

## 黄癸素对拓扑异构酶的影响及联合羟喜树碱的抗肿瘤作用

林 菁<sup>1\*</sup>, 王 希<sup>2</sup>

(福建医科大学 1. 药学院药理学系, 福建 福州 350004; 2. 附属口腔医院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 观察黄癸素联合应用羟喜树碱对肿瘤细胞的协同抑制作用, 并探讨黄癸素对拓扑异构酶的影响。采用 MTT 法检测黄癸素联合应用羟喜树碱对体外培养肿瘤细胞增殖的抑制作用, 计算 IC<sub>50</sub> 和联合指数 (CI 值) 判断药物协同作用效果; 通过琼脂糖凝胶电泳法测定黄癸素对 SW480 细胞 DNA 拓扑异构酶活性的影响。结果显示, 与两药单用比较, 黄癸素联用羟喜树碱对 SW480、SGC-7901、SW1116 细胞的抑制作用更显著, IC<sub>50</sub> 显著降低, 两药联用对各种人癌细胞株的 CI 值均小于 1, HepG2、SW480、SGC-7901、SW1116 细胞的 CI 值最低分别达 0.447、0.626、0.161 和 0.178, 表现为较显著的协同效果。琼脂糖凝胶电泳法结果显示, 经黄癸素 (2.0~8.0 mg·L<sup>-1</sup>) 处理的 SW480 细胞拓扑异构酶 I、II 的活性均有所降低。研究表明, 黄癸素可抑制拓扑异构酶的活性, 与典型的 Topo I 抑制剂羟喜树碱合用具有良好的协同抑制肿瘤细胞增殖作用, 该结果可能与两药在作用机制方面的协同有关。

**关键词:** 黄癸素; 羟喜树碱; 协同作用; 琼脂糖凝胶电泳; DNA 拓扑异构酶

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0390-05

## The synergistic antitumor effects of berberine $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -decanylethyl sulfonate with hydroxycamptothecine and its effect on topoisomerase

LIN Jing<sup>1\*</sup>, WANG Xi<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;

2. Affiliated Stomatological Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Synergistic antitumor effects of HB (berberine  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -decanylethyl sulfonate, houttuyn berberine) with HCPT (hydroxycamptothecine), and its correlative mechanism were studied *in vitro*. MTT assay was employed to determine the cytotoxicity of HB combined with HCPT in tumor cells culture *in vitro*, IC<sub>50</sub> and combination index (CI value) were used to evaluate the synergistic effects. The supercoiled DNA relaxation mediated by topoisomerase I & II was measured by agarose gel electrophoresis assay, and influence of HB was detected. The results showed that HB could inhibit the proliferation of tumor cells (SGC-7901, SW1116 and SW480) *in vitro*, and the inhibition ratio was increased, IC<sub>50</sub> was reduced when combining with HCPT. CI value of the two drugs was less than 1 in HepG2, SW480, SGC-7901 and SW1116 cells. The lowest value was 0.447, 0.626, 0.161 and 0.178 in these tumor cells, respectively, further indicating HB has synergistic action with HCPT on suppressing tumor proliferation. The agarose gel electrophoresis assay showed HB can inhibit topoisomerase I & II activity of SW480 cells at the concentration of 2.0–8.0 mg·L<sup>-1</sup>. HCPT is a typical inhibitor of topoisomerase I, the synergistic action between HCPT and HB on suppressing tumor proliferation is perhaps related to the congenerous inhibition of topoisomerase.

**Key words:** berberine  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -decanylethyl sulfonate; hydroxycamptothecine; synergistic effect; agarose gel electrophoresis; DNA topoisomerase

收稿日期: 2010-09-28.

