

中效原理在体外抗癌药物定量分析中的应用

陈 姝¹, 汤为学², 娄世锋¹

Application of Median-effect Principle in Quantitative Analysis of Antitumor Agents in Vitro

CHEN Shu¹, TANG Wei-xue², LOU Shi-feng¹

1. Department of Hematology, The Second Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 2. Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Sciences

Abstract: **Objective** Synergistic and antagonistic effect of combined antitumor agents were analyzed quantitatively with median-effect principle in vitro. **Methods** The median-effect principle and MTT method were used in HL-60. **Results** Vincristine and cytarabine cytotoxic activity of the individual and combined drugs enhanced as drug concentration increased. These sequence of administration did not influence the cytotoxic activity of the combined antitumor drugs. The ratio of drug concentration was a factor to influence the killing effect. The interaction of the agents was synergistic at lower concentration, and antagonistic at higher concentration. **Conclusion** The combined drug interaction (CI < 1) was synergistic at lower concentration and antagonistic at higher concentration. The ratio of drug concentration is a significant factor that can influence the killing effect.

Keywords: HL-60; Median-effect principle; Cytarabine; Vincristine; Combination index (CI)

摘 要: **目的** 在体外利用中效原理定量分析抗癌药物联合应用过程中的协同、相加或拮抗作用。 **方法** 采用 MTT 法, 利用中效原理判断联合用药(阿糖胞苷、长春新碱)对 HL-60 细胞的效应。 **结果** 两种药物单用及联合应用时随药物剂量增加, 其效应也随之增加。两药大剂量合用时为拮抗效应, 小剂量合用时为协同效应。两药合用时给药次序不同不会影响合用效应, 两药合用时药物浓度比例变化会影响合用效应。 **结论** 两种药物合用时大剂量为拮抗, 小剂量为协同, 其效应大小与两种药物浓度比例有关, 而与给药时间次序无关。

关键词: HL-60; 中效原理; 阿糖胞苷; 长春新碱; 合用指数

中图分类号: R733.7; R730.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)05-0270-03

0 引言

化学疗法是目前治疗白血病的主要方法之一。由于新药的不断出现, 治疗观念和策略的进步以及支持疗法的进步, 使白血病的化疗效果得到了很大提高。目前多采用几种抗癌药物联合应用, 以期提高疗效而不增加毒性, 并减少耐药性的出现。联合化疗应选择作用机制不同的药物联用, 以发挥其协同作用^[1]。建立一种在体外能准确分析各抗癌药物之间的协同、相加或拮抗作用的定量分析法, 可以为临床正确制定联合化疗方案提供参考。我们应用中效原理(Chou-Talalay 联合指数法)^[2-5] 体外观察阿糖胞苷、长春新碱两种抗癌药物单独或合用时对人急性髓系白血病细胞株(HL-60)的相互作用, 用中效方程式计算判断两种药物之间相互作用的效果。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人急性髓系白血病细胞株(HL-60)由重庆医科大学病理生理教研室提供。细胞株培养在 10% 小牛血清(杭州四季青生物材料有限公司) RPMI1640 (美国 GIBCO) 培养液中(内含 0.1% 青霉素、链霉素), 并置 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中备用。

1.2 药物

阿糖胞苷(cytarabine, Ara-c)(北京医科大学实验药厂), 使用时配成最终浓度为 1.430 mmol/L、0.715 mmol/L、0.357 mmol/L、0.178 mmol/L、0.089 mmol/L 五种浓度。长春新碱(Vincristine, VCR)(广州明兴制药厂), 使用时配成最终浓度为 4.850×10^{-3} mmol/L、 2.420×10^{-3} mmol/L、 1.212×10^{-3} mmol/L、 0.600×10^{-3} mmol/L、 0.300×10^{-3} mmol/L 五种浓度。

1.3 用 MTT 法检测药物效应^[6]

1.3.1 将 HL-60 细胞制成 5×10^4 个细胞/ml 的悬液, 每孔 200 μ l, 种入 96 孔培养板内。实验设试剂对

收稿日期: 2003-08-08; 修回日期: 2003-11-17

作者单位: 1. 400010 重庆医科大学附属第二医院血液科; 2. 重庆医科大学病理生理教研室

照组(8孔),肿瘤细胞对照组(8孔)及药物试验组(每种药物浓度重复3孔)。

1.3.2 单用及两药合用时效应观察

将两种单药的五个不同浓度分别加在96孔板内,每孔加药量20μl;两药合用比例为1:1,每孔加药总量仍为20μl(每种单药剂量浓缩1倍,各加10μl),在37℃,5%CO₂孵育箱中培养3天,测试结果。

1.3.3 两药合用时给药时间先后次序依赖关系

试验设同时给药组、先给Ara-c24h后再给VCR组,先给VCR24h后再给Ara-c组,37℃,5%CO₂孵育箱中培养3天,测试结果。

1.3.4 两药合用时药物浓度比例关系

Ara-c的五个不同浓度分别与VCR的1/10血峰浓度(1.212×10⁻³mmol/L)合用,VCR的五个不同浓度分别与Ara-c的1/10血峰浓度(0.357mmol/L)合用,37℃,5%CO₂孵育箱中培养3天,测试结果。以上实验均重复3次,取平均值计算。

