环丙沙星增强抗体偶联药物(RC48)对 HER2 阳性肿瘤细胞增殖的抑制作用

张信玲[1]，王阅[1]，黄长江[2]，ZHU M. Marie[1]，罗文婷[1*][1.荣昌生物制药(烟台)股份有限公司，山东 烟台 264006；2.烟台迈百瑞国际生物医药股份有限公司，山东 烟台 264006]

摘要：目的 探讨环丙沙星与抗 HER2 抗体药物偶联物 RC48 联合用药时的抑瘤活性及机制。**方法** CCK-8 法分别检测环丙沙星单药、RC48 单药及两者联合用药(在不同配比条件下同时或序贯用药)对 HER2 阳性肿瘤细胞增殖的抑制作用。联合指数法评价 2 种药物联用的效果。**结果** RC48 单药对 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞增殖有显著的抑制作用，IC_{50} 分别为(4.91±1.15)ng·mL^{-1} 及(14.54±0.85)ng·mL^{-1}，最大抑制率分别为 87.2%及 82.3%。环丙沙星单药剂量在 234.38~7 500 ng·mL^{-1} 内无显著的抗肿瘤作用。当环丙沙星与 RC48 同时给药时，显著降低了 RC48 的抗肿瘤活性(P<0.05)，两者表现为拮抗作用；但当其与 RC48 序贯给药(先给 RC48 后给环丙沙星，用药间隔为 6~48 h)时，抗肿瘤活性显著升高(P<0.05)，2 种药物表现为协同作用，且在联合药效高达 95.3%时，依然保持协同作用。**结论** RC48 与环丙沙星序贯给药(间隔 6~48 h，6 h 最佳)可增强抗肿瘤效果，两者有协同作用。

关键词：环丙沙星；抗体药物偶联物；溶酶体；联合用药

中图分类号：R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2022)20-2585-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.20.003

引用本文：张信玲，王阅，黄长江，等. 环丙沙星增强抗体偶联药物(RC48)对 HER2 阳性肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2585-2592.

Ciprofloxacin Enhances the Inhibitory Effect of Antibody-drug Conjugate(RC48) on the Proliferation of HER2 Positive Tumor Cells

ZHANG Xinling[1], WANG Yue[1], HUANG Changjiang[2], ZHU M. Marie[1], LUO Wenting[1*](*1.RemeGen Co., Ltd., Yantai 264006, China; 2.MabPlex International Co., Ltd., Yantai 264006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antitumor activity and mechanism of ciprofloxacin combined with RC48 which is an anti-HER2 antibody-drug conjugate. **METHODS** CCK-8 assay was used to detect the inhibitory effect of ciprofloxacin, RC48 and their combination(simultaneously or sequentially with different proportions) on the proliferation of HER2 positive tumor cells. The combined index method was used to evaluate the combined effect of the two drugs. **RESULTS** RC48 displayed a significant inhibitory effect on the proliferation of SK-BR-3 and NCI-N87 cells with the IC_{50} values of(4.91±1.15)ng·mL^{-1} and (14.54+0.85)ng·mL^{-1} respectively, and the maximum inhibition rates were 87.2% and 82.3% respectively. Ciprofloxacin alone had no significant antitumor effect in the dose range of 234.38–7 500 ng·mL^{-1}. When it was given with RC48 at the same time, the anti-tumor effect of RC48 was significantly reduced(P<0.05) and the two drugs showed an antagonistic effect. However, when it was used successively with RC48 was administered first and then ciprofloxacin, with an interval of 6–48 h, the antitumor activity increased significantly(P<0.05). The two drugs showed synergistic effect, and the synergistic effect was still maintained when the combined efficacy was as high as 95.3%. **CONCLUSION** Sequential administration of RC48 and ciprofloxacin, at 6–48 h intervals, especially at 6 h intervals, can enhance the anti-tumor efficacy, and the two drugs show a synergistic effect.

KEYWORDS: ciprofloxacin; antibody-drug conjugates; lysosome; drug combination

抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates，ADCs)是一类通过化学连接子将细胞毒素偶联到单克隆抗体上形成的新型药物，其集单克隆抗体的靶向性与小分子药物的杀伤力于一体，成为肿瘤精准治疗的研究热点。目前已有 14 款 ADCs 上市，300 多款进入临床试验阶段，研发进入井喷期。该药物的一大特点是具有明确的作用机制：ADC 药物与肿瘤表面抗原特异性结合，内吞，转运至溶酶体，溶酶体内 ADC 分子降解并释放毒素分子，毒素分子穿膜进入细胞质与靶分子结合，导致细胞周期阻滞，最终引起细胞凋亡[1-6]。由此可见，溶酶体在 ADC 药物药效发挥过程中起到至关重要

基金项目：中国博士后科学基金项目(2020M672136)

作者简介：张信玲，女，博士　E-mail: ruoxi_67@163.com　*通信作者：罗文婷，女，博士，副研究员　E-mail: luowenting@remegen.cn

