

# Bullatacin 克服肿瘤多药抗药性作用及其机理

符立梧<sup>\*</sup>, 谭炳炎<sup>1</sup>, 梁永钜, 潘启超, 黄红兵, 冯公侃

(中山医科大学肿瘤防治中心, 广州 510060; <sup>1</sup> 中山医科大学分子医学中心, 广州 510089)

**摘要** 目的:探讨 bullatacin 克服肿瘤多药抗药性(MDR)的作用及其机制。方法:以两对 MDR 细胞株及其相应的敏感株进行对比,比较两种细胞株的细胞毒、Fura-2 及阿霉素细胞内积累。结果:bullatacin 不仅对敏感细胞株具有很强的细胞毒活性,而且对 MDR 细胞株也同样具有很强的细胞毒活性,不受抗药性的影响。bullatacin 能使 MDR 细胞内 Fura-2 的积累增加;也能增加 MDR 细胞内阿霉素的积累。结论:bullatacin 具有克服 MDR 的作用,其作用机理与 bullatacin 影响 MDR 细胞 P-gp 的功能,使 MDR 细胞内抗癌药物积累增加有关。

**关键词** Bullatacin; 多药抗药性; P-糖蛋白; 阿霉素; 新型钙离子荧光指示剂(Fura-2)

---

多药抗药性(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞接触一种来源于天然的抗肿瘤药物并产生

抗药性时,同时对结构和作用机理不同的多种天然来源的抗肿瘤药物产生交叉抗药性。已证实 MDR 的主要原因是 P-糖蛋白(permeability glycoprotein, P-gp)过度表达<sup>[1]</sup>。实际上, P-gp 是一种依赖于 ATP 的外排泵,能将抗癌药物从肿瘤细胞内排至细

---

收稿日期:1998-07-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800182)

<sup>\*</sup> Tel:(020)87765368-733, Fax:(020)87754506, E-mail:fuliwu

@hot mail .com

胞外,从而使肿瘤细胞内的抗癌药物浓度降低,因而产生 MDR。MDR 是肿瘤化疗失败的主要原因之一,也是肿瘤化疗领域急需解决的难题。

理论上,克服 MDR 有二种途径,(1) 寻找一些高效、低毒、能用于临床的 MDR 逆转剂。为了寻找逆转剂,人们已进行了较广泛的研究,发现部分钙通道的阻断剂、钙调素的抑制剂、环孢霉素类以及多种多样的亲脂性化合物在体外均有部分或完全逆转 MDR 的作用<sup>[2]</sup>。但却不能用于临床,这主要是由于其毒副作用在体内不能达到逆转 MDR 的有效血药浓度。到目前为止,尚未找到可用于临床的理想逆转剂。(2) 寻找一些对 MDR 细胞无抗药性的新的抗癌药物。目前正处于起步阶段,可能成为克服 MDR 的新的研究方向。

自 1982 年 Jolad 等<sup>[3]</sup>发现第一个番荔枝内酯化合物后,研究进展很快,至今已发现这类化合物达 200 多种。抗癌活性强的结构为邻双四氢呋喃类化合物。其中抗癌活性最强的化合物是从 *Annona bullata* 树皮分离出来的 bullatacin, 据美国国立癌症研究所(NCI)对 bullatacin 的研究报道,研究了对于人的鼻咽癌 9KB 细胞株、人肺癌 A549 细胞株及结肠癌 HT-29 细胞株的作用,IC<sub>50</sub> 分别为  $6.2 \times$

$10^{-14}$ ,  $1.3 \times 10^{-13}$ ,  $1.0 \times 10^{-12}$   $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;L1210 鼠白血病体内试验表明,bullatacin 抗白血病作用是紫杉醇的 300 倍(按重量比计算)<sup>[4,5]</sup>。是目前报道中体内外抗癌活性很强的化合物之一。

番荔枝内酯类化合物的作用靶点为肿瘤细胞的线粒体。其机理为特异性地抑制肿瘤细胞的线粒体 NADH 的还原酶或氧化酶,从而阻断电子的传递,减少 ATP 的生成,抑制线粒体的供能功能<sup>[6]</sup>。

P-gp 是一种依赖于 ATP 的抗癌药物外排泵,而番荔枝内酯的作用是阻断呼吸链的电子传递,使细胞内 ATP 迅速减少。本文研究番荔枝内酯对 MDR 肿瘤有效是否与其使 MDR 细胞内的 ATP 迅速降低,从而 P-gp 的功能降低或丧失,不能将抗癌药物泵出有关?

