

伊立替康联合去甲斑蝥素对人胃癌细胞作用的考察及协同作用机制研究*

李子木 孙震晓**

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要 研究了伊立替康(CPT-11)联合去甲斑蝥素(NCTD)对人胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响及协同作用机制。分别利用 CPT-11 30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$, NCTD 30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 和两药按上述浓度 1:1 联用, 以及两药上述浓度完全交叉组合作用 BGC-823 细胞 24、48 和 72 h, 并且以不同序贯方式作用 BGC-823 细胞 24 h。MTT 法检测 BGC-823 细胞的增殖, 采用中效原理评价两药联合作用; 流式细胞术测定 CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ 、NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ 和联合用药 (60:60) $\mu\text{mol/L}$, 以及不同序贯方式作用 BGC-823 细胞 24 h 后细胞周期及凋亡的情况; Western blot 法检测 CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$, NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 和联合用药 (30:30, 60:60) $\mu\text{mol/L}$ 作用 BGC-823 细胞 24 h 后 Pdc4 和 p53 蛋白表达水平。结果显示: CPT-11 及 NCTD 联合用药比单独用药对细胞增殖的抑制作用增强, IC_{50} 明显减小 ($P < 0.05$), 单独使用 CPT-11 或 NCTD 作用 24、48 和 72 h 时的 IC_{50} 分别是联合使用时的 2.83、3.15、2.19 倍以及 2.66、3.11、2.45 倍, 并且两药联合用药具有协同作用效应; 两药合用 24 h 时先给 CPT-11 方案抑制作用优于先给 NCTD 方案, 且优于同时给药方案 ($P < 0.05$); CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 引起 BGC-823 细胞 S 和 G2-M 期阻滞 ($P < 0.01$), NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 引起细胞 G2-M 期阻滞 ($P < 0.05$), 并诱导细胞凋亡 ($P < 0.05$), 联合用药 (60:60) $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h, 主要引起细胞 G2-M 期阻滞 ($P < 0.01$), 与先给 NCTD 6h 方案及同时给药相比, 先给 CPT-11 6h 方案主要引起细胞 S 期阻滞增加 ($P < 0.05$) 以及细胞凋亡增加; CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 作用 12 h 后 Pdc4 上调表达, p53 下调表达 ($P < 0.05$), NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 作用 12 h 后 Pdc4 下调表达, p53 上调表达 ($P < 0.05$), 联合用药 (30:30, 60:60) $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 后 Pdc4 及 p53 蛋白表达均上调 ($P < 0.05$)。上述结果表明: CPT-11 联合 NCTD 对人胃癌 BGC-823 细胞有协同抑制作用, 其机制主要是诱导细胞 G2-M 期阻滞, 并与抑癌基因蛋白 Pdc4 及 p53 上调表达有关; 两种药物联用序贯次序对联合作用有影响, 先给 CPT-11 方案要优于先给 NCTD 方案及同时给药方案, 其机制主要是引起 S 期阻滞增加以及细胞凋亡增加; 抑癌基因蛋白 Pdc4 与 p53 之间可能存在负调控关系。

关键词 伊立替康, 去甲斑蝥素, 联合用药, 人胃腺癌 BGC-823 细胞, 序贯治疗, Pdc4, p53

学科分类号 R285, R979.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0231

在癌症临床治疗上, 长期给予单一药物, 机体可能会通过基因突变、蛋白质表达变化、干细胞靶点表达缺失等机制逃避抗癌药物的杀伤作用, 从而形成耐药性^[1], 而联合用药引起的蛋白质表达调控的变化或启动的新靶点可以避免机体的耐药性, 从而实现提高疗效、降低毒性、减少耐药性的目的^[2]。因此, 抗癌药物联合用药的相关研究已成为癌症研究领域的新热点。

联合药效评价方法的研究可以为抗癌药物联合用药的药物组方评价或组方定量设计提供理论依

据, 具有很高的临床应用价值。目前由剑桥大学的 Chou 和约翰霍普金斯大学的 Talalay 共同建立的中效原理 (Chou-Talalay; 联合指数法, combination index method) 凭借其优势已成为抗癌药物联合研究

* 国家自然科学基金(81473418), 国家林业局野生动植物保护项目 (2012-2014) 和北京中医药大学自主选题项目 (2013JYBZZ-XS-088, 2014JYBZZ-XS-097) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-84738646, E-mail: sunzxcn@hotmail.com

收稿日期: 2014-08-14, 接受日期: 2014-11-17

中应用最为广泛的方法之一^[3]。该方法不仅可以用于定量描述联合用药的相加作用(additive effect)、协同作用(synergism)以及拮抗作用(antagonism),还能对给定剂量-效应水平下药物的效应进行定性描述,其结果将分别由抑制率-联合指数图($Fa-CD$)以及等效线图(isobologram)表示^[4]。

喜树碱类药物作为拓扑异构酶 I 的抑制剂抗癌机制独特,伊立替康(irinotecan, CPT-11)为喜树碱类药物,是国际上通用的用于治疗胃肠道肿瘤的药物,研究表明, CPT-11 单药用于进展期胃癌的初治或二线治疗均被证实有效,而且可以用于晚期胃癌患者的二线治疗方案^[5],骨髓抑制是其毒副作用之一^[6]。去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)为斑蝥素类药物,主要通过有丝分裂期阻滞、诱导肿瘤细胞凋亡等抑制肿瘤生长,与其结构同类物相比, NCTD 毒性小、疗效高,临床上主要用于胃癌、肝癌等消化道肿瘤的治疗,且有一定升高白细胞的作用^[7]。这两类药物临床上有联合用药的尝试^[8],但有关联合用药的基础研究不足,尚未见有 CPT-11 与 NCTD 联合用药作用及机制研究报道。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及主要仪器

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青霉素与链霉素购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶、NCTD(母液浓度 60 mmol/L,超纯水为溶剂)、CPT-11(母液浓度 80 mmol/L,细胞培养级二甲亚砜为溶剂)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)及四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自美国 Sigma 公司;RNA 酶 A 购自德国 Merck 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自中国南京凯基生物科技发展有限公司;BCA 蛋白质测定试剂盒和 ECL 试剂购自美国 Thermo Scientific 公司;兔抗人 Pdcd4 抗体为杨新盛博士(美国肯塔基大学癌症研究中心)惠赠;小鼠抗人 p53 蛋白购自中国苏州百奇生物科技有限公司;小鼠抗人 β 肌动蛋白(β -actin)、山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;超低温冰箱,美国 Revco 公司;高速台式离心机,美国 Sigma 公司;倒置相差显微镜,日本 Nikon 公司;CO₂ 恒温培养箱,日本 Sanyo 公司;纯水仪,美国 Millipore 公司;酶标仪,美国 BioTek 公司;流式

细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;PAC3000 型电泳仪、电泳槽、半干电转仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞株来源及培养

人胃腺癌细胞系 BGC-823,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,北京中医药大学中药学院生物制药系保存。BGC-823 细胞采用常规培养,在含 10%胎牛血清、青霉素 100 kU/L 和链霉素 100 mg/L 的 RPMI 1640 完全培养基,于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行常规培养,所有实验均在细胞对数生长期进行。

1.3 MTT 法测定药物对细胞增殖的影响

选取对数生长期细胞,以每孔 2×10^3 个细胞终密度接种于 96 孔板中,5% CO₂、37℃ 孵育 24 h。吸去孔中的培养基,加入 RPMI 1640 完全培养基稀释的不同浓度的不同药物并按照表 1 中两药的 5 个不同浓度交叉组合,设置相对应的对照组: NCTD 对照组为 RPMI 1640 完全培养基, CPT-11 及 CPT-11&NCTD 联合用药对照组为含有相对应浓度 DMSO 的 RPMI 1640 完全培养基。分别培养 24、48 和 72 h 后,弃去培养液,每孔加入终浓度为 0.5 g/L 的 MTT 工作液 100 μ l,继续培养 4 h,弃上清,加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,在酶标仪上 550 nm^[9]波长处读取吸光度(A_{550})值,计算抑制率,抑制率 $= (1 - A_{550 \text{ 药物处理组}} / A_{550 \text{ 对照组}}) \times 100\%$ 。