的作用。环丙沙星作为广谱抗菌药物，常作为辅助药物用于预防恶性肿瘤并发症之一(感染)，但其还是一种溶酶体膜通透性诱导剂[7-8]。因此环丙沙星很可能通过溶酶体影响 ADC 药效的发挥。本研究以 RC48 为例，探讨环丙沙星对 ADC 抗肿瘤活性的影响。RC48 是一款靶向 HER2，由单克隆抗体 Hertuzumab、细胞毒素甲基澳瑞他汀 E(monomethyl auristatin E，MMAE)与组织蛋白酶 B(cathepsin B，cat B)敏感的可裂解连接子 mc-vc 组成的 ADC，是中国首个获国家药品监督管理局批准上市的自主研发 ADC 新药[9-10]。该药物与肿瘤细胞表面的 HER2 抗原结合后经内吞作用进入溶酶体，其连接子经 cat B 催化断裂释放出 MMAE，MMAE 透过溶酶体进入细胞质并与微管蛋白结合导致细胞周期阻滞，最终导致细胞凋亡[9-10]。由此可见溶酶体及其特异性组织蛋白酶——cat B 异常与否直接影响 RC48 药效的发挥。本研究分别检测了 2 种药物同时和序贯给药对 HER2 阳性细胞增殖的抑制作用，采用联合指数法评价联用效果，为提高 ADC 药物的临床药效提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HF90 二氧化碳细胞培养箱(中国 Heal Force 公司)；ZCZY-AN 二氧化碳振荡培养箱(中国知楚仪器)；HFsafe-1200LC(A2)生物安全柜(中国 Heal Force 公司)；SpectraMax 190 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

胎牛血清(批号：11H272；规格：500 mL)、高糖 RPMI-1640 培养基(批号：2192743；规格：500 mL)、DMEM 培养基(批号：2186818；规格：500 mL)均购自美国 Gibco 公司；ExpiCHO™ 表达培养基(批号：2239740；规格：1 000 mL)、ExpiFectamine CHO 细胞转染试剂(批号:2264837；规格：1 L)均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司；CCK-8 试剂盒(日本同仁化学公司，批号：NN706；规格：10 000 次)；cat B 活性检测试剂盒(英国 Abcam 公司，批号：1-31008-68；规格：20 次)；盐酸环丙沙星(中国阿拉丁实业有限公司，批号：C1806098；规格：5 g)；RC48 由本实验室提供；Hertuzumab(批号：20201021)和转接药物 mc-vc-MMAE(批号：202009003)由本公司自主设计合成。

1.2 细胞系及培养

HER2 阳性的人乳腺癌细胞 SK-BR-3 及人胃癌细胞 NCI-N87 均购自美国 ATCC 公司。中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary，CHO)细胞购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

CHO 细胞用无血清的 ExpiCHO™表达培养基，置于 37 ℃、8%CO_2 且相对湿度≥80%的振荡培养箱中培养，每 3~4 d 传代 1 次。SK-BR-3 细胞采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，NCI-N87 细胞采用含 10%胎牛血清的高糖 RPMI-1640 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，同样每 3~4 d 传代 1 次。

1.3 RC48 制备

Hertuzumab 抗体表达纯化：将人源化的 anti-HER2 单抗 Hertuzumab 的轻、重链表达质粒按 2∶1 的比例转入 CHO 细胞(L 链∶H 链=2∶1)。转染后 8~10 d 收样，采用离心及过滤的方法将细胞分离出去，取上清液(抗体蛋白存在于上清液中)，上 Protein A 亲和层析柱进行第一步纯化，经阳离子交换层析进行粗纯，经阴离子交换层析进行精纯，纯化后的蛋白经过疏水相互作用色谱(hydrophobic interaction chromatography，HIC)及排阻色谱法(size exclusion chromatography，SEC)检测合格后，进行超滤浓缩，蛋白浓度达到约 20~30 mg·mL^{-1}，此即为抗体蛋白原液，可在–80 ℃长期保存。

Hertuzumab 与转接药物(mc-vc-MMAE)偶联：通过超滤用合适的偶联缓冲液(如 His-HCl pH 6.8)置换 Hertuzumab 的储存缓冲液，并将 Hertuzumab 的浓度调整至 10 mg·mL^{-1}。加入 10%的螯合剂 DTPA，震荡混匀，再加入 2 倍当量的 TCEP，于 25 ℃搅拌反应 2.5 h。在冰水浴的条件下向样品中加入 26%的 DMSO，震荡混匀，加入 5 倍当量的 mc-vc-MMAE，震荡混匀，于 25 ℃搅拌反应 2 h。用 DTNB 法于 412 nm 检测自由巯基浓度(接近 0)，纯化除去残余未反应细胞毒素以及 DMSO 等游离小分子，HIC 及 SEC 法检测偶联情况。偶联反应可重复性好，打开的自由巯基可以偶联完全，得到 RC48，偶联度为 3.5~4.5。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力

胰酶消化对数生长期的 SK-BR-3 或 NCI-N87 细胞，培养基终止消化，300×*g* 离心 5 min，弃上清，新鲜培养基重悬并调整细胞密度至 1×10^5 ·mL^{-1}。按每孔 100 μL 将细胞接种至 96 孔板中，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。RC48 单药药效检测：0.73，1.45，2.90，5.80，11.60，23.20，

46.40 ng·mL^{-1} RC48 处理 SK-BR-3 细胞 72 h；0.15，0.74，3.70，18.52，92.59，277.78，833.33，2 500 ng·mL^{-1} RC48 处理 NCI-N87 细胞 72 h，每个浓度梯度设 3~6 个复孔，同时设置空白孔及对照孔。环丙沙星单药药效检测：234.38，468.75，937.50，1875，3750，7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星处理 SK-BR-3 或 NCI-N87 细胞 72 h，每个浓度梯度设 3~6 个复孔，同时设置空白孔及对照孔；联合用药药效检测：恒定浓度(如 IC_{50})的 RC48 分别与不同浓度环丙沙星同时或先后给药，72 h 后检测，同样每个浓度梯度设 3~6 个复孔，同时设置空白孔及对照孔。药物处理结束后弃掉培养基，每孔加入含 10% CCK-8 的无血清培养基 100 μL，37 ℃放置 1~4 h，使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

