

· 论著 ·

汉黄芩素与氟尿嘧啶联用抗人肝癌细胞 Hep-G2 作用的拮抗效应研究

陈维中¹, 蔡靖斌¹, 陈晓兰¹, 陈瑞奇², 李夏静², 廖联明² (1. 南京军区福州总医院第一附属医院, 福建 莆田 351100; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院肿瘤研究所, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的 探讨汉黄芩素(wogonin)联合氟尿嘧啶(5-FU)对人肝癌细胞 Hep-G2 生长活性的影响。方法 实验分汉黄芩素组、5-FU 组、汉黄芩素+5-FU 组和空白对照组, 采用 MTT 法观察药物对肿瘤细胞体外生长活性的影响, 采用流式细胞仪分析肿瘤细胞凋亡率的变化。结果 MTT 实验结果显示汉黄芩素(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24、48 h 后对肿瘤细胞具有一定的增殖抑制作用($P < 0.05$); 5-FU (5、10、20、40 mg/L)作用 24、48 h 后对肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$); 与单用组对肿瘤细胞的抑制作用相比, 汉黄芩素联合 5-FU 组的抗肿瘤作用呈相互拮抗作用($P < 0.05$); 汉黄芩素联合 5-FU 给药 48 h 后, 联合指数 CI 值呈现剂量依赖性, CI 值随汉黄芩素浓度的加大而增大, 说明随汉黄芩素浓度的加大, 其拮抗 5-FU 抗肿瘤效应的作用也越来越明显($P < 0.05$)。结论 汉黄芩素具有一定的抗肿瘤作用, 但可拮抗 5-FU 的抗肿瘤作用, 具体机制有待进一步研究。

[关键词] 汉黄芩素; 氟尿嘧啶; 拮抗作用; 肝癌细胞 Hep-G2

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)05-0411-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.007

Combination of wogonin with 5-fluorouracil exhibits antagonistic effect on human Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells

CHEN Weizhong¹, CAI Jingbin¹, CHEN Xiaolan¹, CHEN Ruiqi², LI Xiajing², LIAO Lianming² (1. First Affiliated Hospital, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Putian 351100, China; 2. Department of Oncology, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antagonistic effect of wogonin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on the proliferation of human Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Human hepatocellular Hep-G2 cells were divided into experimental group (wogonin group, 5-FU group, wogonin + 5-FU group) and control group. MTT method was used to evaluate tumor cell proliferation *in vitro*, flow cytometry analysis was used to evaluate tumor cell apoptosis. **Results** The results showed that the wogonin inhibited the proliferation of tumor cells at the concentrations of 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ after 24 h and 48 h treatment respectively ($P < 0.05$); 5-FU also inhibited the proliferation of tumor cells at the concentrations of 5, 10, 20 and 40 mg/L after 24 h and 48 h treatment respectively ($P < 0.05$). However when wogonin was combined with 5-FU (wogonin+5-FU group), an antagonistic effect was observed on tumor cell proliferation ($P < 0.05$). When cells were treated by wogonin+5-FU for 48 h, the combined index (CI) value showed a dose-dependent antagonistic effect ($P < 0.05$). **Conclusion**

Wogonin has anti-tumor effect. However when wogonin was combined with 5-FU, an obvious antagonistic effect on 5-FU's anti-tumor action was observed. The underlying mechanism deserves further study.

[Key words] wogonin; fluorouracil; antagonism; hepatocellular carcinoma cell Hep-G2

汉黄芩素(图 1)是一种从黄芩(唇形科)中提取的天然黄酮类化合物, 其抗肿瘤作用越来越引起学者的重视^[1]; 临床常运用 5-FU 治疗实体瘤, 但易产生耐药性并导致严重的毒副作用, 故联合用药增强

化疗药物的抗肿瘤效应并减轻其毒副作用成为当今的研究热点。但值得关注的是研究发现联合用药也可能产生一定的相互拮抗作用^[2]。本研究在观察汉黄芩素联合 5-FU 的抗肿瘤作用时发现二者联用存在一定的拮抗作用。现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 汉黄芩素由福建中医药大学中西医结合研究院肿瘤研究所制备, 用二甲基亚砜