Table 1 BGC-823 cells treated with CPT-11 and NCTD alone or in combination for 24, 48, 72 h
 $\mu\text{mol/L}$

CPT-11	NCTD	CPT-11+NCTD
30	30	30+30
60	60	60+60
90	90	90+90
120	120	120+120
150	150	150+150

1.4 药物 IC_{50} (中效浓度 D_m)的计算及药物联合作用的判定

采用中效原理(Chou-Talalay)对所得数据进行分析。药物作用效应(fa)与之前提到的抑制率的计算方法一致。

用 MTT 法测得药物不同剂量的抑制率后,根据中效方程式^[10]: $fa/fu = (D/D_m)^m$; $fu = 1 - fa$ [fa 为药物作用效应, D 为药物浓度, m 为斜率, D_m 为中效

浓度(效应为 0.5 时的药物浓度)], 上式两边取对数后为 $\lg(fa/fu) = m\lg D - m\lg D_m$, 以 $y = \lg(fa/fu)$, $x = \lg D$, $a = -m\lg D_m$, $b = m$, 得到回归直线方程式 $y = bx + a$. 根据联合指数(combination index, CI)公式: $CI = D1/Dx1 + D2/Dx2 + \alpha \cdot (D1 \cdot D2) / (Dx1 \cdot Dx2)$, $D1$ 、 $D2$ 为合用时产生 X 效应时两药各自所需剂量, $Dx1$ 、 $Dx2$ 为两药单独使用产生 X 效应时各自剂量. 系数 α 根据中效作图确定: 两药作图相互平行时 α 取值为 0, 反之为 1.

依据上述原理, 利用 CalcuSyn 软件可以得到剂量-效应曲线以及药物的 IC_{50} (中效浓度 D_m), 并可以计算联合用药的联合指数(CI)值, 其中 $CI < 1$ 、 $=1$ 、 >1 分别表明药物间的协同作用(synergism)、相加作用(additive effect), 以及拮抗作用(antagonism)^[11].

1.5 MTT 法测定药物序贯方式对细胞增殖的影响

按照 1.3 中所述, 测定 CPT-11&NCTD 联合用药(60:60) $\mu\text{mol/L}$, 处理 BGC-823 细胞 24 h 后细胞的抑制率. 分为两种序贯方式给药: a. NCTD 先给 6、12、18 h 之后 CPT-11 再给药, 两药共同作用 18、12、6 h; b. CPT-11 先给 6、12、18 h 之后 NCTD 再给药, 两药共同作用 18、12、6 h.

1.6 流式细胞术检测细胞周期

选取对数生长期的人胃腺癌 BGC-823 细胞, 按照每皿 2×10^6 个细胞接种于直径 10 cm 的细胞培养皿内, 培养 24 h 后, 利用 CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ 、NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ 单独用药和联合用药(60:60) $\mu\text{mol/L}$ 以及如 1.5 中所述的两种序贯方式中(NCTD 先给 6 h 之后 CPT-11 再给药, 两药共同作用 18 h; CPT-11 先给 6 h, 之后 NCTD 再给药, 两药共同作用 18 h)处理. PBS 洗涤 2 次后, 用胰酶消化贴壁细胞, 合并后 800 g 离心 5 min 收集全细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用 500 μl PBS 重悬并用预冷的 70%乙醇固定, 4℃ 过夜. 固定后的细胞用 PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μl 预冷的 PBS 重悬细胞并加入终浓度为 50 mg/L 的 RNA 酶, 在 37℃ 孵育 30 min, 最后加入终浓度为 50 mg/L 的 PI 染液, 4℃ 避光染色 60 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布情况, 经 ModFit LT 软件分析细胞周期结果^[9].

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

按照 1.6 中所述收集全细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后, 按照 Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒的说明书操作: 用 500 μl 结合缓冲液重悬, 分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 1 PI 轻轻混匀后避光

室温反应 10 min, 进行光路校准, 利用流式细胞仪检测, BD FACSDiva software v6.1.3 软件分析细胞凋亡结果^[9].

1.8 Western blot 法检测 Pdcd4 和 p53 蛋白表达

选取对数生长期的人胃腺癌 BGC-823 细胞, 进行不同处理(表 2, 3), 收集全细胞, 加入细胞裂解液 [Tris-HCl (pH 8.0) 50 $\mu\text{mol/L}$; NP-40 1%; NaCl 150 $\mu\text{mol/L}$; SDS 0.1%; Protease Inhibitor Cocktail Set III 1%], 冰上放置裂解 30 min, 12 000 g 离心 5 min, 取上清液. 采用 BCA 蛋白质检测试剂盒测定蛋白质样品的含量, 蛋白质热变性后, 以每个样品 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶, 12%分离胶). 电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭, 随后进行相关抗体孵育(小鼠抗人 p53 一抗 1:1 000 稀释, 4℃ 过夜; 山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗 1:2 500, 室温 60 min; 兔抗人 Pdcd4 一抗 1:2 000 稀释, 4℃ 过夜; 山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗 1:2 500, 室温 60 min; 小鼠抗人 β -actin 一抗 1:1 000 稀释, 室温 2 h; 山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗 1:2 500, 室温 60 min), 最后加入 ECL 试剂, 于暗室压片曝光, 图像扫描后采用 Quantity One 软件对其进行定量与分析^[12]. 以目标蛋白条带积分吸光度值与内参蛋白 β -actin 条带积分吸光度值的比值表示目标蛋白相对表达水平.

Table 2 BGC-823 cells treated with CPT-11 and NCTD alone for 24 h

Control group	Experimental group
Control (complete medium)	NCTD 30&60 $\mu\text{mol/L}$
DMSO (amount to the concentration in experimental group)	CPT-11 30&60 $\mu\text{mol/L}$

Table 3 BGC-823 cells treated with CPT-11 and NCTD in combination for 24 h

Group	Treatment on BGC-823
1	DMSO (amount to Group2)
2	CPT-11: NCTD(30:30) $\mu\text{mol/L}$
3	CPT-11: NCTD(60:60) $\mu\text{mol/L}$
4	DMSO (amount to Group3)

1.9 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, 多个样本均数的比较采用单因素方

差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为极显著差异.

2 结 果

2.1 CPT-11 及 NCTD 单独用药和联合用药对 BGC-823 细胞增殖的影响

由图 1 可见, CPT-11、NCTD 及两药以固定比例(1:1)联用对 BGC-823 细胞杀伤作用显著, 并且作用效果呈一定的时间 - 浓度依赖性($P < 0.05$).

经 CalcuSyn 软件计算得到两药联用对 BGC-823 细胞 24、48 和 72 h 的 IC_{50} (CPT-11)分别

为(88.31±0.60)、(77.86±0.98)和(56.22±0.59) $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} (NCTD) 分别为 (82.96±0.90)、(76.81±1.08) 和 (62.77±0.79) $\mu\text{mol/L}$. [CPT-11:NCTD]采用固定比例 1:1 时, IC_{50} (NCTD+CPT-11)分别为(62.29±1.20)、(49.43±1.96)和(51.28±1.17) $\mu\text{mol/L}$.

联合用药时 IC_{50} (NCTD+CPT-11)= IC_{50} (NCTD)_{联合}+ IC_{50} (CPT-11)_{联合}, 两药比单独使用 CPT-11 及 NCTD 时的 IC_{50} 明显减小($P < 0.05$), 单独使用 CPT-11 时的 IC_{50} 分别是联合使用时的 2.83、3.15、2.19 倍, 而单独使用 NCTD 时的 IC_{50} 分别是联合使用时的 2.66、3.11、2.45 倍.

