

力达霉素-单抗 Fab' 片段不同连接偶联物的抗肿瘤作用比较

封云¹, 邵荣光^{2*}, 戴垚², 李保卫², 何红伟², 任开环²

(1. 江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013;

2. 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: 研究力达霉素与抗IV型胶原酶单抗的不同连接键的小型化免疫偶联物的抗肿瘤作用。制备长短链的二硫键以及硫醚键抗肿瘤抗生素力达霉素 (LDM) 与抗IV型胶原酶单抗 3G11 的 Fab' 片段连接的免疫偶联物, ELISA 法测定偶联物的免疫活性, 体外细胞克隆形成测定和体内荷瘤裸小鼠模型观察两种偶联物的抗肿瘤作用。体外研究显示, Fab'-LDM 偶联物部分保留了抗IV型胶原酶单抗 3G11 对抗原的亲合力, 硫醚键偶联物对体外培养的人纤维肉瘤 HT-1080 细胞的杀伤作用强于 LDM 和二硫键偶联物。实验结果显示, LDM 等剂量条件下硫醚键偶联物 Fab'-SSMPB-LDM 和 Fab'-SMBS-LDM 组的抑瘤率分别为 87.7%和 78.0%, 二硫键偶联物 Fab'-SPDP-LDM 和 Fab'-LCSPDP-LDM 组分别为 74.8%和 72.3%, 游离 LDM 组为 70.9%, 相比较长连接键的硫醚键偶联物抑瘤作用显著增强。Fab'-SSMPB-LDM 和 Fab'-SMBS-LDM 组动物的平均生存时间延长为 165.8%和 145.2%, Fab'-SPDP-LDM 和 Fab'-LCSPDP-LDM 组分别为 82.2%和 107.5%, LDM 组为 71.9%。与二硫键偶联物组比较, 硫醚键偶联物组能显著延长荷瘤鼠的生存期; 长硫醚键偶联物抗肿瘤作用和对荷瘤动物生存期延长作用强于短硫醚键偶联物。长链硫醚键偶联物 Fab'-SSMPB-LDM 肿瘤生长抑制作用提高, 荷瘤动物生存期显著延长, 有望开发为新的肿瘤治疗药物。

关键词: 力达霉素; IV型胶原酶; 靶向治疗; 小型化; 偶联剂

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0571-05

Comparison of the antitumor activities of immunoconjugates composed of lidamycin and monoclonal antibody Fab' fragment with different linkers

FENG Yun¹, SHAO Rong-guang^{2*}, DAI Yao², LI Bao-wei², HE Hong-wei², REN Kai-huan²

(1. School of Medical Science and Laboratory Medicine of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To investigate the antitumor activities of the immunoconjugates composed of anti-type IV collagenase monoclonal antibody Fab' fragment and lidamycin (LDM) prepared with different linkers. The immunoconjugates were prepared by linking Fab' to lysine-69 of LDM apoprotein by SPDP, LCSPDP, SMBS or SSMPB as the intermediate drug linkers. Immunoreactivities of the conjugates were determined by ELISA. The cytotoxicities of the conjugates were examined by clonogenic assay. *In vivo* antitumor effects of the conjugates were evaluated in nude mice bearing subcutaneously implanted HT-1080 tumor. ELISA assay showed that the conjugates retained part of the immunoreactivity of 3G11 against the antigen. The cytotoxicities of the Fab'-SMBS-LDM and Fab'-SSMPB-LDM to HT-1080 cells were significantly potent, compared with Fab'-SPDP-LDM, Fab'-LCSPDP-LDM and free LDM. In animal models at the same condition, free LDM, Fab'-SPDP-LDM and Fab'-LCSPDP-LDM inhibited the growth of HT-1080 tumor by 70.9%, 74.8% and 72.3%, while

收稿日期: 2009-11-25.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2009CB521807); 国家自然科学基金资助项目 (30472107, 30701031); 江苏大学高级专业人才科研启动基金资助项目 (06jdg045).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63026956, E-mail: shaor@public3.bta.net.cn

