

LKB-1 表达差异细胞系中黄芩苷和顺铂联合用药研究

王士群^{1,3}, 庞丽萍², 朱宇珍³, 叶华³, 郑学宝^{3*} (1.广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023; 2.广东医学院附属医院消化内科, 广东 湛江 524023; 3.广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要: 黄芩苷是黄芩中提取的黄酮类天然成分, 具有显著的抗炎、抗肿瘤、促代谢等生理活性。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是调控能源代谢的主要途径, 由上游 LKB-1 或 CaMKK β 蛋白激酶调控。最新研究发现黄芩苷对于 LKB-1 低表达的细胞系中可通过 CaMKK β 途径激活 AMPK。本研究通过等效线图解法和 Chou-Talalay 法定性及定量评估了黄芩苷和顺铂在 LKB-1 表达差异的细胞系的相互作用。细胞凋亡结果发现: 相比 LKB-1 高表达的肿瘤细胞系 HepG2, 黄芩苷在 LKB-1 低表达细胞系 A549 能够增强顺铂对凋亡的诱导; 相反, 对于高表达 LKB-1 的正常细胞系 LO2, 黄芩苷起到保护作用。

关键词: 黄芩苷; 顺铂; LKB-1; 等效线图解法; Chou-Talalay

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)08-0907-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.001

Study on the Drug Combination of Cisplatin and Baicalin in LKB-1 Differential Expression Cell Lines

WANG Shiqun^{1,3}, PANG Liping², ZHU Yuzhen³, YE Hua³, ZHENG Xuebao^{3*} (1.Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2.Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 3.Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT: Baicalin, one of the major flavonoids in *Scutellaria baicalensis*, is a potent activity in anti-inflammatory, anti-tumor and promoting metabolism. AMP-activated protein kinase(AMPK) plays an important role in energy metabolism and regulated mainly by two upstream kinases, LKB-1 or CaMKK. Recent studies show that CaMKK β is involved in AMPK by baicalin in LKB-1 deficient cell lines. In this study, isobologram and Chou-Talalay was respectively applied to qualitative and quantitative assessment of the interaction of cisplatin and baicalin in LKB-1 deficient or sufficient cell lines. In the apoptosis results, it was found that compared with LKB-1 sufficient tumor cell lines, baicalin could enhance the rate of apoptosis induced by cisplatin in deficient cells. On the contrary, baicalin protected against the development of apoptosis in LO2 cells, a LKB-1 sufficient liver cell lines.

KEY WORDS: baicalin; cisplatin; LKB-1; isobologram; Chou-Talalay

黄芩苷是由黄芩中提取的一种天然黄酮类成分, 具有显著的抗炎、抗肿瘤、促代谢等生物活性^[1-2]。近年来研究发现腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)在能量代谢中扮演重要角色。此外, 由于 AMPK 的激活涉及到肿瘤形成过程中的细胞增殖、蛋白合成和细胞周期的调控环节, 成为癌症的潜在治疗靶点^[3-4]。AMPK 主要受 LKB-1, CaMKK β 上游 2 个蛋白激酶调控^[5-6]。LKB-1 在人多种组织中表达广泛, 以幼肝、睾丸、小肠和骨骼肌最多^[7-8], 对于 LKB-1 低表达的细胞系 CaMKK β 可能涉及黄芩苷对 AMPK 的激活^[9]。

顺铂做为第 1 代铂类抗代谢药物一直被认为是治疗多种实体肿瘤的基础^[10]。这些化疗药物采用联合用药通常可增强疗效或者缓解不良反应, 而联合的效价通常受到药物、治疗方案和肿瘤的种类等影响^[11]。在 LKB-1 低表达细胞系中, 黄芩苷可能激活与 AMPK 相关的凋亡通路, 这对顺铂的抗代谢凋亡途径可能产生放大作用, 起到协同抑癌作用。本实验通过对 LKB-1 表达差异的 3 种细胞系采用贯序给药方案目的在于: ①考察黄芩苷联合顺铂是否具有协同作用; ②贯序给药有助于阐明药物间的相互作用方式^[12]; ③LKB-1 表达

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173240)

作者简介: 王士群, 男, 硕士生 Tel: (0759)2388405
(0759)2388405 E-mail: xuebaozheng@163.com

E-mail: 731560548@qq.com

*通信作者: 郑学宝, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

差异的细胞系在黄芩苷对于顺铂联合中的作用是否具有显著差异。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

