三种药物相互作用数学模型分析 SAHA 与三氧化二砷联合 用药的细胞毒作用

芦娜,刘振佳,闫征,王楠*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,北京 100050)

摘要:为阐明不同药物相互作用数学模型分析结果的差异来源,观察了 SAHA 与三氧化二砷单独或联合用 药对体外培养的人肿瘤细胞及正常细胞的杀伤作用。通过三种药物相互作用数学模型——Loewe 相加模型、Bliss 独立模型和周氏中效模型,分析了联合用药的实验结果并比较了这三种模型计算结果的区别。结果说明,在量效 曲线拟合方法相同的前提下,这三种模型得到的结论是一致的;量效曲线拟合方法的差异,而非模型本身,是不 同模型分析结论差异的主要来源。对不同的细胞两药联合的结果并不完全一致,在不同的剂量下联合作用的效 果有一定差异。

关键词:药物相互作用;数学模型;SAHA;三氧化二砷;细胞毒性 中图分类号:R911;R969.2 文献标识码:A 文章编号:0513-4870 (2010) 05-0601-07

Three different drug interaction mathematical models used to evaluate the cytotoxicity of SAHA and arsenic trioxide in combination

LU Na, LIU Zhen-jia, YAN Zheng, WANG Nan*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To clarify the source of deviations of drug combination effects evaluated with different drug interaction mathematical models, the cytotoxicity of SAHA and arsenic trioxide and their combinations were observed in a series of human cancer cell lines and a normal cell line. The combined effects were evaluated with three drug interaction models: Loewe Additivity (LA), Bliss Independence (BI) and Chou's Median Effect Model. The evaluations with three different models were further compared with each other. We demonstrated that when dose-response curves were fitted with the same method, similar evaluated results for drug combinations would be derived with different models. The deviations of evaluated effects of drug combinations were attributed to different curve fitting methods used rather than the models themselves. The effects of drug combinations showed discrepancies on different cell lines, and at different combined drug concentrations on same cell line.

Key words: drug interaction; mathematical model; SAHA; arsenic trioxide; cytotoxicity

通过临床前研究特别是体外药敏试验,发现不同化疗药物的协同作用,是研究新型联合用药方案的首选步骤^[1]。而对于药物联合效应的判断,是此类研究的关键。在研究文献中,评价药物联合作用的数学方法有很多,其中在国际上获得认可和广泛应

用的方法^[2-5]可归为三种: Loewe 相加模型 (Loewe Additivity, LA)、Bliss 独立模型 (Bliss Independence, BI) 和周氏的中效模型 (Median Effect Principle)。三种数学模型具有不同的理论基础或计算方法。实际应用中也可能产生不同的计算结果^[6]。

LA 模型通过引入等效剂量的概念,建立了用等 效线方法判断药物相互作用的指标。等效线表示为 $d_A/D_A + d_B/D_B = 1$,其中, d_A 、 d_B 分别为两药合用时的

收稿日期: 2009-12-31.

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2009ZX09301-003-9-1).

^{*}通讯作者 Tel: 86-10-83172984, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: wangnan@imm.ac.cn

剂量, D_A 、 D_B 分别为达到合用效果时所需的单药剂 量。在 LA 模型下, 引入参数 LCI (Loewe Combination Index), 使 LCI = $d_A/D_A + d_B/D_B$ 。当 LCI = 1 时, 认为 两药为相加作用; 当LCI < 1 时, 认为两药为协同作用; 当 LCI > 1 时, 认为两药为拮抗作用。BI 模型采用概 率计算方法, 依据数学公式 $E_{AB} = E_A + E_B - E_A \cdot E_B$ 描 述两药独立无相互作用时的联合效应, 其中 E_A 和 E_B 分别是两药单独使用时产生的效应 (表示为 0~1 之 间的小数)。实际联合效应与理论值的偏差反映两药 为协同或拮抗作用。中效模型根据质量作用定律, 推 导出公式 $d_A/D_A + d_B/D_B = 1$ 作为两药单纯相加的指 标, 并设定 CI (Combination Index) = $d_A/D_A + d_B/D_B$, 以此判断两药是否有相互作用, 其形式、含义与 LA 模型中的 LCI 完全一致。

SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) 作为第 一个批准上市的组蛋白去乙酰化酶抑制剂,已经应 用于临床治疗皮肤型 T 细胞白血病^[7]。临床前研究显 示, SAHA 对其他肿瘤也有治疗作用, 与现有的化疗 药物^[8, 9]或其他具有不同作用机制的药物联合使用, 如酪氨酸激酶抑制剂^[10]、拓扑异构酶 II 抑制剂^[11]、激 素拮抗剂^[12]、分化诱导剂等^[13],可产生协同作用。三 氧化二砷 (arsenic trioxide, As2O3, ATO) 在临床上用 于治疗复发性和难治性急性早幼粒细胞性白血病[14], 实验研究显示,对于实体瘤的治疗,如原发性的肝 癌^[15, 16]、食管癌^[17]、恶性淋巴瘤^[18]也有明显效果。 临床前和临床研究发现, ATO 与一些化疗药物联合应 用具有明确的协同抗肿瘤作用[19-22]。本研究观察了 SAHA 与 ATO 联合应用对体外培养的人肿瘤细胞及 正常细胞的杀伤作用,并用三种模型评价了其联合 效应。结果发现:在量效曲线拟合方法相同的前提下, 这三种模型得到的结论是一致的; 而量效曲线拟合 方法的差异可能会使最终结论相差很大, 甚至相反。

材料与方法

试剂和仪器 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 和 RPMI 1640 培养 基购自 Invitrogen;新生牛血清购自杭州四季青生物 工程材料有限公司;青霉素和链霉素购自华北制药 厂;胰蛋白酶购自 Ameraco, ATO 由本所剧毒药品储 藏中心提供,购自波兰兹沃蒂斯托克砷矿厂; SAHA 由本所吴松教授课题组提供。

多功能酶标仪 (Spectra Max 190) 为美国 Molecular Devices 公司产品。

细胞培养 人胃癌细胞株 BGC-803, 人肝癌细

胞株 BEL-7402、H-7402, 人结肠癌细胞株 HCT-8, 人前列腺癌细胞株 PC-3M, 人鼻咽癌细胞株 KB, 人乳 腺癌细胞株 MCF-7 以及人胚肺成纤维细胞 HELF, 均为本室保存, 在含 10%新生牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素、100 u·mL⁻¹链霉素的 RPMI 1640 培养基, 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。

细胞毒性检测 采用 MTT 法^[23]进行药物的细胞 毒性测定。处于对数生长期的各种细胞、接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入100 µL (细胞数1 200~ 1 500/孔)。24 h 后加入不同浓度的 ATO 或 SAHA, 每 个浓度 4 个复孔。细胞继续在 37 ℃培养 72 h 后, 弃 去培养基,每孔加入含有0.5 mg·mL⁻¹ MTT 的培养液 100 µL, 37 ℃继续培养4h。弃去培养基, 加入 DMSO 150 μL 震荡至噻唑蓝结晶完全溶解, 测定吸收度值, 检测波长为 570 nm,参比波长为 655 nm。噻唑蓝染 料颜色吸收度值的改变标志着细胞活力的改变。计算 ATO、SAHA 不同浓度的抑制率。采用两种方法拟合 量效曲线和计算 IC₅₀。使用 SigmaPlot 软件, 基于四 参数 logistic 方法拟合量效曲线, 计算 IC50; logistic 方 法依据公式 $y = B + (A - B)/(1 + 10^{[x - \log C]m})$ 拟合出以 剂量 x 产生效应 y 的 S 形的量效曲线, 其中 A 为最大 反应水平, B表示最小反应水平, m代表曲线斜率, C 表示 IC50。使用 CompuSyn 软件, 基于中效模型采用 中位法拟合量效曲线, 计算 IC50; 该量效曲线可依据 公式 log[y/(1-y)] = mlog(x) - mlogC转换成一条直线, y为产生的效应值 (0 < y < 1)。

联合用药及数据分析 培养细胞进行药物联合 处理时,固定浓度的 ATO (0.25、0.5 和 1 μmol·L⁻¹), 分别与不同剂量的 SAHA 同时加入相应细胞中,以 观察两药联合应用对细胞的毒性。