Fab'-SMBS-LDM and Fab'-SSMPB-LDM reached 78.0% and 87.7%, respectively. The median survival time of the mice treated with free LDM, Fab'-SPDP-LDM and Fab'-LCSPDP-LDM were prolonged by 71.9%, 82.2% and 107.5%, respectively, compared with that of untreated group. Whereas, the median survival time of Fab'-SMBS-LDM and Fab'-SSMPB-LDM were prolonged by 145.2% and 165.8%, respectively, indicating that Fab'-SSMPB-LDM was more effective than Fab'-SMBS-LDM in tumor suppression and life span prolongation. Fab'-SSMPB-LDM has more marked selective antitumor efficacy and lower toxicity, and might be a novel candidate for cancer therapy.

Key words: lidamycin; type IV collagenase; target therapy; miniaturization; linker

目前的治疗性单克隆抗体(单抗)多为完整单抗免疫偶联物。但完整单抗免疫偶联物分子庞大,对实体瘤穿透力弱,体内分布特异性不高,易引发人抗鼠抗体反应,因此临床疗效不佳,寻找合理的途径克服上述不足是单抗靶向药物发展的关键。新高效弹头药物,新靶点的发现以及抗体的小型化、高效化是解决问题的思路^[1]。此外,单抗与弹头药物的链接方法也是影响抗体免疫偶联物活性的重要因素之一^[2, 3]。烯二炔类抗肿瘤抗生素力达霉素(lidamycin, LDM, 又称 C-1027)抗肿瘤活性高,适合作为抗肿瘤药物的“弹头”药物^[4, 5]。作者曾报道了完整抗IV型胶原酶单抗与力达霉素偶联物的选择性抗肿瘤作用^[6]。在此基础上,作者进一步将完整单抗小型化,用不同连接剂制备了不同偶联物,并比较研究了不同小型化偶联物的抗肿瘤活性。

材料与方法

药物及试剂 LDM 由中国医学科学院医药生物技术研究所金莲舫教授提供。抗IV型胶原酶单抗3G11为中国医学科学院医药生物技术研究所肿瘤室制备。IV型胶原酶、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体、四氮唑蓝(MTT)等购自Sigma公司;2-亚氨基四氢噻吩(2-IT)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺-6-[3'-(2-吡啶二硫基)丙酰胺]己酸酯(LCSPDP)、间-马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基磺琥珀酰亚胺酯(SMBS)和4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酸-N-羟基磺琥珀酰亚胺酯均购自Pierce公司;Sephacryl S-200 HR 丙烯葡聚糖凝胶和PD-10脱盐柱购自Pharmacia公司;RPMI 1640干粉为Gibco公司产品。其他生化试剂均为分析纯。

肿瘤细胞株和实验动物 人纤维肉瘤 HT-1080 细胞由中国医学科学院医药生物技术研究所肿瘤室传代保存。实验用 BALB/c 裸小鼠, 6~8 周龄, 体重 16~20 g, 由北京维通利华实验技术有限公司提供(合格证号: SCXK(京) 2008-00030)。

单抗 Fab' 与 LDM 免疫偶联物 (Fab'-LDM) 的制备 LDM 溶解于转胺缓冲液中室温搅拌反应 1 h, PD-10 柱脱盐, 经浓缩离心后得到 N 端 1 位丙氨酸 α -氨基转变为酮基的 LDM。Fab'-SPDP-LDM 或 Fab'-LCSPDP-LDM 的制备: 将修饰后的 LDM 加入二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解的 SPDP/LCSPDP, 室温反应 30 min, PD-10 柱脱盐除去未反应的 SPDP, 浓缩后立即与还原脱盐的 Fab' 反应, 室温过夜。Fab'-SMBS-LDM 或 Fab'-SSMPB-LDM 的制备: 将上述修饰后的 LDM 加入二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解的小分子交联剂 SMBS/SSMPB, 将两者混合室温反应 0.5~1 h, 脱盐浓缩离心后立即与还原脱盐的 Fab' 混合反应 30 min。Sephacryl S-200 HR 凝胶柱纯化偶联物。