## 材 料 与 方 法

药品 Bullatacin(图 1)由华南植物研究所陈文森教授提供,以二甲基亚砷溶解,用生理盐水配成所需浓度。噻唑蓝(MTT),Fura 2-AM,Fura 2 均为 Singma 公司产品;阿霉素为华明公司产品。

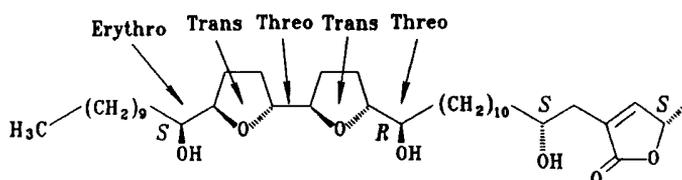


Fig 1 Structure of bullatacin.

细胞培养 MCF-7/ADR, MCF-7 细胞株由北京肿瘤研究所刘叙仪教授赠送(来源于美国国立癌症研究所),已证实 MCF-7/ADR 能稳定表达 P-糖蛋白,具有典型的多药抗药性,对阿霉素的抗药性是敏感株的 66 倍。培养于 DMEM 培养液中,内含 10% 小牛血清,青霉素  $100 \text{ u} \cdot \text{ml}^{-1}$  和链霉素  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,置于  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养。KB 细胞和 KBv200 细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液内,置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  温箱中培养。KBv200 细胞是用对长春新碱(VCR)敏感的 KB 细胞为亲本,通过诱变剂甲基磺酸乙酯刺激,然后在培养液中加入浓度递增的 VCR 诱导而得,在 VCR 浓度为  $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时生长良好,较 KB 细胞对 VCR 耐药 100 倍。两细胞均为中国医学科学院药物研究所提供。

方法 细胞生长抑制试验以噻唑蓝(MTT)法<sup>[7]</sup>进行;P-gp 功能测定以 Fura 2-AM 法<sup>[8]</sup>;细胞内 ADM 积累量的测定按荧光分光光度计测定方法<sup>[9]</sup>。

## 结 果

### 1 Bullatacin 对 MDR 细胞株及相应的敏感株生长的影响

结果表明 bullatacin 有较强的体外抗肿瘤活性。同时,以有 MDR 的细胞株与敏感细胞株(MCF-7/ADR 与 MCF-7, KBv200 与 KB)的 IC<sub>50</sub> 进行比较,均无显著性差别。表明 MDR 细胞株对 bullatacin 无抗药性(表 1)。

**Tab 1 Bullatacin cytotoxicity to MCF 7/ ADR cells, MCF7 cells, KBv200 cells and KB cells as determined by MTT assay**

Cell	IC <sub>50</sub> of bullatacin/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
MCF-7	$3.67 \times 10^{-4}$ ( $1.00 \times 10^{-4} \sim 6.33 \times 10^{-4}$ )
MCF-7/ ADR	$3.73 \times 10^{-4}$ ( $0.42 \times 10^{-4} \sim 7.04 \times 10^{-4}$ )
KB	$2.50 \times 10^{-5}$ ( $1.40 \times 10^{-5} \sim 3.60 \times 10^{-5}$ )
KBv200	$2.43 \times 10^{-5}$ ( $0.86 \times 10^{-5} \sim 4.00 \times 10^{-5}$ )

Mean IC<sub>50</sub> values were obtained from three independent experiments, in which cells were incubated with various concentrations of bullatacin. The numbers in parentheses represent 95% confidence limits. \*  $P > 0.05$ , IC<sub>50</sub> values obtained in MDR cells compared with that in parental sensitive cells.

**Tab 2 Effects of bullatacin on Fura-2 accumulation in MCF 7 cells and MCF 7/ ADR cells**

Group	Concentration $/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Fura-2 accumulation $/\text{nmol}/10^6$ cells		Fold accumulation of Fura-2	
		MCF-7	MCF-7/ ADR	MCF-7	MCF-7/ ADR
Control	0	$1.022 \pm 0.029$	$0.266 \pm 0.039$	1.00	1.00
Bullatacin	0.1	$1.029 \pm 0.046$	$0.834 \pm 0.027^{**}$	1.00	3.14

The values represent  $\bar{x} \pm s$  of three independent experiments. The fold accumulation of Fura-2 was defined as the ratio of the accumulation of Fura-2 obtained in the presence of bullatacin and that obtained in its absence. \*\*  $P < 0.01$  compared to no bullatacin values.

