

## THE MECHANISMS OF NEGATIVE INOTROPIC EFFECT OF INTERLEUKIN-2 ON CARDIOMYOCYTES

CAO Chun Mei XIA Qiang ZHANG Xiong ZHANG Wei CHEN Jun Zhu

(Zhejiang University School of Medicine Hangzhou 310031 China)

**ABSTRACT** In the present study, we investigated the effect of interleukin-2 (IL-2) on the sarcolemmal calcium channel and intracellular pH (pH<sub>i</sub>) in enzymatically isolated ventricular myocytes with whole cell patch clamp and spectrofluorometry techniques. Fura-2/AM and BCECF/AM were used as the intracellular calcium and hydrogen probe, respectively. It was shown that IL-2 (2.5 - 200 U/ml) decreased the amplitude of electrically induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients of ventricular myocytes in a dose-dependent manner and increased the end-diastolic calcium level. Pretreatment with a specific  $\kappa$ -opioid antagonist nor-BNI (10 nmol/L) abolished the effect of IL-2 (200 U/ml) on the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in cardiomyocytes. Perfusion with IL-2 had no significant effect on whole cell L-type calcium current of cardiomyocytes. We also found that pretreatment with IL-2 did not elicit the significant alteration in the initial rate of Mn<sup>2+</sup> quench activated by electrical stimulation. IL-2 decreased the intracellular pH (pH<sub>i</sub>) of cardiomyocytes, which could be attenuated by nor-BNI. It is concluded that the decrease of pH<sub>i</sub> induced by IL-2 may be one of the mechanisms of negative inotropic effect of IL-2, in which L-type Ca<sup>2+</sup> channel of ventricular myocytes was not involved. The cardiac effect of IL-2 is mainly mediated by cardiac  $\kappa$ -opioid receptors.

**Key words:** Interleukin-2 Ventricular myocytes Calcium channel Intracellular pH  
Intracellular calcium

## 阿克拉霉素对顺铂和足叶乙甙杀伤卵巢癌细胞的影响

阴梅云 郑力芬 韩 硕 阎蕴力

(河北医科大学细胞生物研究室 石家庄 050017)

**摘 要** 有效化疗药物的选择对于提高卵巢癌的治疗效果至关重要。本文应用 MTT 法, 分别测定了阿克拉霉素 (Aclarubicin, ACR) 血浆峰浓度与不同浓度顺铂 (Cisplatin, CDDP) 或足叶乙甙 (Etoposide, VP-16) 合用对 SKOV3 卵巢癌细胞 24h 的抑制率, 并分析药物合并效应。采用荧光染色观察细胞凋亡; 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 断裂; 并用 western 印迹检测 TopoII 表达与药物作用之关系。结果表明, ACR 对 VP-16 具有拮抗作用; 与药物单用相比, 二者合用后使细胞凋亡率减少、DNA 断裂减少, 拓扑异构酶 II 表达增强。CDDP 单用可以促进 TopoII 表达。ACR 与 CDDP 合用对卵巢癌细胞的抑制具有协同效果; 表现为细胞凋亡率增加、DNA 断裂增加, TopoII 表达降低, 尤其对 TopoII $\beta$  表达的抑制作用明显。因此认为: ACR 与 CDDP 合用能够提高对卵巢癌细胞的抑制效果, TopoII 是其重要的作用靶点。该结果对于临床治疗具有一定的参考意义。

**关键词:** 卵巢癌 阿克拉霉素 顺铂 足叶乙甙 DNA 拓扑异构酶 II

临床资料表明, 卵巢癌往往发现较晚, 确诊时以中、晚期患者多见。化疗仍是目前常用的有效治疗方法。但化疗后尚有 40% - 60% 病人复发, 常需要二线化疗<sup>[1,2]</sup>。因此, 高效抗癌药物的研制和应用, 以及选择更有效的化疗方案, 是提高卵巢癌疗效的重要措施。

在临床诸多的抗癌药物中, 以拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, TopoII) 为作用靶点的化疗药物含量众多。其中包括能够稳定 DNA-TopoII 断裂复