偶联物中各组分的分子比计算 根据 LDM 在 341 nm 附近有特征吸收的肩峰, 将 Fab'-LDM 稀释至一定浓度后检测 341 nm 吸收, 扣除相应浓度 Fab' 的吸收, 其差值对应 LDM 在 341 nm 的标准曲线即可得到偶联物中 LDM 的含量; 进一步得到相应的辅基蛋白的含量, 再根据 LDM 辅基蛋白的含量推算出其在 280 nm 的吸收。根据光吸收的加合性, 用偶联物在 280 nm 的吸收减去 LDM 辅基蛋白在 280 nm 的吸收计算出单抗 Fab' 在 280 nm 的吸收, 进而得到 Fab' 的含量, 再计算出 Fab' 和 LDM 的分子比^[7]。

偶联物的免疫活性分析 以 Bradford 法进行蛋白定量, 蛋白浓度调整一致后, 采用间接 ELISA 法测定 $F(ab')_2$ 和 Fab'-LDM 对 IV 型胶原酶和 HT-1080 细胞的免疫活性, 计算亲和常数 $K_a = 1/K_D$ 。 K_D ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为解离常数, K_D 越大时亲和力越小, 两者呈反比。用 D 表示抗体药物, R 表示抗原受体, 根据 $K_D = [D][R]/[DR]$, $[R_T] = [R] + [DR]$ (R_T 为抗原受体总量), 推得 $[DR]/[R_T] = [D]/(K_D + [D])$ 即 $1/[DR] = K_D/[D][R_T] + 1/[R_T]$ 。以 $1/[DR]$ 为纵座标、 $1/[D]$ 为横座标进行双倒数作图得直线, 斜率为 $K_D/[R_T]$, 即 $K_D/E_{\max}$, 与纵座标交点为 $1/[R_T]$, 即 $1/E_{\max}$, 与横座标交点为 $-1/K_D$ 。

体外细胞增殖抑制实验 取对数生长期的

HT-1080 细胞, 以细胞数 50/孔接种于 24 孔培养板, 37 °C、CO₂ 细胞培养箱培养 24 h。加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μ L 稀释的药物, 每个浓度 4 孔, 无药对照孔加无血清 RPMI 1640 培养液 200 μ L, 继续培养 1 h。轻轻吸去培养液, 每孔加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μ L 轻轻洗涤 1 次, 然后每孔加入新鲜的 RPMI 1640 培养液 1 mL, 在 CO₂ 细胞培养箱内继续培养 6 d, 在倒置显微镜下计数每孔克隆数 (大于 30 个细胞计为 1 个克隆), 计算克隆形成百分率^[8]。

Fab'-LDM 偶联物对免疫缺陷小鼠移植性人纤维肉瘤 HT-1080 的治疗作用 将 HT-1080 细胞接种至 BALB/c 裸小鼠右侧腋窝。传代后取新鲜肿瘤组织接种裸小鼠右侧腋窝皮下, 接种后 1d、8d 静脉注射给药。实验期间每 3 天称体重 1 次并测定肿瘤大小, 根据公式 $V = ab^2/2$ 计算瘤块的体积, a 为长径, b 为短径。同时每天观察动物的死亡情况^[9]。

统计学处理 皮下肿瘤体积以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性分析采用 t 检验。

结果

1 Fab'-LDM 偶联物的制备

LDM 辅基蛋白 N 端 1 位丙氨酸 α 伯氨基和转胺缓冲液中的乙醛酸钠反应转变为羰基而封闭, 其 69 位赖氨酸的 ϵ 伯氨基和交联剂 SPDP/LCSPDP 反应, 在辅基蛋白上引入吡啶二硫基 PDP-LDM; 或者将 LDM α 伯氨基封闭后和 SMBS/SSMPB 反应, 在辅基蛋白上引入马来酰亚胺基 MB-LDM, 单抗经 2-IT 的修饰引入了巯基, 巯基化的单抗 Fab'-SH 与 PDP-LDM 反应或者 MB-LDM 反应, 最终通过二硫键或者硫醚键将 Fab' 和 LDM 连接起来。两种方法偶联的 Fab'-LDM 偶联物的结构如图 1 所示。