基金项目: 福建省科技计划资助项目 (2005KD50).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-591-22862587, E-mail: yq509@163.com

黄葵素 ( $\alpha$ -羟基- $\beta$ -癸酰乙基磺酸小檗碱, berberine  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -decanoyl ethyl sulfonate, houttuyn berberine, HB) 系湖南省中医药研究院贾本真教授合成的小檗碱鱼腥草素离子对化合物 (专利号: 200510136655.2)<sup>[1]</sup>。黄葵素的先导化合物小檗碱已有研究证明其具有抑制多种肿瘤细胞生长、诱导分化和凋亡的作用<sup>[2-4]</sup>, 但由于难以通过口服给药发挥全身性作用, 成为阻碍该药扩大临床应用的瓶颈。黄葵素系新型小檗碱类化合物, 脂溶性较高, 本室的前期研究显示其同样具有显著的体内外抗肿瘤作用, 期望作为小檗碱的替代物发挥更好的临床效果。本文拟在单药疗效实验的基础上, 探讨黄葵素与羟喜树碱合用的协同作用, 并以 DNA 拓扑异构酶 I 和 II (Topo I、Topo II) 为靶点, 探讨相关作用机制, 为该类化合物作为新型的抗肿瘤药物进行深入的研究提供科学的实验依据和新的思路。

## 材料与方法

**供试品和试剂** 黄葵素为黄色粉末, 由湖南省中医药研究院贾本真教授提供 (纯度 98%), 用 2% 丙二醇配成  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的母液, 过滤除菌,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 用前以细胞培养液稀释, 供体外实验用。羟喜树碱 (HCPT) 购自李时珍药业, 批号 20081201。鬼臼乙叉苷 (VP-16) 由江苏恒瑞医药有限公司提供, 批号 09070831。RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基和胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); Tris、EDTA、NP40、ATP、DTT、BSA 及 MTT (上海生物工程有限公司); 亚精胺 (美国 Fluka 公司); pBR322 DNA (日本 Toyobo 公司); EGTA (美国 Amresco 公司); 琼脂糖凝胶 (美国 Sigma 公司)。

**细胞株** 人源性肝癌细胞 HepG2、胃癌细胞 SGC-7901、结肠癌细胞 SW480 和 SW1116 引自上海中国科学院细胞库, 由本实验室保种传代。SW480 细胞培养于 DMEM 培养基, 其他细胞株培养于 RPMI 1640 培养基, 培养液含 10% 新生牛血清、 $1\times 10^5 \text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$  青霉素、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  链霉素, 置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度培养, 以 0.25% 胰酶消化传代。

**主要仪器** 酶标仪 Microplate Reader 450, 美国 BIO-RAD 公司。电泳仪 DY CZ-24DN 型, 北京六一仪器厂。

**MTT 法检测黄葵素体外联合给药作用** 取对数生长期细胞, 制备成细胞数为  $6\times 10^4\sim 8\times 10^4/\text{mL}$  的单细胞悬液。细胞接种于 96 孔培养板, 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后加入以培养液稀释的

药物  $100 \mu\text{L}$ 。实验设空白对照、细胞对照、黄葵素和羟喜树碱不同浓度单药及联合用药组, 黄葵素浓度设  $1.875$ 、 $3.75$ 、 $7.50$  和  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 羟喜树碱浓度设  $6$ 、 $12$  和  $24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 两药各浓度交叉组合形成各联合用药组, 每组设 4 个平行孔。加药后继续培养 48 h, 实验结束前 4 h 每孔加入  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 溶液  $50 \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 小心吸弃培养液后, 每孔加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$  充分溶解 MTT 还原产物, 振荡器混匀后, 酶标仪测定  $A_{570}$ , 按公式计算抑制分数。抑制分数 (inhibition ratio) =  $1 - (\text{药物组 } A_{570} - \text{空白组 } A_{570}) / (\text{对照组 } A_{570} - \text{空白组 } A_{570})$ 。

**拓扑异构酶提取** 收集 SW480 细胞 (细胞数  $1\times 10^7$ ), 以  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗涤 2 遍 ( $1\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min), 细胞重悬于 1 mL 的裂解液 ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA,  $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖, 0.5% NP40, pH 7.2), 置  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后, 以  $6\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 弃上清液后加入  $50 \mu\text{L}$  的抽提液 ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT,  $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH 7.2), 吹打均匀, 置  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 以  $14\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液分装, 置  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