[作者简介] 陈维中, 本科, 副主任药师. 研究方向: 医院药学. E-mail: cwzhongfz@sina.com

[通讯作者] 廖联明, 博士, 副教授, 硕士生导师. 研究方向: 中药抗肿瘤的药理学机制. E-mail: llm@fjtcu.edu.cn

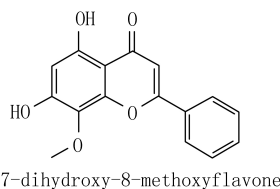


图1 汉黄芩素化学结构式

(DMSO)溶液配制成浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的母液,分装,储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,备用;四甲基偶氮唑蓝(MTT)和细胞凋亡试剂盒购自凯基生物试剂公司。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞 Hep-G2 培养于 10% 胎牛血清,1640 培养液中常规培养(37 $^\circ\text{C}$ 培养箱,5% CO_2)。

1.3 细胞增殖活力检测(MTT法) 取 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μl ,培养 24 h 后给药,分为汉黄芩素组(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)、5-FU 组(5、10、20、40 mg/L)、联合给药组和空白对照组。每组设 8 个复孔。药物分别作用 24 及 48 h 后,弃培养液。每孔加入 100 μl 0.5% MTT 溶液并在培养箱中作用 4 h,倾去培养液,加入 DMSO 溶液 100 μl ,待完全溶解显色后,用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度(A),计算细胞生长抑制率。

1.4 细胞形态学观察 用显微镜分别观察汉黄芩素(40 $\mu\text{mol/L}$)和 5-FU(5 mg/L)处理 Hep-G2 细胞 48 h 后细胞形态学的变化。

1.5 细胞凋亡率检测(流式细胞术) 实验分为对照组、汉黄芩素(20 $\mu\text{mol/L}$)组、5-FU(5 mg/L)组、联合给药组(汉黄芩素 20 $\mu\text{mol/L}$ +5-FU 5 mg/L) 4 个组,给药处理 Hep-G2 细胞 24 h,磷酸缓冲液(PBS)洗涤 2 次,用不含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的胰酶消化,收集 1×10^5 个细胞,加入 500 μl 的结合缓冲液悬浮细胞,再加入 5 μl 磷酸酰丝氨酸-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)混匀,室温避光反应 5~15 min,1 h 内用流式细胞仪进行检测。

1.6 联合组给药 48 h 的联合指数 CI 计算方法 参照相关文献^[3-5];联合指数 $CI = D1/(DX)1 + D2/(DX)2$ 。首先计算汉黄芩素和 5-FU 的 IC_{50} 所对应的浓度,(DX)1 代表汉黄芩素作用 48 h, IC_{50} 所对应的汉黄芩素浓度,(DX)2 代表 5-FU 作用 48 h, IC_{50} 所对应的 5-FU 浓度。其次计算联用组 C1[汉黄芩素(5 $\mu\text{mol/L}$)+5-FU(5、10、20、40 mg/L)],C2[汉黄芩素(10 $\mu\text{mol/L}$)+5-FU(5、10、20、40 mg/L)],C3[汉黄芩素(20 $\mu\text{mol/L}$)+5-FU(5、10、20、40 mg/L)],C4[汉黄芩素(40 $\mu\text{mol/L}$)+5-FU(5、10、20、40 mg/L)]48 h 给药处理, IC_{50} 所对应

的汉黄芩素和 5-FU 的浓度。D1 代表联合给药组 IC_{50} 所对应的汉黄芩素给药浓度,D2 代表联合给药组 IC_{50} 所对应的 5-FU 的给药浓度。将所得的值代入上述公式得到 CI 值。当 $CI < 1$,表明具有协同作用;当 $CI = 1$,表明具有相加作用;当 $CI > 1$,表明具有拮抗作用。

