

5-FU 和黄芩苷在人类恶性上皮瘤细胞系中体外联合给药方案依赖性效应研究

王士群¹, 朱宇珍², 叶华², 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:目的 对黄芩苷和 5-FU 在不同给药方案联合效应的依赖性进行研究。方法 通过体外人恶性肿瘤细胞系和正常细胞系的抗细胞增殖试验、细胞周期分布及凋亡试验, 分别对应用黄芩苷和 5-FU 3 种联合方案(同时给药或序贯给药)进行效果评估。结果 等效线图解法和 Chou-Talalay 法的定性定量评估结果表明, 相比同时给药方案, 5-FU 给药前给予适当剂量的黄芩苷不仅具有更显著的协同抗肿瘤活性, 而且还可减小 5-FU 对正常细胞 LO2 的毒性。结论 黄芩苷和 5-FU 联合的协同和拮抗作用具有给药方案依赖性。机制可能是黄芩苷促进了 5-FU 的 S 期细胞周期捕获, 以此限制了细胞通过细胞周期的能力。相反, 对于 5-FU 后给予黄芩苷对肿瘤细胞系表现出拮抗效应, 而正常细胞系表现出协同作用。

关键词: 5-氟尿嘧啶; 黄芩苷; 给药方案依赖; 等效线图解法; Chou-Talalay 法

中图分类号: R969.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)02-0129-05

Study on Schedule-dependent Synergism and Antagonism of the Combination of 5-FU and Baicalin in Human Carcinoma Cells *in Vitro*

WANG Shiqun¹, ZHU Yuzhen², YE Hua², ZHENG Xuebao^{2*} (1.Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2.Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate whether the addition of baicalin to 5-FU is able to increase their anti-tumor activity and to establish an effective schedule of combined treatment. **METHODS** The effects on cancer cell proliferation, cell cycle distribution, and apoptosis were evaluated in three different combination schedules (concomitant treatment, sequential treatment with baicalin followed by 5-FU, or 5-FU followed by baicalin) in a panel of human carcinoma and normal cells. **RESULTS** Isobologram and Chou-Talalay were respectively applied to qualitative and quantitative assessment of the drug combination. The results showed that compared with concomitant treatment, sequential treatment with baicalin followed by 5-FU not only increased the anti-tumor effects, but also reduced the toxicity to normal cells(LO2). **CONCLUSION** The combination of baicalin and 5-FU can provoke different synergism and antagonism depending on the treatment schedule. These effects are accompanied by the arrest of the surviving cells in the S phase, thus limiting their ability to proceed through the cell cycle. In contrast, the sequential treatment with 5-FU followed by baicalin can attenuate the effects.

KEY WORDS: 5-FU; baicalin; schedule-dependent; isobologram; Chou-Talalay

黄芩苷(baicalin)是由黄芩中提取的一种黄酮类化合物, 具有显著的抗炎、抗肿瘤等生物活性^[1-2]。黄芩苷可通过诱导自噬、凋亡、抑制细胞增殖等途径对多种系统性恶性肿瘤起到抗肿瘤活性作用^[3-4]。5-氟尿嘧啶(5-FU)以氟尿嘧啶脱氧核苷酸形式作为抗代谢物应用于实体肿瘤治疗, 如肝癌、胃癌等^[5]。目前, 临床上对肿瘤的治疗方案逐步从单一

药物向多药联合治疗转变。一方面, 联合用药可能通过启动新靶点或放大凋亡信号通路等机制避免单一用药所引起的机体肿瘤逃逸或协同促进对肿瘤细胞的增殖抑制^[6]; 另一方面, 可减小抗代谢类化疗药物的不良反应, 从而提高患者的生存质量^[7]。目前临床上对化疗药物在不同给药顺序中的联合方案已经有所应用, 但关于黄芩苷在联合给

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@sina.com

E-mail: 731560548@qq.com *通信作者: 郑学宝, 男, 博士, 教授 Tel:

药中的药物疗效以及科学的定性定量评估还比较少。不同的联合给药方案更有利于发现药物相互作用机制,因此,笔者所在实验室开展了这项研究工作。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