**琼脂糖凝胶电泳法测定拓扑异构酶活性及药物的影响**<sup>[5,6]</sup>  $10\times$  反应缓冲液 I (pH 7.9 的  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  亚精胺,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA) 中加入 5% 丙三醇  $1 \mu\text{L}$ 、pBR322 DNA  $0.2 \mu\text{g}$ 、不同量的拓扑异构酶提取液, 双蒸水加至  $10 \mu\text{L}$ 。置  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱中反应 30 min, 加入  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的  $2.5 \mu\text{L}$  的  $5\times$  终止液 ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, 50% 丙三醇,  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴酚蓝显色液) 终止反应。以 1% 琼脂糖、TAE 缓冲液,  $80 \text{ V}$  电泳 1 h。电泳后以溴化乙锭 (EB) 染色 30 min, 应用 SynGene GeneSnap Tools 软件在紫外灯下对电泳凝胶图像进行观察并拍照。根据上述结果选择刚能使超螺旋 DNA pBR322 解旋的 Topo I 量 ( $3 \mu\text{L}$  提取液), 同上建立 Topo I 反应体系, 反应液中加入不同浓度的黄葵素, 以羟喜树碱为阳性对照, 测定药物对 Topo I 活性的影响。Topo II 对 DNA 的解旋反应体系为:  $4\times$  反应缓冲液 II (pH 8.0 的  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA)  $2.5 \mu\text{L}$ 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP、pBR322 DNA  $0.2 \mu\text{g}$ 、不同量的拓扑异构酶提取液, 双蒸水加至  $10 \mu\text{L}$ 。其他操作同 Topo I 测定, 根据结果选择合适的 Topo II 量 ( $3 \mu\text{L}$  提取液), 以鬼臼乙叉

昔为阳性对照, 同法测定黄葵素对 TopoII 的影响。采用 ImageJ 软件对 DNA 条带进行密度分析, 以 pBR322 DNA 条带为对照计算各组环状/线性 DNA 和超螺旋 DNA 的相对密度。

**数据处理** 细胞实验重复 2 次以上, 以重现性良好为准<sup>[7]</sup>。联合用药数据采用 calcuSyn 软件处理, 该软件利用中效原理, 通过单药和两药合用量效关系参数计算联合用药效应值与两药单用效应值的关系, 求出各抑制水平的联合指数 (combination index, CI), CI < 1 表示联用药物之间有协同作用, CI 值越小协同作用越大; CI = 1 表示联用药物之间为相加或无关作用, CI > 1 表示联用药物之间无协同关系, CI 值越大拮抗作用的可能性越大<sup>[8]</sup>。

## 结果

### 1 黄葵素联用羟喜树碱对肿瘤细胞的抑制作用

实验采用拉丁方设计法, 在小于 IC<sub>60</sub> 的药物浓度范围内设置不同浓度黄葵素与不同浓度羟喜树碱进行联合, 由图 1 可见, 黄葵素和羟喜树碱联用对 SW480、SGC-7901、SW1116 细胞具有明显抑制作用, 曲线相关数据显示最大抑制分数分别达 0.835、0.712 和 0.705, 高于两药单用效果, 从曲线趋势 (不同黄葵素浓度) 和各曲线比较 (不同羟喜树碱浓度) 尚可以看出细胞抑制对两药均有浓度依赖性。黄葵素对

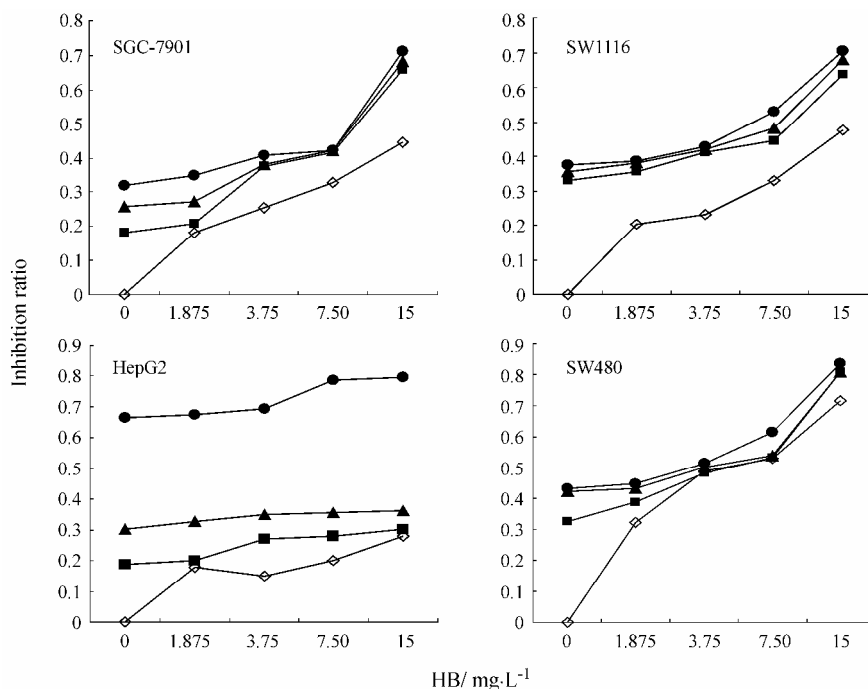
HepG2 细胞的抑制作用相对较弱且在实验浓度范围无明显浓度依赖性, 联用较高浓度羟喜树碱时才出现明显细胞抑制。比较黄葵素的 IC<sub>50</sub> 可见, 联用羟喜树碱可使黄葵素对 SW480、SGC-7901、SW1116 细胞的 IC<sub>50</sub> 显著降低, 细胞敏感性提高 56%~314% (表 1), 表明联合用药提高了对肿瘤细胞的抑制效果。