采用三种数学模型评价药物相互作用。LA 与 BI 相互作用模型使用软件 CombiTool (version 2.001) 进 行数据处理。除可直接得到 LA 模型下的参数 LCI, CombiTool 还可以同时计算得到 LA 模型下的参数 LCI, CombiTool 还可以同时计算得到 LA 模型下两药无相 互作用的理论效应值 E^{LA},和 BI 模型下的两药无相 互作用的理论效应值 E^{BI},通过反应面 (response surface) 的直观图形方式,观察 LA 与 BI 模型下,两 药无相互作用的理论效应值与实测值的差异,了解 两药有无相互作用。依据原数学模型的设定,实测值 高于反应面时为协同作用,低于反应面时为拮抗作 用,等于反应面时为相加作用。中效模型用软件 CompuSyn (version 1.0.1) 进行数据处理,根据质量 作用定律,直接拟合量效曲线产生相应的 IC₅₀,并计 算 CI 值,判断两药是否有相互作用。依据原数学模 型的设定, CI < 1 时为协同作用, CI > 1 为拮抗作用, CI = 1 时为相加作用。

结果

1 ATO 与 SAHA 的细胞毒性及量效曲线拟合

MTT 实验表明, SAHA 和 ATO 都有剂量依赖性的抑制细胞增殖的作用。采用 Logistic 方法和中位法, 拟合 SAHA 及 ATO 单独作用的量效曲线, 可分

別得到两组 IC₅₀ 值 (表 1)。两组 IC₅₀ 值之间有一定 差异, Logistic 方法下 ATO 的 IC₅₀ 范围是 0.2~2.0 μ mol·L⁻¹, SAHA 的稍高,在 0.8~9 μ mol·L⁻¹;中位法 下 ATO 的 IC₅₀ 的范围是 0.4~4.0 μ mol·L⁻¹, SAHA 的 范围是 0.9~19 μ mol·L⁻¹。

由图 1 中的两组量效曲线可看出, Logistic 方法 拟合得到的曲线 (图 1a) 与实验点更为接近。线性 相关系数 *R* (correlation coefficient) 也表明 (表 1),

Table 1 Cytotoxicity of ATO and SAHA evaluated with Logistic function or Median Effect equation

| Cell line | Logistic function (ATO) | | Median Effect(ATO) | | Logistic function (SAHA) | | Median Effect (SAHA) | |
|-----------|-------------------------|---------|--------------------|---------|--------------------------|---------|----------------------|---------|
| | | | | | | | | |
| | HCT-8 | 0.644 | 0.995 8 | 3.52 | 0.958 4 | 2.68 | 0.992 8 | 2.17 |
| BGC-803 | 0.582 | 0.996 8 | 2.06 | 0.988 6 | 0.958 | 0.996 6 | 1.79 | 0.975 2 |
| BEL-7402 | 0.260 | 0.998 7 | 0.708 | 0.895 4 | 3.62 | 0.998 8 | 5.15 | 0.973 1 |
| H-7402 | 0.736 | 0.995 7 | 1.68 | 0.950 1 | 1.76 | 0.999 2 | 1.72 | 0.988 1 |
| PC-3M | 1.95 | 0.998 4 | 3.74 | 0.892 2 | 1.35 | 0.991 8 | 4.10 | 0.987 5 |
| KB | 0.812 | 0.998 8 | 1.18 | 0.954 2 | 0.894 | 0.991 9 | 0.958 | 0.984 9 |
| MCF-7 | 0.919 | 0.998 6 | 1.36 | 0.862 0 | 1.60 | 0.998 7 | 0.905 | 0.991 5 |
| HELF | 0.746 | 0.998 5 | 0.491 | 0.977 2 | 8.19 | 0.998 5 | 18.3 | 0.919 5 |

^aIC₅₀s (μ mol·L⁻¹) were calculated through dose-response curve fitting with Logistic function or Median Effect equation. Values represent means of 2 to 8 independent MTT assays for each cell line except for HCT-8, PC-3M and HELF which represent a single experiment. ^b*R* is the correlation coefficient for the corresponding curve fitting