1.4 结果判定

在自动酶标读数仪(Bio-RadE2500型)上测得每孔A_{570nm}值进行计算。药物作用效应(fa)即抑制率=1-

$$\frac{\text{试验组平均 OD 值}}{\text{肿瘤细胞对照组平均 OD 值}}$$

根据中效方程式 $fa/fu = (\frac{D}{D_m})^m$

两边取对数 $lg(fa/fu) = mlg D - mlg D_m$

设 $a = -mlg D_m$

$b = m$

$x = lg D$

$y = lg(fa/fu)$

代入中效方程式 $y = bx + a$

其中 fa 为药物作用效应, fu=1-fa

D 为药物浓度, m 为斜率

D_m 为中效浓度,即0.5效应时的药物浓度

依上述公式,计算出两种抗癌药单用及合用时各自的中效浓度 D_m(lgD_m=-a/m),再计算出单用及两药合用时在各种效应时所需药物浓度 D = D_m(fa/fu)^{1/m},可计算出两药合用时在各种效应时的合用指数 CI = $\frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}} + \frac{D_1 D_2}{D_{x1} D_{x2}}$, D₁、D₂ 为

两药合用时产生 x 效应时两药各自所需浓度, D_{x1}、D_{x2}为两药单独使用时产生 x 效应时两药各自浓度。 =0 为两种相互排斥性药物, =1 为两种相互非排斥性药物。CI<1 协同,CI=1 相加,CI>1 拮抗。

2 结果

2.1 单用及两药合用时不同浓度的效应

两种抗癌药物单用及合用时随着药物浓度增加其效应也增加,见表1。按中效方程式计算 m, D_m及 r,见表2。再计算出两药合用在不同效应时的合用指数 CI,进而判断两药在不同效应时各自所需药物浓度之间相互作用见表3及图1。以效应(fa)为横坐标,合用指数(CI)为纵坐标作图。

表 1 两种抗癌药物单用及合用在不同浓度(mmol/L)时的效应(fa)(n=9)

Ara-c	VCR	Ara-c+VCR
(1.430)0.888	(4.850 ×10 ⁻³)0.898	(1.435)0.872
(0.715)0.818	(2.420 ×10 ⁻³)0.800	(0.717)0.854
(0.357)0.787	(1.212 ×10 ⁻³)0.697	(0.358)0.809
(0.178)0.635	(0.600 ×10 ⁻³)0.611	(0.179)0.757
(0.089)0.448	(0.300 ×10 ⁻³)0.427	(0.090)0.615

表 2 两种抗癌药单用及合用时 m、D_m、r

药物	斜率(m)	中效浓度(D _m)mmol/L	相关系数(r)
Ara-c	0.795	96.080 ×10 ⁻³	0.982
VCR	0.741	0.388 ×10 ⁻³	0.995
Ara-c+VCR	0.509	25.420 ×10 ⁻³ *	0.969

*其中 Ara-c 的浓度为 25.336 ×10⁻³ mmol/L,VCR 的浓度为 0.084 ×10⁻³ mmol/L。

表 3 两种抗癌药物合用时在不同效应(fa)时的合用指数(CI)

效应(fa)	0.95	0.90	0.80	0.75	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10
合用指数(CI)	3.33	2.07	1.22	0.98	0.87	0.68	0.48	0.39	0.27	0.19	0.11

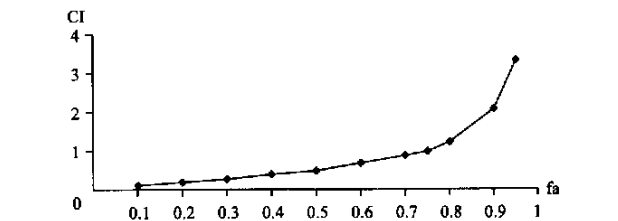


图 1 Ara-c 与 VCR合用时的效应与合用指数的关系

2.2 两药合用时给药时间先后次序依赖关系及给药浓度比例关系,见表4、表5。

3 讨论

阿糖胞苷为抗代谢的抗肿瘤药物,通过阻断胞嘧啶核苷酸还原成脱氧胞嘧啶核苷酸,显著地抑制DNA聚合酶活性和DNA合成。它对肿瘤增殖细胞敏感,为细胞周期特异性药物,主要作用于S期,并对G₁/S、S/G₂边界有延缓作用^[7]。长春新碱是抗肿瘤植物药,它主要作用于M期,为细胞周期特异

表 4 两药合用时给药时间先后次序依赖关系(n =9)

Ara-c+VCR (mmol/L)	同时用药效应	Ara-c 先用 24h 效应	VCR 先用 24h 效应
1.435	0.872 ±0.037	0.741 ±0.119	0.871 ±0.043
0.717	0.854 ±0.028	0.727 ±0.092	0.823 ±0.044
0.358	0.809 ±0.038	0.717 ±0.086	0.799 ±0.097
0.179	0.757 ±0.022	0.702 ±0.054	0.732 ±0.036
0.090	0.615 ±0.037	0.591 ±0.049	0.606 ±0.083

