



王雪松,张羽彤,杨婉婷,等.荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的协同抑制作用[J].黑龙江农业科学,2024(10):61-68.

荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的协同抑制作用

王雪松¹,张羽彤¹,杨婉婷¹,王旭¹,谢凤英²,王岩¹

(1. 齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 东北农业大学 食品学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为减少癌细胞对药物的抗药性,通过液质联用法、MTT 法和流式细胞仪分析法对荞麦和燕麦多酚提取物进行组分鉴定以及对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的协同抑制作用进行研究,并结合高效液相色谱-质谱鉴定(-)-表阿夫儿茶精-表儿茶素等 10 种化合物。结果表明,荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞抑制作用表现为一定的浓度范围内随着多酚提取物浓度的增加而极显著增加($P < 0.01$),其中,燕麦多酚提取物的抑制作用显著高于荞麦($P < 0.05$),最佳培养时间皆为 24 h。联合作用条件下,燕麦浓度增加至 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上时,荞麦和燕麦多酚提取物呈现出协同抑制作用,其最佳浓度组合为荞麦(2.0 或 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和燕麦($10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),对结肠癌 Caco-2 细胞增殖抑制率浓度分别为 47.03% 和 50.10%。经凋亡图谱分析发现,荞麦和燕麦组(C 和 D)不仅远远高于对照组,与同剂量燕麦组(B)相比,细胞凋亡率分别增加了 3.5% 和 6.8%。因此,说明荞麦和燕麦中多酚化合物存在形式之间的互补可有效地诱导细胞发生凋亡,且能够对多酚癌细胞增殖协同抑制作用提供帮助。

关键词:荞麦;燕麦;多酚;结肠癌;协同抑制作用

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率在所有肿瘤中占第 3 位,其治疗多以手术为主并辅以化疗和放疗,但术后 5 年发病率却在 50% 左右。因此,探索新的、更有效的药物用于改善结肠癌的治疗显得尤为重要^[1-3]。多酚化合物的抗氧化、抗炎和抗癌等生物活性功能已被证实。例如,山柰酚能抑制人结肠癌 SW48 细胞的生长,通过诱导 p53 介导的线粒体凋亡通路及阻滞细胞周期来实现对结肠癌细胞的抑制作用^[4];槲皮素对人结肠癌 HT29 细胞增殖具有显著的抑制作用并能引起细胞周期阻滞,为一种极具发展潜力的抗结肠癌药物^[5]; γ -生育三烯酚对体外培养的人结肠癌 HT-29 细胞增殖有显著的抑制作用,并可有效诱导细胞发生凋亡^[6]。随着山柰酚、槲皮素抗癌机理的发现,以其为组成成分的杂粮多酚化合物抗癌作用也陆续展开了研究,例如,薏米多酚提取物被证实了可抑制小鼠中肉瘤-180 肿瘤生长、可对 U937 白血病细胞及 A549 肺癌细胞的增殖起到抑制作用^[7-8]。此外,在多组分体系中,多酚

与其它抗氧化剂共存时二者之间存在着协同增效作用^[9]。例如,多酚化合物可与 VE 的自由基发生反应,使 VE 的结构得到修复而继续发挥抗氧化作用;在完整的膜细胞中,酚酸与阿魏酸、生育酚、 β -胡萝卜素之间协同抗氧化作用明显会高于单一抗氧化剂的抗氧化效果。因此,具有生物活性的营养素之间的协同作用研究已成为一个崭新的课题。杂粮荞麦中含有的芦丁、3-黄酮醇、酚酸及其衍生物等多酚化合物不仅对自由基损伤具有一定的修复能力,还可影响基因的表达和细胞中结合激酶以后的信号传递,进而帮助机体对抗由于氧化作用带来的疾病^[10-14]。而燕麦除了含有丰富的蛋白质、可溶性膳食纤维和维生素外还含有肉桂酸衍生物、对香豆酸、对羟基苯甲酸等多酚类物质^[15-16],其二者含有的多酚化合物相互之间是否存在协同增效作用却鲜见报道。

本研究以荞麦和燕麦多酚提取物为研究对象,通过二者对结肠癌 Caco-2 细胞增殖抑制作用的研究,可以更好地了解氧化应激状态下,多酚化

收稿日期:2024-04-18

基金项目:2023 年度黑龙江省省属高校基本科研业务费科研项目(145309631);黑龙江省重点研发项目(2022ZX02B16);黑龙江省“百千万”工程科技重大专项子课题(2021ZX12809-3)。

第一作者:王雪松(1998-),男,硕士研究生,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:1960218739@qq.com。