**Table 1** Comparison of IC<sub>50</sub> between the groups of HB and it plus HCPT on human tumor cells. IC<sub>50</sub> ratio: IC<sub>50</sub> of HB alone / IC<sub>50</sub> of HB plus HCPT; IC<sub>50</sub> of HCPT were 30.8, 41.00, and 11.12 mg·L<sup>-1</sup> on SGC-7901, SW1116, and SW480 cells, respectively

HCPT /mg·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> of HB/mg·L <sup>-1</sup>			IC <sub>50</sub> ratio		
	SGC-7901	SW1116	SW480	SGC-7901	SW1116	SW480
0	24.98	20.09	4.92	1	1	1
6	7.93	6.85	4.14	3.15	2.93	1.19
12	7.13	5.64	3.75	3.50	3.56	1.31
24	6.04	4.93	3.14	4.14	4.08	1.56

### 2 黄葵素联用羟喜树碱对肿瘤细胞的协同作用观察

联合指数 (CI) 计算结果 (表 2) 显示, 两药联用对各种人癌细胞株的 CI 值均小于 1, 表现为较显著的协同效果, 且 CI 值随两药浓度的增大而明显降低, 显示协同效果对两药均有明显的浓度依赖性。对 HepG2 和 SW480 细胞, 黄葵素 (15 mg·L<sup>-1</sup>) 的 CI 值均低于 0.7, 为中度协同, 其余浓度联合为轻度协同或相加。对 SGC-7901 和 SW1116 细胞, 两药表现为



**Figure 1** Dose-dependent curves of HB in combination with HCPT on proliferation of human tumor cells determined by MTT assay. Concentration of HCPT: 0 (◇), 6 (■), 12 (▲), and 24 (●) mg·L<sup>-1</sup>

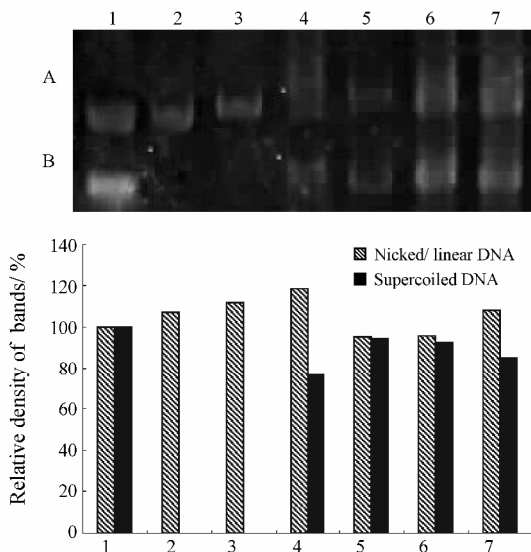
更强的协同作用, CI 值最低分别达 0.161 和 0.178, 黄葵素 ( $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 CI 值均低于 0.3, 为高度协同, 其余浓度联合多为中度协同。

### 3 黄葵素对 Topo I 活性的影响

从 DNA 电泳图及其条带密度分析结果 (图 2) 可见, 超螺旋 DNA (pBR322 DNA, 见 Lane 1) 在 Topo I 作用下仅有环状缺口和线性 DNA (Lane 2), 随加入黄葵素浓度的增高, 酶的作用逐渐受到抑制,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Lane 4) 时已有明显抑制作用, 表现为环状缺口和线性 DNA 减少, 超螺旋 DNA 增多,  $8.0$

