

# 羊角棉总生物碱增强氟尿嘧啶对结直肠癌化疗敏感性

王潇<sup>1</sup>,孔文茹<sup>1</sup>,崔伟亮<sup>2</sup>,王姝麒<sup>1</sup>

(1.山东大学药学院,山东 济南 250012;2.山东省食品药品检验研究院,山东 济南 250101)

**摘要:**目的 观察羊角棉总生物碱在结直肠癌治疗中对氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的增敏作用,探讨其对5-FU药代动力学的影响。方法 CCK-8法评价羊角棉总生物碱与5-FU联用对HCT15人结直肠腺癌细胞和CT26.WT小鼠结肠癌细胞杀伤能力;构建小鼠皮下瘤模型,观察5-FU和羊角棉总生物碱单用或联用时对肿瘤生长的影响;LC-MS/MS法检测5-FU及其代谢物二氢氟尿嘧啶(dihydrofluorouracil, FUH<sub>2</sub>)和氟脱氧尿苷(flurordeoxyuridine, FUrd)在大鼠体内的药代动力学参数。结果 羊角棉总生物碱对HCT15和CT26.WT细胞毒性的IC<sub>50</sub>值分别为31.98 μg/mL和23.71 μg/mL;低剂量(100 mg/kg)和高剂量(200 mg/kg)羊角棉总生物碱联用5-FU对荷瘤小鼠的抑瘤率从50.91%分别增长至58.56%和62.16%;5-FU联用羊角棉总生物碱后,T<sub>1/2</sub>显著延长,其代谢产物FUrd血药浓度显著下降。结论 羊角棉总生物碱对结直肠癌细胞有一定的细胞毒性,与5-FU联用可显著增强其抗结直肠癌活性;羊角棉总生物碱可能通过降低二氢尿嘧啶脱氢酶浓度延缓5-FU分解代谢并调节其合成代谢途径,从而加强其生物学活性。

**关键词:**羊角棉;结直肠癌;生物碱;氟尿嘧啶;细胞毒

中图分类号:R574

文献标志码:A

## *Alstonia mairei* total alkaloids enhance the sensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil chemotherapy

WANG Xiao<sup>1</sup>, KONG Wenru<sup>1</sup>, CUI Weiliang<sup>2</sup>, WANG Shuqi<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To observe the sensitizing effect of *Alstonia mairei* total alkaloids on 5-fluorouracil (5-FU) in the treatment of colorectal cancer, and to explore the influence on the pharmacokinetics of 5-FU. **Methods** The cytotoxicity of *Alstonia mairei* total alkaloids combined with 5-FU on HCT15 human colorectal adenocarcinoma cells and CT26.WT mouse colon cancer cells was evaluated by CCK-8 kit. A mouse subcutaneous tumor model was established to observe the effects of 5-FU and *Alstonia mairei* total alkaloids on tumor growth when used alone or in combination. The pharmacokinetic parameters of 5-FU and its metabolites dihydrofluorouracil (FUH<sub>2</sub>) and fluorodeoxyuridine (FUrd) in rats were determined by LC-MS/MS. **Results** The IC<sub>50</sub> values of *Alstonia mairei* total alkaloids on HCT15 and CT26.WT cells were 31.98 μg/mL and 23.71 μg/mL, respectively. The tumor inhibition rate of low dose (100 mg/kg) and high dose (200 mg/kg) *Alstonia mairei* total alkaloids combined with 5-FU in tumor-bearing mice increased from 50.91% to 58.56% and 62.16%, respectively. The T<sub>1/2</sub> of 5-FU combined with *Alstonia mairei* total alkaloids was significantly prolonged, and the plasma concentration of FUrd was significantly decreased. **Conclusion** The *Alstonia mairei* total alkaloids have certain cytotoxicity against colorectal cancer cells, and its anti-colorectal cancer activity can be significantly

收稿日期:2024-03-19

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010511);国家重点研发计划-中医药现代化专项(2023YFC3504102);山东省自然科学基金(ZR2022MH224);国家药品监管科学体系建设重点项目(RS2024Z006)

通信作者:崔伟亮。E-mail:xinyao2002@126.com

王姝麒。E-mail:wangsq@sdu.edu.cn

enhanced in combination with 5-FU. *Alstonia mairei* total alkaloids may enhance the biological activity of 5-FU by reducing the concentration of DPD to delay the catabolism of 5-FU and regulate its anabolic pathway.

