

三肽氮芥类化合物 MF13 联合化疗的抗肝癌作用

胡琼莹^{1,3}, 蒋建东^{2,3}, 宋丹青³, 梁勇^{1*}, 韩燕星^{2*}

(1. 台州学院医学院, 浙江 台州 318000; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: *L*-脯氨酸-间-双(2-氯乙基)氨基-*L*-苯丙氨酰基-*L*-正缬氨酸乙酯盐酸盐 (MF13) 是一个新颖的含三肽的氮芥类化合物。本课题组以往的体内外研究数据表明, MF13 单药给药时, 对多种不同来源的人肝癌细胞系均有较强的抗增殖活性。本文主要研究 MF13 与其他抗肿瘤药物联合使用时对肝癌的抑制作用。联合化疗体外实验结果显示, MF13 与丝裂霉素 C (MMC) 在适宜浓度下联合应用时, 对 Bel-7402 细胞的抗增殖活性有协同作用; MF13 与长春新碱 (VCR) 联用无协同作用。联合化疗裸鼠体内实验结果表明, 2 mg·kg⁻¹ MF13 与 50 mg·kg⁻¹ 环磷酰胺 (CTX) 或 2 mg·kg⁻¹ MMC 联用, 协同作用显著; 然而, 2 mg·kg⁻¹ MF13 与 0.3 mg·kg⁻¹ VCR 联合使用时无协同作用。联合化疗的体内外实验结果一致。本研究结果表明, 无论单药给药还是联合化疗, MF13 都是一个有潜在应用前景的抗肝癌化合物。

关键词: 肝癌; 盐酸氮芥; 联合化疗; 协同作用

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0911-10

Combination chemotherapy of *L*-proline-*m*-bis (2-chloroethyl) amino-*L*-phenylalanyl-*L*-norvaline ethyl ester hydrochloride with anti-cancer drugs in human hepatocellular carcinoma

HU Qiong-ying^{1,3}, JIANG Jian-dong^{2,3}, SONG Dan-qing³, LIANG Yong^{1*}, HAN Yan-xing^{2*}

(1. School of Medicine, Taizhou University, Taizhou 318000, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: *L*-Proline-*m*-bis (2-chloroethyl) amino-*L*-phenylalanyl-*L*-norvaline ethyl ester hydrochloride (MF13) is a new anticancer tripeptide. Our previous study *in vitro* and *in vivo* showed that MF13 had anti-proliferative activities in a panel of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines from different origin. In the present study, we focused on the inhibition effect on HCC of MF13 combined with other anti-cancer drugs. The results of combination chemotherapy *in vitro* indicated that the combination of MF13 with mitomycin C (MMC) at appropriate concentrations led to a synergistic effect; however, the combination of MF13 with vincristine (VCR) showed no synergistic effect. In the Bel-7402 tumor bearing nude mice, the antitumor effect of the groups of 2 mg·kg⁻¹ MF13 + 2 mg·kg⁻¹ MMC or 2 mg·kg⁻¹ MF13 + 50 mg·kg⁻¹ cyclophosphamide (CTX) exhibited synergistic anticancer efficacies while the group of 2 mg·kg⁻¹ MF13 + 0.3 mg·kg⁻¹ VCR did not have the same effect. Based on our data, we believe that MF13 can be considered as a potential agent against human hepatocellular carcinoma no matter how treated, alone or combined with other drugs.

收稿日期: 2017-05-03; 修回日期: 2017-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (398708889); 浙江省公益技术应用研究项目 (2016F81G2170011).

*通讯作者 Tel: 86-10-63167255, E-mail: hanyanxing@hotmail.com;

Tel: 86-576-88665198, E-mail: liangytu@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0441

Key words: hepatocellular carcinoma; mechlorethamine; combined chemotherapy; drug synergism

肝细胞性肝癌 (human hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌最常见的形式, 为世界第五大癌症, 位于癌症相关死亡率的第三位^[1]。目前我国肝癌发病人数占全球肝癌患者的 50% 以上, 已经成为严重威胁我国人民健康和生命的一大杀手^[2]。抗肝癌治疗一直处于一种治疗技术有限、有效药物很少的困难境地, 因此寻找高效低毒的抗肝癌药物是科研工作者努力的目标^[3]。

自 20 世纪 50 年代初以来, 许多传统化疗药物包括 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、多柔比星 (ADM)/表柔比星 (EADM)、顺铂、丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 和依托泊苷已被陆续应用于治疗 HCC^[4]。近年来, 一系列新一代化疗药物如奥沙利铂、吉西他滨和卡培他滨等被广泛应用^[4]。但是, 肝癌的化疗进展不大, 单药治疗有效率通常低于 20%, 且毒副作用大, 可重复性差^[4]。与其他实体瘤相比, 晚期 HCC 患者的生存时间相对较短, 从而限制了使用单个药物进行连续治疗的可能性; 此外, 考虑到大多数单药治疗的反应率低和 HCC 肿瘤异质性高相关, 联合化疗也许可潜在地改善临床效果^[5]。联合化疗是指联合使用两种或更多种治疗药物治疗癌症。与单一疗法相比, 抗癌药物的合用有可能增强疗效, 因为联合化疗可以特征性地针对关键作用途径从而产生协同或加和效应; 此外, 这种方法可潜在地降低耐药性, 并产生治疗性的抗癌益处, 如降低肿瘤生长和转移潜力, 阻断细胞的细胞周期, 减少癌症干细胞群体和诱导细胞凋亡等^[6]。所以合理的联合化疗可达到既增效又减毒, 或减毒而不减效, 或增效而不增毒的目的, 肝癌的联合化疗一直受到临床医生的重视。

L-脯氨酸-间-双 (2-氯乙基) 氨基-*L*-苯丙氨酸酯基-*L*-正缬氨酸乙酯盐酸盐 (MF13) 是一个新颖的含三肽的氮芥类化合物 (结构式见图 1), 本研究组以往的研究数据表明 MF13 在体外对多种不同来源的人肝癌细胞系均有较强的抗增殖活性; 在裸鼠皮下异种移植人肝癌实验中, 结果表明与对照组相比, MF13 对 Bel-7402 和 HepG2 实体瘤有显著的肿瘤生长抑制作用, 并且呈剂量依赖性; 此外, MF13 的抗肝癌活性优于等摩尔当量的前体化合物间-溶肉瘤素 (m-SL) (瘤体积比 $P < 0.01$)^[7]。MF13 单药给药的研究结果表明, MF13 可能有较好的抗肝癌潜能。本课题研究 MF13 与其他抗肿瘤药物联合化疗的体内外抗肝癌作