Figure 1 Dose-response curves of cytotoxicity of ATO and SAHA. Dose-response curves were fitted with Logistic function (a) or Median Effect equation (b). Single typical results of ATO (circles), SAHA (squares) and the combined (triangles) from MTT assays were shown for each cell line. x: μ mol·L⁻¹

Logistic 方法拟合精度高于中位法。

2 ATO 与 SAHA 联合作用

Logistic 方法是拟合量效曲线最通行的方法,被 主流科学软件广泛采用。软件 CombiTool 提供了输 入 Logistic 拟合或中位法拟合量效曲线结果的选择。 在 LA 模型下,不同曲线拟合方法产生的结论差别很 大。用 Logistic 方法拟合量效曲线时(图 2a),两药合 用对 MCF-7、PC-3M、KB 细胞主要为协同作用;对 BEL-7402 细胞主要为拮抗作用;对 H-7402、BGC-803 和 HELF 细胞,两药在中低剂量合用时主要为协 同作用,高剂量合用时为拮抗作用;对 HCT-8 细胞, 中低剂量 ATO 与中高剂量 SAHA 合用时表现为协同 作用,各剂量 ATO 与低剂量 SAHA 合用时表现为协同 作用,各剂量 ATO 与低剂量 SAHA 合用时表现为协同 作用,各剂量 和TO 与低剂量 SAHA 合用时表现为协同 作用,各剂量 和TO 与低剂量 SAHA 合用时最表现 为拮抗作用。用中位法拟合量效曲线时,ATO 与 SAHA 对大部分细胞在大部分剂量下为协同作用; 对 HELF 细胞主要为拮抗作用(图 2b)。

中效模型下只能用中位法拟合量效曲线。SAHA 与 ATO 联合作用下,对大部分细胞在大部分剂量下为



Figure 3 Combination index (CI) of SAHA and ATO on different cell lines. CI were calculated with Median Effect model at combined SAHA concentrations with ATO of 0.25 μ mol·L⁻¹ (circle), 0.5 μ mol·L⁻¹ (square) and 1 μ mol·L⁻¹ (triangle) on each cell line

协同作用,对 HELF 细胞主要为拮抗作用 (图 3)。比 较中效模型的 CI 与 LA 模型的 LCI,如采用 Logistic 拟合结果对 LA 模型进行运算时,所得 LCI 与中效模 型 (中位法拟合量效曲线)的 CI 差距很大,如图 4a 所 示,3个 ATO 浓度下 LCI 与 CI 的相关系数 R 分别为



Figure 2 Combined effects of SAHA and ATO under LA model. Theoretical response surfaces under LA model of combined cytotoxicity of SAHA (μ mol·L⁻¹) and ATO (μ mol·L⁻¹), with dose-response curves fitted by Logistic function (a) or Median Effect equation (b), were calculated as non-interaction response E^{LA}. The red balls represent the observed experimental results of combined SAHA and ATO at indicated concentrations. Balls above the corresponding surface are considered as synergy, below as antagonism, and within as additive

0.847 5、0.613 4 和 0.227 6; 而采用中位法拟合数据 运算 LA 模型时, 得到的 LCI 值与中效模型 (中位法 拟合量效曲线) 得到的 CI 值基本相同 (图 4b), 3 个 ATO 浓度下的相关系数 *R* 分别为 0.998 7、0.999 7 和 0.999 4。实际上, 虽然 LCI 与 CI 的来源不同——LCI 由 Loewe 直接定义得来, CI 由质量作用定律推导得 来,但是两者的形式和含义是一致的。如果采用相同的数据前处理过程,这两种模型是相同的。图 3 的结论与图 2b 完全一致。

在 BI 模型下,分别用 Logistic 方法和中位法拟合 量效曲线时,获得的结论也相差很大,如图 5 所示。 虽然 BI 模型只能得到理论效应值 E^{BI},无法与 LA 模



Figure 4 Linear correlation of LCI and CI. LCI derived from Logistic function (a) or Median Effect equation (b) was correlated with CI. Each point represents the value of combined SAHA at one of 6 concentrations with ATO at the fixed concentration in 8 cell lines



