gen (15 mg•kg ⁻¹) + 5-FU (20 mg•kg ⁻¹)	0.13 ± 0.01	1.72 ± 0.54	13.67 ± 3.54	0.891

Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil; RTV: Relative tumor volume (tumor volume on day 28 divided by tumor volume on day 0); T/C: The ratio of RTV between treatment group and control group.

提高Gen的给药浓度至40 mg/kg后, Gen表现出明显的抑瘤作用, Gen (40 mg/kg) 组T/C为0.555, RTV明显低于NC组 ($P < 0.05$); 5-FU (20 mg/kg) 处理组及Gen (40 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组也表现出肿瘤生长抑制

作用, 但与NC组比较, RTV差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); Gen (40 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合组T/C为0.808, 与2个单独用药组相比肿瘤抑制效果未见增强。见表2。

表2 Gen与5-FU联合干预21 d对Bel-7404荷瘤裸小鼠肿瘤的抑制作用

Tab 2 Inhibitory effect of Gen combined with 5-FU on tumor growth of Bel-7404 tumor-bearing nude mice after 21 d

Group	Tumor volume/cm ³ , $\bar{x} \pm s$		RTV, $\bar{x} \pm s$	T/C
	Day 0	Day 21		
Negative control	0.10 ± 0.04	1.67 ± 0.59	17.54 ± 5.06	
Gen (40 mg•kg ⁻¹)	0.10 ± 0.03	0.94 ± 0.54	9.73 ± 5.85*	0.555
5-FU (20 mg•kg ⁻¹)	0.10 ± 0.03	1.35 ± 0.29	13.84 ± 2.32	0.789
Gen (40 mg•kg ⁻¹) + 5-FU (20 mg•kg ⁻¹)	0.10 ± 0.04	1.37 ± 0.37	14.18 ± 2.11	0.808

* $P < 0.05$ vs negative control group. Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil; RTV: Relative tumor volume (tumor volume on day 21 divided by tumor volume on day 0); T/C: The ratio of RTV between treatment group and control group.

2.5 Gen与5-FU联用对PDX模型Liver-0117异源移植瘤生长的影响 结果如表3所示, 在治疗18 d后, Gen (15 mg/kg) +5-FU (20 mg/kg) 联合处理组

T/C为0.576, 表现出较好的肿瘤抑制效果, RTV明显低于5-FU (30 mg/kg) 处理组 ($P < 0.05$)。

表3 Gen与5-FU联合干预18 d对PDX模型Liver-0117荷瘤裸小鼠肿瘤生长的影响

Tab 3 Effect of Gen combined with 5-FU on tumor growth of PDX Liver-0117 tumor-bearing nude mice after 18 d

Group	Tumor volume/cm ³ , $\bar{x} \pm s$		RTV, $\bar{x} \pm s$	T/C
	Day 0	Day 18		
Negative control	0.10 ± 0.03	2.01 ± 0.42	21.94 ± 1.87	
Gen (15 mg•kg ⁻¹)	0.09 ± 0.02	1.64 ± 0.32	19.74 ± 6.87	0.900
5-FU (30 mg•kg ⁻¹)	0.10 ± 0.02	1.78 ± 0.33	18.76 ± 0.68	0.855
Gen (15 mg•kg ⁻¹) + 5-FU (20 mg•kg ⁻¹)	0.10 ± 0.02	1.24 ± 0.36	12.64 ± 0.92*	0.576

* $P < 0.05$ vs 5-FU (30 mg/kg) group. Gen: Genistein; 5-FU: 5-fluorouracil; PDX: Patient-derived xenograft; RTV: Relative tumor volume (tumor volume on day 18 divided by tumor volume on day 0); T/C: The ratio of RTV between treatment group and control group.

