

· 论 著 ·

范德他尼联合 5-氟尿嘧啶对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 的作用研究\*何本夫<sup>#</sup>, 郑航, 阮健, 罗荣城<sup>△</sup>

(南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广州 510515)

**摘要:**目的 探讨范德他尼(ZD6474)联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 的杀伤作用。方法 用 MTT 法检测 ZD6474、5-氟尿嘧啶单药及其联合对 HepG<sub>2</sub> 细胞的增殖抑制,同时采用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡情况。结果 ZD6474 单药及 5-FU 单药对 HepG<sub>2</sub> 均有明显抑制作用,两药联合具有明显的协同作用( $P < 0.05$ )。ZD6474 主要使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,5-FU 则使细胞阻滞于 S 期。两药联合治疗同时产生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 及 S 期阻滞。联合组凋亡率显著高于任一单药组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 ZD6474 和 5-FU 对肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞能产生增殖抑制及促凋亡作用,两药联合表现为协同或相加作用。

**关键词:**癌,肝细胞;范德他尼;5-氟尿嘧啶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1260-03

Effect of ZD6474 in combination with 5-fluorouracil in hepatocarcinoma HepG<sub>2</sub> cells in vitro\*He Benfu<sup>#</sup>, Zheng Hang, Ruan Jian, Luo Rongcheng<sup>△</sup>

(Oncology Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Objective To investigate the killing effect of ZD6474 in combination with 5-fluorouracil on hepatocarcinoma cells line HepG<sub>2</sub>. Methods The inhibitory effect of ZD6474 and 5-fluorouracil alone and their combination treatment on the proliferation of HepG<sub>2</sub> cell in vitro was assessed by MTT assay. The cell cycle and cell apoptosis were detected by flow cytometry. Results ZD6474 and 5-fluorouracil alone both significantly inhibited the proliferation of HepG<sub>2</sub> cells, showing a synergistic effect of their actions in combined use ( $P < 0.05$ ). ZD6474 and 5-fluorouracil alone caused cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S phases, respectively. Combined use of the two drugs resulted in significant reduction of the S-phase cell percentage and cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S phases. The combination use of the two drugs significantly increased the apoptosis rate of the cells as compared with that of the cells with ZD6474 or 5-fluorouracil treatment alone ( $P < 0.05$ ). Conclusion ZD6474 and 5-fluorouracil show a synergistic effect in inhibiting the proliferation and inducing apoptosis of HepG<sub>2</sub> cells.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; vandetanib; 5-fluorouracil

原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, HCC)是一种严重影响人类健康的恶性肿瘤。我国是世界上肝癌高发区之一,发病率为 20.37/10 万,位于常见肿瘤第 3 位<sup>[1-2]</sup>。虽然治疗肝癌的手段很多,如手术、放疗及化疗等,但是肝癌患者就诊时大多数已属晚期,治疗效果不甚满意。范德他尼(Zactima, Vandetanib, ZD6474)是一种合成的苯胺唑啉化合物,为口服的小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI),可同时作用于肿瘤细胞表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)及 RET 酪氨酸激酶<sup>[3]</sup>。2006 年 2 月被美国食品和药物管理局(FDA)批准作为治疗甲状腺癌的靶向治疗药物。虽然目前尚未有 ZD6474 治疗肝癌的大型临床实验报道,但是在细胞学上已经证实 ZD6474 能抑制肝癌细胞的增殖及侵袭<sup>[4]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)则是公认的对肝癌治疗有效的化疗药物之一<sup>[5-6]</sup>。因此,作者选择了 ZD6474 联合 5-FU 这一生物化疗模式来探索肝癌治疗新途径。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

1.1.1 细胞系 HepG<sub>2</sub> 细胞系来自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,培养于含 10% 国产胎牛血清的 1640 培养基,选择对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 药物及试剂 ZD6474 由拜耳公司生产,用 100% DM-SO 溶解,DMSO 终浓度小于 0.5%, -20 °C 保存。5-FU 由恒瑞医药生产;胎牛血清由杭州四季青公司生产;MTT 及 DM-SO 由 Sigma 公司生产;AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。

