

维拉帕米增强博莱霉素 A₅抗癌活性的机制*

何农高 张鸿卿 宋平根 刘忠敏 薛绍白

(北京师范大学生物系, 北京 100875)

提要 本文利用流式细胞术 (FCM) 和动物整体水平的同位素标记药物示踪方法探讨了维拉帕米 (VP) 增强博莱霉素 A₅ (BLM) 抗癌活性的机制。实验发现 VP 显著增强 BLM 对 S-180 和 HEP-2 细胞的 G₂ 期阻断效应。VP 改变了 ⁵⁷Co-BLM 在荷瘤小鼠部分器官中的分布, 增加了该药在肿瘤中的积聚。VP 增强 BLM 抗癌活性可能是通过增加药物在肿瘤中的积聚, 增强药物的 G₂ 期阻断效应以及其它作用实现的。

关键词 维拉帕米; 博莱霉素 A₅; 流式细胞术

已经证明维拉帕米 (VP) 与博莱霉素 A₅ (BLM) 合并使用时可增强 BLM 的抗癌活性⁽¹⁾。我们曾报道 ⁵⁷Co-BLM 可积聚在小鼠肿瘤中⁽²⁾, VP 增强 BLM 的抑瘤活性与延长动物的生存期是否与此有关尚待证实。本文试图用流式细胞术和 ⁵⁷Co-BLM 示踪方法从细胞以及动物整体水平初步探讨 VP 增强 BLM 抗癌活性的机制。

材 料 和 方 法

药品 所用维拉帕米 (verapamil, VP) 为盐酸盐, 购自 Sigma 公司; 博莱霉素 A₅ (bleomycin A₅, BLM) 为无铜精制品, 购自天津河北制药厂。两种药品均用生理盐水配制, 过滤除菌, 放 4 °C 备用。无载体 ⁵⁷CoCl₂ 水溶液购自北京师范大学化学系放射化学研究室。

细胞及细胞培养 体外培养小鼠 S-180 细胞系由中国科学院发育生物研究所赠送, HEP-2 细胞由本室提供, 两种细胞均用含 10 ~ 15% 小牛血清的 DMEM (Gibco 公司) 培养基, 置 37 °C, 5% CO₂ 条件培养。

动物 18 ~ 22 g 昆明种小白鼠, ♀ 不拘。

⁵⁷Co-BLM 的制备 采用文献(3)的方法, 按 $3.7 \times 10^5 \text{Bq}^{57}\text{Co}/\text{mg}$ BLM 标记。标记后经滤纸层析, 并分别用色层扫描仪和井型闪烁计数器检测层析结果, 计算 Rf 值。两种方法测定结果都表明 ⁵⁷CoCl₂ 停留在原点, 而标记在 BLM 的 ⁵⁷Co 的 Rf 值为 0.65 ~ 0.7, 证明 BLM 被 ⁵⁷Co 标记。

流式细胞术 收集对数生长期细胞, 培养 5 h 后加药。实验分四组: 对照组; BLM 组; VP 组; BLM + VP 组, 每组 3 瓶细胞。在加药后 6, 12 和 24 h 收集细胞, 70% 乙醇固定过夜, 经 RNase A (1 mg/ml) 消化和碘化丙啶 (50 μg/ml) 染色后, 用 FACS III 型流式细胞计 (B-D 公司) 测定每个细胞的 DNA 含量, 经计算机按 Dean 的细胞周期分析程序⁽⁴⁾拟合 DNA 组方图计算各样品不同周期时相细胞的比例。

药物分布 采用文献⁽³⁾方法, 取 S-180 腹水细胞以 sc 接种于小鼠, 10 天后开始实

验。实验分两组，每组用动物 4 只。两组动物分别 iv $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ ($7.4 \times 10^5 \text{ Bq}/2 \text{ mg}$) 溶液和 $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ ($7.4 \times 10^5 \text{ Bq}/2 \text{ mg}$) 与 VP ($10 \text{ mg}/\text{kg}$) 的混合液。注射后 6 h 处死动物，取部分肝、肾、脾、肌肉、胃、肠、骨、肿瘤和血液称重，用井型闪烁计数器测定其放射性，结果以每毫克组织放射性和肿瘤与其它器官的放射性比值表示。