5-FU(上海旭东海普药业有限公司,批号:20111010)溶解于无菌蒸馏水,母液浓度为 $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;黄芩苷(南京泽朗药业,批号:ZL20110810,含量:98%)溶解于DMSO,母液浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,药品于 -20°C 储备,临用前分别用培养基稀释至所用浓度;噻唑蓝(MTT,美国MP生化公司)、碘化丙啶(PI,美国Sigma)分别用PBS配制成 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4°C 避光储备;DMSO、0.25%EDTA-胰酶均购自美国MP公司;RPMI-1640、胎牛血清(FBS)、青链霉素双抗均购自Hyclon。

1.2 仪器

HERAcell-150i 型 CO_2 气体细胞孵箱(Thermo Scientific);TS-100 倒置显微镜(Nikon);EXL-800 酶标仪(BIO-TEK);FACSCanto-II 型流式细胞仪(美国BD)。

1.3 细胞系及细胞培养

A549 人肺癌细胞系、HepG-2 人肝癌细胞系、LO2 人正常肝细胞系均购自中科院上海细胞库,培养于含 10% FBS、 $1\times 10^5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养。

1.4 细胞增殖抑制试验

1.4.1 给药方案 取对数生长期细胞,以每孔 2×10^3 个细胞浓度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,按照设定浓度范围(5-FU、黄芩苷浓度分别设定为 1, 5, 10, 50, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10, 25, 50, 75, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, DMSO 含量低于 0.2%)的 3 种联合方案给药,并设对照组、单独给药组,试验方案见图 1。方案 I:5-FU 和黄芩苷同时给药培育 24 h,无血清培养基洗 2 次,继续培养 48 h;方案 II:细胞首先以 5-FU 给药培养 24 h,无血清培养基洗涤 2 次,随后以黄芩苷给药培养 24 h,无血清培养基洗涤 2 次,继续培养 24 h;方案 III:给药顺序与方案 II 相反,其他步骤一样。

1.4.2 MTT 细胞毒性试验 MTT 试验检测药物对细胞的增殖抑制作用是依据只有活细胞线粒体中的琥珀色脱氢酶能够还原 MTT 生成水不溶性的

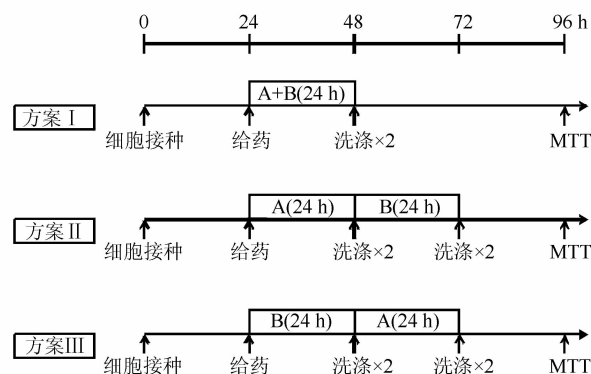


图 1 化疗药物给药方案概述

A-5-FU; B-黄芩苷

Fig 1 Overview of treatment schedules for chemotherapeutic agents

A-5-FU; B-baicalin

蓝色结晶甲臆,而死细胞不能。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 5-FU、黄芩苷单独作用的增殖抑制考察中,浓度分别设定在 $0.13\sim 130 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\sim 200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,给药处理时间为 24, 72 h。联合方案浓度设定按“1.4.1”项下。培养 72 h 后每孔加入 $20 \text{ }\mu\text{L}$ MTT, 37°C 继续培养 4 h,小心吸取培养基,每孔加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO,振荡 15 min,待结晶溶解后于 570 nm 波长处检测吸光度值(OD)。

1.5 联合效应分析

1.5.1 等效线图解法 使用等效线图解法分析药物联合效应是基于 Tallarida 建立的方法^[8]。由于该法能够用于分析不明确细胞毒性机制的药物以及多种化疗药物的量-效曲线^[9],所以被选用于黄芩苷的药物联用研究。等效线是基于既定细胞毒性效应(50%抑制率, IC_{50})的药物剂量绘制,通过 GraphPad Prism 5.0(GraphPad, USA)软件对药物单独作用的剂量标绘在横、纵坐标轴,连接 X、Y 轴上的等效点之间的线段为等效线。对于既定效应的实际测得的药物联合剂量位于等效线上或附近表示为相加作用,而位于等效线上端和下端则分别表示拮抗作用和协同作用^[10]。