合体, 造成 DNA 断裂, 导致细胞死亡的 TopoII 毒性抑制剂类药物, 如足叶乙甙 (Etoposide, VP-16)、替尼泊甙 (Teniposide, VM-26)、阿霉素 (adriamycin, ADM) 等。该类制剂临床应用已有较长历史, 其作用特点和疗效相对比较明确。而另一类主要影响 TopoII 催化作用的药物被称为 TopoII 催化抑制剂, 如 ACR、美巴龙 (Merbarone)、ACRF-187 等。此类

本文 2002 年 10 月 17 日收到, 11 月 18 日接受。  
E-mail: yanyl@hebm. edu. cn

药物目前大多处于研究阶段,尚未广泛应用于临床治疗。其中,ACR于90年代中期在我国进入临床,并逐渐广泛的应用于白血病和实体瘤的治疗中。目前,ACR在卵巢癌的治疗中使用较少,并且与其他抗癌药物合并应用时相互作用机理尚不明确。

在诸多卵巢癌化疗方案中,CDDP和VP-16是常用药物,临床应用普遍。但相关的抗药性问题也越来越受到关注。因此,选择能有效与之配伍的药物是临床探索的问题之一。至今,ACR与CDDP或VP-16合用于卵巢癌治疗的报道较少。为此,本研究通过对ACR与CDDP以及ACR当VP-16联合用药的体外实验,旨在探讨卵巢癌化疗药物的组合,为筛选有效抗肿瘤药物提供理论依据。

## 材料和方法

### 1. 材料

1) 细胞株 卵巢浆液性囊腺癌细胞株(SKOV3)引自北京大学人民医院。

2) 药物 ACR为深圳万乐药业有限公司产品;CDDP为昆明三戒金属药业有限公司产品;VP-16为北京双鹤现代医药技术公司产品。

3) 试剂 免疫组化试剂,一抗为鼠抗人TopoII抗体(Sandacruz公司,美国),HRP标记的生物素化二抗购自武汉博海生物公司。RPMI-1640培养基(GIBCO,美国)、MTT、RNA酶、蛋白酶K、中分子量蛋白标准、吖啶橙、溴乙锭购自华美公司。新生牛血清为本室分离。

4) 主要仪器 荧光显微镜(Olympus,日本),倒置显微镜(Olympus,日本)。CO<sub>2</sub>培养箱(Hitachi,日本),DG-3201型酶标仪(南京华东电子管厂),LXJ-II型离心机(上海医用分析仪器厂)。电泳仪、转移电泳仪、半干式转移仪、紫外透射仪为BioRad公司产品。

### 2. 方法

1) 细胞培养 SKOV3细胞以RPMI-1640培养基培养,内含10%新生牛血清、青霉素100U/ml、链霉素100μg/ml。置37℃、5%CO<sub>2</sub>环境下培养。

2) MTT法检测药物对卵巢癌细胞抑制作用

(1) 药物浓度选择、实验分组 参考药物的血浆峰(PSC)浓度,其中ACR为6μg/ml;CDDP为3μg/ml;VP-16为5μg/ml,进行实验分组。将ACR的PSC浓度分别与CDDP和VP-16的1/10PSC浓度、PSC浓度、10xPSC浓度合用,观察ACR对CDDP及VP-16的影响。同时设对照样品。

(2) MTT检测及结果分析 取对数生长期细胞,经0.04%EDTA消化后,加入培养液吹打混匀,以 $1 \times 10^5$ /ml细胞浓度接种于96孔培养板,每孔加入100μl细胞悬液。24h后加入经无血清培养液稀释的药物10μl,不同药物及浓度均为3复孔。药物与细胞共同培养至24h,每孔加入5mg/ml MTT 20μl。继续孵育4小时后,离心吸去上清,加入200μl