## 1.2 方 法

1.2.1 肿瘤细胞体外增殖抑制实验 首先选取处于对数生长期 HepG<sub>2</sub> 细胞,按每孔  $3 \times 10^3$  接种于 96 孔板上,培养 24 h 后加入药物。ZD6474(Z) 药物剂量分别是 4、8、12、24、50  $\mu\text{mol/L}$ ;5-FU 单药组的浓度分别为 0.3、0.6、0.9、2.7、5.4  $\mu\text{mol/L}$ 。联合药物组的浓度分别是(Z 4  $\mu\text{mol/L}$  + 5-FU 0.3  $\mu\text{mol/L}$ )、(Z 8  $\mu\text{mol/L}$  + 5-FU 0.6  $\mu\text{mol/L}$ )、(Z 12  $\mu\text{mol/L}$  + 5-FU 0.9  $\mu\text{mol/L}$ )、(Z 24  $\mu\text{mol/L}$  + 5-FU 2.7  $\mu\text{mol/L}$ )、(Z 50  $\mu\text{mol/L}$  + 5-FU 5.4  $\mu\text{mol/L}$ )。每个剂量设置 12 个复孔,对照组加生理盐水,实验组加药物培养 72 h 后,每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,然后倒掉培养液加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,振荡 30 min,用酶标仪(波长为 570 nm)测出各孔的 OD 值,计算细胞增殖抑制率。抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 取对数生长期

\* 基金项目:临床肿瘤学协作专业委员基金会资助项目(Y20060009)。 △ 通讯作者, Tel: (020)61641651; E-mail: luorc01@163.com。

# 在读博士。工作单位为解放军第四二一医院肿瘤科(邮编 510318)。

HepG<sub>2</sub> 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 后加入药物。分组如下:实验组为单药 ZD6474 12 μmol/L、单药 5-FU 0.9 μmol/L 以及联合用药组 ZD6474 12 μmol/L+单药 5-FU 0.9 μmol/L,另设不加药的对照组。加药后 24 h 分别收集细胞,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,调整细胞浓度为 5×10<sup>6</sup>/mL,分别行细胞周期及凋亡检测:(1)周期检测。75%乙醇、-20℃固定过夜,洗涤离心后加入含有 11% RnaseA 的 PBS 液和 10 μg/mL PI 500 μL,室温避光染色 30 min 后上流式细胞仪(美国, BIDI Vantage 型)进行细胞周期测定。(2)凋亡检测。加入 10 μL Annexin V - FITC 和 5 μL 的 PI,避光室温孵育 15 min,然后上机检测。数据均由 ModFit 210 软件系统分析。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。3 组间抑制率差异分析采用重复测量方差分析;细胞周期、细胞凋亡率采用单向方差分析;多重比较均采用 LSD 法,交互效应分析采用 factorial analysis。

**2 结 果**

**2.1 MTT 结果分析** 经过药物处理的 HepG<sub>2</sub> 细胞在 72 h 后检测 OD 值,结果显示,ZD6474 单药组、5-氟尿嘧啶单药组、两药联合组对肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞均有抑制作用,且两药联合组的抑制率明显高于 2 个单药组(P<0.05),见表 1~3。用 factorial analysis 分析两药联用的性质,结果显示两药具有交互作用(P<0.05),其中,Z<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 时表现为协同作用,为最佳浓度。

表 1 ZD6474 单药组 72 h 抑制率(±s)

药物及其浓度(μmmol/L)	72 h 抑制率(%)
Z <sub>1</sub>	13.53±0.95
Z <sub>2</sub>	32.62±1.60
Z <sub>3</sub>	54.71±2.06
Z <sub>4</sub>	69.32±5.25
Z <sub>5</sub>	76.11±4.55

表 2 5-氟尿嘧啶单药组 72 h 抑制率(±s)

药物及其浓度(μmmol/L)	72 h 抑制率(%)
5-FU <sub>1</sub>	11.33±1.71
5-FU <sub>2</sub>	22.59±1.67
5-FU <sub>3</sub>	38.17±2.45
5-FU <sub>4</sub>	44.29±3.82
5-FU <sub>5</sub>	63.43±2.47