1.7 数据处理 应用 SPSS 18.0 统计软件对本研究数据进行统计学分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各均数间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素对 Hep-G2 细胞增殖的抑制作用 结果表明,汉黄芩素给药处理 24、48 h 后,汉黄芩素对人肝癌细胞 Hep-G2 增殖具有一定的抑制作用,其抑制作用呈剂量和时间依赖关系,见图 2、3。

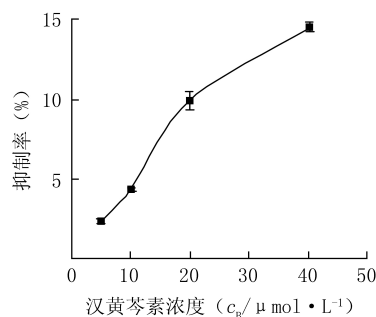


图2 汉黄芩素给药 24 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率

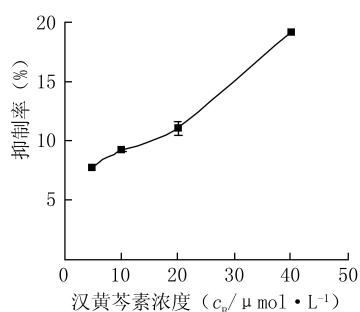


图3 汉黄芩素给药 48 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率

2.2 汉黄芩素对 Hep-G2 细胞形态学的影响 汉黄芩素给药 48 h,形态学上观察发现细胞变圆,体积缩小,细胞变形,并伴有坏死细胞及碎片,呈现出典型的细胞凋亡现象。

2.3 5-FU 对 Hep-G2 细胞增殖的抑制作用 5-FU 给药处理 24、48 h 后,5-FU 对人肝癌细胞 Hep-G2 具有明显抑制作用,呈现剂量和时间依赖关系,

见图4、5。

2.4 5-FU 对 Hep-G2 细胞形态学的影响 形态学上观察发现细胞变圆,体积缩小,细胞变形,并伴有坏死细胞及碎片,呈现出典型的细胞凋亡现象。

2.5 联合给药处理 24、48 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制作用 联用组对 Hep-G2 抑制率小于单用组抑

制率之和,说明汉黄芩素联合 5-FU 抗人肝癌细胞 Hep-G2 具有一定的拮抗作用 ($P < 0.05$, 见表 1、2)。汉黄芩素联合 5-FU 给药 48 h, 其联合用药指数 CI 值呈现剂量依赖性, CI 值随着汉黄芩素浓度的加大而增大, 说明随着汉黄芩素浓度的加大, 其拮抗 5-FU 抗肿瘤效应越明显 ($P < 0.05$), 见图 6。