细胞存活率(%)=[(As−Ab)÷(Ac−Ab)]×100

抑制率(%)=[1−(As−Ab)÷(Ac−Ab)]×100

As 为实验孔吸光度(含有细胞、培养基、CCK-8 和待测化合物的孔的吸光度)；Ab 为空白孔吸光度(含有培养基和 CCK-8 的孔的吸光度)；Ac 为对照孔吸光度(含有细胞、培养基和 CCK-8 的孔的吸光度)。

1.5 联合指数(combination index，CI)法评价联合效果

CI 值可由 CompuSyn 软件根据 2 种药物的单药 IC_{50} 及联用药效计算得出，多用于评价 2 种药物在体外合并使用时的效果。评价标准如下：CI<1 表示协同作用，CI=1 表示相加作用，CI>1 表示拮抗作用[11-13]。

1.6 cat B 活性检测(溶酶体膜通透性检测)

根据 cat B 活性检测试剂盒的使用说明检测肿瘤细胞溶酶体中 cat B 活性。简单来说，包括样品制备、反应体系建立及荧光值检测(Ex/Em=400/505 nm)。

①样品制备：经 2 000 ng·mL^{-1} 环丙沙星处理 72 h 或未经处理的细胞(建议每个样品细胞数达到 1×10^6~5×10^6 个)经胰酶消化后收集，300×*g* 离心 5 min 弃上清，预冷 PBS 漂洗后用 50 μL 预冷的细胞裂解液重悬，冰上孵育 10~30 min。4 ℃条件下最高转速离心 2~5 min，取上清。

②反应体系建立及检测：取 50 μL 样品裂解液(50~200 μg 蛋白)加入 96 孔板中，每孔再加入 50 μL CB 反应缓冲液及 2 μL CB 反应底物 Ac-RR-AFC(储液浓度 10 mmol·L^{-1}，终浓度 200 μmol·L^{-1})，37 ℃避光孵育 1~2 h。利用酶标仪检测 Ex/Em=400/505 nm 时的荧光值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析，GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行相关图片的绘制。所有细胞活性检测试验均独立重复 3 次，2 组间比较采用双侧 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备 RC48

anti-HER2 单抗 Hertuzumab 经瞬时表达及纯化后，纯度>99%(HIC-HPLC，图 1A)，浓度浓缩至 30 mg·mL^{-1}。将缓冲液置换为 His-HCl pH 6.8，浓度调整为 10 mg·mL^{-1} 后，取 1 mL 与 mc-vc-MMAE 偶联，纯度为 96.05%(HIC-HPLC)，即得平均药物与抗体比率为 4.01 的 ADC 产物 RC48，结果见图 1B。

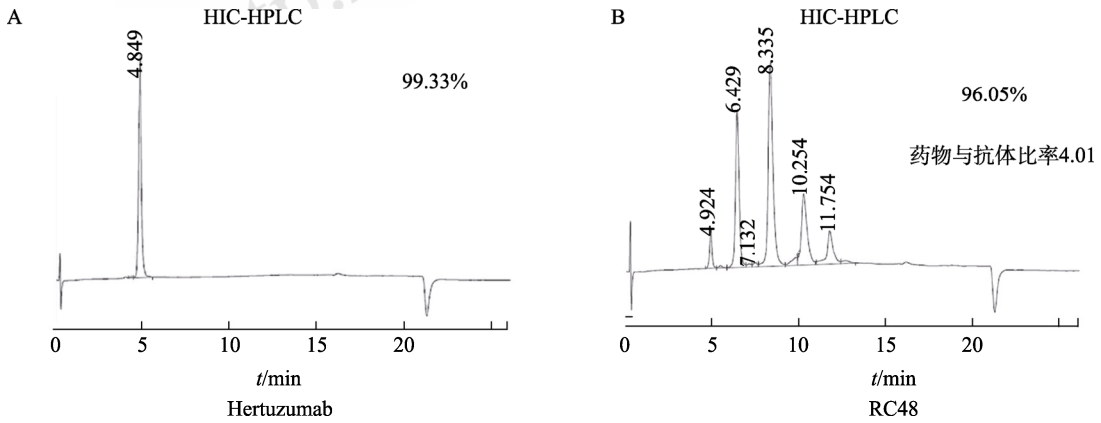

图 1 高效液相色谱图

A−Hertuzumab; B−RC48。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A−Hertuzumab; B−RC48.

2.2 RC48 与环丙沙星单独用药时的抗肿瘤活性

分别用梯度浓度的 RC48 处理 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞 72 h 后，2 种细胞的增殖明显受到抑制，且呈量效依赖性，其 IC_{50} 分别为(4.91±1.15)ng·mL^{-1} 及(14.54±0.85)ng·mL^{-1}，其最大抑制率分别为 87.2%及 82.3%，结果见图 2A。环丙沙星在 234.38~7 500 ng·mL^{-1} 对 SK-BR-3 细胞的增殖无显著的抑制作用(抑制率<4%)，对 NCI-N87 细胞的增殖有轻微的抑制作用(最高抑制率为 10%左右)，结果见图 2B。