孔DMSO终止反应。用酶标仪测570nm波长吸光值(A值)。根据公式:对照孔A值-用药孔A值/对照空A值×100%,计算抑制率。按金氏公式<sup>[3]</sup>分析ACR与CDDP及VP-16合用对卵巢癌细胞抑制效应。本实验重复3次。

3) 双荧光染色观察凋亡细胞 实验分组如上。将细胞与药物共同作用24h后,经1500rpm/min离心5分钟,悬浮于磷酸缓冲液中。按文献<sup>[4]</sup>方法配制吖啶橙(AO)和溴乙锭(EB)各为0.05mg/ml的混合染液。加荧光染液于细胞悬液内,吹打混匀、滴至载玻片上,置荧光显微镜下观察,并定量计数10个视野共1000个细胞。按公式:凋亡细胞数/总细胞数×100%,计算凋亡率,用t检验分析实验结果。

4) DNA提取及电泳 实验组将ACR的PSC浓度分别与CDDP的PSC浓度,以及VP-16的PSC浓度、10×PSC浓度分别与细胞共同孵育24h。离心收集细胞,加入细胞裂解液(10mmol/L Tris-HCl pH8.0,150mmol/L NaCl,10mmol/L EDTA,1%SDS)4℃裂解20min。经RNA酶(50μg/ml)37℃1h,蛋白酶K50℃3h。以酚-氯仿法抽提DNA,3mol/L乙酸钠、无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤后凉干。沉淀溶于20μl TE溶液(Tris、Cl-EDTA),行1.5%琼脂糖凝胶电泳。经0.5mg/ml EB染色后,紫外透射仪观察、照相。

5) western印迹分析 药物处理与以上DNA提取样品相同。各组细胞经消化、PBS洗涤,加入200μl预冷细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl pH7.6,150mmol/L NaCl,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,1mmol/L EDTA,2μg/ml LEUPTIN,1mmol/L PMSF),4℃裂解40min。测定蛋白浓度。10μg样品加入等量上样缓冲液,经10%SDS-PAGE电泳后,用半干式电转移仪转至硝酸纤维素膜上。经5%BSA,37℃封闭1h,加入一抗鼠抗人Topo II 4℃孵育过夜。羊抗鼠HRP标记二抗,37℃孵育1h。DAB显色后分析结果。

## 结果

### 1. MTT检测结果

将药物与细胞共同作用后,检测对卵巢癌细胞生长的抑制率。所得实验数据用金氏公式: $Q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea \cdot Eb)$ 判断两药的合并用药效应。公式中的Ea代表ACR的抑制率、Eb代表CDDP的抑制率。式中的分子Ea + b为两药联合应用的抑制率,即实测合并效应;分母Ea + Eb - Ea·Eb为期望合并效应;Q为两者相比。Q值在0.85 - 1.15时,两药合并效应为相加(+),Q值>1.15 - 20为增强(++),>20为明显增强(+++)。Q值<0.85 - 0.05为拮抗(-),<0.05为明显拮抗(-)。实验结果见表1。

分组实验显示:ACR的PSC浓度与CDDP各浓度合用,两药具有明显的协同作用,并且协同作用随CDDP浓度增加而增强。ACR与VP-16各浓度合用,则两药之间有拮抗作用。

表1 MTT测定ACR与CDDP及VP-16合用对卵巢癌细胞的抑制作用( $\bar{X} \pm S, n=9$ )

药物 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CDDP和VP-16浓度( $\mu\text{g/ml}$ )及抑制率(%)							
	CDDP(0)	CDDP(0.3)	CDDP(3)	CDDP(30)	VP-16(0)	VP-16(0.5)	VP-16(5)	VP-16(50)
ACR(0)	0	6.20 $\pm$ 3.2	23.5 $\pm$ 1.2	56.3 $\pm$ 2.2	0	15.2 $\pm$ 3.2	26.1 $\pm$ 4.2	66.2 $\pm$ 2.5
ACR(6)	12.5 $\pm$ 1.2	18.5 $\pm$ 4.3	35.7 $\pm$ 5.1	78.2 $\pm$ 4.0	12.5 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 1.2	17.4 $\pm$ 1.2	22.8 $\pm$ 5.2
Q值(判断)		1.03(+)	1.07(+)	1.27(++)		0.24(-)	0.49(-)	0.32(-)