偶联物通过 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱纯化, 得到洗脱曲线 (图 2), 其中第一峰为偶联物, 第二峰为

LDM。通过分光光度法测定的偶联物 A_{280} 和 A_{341} 值计算 LDM 和 Fab' 的比例, 结果 Fab' 在 341 nm 几乎无吸收, 所以 $\epsilon_{\text{Fab}'(1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})}^{341} \approx 0$ 。绘制 LDM 和 Fab' 在 280 和 341 nm 处光吸收的标准曲线, 求出吸光系数 ϵ ($\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 分别为 $\epsilon_{\text{LDM}(1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})}^{341} = 1.46$, $\epsilon_{\text{LDM}(1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})}^{280} = 1.05$, $\epsilon_{\text{Fab}'(1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})}^{280} = 1.45$ 。根据公式得到偶联物分子中 LDM 和 Fab' 的分子比约为 1:2。由于两种方法得到的偶联物的凝胶过滤纯化情况以及全波长扫描图谱相似, 以下仅列出其中的一个批次偶联物的分离情况。

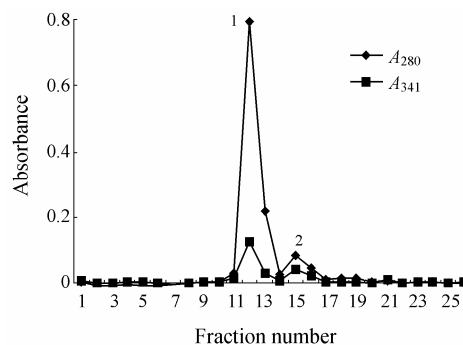


Figure 2 Separation of Fab'-LDM immunoconjugates on Sephacryl S-200 size exclusion chromatography. The column is 30 cm long with the diameter of 1 cm. Peak 1 is the Fab'-LDM, peak 2 is the free LDM

2 Fab'-LDM 偶联物的免疫活性

ELISA 检测亲和常数结果表明, 抗 IV 型胶原酶单抗 3G11 及其 F(ab')₂ 片段和 Fab'-SMBS-LDM、Fab'-SSMPB-LDM、Fab'-SPDP-LDM、Fab'-LCSPDP-LDM 对于 HT-1080 细胞的亲和常数 K_a 分别为 2.6×10^{-7} 、 2.4×10^{-7} 、 7.4×10^{-7} 、 2.6×10^{-7} 、 4.3×10^{-7} 和 $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}$, 抗体片段及片段偶联物保留了单抗对抗原高表达细胞的免疫反应性。长连接键偶联物 Fab'-SSMPB-LDM 及 Fab'-LCSPDP-LDM 对抗原的亲合力略高于短连接键偶联物 Fab'-SMBS-LDM 和 Fab'-SPDP-LDM (图 3)。