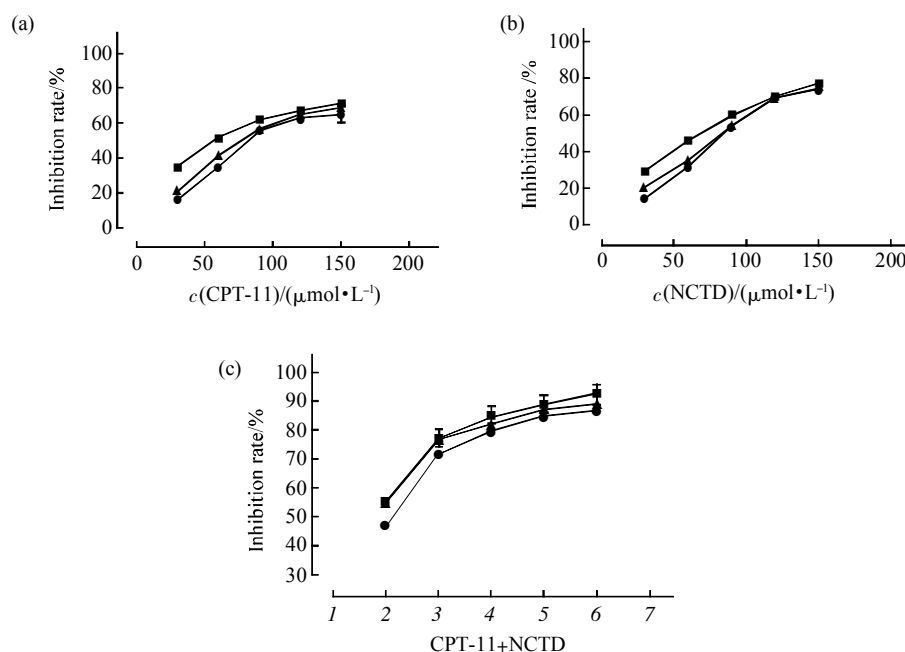


Fig. 1 Inhibition of CPT-11 (a) and NCTD (b) alone or in combination (c) on BGC-823 cells by MTT assay

Inhibition rate = $(1 - A_{550} \text{ of drug group} / A_{550} \text{ of medium control group}) \times 100\%$. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. $\bullet$ — $\bullet$: 24 h; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: 48 h; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: 72 h. 1: (0+0) $\mu\text{mol/L}$; 2: (30+30) $\mu\text{mol/L}$; 3: (60+60) $\mu\text{mol/L}$; 4: (90+90) $\mu\text{mol/L}$; 5: (120+120) $\mu\text{mol/L}$; 6: (150+150) $\mu\text{mol/L}$; 7: (180+180) $\mu\text{mol/L}$.

2.2 CPT-11 及 NCTD 联合用药对 BGC-823 细胞的联合作用效应

根据 2.1 所示药物作用的抑制率, 采用 CalcuSyn 软件计算联合用药的联合指数(combination index) CI 值, 以此判断药物联合作用效应.

2.2.1 联合用药对人胃癌 BGC-823 细胞作用 24 h 时的联合作用效应

如图 2a 和表 4 所示: 联合用药 24 h 时, 随着 Fa 的增加, CI 也逐渐增加. 当 $Fa > 0.85$ 时(即所需两药浓度高时) $CI > 1$, 表现为拮抗作用效应; $Fa < 0.8$ 时(即所需两药物浓度较低时) $CI < 1$, 表现

为协同作用效应. 因此, 表现为两药高浓度合用时为拮抗作用效应, 低浓度合用时为协同作用效应, 并且协同作用效应随着浓度增大而逐渐减少.

2.2.2 联合用药对 BGC-823 细胞作用 48 h 时的联合作用效应

如图 2b 和表 5 所示: 联合用药 48 h 时, 随着 Fa 的增加, CI 也逐渐增加. 当 $Fa > 0.97$ 时 $CI > 1$, 表现为拮抗作用效应; $Fa < 0.95$ 时 $CI < 1$, 表现为协同作用效应. 因此, 表现为两药合用时基本上为协同作用效应, 只有在极高浓度下合用时为拮抗作用效应, 并且协同作用效应随着浓度增大而逐渐减少.

2.2.3 联合用药对 BGC-823 细胞作用 72 h 时的联合作用效应

如图 2c 和表 6 所示: 联合用药 72 h 时, 随着 Fa 的增加, CI 逐渐减小. 当 $Fa < 0.3$ 时 $CI > 1$,

表现为拮抗作用效应; $Fa > 0.35$ 时 $CI < 1$, 表现为协同作用效应. 因此, 表现为两药低浓度合用时为拮抗作用效应, 高浓度合用时为协同作用效应, 并且协同作用效应随着浓度增大而逐渐增加.

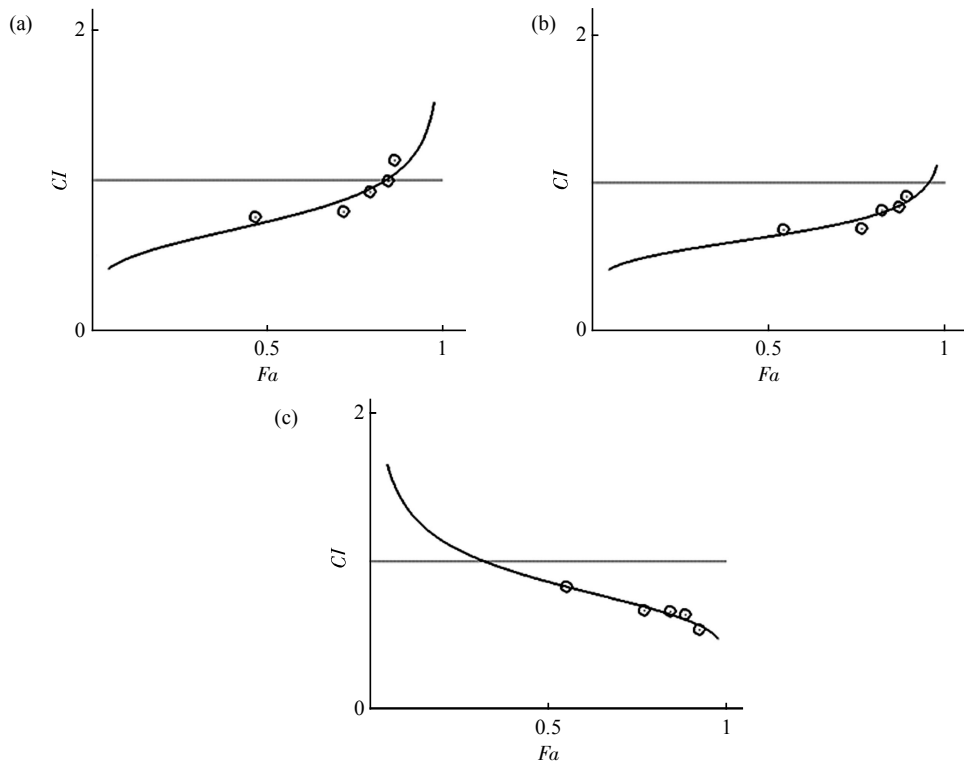


Fig. 2 Fa -Combination Index Plot of CPT-11 combined with NCTD on BGC-823 cells for 24 h(a), 48 h(b) and 72h (c) $n = 3$.

Table 4 CI of combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells in different Fa for 24 h ($n = 3$)

Fa	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.6	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.97
CI	0.42	0.48	0.52	0.56	0.59	0.62	0.65	0.67	0.7	0.73	0.76	0.79	0.82	0.86	0.9	0.95	1.02	1.12	1.3	1.45

Table 5 CI of combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells in different Fa for 48 h ($n = 3$)

Fa	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.6	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.97
CI	0.42	0.47	0.5	0.52	0.55	0.57	0.58	0.6	0.62	0.64	0.66	0.68	0.7	0.72	0.75	0.78	0.83	0.89	0.99	1.08

Table 6 CI of combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells in different Fa for 72 h ($n = 3$)

Fa	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.6	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.97
CI	1.64	1.37	1.24	1.15	1.08	1.02	0.98	0.94	0.9	0.86	0.83	0.8	0.77	0.74	0.71	0.68	0.64	0.6	0.53	0.5

2.3 CPT-11 及 NCTD 完全交叉组合对BGC-823 细胞的联合作用效应

按照 1.3 所述方法测定了 CPT-11 30、60、90、120 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 及 NCTD 30、60、90、120 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 完全交叉组合处理 BGC-823 细胞 24、48 和 72 h 后的抑制率, 采用 CalcuSyn 软件计算出

联合用药的联合指数(combination index) CI 值.

如表 7, 8, 9 所示: CPT-11&NCTD 完全交叉组合作用 24、48 h 时, 主要表现为协同作用及近相加作用效应, 并且在低浓度组合下, 协同作用效应最强; 而作用 72 h 时, 主要表现为协同作用效应, 并且在高浓度组合下, 协同作用效应最强.