1.5.2 Chou-Talalay 法 Chou-Talalay 法分析能够定量评估 2 种或 2 种以上药物的相互作用^[11],因其操作简便、定量准确而被广泛应用于抗肿瘤联合用药疗效的评价^[12]。联合作用指数(combination index, CI)通过 Chou-Talalay 中效定律公式计算得出,通过比较 5-FU 和黄芩苷单独作用与联合给药方案作用的等效剂量来评估药物间的相互作用。

CI 公式为: $CI=d_1/D_1+d_2/D_2$ (D_1, D_2 表示药物单独作用时产生效应 Fa 的剂量, d_1, d_2 表示药物联合作用时等效于 Fa 的剂量), 当 $CI>1$ 表示药物联用产生拮抗作用, $CI=1$ 表示产生相加作用, $CI<1$ 表示产生协同作用。

1.6 细胞周期分布和凋亡试验

将人恶性上皮瘤细胞系接种于 6 孔板中, 按设定浓度的 5-FU、黄芩苷单独给药或 3 种方案给药培养。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(细胞数约 1×10^6 个)于 70% 乙醇-20℃ 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, 用流式细胞仪检测细胞周期分布。细胞周期分布直方图用 ModFit LT 3.0 软件(BD)分析。细胞凋亡的检测是通过亚二倍体凋亡峰区

域设门方式圈定凋亡细胞峰比例。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制作用

5-FU 和黄芩苷不同的暴露时间对 3 种细胞系的增殖抑制作用敏感性考察, 用 t 检验检验统计学显著性差异, 药物在 3 种细胞系中暴露 24, 72 h 的 IC_{50} 值见表 1, 各药物在不同细胞系中的剂量和增殖抑制作用的相关系数 $R^2>0.9$ 。选择性指数(selectivity index, SI)为药物对正常细胞与肿瘤细胞的选择性。结果显示: ①5-FU 和黄芩苷在 24 h 或 72 h 的暴露时间中 IC_{50} 变化均具有统计学意义; ②不同暴露时间的 SI 不同, 5-FU 在 24 h 时 SI 高于 72 h 的 SI, 黄芩苷在 24 h 的 SI 低于 72 h 的 SI。虽然不同时间的 IC_{50} 有统计学差别, 但仍保持在同一个数量级上。

表 1 5-FU 和黄芩苷对 3 种细胞系增殖抑制作用的 IC_{50} 值($n=4, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 IC_{50} values of 5-FU and baicalin for inhibition of growth of three cells($n=4, \bar{x}\pm s$)

药物	暴露时间/ h	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			SI	
		A549	HepG2	LO2	LO2/A549	LO2/HepG2
5-FU	24	12.7 $\pm$ 1.35 ¹⁾	15.9 $\pm$ 1.00 ¹⁾	18.4 $\pm$ 0.81 ¹⁾	1.45	1.16
	72	4.1 $\pm$ 0.38	4.9 $\pm$ 0.58	3.7 $\pm$ 0.60	0.90	0.76
黄芩苷	24	32.4 $\pm$ 1.89 ¹⁾	31.3 $\pm$ 2.08 ¹⁾	67.3 $\pm$ 2.78 ¹⁾	2.08	2.15
	72	27.6 $\pm$ 1.74	23.9 $\pm$ 1.76	93.96 $\pm$ 5.90	3.40	3.93

注: 与 72 h 时比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with the groups at 72 h, ¹⁾ $P<0.05$

2.2 等效线图对 5-FU 和黄芩苷联合给药方案的定性评估

5-FU 和黄芩苷按“1.4.1”项下方案给药, IC_{50} 等效线图见图 2。每个试验设复孔, 图中数据点通过至少重复 5 次实验, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示。在等效线图中, 进行标准化药物剂量处理后, 单药 IC_{50} 剂量以 1.0 表示在横、纵坐标轴。结果表明, 对于方案 I、III, 5-FU 和黄芩苷给药, 联合的剂量点分布在等效线附近或下半部分, 表示具有相加作用或协同作用趋势; 而方案 II, 在 A549 细胞系中表现出相加作用, HepG2 细胞系中表现出拮抗作用, 在正常肝细胞 LO2 细胞系中起到协同作用。