用, 并与单药给药的疗效作比较, 进一步评估 MF13 作为抗肝癌化合物的应用前景。为了研究 MF13 与其他药物联合应用的效果, 在动物体内研究中, 采用了同为氮芥类烷化剂的环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 和抗生素类烷化剂 MMC, 还选用了 G₂/M 期特异性药物——植物来源抗肿瘤药长春新碱 (vincristine, VCR); 在体外实验中没有考证联合应用 CTX 的作用, 是因为 CTX 为前药, 进行体外实验需加肝微粒体功能氧化酶, 这样就增加了实验影响因素。体内外的实验结果一致表明, 无论是单药给药, 还是联合化疗, MF13 是一个有潜在应用前景的抗肝癌化合物。

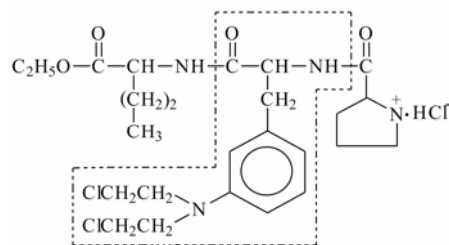


Figure 1 Chemical structure of MF13

材料与方法

药物及主要生化试剂 MF13、m-SL 由蒋建东研究组^[7-9]合成, 纯度大于 90.0%。将 MF13 和 m-SL 溶于 *N,N*-二甲基乙酰胺 (DMF): 1,2-丙二醇 (1:2), 配成 10 mg·mL⁻¹ 母液, 体外实验时再用培养基稀释成所需浓度, 动物实验则临用前再用生理盐水稀释成所需浓度。注射用 MMC 购于山西泰盛制药有限公司, 溶于 pH 8.0 碱液中; 注射用 CTX, 上海新亚药业有限公司产品; 注射用硫酸 VCR, 由北京医科大学实验药厂提供。进行动物实验时, 所有药液临用前再用生理盐水稀释成所需浓度。RPMI 1640 培养基、胰酶/EDTA 购自 GIBCO 公司; 无 DNA 酶的 RNA 酶 (RNase)、碘化丙啶 (PI)、噻唑蓝 (MTT)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 均购自 Sigma 公司; DMF、乙醇与其他试剂为国产试剂 (北京化工厂)。

细胞系 人肝癌细胞系 Bel-7402 购自中国科学院上海细胞研究所, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基 (每毫升培养基含有 150 单位青霉素和 150 单位链霉素), 在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱培养。用胰酶/EDTA 消化细胞传代, 并按细胞的生长规律定期传代, 实验所用的细胞均处于对数生长期。在动物实

验中, 人肝癌细胞 Bel-7402 皮下注射裸鼠体内, 以实体瘤形式传代。

实验动物及饲养条件 5~6 周龄的 BALB/c 裸鼠, 动物许可证: SCXK (京) 2004-0011, 雌性, 体重为 17 ± 2 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。每个无菌隔离罩中放入 8~10 只裸鼠, 置层流柜中饲养观察 1 周, 确认其健康后开始动物实验。裸鼠的饲养条件为: 用钴 60 照射的鼠颗粒饲料和高压灭菌的自来水饲养裸鼠, 高压消毒的垫料每周更换 2 次, 饲养室温度在 $24 \sim 26$ °C, 湿度为 50%~60%。

流式细胞术检测 MF13 联合化疗对细胞周期的影响 收集溶剂对照细胞和按不同设定孵育时间、经不同配伍方式药物处理后的细胞 (贴壁及未贴壁的), 冰冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷的 70%乙醇于 4 °C 固定至少 12 h, 离心去除乙醇, PBS 洗 2 次, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA 酶 37 °C 消化 30 min, 加入 PI 使其终质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 °C 避光染色 30 min, 过 300 目尼龙网, 经流式细胞仪 (Coulter EPICS-XL 型, 美国 Coulter 公司) 检测各组细胞的周期变化。

MF13 联合化疗对 HCC 细胞的生长抑制作用——MTT 比色法^[10] 将 Bel-7402 细胞接种于 2 块 96 孔培养板上, 接种的活细胞数为每孔 1×10^4 个。一块培养板分别加入两倍浓度梯度的 VCR ($0.42 \times 10^{-5} \sim 6.72 \times 10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、MF13 ($0.14 \sim 4.42 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 MF13+VCR (联合给药组每孔的浓度通过正交法确定), 同样方法, 另一块分别加入 MMC ($0.24 \sim 3.74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、MF13 和 MF13+MMC。各孔的总体积为 250 μL , 每个浓度重复 2 孔, 溶剂对照孔内加入等体积含等量溶剂的培养基, 置 CO₂ 孵箱于 37 °C 培养 72 h。然后弃去药液, 加入无血清培养液配制的 MTT 工作液 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 200 μL , 置 CO₂ 孵箱于 37 °C 继续培养 4 h 后, 倒掉 MTT 工作液, 每孔加入 50% DMF-20% SDS 脱色液 200 μL , 置 37 °C 恒温摇床反应 2 h 后, 在酶标仪上测定波长为 570 nm 时各孔的光密度吸光度 (OD)。每组实验重复 3 次, 每次实验均设定溶剂对照孔和细胞对照孔各 3 孔, 结果以细胞生长抑制率 (%) 和两药相互作用指数表示。细胞生长抑制率 (%) 通过公式 $(\text{OD}_{\text{溶剂对照组}} - \text{OD}_{\text{加药组}}) / \text{OD}_{\text{溶剂对照组}} \times 100\%$ 计算。两药相互作用指数 (coefficient of drug interaction, CDI) 的计算公式为: $\text{CDI} = AB / (A \times B)$, 在 MTT 法中, AB 为两药联合使用组与对照组在 570 nm 处吸光度的比值, A 、 B 为各药单独使用组与对照组在 570 nm 处吸光度的比值; 在动物实验中, AB 为两药联合使用组与对照组瘤体积的比值, A 、 B 为各药单独

使用组与对照组瘤体积的比值。CDI < 1、= 1 或 > 1 分别表示这些药物组合的作用是协同、加和或拮抗的, CDI < 0.7 表明该药物具有显著的协同作用^[11-13]。