2. 双荧光染色观察结果

为进一步了解ACR对CDDP对卵巢癌细胞的杀伤作用,用药物与细胞共同作用后,行双荧光凋亡检测。观察可见,活细胞被AO染成绿色,凋亡细胞被EB染为橘红色。分别计算各组细胞凋亡率,进

行统计检验。结果表明,ACR和CDDP合用与药物单用相比,细胞凋亡率明显增加。与此相反,观察ACR对VP-16的影响,可见两药合用与药物单用相比,细胞凋亡率显著减少。实验结果见表2。

表2 荧光染色观察ACR与CDDP及VP-16合用对细胞凋亡率的影响( $\bar{X} \pm S, n=6$ )

药物 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CDDP和VP-16浓度( $\mu\text{g/ml}$ )及细胞凋亡率(%) <sup>*</sup>							
	CDDP(0)	CDDP(0.3)	CDDP(3)	CDDP(30)	VP-16(0)	VP-16(0.5)	VP-16(5)	VP-16(50)
ACR(0)	6.2 $\pm$ 3.2	18.5 $\pm$ 2.0	36.4 $\pm$ 3.6	62.5 $\pm$ 4.2	6.2 $\pm$ 3.2	12.5 $\pm$ 6.2	23.5 $\pm$ 6.6	55.1 $\pm$ 3.0
ACR(6)	22.3 $\pm$ 3.4	35.5 $\pm$ 5.2	48.2 $\pm$ 6.2	76.3 $\pm$ 4.4	22.3 $\pm$ 3.4	8.5 $\pm$ 2.3	14.7 $\pm$ 4.8	32.9 $\pm$ 6.1
t检验 <sup>*</sup>		P<0.01	P<0.01	P<0.01		P<0.01	P<0.01	P<0.01

表2注:<sup>\*</sup>表示P值为药物合用与CDDP或VP-16单用相比

3. DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果

观察药物作用后对细胞DNA断裂的影响,经琼脂糖凝胶电泳显示(图1);ACR 6 $\mu\text{g/ml}$ 单独作用(图1,条带2),及5 $\mu\text{g/ml}$  VP-16(图1,条带3)、50 $\mu\text{g/ml}$  VP-16(图1,条带4)单独用药均可引起DNA断裂,其中后两者造成DNA断裂更为明显。将6 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的ACR分别与5 $\mu\text{g/ml}$  VP-16(图1,条带5)和50 $\mu\text{g/ml}$  VP-16(图1,条带6)共同作用,并与VP-16单用相比,可见DNA断裂减少。但将相同浓度的ACR和3 $\mu\text{g/ml}$  CDDP合用(图1,条带8)与CDDP单用(图1,条带7)相比,可见对细胞DNA损伤增加,并断裂成小分子片段。

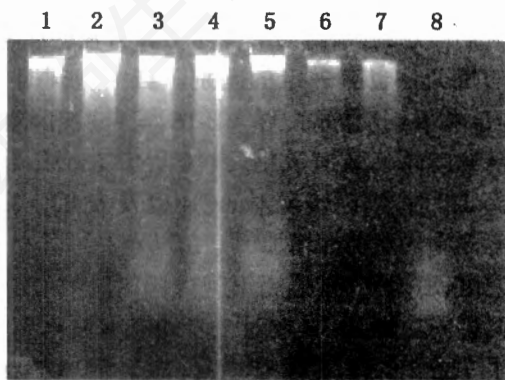


图1 琼脂糖凝胶电泳显示药物对细胞DNA断裂的影响  
注:条带1.对照,2.ACR(6),3.VP-16(5),4.VP-16(50),5.ACR(6)+VP-16(5),6.ACR(6)+VP-16(50),7.CDDP(3),8.ACR(6)+CDDP(3),括号内数字表示药物浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