3 讨论

细胞异常增殖和凋亡失控是癌变的一个主要特征,研究药物对癌细胞增殖和凋亡的影响是评价其抗肿瘤效果的手段之一。5-FU为消化道肿瘤常用的化疗药物,价格低廉,是一种细胞周期特异性药,目前作为实体瘤的广谱抗代谢药物应用于临床^[19],它通过抑制胸苷酸合成酶与脱氧尿苷单磷酸的结合阻碍细胞DNA合成;还可通过调节凋亡关键蛋白包括p53和Bcl-2蛋白家族[Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)]等诱导细胞凋亡^[20]。近年来也有研究将5-FU与奥沙利铂、双丹胶囊等联用^[21-22],但是5-FU的使用也受其毒性和耐药性的限制,如能通过天然抗肿瘤化合物联用增强肿瘤细胞对药物的敏感性、降低化疗药物的使用剂量,或许可减轻其毒性和不良反应。

作为大豆中的黄酮类化合物,Gen对卵巢癌、乳腺癌及胰腺癌具有增殖抑制或者促凋亡作用^[23-25]。近年来有较多研究将Gen与化疗药联用,观察其对不同肿瘤的化疗增敏作用,Pintova等^[26]将Gen与奥沙利铂或奥沙利铂-贝伐单抗联合用于转移性结肠癌的治疗,疗效显著且可耐受,提示Gen在肿瘤化疗中有潜在的应用价值。本研究的体外实验发现Gen(10 μmol/L)与5-FU(2 μmol/L)联用可有效抑制Bel-7404、SMMC-7721和HepG2细胞增殖,同时显著促进细胞凋亡,表明两者联用对肝癌细胞具有较好的化疗增敏作用,其机制可能与Bax/Bcl-2表达上调有关^[19]。另有研究发现Gen与5-FU联用可通过p42/44 MAPK通路调控Bax的表达^[27],或可能通过上调PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路抑制细胞自噬,从而发挥逆转肝癌Bel-7402细胞的5-FU耐药性^[28]。上述研究结果均提示,Gen与5-FU联用可能通过调控多条通路启动凋亡或自噬途径,影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

本研究还分别利用Bel-7404细胞及人源肝癌组织建立Bel-7404荷瘤裸小鼠和PDX模型Liver-0117异源移植肿瘤裸小鼠,发现相同剂量Gen与5-FU联用对PDX模型Liver-0117荷瘤裸小鼠的作用效果优于Bel-7404荷瘤裸小鼠。也有研究发现,同样的药物处理对不同的细胞模型效果不

同,分析原因可能是不同细胞系的基因表达模式和细胞内环境有所不同^[29]。本实验中的PDX模型Liver-0117荷瘤裸小鼠模型肿瘤组织块细胞种类构成较复杂,可能还有肿瘤的间质细胞和免疫细胞,肿瘤微环境、基因改变模式不同及Gen多靶点的作用,可能导致了2种模型小鼠肿瘤组织对药物的敏感性不同。这也提示在肝癌的治疗中影响Gen与5-FU联用效果的因素较多,其具体的分子机制及临床应用还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL R L, TORRE L A, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, ZHANG S, ZENG H, BRAY F, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40: 121-138.
- [4] 梁淑影, 王峰, 王珺, 何炜, 樊青霞. 5-氟尿嘧啶血药浓度对替吉奥联合紫杉醇治疗晚期胃癌疗效的评估价值[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52: 339-343.
- [5] 程康文, 李琪, 詹勇强, 王成友, 王贵和, 倪勇, 等. 5-氟尿嘧啶对肝癌细胞株PLC/RAF/5生物学特性及耐药机制的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31: 1458-1463.
- [6] MUKUND V, MUKUND D, SHARMA V, MANNARAPU M, ALAM A. Genistein: its role in metabolic diseases and cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 119: 13-22.
- [7] GANAI A A, FAROOQI H. Bioactivity of genistein: a review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 76: 30-38.
- [8] THANGAVEL P, PUGA-OLGUÍN A, RODRÍGUEZ-LANDA J F, ZEPEDA R C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases[J/OL]. *Molecules*, 2019, 24: 3892. DOI: 10.3390/molecules24213892.
- [9] WENG L, ZHANG F, WANG R, MA W, SONG Y S. A review on protective role of genistein against oxidative stress in diabetes and related complications[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2019, 310: 108665. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.05.031.
- [10] DONG J Y, QIN L Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies[J]. *Breast Cancer Res*