通信作者:王岩(1982-),男,博士,教授,从事食品功能因子研究与开发。E-mail:pitwang05@163.com。

合物清除自由基或抑制蛋白磷酸化的能力。对二者协同作用的探究可为多酚化合物的联合使用,增强药用功效,减少癌细胞对药物的抗药性起到积极的指导作用,进而为谷物食品保健功能的开发和增效作用提供一定理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 荞麦和燕麦(阜新化石戈谷业有限责任公司);人结肠癌 Caco-2 细胞(哈尔滨医科大学);福林-酚试剂、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素、二甲基亚砷(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司);Giemsa 吉姆萨染液(上海古朵生物科技有限公司);PBS 缓冲液(科德角国际生物医学科技有限公司);碘化丙啶 PI 染色液(上海居里生物科技有限公司);膜联蛋白 v-fitcpropidium 碘凋亡检测试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);甲醇和乙腈为色谱纯;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备 高速万能粉碎机(绍兴市科宏仪器有限公司);F-101S 集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);LCQ Deca XP Plus 液质联用仪(美国热电菲尼根公司);VD-1320 型无菌超净工作台(北京东联哈尔仪器制造厂);HF-90 型 CO₂ 培养箱(HealForce 公司);Model 680 型酶标仪(BIO-RAD 公司);AE-31 型倒置显微镜(麦克奥迪公司);FACS 分选型流式细胞仪(BDAria 公司)。

1.2 方法

本研究于 2023 年 10 月 10 日在齐齐哈尔大学食品与生物工程学院 212 实验室开始荞麦和燕麦多酚提取物的提取,与此同时在学院细胞间开展结肠癌细胞 Caco-2 的培养,于 2023 年 11 月中旬完成多酚鉴定,2023 年 11 月下旬开展结肠癌 Caco-2 细胞协同抑制作用研究,最终于 2023 年 12 月 18 日完成本研究。

1.2.1 多酚提取物制备 分别称取荞麦和燕麦粉各 10.0 g 于烧杯中,按料液比 1:10 加入体积分数 70% 的乙醇溶液后,于 37 ℃ 条件下搅拌提取 5.0 h,经离心、浓缩、冻干,即得荞麦和燕麦多酚冻干粉。

1.2.2 多酚含量的测定 采用 Folin-Ciocalteu 法^[17],以没食子酸为标准品,其标准曲线为: $A = 0.0119X + 0.0056$,相关系数 $R^2 = 0.9991$ 。

1.2.3 高效液相色谱-质谱分析 取荞麦和燕麦冻干粉于离心管中,加入 10.0 mL 甲醇溶解,超声 30 min,经 0.22 μm 微孔膜过滤后进行液质分析。色谱分析条件:采用岛津¹⁸ C 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm)色谱柱;柱温 30 ℃;检测波长 280 nm;流速 1 mL·min⁻¹;进样量为 10 μL;流动相 A 相为乙腈,B 相为体积分数 2% 的乙酸水溶液。梯度洗脱程序:0~30 min,100% A;30~35 min,40% A;35~42 min,1% A。

质谱分析条件:雾化气(N₂)流速为 25 Psi;干燥气(N₂)流速为 9.0 L·min⁻¹;毛细管温度为 350 ℃,毛细管电压为 3.0 kV,采用正、负离子模式,测定范围为 m/z=100~2 000。

1.2.4 结肠癌 Caco-2 细胞培养 结肠癌 Caco-2 细胞置于 5%CO₂ 培养箱中 37.0 ℃ 培养。其培养基为 RPMI-1640 培养基,其中含有体积分数 10% 胎牛血清和体积分数 1.0% 的 100 U·mL⁻¹ 青霉素及 0.1 mg·mL⁻¹ 链霉素。

1.2.5 荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用 采用 MTT 法进行测定。其操作过程为:取对数生长期的结肠癌细胞,用体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞。用 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液,进行细胞计数,调整细胞密度为 5.0 × 10⁴ 个·mL⁻¹。接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,培养 24 h,使细胞同步化。基于 1.2.2 的测定调整荞麦和燕麦多酚化合物含量为同一浓度,试验组浓度经调整设定为:荞麦组 0.6,1.2,1.8,2.4 和 3.0 mg·mL⁻¹;燕麦组 2.0,4.0,6.0,8.0 和 10.0 mg·mL⁻¹,同时设定等体积培养液为空白对照组。每个浓度设 8 个复孔,培养时间为 24 和 48 h。培养结束后,吸弃各孔中残余培养液,每孔中加入 0.5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液 20 μL,37.0 ℃ 孵育 4 h 吸弃各孔中的液体,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)200 μL,室温低速振荡 5 min,使结晶充分溶解并混匀,于全自动酶标仪 490 nm 处测定吸光度值。平行 3 次取平均值。

