

- [24] WU S, XING D. Mechanism of mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis under photofrin-mediated photodynamic therapy [J]. J Xray Sci Technol, 2012, 20(3): 363-372.
- [25] SIBRIAN-VAZQUEZ M, JENSEN T J, VICENTE M G. Porphyrin-retinamides: synthesis and cellular studies [J]. Bioconjug Chem, 2007, 18(4): 1185-1193.
- [26] LIU Q H, XIAO L N, LI X Y, et al. Molecular mechanisms of the killing effects on Ehrlich ascites tumor cells by sonochemical-activated protoporphyrin IX [J]. Acta Zoolog Sin (动物学报), 2008, 54(5): 846-854.
- [27] LEI W, XIE J, HOU Y, et al. Mitochondria-targeting properties and photodynamic activities of porphyrin derivatives bearing cationic pendant [J]. J Photochem Photobiol B, 2010, 98(2): 167-171.
- [28] AMO T, KAWANISHI N, UCHIDA M, et al. Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937 [J]. Cell Biochem Funct, 2009, 27(8): 503-515.
- [29] NOWAK-STEPNIEWSKA A, WIKTORSKA K, MAMECKI M, et al. Cytotoxicity of PP(Arg)(2)- and Hp(Arg)(2)-mediated photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in prostate carcinoma in vitro [J]. Acta Biochim Pol, 2011, 58(4): 497-505.
- [30] FURRE I E, MØLLER M T, SHAHZIDI S, et al. Involvement of both caspase-dependent and independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells [J]. Apoptosis, 2006, 11(11): 2031-2042.
- [31] LAI J C, LO P C, NG D K, et al. BAM-SiPc, a novel agent for photodynamic therapy, induces apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells by a direct mitochondrial action [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(4): 413-418.
- [32] WU S, ZHOU F, ZHANG Z, et al. Bax is essential for Drp1-mediated mitochondrial fission but not for mitochondrial outer membrane permeabilization caused by photodynamic therapy [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(2): 530-541.
- [33] CHWILKOWSKA A, KULBACKA J, SACZKO J. Death of tumor cells. Photodynamic reaction in apoptosis induction in cancer cells [J]. Pol Merkuri Lekarski, 2011, 30(175): 45-48.

收稿日期: 2012-06-21

Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况

王士群^{1,2}, 朱宇珍¹, 郑学宝^{2*} (1.广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023; 2.广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要: 联合用药已经广泛地运用于多种疾病的治疗过程中, 如抗菌、抗病毒、抗肿瘤等治疗领域。然而, 目前为止国内外学者关于联合用药后疗效的评价标准仍没有达成一致, 尤其是药物协同作用的评价。Chou-Talalay 是目前被广泛认可的药物协同作用定量分析方法。本文针对抗肿瘤研究领域, 对该法的研究应用概况作一综述, 为合理用药的研究提供线索和参考。

关键词: Chou-Talalay; 抗肿瘤; 联合用药; 定量分析

中图分类号: R285.6; R979

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)04-0449-05

Study and Application of Chou-Talalay Method for Anti-tumor Drug Combination

WANG Shiqun^{1,2}, ZHU Yuzhen¹, ZHENG Xuebao^{2*} (1.Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2.Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT: Drug combination has been widely used in the therapeutic process of many serious illness, such as anti-bacterial, anti-viral and anti-tumor therapeutic, etc. However, so far the domestic and overseas scholars about evaluation standards of the curative effects have not arrived at any agreement yet, especially the synergistic effect of drug combination. Chou-Talalay method is now generally accepted as synergy quantitative analysis method for drug combination. Aiming at the anti-tumor research field, we comprehensively reviewed the method to lay a good basis for the rational use of drugs.