经 t 检验,各组之间比较 P>0.05,无显著性差异。

表 5 两药合用时给药浓度(mmol/L) 比例关系(n =9)

Ara-c	VCR	VCR/Ara -c	fa	CI	VCR	Ara-c	VCR/Ara -c	fa	CI
1.430	1.212 ×10 ⁻³	1 4	0.870	1.19	4.850 ×10 ⁻³	0.357	1 4	0.866	3.77
0.715	1.212 ×10 ⁻³	1 2	0.850	1.23	2.420 ×10 ⁻³	0.357	1 2	0.834	2.10
0.357	1.212 ×10 ⁻³	1 1	0.807	1.46	1.212 ×10 ⁻³	0.357	1 1	0.800	1.41
0.178	1.212 ×10 ⁻³	1 1/2	0.761	1.49	0.600 ×10 ⁻³	0.357	1 1/2	0.777	0.88
0.089	1.212 ×10 ⁻³	1 1/4	0.639	1.64	0.300 ×10 ⁻³	0.357	1 1/4	0.623	0.45

为96.080 ×10⁻³ mmol/L, 合用时为25.336 ×10⁻³ mmol/L, 合用时比单用时小3.792 倍;VCR 单用时 D_m 为0.388 ×10⁻³ mmol/L, 合用时为0.084 ×10⁻³ mmol/L, 合用时比单用时小3.619 倍,这充分说明联合用药的优点是只需小剂量就可达到高效,从而使药物不良反应减少。

我们的实验发现,两药合用时给药时间先后次序不同,对合用效应无影响,因此对 HL-60 来讲,无论先用 Ara-c 还是先用 VCR,其效应无明显差异。

实验还发现两药给药浓度比例不同会影响两药的合用效应,见表 5。不同浓度 Ara-c 与 VCR 的 1/10 血峰浓度(1.212 ×10⁻³ mmol/L) 合用时均产生拮抗作用;而 VCR 浓度小于0.600 ×10⁻³ mmol/L 与 Ara-c 的 1/10 血峰浓度(0.357mmol /L) 合用时产生协同效应(即 Ara-c 与 VCR 浓度比为 1 1/2,1 1/4 时),VCR 浓度大于0.600 ×10⁻³ mmol/L 与 Ara-c 的 1/10 血峰浓度合用时产生拮抗效应(即 Ara-c 与 VCR 浓度比为 1 1,1 2,1 4 时),因此两药合用时需要合适浓度比例,这样才能达到最好的合用效应。从两药合用的效应与合用指数关系(见表 3、图 1)中可以看出,当效应 fa> 0.8 时(即所需两药物浓度大时),两药合用指数 CI>1, 为拮抗作用效应;fa< 0.75 时(即所需两药物浓度较小时)两药合用指数 CI<1, 为协同效应。

性药物,它能与微管蛋白结合,阻止微管装配,抑制纺锤丝的形成,使细胞分裂同步停止于 M 期,从而有利于其它抗癌药物发挥作用^[7]。这两种药物单用时在体外对 HL-60 细胞的效应较好,而且两药作用机理不同,因而选为合用药。两药合用时,它们对 HL-60 的效应增加,而且合用时中效浓度及各自所需用量均比单用时要小,见表 2。Ara-c 单用时 D_m

利用中效原理在体外对联合应用的抗癌药物进行协同、相加或拮抗的定量分析,可以为临床抗癌药物联合应用方案的制定提供参考,从而为白血病患者筛选出合理的联用方案,达到增加疗效,减少不良反应,延长患者生命的目的。

参考文献:

[1] 沈志祥,欧阳仁荣. 血液肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999.54 -71.

[2] ChouTC,Talala yP.Quantitativeanal ysisofdose-effectsrela - tionships:thecombinedeffectofmulti pledrugsonenz ymein - hibitors[J].AdvEnz ymeRe gul,1984,22:27 -55.

[3] TingChaoChou,RobertJM,YouZhiTon g,etal.Com puteriged quantitationofs ynergismandanta gonismofTaxol,To potecan, andCis platina gainsthumaneratocarcinomacell growth:aratio - nala pproachtoclinical protocoldesi gn[J].JournaloftheNational cancerInstitute,1994,86 (20):1517-1524.

[4] ScottHK,DavidP,Christo pherAB,etal.C ytotoxiceffectsof Topotecan.Combinedwithvariousanticancera gentsinhuman cancercelllines[J].JournaloftheNationalCancerInstitute, 1996,88 (11):734-741.

[5] HayleyMM,PatrickGJ.S ynergisticInteractionbetween pacli - taxeland8 -Chloro-adenosine3 ',5 '-Monophosphateinhumano - rarianCarcinomaCellLines[J].ClinCancerRes,1999,5 (1): 215-220.

[6] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪.人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法 的建立[J]. 重庆医科大学学报,1992,17 (2):103-108.

[7] 姚尔固,徐世荣,董作仁.新编白血病化疗学[M]. 天津:天津科 学技术出版社,2000.39 -67.

[编辑校对: 贺 文]