**3 Bullatacin对细胞内抗癌药物积累的影响**

抗癌药物被 P-gp 排出细胞外,使细胞内抗癌药物浓度降低是产生 MDR 的主要原因。bullatacin 是否也能被 MDR 细胞外排?细胞内 bullatacin 的浓度难于检测,若 bullatacin 进入细胞后,使 ATP 产生锐减,从而影响 P-gp 功能,会使其他天然来源的抗癌药物细胞内积累增加,因此,测定加入 bullatacin 后

**2 Bullatacin 增加 MDR 细胞内 Fura-2 积累的作用**

Fura-2/AM 是 P-gp 的底物,可被 P-gp 外排,使 MDR 细胞内的 Fura-2 积累减少,当 P-gp 功能降低或丧失时,Fura-2/AM 的外排减少,使 MDR 细胞内 Fura-2 积累增加,其增加越多,表示克服 MDR 活性越强,本法也是测定 P-gp 功能的新方法<sup>[7]</sup>。

敏感细胞 MCF-7 细胞内 Fura-2 的积累是 MDR 细胞 MCF-7/ ADR 的 3.8 倍。加入 bullatacin 作用 3 h,再与 Fura-2-AM 共同培养 20 min,能使 MDR 细胞内 Fura-2 分别增加 3.14 倍(表 2),表明 bullatacin 能增加 MDR 细胞内 Fura-2 的积累。提示 bullatacin 降低了 P-gp 外排 Fura-2-AM 的功能。

ADM 的积累,能反映 bullatacin 对 P-gp 功能的影响。间接反映 bullatacin 的细胞内积累。结果显示: MCF-7 细胞内 ADM 积累是 MCF-7/ ADR 的 4.9 倍。bullatacin 显著增加 MCF-7/ ADR 细胞内 ADM 积累,而未见显著增加敏感株内 ADR 的积累(表 3)。

**Tab 3 Effect of bullatacin on ADM accumulation in MCF 7/ ADR cells and MCF 7 cells**

Group	Concentration $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Accumulation of ADM $/\text{nmol}/10^6$ cells		Fold of accumulation of ADM	
		MCF-7	MCF-7/ ADR	MCF-7	MCF-7/ ADR
Control	0	$2.099 \pm 0.094$	$0.408 \pm 0.046$	1.00	1.00
Bullatacin	0.1	$2.074 \pm 0.048$	$1.671 \pm 0.144^{**}$	0.99	4.10

The values represent  $\bar{x} \pm s$  of three independent experiments. The fold of accumulation of ADM was calculated by dividing the value obtained with the presence of bullatacin by that obtained with the absence of bullatacin. \*\*  $P < 0.01$  compared to no bullatacin values.

**讨 论**

Morre DJ 等<sup>[10]</sup>研究表明 bullatacin 不仅对 HL-60 细胞 NADH 氧化酶具有抑制作用,而且对耐阿霉素的 HL-60/ ADR 细胞株 NADH 氧化酶也具有同样水平的抑制作用,提示对耐阿霉素的 HL-60/ ADR 细胞株同样有效而无抗药性。Oberlies NH 等<sup>[11]</sup>以耐阿霉素的 M17/ ADR 细胞株进行细胞毒作用的研究亦得出相似的结果。

Coley HM 等<sup>[12]</sup>报道 MDR 细胞内抗癌药物的积累呈能量依赖性。这提示细胞内 ATP 的供应量可能影响 P-gp 的功能。

P-gp 能将天然来源的抗癌药物排出细胞外,是否也能将番荔枝内酯排出胞外?番荔枝内酯类化合物为什么对 MDR 细胞株同样有效而无抗药性?P-gp 是一种依赖于 ATP 的外排泵,而番荔枝内酯的作用是阻断呼吸链的传递,使细胞内 ATP 迅速减