2.3 Chou-Talalay 对 5-FU 和黄芩苷联合给药方案的定量评估

通过 Chou-Talalay 建立的联合指数方法对 5-FU 和黄芩苷联合方案的定量评估, 见表 2。由表 2 可见, 对于方案 I、III 的 CI 均 <1 , 表示协同作用, 其结果和等效线图解法定性分析的趋势相一致。此外, 定量分析结果显示方案 III 在肿瘤细

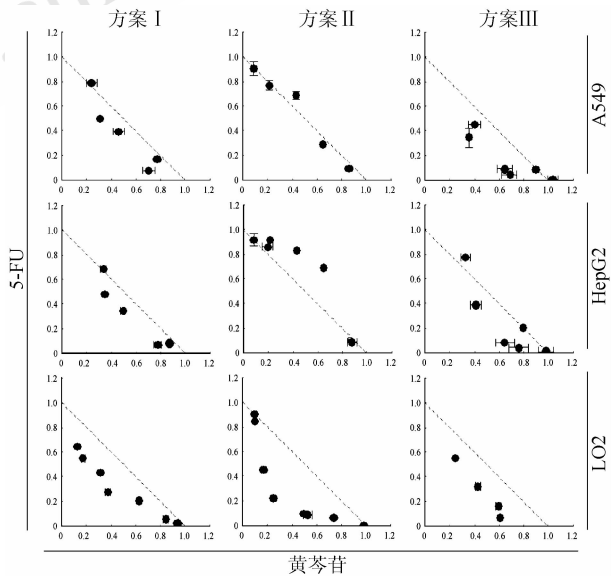


图 2 5-FU 和黄芩苷在各自的给药方案中的等效线图

Fig 2 Isobolograms for 5-FU and baicalin with each schedule

胞系中的协同作用相比方案 I 高出 0.1, 但对正常细胞系 LO2 虽有协同作用, 但却低 0.1。这些数据表明在 5-FU 给药前给予适当黄芩苷(方案 III)能够

起到协同促进细胞增殖抑制，并保护正常细胞的作用。对于方案Ⅱ具有不利因素，在肿瘤细胞系中表现拮抗作用(CI>1.0)，正常细胞系中表现协同作用(CI<1.0)。

表 2 3 种细胞系在不同给药方案中 50%抑制率的联合作用指数(CI₅₀)

细胞	CI ₅₀ 值		
	方案 I	方案 II	方案 III
A549	0.85	1.27	0.73
HepG2	0.83	1.05	0.72
LO2	0.65	0.62	0.76

2.4 细胞周期分布和凋亡

收集上清和贴壁细胞，由表 1 药物单独给药 IC₅₀ 范围设定细胞周期试验药物所用剂量，5-FU、黄芩苷给药剂量分别为 20, 30 μg·mL⁻¹，通过流式细胞仪分析各细胞系在单独给药以及 3 种联合给药方案下的细胞周期分布，分析结果以 DNA 含量直方图表示，结果见图 3。5-FU 能显著增加 A549、HepG2 细胞系中 S 期细胞的比例(*P*<0.05)，并且在方案Ⅲ条件下，S 期抑制效应被显著放大，体现出前药(黄芩苷)对后药(5-FU)的调控作用，而其他 2

种方案相对于 5-FU 单独给药，体现出黄芩苷对 5-FU 的 S 期一定的负向调控抑制作用。通过 ModFit LT 3.0 软件分析得 A549、HepG2 细胞凋亡结果，以至少 3 次独立重复试验的均值表示，A549 结果见图 4，对于给予 5-FU 组，除方案Ⅲ外各组的凋亡抑制率均值在 10%左右。HepG2 凋亡抑制结果基本一致，故未例出。

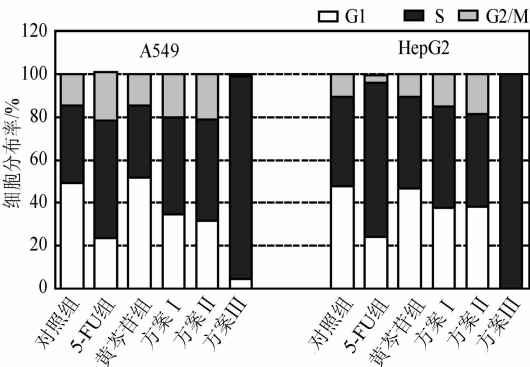


图 3 单独或 3 种不同联合方案给药在 A549、HepG2 细胞系的 DNA 含量直方图

Fig 3 Histograms of DNA content of 5-FU and baicalin applied alone or in three combined schedules in A549, HepG2 cells