- Treat, 2011, 125: 315-323.
- [11] ZHANG Y, LI Q, ZHOU D, CHEN H. Genistein, a soya isoflavone, prevents azoxymethane-induced up-regulation of WNT/ β -catenin signalling and reduces colon pre-neoplasia in rats[J]. Br J Nutr, 2013, 109: 33-42.
- [12] YANAGIHARA K, TAKIGAHIRA M, MIHARA K, KUBO T, MORIMOTO C, MORITA Y, et al. Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and Cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers[J]. Nutr Cancer, 2013, 65: 578-589.
- [13] DAI W, WANG F, HE L, LIN C, WU S, CHEN P, et al. Genistein inhibits hepatocellular carcinoma cell migration by reversing the epithelial-mesenchymal transition: partial mediation by the transcription factor NFAT1[J]. Mol Carcinog, 2015, 54: 301-311.
- [14] CHODON D, RAMAMURTY N, SAKTHISEKARAN D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line[J]. Toxicol Vitro, 2007, 21: 887-891.
- [15] CHODON D, BANU S M, PADMAVATHI R, SAKTHISEKARAN D. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 297: 73-80.
- [16] YAN H, JIANG J, DU A, GAO J, ZHANG D, SONG L. Genistein enhances radiosensitivity of human hepatocellular carcinoma cells by inducing G₂/M arrest and apoptosis[J]. Radiat Res, 2020, 193: 286-300.
- [17] SONG L, MA L, CONG F, SHEN X, JING P, YING X, et al. Radioprotective effects of genistein on HL-7702 cells via the inhibition of apoptosis and DNA damage[J]. Cancer Lett, 2015, 366: 100-111.
- [18] 凌航. Genistein联合5-Fu促人结肠癌细胞凋亡及相关机制的研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [19] 王钰粟, 梅庆步, 郑立红, 王玉, 刘丹. Genistein与5-FU诱导肝癌细胞凋亡协同作用机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22: 758-763.
- [20] LEI X, LV X, LIU M, YANG Z, JI M, GUO X, et al. Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417: 864-868.
- [21] 崔今姬. 奥沙利铂联合5-Fu治疗晚期原发性肝癌的临床分析[J]. 中国医药指南, 2020, 18: 138.
- [22] 丁文波, 宁青, 夏智, 宋捷, 周晓雯, 陈秀伟. 双丹胶囊联合5-Fu对肝癌细胞Huh-7及荷瘤小鼠协同抗肿瘤作用研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45: 5762-5769.
- [23] SAHIN K, YENICE E, BILIR B, ORHAN C, TUZCU M, SAHIN N, et al. Genistein prevents development of spontaneous ovarian cancer and inhibits tumor growth in hen model[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2019, 12: 135-146.
- [24] PONS D G, VILANOVA-LLOMPART J, GAYABOVER A, ALORDA-CLARA M, OLIVER J, ROCA P, et al. The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ER α /ER β ratio in breast cancer cells[J]. Int J Food Sci Nutr, 2019, 70: 941-949.
- [25] BI Y L, MIN M, SHEN W, LIU Y. Genistein induced anticancer effects on pancreatic cancer cell lines involves mitochondrial apoptosis, G₀/G₁ cell cycle arrest and regulation of STAT3 signalling pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 39: 10-16.
- [26] PINTOVA S, DHARMUPARI S, MOSHIER E, ZUBIZARRETA N, ANG C, HOLCOMBE R F. Genistein combined with FOLFOX or FOLFOX-Bevacizumab for the treatment of metastatic colorectal cancer: phase I / II pilot study[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 84: 591-598.
- [27] 赵忠新, 迟大鹏, 王钰粟, 梅庆步, 于海涛, 岳丽玲, 等. Genistein与5-Fu通过p42/44 MAPK通路调控Bax诱导肝癌细胞凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22: 2003-2007.
- [28] 刘波. 染料木素逆转肝癌Bel-7402/5Fu细胞耐药性的机制研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2019, 22: 90-95.
- [29] JIN R, LIU B X, LIU X J, FAN Y J, PENG W, HUANG C Z, et al. Leflunomide suppresses the growth of LKB1-inactivated tumors in the immune-competent host and attenuates distant cancer metastasis[J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20: 274-283.

[本文编辑] 尹 茶