少。番荔枝内酯对 MDR 肿瘤有效可能与其使 MDR 细胞内的 ATP 迅速降低,从而使 P-gp 功能降低有关。

我们以前的研究已证明, Fura-2/AM 可被 P-gp 外排,使 MDR 细胞内的 Fura-2( Fura-2/AM 在细胞内酯解为 Fura-2 和 AM) 积累减少<sup>[7]</sup>; P-gp 的作用是依赖于 ATP 供能;而番荔枝内酯对肿瘤细胞的作用是减少 ATP 的生成,可影响 P-gp 的功能。因此,番荔枝内酯可能使 Fura-2 在 MDR 细胞内积累增加。这似可解释 MDR 细胞对番荔枝内酯不产生耐药的原因,是一种新的克服 MDR 机制;可望番荔枝内酯开发为治疗 MDR 肿瘤的新型抗癌药物。

### 参 考 文 献

- 1 Beck WT. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treat Rev*, 1990, **17**( Supp A): 11
- 2 符立梧,潘启超. 逆转肿瘤多药抗药性化合物的理化特性. *癌症*, 1996, **15**: 475
- 3 Jolad SD, Hoffman JJ, Schram KH, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accumibata* (annonaceae). *J Org Chem*, 1982, **47**: 3151
- 4 Fang XP, Rieser MJ, Gu ZM, et al. Annonaceous acetogenins, up to date. *Phytochem Anal*, 1993, **4**: 27
- 5 Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, McGvren JP, et al. Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci*, 1993, **53**: 1113
- 6 Londerhausen M, Leicht W, Leib F, et al. Molecular mode of action of annonins. *Pesticide Sci*, 1991, **3**: 427
- 7 符立梧,潘启超. 一种以 Fura-2/AM 筛选多药抗药性逆转剂的新方法. *中国药理学杂志*, 1995, **30**( Suppl 11): 109
- 8 Carmichael J, DeGraff WG, Gazadar AF, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 1987, **47**: 943
- 9 Ford JM, Bruggermann EP, Pastan I, et al. Cellular and biochemical characterization of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Res*, 1990, **50**: 1748
- 10 Morre DJ, De Cabo R, Farley C, et al. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci*, 1995, **56**: 343
- 11 Oberlies NH, Jones JL, Corbett TH, et al. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins *in vitro* disk diffusion assay. *Cancer Lett*, 1995, **96**: 55
- 12 Coley HM, Twentyman PR, Workman P. The efflux of anthracyclines in multidrug-resistant cell lines. *Biochem Pharmacol*, 1993, **46**: 1317

## THE CIRCUMVENTION OF TUMOR MULTIDRUG RESISTANCE BY BULLATACIN AND ITS MECHANISM

Fu Liwu( Fu LW), Tan Bingyan( Tan BY)<sup>1</sup>, Liang Yongju( Liang YJ),  
Pan QC( Pan Qichao), Huang Hongbing( Huang HB) and Feng Gongkan( Feng GK)

( Cancer Institute, <sup>1</sup> Molecular Medical Centre,  
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060)

**ABSTRACT AIM:** To find new drugs to overcome tumor multidrug resistance( MDR), bullatacin was studied with technique of cell culture *in vitro*. **METHODS:** The study was carried out using two pairs of cell lines: MDR cell lines and their parental sensitive cell lines including MCF-7/Adr cells and MCF-7 cells, KBv200 cells and KB cells. Cytotoxicity was determined with tetrazolium (MTT) assay. The function of P-gp was examined by Fura-2/AM assay. Cellular accumulation of adriamycin( ADM) was determined by fluorescence spectrophotometry measurement (to reflect cellular bullatacin accumulation). **RESULTS:** Bullatacin showed potent cytotoxicity to MCF-7/Adr cells, MCF-7 cells, KBv200 cells and KB cells. The cytotoxicities of bullatacin to MDR cells were similar to that to parental sensitive cells. Bullatacin markedly increased cellular Fura-2 and ADM accumulation in MCF-7/Adr cells, while not in MCF-7 cells. **CONCLUSION:** There was no cross-resistance of bullatacin to P-glycoprotein-positive MCF-7/ADR and KBv200 cell lines as compared with their sensitive cell lines. The mechanism of overcoming MDR was associated with the decrease of P-gp function and the increase of MDR cellular drug accumulation.

**KEY WORDS** bullatacin; multiple drug resistance; P-glycoprotein; adriamycin; Fura-2