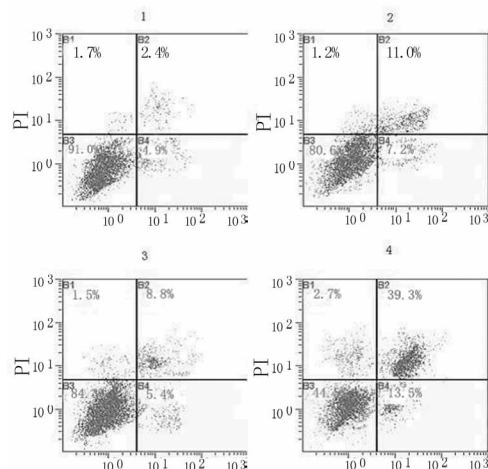
表 3 5-氟尿嘧啶联合 ZD6474 组 72 h 抑制率(±s)

药物及其浓度(μmmol/L,)	72 h 抑制率(%)
Z <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	35.64±4.56
Z <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	57.31±3.03
Z <sub>3</sub> F <sub>3</sub>	80.34±5.34
Z <sub>4</sub> F <sub>4</sub>	86.41±5.64
Z <sub>5</sub> F <sub>5</sub>	93.22±4.16

**2.2 ZD6474、5-FU 单药及联合用药对 HepG<sub>2</sub> 细胞周期的影响** ZD6474 单药作用可使细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期

(50.0%),与对照组(30.7%)相比增加了 19.3%。而 5-FU 单药主要使细胞阻滞于 S 期(62.33%,对照组 42.45%)。联合用药后,G<sub>2</sub> 期明显下降至 2.66%(对照组 17.25%),细胞主要阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 和 S 期。

**2.3 ZD6474、5-FU 单药及联合用药对 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡的影响** 经两药单药分别作用后,细胞凋亡率均较对照组升高。两药单药的凋亡率分别为 18.2%和 14.2%(对照组 7.3%)。联合用药组凋亡率为 52.8%,与单药组相比差异具有统计学意义(P<0.05),见图 1。



1. 对照组;2. ZD6474 治疗组;3. 5-FU 治疗;4. 联合组

图 1 ZD6474 和 5-FU 单独及联合对 HepG<sub>2</sub> 细胞的凋亡作用

**3 讨 论**

对于中晚期肝癌患者,以化疗为主的综合治疗是首选治疗方案,但是由于部分患者的肝癌细胞中存在多药耐药性(multidrug resistance, MDR),往往导致化疗的失败。MDR 通常是由 ATP 结合盒(ABC)运转子所介导,能逆转药物浓度梯度将药物底物移出细胞外<sup>[7-8]</sup>。ABCC1 是 ATP 结合盒(ABC)家族运转子的成员之一,它能转导结合于谷胱甘肽、葡萄糖醛酸、硫酸的抗癌药物底物,包括长春新碱和阿霉素等<sup>[9]</sup>。近来有研究表明,ZD6474 能抑制 ABCC1 的运载功能,从而逆转耐药,提高化疗药物敏感性<sup>[10]</sup>。而 5-FU 是嘧啶类抗代谢药,其抗肿瘤机制为 5-FU 进入体内即被活化成为氟尿嘧啶脱氧核苷酸(FdUMP),继而抑制胸苷酸合成酶(TS),使之不能合成 dTMP,最终起到干扰核酸和 DNA 的生物合成。Correde 等<sup>[11]</sup>发现 5-FU 单用或联用吉西他滨和(或)伊立替康能提高结肠癌细胞系中 EGFR 的水平和增强对西妥昔单抗介导的 ADCC 作用。Wu 等<sup>[12]</sup>认为抑制 EGFR 能增强肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性。因此,在理论上将 ZD6474 与 5-FU 联合可以相互促进对肝癌细胞的凋亡和抑制增殖的作用。

本研究结果显示,ZD6474 及 5-FU 单药对肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞均有增殖抑制作用,且呈剂量依赖性。两者联用时,可产生单纯相加至增强的协同抑制效果,在 ZD6474 10μmol/L 及 5-FU 0.8μmol/L 时联合效果最佳,表现为协同作用。其机制可能是因为二药联用时抑制或阻断了细胞增殖和生存相关的信号通路,从而协同影响了 HepG<sub>2</sub> 细胞增殖及存活。

本研究亦发现,ZD6474 和 5-FU 联用能促进 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡,联合用药组较单药组凋亡率明显升高(P<0.05)。流式

