

nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, in Syrian golden hamster. *Ibid* 1989; 223 : 65  
 6 Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Ibid* 1970; 9 : 527  
 7 Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of

micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Ibid* 1983; 120 : 127  
 8 Cole RJ, Taylor N, Cole J, Arlett CF. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. 1. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Ibid* 1981; 80 : 141

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jul; 11 (4) : 381-384

## 维拉帕米增强博来霉素 A<sub>5</sub> 对体内外小鼠肉瘤 S-180 细胞的抗癌活性<sup>1</sup>

何农高、张鸿卿、王瑞虹、杨新林、薛绍白(北京师范大学生物系, 北京 100875, 中国)

### Enhancement of antitumor activity of bleomycin A<sub>5</sub> in mouse sarcoma 180 cells *in vitro* and *in vivo* by verapamil<sup>1</sup>

HE Nong-Gao, ZHANG Hong-Qing, WANG Rui-Hong, YANG Xin-Lin, XUE Shao-Bai (Department of Biology Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**ABSTRACT** Verapamil (Ver), a calcium influx blocker, enhanced the cytotoxicity of bleomycin A<sub>5</sub> (BLM) in cultured S-180 cells. IC<sub>50</sub> of BLM to the cells was about 2.6 μg/ml when the cells were treated with BLM alone, but when the cells were treated with BLM plus Ver 1, 5, 10 μg/ml, the IC<sub>50</sub> were 1/1.2, 1/5.2, 1/7.4 of the cells treated with BLM alone, respectively. In colony test, the survival fractions of the cells treated with BLM 20, 60, 100 μg/ml plus Ver 60 μg/ml were 1/7, 1/8, 1/11 of the cells treated with BLM alone, respectively. Ver enhanced the growth inhibitory actions of BLM in mice bearing S-180 sarcoma by 60% or over. The mean survival time of the mice bearing S-180 ascites sarcoma treated with BLM plus Ver was prolonged 21% from that of the mice treated with BLM alone. The results suggest that Ver may be used clinically as an antitumor enhancer of BLM.

**KEY WORDS** verapamil; bleomycins; sarcoma 180; cultured tumor cells; combination drug therapy

**摘要** 无毒剂量的维拉帕米(10 μg/ml)与低浓度的博来霉素 A<sub>5</sub>(BLM, 0.37 μg/ml)合用,可使 BLM 抑制小鼠肉瘤 S-180 细胞增殖的作用比单独应用 BLM 增强 7.4 倍,使 BLM 对细胞的毒性增强 11 倍。维拉帕米 40 mg/kg 使 BLM 5mg/kg 的抑瘤效应增强 60% 以上,联合治疗的 S-180 腹水小鼠存活时间比单独用 BLM 5mg/kg 延长 21%。以上结果提示维拉帕米在临床有可能提高 BLM 的治癌效果。

**关键词** 维拉帕米; 博来霉素类; 肉瘤-180; 培养肿瘤细胞; 药物联合治疗

BLM 对头颈部鳞癌、宫颈癌和乳腺癌有较好的疗效,并具有不抑制机体免疫和造血功能的特点。但长期使用易产生肺毒性<sup>(1)</sup>;体外培养的肿瘤细胞在很短时间内就能对博来霉素产生抗性<sup>(2)</sup>。因此,如何减轻肺毒性,克服细胞的抗药性,充分发挥 BLM 的抗肿瘤作用,是该药临床应用中急待解决的问题。钙拮抗剂维拉帕米(verapamil, Ver)能增强长春新碱、阿霉素等抗癌药物的细胞毒性和治疗效果。对已具有抗药性的癌细胞,这种增强作用特别强<sup>(3,4)</sup>。本文目的在于验证维拉帕米是否也能增强 BLM 的抗癌活性,以期可能将维拉帕米作为一种化疗增效剂用于 BLM 的临床治疗。

### MATERIALS AND METHODS

盐酸 Ver(Sigma 公司产品), BLM 为天津河北制药厂生产,系无铜精制品。两种药品均用磷酸缓冲液配制,过滤除菌。

Received 1989 Jul 17 Accepted 1990 Apr 19

<sup>1</sup>Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 9388002

昆明种小鼠, 体重  $20 \pm SD 2 g$ , 雌雄不拘, 体外培养小鼠肉瘤 S-180 细胞由中国科学院发育生物研究所赠送, 用含 10-15% 小牛血清的 DMEM(GIBCO)培养基,  $37^{\circ}C$ , 5%  $CO_2$  条件培养. S-180 体内细胞系由医学科学院药物研究所赠送. 以腹水形式保持于鼠体.