MF13 联合化疗对裸鼠皮下异种移植人肝癌 Bel-7402 的治疗作用 无菌条件下, 剥取体内接种传代人肝癌 Bel-7402 细胞 30 天的荷瘤裸鼠皮下瘤块于消毒平皿中, 小心剔除粘连组织或血块后, 在无血清的 RPMI-1640 培养基中, 选取肿瘤细胞活力强的瘤块外层剪成 $2 \sim 8 \text{ mm}^3$ 大小的均匀瘤块, 用套管针将瘤块接种于裸鼠右侧背部皮下, 1 块/只。肿瘤接种第 7 天, 将 48 只裸鼠随机分为 8 组, 分别为溶剂对照组 (7 只)、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CTX 治疗组 (5 只)、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MMC 治疗组 (5 只)、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ VCR 治疗组 (5 只)、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 治疗组 (5 只)、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CTX 治疗组 (7 只)、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 + $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MMC 治疗组 (7 只) 及 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 + $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ VCR 治疗组 (7 只)。待各组荷瘤裸鼠的平均瘤体积为 100 mm^3 左右时, 开始腹腔注射 (intraperitoneal injection, ip) 给药, 首剂剂量按组别所示 (所有 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 治疗组首剂为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 联合化疗组两药同时给药), 以后继续每周给药 1 次, 共 5 次。接种肿瘤第 35 天, 因溶剂对照组裸鼠的平均瘤体积超过 2000 mm^3 而结束实验^[14], 颈椎脱臼法处死动物, 剥取瘤块称重并计算抑瘤率 (%)。用下列公式计算肿瘤体积: 瘤体积 = 瘤长径 \times 瘤宽径² $\times 0.52$ ^[15], 根据瘤体积绘制各组肿瘤生长曲线, 并计算抑瘤率 (%)。对各组瘤体积和瘤重组间差异显著性进行 F 和 t 检验。

统计学方法 数据在 SPSS 软件中进行计算和统计, 经正态分布和方差齐性检验 (F 检验) 后, 进行两两比较的两个独立样本的 t 检验。

结果

1 MF13 与其他抗肿瘤药联合使用时对细胞周期的影响

1.1 MMC 单独使用时主要将细胞阻断在 S 期 以前的研究数据显示, MF13 连续处理 Bel-7402 细胞, 作用 6 h 后 S 期细胞数量已有所增加; 作用 12 h 后 S 期细胞所占比例超过 50%; 作用 24 h 后 S 期细胞所占比率达到 76.2%, 同时 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期细胞也分别减少至 10% 左右^[7]。在本研究中, 流式细胞仪检测结果显示 Bel-7402 细胞未经药物处理时, 细胞周期各时相的细胞呈典型性分布, 即 G₀/G₁ 期细胞占

55.4%, S 期细胞占 34.2%, G₂/M 期细胞占 10.4%; 1.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMC 连续处理 Bel-7402 细胞, 6 h 后 S 期细胞数量已有所增加, 12 h 后 S 期细胞所占比例超过 60%, 24 h 后 S 期细胞所占比率达到 87.9%, 具体结果见图 2。由此可见, MMC 单剂给药时主要将细胞阻断在 S 期。由于 MMC 或 MF13 单独^[7]给药时的细胞阻断作用都在 24 h 达到最大值, 因此本研究选用 24 h 这一时间点来考查不同剂量的 MF13 与 MMC 联合给药对细胞周期的影响。

1.2 VCR 单独使用时主要将细胞阻断在 G₂/M 期 流式细胞仪检测结果显示, 3.36×10^{-5} $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VCR 单独连续处理 Bel-7402 细胞, 6 h 后 G₂/M 期细胞数量已增加到 31.8%, 12 h 后 G₂/M 期细胞所占比例为 60.2%, 24 h 后 G₂/M 期细胞所占比率达到 76.0%, 具体结果见图 3, 由此可见, VCR 主要将细胞阻断在 G₂/M 期。MMC 和 VCR 对细胞周期的影响不同, 这正是本研究选用这两个药物用以考查不同细胞周期作用时相的药物与 MF13 联用的效果的原因。虽然 VCR 单独给药时的细胞阻断作用也在 24 h 达到最大值, 但由于 VCR 连续作用 24 h 将有超过 10% 的凋亡细胞出现 (数据未列出), 为了使对细胞周期时相分布的分析数据更准确, 选用 12 h 这一时间点考查不

同剂量的 MF13 与 VCR 联合用药对细胞周期的影响。

1.3 MMC 与 MF13 联合应用时对细胞 S 期阻断作用增强 因考虑到若采用较高的剂量, 单独用药组 S 期细胞或 G₂/M 所占比率便已达到很高的值, 则不易观察到联合用药组对周期阻断作用增强的现象, 所以本实验选用了较小剂量。流式细胞仪检测结果显示, $2.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13 作用 24 h 后 S 期细胞所占比率为 48.3%, $0.94\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMC 作用后 S 期细胞所占比率为 38.4%, $2.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13+ $0.94\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMC 作用后 S 期细胞所占比率为 60.5%, 具体结果见图 4。由此可见, MF13 与 MMC 联合给药组对 S 期的阻断作用要强于单独给药组。

1.4 VCR 与 MF13 联合应用时对细胞 S 期和 G₂/M 期的双阻断作用 流式细胞仪检测结果显示 $2.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13 作用 12 h 后 S 期和 G₂/M 期细胞所占比率分别为 44.5% 和 13.4%, $1.68\times 10^{-5}\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VCR 作用 12 h 后 S 期和 G₂/M 期细胞所占比率分别为 37.0% 和 57.8%, $2.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13+ $1.68\times 10^{-5}\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VCR 作用后, S 期细胞所占比率为 43.2%, G₂/M 期细胞所占比率为 52.6%, 说明联合用药组中的 MF13 和 VCR 各自阻断肿瘤细胞, 分别进入它们作用的敏感时相 S 期和 G₂/M 期, 具体结果见图 5。