**Key words:** *Alstonia mairei*; Colorectal cancer; Alkaloids; 5-Fluorouracil; Cytotoxicity

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是当今世界第四大致命癌症,每年有近90万人因此死亡,在世界范围内约占每年诊断的癌症和癌症相关死亡人数的10%<sup>[1-6]</sup>。肥胖、过度摄入乙醇或红肉、缺乏体育锻炼和吸烟均是罹患CRC的风险因素<sup>[2]</sup>。在发达国家,CRC的患病率趋于稳定,并呈现出下降趋势;但50岁以下的CRC患者发病率却呈现上升趋势,特别是直肠癌和左侧结肠癌患者,目前导致这种上升趋势的原因尚不明确<sup>[7]</sup>。

内镜手术和外科手术是CRC最重要的治疗方式,并且是局部CRC患者以及可切除的远端转移患者的唯一治疗选择<sup>[8]</sup>,但化疗仍然是CRC治疗中不可缺少的手段,氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是CRC治疗中最有效和最常用的药物之一,也是化疗联合方案的主要组成部分,放疗中也会使用5-FU作为放射增敏剂<sup>[9-12]</sup>。5-FU是一种抗代谢药物,是最早报道的具有抗癌活性的化疗药物之一,通过抑制胸腺苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)的活性干扰DNA的合成,从而抑制肿瘤细胞生长<sup>[11]</sup>。尽管5-FU是最安全的化疗药物之一,仍有部分CRC患者服用后出现严重的不良反应,包括发热、疲劳、黏膜炎、口炎、恶心、呕吐和腹泻等。为了提高疗效,5-FU经常与奥沙利铂和/或伊立替康联合使用,这一做法的缺点是不良反应也随之增加。耐药性也是CRC患者5年生存率较低的原因之一<sup>[13-16]</sup>。

天然产物被认为是CRC常规化疗的辅助药物,并且能够通过不同的机制逆转获得性耐药<sup>[17]</sup>。羊角棉为夹竹桃科鸡骨常山属植物,民间用其治疗痈肿疮毒,其标志性成分吡啶生物碱类化合物在抗肿瘤和抗疟疾方面发挥重要作用<sup>[18-20]</sup>。本研究使用羊角棉总生物碱与5-FU联用,观察其在小鼠CRC模型中对5-FU的增敏作用,并检测其对5-FU的药代动力学过程的影响,旨在对羊角棉药用活性进行发掘。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞

人结直肠腺癌细胞HCT15和小鼠结肠癌细胞CT26.WT购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

#### 1.1.2 实验动物

雄性BALB/c小鼠66只,体质量18~20g,SPF级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2021-0002,适应性饲养1周后进行实验。雄性SD大鼠10只,体质量200~220g,SPF级,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号:SYXK(鲁)2020 0022,适应性饲养1周后进行实验。本研究动物实验经山东大学药学院伦理委员会批准(No. 240089)。

#### 1.1.3 主要试剂

1640培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司,CCK-8试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司,小鼠脱氧吡啶酚酶联免疫吸附测定试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,1%青霉素/链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司,二氯甲烷和无水乙醇购自天津富宇精细化工有限公司,盐酸和氢氧化钠购自国药集团药业股份有限公司,5-FU(纯度>99%)和氟脱氧尿苷(flurordeoxyuridine, FUrd)(纯度>98%)购自北京百灵威科技有限公司,5-BU(纯度>98%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,二氢氟尿嘧啶(dihydrofluorouracil, FUH<sub>2</sub>)(纯度>98%)购自上海凯梅根生物科技有限公司,色谱级甲醇购自中国Thermo Fisher公司,纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。羊角棉枝叶购自云南众和植域生物科技有限公司,经山东大学药学院王小宁教授鉴定。6.0kg羊角棉枝叶粉碎后,用90%乙醇超声提取50min,总浸膏经旋转蒸发仪浓缩后用2%盐酸溶解,用氢氧化钠调节pH值至10~11,用二氯甲烷萃取3次,合并有机相,经旋转蒸发仪浓缩后用盐酸溶解并调节pH值为5,上X-5型大孔树脂,70%乙醇洗脱,合并洗脱液,用溴甲酚绿比色法测定总生物碱浓度,得到羊角棉总生物碱7.2g。

#### 1.1.4 主要仪器设备

Mettler ag135十万分之一电子分析天平购自瑞士Mettler Toledo公司,Infinite f50吸收光酶标仪购自瑞士Tecan公司,Multifuge x1r pro离心机购自美国Thermo Fisher公司,Eclipse ci-1正置白光拍照显微镜购自日本Nikon,AD Pump二元液相泵、AD Column oven柱温箱、AD Autosampler自动进样器和Triple Quad TM 6500三重四级杆串联质谱仪配备电喷雾离子源购自美国AB SCIEX公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用检测 CRC 细胞毒性

取对数生长期的 HCT15 和 CT26.WT 细胞,以 8 000 个/孔细胞的密度接种于 96 孔板中,细胞贴壁后弃去原来的培养基,加入含有不同药物组合的完全培养基培养 48 h,弃去含有药物的培养基,加入含有 10% CCK-8 的完全培养基,培养 40 min,检测 450 nm 处吸光度并计算  $IC_{50}$  值。细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