Figure 5 Combined effects of SAHA and ATO under BI model. Theoretical response surfaces under BI model of cytotoxicity of SAHA (μ mol·L⁻¹) and ATO (μ mol·L⁻¹) in combination, with dose-response curves fitted by Logistic function (a) or Median Effect equation (b), were calculated as non-interaction response E^{BI}. The red balls represent the observed experimental results of combined SAHA and ATO at indicated concentrations. Balls above the corresponding surface are considered as synergy, below as antagonism, and within as additive

型直接进行比较,但软件 CombiTool 经过公式演变得 到 LA 模型的理论效应值 E^{LA},以反应面的形式将两 种模型直接进行比较。用 Logistic 方法拟合单药量效 曲线时,两种模型下得到的结论 (图 2a 和图 5a) 是 完全一致的,只是 BI 模型的理论效应值略小。用中 位法拟合单药量效曲线时,LA 模型与 BI 模型得到结 论 (图 2b 和图 5b) 也是完全一致的,不同的是 BI 模 型的理论效应值略大。

讨论

评价两药相互作用的数学模型有很多种,使用 者选择模型主要是参照类似的研究文献或出于个人 习惯。对这些数学模型进行分析比较有助于更好地理 解和使用这些数学模型。

LA 模型、BI 模型和中效模型是广泛使用的三种 评价药物相互作用的数学模型。这三种模型的理论 基础各不相同。LA 模型通过比较联合用药时两药的 实际剂量与无相互作用时的理论剂量来判断两药相 互作用的形式,着眼点在于剂量的比较。BI 模型是 以概率理论为基础,比较两药联合作用的实际效应 与两药无相互作用时的理论效应,着眼点在于药效 的比较。不同的着眼点造成了这两种方法直接比较 时的困难,软件CombiTool可以得到这两种模型各自 的反应面, 使两者可以直接进行比较^[3]。中效模型以 质量作用定律为基础,对酶动力学模型和受体结合 理论进行数学演绎和归纳得到 CI 公式及中效公式^[24]。 中效公式可以经过推导与生物化学中的四大公式—— 米氏方程、希尔方程、Scatchard 方程、Henderson-Hasselbalch 方程相吻合,这在一定程度上证明了中 效公式的"正确性"^[25]。中效模型中的 CI 是从质量 作用定律推导得到, LA 模型中的 LCI 是由 Loewe 直 接定义得到,虽然两者来源不同,但在形式和含义上 是一致的。本研究中计算得到的结果也证明了这点。

本文运用三种药物相互作用数学模型,两种量效曲线拟合方法对本实验数据进行处理。运用不同的药物相互作用模型计算相同前处理数据时,结果可能在数值上有微小差异,但得出的结论是基本一致的。尽管三种数学模型有理论基础或计算方法的差异,但在本研究中,相同数据的计算结果基本相同,说明这些数学模型具有一定的普适性。

量效曲线拟合方法对模型的评价结果有很大影响,量效曲线拟合方法的不同可能使最终的评价结 果相差很大,甚至得到相反的结论。Logistic 方法是 一种常用的非线性回归方法,广泛应用于多种量效 曲线的拟合,能够适应不同的实验数据。中位法是以 中效模型为基础进行曲线拟合,将实验数据与其量 效关系公式进行匹配 (软件 CompuSyn 说明书)。本 研究表明,Logistic 方法拟合精度明显高于中位法。对 于一般的实验数据,Logistic 回归应是量效曲线拟合 的首选方法。

用 Logistic 方法拟合量效曲线, 以 LA 或 BI 模型 进行分析, 可以看出, SAHA 与 ATO 联合作用, 对不 同的细胞产生的结果并不完全一致; 在同一细胞, 不 同剂量下的联合作用, 其效果也有一定差异。SAHA 作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 可以影响多种转 录因子的表达, 并通过多种途径抑制肿瘤细胞的生 长^[26]。ATO 也可作用于细胞的多个信号通路, 通过多 种途径产生抗肿瘤作用^[27]。SAHA 与 ATO 联合作用 的多重性, 可能与其各自作用机制的复杂性有关。