2.3 RC48 与环丙沙星同时用药时的抗肿瘤药效

为了检测环丙沙星对 RC48 抗肿瘤活性的影响，分别用 468.75，937.50，1 875，3 750，7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星与恒定剂量(IC_{50})的 RC48 同时处理 SK-BR-3 或 NCI-N87 细胞 72 h 并检测对肿瘤细胞增殖的抑制率。CCK-8 法结果显示，在 SK-BR-3 细胞中，2 种药物的联合抑制率依次为 31.34%，31.33%，32.67%，32.63%，34.68%，均低于 RC48 单药组(实际测得的抑制率为 49.27%)，且除最后一组外，均有统计学差异(P<0.05)，结果见图 3A。利用 CompuSyn 软件计算以上不同配比条件下 2 种药物联用的 CI 值，分别为 1.45，1.46，1.41，1.44 及 1.41，表现为中度拮抗至拮抗，结果见图 3B。相似的，在 NCI-N87 细胞中，2 种药物的联合抑制率依次为 17.54%，20.00%，21.29%，23.40%，23.27%，显著低于 RC48 单药组(51.33%)(P<0.05)，结果见图 3A；CI 值依次为 26.23，18.63，15.84，12.37，12.86，表现为极强拮抗，结果见图 3B。综上所述，环丙沙星与 RC48 同时给药时，联合抑瘤效果显著低于 RC48 单药，两者表现为拮抗作用，且在 NCI-N87 细胞中拮抗作用更明显。

2.4 RC48 与环丙沙星序贯用药时的抗肿瘤活性

为了进一步检测环丙沙星对 RC48 抗肿瘤活性的影响，本研究利用 CCK-8 法检测了 IC_{50} 剂量的 RC48 分别与 468.75，937.50，1 875，3 750，7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星序贯用药(先给 RC48，后给环丙沙星，2 种药物给药间隔为 24 h)对 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞增殖的抑制作用。结果显示，在 SK-BR-3 细胞中，联合抑瘤率依次为 69.90%，70.25%，70.83%，71.53%及 70.46%，显著高于 RC48 单药(P<0.05)；CI 分别为 0.56，0.55，0.52，0.49，0.54，两者联用表现为协同作用，结果见图 4。在

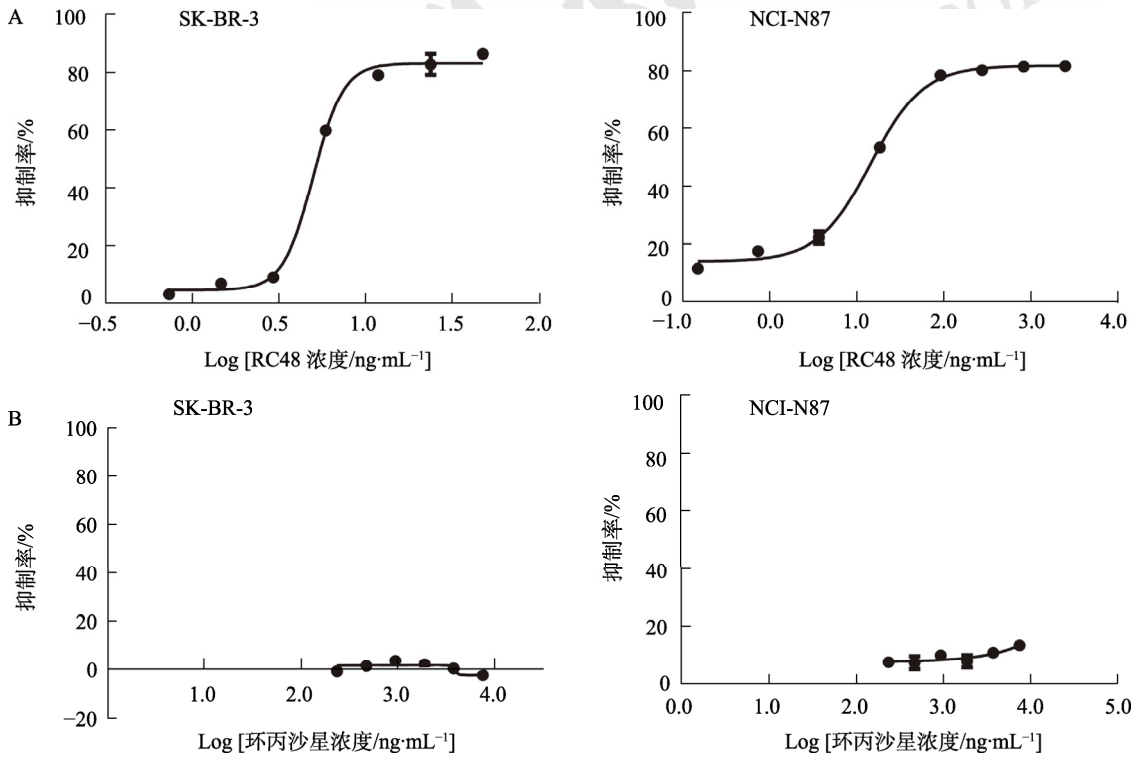

图 2 RC48 及环丙沙星单独用药时的抗肿瘤活性

A–RC48 对 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞增殖的抑制作用；B–环丙沙星对 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞增殖的抑制作用。

Fig. 2 Antitumor activities of RC48 and ciprofloxacin alone

A–inhibition effect of RC48 on proliferation of SK-BR-3 and NCI-N87 cells; B–inhibition effect of ciprofloxacin on proliferation of SK-BR-3 and NCI-N87 cells.