黄芩苷(南京泽朗药业, 批号: ZL20110810)溶于 DMSO, 浓度: $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司, 批号: H20120810, 规格: $6 \text{ mL}:30 \text{ mg}$), 浓度为 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 药品于 -20°C 储备; 噻唑蓝(MTT), 碘化丙啶(PI)分别用 PBS 配制成 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4°C 避光储备。HERAcell-150i 型 CO_2 气体细胞孵箱(美国 Thermo Scientific); EXL-800 酶标仪(美国 BIO-TEK); FACSCanto-II 型流式细胞仪(美国 BD)。

1.2 细胞系及培养

LKB-1 低表达肿瘤细胞系: A549^[9]; LKB-1 高表达肿瘤细胞系: HepG-2^[9]; LKB-1 高表达正常细胞系: LO2^[13]。细胞系均购自中科院上海细胞库, 10%FBS(Hyclon)、 $1 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素(Hyclon)、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640(Gibco)培养液, 37°C 、5% CO_2 孵箱培养。

1.3 细胞增殖抑制试验

1.3.1 给药方案 取对数生长期细胞, 以 $2\sim 3 \times 10^3$ 个细胞每孔接种于 96 孔板培养 24 h。按文献[14-15]序贯给药方式, 3 种联合方案给药, 试验方案见图 1。方案 I: 黄芩苷和顺铂同时给药培养 24 h, PBS 洗 2 次, 继续培养 48 h; 方案 II: 首先顺铂给药培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 随后以黄芩苷给药培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 继续培养 24 h; 方案 III: 给药顺序与方案 II 相反。

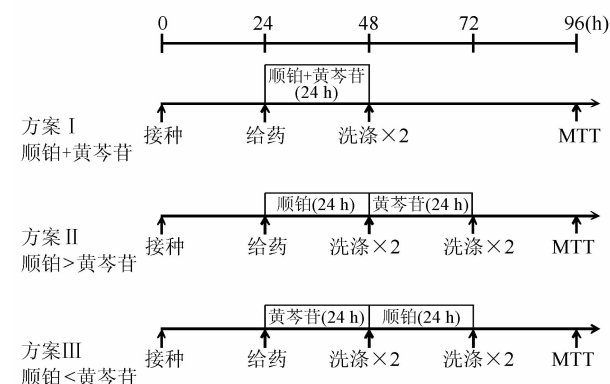


图 1 化疗药物给药方案

Fig. 1 Schedules for chemotherapeutic agents

1.3.2 MTT 细胞毒性试验 药物单独作用或以不同给药方案的增殖抑制效应通过该试验评估。在

单独给药增殖抑制考察中, 顺铂、黄芩苷浓度分别在 $0.1\sim 10$, $1\sim 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, DMSO 含量低于 0.2%, 处理时间为 24, 72 h。顺铂、黄芩苷浓度分别设定为 0.25, 0.5, 1, 2.5, $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 10, 25, 50, 75, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 培养至 72 h 后 MTT 法于 570 nm 处检测吸光度值(OD)。

1.4 效应分析

1.4.1 等效线图解法 等效线图解法是目前最为严格的药物相互作用定性方法之一, 它可对不明机制药物的量-效曲线进行分析, 从而确定药物之间相互作用的类型^[16]。对于本实验黄芩苷和顺铂的联合具有非恒定 Hill 系数比值, 因此等效线并不重合而是分割成一个等效区域。该图通过 GraphPad Prism 5.0 软件绘制。两药单独给药 IC_{50} 值为横坐标, 纵坐标轴 1.0, 等效线 a, b 区域内为加和作用, a 线以下为协同作用, b 线以上为拮抗作用。

1.4.2 Chou-Talalay 法 Chou-Talalay 法可对 2 种或多种药物的相互作用通过联合指数(combination index, CI)进行定量分析^[17-18]。CI 公式为: $\text{CI} = d_1/D_1 + d_2/D_2$ (D_1 、 D_2 为药物单独作用产生效应的剂量, d_1 、 d_2 为联合作用时等效的剂量), 当 $\text{CI} > 1$ 表示药物联用产生拮抗作用, $\text{CI} = 1$ 表示产生相加作用, $\text{CI} < 1$ 表示产生协同作用。