4. Western印迹分析TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达

western印迹分析表明:SKOV3卵巢癌细胞表达有TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 两种同功酶(图2),经与蛋白分子量条带对比,前者分子量约为170kD,后者为180kD。

观察药物单独应用对SKOV3细胞内TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达的影响,可见细胞经ACR单独作用后,能够同时抑制TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 的表达,并对TopoII $\beta$ 的抑制作用更强(图2,条带2)。细胞经VP-16单独作用后能够同时抑制TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ ,药物对二者没有明显的选择性(图2,条带3、4)。细胞单独经CDDP作用后TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达均明显增加(图2,条带7)。

观察药物合用对TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达的影响,可见ACR与VP-16合用后,对TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达的抑制效应减少(图2,条带5、6)。同时,ACR与CDDP合用可明显减少TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 的表达,其中对TopoII $\beta$ 表达的抑制效应更为显著(图2,条带8)。

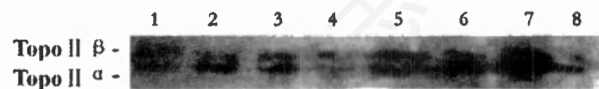


图2 药物对TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达的影响  
1.对照,2.ACR(6),3.VP-16(5),4.VP-16(50),5.ACR(6)+VP-16(5),6.ACR(6)+VP-16(50),7.CDDP(3),8.ACR(6)+CDDP(3),括号内数字表示药物浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

## 讨 论

### 1. ACR对VP-16杀伤卵巢癌细胞的影响

ACR和VP-16同为TopoII抑制剂,但药物的作用原理有明显差别。ACR能够抑制TopoII与DNA的结合,干扰TopoII催化周期反应,但并不直接导致DNA断裂。ACR引起的DNA损伤是细胞凋亡或死亡的结果。VP-16则通过稳定TopoII-DNA断裂复合物,以DNA断裂为明显特征。VP-16造成的DNA断裂是细胞凋亡或死亡的主要原因。有资料表明,ACR能够干扰VP-16对白血病细胞的抑制作用,原因在于ACR通过抑制TopoII与DNA的结合,使VP-16失去了药物作用靶点,导致对细胞DNA断裂减少,细胞凋亡率下降<sup>[5,6]</sup>。

本研究将ACR与VP-16合用,观察对卵巢癌细胞的杀伤作用。研究表明,与药物单用相比,细胞的抑制率和凋亡率有明显下降,受试细胞DNA断裂减少,TopoII表达增强。实验结果说明:ACR对VP-16产生的拮抗作用,不单局限在白血病细胞,同时也表现在卵巢癌等实体瘤细胞方面。对此,尽管体外结果与体内反应会有差别<sup>[7]</sup>,但应给予充分重视和进一步研究。

### 2. ACR对CDDP杀伤卵巢癌细胞的影响

铂类化合物CDDP可与DNA产生链内和链外交联,破坏DNA完整性,导致DNA断裂,阻止DNA复制。虽不属于TopoII抑制剂范畴,但长期研究表明,CDDP与TopoII之间也有广泛联系。研究发现:对CDDP耐药的卵巢癌细胞内TopoII含量和活性明显增高。并认为这一现象可能于药物作用后启动了DNA修复机制有关<sup>[8-10]</sup>。最近研究证明:卵巢癌细胞内TopoII含量与TopoII抑制剂的敏感程度成正比<sup>[11,12]</sup>。因此,关注TopoII抑制剂与CDDP合用的研究,对于提高卵巢癌的疗效、寻找解决CDDP耐药措施方面具有重要意义。对此,本实验注意到,细胞单独经CDDP作用后可以促进TopoII的表达。作为参与DNA修复的重要蛋白质之一,TopoII表达增加可能是细胞一个主动的代偿性过程。这一结果也为TopoII抑制剂提供适宜的作用环境,使细胞对药物的敏感性增加,提示:ACR与CDDP配伍应用比单用CDDP的效果更好。