细胞增殖抑制率计算公式为:

$$CPI(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

式中,CPI为细胞增殖抑制率(%); A_1 为空白对照组吸光度值; A_2 为试验组吸光度值。

1.2.6 荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的协同抑制作用 在 1.2.5 试验基础之上选取浓度为 0, 2.0 和 3.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的荞麦提取物与浓度为 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 和 10.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的燕麦提取物进行组合,按 1.2.5 方法对经 24 h 培养的结肠癌 Caco-2 细胞增殖抑制率进行测定。

1.2.7 细胞凋亡和细胞形态观察 调整结肠癌 Caco-2 细胞密度为 5.0×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,接种于 24 孔培养板中,每孔 0.5 mL,培养 24 h,弃去旧的培养基。共设置 4 组分别加入含有 10.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 燕麦, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荞麦 + 10.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 燕麦, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荞麦 + 10.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 燕麦和空白对照组的多酚提取物的新鲜培养基,37.0 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 48 h 后进行 Giemsa 染色,倒置显微镜观察。

1.2.8 细胞凋亡的检测 为了检测荞麦和燕麦的多酚协同引起的生长抑制是否与细胞凋亡有关,根据试验结果,采用了抑制 24 h 的细胞来探讨细胞凋亡情况。凋亡细胞用 Annexin-V/PI 标记法进行检测,由流式细胞仪进行观察,实验分组为对照组 A,燕麦组 B 以及荞麦和燕麦协同作用组 C、D。体积分数为 0.25% 胰酶消化并收集细胞,离心(1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 7 min),4.0 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,用 250 μL 结合缓冲液悬浮细胞调整其浓度为 1.0×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL annexin V-FITC 和 10 μL 、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的碘化丙啶溶液,混匀,于室温避光孵育 15 min,在反应管中加 400 μL

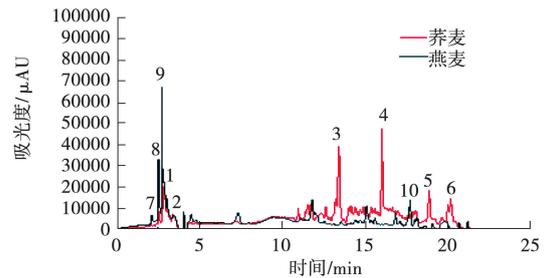
PBS,上流式细胞仪分析。

1.2.9 数据分析 试验数据采用 SPSS 26.0 软件进行显著性分析,采用 Origin 2021 软件进行作图且图中数据均为平均值 \pm 标准差绘制。在 $P<0.01$ 水平进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 荞麦和燕麦提取物中多酚化合物的鉴定

荞麦和燕麦多酚提取物在 280 nm 处的 HPLC 光谱的主要 UV 峰如图 1 所示,其主要化合物如表 1 所示。根据这些化合物保留时间、分子离子峰和碎片离子峰参考相应文献^[18-23] 确定荞麦中多酚化合物主要为(-)-表阿夫儿茶精-表儿茶素、咖啡酸-己糖、原花青素 B2、葡糖基芦丁、(-)-表阿夫儿茶精-表儿茶素-O-(3,4-二-O-甲基)没食子酸酯、(-)-表儿茶素-3-O-(3,4-二-O-甲基)没食子酸酯;燕麦中主要为 N-3',4'-二羟基肉桂酰-5-羟基邻氨基苯甲酸、燕麦蒽酰胺及其衍生物、二烯酸与二十六烷-1-醇、26-羟基二十六烷酸和 28-羟基二十八烷酸组成的酚酸酯化合物。



1~6. 荞麦;7~10. 燕麦。

图 1 荞麦和燕麦多酚提取物的 HPLC 光谱图

表 1 HPLC-EIS-TOF-MS 法测定荞麦和燕麦提取物中多酚化合物组成

序号	保留时间/min	分子离子峰/(m/z)	碎片离子峰/(m/z)	对应的化合物
1	2.51	562.81	503.09, 340.97, 221.09	(-)-表阿夫儿茶精-表儿茶素
2	2.73	341.03	195.09	咖啡酸-己糖
3	13.43	575.06	487.09, 383.02, 205.89	原花青素 B2
4	16.03	795.25	633.14, 542.95, 301.28	葡糖基芦丁
5	18.88	741.03	468.89, 406.04, 271.10	(-)-表阿夫儿茶精-表儿茶素-O-(3,4-二-O-甲基)没食子酸酯
6	20.18	468.93	331.13, 122.88	(-)-表儿茶素-3-O-(3,4-二-O-甲基)没食子酸酯
7	2.11	626.75	338.85, 316.82	N-3',4'-二羟基肉桂酰-5-羟基邻氨基苯甲酸
8	2.53	295.11	258.21, 125.06	蒽酰胺化合物
9	2.74	235.24	118.19, 118.19	蒽酰胺衍生物
10	17.73	815.01	792.94, 679.86, 114.05	二烯酸与二十六烷-1-醇、26-羟基二十六烷酸和 28-羟基二十八烷酸的酚酸酯化合物