Table 7 *CI* of cross combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells for 24 h

$c(\text{NCTD})/(\mu\text{mol/L})$	$c(\text{CPT-11})/(\mu\text{mol/L})$				
	30	60	90	120	150
30	0.75897	0.78253	0.84130	0.89847	0.99077
60	0.77323	0.79359	0.86135	0.85264	1.05988
90	0.80263	0.88308	0.92405	0.92609	0.90868
120	0.86444	0.94398	1.03772	0.99467	0.9526
150	0.9298	0.93485	1.01586	0.93728	1.13591

Table 8 *CI* of cross combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells for 48 h

$c(\text{NCTD})/(\mu\text{mol/L})$	$c(\text{CPT-11})/(\mu\text{mol/L})$				
	30	60	90	120	150
30	0.68835	0.78560	0.84718	0.84768	0.95391
60	0.74624	0.69334	0.83581	0.73528	0.92969
90	0.746	0.81632	0.81707	0.86929	0.94281
120	0.78656	0.84751	0.89982	0.83608	0.93634
150	0.75415	0.86009	0.89985	0.89295	0.9121

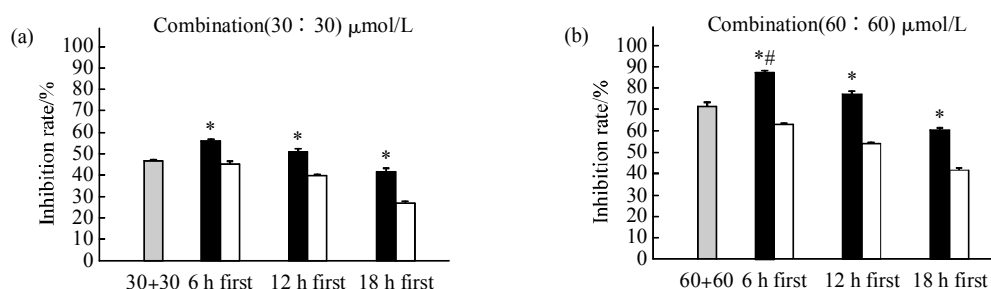
Table 9 *CI* of cross combination of CPT-11 with NCTD on BGC-823 cells for 72 h

$c(\text{NCTD})/(\mu\text{mol/L})$	$c(\text{CPT-11})/(\mu\text{mol/L})$				
	30	60	90	120	150
30	0.83312	0.78985	0.75075	0.79268	0.81391
60	0.7285	0.67008	0.70464	0.72864	0.69135
90	0.70006	0.70778	0.6651	0.69815	0.59027
120	0.73085	0.79527	0.69596	0.64385	0.63509
150	0.6937	0.68097	0.67361	0.61409	0.53907

2.4 CPT-11 及 NCTD 联合用药时序贯方式对 BGC-823 细胞增殖的影响

如图 3 所示: CPT-11&NCTD 合用时给药时间先后次序不同, 对细胞增殖的抑制作用有影响, 先

给 CPT-11 方案抑制作用优于先给 NCTD 方案($P < 0.05$), 且优于同时给药方案(CPT-11 先给 6 h 方案与同时给药相比 $P < 0.05$).

**Fig. 3** Inhibition of CPT-11 combined with NCTD with different sequence on BGC-823 cells for 24 h by MTT assay

(a) Combination(30 : 30) $\mu\text{mol/L}$. (b) Combination(60 : 60) $\mu\text{mol/L}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$ compared with NCTD first, # $P < 0.05$ compared with CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ +NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$. ■: CPT-11 first; □: NCTD first; ▨: Administrate together.

2.5 CPT-11 及 NCTD 单独与联合用药以及联合用药序贯方式对 BGC-823 细胞周期的影响

如图 4, 表 10 所示: 药物作用 BGC-823 细胞 24 h 时, 与 DMSO 对照组相比, CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ 组 G1 期细胞数减少($P < 0.01$), 引起了细胞 G2-M

($P < 0.01$)和 S 期($P < 0.01$)阻滞; 与 Control 对照组相比, NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ 组 G1 期、S 期细胞数减少($P < 0.05$), 引起了细胞 G2-M 期阻滞($P < 0.05$); 联合用药(60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ 组与 DMSO 对照组相比, G1 期细胞数减少($P < 0.01$), 细胞 G2-M 期阻滞明

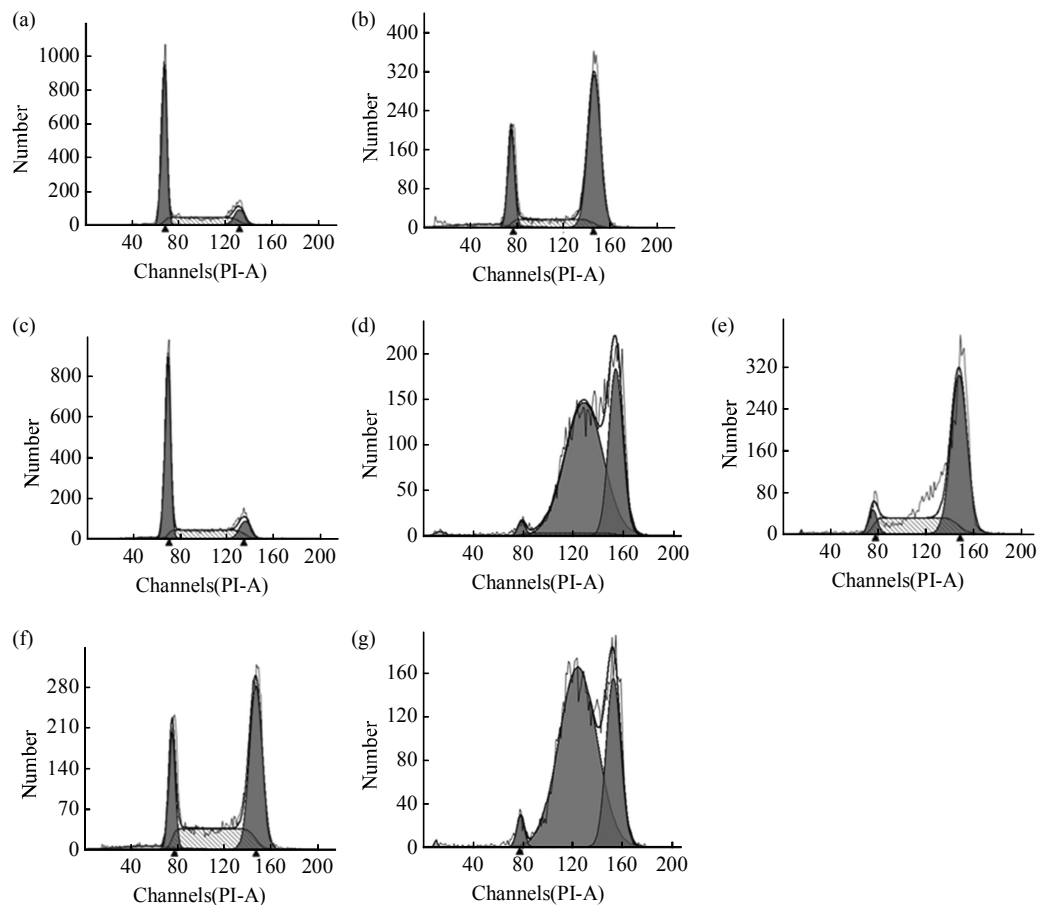


Fig. 4 Effect of CPT-11 (d) and NCTD (b) alone or in combination (e) and combination with different sequence (f, g) on cell cycle in BGC-823 cells by flow cytometry
(a) Control. (b) NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (c) DMSO(amount to CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. (d) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (e) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ + NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (f) Firstly, administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h. (g) Firstly, administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h.