1.5 细胞周期分布和凋亡试验

取对数生长期细胞, 以 1×10^5 个细胞每孔接种于 6 孔板中培养至 24 h。按照设定浓度的顺铂、黄芩苷单独给药或联合给药方案培养 72 h。加药后收集上清悬浮细胞和贴壁细胞, 合并同组的细胞悬液(1×10^6)于 70%乙醇 -20°C 固定, PBS 洗涤后加入含 RNase($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 PI($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) DNA 染料室温避光染色 30 min, 流式细胞仪检测周期分布及凋亡。凋亡检测根据亚二倍体凋亡峰设定凋亡细胞比例。细胞周期分布直方图通过 ModFit LT 3.0 软件(BD)分析。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制作用

顺铂和黄芩苷在 3 种细胞系给药处理 24 h 及 72 h 的 IC_{50} 值见表 1, 各组量-效相关系数 $R^2 > 0.9$ 。结果显示, 顺铂单独给药 24 h 和 72 h 对 3 种细胞系具有统计学意义, 但 2 种 LKB-1 表达差异的肿瘤细胞系相比差异不显著, 对正常细胞 LO2 细胞毒性高于肿瘤细胞系; 黄芩苷对 LKB-1 高表达细

胞系单独给药 24 h 和 72 h 具有统计学意义。

表 1 顺铂和黄芩苷对 3 种细胞系增殖抑制作用的 IC₅₀ 值
Tab. 1 IC₅₀ values of cisplatin and baicalin for inhibition of growth of three cells

药物	给药时间/h	IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹		
		A549	HepG2	LO2
顺铂	24	1.10±0.04 ¹⁾	1.44±0.04 ¹⁾	0.26±0.02 ¹⁾
	72	0.66±0.03	0.89±0.04	0.39±0.03
黄芩苷	24	32.66±1.16	38.30±2.54 ¹⁾	56.54±6.67 ¹⁾
	72	32.37±1.89	28.66±0.74	89.43±4.94

注：与 72 h 组比较，¹⁾P<0.05。
Note: Compared with treated for 72h, ¹⁾P<0.05.

2.2 等效线图对顺铂和黄芩苷联合给药方案的定性评估

顺铂和黄芩苷按“1.3.1”项下方法处理，IC₅₀ 等效线图见图 2。在等效线图中，药物剂量进行标准化处理后，单独给药处理 IC₅₀ 剂量以 1.0 表示在横、纵坐标轴。对于 LKB-1 表达差异的 2 种肿瘤细胞系，方案 I 表现加和作用，方案 II 有拮抗作用趋势，方案 III 有协同作用趋势。然而，对于 LKB-1 高表达的正常细胞系 LO2 方案 II 则具有明显协同作用，方案 III 具有拮抗作用。