2.2 荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用

2.2.1 荞麦 单独对荞麦多酚提取物 5 组浓度孵育 24 和 48 h 探讨其多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用。由图 2 可知,在培养 24 和 48 h 后,荞麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖清除率随着浓度增加都呈现极显著的先增加后下降的趋势,差异显著性具有统计学意义 ($P < 0.01$),且只在 $0.5 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间存在浓度依赖性。培养时间为 24 h,荞麦提取物浓度为 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对结肠癌 Caco-2 细胞增殖抑制效果最好,抑制率达到了 29.14%。此外,作用 24 h 后荞麦多酚提取物比作用 48 h 后荞麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞的清除率更高,可极显著抑制结肠癌 Caco-2 细胞,推测可能与细胞周期有关。孵育 24 和 48 h 的清除率在经过 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈现下降趋势,推测可能是因为荞麦多酚高浓度下对癌细胞的抑制作用减弱。

因此,荞麦多酚提取物对结肠癌细胞 Caco-2 抑制的最佳作用时间是 24 h,提取物浓度 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

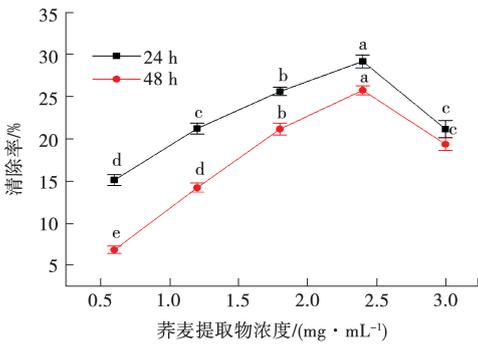


图 2 荞麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用

注:不同的字母表示两组数据在 $P < 0.01$ 水平差异显著。下同。

2.2.2 燕麦多酚提取物 根据 MTT 法,单独对燕麦多酚提取物 5 组浓度孵育 24 和 48 h 探讨结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用。由图 3 可知,在培养时间为 24 和 48 h 后,燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖清除率随着浓度增加而呈现极显著增加的趋势,差异显著性具有统计学意义 ($P < 0.01$),且清除率随着浓度的增加呈现剂量依赖性。培养时间增加至 48 h 时,燕麦多酚提取物对结肠癌细胞增殖清除率极显著下降,推

测可能是燕麦多酚对人结肠癌细胞株 Caco-2 细胞凋亡受到了细胞周期的影响。因此,燕麦多酚提取物对结肠癌细胞 Caco-2 抑制的最佳作用时间是 24 h,最佳浓度 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

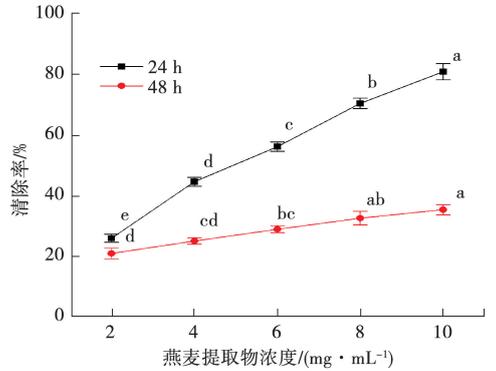


图 3 燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用

2.3 荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的协同抑制作用

对荞麦和燕麦多酚提取物 5 组浓度协同作用下孵育 24 h 探讨结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用,由图 4 可知,在燕麦多酚提取物浓度为 $6.0, 8.0$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其与荞麦 (2.0 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混合时对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的清除率显著高于单一燕麦多酚提取物处理,差异显著性具有统计学意义 ($P < 0.01$)。其混合物协同作用浓度最佳组合模式为荞麦 (2.0 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + $10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 燕麦,其对结肠癌 Caco-2 细胞增殖清除率为 47.03% 和 50.10%。结合荞麦和燕麦多酚化合物的鉴定结果发现,植物多酚的自由态和结合态存在形式在功效发挥过程中有着重要作用。