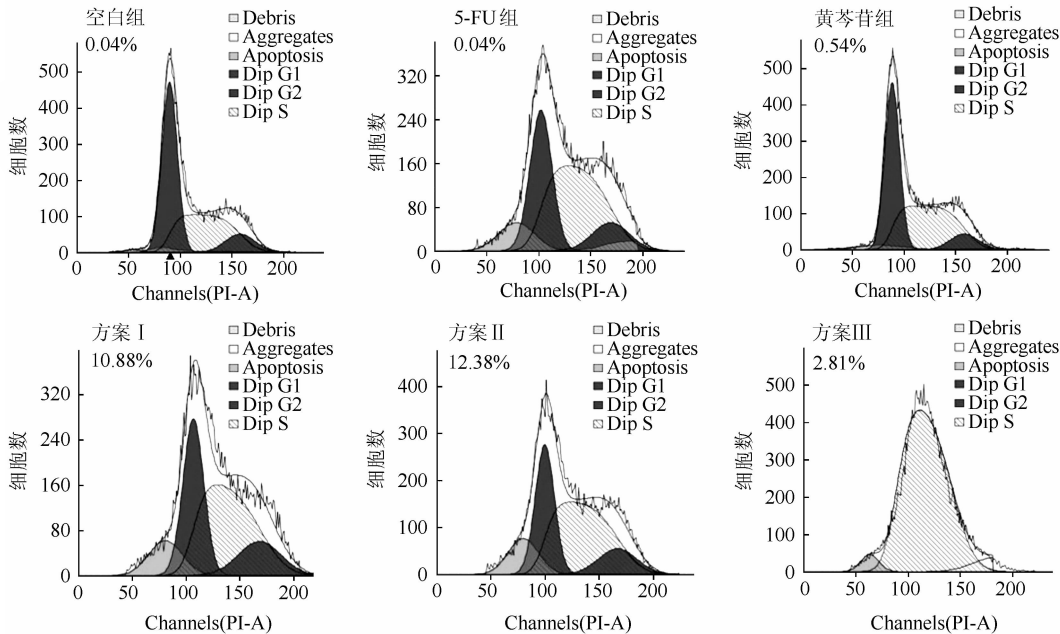


图 4 单独或 3 种不同联合方案给药在 A549 细胞系的流式细胞凋亡分析结果

Fig 4 Apoptosis rates of 5-FU and baicalin applied alone or in three combined schedules in A549 cells

3 讨论

细胞存活和细胞死亡之间的平衡是一个复杂的问题，理解肿瘤细胞怎样调控这一关键环节值得付出相当大的努力^[13]。本试验工作最重要的发现是首次证明：①黄芩苷和细胞毒性抗肿瘤药物

5-FU 在联合方案的方案Ⅲ中对人恶性上皮瘤细胞系 A549、HepG2 细胞系表现出抗增殖活性的协同放大效应；②在联合方案的方案Ⅱ中黄芩苷能够拮抗 5-FU 在人恶性上皮瘤细胞系中抗增殖活性，而在正常人肝细胞系 LO2 中却具有明显的协同抗

增殖活性。在 5-FU 和黄芩苷单独作用随时间依赖性结果(表 1)显示, 各细胞系分别暴露于药物 24, 72 h 的 IC_{50} 具有统计学差异, 然而差异仍停留在同一数量级之上, 并且 5-FU 对肿瘤细胞和正常细胞的选择性系数 SI 24 h 时高于 72 h, 而黄芩苷 SI 24 h 时低于 72 h。因此, 随后再药物处理试验的时间均采取 24 h, 合计药物处理时间为 48 h。随后在无药物处理继续培养 24 h^[14], 以便于观测加处理药物后对细胞周期、凋亡进程的变化。