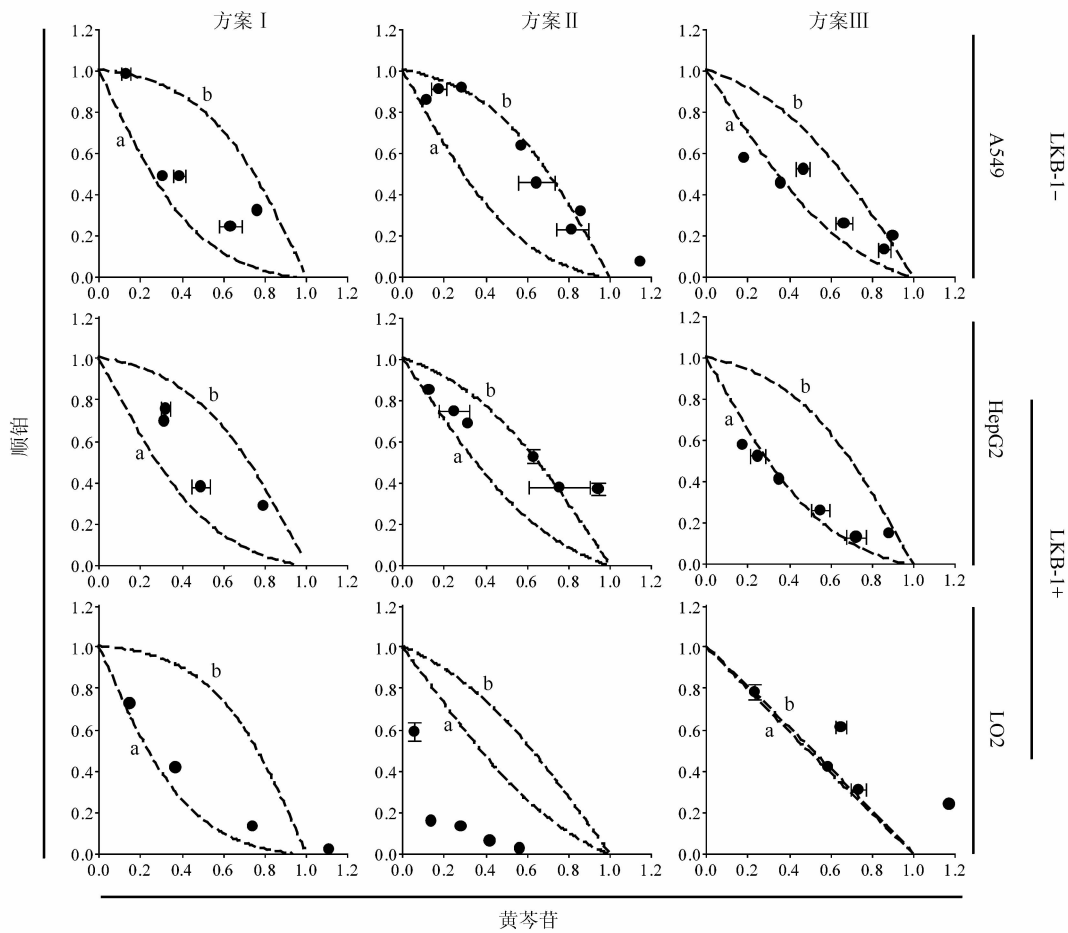


图 2 顺铂和黄芩苷联合给药方案等效线图
Fig. 2 Isobolograms for cisplatin and baicalin with each schedule

2.3 Chou-Talalay 对顺铂和黄芩苷联合给药方案的定量评估

CI 对顺铂和黄芩苷联合方案的定量评估见表 2。对于 LKB-1 表达差异的肿瘤细胞系方案 I 的 A549 的 CI=0.80 低于 HepG2 的 0.96，而方案 III 中两者 CI 值相近。此外，对 LKB-1 高表达的正常 LO2 细胞系 CI 定量分析结果显示方案 II 在给予顺铂后给予黄芩苷具有明显协同作用。

表 2 联合给药方案中 50%抑制率的联合指数
Tab. 2 Effects of treatment schedules on the combination index (CI)

细胞系	CI ₅₀ 值		
	方案 I	方案 II	方案 III
A549(LKB-1-)	0.80	0.97	0.82
HepG2(LKB-1+)	0.96	0.98	0.75
LO2(LKB-1+)	0.87	0.64	1.02

2.4 细胞周期分布和凋亡

由表 1 药物单独给药 24 h 的 IC_{50} 范围设定细胞周期和凋亡试验顺铂、黄芩苷给药剂量分别为 1, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。流式细胞仪检测各细胞系在单独给药以及 3 种联合给药方案下细胞周期分布, DNA 含量直方图见图 3A。对于 LKB-1 表达差异的肿瘤细胞系细胞周期分布无显著差异, 而 LKB-1 高表达的 LO2 在方案 I 和方案 II 下, 细胞周期相比顺铂单独给药组 G_1 期增加 10%~20%左右。亚二倍体凋亡峰检测细胞凋亡结果见图 3B, 顺铂第 1 天给药(C1)相比第 2 天给药(C2)凋亡有显著差异, 而黄芩苷第 1 天给药(B1)和第 2 天(B2)之间无显著差异。对于 LKB-1 低表达的 A549 细胞系相比 LKB-1 高表达的 HepG2 和 LO2 在方案 I 给药具有统计学意义。对于方案 III 下肿瘤细胞系的凋亡相比 C2 或 B2 具有统计学意义, 而正常 LO2 细胞系无显著差异。