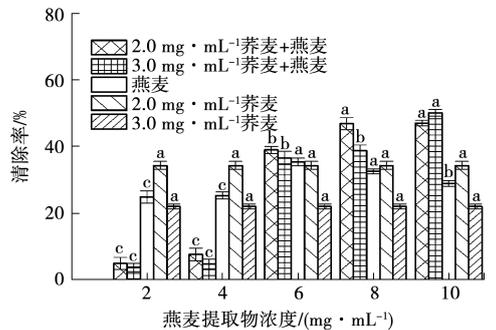


图 4 荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制作用

2.4 细胞形态观察

细胞凋亡发生时,会产生细胞的形态变化,本研究通过倒置显微镜 200× 状态下观察不同处理 Caco-2 细胞培养 48 h 后的形态变化。由图 5 可知,正常对照组的 Caco-2 细胞核大而均匀着色,核仁清晰(图 5A),与对照组进行比较,随着荞麦多酚的浓度增加试验组细胞发生不同程度的皱缩,细胞数量逐渐减少,排列变得松散,胞核与胞

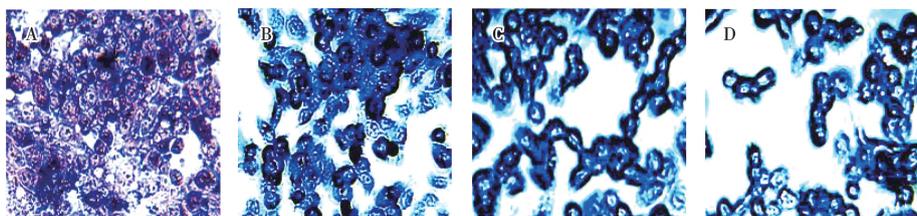


图 5 荞麦和燕麦多酚提取物联合诱导结肠癌 Caco-2 细胞凋亡的形态学变化(倒置显微镜 200×)
A. 对照组; B. 10.0 mg·mL⁻¹燕麦; C. 2.0 mg·mL⁻¹荞麦+10.0 mg·mL⁻¹燕麦;
D. 3.0 mg·mL⁻¹荞麦+10.0 mg·mL⁻¹燕麦。下同。

2.5 细胞凋亡的检测

由图 6 可知,对照组 A 活细胞的百分比为 85.0%,细胞早期和晚期凋亡率分别为 3.4%和 2.0%,坏死细胞率为 9.6%;试验组 B 活细胞百分比 80.3%,细胞早期和晚期凋亡率分别为 6.8%和 9.9%,坏死细胞率为 3.0%;试验组 C 活细胞的百分比 78.1%,细胞早期和晚期凋亡率分别为 15.6%和 4.6%,坏死细胞率为 1.7%;试验组 D 的活细胞百分比为 75.8%,细胞早期和晚期凋亡率分别为 21.3%和 2.2%,坏死细胞率为

质比例拉开,核染色体浓缩密集于核膜下,核碎裂崩解成多个小块连同萎缩退变的细胞器被膜性结构包裹形成凋亡小体,胞膜内陷为凋亡细胞形态(图 5B、C、D)。证明荞麦和燕麦多酚能够协同抑制结肠癌 Caco-2 细胞的增殖,符合细胞凋亡形态的变化,并且结肠癌 Caco-2 细胞抑制力随着荞麦浓度的增加而增强。

0.7%。由于活细胞和坏死细胞不属于凋亡分析范畴内,因此对细胞凋亡图谱分析发现,荞麦和燕麦组(C和D)无论早期还是晚期凋亡率都远远高于对照组 A,总体凋亡率分别增加 14.8%和 18.1%,与同剂量燕麦组 B 相比,晚期凋亡率略下降,早期凋亡率明显上升,但细胞总体凋亡率分别增加了 3.5%和 6.8%。由此可见,燕麦与荞麦多酚提取物共存时可通过提取物协同作用诱导 Caco-2 癌细胞凋亡,促使谷物多酚抗肿瘤活性最大化发挥作用。