### 1.2.2 小鼠结肠癌皮下移植瘤模型建立与给药方案

42 只 BALB/c 小鼠随机分为 7 组,分别为正常组、模型组、5-FU 组、低剂量总碱组、高剂量总碱组、

5-FU 联用低剂量总碱组和 5-FU 联用高剂量总碱组,每组 6 只。除正常组外,其他组小鼠均于右前肢腋下接种 0.1 mL 的 CT26.WT 细胞( $5 \times 10^7$  个/mL)。继续饲养 5 d,肿瘤长至 0.5 cm × 0.5 cm 时,确认建模成功。之后给药 7 d,详细给药方案见表 1,正常组和模型组每天给予相同量的生理盐水。观察小鼠活动、反应、精神、皮毛情况等,测量肿瘤长径( $a$ )和短径( $b$ ),每两天测量一次小鼠体质量。处死小鼠前,内眦取血,静置后分离血清;处死小鼠后,剥离心、肝、脾、肾脏器与肿瘤,称重,计算抑瘤率和脏器系数。相应公式如下:肿瘤体积 =  $1/2 \times a \times b^2$ ,抑瘤率(%) = (模型组小鼠平均瘤重 - 给药组小鼠平均瘤重) / 模型组小鼠平均瘤重 × 100%,脏器系数 = 脏器质量(mg) / 体质量(g)。

表 1 BALB/c 荷瘤小鼠给药方案

Table 1 Treatments for BALB/c tumor-bearing mice

组别	羊角棉总生物碱	5-FU
正常组	—	—
模型组	—	—
低剂量总碱组	100 mg/kg, 灌胃, 1 次/d	—
高剂量总碱组	200 mg/kg, 灌胃, 1 次/d	—
5-FU 组	—	25 mg/kg, 腹腔注射, 隔日 1 次
5-FU 联用低剂量总碱组	100 mg/kg, 灌胃, 1 次/d	25 mg/kg, 腹腔注射, 隔日 1 次
5-FU 联用高剂量总碱组	200 mg/kg, 灌胃, 1 次/d	25 mg/kg, 腹腔注射, 隔日 1 次

### 1.2.3 肿瘤组织 HE 染色

小鼠肿瘤用 PBS 清洗后,经 4% 多聚甲醛中固定、乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片、烘干、脱蜡、复水、PBS 清洗、苏木精-伊红染色、清洗、晾干和封片后即得 HE 染色切片,在光学显微镜下观察拍照。

### 1.2.4 二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)含量检测

24 只 BALB/c 小鼠随机分入对照组、低剂量总碱组和高剂量总碱组,每组 8 只,分别每天灌胃,给予生理盐水 10 mL/kg、羊角棉总碱 100 mg/kg 和 200 mg/kg,连续 5 d,第 5 天在 9:00~11:00 间切除肝脏,匀浆、离心后取上清,用 ELISA 试剂盒检测 DPD 含量。

### 1.2.5 检测羊角棉总碱对 5-FU 体内代谢动力学过程的影响

10 只 SD 大鼠随机分成 5-FU 组和 5-FU 联用总碱组,每组 5 只。5-FU 组先连续给予生理盐水(10 mL/kg, 灌胃) 4 d,第 5 天给予生理盐水(10 mL/kg, 灌胃) 1 h 后,再给予 5-FU(20 mg/kg, 腹腔注射);5-FU 联用总碱组先连续给予羊角棉总碱(200 mg/kg, 灌胃) 4 d,第 5 天给予羊角棉总碱(200 mg/kg, 灌胃) 1 h 后,再给予 5-FU(20 mg/kg, 腹腔注射);给予 5-FU 前 12 h 禁食、不禁水,羊角棉总碱的给药体积为 0.1 mL/10 g,5-FU 的给药体积

为 0.05 mL/10 g。给药 0、2、5、10、20、30、45、60、90、120 和 180 min 后,乙醚缸内麻醉,从大鼠内眦取血,LC-MS/MS 检测血浆中 5-FU 及其代谢物 FUH2 及 FUrd 的浓度(以 5-BU 为内标物),绘制药浓度-时间曲线。质谱条件:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),负离子模式,多反应监测方式(multiple reaction monitoring, MRM)扫描,离子源 550 °C,鞘气流速 46 L/h,辅助气流速 850 L/h,喷雾电压 3.5 kV,源温度 150 °C,辅助气温度 400 °C,锥口电压 30 V,碰撞电压 35 V。色谱条件:色谱柱 RESTEK Pinnacle II C18 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm),柱温 40 °C;流动相为纯水(A 相)和甲醇(B 相),流速 0.4 mL/min,流动相洗脱程序:0~2 min,10→95% B;2.1~2.5 min,95% B;2.6~3.0 min,95→100% B;3.1~6 min,10% B。

### 1.2.6 药代动力学数据分析

用 TOPFIT 软件(version 2.0; Thomae GmbH, 德国)的非房室模型进行计算,分析所得药动学参数包括药时曲线下面积( $AUC_{0-t}$ )、半衰期( $T_{1/2}$ )、机体清除率( $Cl/F$ )及表观分布容积( $V_z$ )、达峰时间( $T_{max}$ )及最大血浆药物浓度( $C_{max}$ )。