KEY WORDS: Chou-Talalay method; anti-tumor; drug combination; quantitative analysis

肿瘤是导致人类死亡的一个主要原因。世界卫生组织 2010 年肿瘤患者死亡率调查报告显示, 全

球每年有 760 多万人被肿瘤夺去生命。根据近年文献报道, 对于长期给予单一药物治疗的肿瘤患

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

Tel: (0759)2388405

E-mail: 731560548@qq.com

*通信作者: 郑学宝, 男, 博士, 教授, 博导

Tel:

者, 机体将通过基因突变、蛋白表达变化、干细胞靶点表达缺失等机制逃避抗肿瘤药物的杀伤^[1]。相反, 由药物联合作用所启动的新靶点或蛋白表达调控变化将有可能避免机体对药物耐受, 甚至出现提高疗效、降低毒性的效果^[2]。抗肿瘤药物联合作用所带来的优势促使国内外学者广泛地开展了对该领域的研究。以往, 临床上通常根据专业知识来选择联用方案, 但是最终疗效却难以进行定量的描述, 致使方案难以得到推广。近些年, 药物联合作用的评价方法不断被引入, 例如, 早在 1995 年由 Greco 等^[3]所发表的综述关于联合用药评价方法就已多达 13 种。可惜的是, 这些评价方法大多成为各家之言, 难以将其研究的成果应用于临床实践。因此, 建立一种可靠的联合用药评价方法迫在眉睫。

Chou-Talalay(又称中位药效法, median-drug effect analysis; 联合指数法, combination index method)是由 Chou 和 Talalay 于 1984 年共同建立的药物联合作用的定量方法。于 2005 年, 由 Martin 等^[4]组成的团队针对 Chou-Talalay 的数学模型开发出第 3 代药物联合作用量-效分析软件“CompuSyn”, 使得该法的应用步入高效的信息技术时代。2010 年 Chou 等^[5]将该法的理论进一步完善, 并对其在联合用药中研究进行总结。Chou-Talalay 凭借其科学的原理, 完备的数学模型以及简便的实验操作等优点, 已成为抗肿瘤药物联合研究中应用最为广泛的方法之一。

1 Chou-Talalay

原则上, 联用药物在体内相互作用之后必将引起药物自身药动学及药效学参数发生连续的变化, 这些参数的变化将从定性及定量的角度反映药物之间的相互作用。该方法正是基于这一原则, 通过质量守恒定律中的 Median-effect 方程作为媒介, 将药物之间以及药物代谢一级和多级动力学之间建立起联系^[6]。最终, 给出的联合指数(combination index, CI)不仅能用于定量描述联合用药的相加作用(additive effect)、协同作用(synergism)以及拮抗作用(antagonism), 同时又能对给定量-效水平下的效应进行定性描述, 其结果将分别由抑制率-联合指数图(Fa-CI)以及等效线图(isobologram)表示。

1.1 Chou-Talalay 数学模型

Chou-Talalay 的数学模型是质量守恒定律中

的 Median-effect 方程衍生出的方程, 该方程也衍生出生物化学及生物物理学领域中的 Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch, Scatchard 方程等。由 Median-effect 方程衍生出的 Chou-Talalay 的数学模型见图 1, 其中图 1A 是该法的理论基石, Median-effect 方程以及衍生方程。图 1B 展示了由 Median-effect 方程推导出联合指数公式的过程。在推导过程中引入了抑制率(Fa)、存活率(Fu)、单用剂量(D)、联用剂量(Dx)、半数有效量(Dm)、反应动力学级数(m)以及剂量减小指数(DRI)多个参数。最终推导得出药物联合指数的一般式为:

$$CI = \sum_{i=1}^n \frac{(D)_i}{(Dx)_j}$$

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

现了简便性及灵活性(例如, 将药物的作用机制与剂量单位独立); 可量化描述的联合效果(例如, 数字化的 CI 值); 高效及经济的实验要求(例如, 允许少量测量数据以及小规模动物实验)等显著的优点。关于该法更多细节可见参考文献^[5-7]。