结 果

一. 维拉帕米增强博莱霉素 A_2 对细胞周期 G_2 期的阻断效应

(一)人 HEP-2 细胞系 BLM 和 VP 单独或合并处理 HEP-2 细胞后，在不同时间取样，用 FCM 测定 DNA 分布直方图如图 1 所示。在各时间点，VP $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 单独处理对细胞群体中细胞周期各时相细胞的比例与对照组基本相似，说明 VP $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 对细胞周期的运行无影响；BLM $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 处理， $\text{G}_2 + \text{M}$ 期细胞略有增加；与上述浓度相同的两种药物合并处理时细胞周期时相分布显著改变， $\text{G}_2 + \text{M} \%$ 明显增加。经计算机拟合计算出各时相细胞百分比，发现在加药后 6 h，合并用药组的 $\text{G}_2 + \text{M} \%$ 从单独 BLM 组的 10.1% 增加到 22.8%；12 h 从 11.5% 增加到 39.5%，在两个时间点分别增加 1.2 倍和 2.4 倍；24 h 后， $\text{G}_2 + \text{M} \%$ 有下降趋势，但仍比单独用药组高。说明对 $\text{G}_2 + \text{M}$ 期无阻断效应的 VP 明显地增加了 BLM 的 $\text{G} + \text{M}$ 期阻断作用。

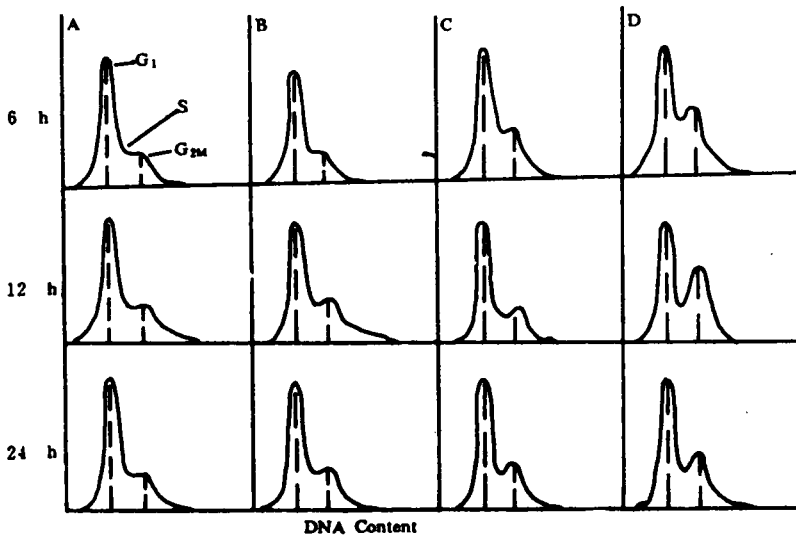


Fig 1. DNA histograms of HEP-2 cells (A) and cells treated with VP $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (B), BLM $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (C) and BLM $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ plus VP $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (D) for 6, 12, 24 h after seeding the cells.

(二)小鼠 S-180 细胞系 利用 S-180 细胞也得到与 HEP-2 细胞相似的结果 (图 2)。BLM $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 与 VP $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 合并处理 12 h， $\text{G}_2 + \text{M} \%$ 从单独 BLM 组的 16.2% 增加到 31.3%。由于 G_2 和 M 期细胞都具有 4C DNA 含量，BLM 不能区分 G_2 或 M 或 $\text{G}_2 + \text{M}$ 的阻断，但是我们过去的工作已证明 $\text{G}_2 + \text{M} \%$ 增高是 $\text{G}_2 \%$ 增高造成的⁽⁴⁾。

二. 维拉帕米对 $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ 在动物体内分布的影响

实验结果总结于表 1 和表 2。可以看出，注射药物 6 h 后，VP 改变了 $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ 在荷瘤小

鼠的肿瘤及各器官中的分布。⁵⁷Co-BLM 与 VP 合并使用后,在肿瘤中的积累从单独应用⁵⁷Co-BLM 的 14.7 cpm/mg 增加到 18.48 cpm/mg。同时,VP 也改变了⁵⁷Co-BLM 在部分其它器官中的分布,二药合用后⁵⁷Co-BLM 在肺、胃、小肠和血中的含量下降。由肿瘤与各器官的放射性比值(表 2)也可以看出⁵⁷Co-BLM 在与 VP 合用后在肿瘤中的积累增加。值得注意的是 VP 使⁵⁷Co-BLM 在肺中的积累减少,说明 VP 有可能减轻 BLM 对肺的毒副作用。