## 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9 软件。检测数据通过正态检验,符合正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,对数据进行

Bartlett 方差齐性检验,两组间平均值比较采用  $t$  检验,多组间平均值比较采用单因素方差分析;不满足方差齐性的数据采用非参数 Kruskal-Wallis 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用对 CRC 细胞系的细胞毒性

#### 2.1.1 羊角棉总生物碱的细胞毒性

不同浓度的羊角棉总生物碱对 HCT15 和

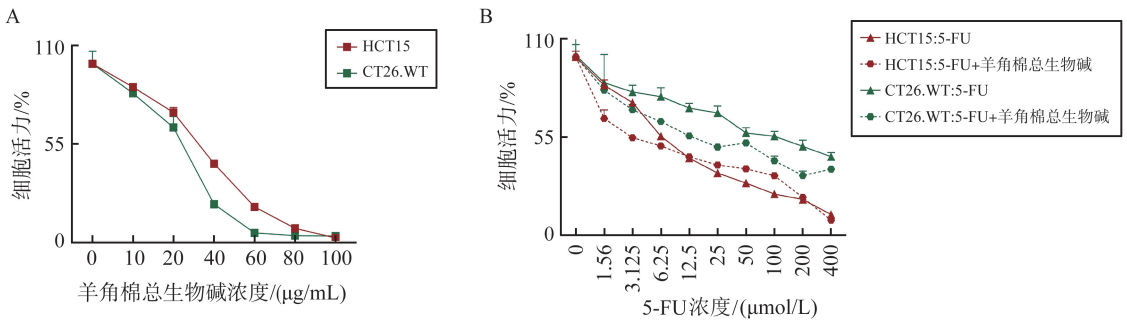


图 1 羊角棉总生物碱影响 CRC 细胞活力

A: 羊角棉总生物碱有 CRC 细胞毒性; B: 羊角棉总生物碱增强 5-FU 对 CRC 细胞毒性。

Figure 1 *Alstonia mairei* total alkaloids affected the viability of CRC cell lines

A: *Alstonia mairei* total alkaloids were cytotoxic to CRC cell lines; B: *Alstonia mairei* total alkaloids enhanced the cytotoxicity of 5-FU to CRC cell lines.

### 2.2 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用增强其抗 CRC 活性

#### 2.2.1 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用对 CRC 小鼠一般情况的影响

正常组小鼠在整个实验过程中精神饱满、活动自如、毛发顺滑、进食饮水正常;模型组小鼠实验后期精神欠佳、蜷缩怕冷、毛发蓬松凌乱、进食饮水减少。5-FU 组与模型组小鼠体况类似,但体质量明显降低;低剂量总碱组、高剂量总碱组、5-FU 联用低剂量总碱组和高剂量总碱组小鼠体况尚

可,表现为活动较好、毛发较顺滑、食欲有所增加,精神也较好。

#### 2.2.2 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用对 CRC 小鼠体质量的影响

到治疗结束时,低剂量总碱组小鼠体质量显著高于高剂量总碱组外的其他给药组 ( $P$  均  $< 0.05$ ),高剂量总碱组小鼠体质量显著高于 5-FU 联用高剂量总碱组 ( $P < 0.05$ ),5-FU 组小鼠体质量显著低于模型组、低剂量总碱组和高剂量总碱组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见图 2A。

可,表现为活动较好、毛发较顺滑、食欲有所增加,精神也较好。

#### 2.2.2 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用对 CRC 小鼠体质量的影响

到治疗结束时,低剂量总碱组小鼠体质量显著高于高剂量总碱组外的其他给药组 ( $P$  均  $< 0.05$ ),高剂量总碱组小鼠体质量显著高于 5-FU 联用高剂量总碱组 ( $P < 0.05$ ),5-FU 组小鼠体质量显著低于模型组、低剂量总碱组和高剂量总碱组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见图 2A。

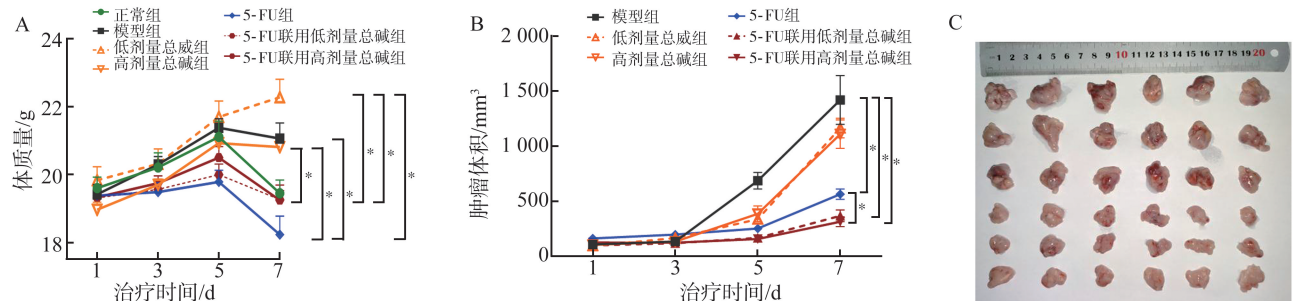


图 2 羊角棉总生物碱与 5-FU 联用抑制肿瘤生长

A: 荷瘤小鼠体质量变化 ( $*P < 0.05$ ); B: 肿瘤体积-时间曲线 ( $*P < 0.05$ ); C: 不同治疗方案的肿瘤体积。

Figure 2 Combined administration of *Alstonia mairei* total alkaloids and 5-FU inhibited tumor growth