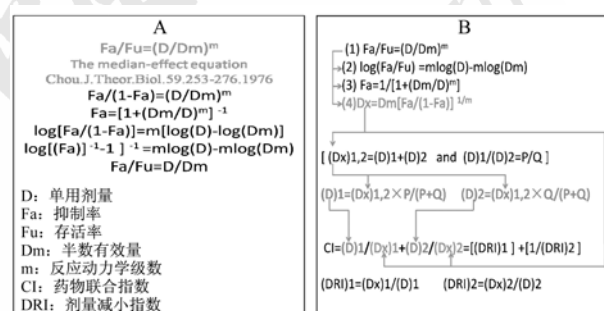


图 1 Chou-Talalay 的数学模型

Fig 1 A mathematical model of Chou-Talalay method

1.2 Chou-Talalay 结果分析

在确定药物数目、有无竞争作用以及剂量配比的条件下, 通过对 MTT 获得的量-效关系数据进行等量效比较和等效量比较处理而对药物联合作用进行定性及定量描述。“CompuSyn”软件根据 Chou-Talalay 建立的数学模型, 计算得出 Dm, m, CI 值。通过 CI 值的数值大小可以定量判断药物间相互作用的强度以及性质(CI>1 为拮抗作用, CI=1 为相加作用, 0.7<CI<1 为轻微协同作用, 0.3<CI<0.7 为协同作用, CI<0.3 为强协同作用)。与此同时, “CompuSyn”将会根据所得数据绘制等价剂量效应比的 Fa-CI 图以及等价效应剂量比的 Isobologram 图, 见图 2~3。根据观测比较实际

测量点落入图中所在区域的位置,可直观判断联用药物在剂量、效应二者之间的关系,以及变化趋势。

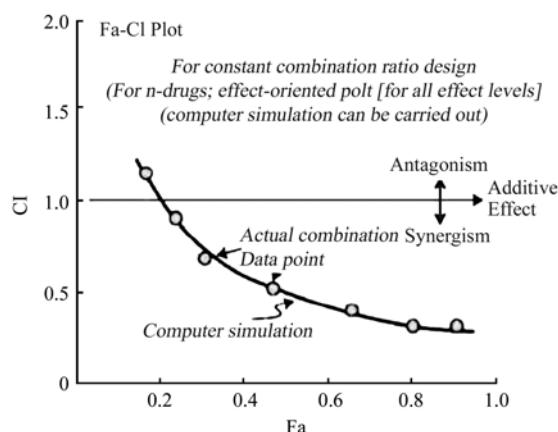


图2 Fa-CI图
Fig 2 Fa-CI Plot

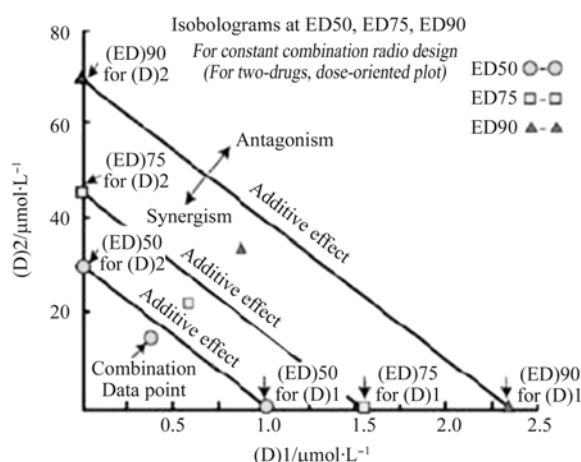


图3 ED50, ED75, ED90的等效线图
Fig 3 Isobolograms at ED50, ED75, ED90

2 Chou-Talalay 应用进展

Chou-Talalay 凭借其简便、高效、经济的优点,已在多个领域获得了广泛的认可。通过汤普森科学网络(Thompson ISI Web of Science)检索显示,在国际上 407 种生物医学杂志上报道的相关科技论文多达 4 060 篇。根据近年来相关文献资料发现,Chou-Talalay 应用主要集中在细胞毒类与非细胞毒类抗肿瘤药物的联用。