临床应用方面,Chen等(1989,1990)曾报道:将ACR和CDDP合用治疗数例卵巢癌患者,其中包括既往有CDDP用药史的患者。结果表明,临床有效率高,且毒副反应小<sup>[13,14]</sup>。另外,ACR与秋水酰胺、

丝裂霉素联合应用时,对CDDP耐药的卵巢癌显示有较好的疗效<sup>[15]</sup>。但ACR至今临床尚未广泛应用,且与CDDP合用的抗癌机理尚缺乏了解。

ACR作用特点是:体内代谢较快、无蓄积性、毒副反应小、心脏毒性小,无致突变性、能够强力诱导肿瘤细胞分化成熟等。CDDP主要特点是:疗效比较确切,价格相对低廉,但也可引进肾脏损害、骨髓抑制、消化道反应等诸多较严重的毒副反应。另外,由于CDDP的广泛应用,不可避免的带来抗药性问题。本实验显示:ACR与CDDP合用可以增强药物的敏感性,这或许可以减少CDDP用量、降低CDDP的毒性,并对CDDP不敏感患者也可以提高疗效。

### 3. TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 表达在卵巢癌治疗中的意义

人类的TopoII有两种同工酶,分别为TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ ,基因分别定位于17号和3号染色体上,分子量分别为170kD和180kD。研究表明:卵巢癌细胞内TopoII,尤其是TopoII $\alpha$ 的表达对于TopoII抑制剂的敏感性至关重要。药物作用后引起的TopoII含量或活性降低、基因变异以及在细胞内分布的改变,均是对TopoII抑制剂产生耐药的原因<sup>[12,16,17]</sup>。

肿瘤组织对TopoII抑制剂的敏感性方面存在一定的差别。一般来说,抑制TopoII $\alpha$ 药物也能抑制TopoII $\beta$ ,药物的作用机制也较为一致。但多数药物,尤其是非DNA嵌人类药物,如VP-16、VM-26等对TopoII $\alpha$ 敏感程度更高一些<sup>[18]</sup>。对TopoII $\beta$ 敏感的药物以DNA嵌人类药物居多,其中包括ACR以及米托蒽醌(Mitoxantrone)、多柔比星(Doxorubicin)等<sup>[19]</sup>。

人们注意到,细胞内两种同工酶的表达不同,对药物的抗药性也有一定的差别。当细胞同时含有TopoII $\alpha$ 和 $\beta$ 同工酶时,对VP-16、安吡啶和米托蒽醌等药物的杀伤效应敏感;当仅含有TopoII $\alpha$ 而缺少TopoII $\beta$ 时,细胞表现对ACR以及安吡啶、米托蒽醌等药物的耐药性增加<sup>[20]</sup>。

总之,SKOV3卵巢癌细胞内同时具有TopoII $\alpha$ 和 $\beta$ 两种同工酶,ACR在对二者均有抑制作用的同时,对TopoII $\beta$ 作用强于TopoII $\alpha$ 。而VP-16在TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 之间没有明显的选择作用。CDDP与ACR共同应用时,能够同时抑制TopoII $\alpha$ 和TopoII $\beta$ 的表达,但抑制TopoII $\beta$ 成分更强一些。实验说明,不同类型的TopoII抑制剂在同工酶 $\alpha$ 和 $\beta$ 之间确有选择性。因此,在肿瘤治疗过程中,关注