细胞技术检测细胞周期及凋亡结果显示,ZD6474 使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/G<sub>1</sub> 期,而 5-FU 使细胞阻滞于 S 期。联合用药组中的 G<sub>2</sub>/M 期比例明显降低,细胞主要阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 和 S 期,细胞凋亡率明显强于两药单用。有研究表明,ZD6474 能阻断 c-Kit 和它的下游效应子 Akt 和 ERK 从而促进细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>。而 5-FU 联合 ERK 抑制剂则能通过下调 bcl-2 和上调 caspase-9 来协同抑制黑色素瘤细胞 B16 的增殖及促进其凋亡<sup>[16]</sup>。由此推测,抑制 ERK 可能是两药联合产生协同作用的机制之一。

总之,随着分子靶向治疗研究的深入,生物化疗(biochemotherapy)这一全新的肿瘤治疗模式越来越受到人们的关注,ZD6474 单药治疗甲状腺癌、非小细胞肺癌已取得了肯定疗效<sup>[17-18]</sup>。本实验通过联用 ZD6474 和 5-FU 的体外实验证明其对肝癌的抗肿瘤作用,探讨了不同联合治疗方案的疗效,开阔了思路,为临床上肝癌生物化疗的治疗模式提供了一定的理论基础。

#### 参考文献:

[1] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907-1917.

[2] 王星刚, 刘刚. 原发性肝癌的综合治疗方法探讨[J]. *基层医学论坛*, 2007(15): 695-696.

[3] Morabito A, Piccirillo M C, Falasconi F, et al. Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions[J]. *Oncologist*, 2009, 14(4): 378-390.

[4] Giannelli G, Azzariti A, Sgarra C, et al. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(4): 479-485.

[5] Rougier P, Mitry E, Barbare J, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC): an update[J]. *Semin Oncol*, 2007, 34 Suppl 1: S12-20.

[6] 伍福胜. 羟基喜树碱联合甲酰四氢叶酸钙、氟尿嘧啶治疗晚期消化系统肿瘤临床观察[J]. *安徽医药*, 2006(6): 421.

[7] Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71(1): 537-592.

[8] Litman T, Druley T E, Stein WD, et al. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(7): 931-959.

[9] Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/

ABCC1)[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 453(5): 621-641.

[10] Zheng LS, Wang F, Li YH, et al. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5172.

[11] Correale P, Marra M, Remondo C, et al. Cytotoxic drugs up-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in colon cancer cells and enhance their susceptibility to EGFR-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9): 1703-1711.

[12] Wu X, Deng Y, Wang G, et al. Combining siRNAs at Two Different Sites in the EGFR to Suppress its Expression, Induce Apoptosis, and Enhance 5-Fluorouracil Sensitivity of Colon Cancer Cells[J]. *J Surg Res*, 2007, 138(1): 56-63.

[13] Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C, et al. ZD6474 induces growth arrest and apoptosis of GIST-T1 cells, which is enhanced by concomitant use of sunitinib[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(12): 1404-1409.

[14] Sarkar S, Mazumdar A, Dash R, et al. ZD6474 enhances paclitaxel antiproliferative and apoptotic effects in breast carcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 22(2): 375-384.

[15] Yang S, Wu J, Zuo Y, et al. ZD6474, a Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitor, Potentiates the Anti-Tumor and Anti-Metastasis Effects of Radiation for Human Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(6): 611-622.

[16] Yoon H, Min J K, Lee J W, et al. Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011(3): 333-337.

[17] Herbst R S, Sun Y, Eberhardt W E, et al. Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(7): 619-626.

[18] Romagnoli S, Moretti S, Voce P, et al. Targeted molecular therapies in thyroid carcinoma[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009, 53(9): 1061-1073.

(收稿日期: 2011-01-10 修回日期: 2011-03-05)

(上接第 1259 页)

[14] Zhu L, Lovinger D, Depire E. Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride[J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(3): 1557-1568.

[15] Witte OW, Freund HJ. Neuronal dysfunction, epilepsy,

and post lesional brain plasticity[J]. *Adv Neurol*, 1999, 81(1): 25-36.

(收稿日期: 2010-04-11 修回日期: 2010-10-11)