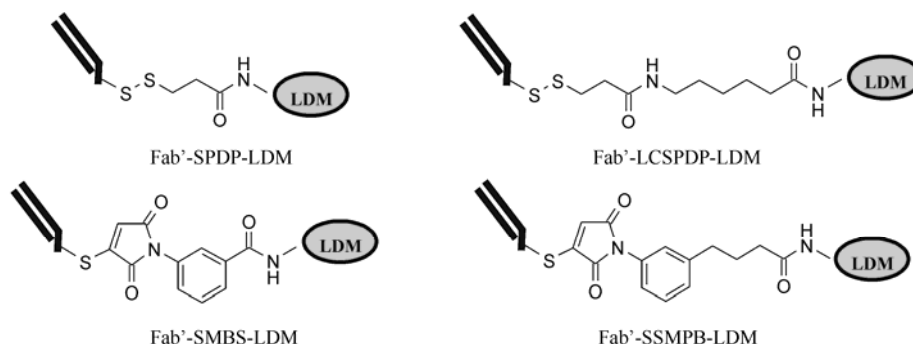


Figure 1 Structures of various Fab'-LDM immunoconjugates

3 Fab'-LDM 偶联物对体外培养 HT-1080 细胞的增殖抑制作用

比较 Fab'-LDM 偶联物和游离 LDM 对靶细胞 HT-1080 的细胞集落生成的抑制作用, 结果表明, Fab'-SPDP-LDM、Fab'-LCSPDP-LDM、Fab'-SMBS-LDM、Fab'-SSMPB-LDM 和 LDM 抑制 50% 集落生成的浓度 (IC_{50}) 分别为 0.77、0.11、0.05、0.02 和 0.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。偶联物的作用强于 LDM, 其中以 SSMPB 为交联剂的

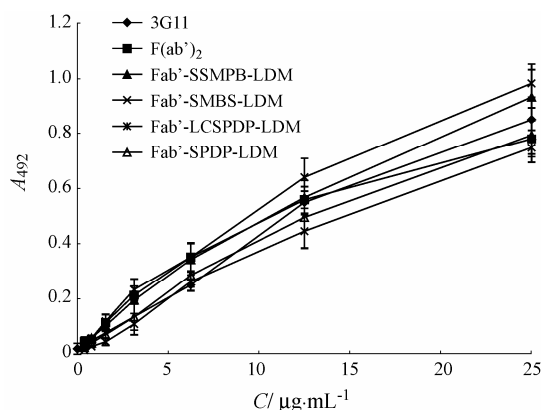


Figure 3 The immunoreactivity of $F(ab')_2$ and Fab'-LDM immunoconjugates with human fibrosarcoma HT-1080 cells in ELISA

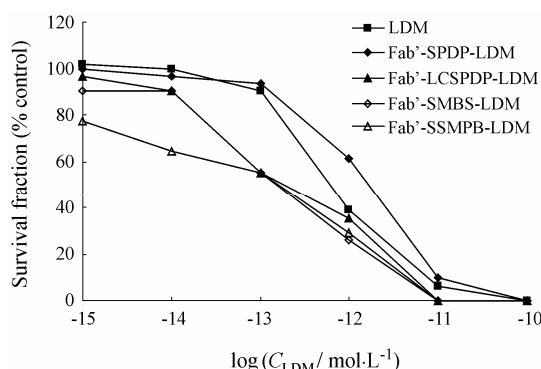


Figure 4 Cytotoxicity of LDM and Fab'-LDM to HT-1080 cells detected by clonogenic assay. Values for SDs of each point were $<10\%$

偶联物对靶细胞的克隆形成抑制作用最强, 为游离 LDM 的约 31 倍 (图 4)。

4 Fab'-LDM 偶联物对免疫缺陷小鼠移植性人纤维肉瘤 HT-1080 的治疗作用

裸鼠皮下接种 HT-1080 瘤块 24 h 后静脉注射 LDM 及偶联物一次, 第 8 天再给药一次, 在实验的第 28 天, 计算各组的抑瘤率 (图 5 和表 1)。结果表明: 与对照组相比, Fab'-SPDP-LDM ($P = 0.0098$)、Fab'-LCSPDP-LDM ($P = 0.0005$)、Fab'-SMBS-LDM ($P = 0.0036$)、Fab'-SSMPB-LDM ($P = 0.0008$) 和 LDM ($P = 0.0004$) 对 HT-1080 移植瘤的生长均具有显著抑制作用, 其中 Fab'-SSMPB-LDM 偶联物的抑瘤率最高 (与 LDM 组相比有显著性差异, $P = 0.044$)。