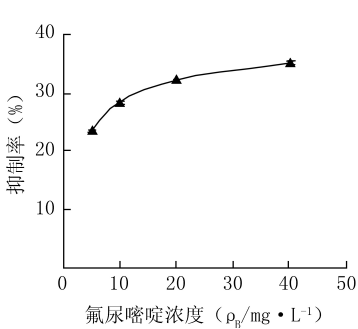


图 4 5-FU 给药 24 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率

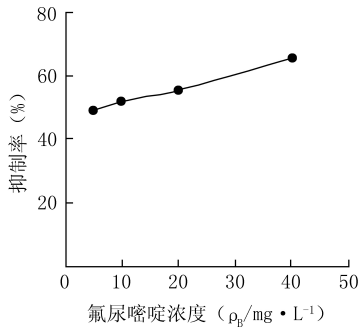


图 5 5-FU 给药 48 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率

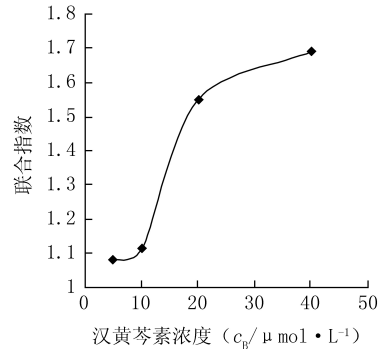


图 6 不同剂量汉黄芩素联合 5-FU 给药 48 h 对联合指数影响

表 1 联用组给药处理 24 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

汉黄芩素浓度 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5-FU 浓度 ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	0	5	10	20	40
0	0	25.35 ± 0.18	30.71 ± 0.40	34.99 ± 0.42	37.62 ± 0.43
5	2.53 ± 0.75	24.52 ± 0.18	30.72 ± 0.06	33.63 ± 0.71	36.43 ± 0.90
10	3.88 ± 0.07	25.70 ± 0.11	31.96 ± 0.08	33.26 ± 0.09	38.10 ± 0.75
20	10.67 ± 0.56	26.50 ± 0.26	30.21 ± 0.14	32.69 ± 0.09	35.98 ± 0.09
40	14.52 ± 0.31	28.43 ± 0.08	32.64 ± 0.07	32.67 ± 0.22	30.85 ± 0.05

表 2 联用组给药处理 48 h 对 Hep-G2 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

汉黄芩素浓度 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5-FU 浓度 ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	0	5	10	20	40
0	0	48.93 ± 0.08	52.38 ± 0.14	57.86 ± 0.09	67.50 ± 0.02
5	8.10 ± 0.57	48.02 ± 0.04	48.42 ± 0.08	56.73 ± 0.25	60.55 ± 0.09
10	9.74 ± 0.13	47.29 ± 0.35	49.47 ± 0.17	55.90 ± 0.08	63.20 ± 0.20
20	16.21 ± 0.06	45.46 ± 0.11	46.17 ± 0.25	54.89 ± 0.05	63.95 ± 0.08
40	24.88 ± 0.15	43.77 ± 0.35	45.96 ± 0.10	55.93 ± 0.07	64.06 ± 0.04

2.6 联合给药处理 24 h 对 Hep-G2 细胞凋亡的影响 从实验结果中发现,联用组细胞凋亡率之和小于单用组细胞凋亡率之和, $1+1 < 2$, 说明汉黄芩素对 5-FU 抗肿瘤效应具有一定的拮抗作用, 见图 7。

3 讨论

5-FU 在临床上应用较为广泛,对消化道肿瘤及其他实体瘤有良好疗效,在肿瘤内科治疗中占有重要地位,但其在治疗剂量范围内存在着严重的毒副作用,如:胃肠道反应、骨髓抑制导致的白细胞及血小板减少、脱发等。

本实验采用 MTT 法观察 5-FU 对人肝癌细胞

Hep-G2 的增殖抑制作用,证实其对肝癌细胞 Hep-G2 具有明显的抑制作用,从细胞形态学上观察,其诱导了 Hep-G2 细胞产生凋亡,对细胞形态产生一定的影响,说明 5-FU 对 Hep-G2 有显著的增殖抑制效应。汉黄芩素具有一定的抗氧化作用及神经保护作用,可以降低氧活性自由基的表达^[6],汉黄芩素作用于肿瘤细胞诱导氧自由基产生^[7],并激活细胞凋亡信号通路,诱导肿瘤细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞生长;汉黄芩素还可作用于肿瘤细胞 PI3K-AKT 信号通路^[8-10],诱导细胞凋亡,说明具有一定的抗癌作用。本实验采用 MTT 法观察汉黄芩素对人肝癌细胞 Hep-G2 的抑制作用,发现其在体外对