药物对癌细胞 TopoII $\alpha$  和 TopoII $\beta$  的影响,能够指导药物选择,对于提高肿瘤的治疗效果具有较重要的参考意义。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] du Bois A, Luck HJ, Pfisterer J, et al. ,2000, *Zentralbl Gynakol.* ,**122**:255 - 267.
- [ 2 ] 蔡树模,1997,实用妇产科杂志,**13**:178 - 181.
- [ 3 ] 金正均,1980,中国药理学报,**1**:70 - 76.
- [ 4 ] Wang CY, Eshleman JR, Willson JK, et al. ,1995, *Cancer Res.* ,**55**:5101 - 5105.
- [ 5 ] Nagata T, Higashigawa M, Shimono Y, et al. , 1998, *Exp. Clin. Cancer Res.* ,**17**(4):435 - 442.
- [ 6 ] Salti GI, Das Gupta TK, Constantinou AI. 2000, *Anti-cancer Res.* ,**20**(5A):3189 - 3193.
- [ 7 ] Kern W, Braess J, Grote - Metke A, et al. , 1998, *Leukemia.* ,**12**(10):1522 - 1526.
- [ 8 ] Minagawa Y, Kigawa J, Irie T, et al. , 1997, *Jpn J Cancer Res.* ,**88**(12):1218 - 1223.
- [ 9 ] Eder JP Jr, Chan VT, Ng SW, et al. , 1995, *Cancer Res.* ,**55**(24):6109 - 6116.
- [10] Barret JM, Calsou P, Larsen AK, et al. , 1994, *Mol. Pharmacol.* ,**46**(3):431 - 436.
- [11] Koshiyama M, Fujii H, Kinezaki M, et al. , 2001, *Anti-cancer Res.* ,**21**(2A):905 - 910.
- [12] Koshiyama M, Fujii H, Kinezaki M, et al. , 2001, *Anti-cancer Res.* ,**21**(4B):2925 - 2932.
- [13] Chen JT, Hirai Y, Nakayama K, et al. , 1989, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* ,**41**:1565 - 1570.
- [14] Chen JT, Hirai Y, Shimizu Y, et al. , 1990, *Gynecol Oncol.* ,**38**(1):1 - 5.
- [15] 汤洁、蔡树模、范建玄, 1999, 中国癌症杂志, **9**: 189 - 191.
- [16] Gotlieb WH, Goldberg I, Weisz B, et al. , 2001, *Gynecol Oncol.* ,**82**(1):99 - 104.
- [17] Costa MJ, Hansen CL, Holden JA, et al. , 2000, *Int J Gynecol Pathol.* ,**19**(3):248 - 257.
- [18] Sabourin M and Osheroff N. , 2000, *Nucleic Acids Research.* ,**28**:1947 - 1954.
- [19] Perrin D, van Hille B, Hill BT. , 1998, *Biochem Pharmacol.* ,**56**(4):503 - 507.
- [20] Errington FE, Willmore M J, Tilby L, et al. , 1999, *Mol. Pharmacol.* ,**56**:1309 - 1316.

## THE EFFECTS OF ACLARUBICIN ON CISPLATIN AND ETOPOSIDE KILLING OF OVARIAN CANCER CELLS

YIN Mei Yun ZHENG Li Fen HAN Shuo YAN Yun Li

(Cell Biology Division, Insititute Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**ABSTRACT** For investigating the effects of aclarubicin(ACR)on cisplatin(CDDP)and etoposide(VP-16) killing of ovarian cancer cells, the microculture tetrazolium (MTT) assay was used to determine the inhibition rates of ACR in peak serum concentration combined with different concentration of CDDP, or VP-16 on SK-OV3 cells, respectively. The combination efficiency of the drugs were analyzed by statistics from the MTT results. The methods of fluorescence stain to detect apoptosis, and agarose gel electrophoresis to reveal the cell DNA damage, and western blot to observe topoisomerase II(TopoII) expression of the cells incubated by the drugs were performed. It was noted that ACR have an antagonism effect on VP-16 inhibition of the cells. They could decrease the apoptosis rate and the level of DNA damage, and upraise the TopoII expression compared with each of the drugs used alone, at same time. It was showed that CDDP alone could increase the TopoII level. When ACR and CDDP used together, they could rise the apoptosis rate and the level of DNA damage, as well as could inhibit the TopoII expression which mainly affect the TopoII $\beta$  expression of the cells. In conclusion, the synergism efficiency was obtained for ACR combination with CDDP to inhibit the ovarian cancer cells, and the TopoII may be an important target for them.

**Key words:** Ovarian cancer cell Aaclarubicin; cisplation Etoposide TopoisomeraseII