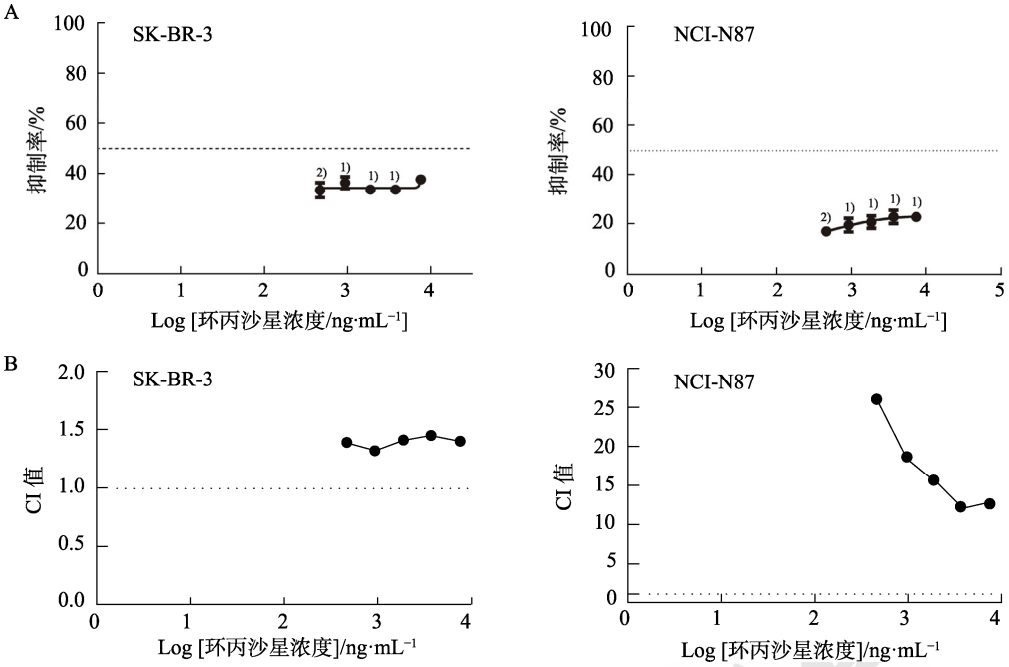

图 3 RC48 与环丙沙星同时用药时的抗肿瘤活性及 CI 值

A–IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量的环丙沙星同时给药对 SK-BR-3及 NCI-N87 细胞增殖的抑制作用；与对照组(IC_{50} 剂量的 RC48 单药)相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01；B– IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量环丙沙星同时使用时的 CI 值。

Fig. 3 Antitumor activities and CI values of RC48 combined with ciprofloxacin simultaneously

A–inhibition rate of proliferation of SK-BR-3 and NCI-N87 cells when IC_{50} dose of RC48 combined with different doses of ciprofloxacin simultaneously; compared with control group(IC_{50} doses of RC48 alone), $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01; B–CI values calculated when IC_{50} dose of RC48 combined with different doses of ciprofloxacin simultaneously.

NCI-N87 细胞中，联合抑瘤率依次为 55.14%，55.55%，56.43%，58.03%及 59.97%，均显著高于 RC48 单药组(P<0.05)；CI 分别为 0.62，0.60，0.56，0.49，0.42，两者联用表现为协同作用，结果见图 4。

同时，本研究分别检测了 2 种药物使用间隔时间为 2，6，24，30，48 h 对 SK-BR-3 细胞增殖的抑制作用。间隔时间在 6~48 h 内时，4.91 ng·mL^{-1} RC48 分别与 468.75，937.50，1 875，3 750，7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星联用，与 4.91 ng·mL^{-1} RC48 单药相较，均显著提高了细胞增殖抑制效果(P<0.05)，且 CI 值均<1，表现为协同，结果见图 5A。2 种药物间隔 6 h 使用，协同效果最佳，环丙沙星剂量在 468.75~7 500 ng·mL^{-1} 内时，其对 RC48 抗肿瘤活性的增强作用没有显著的剂量依赖性，结果见图 5A、B。

2.5 RC48 与环丙沙星联合用药对最大抑瘤率的影响

对于抗肿瘤或者抗病毒药物来说，高药效(如抑制率>80%)条件下的协同比低药效(如抑制率<20%)条件下的协同更有临床指导意义[11]，因此将 RC48 的剂量提高至 20 ng·mL^{-1}，其单药对 SK-BR-3 细胞的增殖抑制率为 85.2%，接近其对 SK-BR-3 细胞增殖的最大抑制率 87.2%。接下来，利用 CCK-8 法检测了 20 ng·mL^{-1} RC48 分别与 468.75，937.50，1 875，3 750，7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星序贯用药(先给 RC48，后给环丙沙星，2 种药物给药间隔为 6 h)对 SK-BR-3 细胞增殖的抑制作用，确认 2 种药物在高药效条件是否有协同作用及联合药效能否突破最大抑制率。结果显示，20 ng·mL^{-1} RC48 与以上不同剂量的环丙沙星间隔 6 h 给药对肿瘤细胞增殖的抑制作用依次为 91.1%，94.4%，94.4%，93.9%及 95.3%，显著高于 20 ng·mL^{-1} RC48 单药对细胞增殖的抑制率(P<0.05)且联合药效均大于 RC48 单药的最大抑制率，结果见图 5C。利用 CompuSyn 软件计算以上不同配比条件下 2 种药物联用的 CI 值，分别为 0.70，0.61，0.61，0.59，0.52，两者联用表现为协同作用，结果见图 5D。因此，在 SK-BR-3 细胞中，RC48 与环丙沙星在高药效条件下(91.1%≤联合抑制率≤95.3%)依然表现为协同。