A: Weight change curves of tumor-bearing mice ( $*P < 0.05$ ); B: Tumor volume change curves with different treatment ( $*P < 0.05$ ); C: Tumour volume for different treatment options.

### 2.2.3 羊角棉总生物碱与5-FU联用抑制肿瘤生长

治疗结束时,5-FU组及5-FU联用高低剂量总碱组小鼠肿瘤体积较模型组显著减小( $P$ 均 $<0.05$ ,图2B)。所有给药组肿瘤生长均受不同程度抑制(图2C)。与模型组相比,所有给药组肿瘤生长均被显著抑制,且5-FU联用高剂量总碱组的抑瘤率显著高于5-FU组( $P$ 均 $<0.05$ ),见表2。

### 2.2.4 小鼠肿瘤组织病理切片HE染色

模型组肿瘤细胞紧密排列,细胞间隙较小,胞核异型、核质比高、嗜碱性强,可见少量核分裂象,未见明显的肿瘤细胞坏死,组织边缘偶见粒细胞及淋巴细胞浸润;5-FU组和5-FU联用低剂量总碱组肿瘤细胞密度降低,并且炎性细胞表现出大小差异、浸润及坏死区;5-FU组肿瘤细胞可见少量核分裂象,小灶性肿瘤细胞坏死,胞核固缩或碎裂,胞质崩解,少量血管淤血,未见明显的炎性细胞浸

润;5-FU联用低剂量总碱组肿瘤细胞偶见核分裂象,肿瘤细胞坏死,组织边缘可见少量淋巴细胞浸润;而5-FU联用高剂量总碱组可见肿瘤细胞坏死进一步加大,胞核固缩或碎裂,胞质崩解,组织边缘见淋巴细胞浸润。见图3。

表2 荷瘤小鼠的瘤重和抑瘤率

Table 2 Tumor weight and tumor inhibition rate with different treatment

分组	瘤重/g	抑瘤率/%
模型组	2.18±0.31	—
低剂量总碱组	1.82±0.18*	16.34
高剂量总碱组	1.56±0.22**	28.59
5-FU组	1.07±0.12***	50.91
5-FU联用低剂量总碱组	0.90±0.20***	58.56
5-FU联用高剂量总碱组	0.82±0.13****	62.16

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs 模型组;\*\*\*\* $P<0.01$  vs 5-FU组。

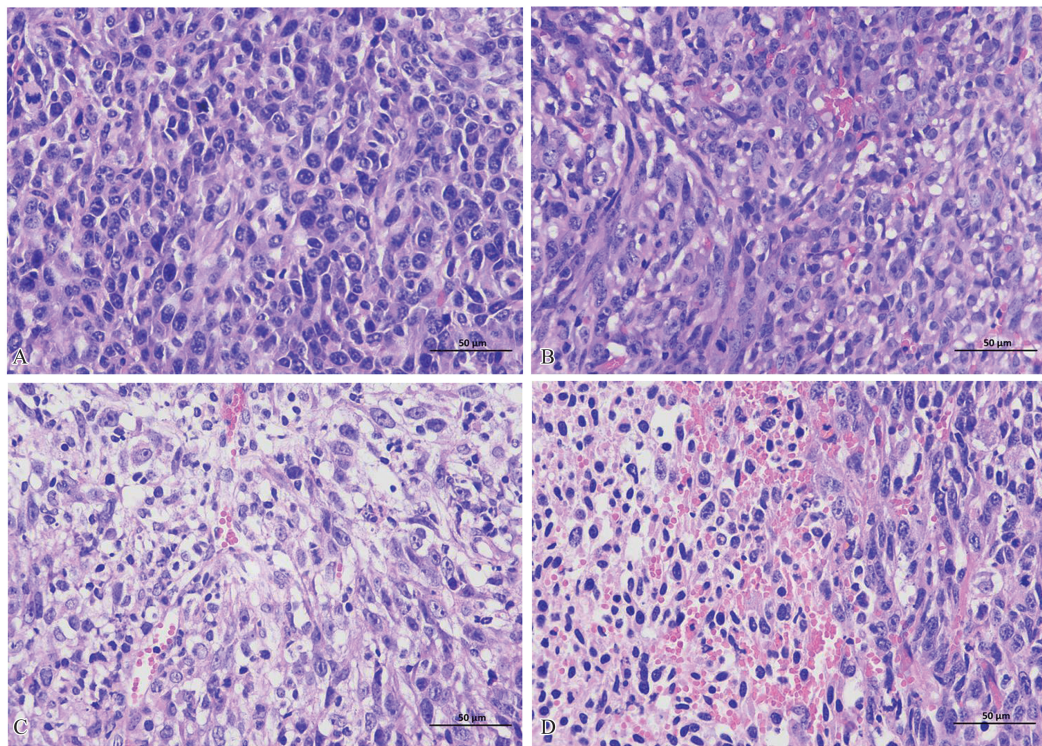


图3 不同治疗方式对小鼠肿瘤组织病理形态的影响(标尺=50 μm)