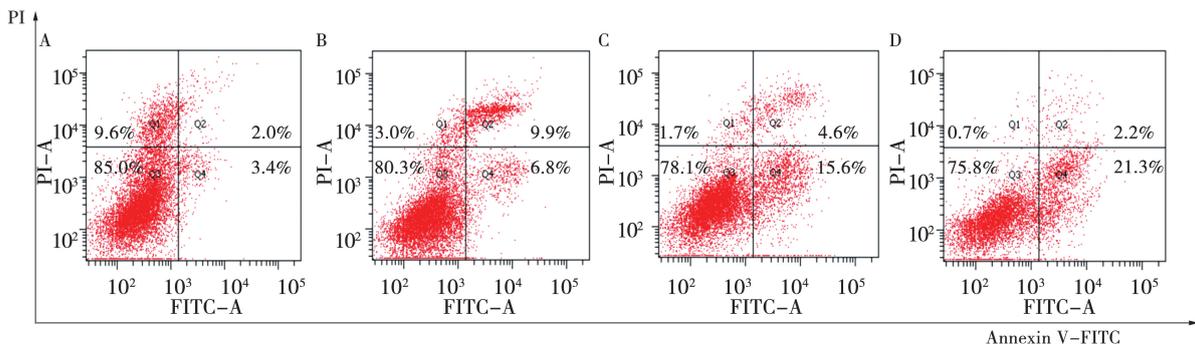


图 6 荞麦和燕麦联合诱导结肠癌 Caco-2 细胞凋亡的影响

3 讨论

目前对于荞麦与燕麦的多酚提取物研究主要集中在抗氧化活性、氧化损伤^[24]和酶抑制^[25]方面,而关于癌细胞抑制的研究少之又少。姚轶俊^[26]做了关于荞麦多酚对 Caco-2 培养模型的细胞毒

理性试验,结果显示 2.5 mg·mL⁻¹无毒性,证明了荞麦多酚可以用来做 Caco-2 结肠癌细胞抑制研究。本研究以东北的荞麦和燕麦为原材料提取多酚,并进行多酚化合物的鉴定,鉴定结果与此前顾金瑞^[27]共鉴定到 31 种多酚化合物,包括原花

青素三聚体 T2、香草酸、芝麻林素、肉桂鞣质、原花青素 B7、对香豆素-二己糖苷等,其中(-)-表儿茶素-3-O-(3,4-二-O-甲基)没食子酸酯、儿茶素没食子酸酯结果一致。因此,提取出来的多酚得到了验证,证明了此提取流程具有可操作性和合理性。

关于多酚对于癌细胞增殖抑制的影响,本研究先分别对荞麦多酚和燕麦多酚进行了癌细胞抑制探讨,然后对二者协同抑制作用进行了探讨,发现 Caco-2 细胞清除率随浓度增大而升高。而董丽华等^[28]研究发现随着茶多酚浓度的升高,Caco-2细胞的增殖抑制率逐渐升高,且在茶多酚浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率达到最高,但随着时间的延长,Caco-2 细胞的增殖抑制率却无明显规律性改变。因此,本研究进一步证明了荞麦多酚与燕麦多酚对癌细胞增殖的抑制作用上具有剂量依赖性。

在分别培养 24 和 48 h 时间下,48 h 出现了显著下降趋势,可能受到细胞周期影响。而 Shan 等^[29] 研究结果表明粟糠的结合多酚能够通过减少结直肠癌 CpG 岛的甲基化来上调 miR-149 的表达,从而诱导 G2/M 期的细胞周期停滞,从而增强 HCT-8/Fu 细胞的化学敏感性,证明了多酚具有作为结直肠癌(CRC)抗 MDR 剂的潜力。高恩光^[30] 研究花生红衣原花青素联合白藜芦醇对 Caco-2 结直肠癌细胞的影响及其机制研究,说明二者多酚联合使用增强了白藜芦醇阻滞 Caco-2 细胞 G0/G1 期的能力。因此,通过(PI)DNA 染色法测定细胞周期与凋亡蛋白的表达证实无论是结合多酚方面还是协同抑制方面 Caco-2 细胞都受到了细胞周期的影响。

荞麦和燕麦协同作用于 Caco-2 结肠癌细胞与多酚的存在形式有关。本研究在鉴定基础上,结合协同抑制试验发现了随着结合态多酚的数目增多,抑制效果显著增强。Bonoli 等^[31] 研究发现,结合酚类化合物的提取率增加时,碱水解消化时间延长,采用溶剂提取法,通过将几个分光光度指数与提取物抗氧化相关联,评估每种方法提取率,比较游离酚与结合酚,证明结合态多酚对结肠癌起到预防作用。荞麦和燕麦中多酚化合物的构

成恰好符合上述模式进而二者混合时表现出较强的协同抑制作用。可能由于自由态多酚主要在人体胃和小肠中被消化吸收而发挥作用,而结合态多酚多以糖苷或酚酸酯形式存在,可完整地通过胃肠到达人体结肠部位,在此被分解而发挥抗氧化作用进而对结肠癌起到预防作用。

多酚可能通过氧化应激途径对癌细胞进行抑制。根据 da Silva 等^[32] 研究巴西水果 Tucum-Do-Cerrado 水提物的促氧化作用对结直肠癌 Caco-2 细胞抑制作用,结果发现多酚诱导了线粒体 ROS 产生,可作为促氧化剂诱导 DNA 损伤从而使得细胞活力下降,其将提取物对癌细胞进行作用,评估 ROS 的产生、SOD1 和 SOD2、CAT、GPX1、NFE2L2、HIF1A 和 NOS2 的 mRNA 水平,发现细胞活力降低,ROS 增加其余成分下调,以癌细胞特异性方式诱导细胞毒性,从 ROS 和基因表达调控探索结直肠癌 Caco-2 细胞抑制。