Table 10 Cell cycle distributions of CPT-11 and NCTD alone or in combination and combination with different sequence on BGC-823 cells for 24 h

Group				%
	G1	S	G2-M	
Control	61.91±6.07	28.45±3.98	9.63±2.11	
NCTD	24.10±6.18*	16.91±0.66*	58.98±5.53*	
DMSO(amount to CPT-11)	61.20±6.83	28.91±4.21	9.64±2.51	
CPT-11	3.83±2.93 ^{##}	45.30±2.60 ^{##}	43.57±8.47 ^{##}	
CPT-11+NCTD	5.87±1.16 ^{##Δ}	33.75±7.60	57.65±13.48 ^{##}	
NCTD first 6 h	22.53±7.67 ^{##}	32.19±4.58	45.61±4.21 ^{##}	
CPT-11 first 6 h	3.90±1.23 ^{##••}	54.37±8.12 ^{##••□}	36.43±1.70 ^{##••}	

$\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$ compared with Control, ^{##} $P < 0.01$ compared with DMSO, ^Δ $P < 0.05$ compared with NCTD, ^{••} $P < 0.01$ compared with NCTD 6 h first, [□] $P < 0.05$ compare with CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ +NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$.

显($P < 0.01$), S 期细胞数没有明显变化, 与单独 NCTD 组相比, G1 期细胞明显减少($P < 0.05$), S 期细胞增加(33.75 vs. 16.91)%, 与单独用 CPT-11 组相比, G2-M 期细胞增加(57.65 vs. 43.57)%. 因此, 联合用药可能主要通过细胞 G2-M 期阻滞发挥作用.

此外, 与 DMSO 对照组相比, 先给 NCTD 方案引起细胞 G2-M 期阻滞($P < 0.01$), 而先给 CPT-11 方案引起细胞 G2-M 期阻滞($P < 0.01$)以及 S 期阻滞($P < 0.01$); 先给 CPT-11 方案与先给 NCTD 方案相比, G1 期细胞数减少($P < 0.01$), G2-M 期细胞减少($P < 0.01$), S 期细胞增加($P < 0.01$), 与同时给药组相比, G1 期细胞减少(3.9 vs. 5.87)%, G2-M 期细胞减少(36.43 vs. 57.64)%, S 期细胞增加($P < 0.05$). 这与联合用药时序贯方式对

于细胞的增殖影响相一致. 提示先给 CPT-11 方案优于先给 NCTD 方案及同时给药方案, 主要与 S 期阻滞的增加关系密切.

2.6 CPT-11 及 NCTD 单独与联合用药以及联合用药序贯方式对 BGC-823 细胞凋亡的影响

如图 5, 表 11 所示: 药物作用 BGC-823 细胞 24 h 时, 与对照组相比, NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ 引起细胞凋亡($P < 0.05$); 与 DMSO 对照组相比, CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ 及联合用药 CPT-11:NCTD(60:60) $\mu\text{mol/L}$ 虽引起凋亡增加[(6 vs.4.87)% 以及(11.7 vs.4.87)%], 但增加并不显著. 因此, 联合用药可能不是主要通过诱导细胞凋亡发挥的协同作用. 结合药物对细胞周期的影响, 联合用药的协同作用机制主要是由于对细胞 G2-M 期周期阻滞作用.

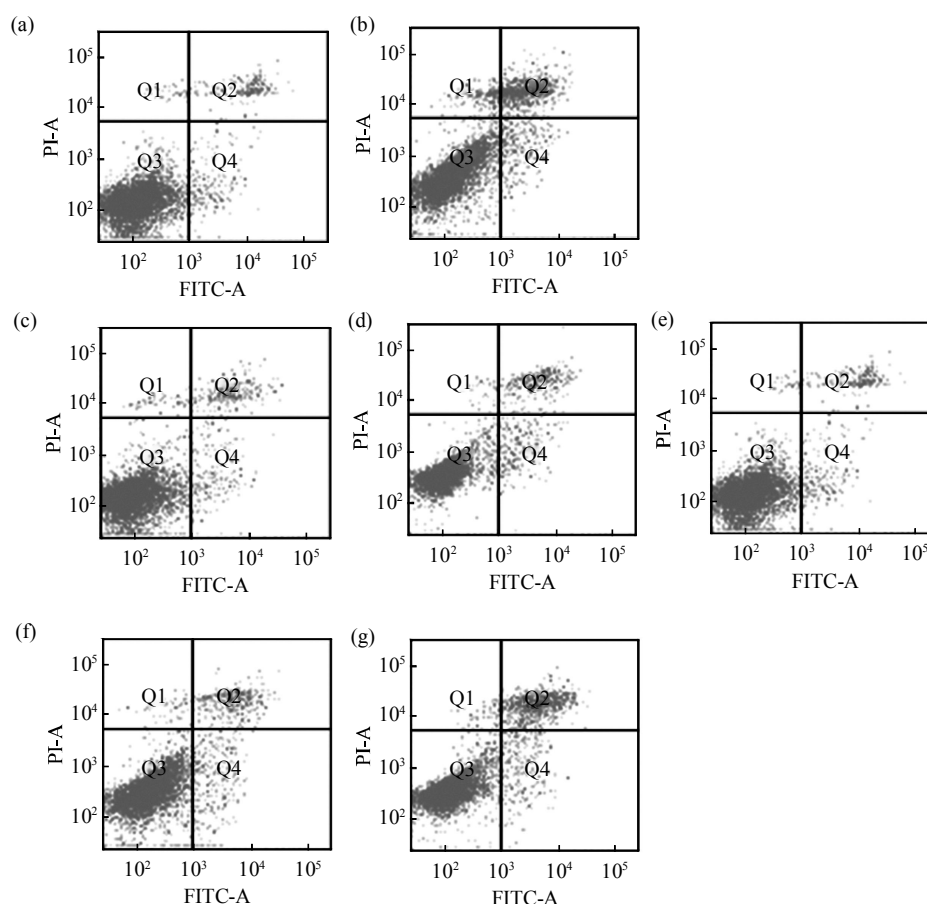


Fig. 5 Effect of CPT-11 (d) and NCTD (b) alone or in combination (e) and combination with different sequence (f, g) on cell apoptosis in BGC-823 cells by flow cytometry

(a) Control. (b) NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (c) DMSO(amount to CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. (d) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (e) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ + NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (f) Firstly, administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h. (g) Firstly, administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h.

此外, 先给 NCTD 方案没有引起细胞凋亡的明显增加, 而先给 CPT-11 方案引起细胞凋亡增加 ($P < 0.01$), 并且与同时给药组相比, 细胞凋亡也有所增加(12.5 *vs.* 11.7)%. 这与联合用药序贯方式对细胞增殖的影响相一致. 提示先给 CPT-11 方案优于先给 NCTD 方案可能与诱导细胞凋亡有关. 综合细胞周期结果, 先给 CPT-11 方案优于先给 NCTD 方案及同时给药方案的原因, 应主要是 S 期阻滞增加以及细胞凋亡增加.

Table 11 Effect of CPT-11 and NCTD alone or in combination and combination with different sequence on apoptosis in BGC-823 cells for 24 h

Group	Necrosis(Q1)	Early apoptosis(Q4)	Late apoptosis(Q2)	Living cells(Q3)	Q2+Q4
Control	0.37±0.31	2.40±0.35	3.37±0.55	93.83±0.81	5.77±0.86
NCTD	1.17±1.16	6.20±3.61*	9.07±1.07**	83.50±2.98**	15.27±3.67*
DMSO	0.80±0.20	1.77±1.14	3.10±0.52	94.33±0.83	4.87±0.65
CPT-11	0.57±0.29	1.63±0.84	4.37±0.60	93.27±0.64	6.00±0.46
CPT-11+NCTD	0.90±0.31	2.93±0.72	8.77±7.31	87.40±6.86	11.7±6.60
NCTD 6 h first	3.13±4.91	2.40±1.47	5.03±2.38	89.47±2.07	7.43±3.62
CPT-11 6 h first	0.76±0.31	2.13±0.59	10.37±2.75 ^{###Δ}	86.77±3.03 ^{###Δ}	12.50±2.69 ^{###}

$\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control, ^{###} $P < 0.01$ compared with DMSO, ^Δ $P < 0.05$ compare with NCTD 6 h first.

2.7 CPT-11 及 NCTD 对 BGC-823 细胞中 Pdc4 及 p53 表达的影响

如图 6 所示: CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 与 NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均在作用 12 h 后明显影响 Pdc4 的

表达($P < 0.05$), 其中 CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均使 Pdc4 上调表达($P < 0.05$), NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均使 Pdc4 下调表达($P < 0.05$).