2.6 环丙沙星对溶酶体膜通透性的影响

根据文献报道，环丙沙星是一种溶酶体膜通透性诱导剂[7-8]，溶酶体膜通透性的改变会导致溶

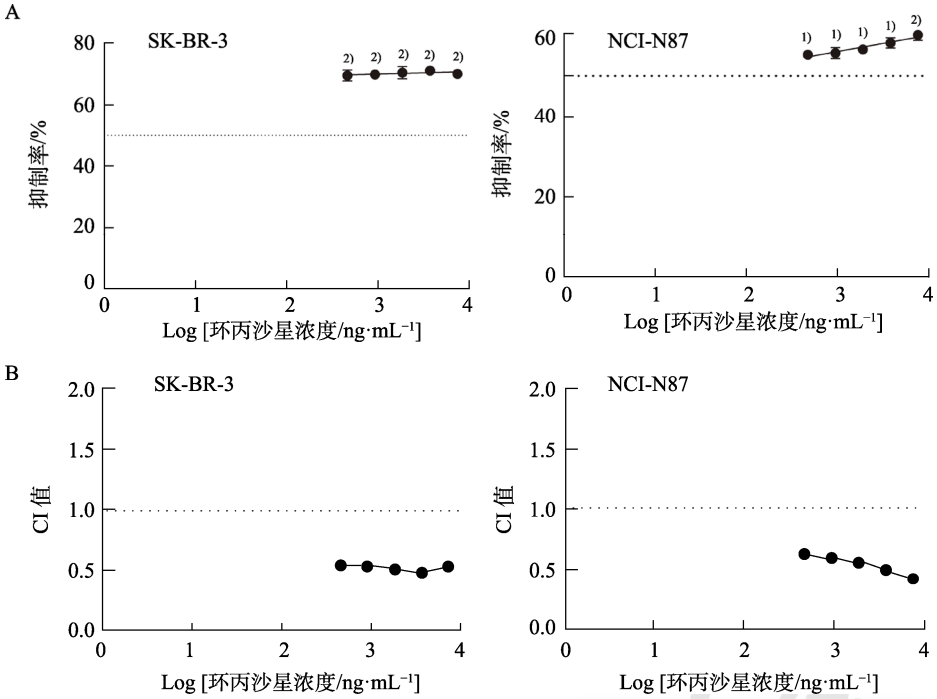

图 4　RC48 与环丙沙星间隔 24 h 用药时的抗肿瘤活性及 CI 值

A–IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量的环丙沙星间隔24 h 给药对 SK-BR-3 及 NCI-N87 细胞增殖的抑制作用；与对照组(IC_{50} 剂量的 RC48 单药)相比，$^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; B–IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量环丙沙星间隔24 h 使用时的 CI 值。

Fig. 4　Antitumor activities and CI values of RC48 and ciprofloxacin administered 24 h apart

A–inhibition rate of proliferation of SK-BR-3 and NCI-N87 cells when IC_{50} dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered 24 h apart; compared with control group(IC_{50} doses of RC48 alone), $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; B–CI values calculated when IC_{50} dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered 24 h apart.

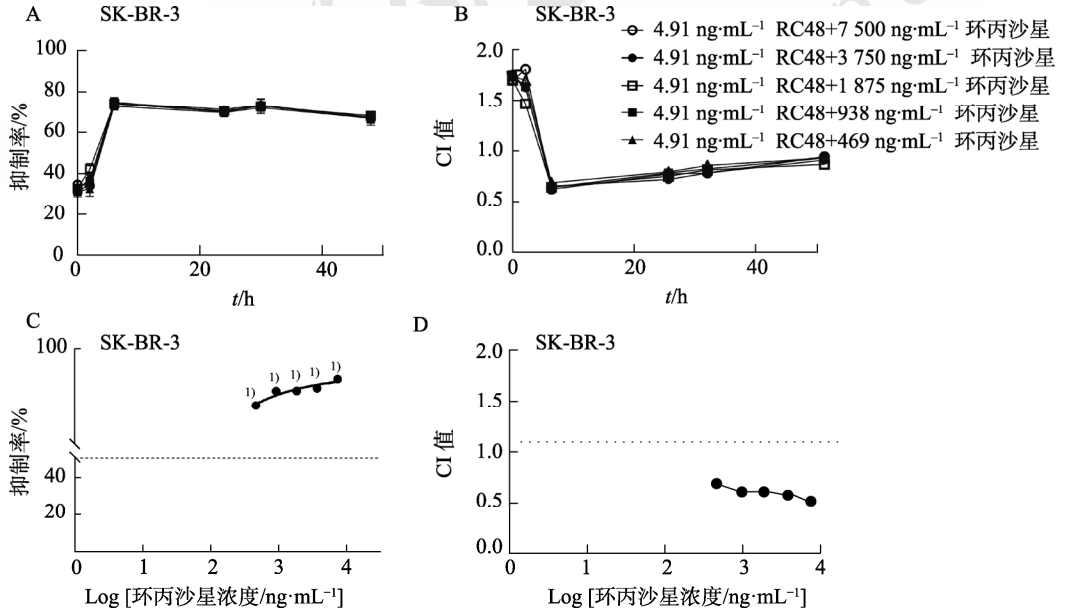

图 5　RC48 与环丙沙星给药剂量及间隔时间对联合药效及 CI 值的影响

A–IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量的环丙沙星间隔不同时间给药对 SK-BR-3 细胞增殖的抑制作用；B–IC_{50} 剂量的 RC48 与不同剂量环丙沙星间隔不同时间使用时的 CI 值；C–高剂量 RC48 与不同剂量的环丙沙星间隔 6 h 给药对 SK-BR-3 细胞增殖的抑制作用；与对照组(20 ng·mL^{-1} RC48 单药)相比，$^{1)}P<0.01$；D–高剂量 RC48 与不同剂量环丙沙星间隔6 h 使用时的 CI 值。