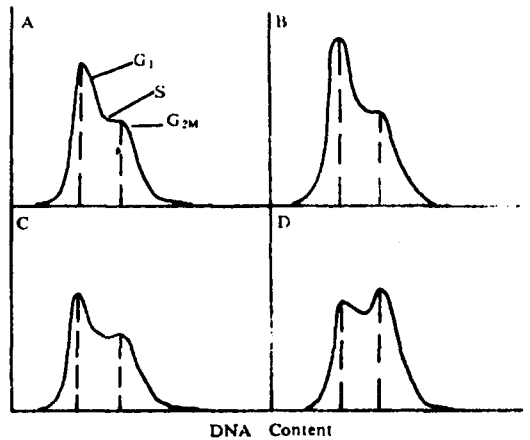


Fig 2. DNA histograms of S-180 cells (A) and cells treated with VP (B), BLM (C) and BLM plus VP (D) for 6 h after seeding the cells. Concentrations of the drugs are the same as those in figure 1.

Tab 1. Effect of VP on the distribution of ⁵⁷Co-BLM in mice bearing S-180 solid tumor for 6 h after i v (cpm/mg of tissue, n=4, $\bar{x} \pm SE$).

| | Liver | Kidney | Spleen | Lung | Muscle | Stomach | Intestie | Bone | Tumor | Blood |
|------------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|
| ⁵⁷ Co-BLM | 9.65 ±0.82* | 79.75 ±7.22 | 3.7 ±0.50 | 5.4 ±0.89 | 4.03 ±0.22 | 5.78 ±1.11 | 6.00 ±0.50 | 5.33 ±1.09 | 14.70 ±1.23 | 3.88 ±0.40 |
| ⁵⁷ Co-BLM + VP | 9.85 ±1.30 | 94.53 ±7.73 | 4.05 ±0.89 | 3.35 ^Δ ±0.53 | 4.28 ±0.65 | 2.93 ^Δ ±0.37 | 3.10 ^Δ ±0.70 | 4.50 ±0.60 | 18.48 ^Δ ±1.12 | 1.30 ^Δ ±0.15 |

*: Standard error. ^ΔP<0.05 as compared with mice treated with ⁵⁷Co-BLM; pinguangmycin; VP: verapamil.

Tab 2. Effect of VP on the ratio of ⁵⁷Co-BLM in tumor to those in other tissues for 6 h after i v (n=4, $\bar{x} \pm SE$).

| | T/Liv | T/Kid | T/Spl | T/Lun | T/Mus | T/Sto | T/Int | T/Bon | T/Blo |
|------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|
| ⁵⁷ Co-BLM | 1.54 ±0.11* | 0.19 ±0.02 | 4.25 ±0.71 | 3.01 ±0.58 | 3.65 ±0.26 | 3.31 ±0.85 | 2.53 ±0.33 | 3.33 ±1.16 | 3.95 ±0.57 |
| ⁵⁷ Co-BLM + VP | 1.94 ±0.20 ^Δ | 0.24 ±0.06 | 5.05 ±0.75 | 5.71 ±0.80 ^Δ | 4.59 ±0.61 | 6.63 ±0.95 | 6.85 ±1.40 | 4.24 ±0.30 | 14.48 ±0.87 ^Δ |

*: Standard. ^ΔP<0.05 as compared with mice treated with ⁵⁷Co-BLM alone. BLM pingyangmycin; VP: verapamil; Liv: Liver; Kid: Kidney; Spl: Spleen; Lun: Lung; Mus: Muscle; Sto: Stomach; Int: Intestine; Bon: Bone; Blo: Blood.