多酚的协同作用对癌细胞抑制有着显著效果。根据 Yang 等^[33] 研究了木犀草素和 3 种多酚(槲皮素、芹菜素、对香豆酸)的组合单独或联合评估 MCF-7 人乳腺癌细胞的抗增殖活性,以 CI(组合关系)随抑制率关系表现出协同作用,表明了甘蔗中多酚抑制癌细胞生长的协同作用。

综上所述,燕麦与荞麦结合态多酚共存时通过协同作用诱导结肠癌细胞凋亡,以不同机制抑制 Caco-2 结肠癌细胞,其抑制作用可能激活了多种抗癌机制以及相关通路。对于未来的研究应该主要集中在二者协同作用下对癌细胞周期对凋亡的影响,氧化应激途径下的诱导凋亡以及激活的信号通路。

4 结论

使用醇提法对荞麦和燕麦多酚进行提取,用液质联用法对荞麦和燕麦多酚组分进行鉴定,鉴定出来了确定荞麦和燕麦中主要的多酚化合物组成。采用 MTT 法分别测定荞麦和燕麦多酚提取物对结肠癌 Caco-2 细胞增殖的抑制率以及协同抑制率,得到燕麦多酚提取物对结肠癌细胞 Caco-2 抑制的最佳作用时间是 24 h,最佳浓度 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,荞麦和燕麦协同抑制结肠癌细胞 Caco-2 的最佳组合模式为荞麦(2.0 或

3.0 mg·mL⁻¹)+燕麦 10.0 mg·mL⁻¹,最佳孵育时间 24 h。通过倒置显微镜 200×状态下观察不同组多酚 48 h 后,与对照组相比,随着荞麦多酚的浓度增加实验组(B,C,D)细胞发生不同程度的皱缩,结肠癌 Caco-2 细胞抑制力随着荞麦浓度的增加而增强。用 Annexin-V/PI 标记法进行检测细胞凋亡,由流式细胞仪进行观察得出凋亡图谱,2.0 mg·mL⁻¹荞麦+10.0 mg·mL⁻¹燕麦和 3.0 mg·mL⁻¹荞麦+10.0 mg·mL⁻¹燕麦处理,无论早期还是晚期凋亡率都远远高于对照组。

参考文献:

- [1] PIERCE B A. CA: A Cancer Journal for Clinicians[M]. 2012.
- [2] BALAN K V, PRINCE J, HAN Z, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(4): 263-272.
- [3] PASCHALL A V, YANG D F, LU C W, et al. CD133⁺ CD24^{lo} defines a 5-Fluorouracil-resistant colon cancer stem cell-like phenotype [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78698-78712.
- [4] 李暉,杜秉娜,张嵘,等.山奈酚对人结肠癌 SW48 细胞增殖的抑制作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(9): 727-730.
- [5] 田波,傅颖璐,田亮.槲皮素对人结肠癌细胞 HT29 的增殖抑制及诱导凋亡的体外实验研究[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2012, 52(4): 16-21.
- [6] 徐伟丽,张兰威,杨鑫,等.γ-生育三烯酚对体外培养的人结肠癌 HT-29 细胞生长的抑制作用[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(1): 47-51.
- [7] CHANG H C, HUANG Y C, HUNG W C. Antiproliferative and chemopreventive effects of adlay seed on lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3656-3660.
- [8] KUO C C, SHIH M C, KUO Y H, et al. Antagonism of free-radical-induced damage of adlay seed and its antiproliferative effect in human histolytic lymphoma U937 monocytic cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3): 1564-1570.
- [9] DING R, MAO Z Y, WANG J L. Synergistic effects of 4-nitrophenol degradation using gamma irradiation combined with a advanced oxidation process [J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2016, 27(1): 4.
- [10] MARINOVA E, TONEVA A, YANISHLIEVA N. Synergistic antioxidant effect of α-tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 628-633.
- [11] KIM S L, KIM S K, PARK C H. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable[J]. *Food Research International*, 2004, 37(4): 319-327.
- [12] BONAFACCIA G, MAROCCHINI M, KREFT I. Composition and technological properties of the flour and bran from common and Tartary buckwheat [J]. *Food Chemistry*, 2003, 80(1): 9-15.
- [13] WÓJTOWICZ A, KOLASA A, MO ŚCICKI L. Influence of buckwheat addition on physical properties, texture and sensory characteristics of extruded corn snacks[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2013, 63(4): 239-244.
- [14] 周晓婷,张根义.苦荞提取物成分分析及不同极性提取物对 α-淀粉酶的抑制作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 42-47.
- [15] XING Y M, WHITE P J. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, 74(3): 303-307.
- [16] CHU Y F, WISE M L, GULVADY A A, et al. *In vitro* antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of seven common oats[J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1/2/3/4): 426-431.
- [17] WALTER M, MARCHESAN E, MASSONI P F S, et al. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing[J]. *Food Research International*, 2013, 50(2): 698-703.
- [18] VERARDO V, ARRÁEZ-ROMÁN D, SEGURA-CARRETERO A, et al. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS) [J]. *Journal of Cereal Science*, 2010, 52(2): 170-176.
- [19] REN Q, WU C S, REN Y, et al. Characterization and identification of the chemical constituents from Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquid chromatography/photodiode array detector/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1377-1389.
- [20] 朱礼艳.燕麦中活性成分的提取、分离与结构鉴定[D].无锡:江南大学, 2012.
- [21] CAI S B, HUANG C, JI B P, et al. *In vitro* antioxidant activity and inhibitory effect, on oleic acid-induced hepatic steatosis, of fractions and subfractions from oat (*Avena sativa* L.) ethanol extract[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 900-905.
- [22] HITAYEZU R, BAAKDAH M M, KINNIN J, et al. Antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid

- contents of oat milling fractions[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 63: 35-40.
- [23] DÓKA O, BRUNORI A, SCHMIDT R, et al. Rutin in buckwheat grain meal determined by UV photoacoustic spectroscopy and HPLC [J]. Nova Biotechnologica et Chimica, 2017, 16(1): 61-67.
- [24] 凌阿静. 荞麦发芽过程中多酚变化及对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [25] 胡童霞, 张楠, 朱鑫麗, 等. 荞麦蜂花粉多酚对 α -淀粉酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(6): 930-937.
- [26] 姚铁俊. 荞麦多酚消化吸收及其对脂质代谢调控机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [27] 顾金瑞. 基于谱效关系的欧李酚类物质抗肿瘤关键成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [28] 董丽华, 杨鹏春, 戴迟兵. 茶多酚对人结肠癌细胞株 Caco-2 细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(1): 50-52.
- [29] SHAN S H, LU Y, ZHANG X L, et al. Inhibitory effect of bound polyphenol from foxtail millet bran on miR-149 methylation increases the chemosensitivity of human colorectal cancer HCT-8/Fu cells [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2021, 476(2): 513-523.
- [30] 高恩光. 花生红衣原花青素联合白藜芦醇对 CACO-2 结肠癌细胞的影响及其机制研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [31] BONOLI M, VERARDO V, MARCONI E, et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(16): 5195-5200.
- [32] da SILVA R C, FAGUNDES R R, FABER K N, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) extracts in colorectal adenocarcinoma caco-2 cells[J]. Nutrition and Cancer, 2022, 74(10): 3723-3734.
- [33] YANG Y J, ZHENG R, ZHANG P L, et al. Combination effects of polyphenols present in sugarcane on proliferation in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Sugar Tech, 2022, 24(3): 832-840.

Synergistic Inhibitory Effects of Buckwheat and Oat Polyphenol Extracts on Colon Cancer Caco-2 Cell Proliferation

WANG Xuesong¹, ZHANG Yutong¹, YANG Wanting¹, WANG Xu¹, XIE Fengying², WANG Yan¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to reduce the drug resistance of cancer cells, the fractional identification of buckwheat and oat polyphenol extracts and their synergistic inhibition of colon cancer Caco-2 cell proliferation were investigated by liquid mass spectrometry, MTT and flow cytometry analysis. Ten compounds were identified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), including (-)-epi-affeocatechin-epicatechin. The inhibitory effect of buckwheat and oat polyphenol extracts on colon cancer Caco-2 cells was shown to increase significantly ($P < 0.01$) with increasing concentrations of polyphenol extracts in a range of concentrations, with the inhibitory effect of oat polyphenol extracts being significantly higher than that of buckwheat ($P < 0.05$), and the optimal incubation time was 24 hours for both. Under the combined conditions, buckwheat and oat polyphenol extracts showed synergistic inhibition when the concentration of oats was increased above $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The optimal combination of buckwheat (2.0 or $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and oats ($10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) inhibited the proliferation of colon cancer Caco-2 cells by 47.03% and 50.10% , respectively. Analysis of the apoptosis profiles revealed that not only were the buckwheat and oat groups (C and D) much higher than the control group, the apoptosis rates increased by 3.5% and 6.8% , respectively, compared with the same dose of oats (B). The results suggest that complementarity between the forms of polyphenolic compounds present in buckwheat and oats can be effective in inducing apoptosis and will contribute to the synergistic inhibition of polyphenolic cancer cell proliferation.

Keywords: buckwheat; oatmeal; polyphenols; colon cancer; synergistic inhibitor