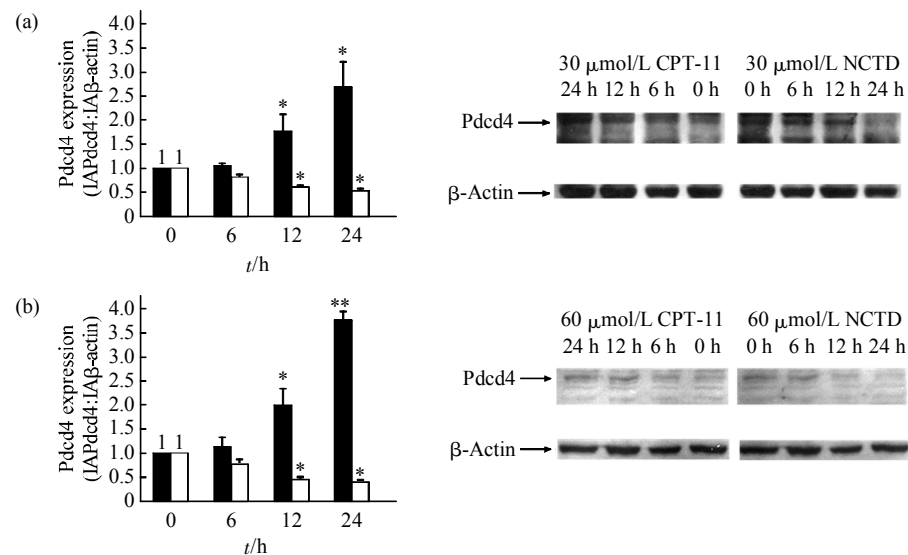


Fig. 6 Effect of CPT-11 & NCTD on Pdc4 protein expression in BGC-823 cells by Western blot (a) CPT-11 30 $\mu\text{mol/L}$ or NCTD 30 $\mu\text{mol/L}$ for 0, 6, 12 and 24 h. (b) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ or NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 0, 6, 12 and 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with respective control groups. ■: CPT-11; □: NCTD.

如图 7 所示: CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 与 NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均在作用 12 h 后明显影响 p53 的表 达($P < 0.05$), 其中 CPT-11 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均使 p53 下调表达($P < 0.05$), NCTD 30、60 $\mu\text{mol/L}$ 均

使 p53 上调表达($P < 0.05$).

上述结果表明, CPT-11 及 NCTD 对人胃癌 BGC-823 细胞中 Pdcd4、p53 的蛋白表达调控作用

不同, 并且在 24 h 内随着作用时间的延长, 上调或下调作用均增强($P < 0.05$), 表明药物作用下 Pdcd4 与 p53 之间可能存在负调控关系.

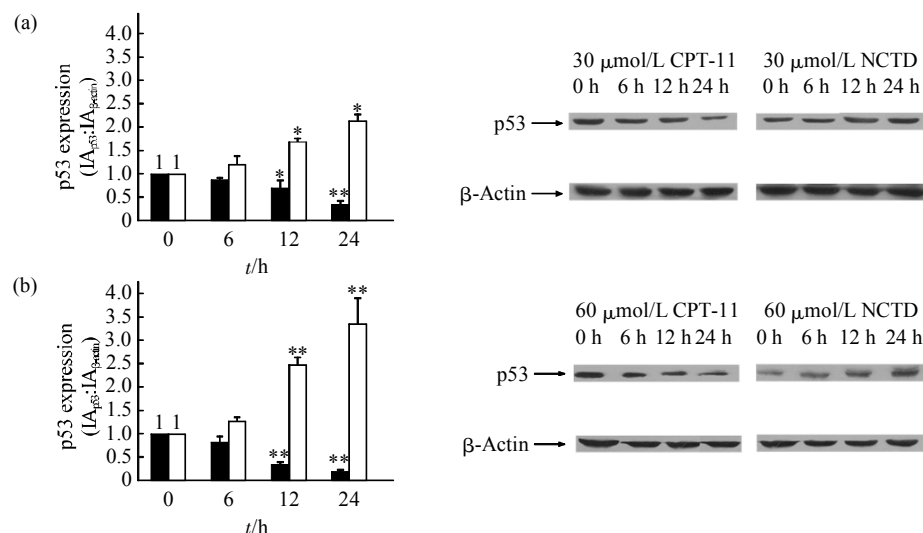


Fig. 7 Effect of CPT-11 & NCTD on p53 protein expression in BGC-823 cells by Western blot

(a) CPT-11 30 $\mu\text{mol/L}$ or NCTD 30 $\mu\text{mol/L}$ for 0, 6, 12 and 24 h. (b) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ or NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 0, 6, 12 and 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with respective control groups. ■ : CPT-11; □ : NCTD.

2.8 CPT-11 及 NCTD 联合用药 24 h 对 BGC-823 细胞中 Pdcd4 及 p53 表达的影响

如图 8 所示: CPT-11 : NCTD(30 : 30) $\mu\text{mol/L}$

及(60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ 联合作用 24 h 后 Pdcd4 及 p53 蛋白表达均上调($P < 0.05$), 但两个剂量组合之间对 Pdcd4 及 p53 的调控没有显著差异.

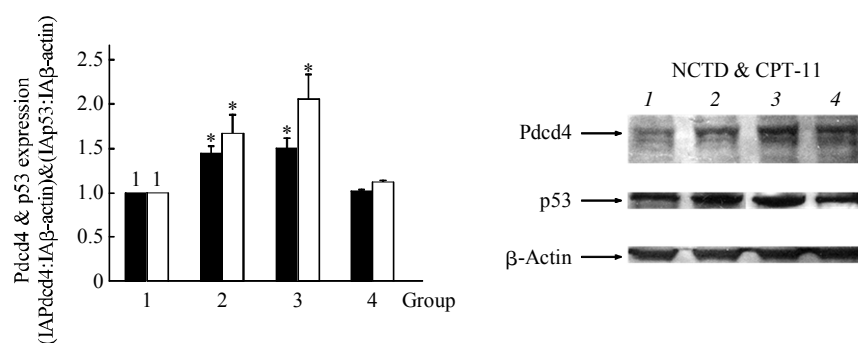


Fig. 8 Effect of CPT-11 combined with NCTD on Pdcd4 & p53 protein expression in BGC-823 cells for 24 h by Western blot

1: DMSO (amount to lane 2); 2: NCTD : CPT-11(30 : 30) $\mu\text{mol/L}$; 3: NCTD : CPT-11(60 : 60) $\mu\text{mol/L}$; 4: DMSO (amount to lane 3). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, compared with respective control groups. ■ : Pdcd4; □ : p53.

3 讨 论

上述研究结果表明, CPT-11 联合 NCTD 对人胃癌 BGC-823 细胞有协同抑制作用, 其机制主要是诱导细胞 G2-M 期阻滞(药物作用后相关的形态学变化见图 S1), 同时, 药物联合作用下两个抑癌

基因 Pdcd4 及 p53 蛋白表达均显著上调.

CPT-11 及 NCTD 联合用药与单用药一样, 可诱导人胃癌 BGC-823 细胞发生周期阻滞. 已有研究表明, Pdcd4 及 p53 蛋白与细胞周期调控关系密切, 二者的上调表达均可引起细胞周期的阻滞^[13-14]. 本研究发现, CPT-11 下调胃癌 BGC-823 细胞中

p53 的表达, 这与他人报道的 CPT-11 作用结直肠癌 SW480 细胞可以上调 p53 表达结果有所不同^[15]. 而 NCTD 下调人胃癌 BGC-823 细胞中 Pdcd4 的表达, 上调 p53 的表达, 与本课题组前期研究报道^[12]及其他课题组的研究结果^[16-17]一致.

已有报道指出, Pdcd4 可以抑制 p53 mRNA 的翻译^[18]. 实验中我们也发现, CPT-11 及 NCTD 分别引起 BGC-823 细胞中 Pdcd4 蛋白表达上调及下调、p53 蛋白表达下调及上调, 并且在 24 h 内随着作用时间的延长, 上调或下调作用相应增强, 表明药物作用下 Pdcd4 与 p53 蛋白之间可能存在负调控关系. 但联合用药组中两种蛋白均表达上调的现象尚不好解释, 该结果是一种简单的叠加作用还是有另外的调控机制需要进一步研究证实.