讨 论

Yanovich 等报道 VP 能增强柔红霉素对 P388 细胞 G₂+M 期的阻断作用⁽⁴⁾; Beck 等也报道 VP 能增强长春花碱对人白血病淋巴瘤母细胞 G₂+M 期的阻断作用⁽⁵⁾。我们曾用多种方法证实了 BLM 对中华仓鼠卵巢细胞和艾氏腹水瘤细胞 G₂ 期的阻断作用^(6,7)。本文结

果表明,不影响细胞周期分布的 VP 能明显增强 BLM 对人 HEP-2 和小鼠 S-180 细胞 G₂ 期的阻断作用,这可能是 VP 增强 BLM 抗癌活性的原因之一。VP 增强抗癌药物的 G₂ 期阻断作用的机制可能与 VP 增加了抗癌药物在细胞中的积累有关。我们曾报道, BLM 的 G₂ 期阻断作用与其使用剂量有关⁽⁷⁾,其抑瘤效果与 BLM 在肿瘤中积累量有关⁽²⁾;本文发现 VP 增强了肿瘤对 ⁵⁷Co-BLM 的积聚;别有报道 VP 能增加柔红霉素⁽⁴⁾、长春新碱、阿霉素^(8,9)和 VP-16⁽¹⁰⁾等药物在体外培养瘤细胞中的积聚。由此可见, BLM 与 VP 合用后疗效提高可能与 VP 增加了 BLM 在肿瘤中的积聚有关。由于肺毒性是 BLM 的主要限制因素⁽¹¹⁾,因此 VP 使肺中 ⁵⁷Co-BLM 减少的现象值得注意,这提示有可能通过这种合并用药减轻 BLM 对肺的毒性。

VP 增强 BLM 在细胞和肿瘤的积聚的分子机理还不清楚。有人认为钙拮抗剂可能抑制药物的主动外向运输系统⁽¹²⁾;或 VP 可能是药物外流的竞争性底物⁽¹³⁾。

参 考 文 献

1. 何农高,等. 维拉帕米增强博来霉素 A₅ 对体内外小鼠肉瘤 5-180 细胞的抗癌活性. 中国药理学报 1990; 11: 381.
2. 薛绍白,等. 不同组分的 ⁵⁷Co- 争光霉素在肿瘤动物中的分布特性及其抑瘤和毒性关系的探讨. 药学报 1980; 15: 1.
3. 柳惠图,等. ⁵⁷Co- 争光霉素几种不同组分的制备和在肿瘤动物中的分布及临床扫描初步结果. 中华肿瘤杂志 1979; 1: 106.
4. Yanovich C, et al. Effect of verapamil on daunomycin cellular retention and cytotoxicity in P388 leukemic cells. *Cancer Res* 1984; 44: 1743.
5. Beck WT, et al. Reversal of vinca alkaloid resistance but not multiple drug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Ibid* 1986; 46: 778.
6. 薛绍白,等. 博来霉素 A₅ 对体外培养中国仓鼠卵巢细胞增殖周期的影响. 中国药理学报 1984; 5: 112.
7. 薛绍白,等. 用流式细胞光度术研究争光霉素对肿瘤及正常细胞周期的影响. 药学报 1984; 19: 491.
8. Tsuruo T, et al. Increase accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982; 42: 4730.
9. Tsuruo T, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Ibid* 1981; 41: 1967.
10. Yalowich JC, et al. Verapamil induced augmentation of etoposide accumulation in L1210 cells *in vitro*. *Ibid* 1985; 45: 1651.
11. 陈乐真,等. 平阳霉素与异博定联合应用对肺纤维化的影响. 中国人民解放军总医院进修学院学报 待发表.
12. Dano K, et al. Mode outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cell. *Biochem Biophys Acta* 1973; 323: 466.
13. Kessel D, et al. Mode of action of calcium antagonists which alter anthracycline resistance. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1157.

MECHANISM OF ENHANCEMENT OF BLEOMYCIN A₅ ANTITUMOR ACTIVITY BY VERAPAMIL

NG He, HQ Zhang, PG Song, ZM Liu and SB Xue

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

ASBTRACT The mechanism of enhancement of Bleomycin A₅ antitumor activity

by verapamil was explored by flow cytometry and tracing the radiolabelled bleomycin A₅ *in vivo*. Verapamil was found to increase the G₂ blocking effect of bleomycin A₅ prominently in mouse S-180 and human HEP-2 cell lines. The distribution of ⁵⁷Co-bleomycin A₅ in mice bearing S-180 sarcoma was changed by verapamil and accumulation of the drug in tumor was increased. In contrast, the labelled drug in the lung was decreased. It seems that the effects of verapamil in enhancing the antitumor activity of bleomycin A₅ are to increase the accumulation of the drug in tumor cells and enhance the G₂ blocking effect of the drug in cell cycle.

Key words Verapamil; Bleomycin A₅; Flow cytometry