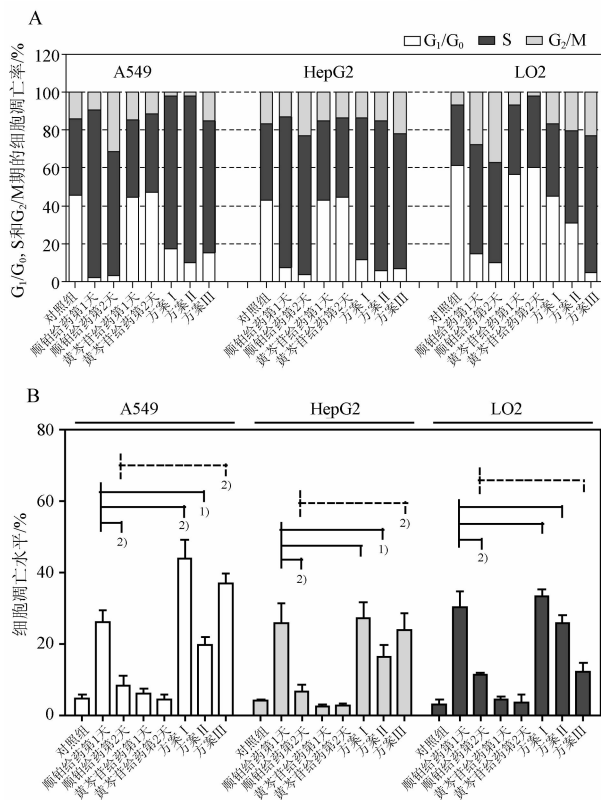


图 3 顺铂和黄芩苷单独或联合方案给药在 LKB-1 表达差异细胞系的 DNA 含量直方图(A)和凋亡分析结果(B)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Histograms of DNA content (A) and apoptosis (B) in LKB-1 deficient or sufficient cells after 72 h with Cisplatin and baicalin applied alone and in combination

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

3 讨论

本实验运用 3 种不同给药方案的序贯疗法来阐明药物的相互作用机制, 并通过定性以及定量的药物相互作用评估方法评估了具有 LKB-1 表达差异细胞细胞在不同给药方案的联合效应。等效线图解法结果表明方案 I 和方案 III 的黄芩苷和顺铂联合都具有一定协同作用趋势, 其中方案 III 在顺铂前给予黄芩苷处理对于肿瘤细胞系具有更显著的协同作用; 低剂量黄芩苷和中高剂量顺铂联合也具有协同作用; 图 2 表明 A549 及 HepG2 细胞系的等效点位于等效线以下, 表 2 定量分析 CI 值分别为 0.82, 0.75。然而, 对于正常的 LO2 细胞系, 方案 III 中的黄芩苷具有保护作用, 等效点整体趋势位于等效线以上, 相应低剂量黄芩苷和高剂量顺铂的 CI 为 1.02, 显示了 Chou-Talalay 的联合指数 CI 定量结果基本和等效线图一致。此外, 进一步对方案 III 下细胞周期和凋亡研究发现, 对于低表达 LKB-1 细胞系 A549, 相比高表达 LKB-1 细胞系 HepG2, LO2 具有显著地凋亡效应, 显示出黄芩苷对顺铂的凋亡效应具有促进作用。这些研究可以发现, 黄芩苷与顺铂联用具有一定的协同作用。协同的机制可能来源于黄芩对 AMPK 的激活在先, 而顺铂的杀伤在后。这种效应在 LKB-1 低表达细胞系中更为显著。

对于黄芩苷激活 AMPK 的研究背景, 黄芩苷在 LKB-1 低表达的细胞系中能够通过 $\text{CaMKK}\beta$ 途径激活 AMPK。AMPK 在涉及能源代谢外也调控了癌症的发生。黄芩苷单独给药效价(24 h 的 IC_{50} 约为 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)不及顺铂效价(24 h 的 IC_{50} 约为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 因此, 将黄芩苷单独开发为抗肿瘤药物可能会面临效价低的问题。黄芩苷联合顺铂对于肿瘤细胞系具有协同作用, 而对正常细胞系具有保护作用。同时, 细胞凋亡结果显示和等效线图解, Chou-Talalay 法基本一致, 区别在于 LKB-1 低表达的 A549 同 LKB-1 高表达的 HepG2, LO2 细胞系。在 A549 细胞系中, 方案 I 和方案 III 的凋亡率明显高于 LKB-1 高表达细胞系, 方案 III 的凋亡增幅大于方案 I。这可能与黄芩苷通过 CaMKK 激活 AMPK 具有一定关联, 但仍需要进一步的分子机制研究证实。

REFERENCES

[1] GUO M, ZHANG N, LI D, et al. Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor- κB and p38