**Table 2** Synergistic inhibitory effect of HB with HCPT on proliferation of tumor cells. Description of CI value: 0.1–0.3, strong synergism; 0.3–0.7, synergism; 0.7–0.9, moderate or slight synergism; 0.9–1.1, nearly additive<sup>[8]</sup>

Drug/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		CI			
HB	HCPT	HepG2	SW480	SGC-7901	SW1116
15	24	0.447	0.626	0.161	0.178
7.50	24	0.708	0.714	0.320	0.292
3.75	24	0.768	0.792	0.539	0.404
1.875	24	0.838	0.866	0.721	0.659
15	12	0.455	0.666	0.203	0.218
7.50	12	0.722	0.721	0.379	0.311
3.75	12	0.797	0.797	0.679	0.430
1.875	12	0.930	0.881	0.764	0.730
15	6	0.569	0.677	0.283	0.282
7.50	6	0.723	0.769	0.418	0.354
3.75	6	0.833	0.838	0.699	0.550
1.875	6	1.000	0.936	0.882	0.910

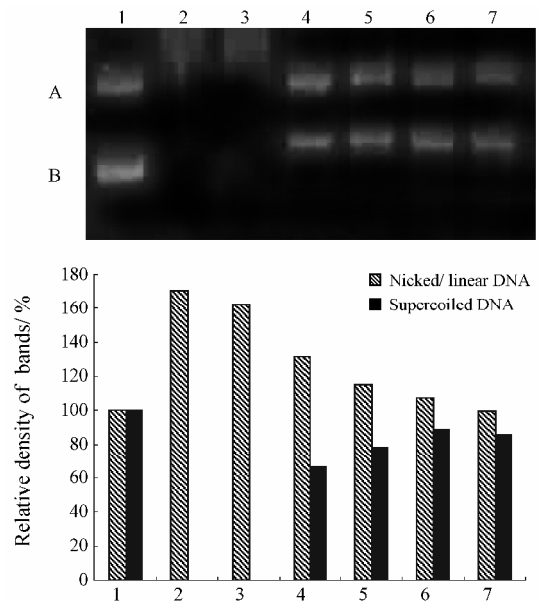


**Figure 2** Effect of HB on pBR322 DNA relaxation mediated by Topo I from SW480 cell. 1: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ); 2: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo I; 3–6: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo I + HB ( $1.0, 2.0, 4.0, \text{ and } 8.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 7: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo I +  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HCPT; A: Nicked/linear DNA; B: Supercoiled DNA

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时抑制作用与羟喜树碱 ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相近 (Lane 6, Lane 7)。

### 4 黄葵素对 Topo II 活性的影响

从 DNA 电泳图及其条带密度分析结果 (图 3) 可见, 黄葵素 ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 Topo II 无明显抑制作用, 无超螺旋 DNA 条带出现 (Lane 2 和 Lane 3); 黄葵素 ( $2.0\sim 8.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 Topo II 有明显的抑制作用, 与鬼臼乙叉昔相似, 可见环状缺口和线性 DNA 减少, 超螺旋 DNA 增多 (Lane 4~Lane 6)。



**Figure 3** Effect of HB on pBR322 DNA relaxation mediated by Topo II from SW480 cell. 1: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ); 2: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo II; 3–6: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo II + HB ( $1.0, 2.0, 4.0, \text{ and } 8.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 7: pBR322 ( $0.2 \mu\text{g}$ ) + Topo II + VP-16 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); A: Nicked/linear DNA; B: Supercoiled DNA

### 讨论

联合化疗是利用联用药物之间的协同作用取得比单药更好的效果, 联用药物之间若存在协同作用, 将有利于总疗效的提高。目前化疗药敏试验方法很多, 但多为单药药敏试验, 不能显示药物联合使用的效果和最佳使用剂量<sup>[9]</sup>。本研究的实验结果利用 calcuSyn 软件分析不同细胞杀伤水平联用药物之间的相互作用及其程度, 根据计算出的联合指数 CI 值可判断联用药物之间的协同、相加或拮抗关系, 通过比较各个联合水平的 CI 值可判断药物之间联合应用的效果<sup>[8]</sup>。实验针对多株人源性消化系统肿瘤细胞 (HepG2、SW480、SGC-7901、SW1116), 比较黄葵素与羟喜树碱各联合用药组和相应单药组的细胞抑制率, 表明不存在相互拮抗作用, 两药联用可使细胞抑