2.1 抗肿瘤药物联合的应用

抗肿瘤用药联合方式灵活多变,根据药物的组合、比例、剂量、时间、次序等处理因素的不同,联用效果也千差万变。临床上通常对健康状况良好的早期肿瘤患者一般采用 2~3 种非竞争性的化疗药物大剂量冲击疗法替代长期小剂量联合

治疗,如主要用于乳腺癌治疗的 CAF(环磷酰胺、阿霉素、氟尿嘧啶),可一次性大规模杀灭癌细胞。

细胞毒类与具有分子靶向性的非细胞毒类药物联合恰当,能够保持细胞毒类药物单用的剂量等价抑制率的效应下减少毒性药物的用量,增加药物的选择性。这种联用模式部分研究成果已在临床上获得推广。在前期临床研究过程中,联合用药疗效的评价方法是不可或缺的一个环节,这为 Chou-Talalay 的应用提供了平台。例如, Jiang 等^[8]应用 Chou-Talalay 定量描述了索拉非尼(sorafenib)和培美曲塞(pemetrexed)给药次序的不同对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR TKI)耐受的非小细胞肺癌细胞系(NSCLC)的协同抑制作用。结果表明,在培美曲塞用药后再给予索拉非尼将会抑制前者所激活的丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路,通过这一机制产生协同作用。这使得 Chou-Talalay 能够评价更为灵活的药物联用方案。此外, Bennett 等^[9]根据交叉物种基因组学得到三阴性乳腺癌(TNBC)几个标记基因,运用 Chou-Talalay 定量分析细胞周期关卡激酶 1(CHK1)抑制剂 UCN-1, AZD7762 和核苷酸还原酶 1, 2(RRM1, 2)抑制剂吉西他滨在 TNBC 中联用的协同作用。这使前沿的生物信息学初步应用在 Chou-Talalay 中,体现了该法具有广泛的包容性。

2.2 抗肿瘤药物与其他药物联合的应用

最新的研究发现,某些非癌症治疗药物(如抗炎药、抗病毒药等)联合细胞毒类或非细胞毒类抗肿瘤药物也同样能获得令人满意的协同治疗或辅助治疗作用。由耶律大学的 Yung-Chi Cheng 教授所带领的团队研究发现传统中药复方黄芩汤提取物 PHY906 具有明显的癌症辅助治疗作用,它能够通过多种途径缓解结肠癌治疗新药伊立替康(CPT-11)带来的严重胃肠道不良反应^[10-11]。

此外,在抗肿瘤药物和其他处理因素上也有令人惊喜的发现,例如 Borges 等^[12]应用 Chou-Talalay 定量评价极光激酶抑制剂 ZM447439 与 γ 射线放射治疗恶性胶质瘤细胞的协同作用。这使 Chou-Talalay 应用范围有了较大的突破,使得药物联合作用的评价不仅仅局限于药物之间的相互作用,也扩展到 pH 值、辐射等处理因素上。此外, Ocio 等^[13]为了解决骨髓瘤患者在硼替佐米(bortezomib)或雷利度胺(lenalidomide)与类固醇类药物联用后易复发的缺陷。通过体外和体内实验研究发现,

硼替佐米或雷利度胺与帕比司他(panobinostat, LBH589)、地塞米松(dexamethasone)三药联合将能够延长药效时间。这也将 Chou-Talalay 由常规的体外细胞实验带入了小规模的内动物实验中。

3 Chou-Talalay 与常见联合用药评价方法的优缺点对比

在抗肿瘤治疗研究中，联合药效评价方法的研究为药物组方评价或组方定量设计提供理论依据，具有很高的临床应用价值。虽然临床前期研究支持以上观点，但是在发展具有靶向性的联合

方案过程中仍面临很多挑战。目前应用广泛的联合用药的评价方法有金正均 Q 值法^[14]、参数法^[15]、相对效应法^[16]、等效线图解法^[17-18]、反应曲面法^[19]等。由剑桥大学的 Chou 和约翰霍普金斯大学的 Talalay 共同建立的 Chou-Talalay 凭借其自身的优势已为国内外该领域学者所采用，但是它不是绝对优于其他评价方法，也存在自身的不足之处。表 1 列举出几类常用方法的优缺点对比。无论使用哪一种方法都有自身的不足，研究者可根据实验需求选择一种或多种方法。