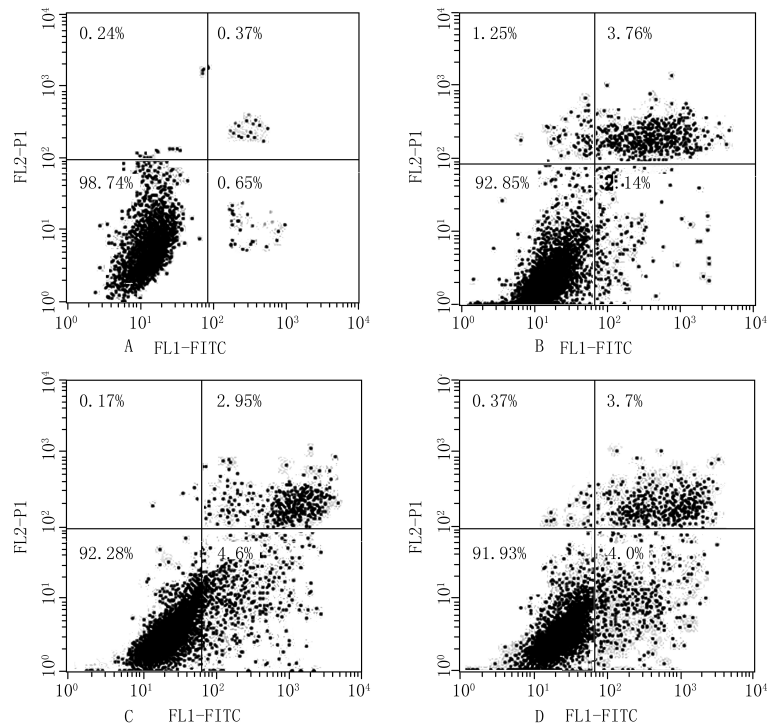


图7 不同给药组处理 24 h 对细胞凋亡的影响

A. 对照组; B. 5-FU 组; C. 汉黄芩素组; D. 5-FU+汉黄芩素组

人肝癌细胞 Hep-G2 具有一定的抑制作用,同时从细胞形态学上观察,可诱导 Hep-G2 细胞凋亡,说明汉黄芩素对 Hep-G2 有一定的增殖抑制作用。

虽然汉黄芩素在体外具有一定的抗肿瘤作用,但本实验结果显示汉黄芩素有拮抗 5-FU 的抗肿瘤效应,细胞增殖活力检测(MTT 法)和细胞凋亡检测(流式细胞术)发现联合给药组对 Hep-G2 抑制率小于两药单用抑制率之和,表明汉黄芩素联合 5-FU 抗人肝癌细胞 Hep-G2 具有一定的拮抗作用,汉黄芩素联合 5-FU 给药 48 h,联合指数 $CI > 1$,随着其浓度加大,CI 变大,拮抗作用越明显,说明汉黄芩素与 5-FU 联合用药不但不能提升疗效,反而可能增加 5-FU 的毒副作用,汉黄芩素拮抗 5-FU 的抗肿瘤作用机制有待深入研究。

【参考文献】

- [1] Zhao L, Chen Z, Zhao Q, *et al.* Developmental toxicity and genotoxicity studies of wogonin[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011, 60(2): 212-217.
- [2] Liu Y, Wang X, Wang Y, *et al.* Combination of SNX-2112 with 5-FU exhibits antagonistic effect in esophageal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1):299-307.
- [3] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22: 27-55.
- [4] Zhao Q, Wang J, Zou MJ, *et al.* Wogonin potentiates the

antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 197(3): 201-210.

- [5] Li CJ, Chu CY, Huang LH, *et al.* Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 203-213.
- [6] Lee YM, Cheng PY, Chen SY, *et al.* Wogonin suppresses arrhythmias, inflammatory responses, and apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58(2): 133-142.
- [7] Tsai CF, Yeh WL, Huang SM, *et al.* Wogonin induces reactive oxygen species production and cell apoptosis in human glioma cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 9877-9892.
- [8] Huang KF, Zhang GD, Huang YQ, *et al.* Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(2): 334-341.
- [9] Zhou M, Song X, Huang Y, *et al.* Wogonin inhibits H2O2-induced angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway[J]. *Vasc Pharmacol*, 2014, 60(3): 110-119.
- [10] Zhao K, Song X, Huang Y, *et al.* Wogonin inhibits LPS-induced tumor angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF-kappaB signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 737: 57-69.

〔收稿日期〕 2014-11-20 〔修回日期〕 2015-07-09

〔本文编辑〕 陈 静