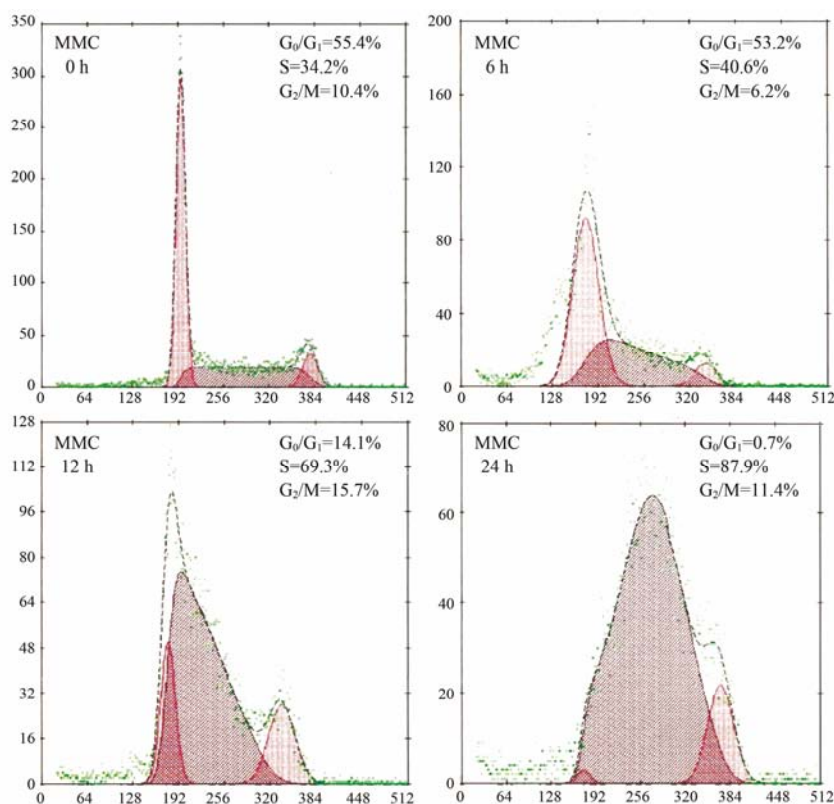


Figure 2 Blockade of cell cycle in Bel-7402 cells treated with mitomycin C (MMC). Cell cycle analysis was done by flow cytometry at 0, 6, 12 and 24 h after MMC treatment ($1.87\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The major blockade was found in the S-phase

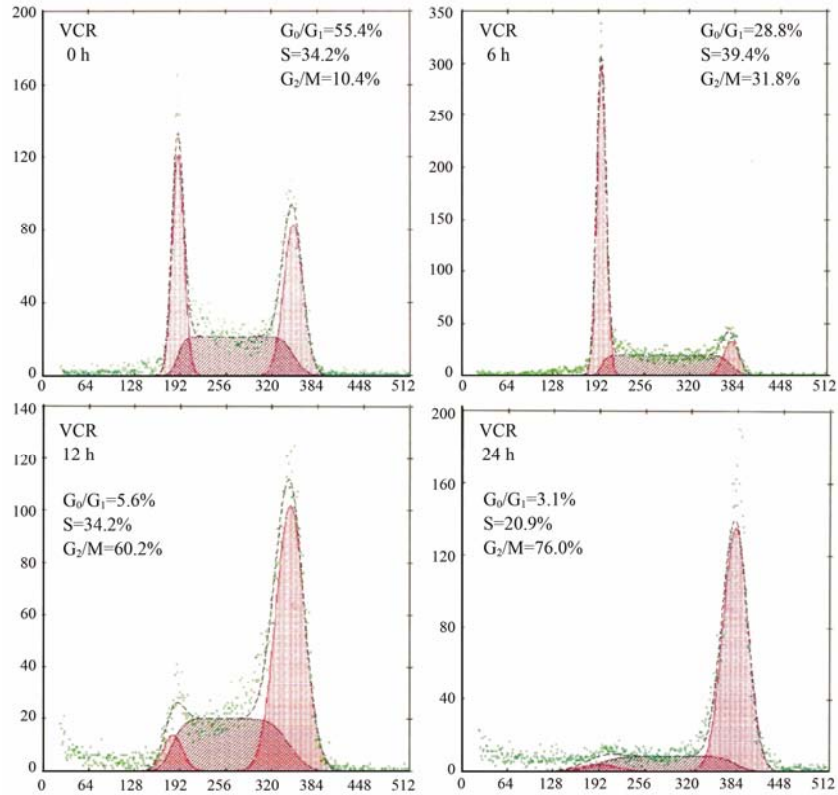


Figure 3 Blockade of cell cycle in Bel-7402 cells treated with vincristine (VCR). Cell cycle analysis was done by flow cytometry at 0, 6, 12 and 24 h after VCR treatment ($3.36 \times 10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The major blockade was found in the G₂/M-phase

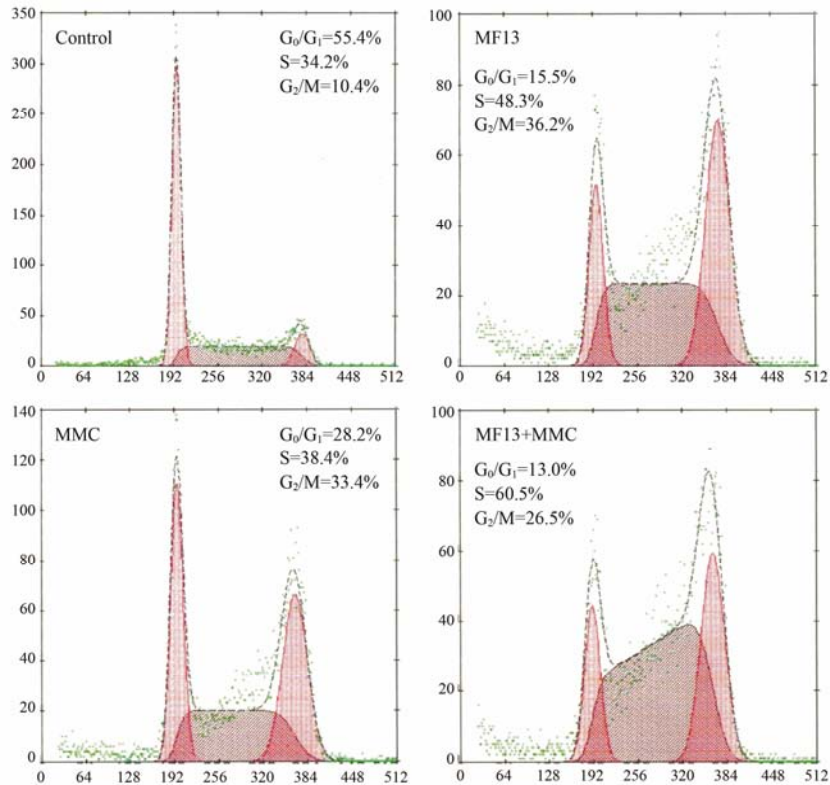


Figure 4 Blockade of cell cycle in Bel-7402 cells treated with MF13 or MMC alone, or MF13 in a combination with MMC. MF13 was at $2.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and MMC at $0.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Cell cycle analysis was done by flow cytometry at 24 h after treatment. As compared to the treatment with MF13 or MMC alone, S-phase blockade increased in combination chemotherapy