A: 模型组; B: 5-FU组; C: 5-FU联用低剂量总碱组; D: 5-FU联用高剂量总碱组。

Figure 3 Effect of different treatments on the pathomorphology of tumor tissues in mice (bar = 50 μm)

A: Model group; B: 5-FU group; C: 5-FU with low-dose total alkaloids group; D: 5-FU with high-dose total alkaloids group.

### 2.2.5 不同给药方案对CRC小鼠脏器系数的影响

与正常组相比,模型组、低剂量总碱组与高剂量总碱组小鼠脾脏系数显著升高( $P$ 均 $<0.001$ );模型组、5-FU组、低剂量总碱组与5-FU联用低剂量总碱组心脏系数显著下降( $P$ 均 $<0.05$ );除5-FU联用高剂量总碱组外,其他组小鼠肾脏系数显著下降( $P$ 均 $<0.05$ );低剂量总碱组与高剂量总碱组

肝脏系数显著上升( $P$ 均 $<0.01$ )。与模型组相比,高剂量总碱组、5-FU组、5-FU联用低剂量总碱组和5-FU联用高剂量总碱组小鼠脾脏系数显著下降( $P$ 均 $<0.05$ );高剂量总碱组小鼠肝脏系数显著升高( $P<0.01$ );所有给药组小鼠心脏和肾脏系数差异无统计学意义。见表3。

表3 小鼠脏器系数  
Table 3 Organ indexes of mice with different treatment

分组	肝脏系数	肾脏系数	心脏系数	脾脏系数
正常组	55.96±2.79	22.49±1.24	6.17±0.44	3.93±0.19
模型组	59.32±3.63	19.40±1.28*	5.05±0.37**	7.80±1.17***
5-FU组	55.47±3.25	18.32±0.98**	5.37±0.45*	3.59±0.33###
低剂量总碱组	63.02±5.94**	17.93±1.10***	5.39±0.33*	6.94±0.66***
高剂量总碱组	67.20±2.76***##	18.64±3.26**	5.46±0.53	6.16±0.93***
5-FU联用低剂量总碱组	57.69±1.47	18.61±1.28**	5.35±0.45*	3.65±0.22###
5-FU联用高剂量总碱组	61.16±2.30	20.65±1.96	5.70±0.73	3.77±0.40###

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs 正常组; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs 模型组。

## 2.3 羊角棉总生物碱改变 5-FU 代谢

### 2.3.1 羊角棉总生物碱降低大鼠肝脏 DPD 含量

对照组、低剂量总碱组和高剂量总碱组大鼠肝脏 DPD 含量分别为 68.22、67.63 和 60.76 nmol/L。高剂量羊角棉总生物碱可显著降低肝脏 DPD 含量 ( $P<0.01$ )。

### 2.3.2 羊角棉总生物碱影响 5-FU 体内代谢动力学

5-FU 与其分解代谢产物  $FUH_2$  及其合成代谢产物  $FUrd$  的平均药物浓度-时间曲线见图 4。与 5-FU 组相比, 5-FU 联用总碱组 5-FU 的  $T_{1/2}$  显著延长、 $Cl/F$  显著降低,  $FUH_2$  无明显差异,  $FUrd$  的  $AUC_{0-t}$ 、 $C_{max}$  显著降低(表 4), 提示羊角棉总生物碱可能通过调节 5-FU 的代谢途径影响其抗肿瘤活性。