抗癌联合用药方式灵活多变, 由于抗癌药物作用机制不同, 采用不同机制药物联合作用可以达到增加药物的疗效和选择性、降低毒性和耐药性的效果^[19]. 另外, 根据药物的组合、比例、剂量、时间、序贯方式等处理因素的不同, 联用效果也千差万别.

研究表明, 喜树碱类药物由于其独特的作用机制与其他常用抗癌药物不同而无交叉耐药性^[20], 因此 CPT-11 是联合化疗方案中的常用药物, 由其组成的方案对于其他化疗药物耐药的肿瘤细胞具有一定的疗效. CPT-11 与铂类、丝裂霉素 C、5-氟尿嘧啶 + 亚叶酸钙、卡培他滨、替吉奥以及靶向药物或是多药联合应用, 可以增加疗效, 改善患者生存状况、延长生存期, 并且可以减轻腹泻、呕吐、骨髓抑制等副作用^[21].

NCTD 作为斑蝥素的去甲基衍生物, 具有抗癌而不产生骨髓抑制的特点, 可促进骨髓造血干细胞向粒-单核细胞分化而使白细胞增加^[7], 从而在杀伤肿瘤细胞的同时, 增强机体免疫力、升高白细胞、维持正常血相, 对化疗的免疫破坏有纠正作用, 对患者有免疫保护作用, 因此常与其他化疗药物联用. 研究表明, NCTD 联合顺铂、亚叶酸钙、5-氟尿嘧啶治疗胃癌术后患者可以提高生存率, 减少如白细胞降低等不良反应, 减少肿瘤的复发^[22].

喜树碱类药物与斑蝥素类药物联合用药不仅具有一定理论依据, 也有一定实验和临床依据. 据报道, 加温合并喜树碱、斑蝥素对荷 Lewis 肺癌小鼠具有很好的肿瘤抑制作用^[23]. 此外, 主要成分为斑蝥素的艾迪注射液能减轻含羟基喜树碱的 FDH 方案对骨髓的抑制作用, 改善机体免疫力, 减轻化疗

所致的胃肠道反应, 增加患者对化疗的耐受性, 表明艾迪注射液联合 FDH 治疗方案是治疗中晚期非小细胞肺癌较理想的方案^[8]. 本实验为 CPT-11 及 NCTD 联合用药提供了一定理论依据, 但具体用药方案还需通过动物实验以及临床试验进一步研究确定.

目前, 序贯治疗被认为是一种能够有效避免药物之间药效干扰的治疗方案. 在单靶点治疗药物与化疗药物的序贯试验中取得了较同期联合用药更明显的抗肿瘤效应. 序贯治疗与单纯联合用药相比, 可以减少毒副作用, 达到正常治疗剂量, 甚至提高疗效, 在多项临床研究中都有很好的疗效^[24-26].

对于晚期胃癌患者采用的姑息性化疗方案中, 考虑到缩短化疗间歇期可以最大程度地减小肿瘤负荷, 并且使用无交叉耐药的序贯化疗可以避免肿瘤耐药, 对晚期胃癌中序贯化疗研究结果表明联合用药的序贯化疗具有很好的疗效^[27].

关于 CPT-11 及 NCTD 联合用药的序贯治疗研究国内外未见相关报道, 本研究发现两种药物联用时序贯次序对联合作用有一定影响, 先给 CPT-11 方案要优于先给 NCTD 方案及同时给药方案, 其机制主要是引起细胞 S 期阻滞增加及细胞凋亡增加. 因此提示以 CPT-11 及 NCTD 联合用药的作用及其机制为基础, 通过对序贯方式的进一步研究将为临床治疗提供更全面的参考和更好的治疗方案. 由于 CPT-11 和 NCTD 单独用药时均在 12 h 后观察到对 Pdcd4 及 p53 蛋白表达产生影响, 推测联合用药序贯方式对药物联合作用的影响可能也和两种药物对 Pdcd4 和 p53 的调控有关, 相关研究还在进行中.

附件 图 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Gordon R R, Nelson P S. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat*, 2012, **15**(1-2): 123-131
- [2] Tortora G, Bianco R, Daniele G, *et al.* Overcoming resistance to molecularly targeted anticancer therapies: rational drug combinations based on EGFR and MAPK inhibition for solid tumours and haematologic malignancies. *Drug Resist Updat*, 2007, **10**(3): 81-100
- [3] Bijnsdorp I V, Giovannetti E, Peters G J. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol*, 2011(731): 421-434
- [4] 王士群, 朱宇珍, 郑学宝. Chou-Talalay 在肿瘤联合用药中的研究应用概况. *中国现代应用药学*, 2013, **30**(4): 449-453

- Wang S Q, Zhu Y Z, Zheng X B. Chin J Mod Appl Pharm, 2013, **30**(4): 449-453
- [5] Kanat O, Evrensel T, Manavoglu O, *et al.* Single-agent irinotecan as second-line treatment for advanced gastric cancer. Tumori, 2003, **89**(4): 405-407
- [6] 郭晓鹏, 冯思良, 王金辉, 等. 拓扑异构酶 1 及其喜树碱类抑制剂的临床研究进展. 国际药学研究杂志, 2013, **40**(4): 405-414
Guo X P, Feng S L, Wang J H, *et al.* J Int Pharm Res, 2013, **40**(4): 405-414
- [7] 李瑞婧, 洪兴福, 季媛媛, 等. 去甲斑蝥素诱导人卵巢癌 SK-OV-3 细胞发生有丝分裂期阻滞与凋亡. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, **27**(2): 180-186
Li R J, Hong X F, Ji Y Y, *et al.* Chin J Pharmacol Toxicol, 2013, **27**(2): 180-186
- [8] 陈文晟, 马 磊, 金 川, 等. 艾迪注射液联合含羟基喜树碱方案治疗中晚期非小细胞肺癌疗效观察. 肿瘤研究与临床, 2003, **15**(3): 199-200
Chen W S, Ma L, Jin C, *et al.* Cancer Res Clin, 2003, **15**(3): 199-200
- [9] Li Z M, Wang M, Xu Z L, *et al.* Different cytotoxic effects of hydroxycamptothecin on human lung cancer cells and human embryo lung fibroblast cells. Chin J Pharmacol Toxicol, 2014, **28**(3): 315-320
- [10] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res, 2010, **70**(2): 440-446
- [11] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev, 2006, **58**(3): 621-681
- [12] Wu Y, Cao C M, Wang H Q, *et al.* Norcantharidin downregulates programmed cell death 4 expression in human gastric cancer cells. Chin J Pharmacol Toxicol, 2013, **27**(4): 622-628
- [13] Lankat-Buttgereit B, Goke R. The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation. Biol Cell, 2009, **101**(6): 309-317
- [14] Freed-Pastor W A, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. Gene Dev, 2012, **26**(12): 1268-1286
- [15] Frey B, Stache C, Rubner Y, *et al.* Combined treatment of human colorectal tumor cell lines with chemotherapeutic agents and ionizing irradiation can *in vitro* induce tumor cell death forms with immunogenic potential. J Immunotoxicol, 2012, **9**(3): 301-313
- [16] Yu C C, Ko F Y, Yu C S, *et al.* Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells. Int J Oncol, 2012, **41**(3): 1050-1060
- [17] 曹秋菊, 田志华, 孙 晟, 等. 人胃癌 BGC-823 细胞中去甲斑蝥素抑癌作用机理的蛋白质组学研究. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(9): 1114-1121
Cao Q J, Tian Z H, Sun S, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(9): 1114-1121
- [18] Lena Wedeken, Priyanka Singh, Karl-Heinz Klempnauer. Tumor suppressor protein Pdc4 inhibits translation of p53 mRNA. J Biol Chem, 2011, **286**(50): 42855-42862
- [19] Bennett C N, Tomlinson C C, Michalowski A M, *et al.* Cross-species genomic and functional analyses identify a combination therapy using a CHK1 inhibitor and a ribonucleotide reductase inhibitor to treat triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res, 2012, **14**(4): R109
- [20] 陈 菲, 王瑜梅. 羟基喜树碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响. 中国医药导报, 2011, **8**(10): 17-19
Chen F, Wang Y M. Chin Med Her, 2011, **8**(10): 17-19
- [21] 江 伟, 陈振东. 伊立替康在晚期胃癌化疗中的应用. 安徽医药, 2010, **14**(4): 459-462
Jiang W, Chen Z D. Anhui Med Pharm, 2010, **14**(4): 459-462
- [22] 张乐天, 项 晖. 去甲斑蝥素联合常规化疗治疗胃癌术后的临床疗效观察. 医学综述, 2013, **19**(11): 2087-2088
Zhang L T, Xiang H. Med Recapitulate, 2013, **19**(11): 2087-2088
- [23] 吴细丕, 曾一峰, 程新超. 加温合并喜树碱、斑蝥素对荷 Lewis 肺癌小鼠的作用. 河南医学研究, 1996, **5**(2): 104-109
Wu X P, Zeng Y F, Cheng X C. Henan Med Res, 1996, **5**(2): 104-109
- [24] OmLin A, Pezaro C, Sommer S G. Sequential use of novel therapeutics in advanced prostate cancer following docetaxel chemotherapy. Therapeutic Adv Urol, 2014, **6**(1): 3-14
- [25] Mukherji D, OmLin A, Pezaro C, *et al.* Metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC): preclinical and clinical evidence for the sequential use of novel therapeutics. Cancer Metast Rev, 2014, **33**(2-3): 555-566
- [26] Procopio G, Verzoni E, Iacovelli R, *et al.* Targeted therapies used sequentially in metastatic renal cell cancer: overall results from a large experience. Expert Rev Anticancer Ther, 2011, **11**(11): 1631-1640
- [27] Dalla Chiesa M, Tomasello G, Buti S, *et al.* Sequential chemotherapy with dose-dense docetaxel, cisplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (TCF-dd) followed by combination of oxaliplatin, folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan (COFFI) in metastatic gastric cancer: results of a phase II trial. Cancer Chemoth Pharm, 2011, **67**(1): 41-48