生存期观察提示偶联物和 LDM 均能明显延长生存期: 与 LDM 相比, 偶联物 Fab'-LCSPDP-LDM ($P = 0.045$)、Fab'-SMBS-LDM ($P = 0.0005$) 和 Fab'-SSMPB-LDM ($P = 0.0016$) 对 HT-1080 肿瘤移植裸鼠的生存期延长作用有显著差异; 与 Fab'-SPDP-LDM、Fab'-LCSPDP-LDM 组分别相比, Fab'-SMBS-LDM ($P = 0.014$, $P = 0.014$)、Fab'-SSMPB-LDM ($P = 0.016$, $P =$

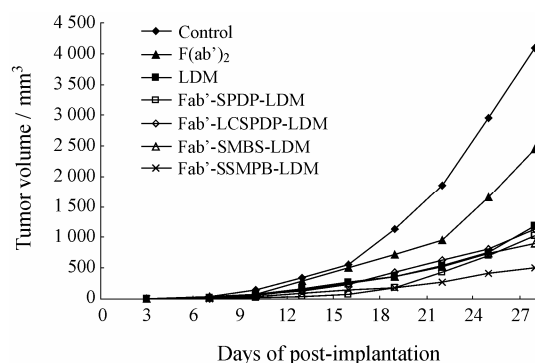


Figure 5 Fab'-LDM conjugate ($0.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), $F(ab')_2$ ($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and LDM ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) inhibited the growth of HT-1080 in nude mice. The molar dose of LDM in Fab'-LDM conjugate is equal to that of free LDM. Drugs were administered $iv\times 2$ on day 1 and 8

Table 1 Inhibitory effects of the immunoconjugates on the growth of fibrosarcoma in nude mice

Group	Dose/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	No. of mice		Body weight change/g	Tumor volume/ cm^3	Inhibition /%
		Initial	End			
Control	0.0	5	4	+ 1.95	4.09 ± 0.89	0.0
$F(ab')_2$	0.5	5	5	+ 2.93	2.45 ± 0.49	39.9 [△]
LDM	0.1	5	5	+ 0.28	1.19 ± 0.44	70.9 ^{△△}
Fab'-SPDP-LDM	0.6	5	5	+ 1.97	1.03 ± 0.38	74.8 ^{△△}
Fab'-LCSPDP-LDM	0.6	5	5	+ 0.58	1.13 ± 0.40	72.3 ^{△△}
Fab'-SMBS-LDM	0.6	5	5	+ 0.50	0.90 ± 0.30	78.0 ^{△△}
Fab'-SSMPB-LDM	0.6	5	5	+ 1.82	0.50 ± 0.17	87.7 ^{△△*}

Drugs were administered $iv\times 2$ on day 1 and 8. [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs LDM group in Student's t -test. The results were recorded on day 28 after tumor inoculation (day 0)

0.018) 偶联物的生存期延长作用提高, 组间比较具有显著性差异 (图 6 和表 2)。

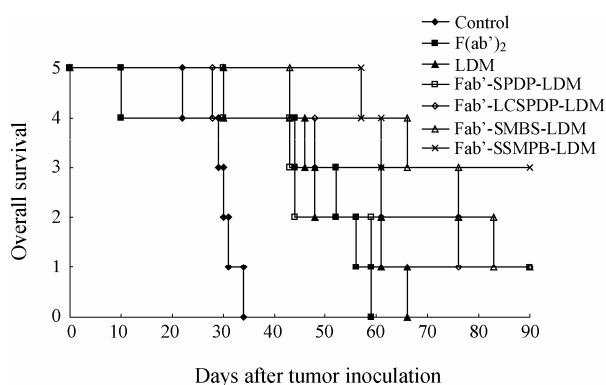


Figure 6 Fab'-LDM conjugates increased the survival of mice bearing human fibrosarcoma HT-1080 xenografts. Drugs were administered iv $\times 2$ on day 1 and 8

Table 2 Effects of Fab'-LDM and LDM on the survival time of nude mice bearing HT-1080

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Mean survival/d	ILS ^a /%	Long term survivor ^b
Control	0	29.2	0	0
F(ab') ₂	0.5	44.2	51.4	0
LDM	0.1	50.2	71.9	0
Fab'-SPDP-LDM	0.6	53.2	82.2	1
Fab'-LCSPDP-LDM	0.6	60.6	107.5 [*]	1
Fab'-SMBS-LDM	0.6	71.6	145.2 ^{**△}	1
Fab'-SSMPB-LDM	0.6	77.6	165.8 ^{**△}	3