事实上, 药物采取不同的联合方案不仅可能有利于药物协同作用的发挥, 而且还能够有利于探讨出药物间相互作用的机制, 譬如前药对后药的调控作用^[15]。根据相关文献报道, 黄芩苷具有一定的 G1 期细胞周期抑制作用, 能通过 NF- κ B, PI3K/Akt 等信号通路调节炎症因子和抗肿瘤增殖作用^[16-18]。在图 2 中建立了 3 种不同给药方案在 IC_{50} 下的等效线图解, 通过“1.5.1”项下对协同作用、相加作用以及拮抗作用的定性描述表明, 对于 A549 和 HepG2 细胞系中方案 I 和方案 III 的数据点分布在等效线下方, 指示为起协同作用。此外, 在 Chou-Talalay 法对图 2 各试验组的药物相互作用进行定量计算得出 CI_{50} 显示: ①在肿瘤细胞系中方案 III 的 CI_{50} 相比方案 I 低 0.11~0.12, 表示在 5-FU 给药前给予黄芩苷能够放大 5-FU 的效应; 在图 3 中 A549、HepG2 细胞的周期分布显示 5-FU 的 S 期抑制效应通过黄芩苷的提前给药而得到放大; ②在正常细胞系中方案 III 的 CI_{50} 相比方案 I 高 0.11, 表现出该药物联用时减小对正常细胞的毒性。以上结果显示 Chou-Talalay 定量结果与等效线图解法定性结果基本吻合。然而, 在图 4 流式细胞仪对细胞凋亡的分析中, 凋亡结果显示各组最高凋亡率为 12.38%, 可推测在此处理条件下 5-FU 和黄芩苷 72 h 内的联合抗增殖作用可能主要由黄芩苷增强了 5-FU 在 S 期细胞周期捕获所介导。

定性和定量药物相互作用评价结果表明, 5-FU 和黄芩苷具有给药方案依赖性效应。相比传统的细胞毒性药物 5-FU 单独应用和 3 个联合方案, 方案 III 一方面限制了细胞毒性药物对正常细胞的不良反应, 另一方面又能对肿瘤细胞系起到协同抗增殖作用。本试验研究结果为进一步的分子机制探索、体内动物试验, 甚至临床研究提供了依据。

REFERENCES

- [1] GUO M, ZHANG N, LI D, et al. Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor- κ B and p38 phosphorylation in *S.aureus*-induced mastitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(2): 125-130.
- [2] WANG D H, CHEN M, JIANG Z Q, et al. Experimental study of baicalin curing antibiotic-resistant plasmid in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(5): 400-404.
- [3] KAPOOR S. Baicalin and its emerging antineoplastic effects in systemic malignancies besides colorectal carcinomas [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28(8): 1169-1170.
- [4] CHEN J, LI Z, CHEN A Y, et al. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 6012-6025.
- [5] WYATT M D, WILSON D M III. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(5): 788-799.
- [6] GORDON R R, NELSON P S. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(1/2): 123-131.
- [7] LAM W, BUSSOM S, GUAN F, et al. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 18(45): 45-59.
- [8] TALLARIDA R J. An overview of drug combination analysis with isobolograms [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(1): 1-7.
- [9] STEEL G G, PECKHAM M J. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1979, 5(1): 85-91.
- [10] GESSNER P K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility [J]. *Toxicology*, 1995, 105(2-3): 161-179.
- [11] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [12] 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*(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 449-453.
- [13] MORGILLO F, MARTINELLI E, TROIANI T, et al. Sequence-dependent, synergistic antiproliferation 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.
- [14] KANO Y, AKUTSU M, TSUNODA S, et al. Sequence-dependent synergistic and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines *in vitro* [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 54(6): 505-513.
- [15] 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.
- [16] CHEN J, LI Z, CHEN A Y, et al. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 6012-6025.
- [17] ZHENG J, HU J D, CHEN B Y, et al. Baicalin induces apoptosis in leukemia HL-60/ADR cells via possible down-regulation of the PI3K/Akt Signaling pathway [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(4): 1119-1124.
- [18] HUANG Y, HU J, ZHENG J, et al. Down-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of apoptosis in CA46 Burkitt lymphoma cells by baicalin [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 48. Doi: 10.1186/1756-9966-31-48.

收稿日期: 2013-06-05