**体外培养细胞增殖抑制实验** 将 S-180 细胞按  $3 \times 10^4 - 3.5 \times 10^4 / ml$  的浓度接种于小方瓶. 分 4 组加药: 不加药组; BLM 组; Ver 组和 BLM+Ver 组. 加药后置  $37^{\circ}C$  培养. 用两种方法收集细胞, 一种方法是从加药后 d 2 开始, 每组取两瓶细胞计数, 共取 5 d; 另一种方法是加药后将细胞连续培养 72 h 后一次收集计数, 所有细胞均用计数器(Coulter Counter 英国)计数. 结果以加药组与对照组细胞数% 表示.

**体外培养细胞集落形成率** 无菌收集对数期细胞并计数, 将细胞分成若干等分. 分 BLM 组和 BLM+Ver 组加药, 加药后置  $37^{\circ}C$  培养 1h, 然后用无菌磷酸缓冲液离心二次洗去药物, 用含血清培养液进行梯度稀释, 并按梯度接种于 24 孔培养板(重复 3 孔)置  $37^{\circ}C$  培养. 待大多数集落达到 50 个细胞以上时, 吸去培养液, Giemsa 染色, 镜检计各孔集落数, 结果以实验组与对照组集落% 表示.

**腹水小鼠平均存活时间** 取 S-180 腹水细胞用生理盐水 1:1 稀释, 每次 ip 0.1ml / 鼠, 接种后 d 2 开始给药物, qd  $\times 10 d$ . 停药后以足够饲料喂养并观察死亡情况. 以接种腹水为 d 1 计算小鼠存活时间. 结果用每组小鼠平均存活时间表示.

**抑瘤效应** 取 S-180 腹水细胞, 用生理盐水 1:1 稀释, 每次 ip 0.1 ml / 鼠, 给药方式同上, 末次给药 24 h 后处死小鼠, 剥出肿瘤称量, 以对照组和实验组瘤重之差与对照组之比表示抑瘤率.

RESULTS

Ver 对 BLM 抑制瘤细胞增殖作用的增强

用 0.5, 2.5, 5  $\mu g / ml$  的 BLM 处理 S-180 细胞, 连续 5 d 取样计数, 与对照组比较, 各加药组细胞数均有减少, 并与浓度相关. 2.5  $\mu g / ml$  时细胞数约为对照组的 70%, 5  $\mu g / ml$  时细胞数几乎没有增加, 用 1-20  $\mu g / ml$  Ver 单独处理细胞, 培养 72 h 后发现, 尽管在高浓度(20  $\mu g / ml$ )时细胞数减少约为对照组的 40%, 但在 10  $\mu g / ml$  以内细胞数与对照组极为相近. 均在对照的 90% 以上. 在联合用药实验中 (Fig 1), 以 0.5, 1.0, 2.5  $\mu g / ml$  的 BLM 单独处理作为对照. 药物浓度增加; 细胞数目下降, 半抑制浓度( $IC_{50}$ )约为 2.6  $\mu g / ml$ . 以上浓度的 BLM 与 60  $\mu g / ml$  的 Ver 合用时. 细胞数显著下降, BLM 3 个浓度使瘤细胞数分别从单独用药的 107%, 91% 和 53% 下降到 55%, 63% 和 45% 并且 Ver 浓度升高, 细胞数继续下降, 在 Ver 为 10  $\mu g / ml$  时各 BLM 浓度细胞数均降到 40% 以下. 特别是在低浓度(2.5  $\mu g / ml$ )的 BLM, 单独和联合用药的细胞数差别更大, 0.5 和 2.5  $\mu g / ml$  的 BLM 分别与 10  $\mu g / ml$  的 Ver 合用后, 细胞数在单独用药的基础上分别减少约 70% 和