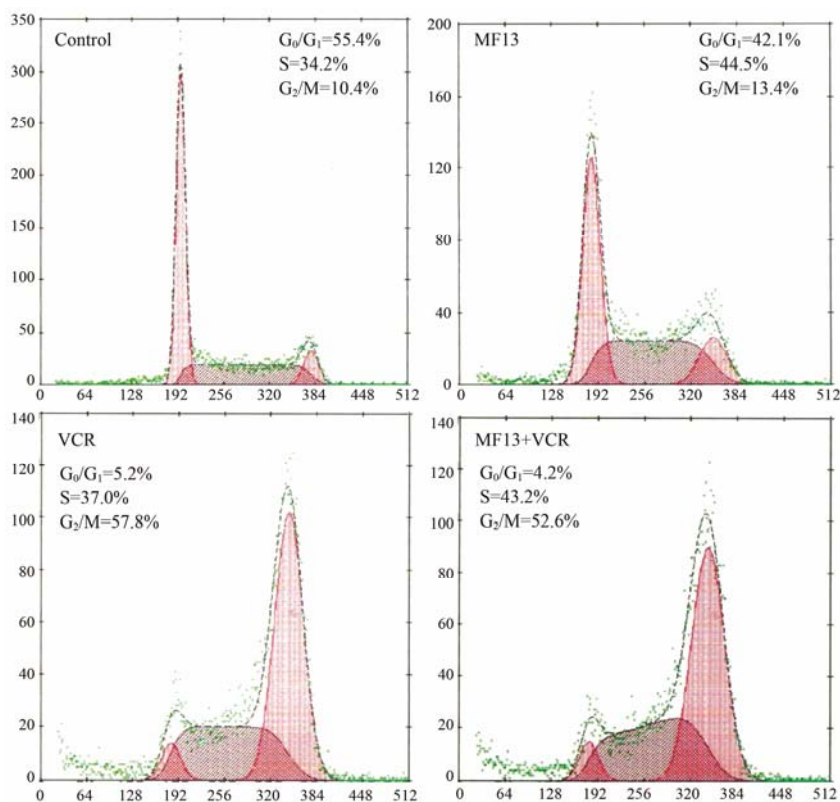


Figure 5 Blockade of cell cycle in Bel-7402 cells treated with MF13 or VCR alone, or MF13 in a combination with VCR. MF13 was at $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and VCR at $1.68\times 10^{-5} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cell cycle analysis was done by flow cytometry at 12 h after treatment. The major blockade was found in the S-phase by MF13 or in the G_2/M -phase by VCR. Double blockade of S-phase and G_2/M -phase was found when cells were treated with combination chemotherapy

2 MF13 与其他抗肿瘤药物联合应用时对 Bel-7402 生长抑制作用的改变

在联合化疗的体内外实验中, 本研究选用其他抗肿瘤药物与 MF13 同时给药的治疗方案。以两药相互作用指数 CDI 衡量两药是否有协同作用, 认为当 $\text{CDI} < 1$ 时, 两药有协同作用, 当 $\text{CDI} < 0.7$ 时, 协同作用非常显著^[11-13]。MF13、MMC、VCR 单独使用及 MF13 分别与 MMC、VCR 联合应用时对 Bel-7402 细胞系的抗增殖活性检测结果如表 1 和 2 所示。由表 1 数据可见 $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13 与 $1.87 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $0.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMC 联合应用时有协同作用, 且 $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MF13 与 $1.87 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMC 联用时协同作用显著, 而 MF13 与 MMC 在其他浓度联用时无协同作用。由表 2 数据可见, MF13 与 VCR 联用时无协同作用。

3 MF13 联合化疗对裸鼠皮下异种移植人肝癌 Bel-7402 的治疗作用

在裸鼠接种瘤块第 35 天, 溶剂对照组平均瘤体积为 2041mm^3 时, $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MF13 治疗组、 $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTX 治疗组、 $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MMC 治疗组和

$0.3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VCR 治疗组的瘤体积分别为 1855.78 、 1797.19 、 1293.63 和 1998.38mm^3 , 对肿瘤生长的抑制率分别为 9.1% 、 12.3% 、 38.7% 和 2.3% , 与对照组的瘤体积比较, 各治疗组均无显著的差异性 ($P > 0.05$); $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MF13 + $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTX 治疗组的瘤体积为 1128.59mm^3 , 对肿瘤生长的抑制率为 47.3% , 与对照组比较有显著的差异性 ($P < 0.05$); $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MF13 + $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MMC 治疗组的瘤体积为 766.15mm^3 , 对肿瘤生长的抑制率为 65.8% , 与对照组比较有非常显著的差异性 ($P < 0.01$), $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MF13 + $0.3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VCR 治疗组的瘤体积为 1844.50mm^3 , 对肿瘤生长的抑制率为 9.9% , 与对照组比较没有显著的差异性 ($P > 0.05$)。实验过程中各组动物的瘤体积变化见图 6 (因为 VCR 两治疗组与对照组比较没有统计学意义, 所以图中未显示 VCR 两治疗组的数据)。可见 MF13 联合用药组的治疗效果要优于单独用药组, $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MF13 与 $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MMC (CDI 为 0.65) 或 $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTX 联合使用时协同作用显著 (CDI 为 0.69), 而与 $0.3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VCR 联合使用时无协同作用 (CDI = 1.02)。动物的体重和瘤重等数据见表 3。本

Table 1 Cytotoxicity of MF13 combined with MMC on Bel-7402 cells. After seeding, cells were treated with MF13 in a combination with MMC. After 72 h, cell viability was detected by MTT assay. Data are the mean \pm SD from at least three independent observations. $^a\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration of MMC can be calculated by multiplying 334.3. CDI, coefficient of drug interaction