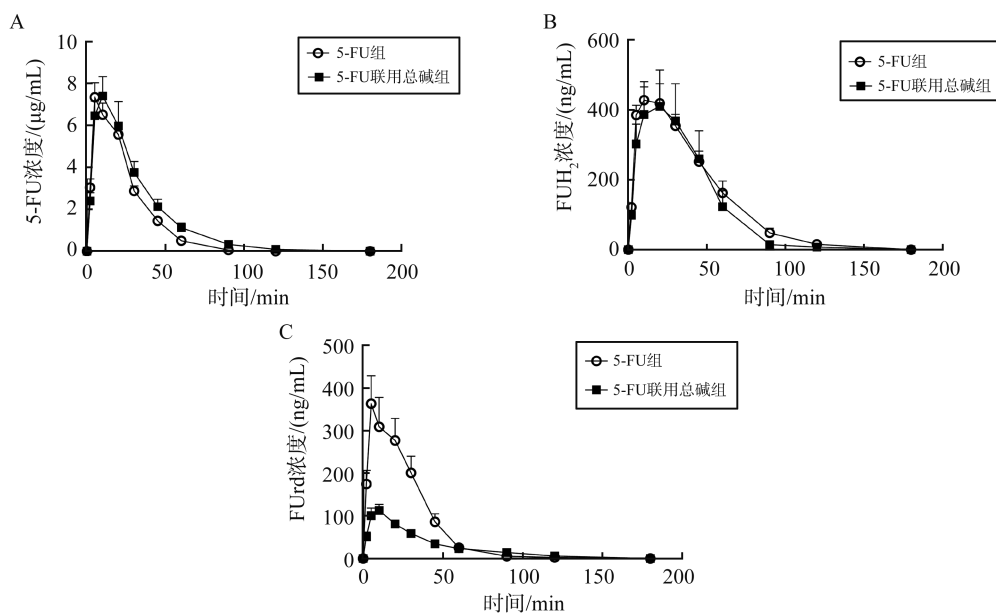


图4 5-FU (A)、 $FUH_2$  (B) 及  $FUrd$  (C) 浓度-时间曲线

Figure 4 Time-concentration curves of 5-FU (A),  $FUH_2$  (B), and  $FUrd$  (C)

表4 5-FU、 $FUH_2$  及  $FUrd$  的药代动力学参数  
Table 4 Pharmacokinetic parameters of 5-FU,  $FUH_2$  and  $FUrd$

化合物	参数	5-FU 组	5-FU 联用总碱组
5-FU	$AUC_{0-t}/(\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL})$	212.70±17.03	266.82±88.19
	$T_{max}/\text{min}$	7(5,10)	10(10,10)
	$T_{1/2}/\text{min}$	10.50±1.81	16.17±3.56*
	$Cl/F/[\text{mL}/(\text{h}\cdot\text{kg})]$	1.58±0.13	1.40±0.49*
	$V_z/(\text{mL}/\text{kg})$	1.44±0.29	1.94±0.83
	$C_{max}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	22.08±2.06	28.60±3.07
$FUH_2$	$AUC_{0-t}/(\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL})$	22.81±4.81	20.31±12.02
	$T_{max}/\text{min}$	16(10,20)	18(10,30)
	$C_{max}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	442.80±115.46	427.20±221.19
	$AUC_{FUH_2}/AUC_{FU}$	0.108±0.023	0.085±0.060

续表

化合物	参数	5-FU 组	5-FU 联用总碱组
FUrd	$AUC_{0-t}/(\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL})$	11.60±2.51	4.51±1.11 ***
	$T_{\text{max}}/\text{min}$	9.40(2,30)	9.00(5,20)
	$C_{\text{max}}/(\text{ng}/\text{mL})$	370.00±123.96	120.20±32.73 **
	$AUC_{\text{FUrd}}/AUC_{\text{FU}}$	1.055±0.105	0.645±0.103 ***

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs 5-FU 组。

### 3 讨论

羊角棉为我国特有的夹竹桃科鸡骨常山属植物,主要分布在贵州、云南和四川等高原地带,当地用其根和叶治疗外伤出血,目前对其化学成分的研究还很不充分。鸡骨常山属植物所含生物碱多为单萜吲哚生物碱、双聚单萜吲哚生物碱和与吲哚碱相关的其他生物碱。吲哚生物碱多具细胞毒性,部分双吲哚生物碱有较强的抗癌作用。

羊角棉总生物碱在体外 CRC 细胞毒性检测中表现出一定的细胞杀伤能力,在安全剂量下与 CRC 临床一线药物 5-FU 联用后,可以通过促进肿瘤细胞坏死、增强免疫细胞浸润从而加强 5-FU 对小鼠 CRC 发展的抑制作用,这一作用在小鼠 CRC 皮下瘤模型中被进一步验证。而且羊角棉总生物碱与 5-FU 联用改善了小鼠对 5-FU 的不良反应,具体表现为厌食减轻及体质量下降减缓,可能由于羊角棉总生物碱增加了小鼠食欲。单用羊角棉总生物碱治疗 CRC 小鼠时,肿瘤虽稍有减小,但小鼠脾脏肿大严重,肝脏与肾脏也表现出不同程度的异常;单用 5-FU 治疗时,肿瘤减小明显,脾脏肿大现象也被逆转,但小鼠肾脏和心脏表现出不同程度的异常;羊角棉总生物碱与 5-FU 联用后发挥协同效应,抗肿瘤功能得到增强,且小鼠主要器官无明显异常,增效的同时减轻不良反应,表明两者有较好的联用前景,其联用机制值得进一步研究。