^aILS: Increase of life span = $(T-C)/C$; C: Mean survival days of control; T: Mean survival days of treatment group. ^bAnimal survived over 90 days were recorded as long term survivor. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs LDM group; [△] $P < 0.05$ vs Fab'-SPDP-LDM & Fab'-LCSPDP-LDM group in Student's *t*-test

讨论

作者曾研究并报道了抗Ⅳ型胶原酶单抗和高效烯二炔类抗肿瘤抗生素 LDM 偶联物的抗肿瘤作用。在此基础上, 作者去除抗体 Fc 段, 将其小型化, 并进一步研究不同连接方法对偶联物体内体外抗肿瘤活性的影响。

研究表明, 小型化的 Fab'-LDM 偶联物对Ⅳ型胶原酶高表达的 HT-1080 细胞表现出良好的免疫反应性。以 LCSPDP、SSMPB 为连接键的长连接键偶联物对 HT-1080 细胞的亲和力高于短连接键偶联物, 长连接键可能降低了 LDM 对 Fab' 抗原结合位点的影响。已有研究显示: 以 SMBS 连接得到的不易断裂的硫醚键连接的偶联物比以 SPDP 连接得到的可切割的二硫键连接的偶联物稳定, 并且在体内代谢相对较慢, 同时体内抗肿瘤活性也有差异^[2, 3]。本研究比较

了长度不同的硫醚键及二硫键偶联物的抗肿瘤活性的差异, 结果表明长链的硫醚键偶联物体内体外抗肿瘤作用更强, 选择性更高, 毒性更低。这可能是由于长连接键偶联物的亲和力提高, 同时硫醚键的稳定性有助于防止偶联物在体内运输过程中发生弹头脱落。此外, 体内试验显示 F(ab')₂ 有很好的抑制肿瘤生长作用 (结果另文报道), 这种作用可能和 F(ab')₂ 阻断Ⅳ型胶原酶, 抗侵袭转移作用有关。

上述研究结果提示, 新制备的小型化硫醚键偶联物具有比游离 LDM 以及二硫键偶联物更高的疗效和更低的毒性。长链的硫醚键偶联物更适合在体内应用, 有可能开发为新的抗肿瘤靶向药物。

References

- [1] Zhen YS. Antibody drugs and tumor target therapy [J]. Med Res J (医学研究杂志), 2007, 36: 1-2.
- [2] Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, et al. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker [J]. Bioconjug Chem, 2002, 13: 40-46.
- [3] Ji Y, He Y, Chen X, et al. Immunotoxins prepared with different coupling methods and their characteristics *in vitro* and *in vivo* [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1991, 18: 443-447.
- [4] Shao RG, Zhen YS. Research and development of enediyne antitumor antibiotics [J]. China Prescr Drug (中国处方药), 2006, 57: 6-9.
- [5] Shao RG, Zhen YS. Relationship between the molecular composition of C1027, a new macromolecular antibiotic with enediyne chromophore, and its antitumor activity [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1995, 30: 336-342.
- [6] Feng Y, Zhen YS, Dai Y, et al. The antitumor activities of various immunoconjugates composed of lidamycin and anti-type IV collagenase monoclonal antibody [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 704-709.
- [7] Dai Y, Liu XJ, Zhen YS. Antitumor effect of the novel immunoconjugate composed of pinyangmycin and anti-type IV collagenase monoclonal antibody [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 41-46.
- [8] Jiang GS, Tong QS, Zeng FQ, et al. Methyl jasmonate induces apoptosis of human neuroblastoma cell line BE(2)-C and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 584-590.
- [9] Wang FQ, Shang BY, Zhen YS. Antitumor effects of the immunoconjugate composed of lidamycin and monoclonal antibody 3G11 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 515-519.