The Effect and The Synergistic Mechanism of Irinotecan Combined With Norcantharidin in Human Gastric Cancer Cell Line BGC-823*

LI Zi-Mu, SUN Zhen-Xiao**

(College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract To investigate the proliferative effects and the synergistic mechanism of irinotecan combined with norcantharidin in human gastric cancer cell line BGC-823. BGC-823 cells were treated with CPT-11 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol/L}$ and NCTD 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol/L}$ alone or in combination with the fixed constant ratio (1 : 1) and with the complete cross-over concentrations (as show above) for 24, 48 and 72 h, and the combination of CPT-11 and NCTD with a sequential schedule were combined for culturing BGC-823 cells for 24 h. Cell proliferation was investigated by MTT assay, and the combination effect was evaluated by Chou-Talalay method. Cell cycle and apoptosis in BGC-823 cells treated with CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ and NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ alone or in combination (60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ and combination with a sequential schedule for 24 h were determined by Flow cytometry. The expression of Pdc4 and p53 in BGC-823 cells treated with CPT-11 30, 60 $\mu\text{mol/L}$ and NCTD 30, 60 $\mu\text{mol/L}$ alone or in combination (30 : 30, 60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ for 24 h was detected by Western blotting. Compared with treatment with CPT-11 and NCTD alone, the combination of them increased the proliferation inhibition, and the IC_{50} were significantly decreased ($P < 0.05$). The IC_{50} values of the combination for 24, 48 and 72 h were 2.83, 3.15, 2.19 fold and 2.66, 3.11, 2.45 fold respectively compared to BGC-823 cells treated with CPT-11 and NCTD alone. The results indicated synergistic effect. The sequence of CPT-11 followed by NCTD showed a stronger inhibition than the sequence of NCTD followed by CPT-11 ($P < 0.05$), and it was superior to co-administration ($P < 0.05$). For 24 h, CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ triggered both S and G2-M phase arrest ($P < 0.01$) in the BGC-823 cells, and NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ induced cell cycle arrest at G2-M phases and apoptosis ($P < 0.05$) in the BGC-823 cells. The combination of CPT-11 and NCTD (60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ increased the G2-M phase arrest. Compared with the sequence of NCTD 6 h first followed by CPT-11 and co-administration, the sequence of CPT-11 6 h first followed by NCTD increased the S phase arrest ($P < 0.05$) and apoptosis in the BGC-823 cells. CPT-11 30, 60 $\mu\text{mol/L}$ up-regulated the expression of Pdc4 ($P < 0.05$) and down-regulated the expression of p53 ($P < 0.05$) after 12 h; NCTD 30, 60 $\mu\text{mol/L}$ down-regulated the expression of Pdc4 ($P < 0.05$) and up-regulated the expression of p53 ($P < 0.05$) after 12 h; The combination (30 : 30, 60 : 60) $\mu\text{mol/L}$ up-regulate the expression of Pdc4 and p53 ($P < 0.05$). The combination of CPT-11 and NCTD has a synergistic effect mainly due to the fact that it can induce the G2-M phase arrest, and up-regulate the expression of Pdc4 and p53 as the tumor suppressor. The combination of CPT-11 and NCTD with a sequential schedule has some impacts on the growth of BGC-823 cells. The sequence of CPT-11 followed by NCTD shows a stronger inhibition than the sequence of NCTD followed by CPT-11 and co-administration, and it may be related to the increase of S phase arrest and apoptosis. Pdc4 and p53 protein may have a negative regulation in BGC-823 cells.

Key words CPT-11, NCTD, drug combination, human gastric adenocarcinoma BGC-823 cell, sequential administration, Pdc4, p53

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0231

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81473418), The Wildlife protection Projects of State Forestry Administration(2012-2014) and Beijing University of Chinese Medicine Foundation (2013JYBZZ-XS-088, 2014JYBZZ-XS-097).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-84738646, E-mail: sunzxcn@hotmail.com

Received: August 14, 2014 Accepted: November 17, 2014

附录

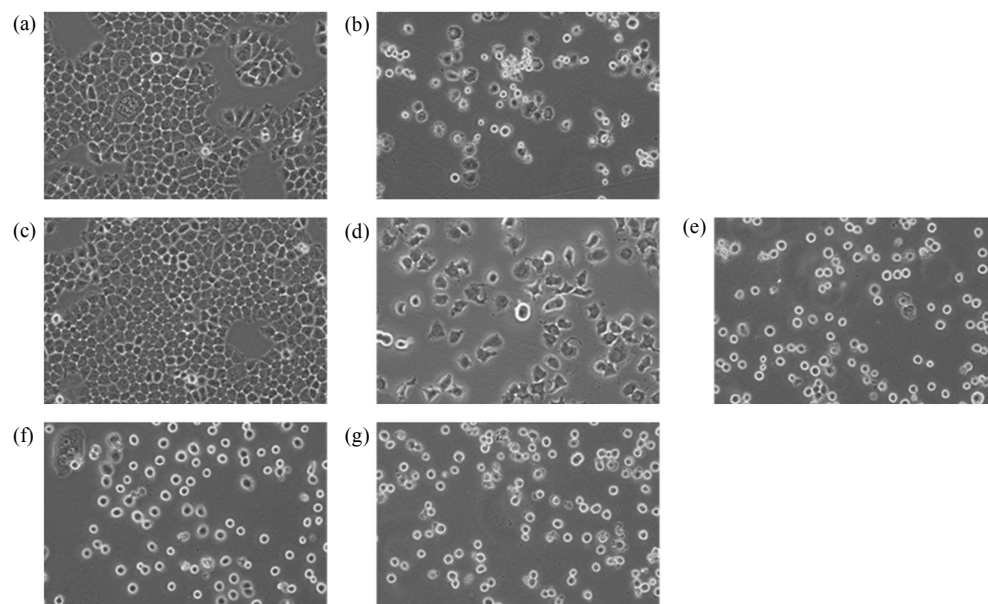


Fig. S1 Effect of CPT-11 (d) and NCTD (b) alone or in combination (e) and combination with different sequence (f, g) on cell morphological alterations in BGC-823 cells under phase-contrast microscope($\times 10$)

(a) Control. (b) NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (c) DMSO(amount to CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. (d) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (e) CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ + NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (f) Firstly, administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h. (g) Firstly, administrated CPT-11 60 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h and then administrated NCTD 60 $\mu\text{mol/L}$ together for 18 h.