Fig. 5　Effect of dosage and interval of RC48 and ciprofloxacin on combined efficacy and CI values

A–inhibition rate of proliferation of SK-BR-3 cells when IC_{50} dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered at different intervals; B–CI values calculated when IC_{50} dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered at different intervals; C–inhibition rate of proliferation of SK-BR-3 cells when high-dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered 6 h apart, compared with control group (20 ng·mL^{-1} RC48 alone), $^{1)}P<0.01$; D–CI values calculated when high-dose of RC48 and different doses of ciprofloxacin were administered 6 h apart.

酶体内 pH 值的变化进而导致功能异常，而组织蛋白酶(cathepsin，cat)是一大类主要存在于溶酶体的 pH 值敏感的半胱氨酸蛋白水解酶，因催化中心不同而分为不同类型，如 cat B，C，K，L，M，N 和 S 等。因此，cat 活性的改变可反映溶酶体功能或 pH 值异常与否。本研究通过检测 cat B 的活性确定环丙沙星对溶酶体膜通透性的影响。结果显示，2 000 ng·mL^{-1} 环丙沙星处理组与对照组相比，cat B 活性下降了 27.52%(P<0.05)，证实环丙沙星能够增加溶酶体膜的通透性。结果见图 6。

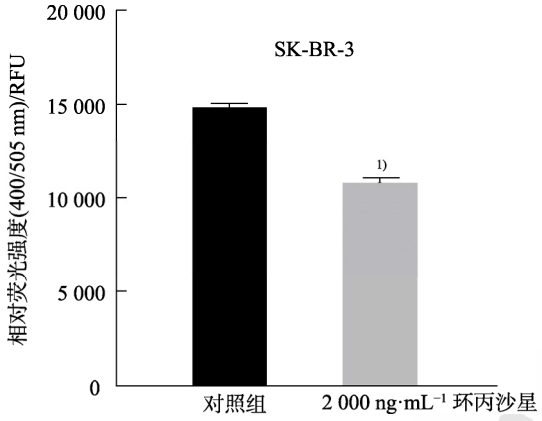

图 6　环丙沙星显著降低 cat B 活性

与对照组(20 ng·mL^{-1} RC48 单药)相比，$^{1)}P$<0.05。

Fig. 6　Ciprofloxacin inhibited cat B activity significantly

Compared with control group(20 ng·mL^{-1} RC48 alone), $^{1)}P$<0.05.

3　讨论

肿瘤患者常伴有多种并发症的发生如肿瘤急症、癌症疼痛及化疗后感染等，以急性白血病为例，接受化疗的患者感染发生率>80%[14]。因此在肿瘤治疗过程中难免会存在同时或先后服用抗感染等辅助药物的情况，那么这些药物就可能会和 ADC 等治疗药物发生相互作用，导致抗肿瘤药效减弱或产生不良作用，但也可能产生相反的效果，即提高疗效和(或)降低不良反应发生率。

环丙沙星作为合成的第三代喹诺酮类抗菌药物，具广谱抗菌活性，杀菌效果好，常用于预防恶性肿瘤的感染[15]。根据文献报道，环丙沙星还可提高溶酶体膜通透性[7]，而根据 ADC 的作用机制可以看出溶酶体膜通透性的改变可能影响 ADC 药物的药效发挥。

本研究以抗 HER2 ADC 药物 RC48 为例，研究环丙沙星对 ADC 抗肿瘤活性的影响。环丙沙星的临床给药剂量因适应证的不同有所差异，常规剂量为 0.5~1.5 g·d^{-1}，分 2~3 次给药。根据文献报道，以上用药方案条件下环丙沙星的最大血药浓度(C_{max})为 0.28~8.83 μg·mL^{-1} [16-18]。因此，本研究检测了环丙沙星在≤7.5 μg·mL^{-1} 剂量下的单药及与 RC48 联合使用时对肿瘤细胞增殖的抑制作用。结果显示，234.38~7 500 ng·mL^{-1} 环丙沙星单药几乎无抗肿瘤作用。但其与 RC48 联合用药时却显著影响了其抗肿瘤药效，在本研究使用的剂量范围内(468.75，937.50，1 875，3 750，7 500 ng·mL^{-1})这种影响没有显著的环丙沙星剂量依赖性，却显著依赖于 2 种药物的用药顺序及用药间隔时间。当 2 种药物同时或间隔 2 h(先给 RC48 后给环丙沙星)给药时，环丙沙星显著降低了 RC48 的抗肿瘤药效，两者联用表现为拮抗作用；但当 RC48 给药 6 h，12 h，24 h，30 h 或 48 h 后给环丙沙星时，抗肿瘤药效显著提高，两者联用表现为协同作用，间隔时间为 6 h 时，协同效果最佳，且即使在联合药效>95%时，两者依然表现出协同抗肿瘤效果。对于用药间隔时间显著影响环丙沙星与 RC48 联用效果的机制，有以下推测：同时用药或间隔时间< 2 h 时，ADC 药物可能还未完全进入溶酶体或者虽已进入溶酶体但还未完成抗体部分与毒素部分的断裂，溶酶体膜通透性的改变，影响了溶酶体的内环境(如 pH、cat B 活性等)，从而降低了毒素分子从 ADC 中释放出来的速率，导致抗肿瘤药效下降；但当 2 种药物间隔较长时间用药时，如间隔 6~48 h，ADC 药物可能已完全转运至溶酶体并完成毒素分子的释放，但毒素分子未完全穿出溶酶体进入细胞质，环丙沙星增加溶酶体膜通透性后，加快了毒素分子穿出溶酶体膜并与细胞质中的靶分子结合，从而提高了抗肿瘤效果。接下来将通过检测溶酶体中 ADC 的浓度及细胞质中游离 MMAE 的浓度验证该假设。