自 20 世纪 90 年代以来,5-FU 或其他氟嘧啶类药物是 CRC 全身治疗的主流药物,基于 5-FU 的化疗可改善切除的 III 期 CRC 患者的总体和无病生存期<sup>[16]</sup>。5-FU 由尿嘧啶 C-5 位的氢原子被氟原子代替而来,采用与尿嘧啶相同的转运机制快速进入细胞,经胸腺嘧啶磷酸酶催化转化为氟脱氧尿苷(fluorodeoxyuridine, FUrd),再由胸腺嘧啶激酶磷酸化为单磷酸氟脱氧尿苷、三磷酸氟脱氧尿苷和三磷酸氟尿苷等活性形式,它们破坏 RNA 合成和抑制 TS 来发挥抗癌作用<sup>[21-23]</sup>。DPD 是 5-FU 分解代谢的限速酶,在肝脏中大量表达,将 5-FU 转化为

FUH<sub>2</sub>,80%以上的 5-FU 在肝脏被 DPD 分解<sup>[24]</sup>。本研究结果表明,羊角棉总生物碱可以剂量依赖性地降低肝脏中 DPD 的含量,5-FU 与羊角棉总生物碱联用后, $T_{1/2}$ 延长、 $Cl/F$ 降低,分解产物 FUH<sub>2</sub>无明显变化,合成产物 FUrd 血药浓度显著下降,提示羊角棉总生物碱可能改变了 5-FU 的合成代谢途径,这需要通过检测 5-FU 的其他代谢产物进行验证。

综上所述,羊角棉总生物碱对 CRC 细胞表现出杀伤能力,可以降低肝脏 DPD 浓度,调节 5-FU 的代谢途径,与 5-FU 联用可以有效提高 5-FU 的抗 CRC 活性,并改善 5-FU 的不良反应,羊角棉总生物碱的化学组成值得进一步分析,有望成为新型的抗肿瘤药物或抗肿瘤药物增敏剂。

### 参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [3] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. Gut, 2017, 66(4): 683-691.
- [4] Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, et al. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974-2013[J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(8): djw322. doi:10.1093/jnci/djw322.
- [5] Bailey CE, Hu CY, You YN, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010[J]. JAMA Surg, 2015, 150(1): 17-22.
- [6] Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 250-281.
- [7] Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ, et al. Rising proportion of young individuals with rectal and colon cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2019, 18(1): e87-e95.

- [ 8 ] Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, et al. Rectal cancer; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2018, 29(Suppl 4): iv263. doi:10.1093/annonc/mdy161.
- [ 9 ] Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, et al. 5-Fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: past, present and future [ J ]. Pharmacol Ther, 2020, 206: 107447. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107447.
- [ 10 ] Veenstra CM, Krauss JC. Emerging systemic therapies for colorectal cancer[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2018, 31(3): 179-191.
- [ 11 ] Blondy S, David V, Verdier M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: from classical pathways to promising processes[J]. Cancer Sci, 2020, 111(9): 3142-3154.
- [ 12 ] Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds[J]. Nature, 1957, 179(4561): 663-666.
- [ 13 ] Sargent D, Sobrero A, Grothey A, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20, 898 patients on 18 randomized trials [ J ]. J Clin Oncol, 2009, 27(6): 872-877.
- [ 14 ] Latchman J, Guastella A, Tofthagen C. 5-Fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme: implications for practice[J]. Clin J Oncol Nurs, 2014, 18(5): 581-585.
- [ 15 ] Zhang LL, Xing XL, Meng FL, et al. Oral fluoropyrimidine versus intravenous 5-fluorouracil for the treatment of advanced gastric and colorectal cancer: Meta-analysis [ J ]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(1): 209-225.
- [ 16 ] Ahn DH, Wu C, Wei L, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with stage II/III resected rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiation therapy [ J ]. Am J Clin Oncol, 2017, 40(6): 531-534.
- [ 17 ] Lee GY, Lee JS, Son CG, et al. Combating drug resistance in colorectal cancer using herbal medicines [ J ]. Chin J Integr Med, 2021, 27(7): 551-560.
- [ 18 ] Li YQ, Cai J, Cheng JX, et al. Alstomairines D-G: new monoterpenoid indole alkaloids with cytotoxic activity from *Alstonia mairei* [ J ]. J Mol Struct, 2022, 1253: 132277. doi:10.1016/j.molstruc.2021.132277.
- [ 19 ] Yan TL, Han DX, Hu J, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia mairei* and their cytotoxicity [ J ]. J Asian Nat Prod Res, 2017, 19(6): 550-556.
- [ 20 ] Cai XH, Zeng CX, Feng T, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia mairei* [ J ]. Helv Chim Acta, 2010, 93(10): 2037-2044.
- [ 21 ] Sobrero A, Aschele C, Guglielmi A, et al. Resistance to 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine mechanisms and clinical implications [ J ]. J Chemother, 1990, 2(Suppl 1): 12-16.
- [ 22 ] Johnston PG, Kaye S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors [ J ]. Anticancer Drugs, 2001, 12(8): 639-646.
- [ 23 ] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies [ J ]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 330-338.
- [ 24 ] Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil [ J ]. Clin Pharmacokinet, 1989, 16(4): 215-237.

(编辑:相峰)