Drug	Concentration ^a / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition rate	CDI
MF13	2.21	23.08 \pm 4.05	
	1.10	19.01 \pm 0.39	
	0.55	10.78 \pm 0.56	
	0.28	6.79 \pm 0.78	
MMC	1.87	74.85 \pm 11.57	
	0.94	50.30 \pm 2.73	
	0.47	38.65 \pm 4.71	
	0.24	30.21 \pm 0.90	
MF13+MMC	2.21+1.87	87.81 \pm 5.92	0.63
	2.21+0.94	64.77 \pm 10.53	0.92
	2.21+0.47	43.19 \pm 15.53	1.20
	2.21+0.24	41.88 \pm 12.28	1.08
	2.21+0.12	34.26 \pm 15.58	1.06
MF13+MMC	1.10+1.87	73.41 \pm 12.07	1.30
	1.10+0.94	46.37 \pm 12.76	1.33
	1.10+0.47	25.46 \pm 8.95	1.50
	1.10+0.24	20.09 \pm 10.27	1.41
	1.10+0.12	18.64 \pm 7.51	1.24
MF13+MMC	0.55+1.87	65.86 \pm 19.63	1.52
	0.55+0.94	38.24 \pm 2.48	1.39
	0.55+0.47	23.71 \pm 3.13	1.39
	0.55+0.24	19.63 \pm 15.10	1.29
	0.55+0.12	14.89 \pm 13.42	1.18
MF13+MMC	0.28+1.87	64.58 \pm 12.10	1.51
	0.28+0.94	35.55 \pm 4.15	1.39
	0.28+0.47	20.03 \pm 17.35	1.40
	0.28+0.24	15.23 \pm 13.53	1.30
	0.28+0.12	9.67 \pm 2.08	1.20

Table 2 Cytotoxicity of MF13 combined with VCR on Bel-7402 cells. After seeding, cells were treated with MF13 in a combination with VCR. After 72 h, cell viability was detected by MTT assay. Data are the mean \pm SD from at least three independent observations. $^a\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration of VCR can be calculated by multiplying 923.04

Drug	Concentration ^a / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition rate	CDI
MF13	4.42	37.16 \pm 3.18	
	2.21	23.08 \pm 4.05	
	1.10	19.01 \pm 0.39	
	0.55	10.78 \pm 0.56	
VCR	6.72×10^{-5}	93.56 \pm 6.34	
	3.36×10^{-5}	69.75 \pm 15.90	
	1.68×10^{-5}	47.12 \pm 5.07	
	0.84×10^{-5}	15.74 \pm 9.11	
	0.42×10^{-5}	8.98 \pm 5.43	
MF13+VCR	$4.42+6.72\times 10^{-5}$	54.33 \pm 3.77	11.29
	$4.42+3.36\times 10^{-5}$	33.34 \pm 1.32	2.40
	$4.42+1.68\times 10^{-5}$	29.82 \pm 4.65	2.11
	$4.42+0.84\times 10^{-5}$	21.22 \pm 10.25	1.49
	$4.42+0.42\times 10^{-5}$	17.83 \pm 1.68	1.44
MF13+VCR	$2.21+6.72\times 10^{-5}$	57.64 \pm 16.18	8.55
	$2.21+3.36\times 10^{-5}$	29.54 \pm 11.85	3.03
	$2.21+1.68\times 10^{-5}$	14.24 \pm 12.41	2.11
	$2.21+0.84\times 10^{-5}$	14.77 \pm 13.45	1.32
	$2.21+0.42\times 10^{-5}$	1.31 \pm 2.26	1.41
MF13+VCR	$1.10+6.72\times 10^{-5}$	66.52 \pm 16.08	6.42
	$1.10+3.36\times 10^{-5}$	31.86 \pm 3.86	2.78
	$1.10+1.68\times 10^{-5}$	22.32 \pm 4.01	1.81
	$1.10+0.84\times 10^{-5}$	10.17 \pm 17.61	1.32
	$1.10+0.42\times 10^{-5}$	4.13 \pm 7.15	1.30
MF13+VCR	$0.55+6.72\times 10^{-5}$	73.15 \pm 11.87	4.67
	$0.55+3.36\times 10^{-5}$	54.44 \pm 8.58	1.69
	$0.55+1.68\times 10^{-5}$	20.20 \pm 19.80	1.69
	$0.55+0.84\times 10^{-5}$	20.18 \pm 13.03	1.06
	$0.55+0.42\times 10^{-5}$	1.73 \pm 2.97	1.21

Table 3 Therapeutic efficacy of MF13 combined with other anticancer drugs in Bel-7402 human hepatoma bearing nude mice

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Injection route	Animal amount		Body weight/g		Tumor weight/g	Inhibition rate/%
			Start	End	Start	End		
Solvent control	0	ip	7	7	17.8 \pm 2.2	22.3 \pm 3.1	2.15 \pm 0.71	
CTX	50	ip	5	5	20.4 \pm 2.3	23.7 \pm 3.2	1.68 \pm 1.16	21.8
MMC	2	ip	5	5	20.3 \pm 1.3	21.6 \pm 3.5	1.32 \pm 1.07	38.6
VCR	0.3	ip	5	5	19.3 \pm 1.0	22.0 \pm 2.3	2.20 \pm 0.61	
MF13	2	ip	5	5	19.1 \pm 0.8	23.4 \pm 2.1	1.78 \pm 1.39	17.2
MF13+ CTX	2+50	ip	7	7	19.6 \pm 2.1	23.6 \pm 3.1	1.50 \pm 0.28	30.2
MF13+ MMC	2+2	ip	7	7	19.0 \pm 2.8	21.6 \pm 3.7	0.70 \pm 0.35**	67.4
MF13+ VCR	2+0.3	ip	7	7	20.4 \pm 1.6	24.8 \pm 1.0	1.85 \pm 0.77	14.0

研究所用的 VCR 的剂量 ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip) 已接近其毒性剂量^[16], 却未能显示很好的疗效可能与用药间隔时间长有关 (VCR 多数采用每天或每 3 天给药的方式)。