以上研究结果提示，在 ADC 药物的临床应用上，要避免与环丙沙星同时或短时间内的序贯用药防止降低 ADC 的抗肿瘤药效，同时也可以尝试与环丙沙星间隔 6~48 h 序贯使用，既能达到预防感染的效果，又能提高 ADC 药物的抗肿瘤药效。此外，在肿瘤治疗的常用辅助药物中，还有多种药物对溶酶体的功能有影响，如塞来昔布[19]、阿司匹林[20]、糖皮质激素[21]及氯丙嗪[22]等，因此还需要关注这些药物对 ADC 抗肿瘤药效的影响，避免此类药物与 ADC 同时用药。

REFERENCES

[1] JOUBERT N, BECK A, DUMONTET C, et al. Antibody-drug conjugates: The last decade[J]. Pharmaceuticals(Basel), 2020, 13(9): 245.

[2] WOLSKA-WASHER A, ROBAK T. Safety and tolerability of antibody-drug conjugates in cancer[J]. Drug Saf, 2019, 42(2): 295-314.

[3] TSUCHIKAMA K, AN Z Q. Antibody-drug conjugates: Recent advances in conjugation and linker chemistries[J]. Protein Cell, 2018, 9(1): 33-46.

[4] BIRRER M J, MOORE K N, BETELLA I, et al. Antibody-drug conjugate-based therapeutics: State of the science[J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(6): 538-549.

[5] CHAU C H, STEEG P S, FIGG W D. Antibody-drug conjugates for cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10200): 793-804.

[6] KHONGORZUL P, LING C J, KHAN F U, et al. Antibody-drug conjugates: A comprehensive review[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(1): 3-19.

[7] BOYA P, ANDREAU K, PONCET D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion[J]. J Exp Med, 2003, 197(10): 1323-1334.

[8] LIANG X, YANG Y, WANG L J, et al. pH-Triggered burst intracellular release from hollow microspheres to induce autophagic cancer cell death[J]. J Mater Chem B, 2015, 3(48): 9383-9396.

[9] LI H W, YU C, JIANG J, et al. An anti-HER2 antibody conjugated with monomethyl auristatin E is highly effective in HER2-positive human gastric cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(4): 346-354.

[10] SHENG X N, YAN X Q, WANG L, et al. Open-label, multicenter, phase II study of RC48-ADC, a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(1): 43-51.

[11] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 440-446.

[12] DUARTE D, VALE N. New trends for antimalarial drugs: Synergism between antineoplastics and antimalarials on breast cancer cells[J]. Biomolecules, 2020, 10(12): 1623.

[13] GALLEGO I, SORIA M E, GREGORI J, et al. Synergistic lethal mutagenesis of hepatitis C virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(12): e01653-e01619.

[14] LOGAN C, KOURA D, TAPLITZ R. Updates in infection risk and management in acute leukemia[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2020, 2020(1): 135-139.

[15] SASSEN S D T, MATHÔT R A A, PIETERS R, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of ciprofloxacin prophylaxis in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(8): e281-e288.

[16] ABDULLA A, ROGOUTI O, HUNFELD N G M, et al. Population pharmacokinetics and target attainment of ciprofloxacin in critically ill patients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2020, 76(7): 957-967.

[17] SCHLENDER J F, TEUTONICO D, COBOEKEN K, et al. A physiologically-based pharmacokinetic model to describe ciprofloxacin pharmacokinetics over the entire span of life[J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57(12): 1613-1634.

[18] VAN DEN BROEK A K, PRINS J M, VISSER C E, et al. Systematic review: The bioavailability of orally administered antibiotics during the initial phase of a systemic infection in non-ICU patients[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 285.

[19] LU Y, LIU X F, LIU T R, et al. Celecoxib exerts antitumor effects in HL-60 acute leukemia cells and inhibits autophagy by affecting lysosome function[J]. Biomed Pharmacother, 2016(84): 1551-1557.

[20] CHANDRA S, JANA M, PAHAN K. Aspirin induces lysosomal biogenesis and attenuates amyloid plaque pathology in a mouse model of Alzheimer's disease via PPARα[J]. J Neurosci, 2018, 38(30): 6682-6699.

[21] SCHMIDT J R, GEURTZEN K, VON BERGEN M, et al. Glucocorticoid treatment leads to aberrant ion and macromolecular transport in regenerating zebrafish fins[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019(10): 674.

[22] HOSOKAWA K, ISHIMARU H, WATANABE T, et al. The lysosome pathway degrades CD81 on the cell surface by poly-ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(3): 540-545.

收稿日期：2021-07-27

(本文责编：沈倩)