- phosphorylation in *S. aureus*-induced mastitis [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(2): 125-130.
- [2] SRINIVAS N R. Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives [J]. Xenobiotica, 2010, 40(5): 357-367.
- [3] HARDIE D G. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2164-2172.
- [4] ENGELMAN J A, CANTLEY L C. Chemoprevention meets glucose control [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3(9): 1049-1052.
- [5] WOODS A, JOHNSTONE S R, DICKERSON K, et al. LKB 1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade [J]. Curr Biol, 2003, 13(22): 2004-2008.
- [6] HAWLEY S A, BOUDEAU J, REID J L, et al. Calmodulin-dependent protein kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase in mammalian cells [J]. Cell Metab, 2005, 2(1): 9-19.
- [7] FENG F, LIU W. Tumor suppression mechanism of LKB1 [J]. Chin J Cell Biol(中国细胞生物学报), 2011, 33(3): 313-317.
- [8] BOUDEAU J, SAPKOTA G, ALESSI D R. LKB 1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity [J]. FEBS Lett, 2003, 546(1): 159-165.
- [9] MA Y, YANG F Z, WANG Y, et al. CaMKK is involved in AMP-activated protein kinase activated by baicalin in LKB-1 deficient cell lines [J]. PloS One, 2012, 7(10): e47900.
- [10] ABU-SURRAH A S, KETTUNEN M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin [J]. Curr Med Chem, 2006, 13(11): 1337-1357.
- [11] ENGELMAN J A, CANTLEY L C. Chemoprevention meets glucose control [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3(9): 1049-1052.
- [12] MORGILLO F, MARTINELLI E, TROIANI T, et al. Sequence-dependent, synergistic antiproliferative and proapoptotic effects of the combination of cytotoxic drugs and enzastaurin, a protein kinase C β inhibitor, in non-small cell lung cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1698-1707.
- [13] ZHAN Y Y, CHEN Y, ZHUANG J J, et al. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(11): 897-904.
- [14] TAKARA K, FUJITA M, MINEGAKI T, et al. Treatment schedule-dependent effect of 5-fluorouracil and platinum derivatives in colorectal cancer cells [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 45(3): 272-281.
- [15] KANO Y, AKUTSU M, TSUNODA S, et al. Sequence-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines *in vitro* [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 54(6): 505-513.
- [16] TALLARIDA R J. An overview of drug combination analysis with isobolograms [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(1): 1-7.
- [17] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 440-446.
- [18] WANG S Q, ZHU Y Z, ZHENG X B. Study and application of Chou-Talalay method for anti-tumor drug combination [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(4): 449-453.

收稿日期: 2013-12-08

醉香含笑心材挥发性成分 GC-MS 分析及抑制 MDA-MB-231 细胞生长与诱导其凋亡作用

宋晓凯^{1a}, 曹志凌^{1a}, 郭雷^{1b}, 李志华^{1a,2} (1.淮海工学院, a.化学工程学院; b.海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2.中国矿业大学化工学院, 江苏 徐州 221116)

摘要: 目的 分析醉香含笑心材提取物(extract of trunk of *Michelia macclurei* Dandy., ETMMD)的挥发性成分, 并考察其对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外生长抑制作用及诱导其凋亡的作用。方法 水蒸气蒸馏法提取醉香含笑心材的挥发性成分, 用气-质联用(GC-MS)技术进行分析, 并用峰面积归一化法测定各成分相对含量; 采用 MTT 法及流式细胞术分别检测 6.25, 12.50, 25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ETMMD 对 MDA-MB-231 细胞体外生长抑制作用及诱导其凋亡的作用。结果 共检出 42 个色谱峰, 确定了其中 41 种化合物, 占该挥发性成分总量的 99.73%。ETMMD 对 MDA-MB-231 细胞的抑制率呈浓度依赖关系。结论 ETMMD 的挥发性成分以倍半萜烯及不饱和酮、不饱和酯类为主, 此外还包括高级脂肪酸酯, 以及一些甾体类化合物。ETMMD 能明显抑制 MDA-MB-231 细胞的生长。浓度为 6.25, 12.50, 25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ETMMD 可明显诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡。

关键词: 醉香含笑心材挥发性成分; 气相色谱-质谱分析; MDA-MB-231 细胞; 生长抑制; 凋亡诱导

中图分类号: R284.1; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2014)08-0911-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.002

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20872110)

作者简介: 宋晓凯, 男, 博士, 教授 Tel: (0518)85895408 E-mail: sxk581214@163.com