讨论

大多数转移性癌症的 5 年生存率仍然相当低, 开发新的抗癌药物既价格昂贵又非常耗时^[6]。因此, 以提高疗效和减轻经济负担为目标的方法被认为是一

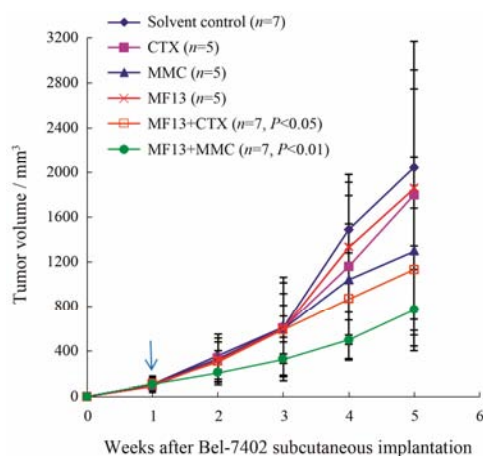


Figure 6 Growth inhibition of Bel-7402 tumor by MF13 and its combination with other anti-cancer drugs in nude mice. Tumor tissue (4 mm^3) was subcutaneously implanted on the right backs of the nude mice. Seven days later, the mice with visible tumor mass at the average volume of 100 mm^3 , were randomly distributed into cages with 5 or 7 mice per group. Treatments (MF13 was initiated with $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip; VCR $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip; MMC $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip; CTX $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) were started on day 7, and continued with other 4 ip injections at 7-day intervals at the same dose, with exception of MF13 which was continued at $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The tumor volume was measured every week and the experiments were terminated when the average tumor size of the solvent control group was over 2000 mm^3 . Each point represents the mean of the tumor volume and the SD error bars. Statistics was done between treatment groups and the solvent group

种可行的新策略, 其中的方法之一就是联合用药^[6]。由于联合用药时, 使用的药物之一已被 FDA 批准, 这样使得治疗的总体成本降低, 弥补“医疗不足”的缺陷^[6]。

氮芥类烷化剂是临床上使用的一类重要的抗肿瘤药物。早期的氮芥类烷化剂选择性差、治疗指数低, 并有潜在的致癌危险, 因此在应用上有所限制。由于肿瘤细胞进行蛋白质合成时需要大量的氨基酸, 以氨基酸或小分子肽做载体可提高药物对肿瘤细胞的靶向性, 又由于小分子肽易合成, 便于确定对靶器官或肿瘤细胞的靶向作用, 因此研究以肽为载体的抗肿瘤药物是一种可行的方案^[17, 18]。蒋建东研究组曾设计了各种不同三肽载体, 在上述理论上, 还主要考虑了以下几个可能性^[8, 9]: ① 所选连接肽通过蛋白质间的相互作用, 可克服多药耐药性, 从而增加肿瘤细胞对药物的敏感性; ② 所选连接肽能靶向关键的生物大分子 (如癌基因和酶等), 可提高药物治疗的针对性; ③ 所选连接肽可与 DNA 分子的小沟结合, 进一步增强药物与 DNA 的结合能力, 增加药物的细胞毒作用。在大量以不同三肽为载体的 m-SL 新衍生物中, MF13 是一个具有高抗癌活性的化合物。以往

的研究表明, MF13 分子中的三肽能将药物很好地靶向向肿瘤组织, 用正缬氨酸代替缬氨酸, 使药物的疏水性增加, 可降低体内的酶对药物的降解作用, 从而使 MF13 具有毒性小和化学稳定等优势^[8]。

MF13 单药给药在体外对所测定的 7 株不同来源的人肝癌细胞系均有较强的抗增殖活性, IC_{50} 值在 $0.32 \sim 2.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, IC_{90} 值在 $3.84 \sim 29.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间^[7-9]。MF13 可引起肝癌细胞选择性凋亡^[7-9], MF13 通过磷酸化 pRb 蛋白将肝癌细胞阻断在 S 期; MF13 虽未诱导 Bcl-2 发生磷酸化, 也未影响 Bcl-2 的蛋白表达量, 但 MF13 使 Bax 的蛋白表达量上调, Bcl-2/Bax 的比例下降, 使细胞趋向凋亡^[7-9]。此外, 研究表明 MF13 既能活化上游的 caspase-8 和 caspase-9, 又能活化下游的 caspase-3, 使 DFF45 由 45 kDa 的完整分子降解为 31 kDa 的片段。说明 MF13 诱导的凋亡信号传导通路启动了 caspase-3 途径^[7-9]。

MF13 在动物体内也同样显示了较强的抗肝癌作用, 并且疗效与剂量呈正相关^[7-9]。 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MF13 ($17.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对 BALB/c 裸鼠异种移植人肝癌 Bel-7402 和 HepG2 实体瘤的抑瘤率分别为 83% ($P < 0.01$) 和 94% ($P < 0.001$), MF13 对肝癌治疗效果优于 MMC ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 5.98 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及前体化合物 m-SL (MF13 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = \text{m-SL } 2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 8.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$), 而与 CTX ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 383 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相当^[7-9]。体内作用机制的研究结果显示, MF13 不仅能抑制肝癌细胞生长, 而且通过诱导细胞凋亡而发挥抗肝癌作用, 与体外实验结果一致。以前的 MF13 单药给药的研究结果提示 MF13 是一个有潜在应用前景的抗肝癌化合物, 而它与其他药物联合使用时的疗效如何有待进一步深入研究。

将细胞周期作用时相不同、作用机制不同或药物毒性不相互重叠的药物合理的联合使用时, 有可能达到既增效又减毒, 或减毒而不减效, 或增效而不增毒的目的。为了研究 MF13 与其他药物联合应用的效果, 本研究选用的药物有同为氮芥类烷化剂的 CTX、抗生素类烷化剂 MMC、植物来源的 G₂/M 期特异性抗肿瘤药 VCR。在体外细胞实验中没有考证 CTX 单药给药或联合给药的作用, 是 CTX 本身不具备细胞毒活性, 进入体内后先在肝脏中经肝微粒体功能氧化酶转化成醛磷酰胺。而醛磷酰胺不稳定, 在肿瘤细胞内分解成酰胺氮芥及丙烯醛, 酰胺氮芥对肿瘤细胞有细胞毒作用。但在动物体内实验中, 考查了 CTX 的抗肝癌作用。由于联合化疗时, 不仅药物的剂量和给药方法会影响疗效, 而且药物的给药顺序和给药