制率提高,  $IC_{50}$  降低, 而 CI 值计算结果则进一步显示黄癸素和羟喜树碱有明显的协同效果。

DNA 拓扑异构酶是近年发现的维持 DNA 复制、重组、转录等信息传递及加工的重要空间构型酶, 被列为筛选抗肿瘤药物的重要靶酶。以往研究表明小檗碱具有拓扑异构酶毒性。Li 等<sup>[10]</sup>报道小檗碱能与 Topo I 结合, 使 S 期细胞合成受阻, 阻止细胞增殖。Kim 等<sup>[11]</sup>研究证明小檗碱的衍生物 9-去甲基小檗碱对 Topo II 有明显的毒性作用, 在  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度可以诱导 DNA 双链的断裂。本研究结果显示, 黄癸素 ( $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 即可抑制 Topo I 的活性, 其抑制作用随浓度提高有增强的趋势, 该浓度下对 Topo II 活性也有抑制作用, 推断拓扑异构酶可能是黄癸素的作用靶点之一。

对各种肿瘤细胞的实验研究表明, 黄癸素具有显著的抑制肿瘤细胞活性, 其作用谱较广, 可促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞侵袭, 具有抑制 CD44V6 和基质金属蛋白酶表达等作用<sup>[12, 13]</sup>。研究还表明, 黄癸素与多种临床常用抗肿瘤药具有不同程度的协同抑制肿瘤作用, 与典型的 Topo I 抑制剂羟喜树碱在单药低效浓度的两药联合应用可使细胞抑制率达到 80% 以上, 表现为较突出的协同效果, 可能与两药在作用机制方面的协同有关。这对进一步开展黄癸素抗肿瘤机制及联合用药的研究有一定的指导意义, 两药的体内协同效果及对临床的指导意义有待进一步研究。

## References

- [1] Jia BZ. Ion pair compound of berberine and houttuynifonate: CN, 200510136655.2 [P]. 2007-07-04.
- [2] Li B, Zhu WL, Chen KX. Advances in the study of berberine and its derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 773–787.
- [3] Wang ZH, Lin J. Effects of berberine on the proliferation and differentiation of HL-60 cells [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2004, 20: 1305–1308.
- [4] Yang J, Lin J. Inhibition of mice implanted tumor by berberine [J]. China Pharm (中国药业), 2009, 18: 4–5.
- [5] Kruczynski A, Barret JM, Van Hille B. Decreased nucleotide excision repair activity and alterations of topoisomerase II $\alpha$  are associated with the *in vivo* resistance of a P388 leukemia subline to F11782, a novel catalytic inhibitor of topoisomerases I and II [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 3156–3168.
- [6] Yang YD, Chen YG, Wu H, et al. Antitumor activity of compound Mirabijalone B and its effect on DNA topoisomerases [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2009, 25: 1345–1349.
- [7] Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration. Guidance on non-clinical study of cytotoxic antitumor drug [EB/OL]. State Food and Drug Administration, 2006 [2008-04-01] <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=31>
- [8] Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies [J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49: 2059–2080.
- [9] Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, et al. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design [J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86: 1517–1524.
- [10] Li TK, Bathory E, Lavoie EJ, et al. Human topoisomerase I poisoning by protoberberine: potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions [J]. Biochemistry, 2000, 39: 7107–7116.
- [11] Kim SA, Kwon Y, Kim JH, et al. Induction of topoisomerase II — mediated DNA cleavage by a protoberberine alkaloid, berberrubine [J]. Biochemistry, 1998, 37: 16316–16324.
- [12] Lin J, Peng HY, Wang X, et al. Antitumor effects of berberine  $\alpha$ -hydroxy  $\beta$ -decanoyl ethyl sulfonate *in vitro* [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2011, 27: 15–18.
- [13] Lin J, Peng HY. Apoptosis of B16 melanoma cells induced by berberine  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -decanoyl ethyl sulfonate [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2010, 26: 1630–1634.