References

- Vazquez A. Optimal drug combinations and minimal hitting sets [J]. BMC Syst Biol, 2009, 6: 3–81.
- [2] Lee JJ, Kong M, Ayers GD, et al. Interaction index and different methods for determining drug interaction in combination therapy [J]. J Biopharm Stat, 2007, 17: 461–480.
- [3] Dressler V, Müller G, Sühnel J. CombiTool—a new computer program for analyzing combination experiments with biologically active agents [J]. Comput Biomed Res, 1999, 32: 145– 160.
- [4] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. Adv Enzyme Regul, 1984, 22: 27–55.
- [5] Berenbaum MC. What is synergy? [J]. Pharmacol Rev, 1989, 41: 93-141.
- [6] Zhao JY, Lu N, Yan Z, et al. SAHA and curcumin combinations co-enhance histone acetylation in human cancer cells but operate antagonistically in exerting cytotoxic effects [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, in press.
- [7] Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent [J]. Oncogene, 2007, 26: 1351–1356.
- [8] Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, et al. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review [J]. Mol Pharmacol, 2005, 68: 917–932.
- [9] Bots M, Johnstone RW. Rational combinations using HDAC inhibitors [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 3970–3977.
- [10] Nimmanapalli R, Fuino L, Stobaugh C, et al. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Ablpositive human acute leukemia cells [J]. Blood, 2003, 101:

3236-3239.

- [11] Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, et al. Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid [J]. J Cell Biochem, 2004, 92: 223–237.
- [12] Marrocco DL, Tilley WD, Bianco-Miotto T, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) represses androgen receptor expression and acts synergistically with an androgen receptor antagonist to inhibit prostate cancer cell proliferation [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6: 51–60.
- Spiller SE, Ditzler SH, Pullar BJ, et al. Response of preclinical medulloblastoma models to combination therapy with 13-*cis* retinoic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) [J].
 J Neurooncol, 2008, 87: 133–141.
- [14] Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, et al. All-trans retinoic acid/As₂O₃ combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 5328–5335.
- [15] Qian J, Qin SK, He ZM. Arsenic trioxide for the treatment of medium and advanced primary liver cancer [J]. Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志), 2002, 10: 63.
- [16] Xiang Y, Huang FM. The clinical study of arsenic trioxide on the treatment of advanced primary liver cancer [J]. Chin Clin Oncol (临床肿瘤学杂志), 2003, 8: 36-37.
- [17] Jiao ZM, Wang JS, Du JF. Arsenious acid injection in treatment of recurrence and metastasis of esophageal carcinoma in clinical study [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医 结合杂志), 2002, 22: 713-714.
- [18] Chen DF, Li R, Liang Y, et al. Preliminary study on the effect of arsenic trioxide to malignant lymphoma cell lines [J]. Tianjin Med J (天津医药), 2003, 31: 210-212.
- [19] Bazarbachi A, El-Sabban ME, Nasr R, et al. Arsenic trioxide

and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells [J]. Blood, 1999, 93: 278–283.

- [20] Berenson JR, Matous J, Swift RA, et al. A phase I/II study of arsenic trioxide/bortezomib/ascorbic acid combination therapy for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 1762–1768.
- [21] Berenson JR, Boccia R, Siegel D, et al. Efficacy and safety of melphalan, arsenic trioxide and ascorbic acid combination therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a prospective, multicentre, phase II, single-arm study [J]. Br J Haematol, 2006, 135: 174–183.
- [22] Chen G, Wang Y, Huang H, et al. Combination of DNA methylation inhibitor 5-azacytidine and arsenic trioxide has synergistic activity in myeloma [J]. Eur J Haematol, 2009, 82: 176–183.
- [23] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55–63.
- [24] Chou TC, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitors of Michaelis-Menten and higher order kinetic systems with two or more mutually exclusive and non-exclusive inhibitors [J]. Eur J Biochem, 1981, 115:207–216.
- [25] Chou TC. On the determination of availability of ligand binding sites in steady-state systems [J]. J Theor Biol, 1977, 65: 345–356.
- [26] Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action [J]. Oncogene, 2007, 26: 5541–5552.
- [27] Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide [J]. Cancer Res, 2002, 62: 3893– 3903.