方案也会产生重要的影响,因此在本研究的联合化疗中,统一采用两药同时给药的方式进行深入研究。

烷化剂通常被认为是周期非特异性药物,因多核苷酸最易受到烷化,所以烷化剂对处于 G₁ 期后期及 S 期的细胞的作用最为明显,并能影响 S 期向 G₂ 期过渡^[19]。流式细胞仪检测结果显示, MF13 或 MMC 单药给药时将细胞主要阻断在 G₁/S 期,二者联用时对 S 期的阻断作用进一步增强,可能是这种烷化作用的一种体现,两药联用时使 DNA 损伤的强度增强,发挥对 S 期细胞的集中抑制。体内外肿瘤抑制实验结果一致显示, MF13 与 MMC 或 CTX (因为 CTX 是前药,所以没有进行体外实验) 联合使用时有协同的抗肝癌疗效,提示了对 S 期有阻断作用的药物与 MF13 联用时可能均有协同作用。流式细胞仪检测结果还表明, MF13 与 VCR 联用对细胞周期双阻断,体内外实验结果一致表明 MF13 与 VCR 联用时没有协同作用。与之相似, S 期敏感药物 5-氟尿嘧啶^[20]或顺铂^[21]与 G₂/M 期抑制剂紫杉醇联用时疗效降低,而且疗效降低与 5-氟尿嘧啶或顺铂可抑制紫杉醇所诱导的 G₂/M 期阻滞和细胞凋亡有关。虽然同时给药 MF13 与 VCR 联合化疗不产生协同作用,但不排除序贯给药时联合化疗疗效可能增加的可能性。若选用 12~24 h 之间的某一时间点,在此之前先给 VCR,此后再给 MF13,那么在 VCR 有效浓度降低时,大量的未被杀伤的堆积在 G₂/M 期细胞几乎可同步化地进入 S 期而被 MF13 杀伤。类似实验显示先给长春碱, 16 h 后再给阿糖胞苷,可出现明显的增效效果;而同时给药则疗效降低;先给长春碱 6、8 和 24 h 后再给阿糖胞苷,增效的程度也都不及 16 h 后再给药^[22]。这些研究结果均说明了联合化疗时,给药顺序是一个重要的考虑内容。

值得一提的是,来源于中国肝癌患者的 Bel-7402 细胞,对临床化疗一线药物多柔比星具有先天耐药性^[20, 23],然而体内外研究一致显示,它对 MF13 有较强的敏感性,并且 MF13 与 MMC 或 CTX 联合使用时,对 Bel-7402 实体瘤的疗效增加,预示了 MF13 有联合用药的临床应用价值。本研究结果表明,无论单药给药还是联合化疗, MF13 都显示了潜在的抗肝癌应用前景,其联合化疗的作用机制正进行深入研究。

References

- [1] Faloppi L, Scartozzi M, Maccaroni E, et al. Evolving strategies for the treatment of hepatocellular carcinoma: from clinical-guided to molecularly-tailored therapeutic options [J]. *Cancer Treat Rev*, 2011, 37: 169–177.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115–132.
- [3] Hu QY, Jiang JD. New molecular targets for human hepatocellular carcinoma treatment and related drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2005, 21: 2–6.
- [4] Liu L, Zheng YH, Han L, et al. Efficacy and safety of the oxaliplatin-based chemotherapy in the treatment of advanced primary hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of prospective studies [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95: e4993.
- [5] Chan SL, Yeo W. Development of systemic therapy for hepatocellular carcinoma at 2013: updates and insights [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 3135–3145.
- [6] Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer [J]. *Oncotarget*, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16723.
- [7] Hu QY, Li JN, Song DQ, et al. Inhibition of human hepatocellular carcinoma by *L*-proline-*m*-bis (2-chloroethyl) amino-*L*-phenylalanyl-*L*-norvaline ethyl ester hydrochloride (MF13) *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25: 1289–1296.
- [8] Jiang JD, Zhang H, Li JN, et al. High anticancer efficacy of *L*-proline-*m*-bis (2-chloroethyl) amino-*L*-phenylalanyl-*L*-norvaline ethyl ester hydrochloride (MF13) *in vivo* [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21: 1681–1689.
- [9] Roboz J, Jiang J, Holland JF, et al. Selective tumor apoptosis by MF13, *L*-prolyl-*L*-*m*-[bis(chloroethyl)amino]-phenylalanyl-*L*-norvaline ethyl ester, a new sarcocollin containing tripeptide [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 4795–4802.
- [10] Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay *versus* a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82: 1113–1118.
- [11] Guo J, Reidenberg MM. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase by bioflavonoids and their interaction with furosemide and gossypol [J]. *J Lab Clin Med*, 1998, 132: 32–38.
- [12] Hao JQ, Li Q, Xu SP, et al. Effect of lumiracoxib on proliferation and apoptosis of human nonsmall cell lung cancer cells *in vitro* [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121: 602–607.
- [13] Zhao Y, Gao JL, Ji JW, et al. Cytotoxicity enhancement in MDA-MB-231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang [J]. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2014, 3: 68–72.
- [14] Dolan ME, Fleig MJ, Feuerstein BG, et al. Effect of 1,19-bis(ethylamino)-5,10,15-triazanonadecane on human tumor

- xenografts [J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 4698–4702.
- [15] Yagi MJ, Bekesi JG. Evaluation of *p*-F-Phe-*m*-bis-(2-chloroethyl)amino-*L*-Phe-Met-ethoxy HCl against transplantable and spontaneous murine neoplasia [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1990, 26: 215–220.
- [16] Ogawa T, Mimura Y, Isowa K, et al. An antimicrotubule agent, TZT-1027, does not induce neuropathologic alterations which are detected after administration of vincristine or paclitaxel in animal models [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 121: 97–106.
- [17] Barinaga M. Peptide-guided cancer drugs show promise in mice [J]. *Science*, 1998, 279: 323–324
- [18] Unger C. Current concepts of treatment in medical oncology: new anticancer drugs [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122: 189–198.
- [19] Judson PL, Watson JM, Gehrig PA, et al. Cisplatin inhibits paclitaxel-induced apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: possible explanation for failure of combination therapy [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 2425–2432.
- [20] Huang M, Liu G. The study of innate drug resistance of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line [J]. *Cancer Lett*, 1999, 135: 97–105.
- [21] Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR, et al. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 7024–7029.
- [22] Zhang Xunmu. *Pharmacology and Clinical Application of Antitumor Drugs (抗肿瘤药物的药理与临床应用)* [M]. Zhengzhou: Henan Medical University Press, 1999: 36–40.
- [23] Cheng RM, Zhu DH, Ye XZ, et al. Establishment and some biological characteristics of human hepatocellular cell line Bel-7402 [J]. *Acta Biol Exp Sin (实验生物学报)*, 1978, 11: 37–45.