表 1 几类常用联合用药评价方法的优缺点

Tab 1 Advantages and disadvantages of several kinds of commonly used evaluation method of drug combination

评价方法	优点	缺点
金正均 Q 值法	①不必取半量(Dm)或半效(Em)，直接利用原始量-效应水平比较，且两药效应也不必相同。②操作简便。	①适合两种药物联合分析。②信息量少。③只能定性。
参数法	①分析引入专业要求和统计要求两部分组成。②建立在药动学基础上，可对数据进行系统分析。③数据丰富，结果可靠。④在应用过程中可不考虑药物数目、是否作用于受体的限制。	①需要较高的统计学知识。②工作量大。③适用于能用 Hill 方程进行拟合的数据。
相对效应法	①通过将两种药物单独作用效应乘积与单一药物同浓度下实际测得的联合效应直接相比确定联合作用。②操作简便。	①未涉实验组内的变异，所以不能够计算置信区间。②在多数情况下通过重复实验也缺乏可靠性。③只能定性。
等效线图解法	①结果直观可靠。②可用于非恒定剂量比的药物联合。③可用于具有完全或部分竞争拮抗的药物联合。	①适用于药疗效相似两药联合。②要求药物作用具有 S 型量-效曲线关系。③只能定性。
反应曲面法	①二维-三维图谱显示，结果全面可靠。②根据谱图可得到最佳联合模式。③能够定性定量描述。	①数学模型复杂，工作量大。②需要较高的统计学知识。③要求药物作用具有 S 型量-效曲线关系。④适用于两药联合。
Chou-Talalay	①可用于多药联合。②能够用于非恒定剂量比的联合。③能够定性定量描述。④仅需要小规模的筛选工作	①无法给出非恒定比的药物联合的 Fa-CI 图，只能给出经过标准化处理后的等效线图。

4 结语

药物联合作用是一个随剂量变化的动态过程，表现为此剂量协同，彼剂量拮抗的现象。然而，在临床前期研究过程中实验者是不可能对全剂量进行探索；在临床研究中又将受到样本量及伦理学因素的制约，这些潜在的困难使得药物联合作用评价方法的研究尤为迫切。在临床前研究需要一个简便、准确的评判标准来衡量药物之间的相互作用；临床研究中也迫切需要前期研究结果来进一步证实抗肿瘤药物之间的协同作用，以此为患者减轻痛苦。Chou-Talalay 凭借其显著优点或许能够从目前众多的评价方法中异军突起，成为临床前期抗肿瘤药物联合作用统一的评判标准。然而，目前要实现这样的统一，它将还需要克服很多的难题。例如，仅通过药物体外抑制率的数据，很难完全解释协同作用的定义；同时该法 DRI 对联用药物的安全性评估还有待商榷；此

外，还无法考虑实际的专业界值，使得该法的理论模型偏于理想化。但是，通过本综述可以预见，随着国内外学者不断深入的研究，Chou-Talalay 将会为抗肿瘤联合用药的研究带来新的机遇和挑战。

REFERENCES

[1] GORDON R R, NELSON P S. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance [J]. Drug Resist Updat, 2012, 15(1/2): 123-131.

[2] TORTORA G, BIANCO R, DANIELE G, et al. Overcoming resistance to molecularly targeted anticancer therapies: rational drug combinations based on EGFR and MAPK inhibition for solid tumours and haematologic malignancies [J]. Drug Resist Updat, 2007, 10(3): 81-100.

[3] GRECO W R, BRAVO G, PARSONS J C. The search for synergy: a critical review from response surface perspective [J]. Pharmacol Rev, 1995, 47(2): 331-385.

[4] CHOU T C, MARTIN N. CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values [J/OL]. ComboSyn, 2005. <http://www.combosyn.com>

- Combosyn.com/ for videodemonstration.
- [5] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay Method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [6] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 68(3): 621-681.
- [7] CHOU T C. The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research [J]. *Integr Biol(Camb)*, 2011, 3(5): 548-559.
- [8] JIANG Y, LI C, MA Y, et al. The inhibition of the pemetrexed-activated MAPK pathway via sorafenib is involved in the synergistic mechanism of sorafenib subsequent potentiation of pemetrexed cytotoxicity in EGFR TKI-resistant cell lines [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(5/6): 551-561.
- [9] BENNETT C N, TOMLINSON C C, MICHALOWSKI A M, et al. Cross-species genomic and functional analyses identify a combination therapy using a CHK1 inhibitor and a ribonucleotide reductase inhibitor to treat triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(4): R109.
- [10] LIU S H, CHENG Y C. Old formula, new Rx: The journey of PHY906 as cancer adjuvant therapy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(3): 614-623.
- [11] LAM W, BUSSOM S, GUAN F, et al. The four-herb chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(45): 45-59.
- [12] BORGES K S, CASTRO-GAMERO A M, MORENO D A, et al. Inhibition of aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(3): 405-414.
- [13] OCIO E M, VILANOVA D, ATADJA P, et al. *In vitro* and *in vivo* rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2010, 95(5): 794-803.
- [14] JIN Z J. The additive of drug combination [J]. *Acta Pharmacol Sin(中国药理学报)*, 1980, 1(1): 70-73.
- [15] ZHENG Q S, SUN R Y. Analysis of multidrug effects by parameter method [J]. *Acta Pharmacol Sin(中国药理学报)*, 1998, 19(3): 37-42.
- [16] BIJNSDROOP I V, GIOVANNETTI E, PETERS G J. Analysis of drug interactions [J]. *Methods Mol Biol*, 2011(731): 421-434.
- [17] TALLARIDA R J. Combination analysis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010(678): 133-137.
- [18] TALLARIDA R J. Quantitative methods for assessing drug synergism [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(11): 1003-1008.
- [19] LEE S I. Drug interaction: focusing on response surface models [J]. *Korean J Anesthesiol*, 2010, 58(5): 421-434.
- 收稿日期: 2012-07-03

托吡酯的合成研究进展

苗宇^{1,2}, 关永霞^{1,3*} (1.鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276000; 2.国家手性制药工程技术研究中心, 山东 临沂 276000; 3.国家哺乳动物细胞高效表达工程实验室, 山东 临沂 276000)

摘要: 目的 介绍托吡酯的研究背景和合成研究进展。方法 综合国内外报道的文献, 阐述托吡酯的合成方法。结果 重点列出了关键中间体的合成方法以及酯化法、氨解法、催化氢化法和水解法 4 种托吡酯的合成方法, 分析各方法特点。

结论 氨解法是托吡酯合成方法的主要研究方向。

关键词: 托吡酯; 合成; 进展

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)04-0453-04

Progress in Synthesis of Topiramate

MIAO Yu^{1,2}, GUAN Yongxia^{1,3*} (1.Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Linyi 276000, China; 2.National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi 276000, China; 3.National Mammalian Cells Efficiently Express Engineering Laboratory, Linyi 276000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the background and current synthesis progress of topiramate. **METHODS** To review both domestic and international published reports regarding the synthesis of topiramate. **RESULTS** Made a list of synthesis methods of a key intermediate and four synthesis methods of topiramate including esterification, ammonolysis, catalytic hydrogenation and hydrolyzation and analyzing characteristics of synthesis methods. **CONCLUSION** The method of ammonolysis provides us a main research direction for efficient synthesis topiramate.

KEY WORDS: topiramate; synthesis; progress

作者简介: 苗宇, 男, 硕士, 工程师 Tel: 13581069216 E-mail: mystery02@163.com *通信作者: 关永霞, 女, 硕士, 工程师 Tel: (0539)5030626 E-mail: jmsgyx@163.com