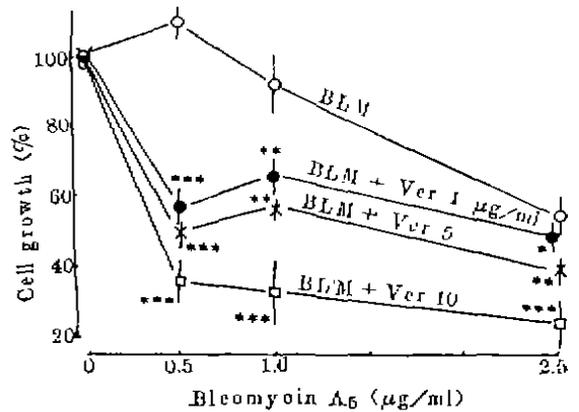


Fig 1. Effect of verapamil (Ver) on the growth-inhibitory actions of bleomycin A<sub>5</sub> (BLM) on S-180 cells *in vitro*. Cell numbers were counted after 72-h continuous incubation. n=5-6,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs single drug groups.

30%。比较单独和联合用药 BLM 的  $IC_{50}$  值, 可见 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  3 个 Ver 浓度分别使 BLM  $IC_{50}$  值不同程度下降, 尤其在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ver 时,  $IC_{50}$  值较单独应用 BLM 下降 7.4 倍。这说明 Ver 在体外能增强 BLM 对 S-180 细胞增殖的抑制作用。

**Ver 对 BLM 细胞毒性的增强** 细胞集落形成率实验结果见 Fig 2. 20, 60 和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 BLM 单独处理, 集落数分别下降为对照的 30%, 5% 和 7%。用以上浓度的 BLM 与 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ver 联合处理, 集落数分别为对照的 4%, 0.6% 和 0.06%, 联合用药较单独用药分别下降 7, 8 和 11 倍。说明 Ver 使 BLM 对细胞的杀伤作用增强。因为 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Ver 单独处理后对细胞集落率无影响(数据略)。

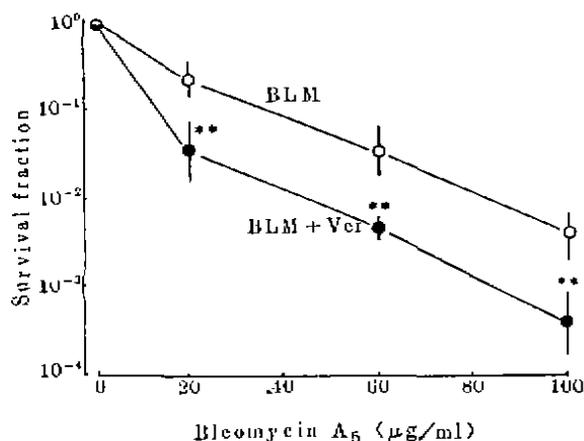


Fig 2. Cytotoxic response of BLM and simultaneous treatment with Ver (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on exponentially growing S-180 cells *in vitro*. The cells were treated for 1 h and then were collected for survival test by colony formation.  $n=5-6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*\* $P < 0.05$  vs single drug groups.

**单独和联合用药对 S-180 腹水小鼠平均存活时间的影响** 小鼠平均存活时间测定结果见 Tab 1. 10 mg/kg  $\times$  10 d 的 BLM 单独治疗, 小鼠存活时间是对照的 117%; 40mg/kg  $\times$  10 d 的 Ver 单独治疗, 存活时间与对照接近。低剂量 BLM 与 Ver 合用, 小鼠存活时间比单

用 BLM 延长。在同一 BLM 剂量, 小鼠存活时间的延长与 Ver 剂量相关。5mg/kg 的 BLM 分别与 20 和 40 mg/kg 的 Ver 合用后, 存活时间分别为单独应用 BLM 的 115% 和 121%; 在同一 Ver 剂量, 小鼠存活时间的延长也依赖于 BLM 的剂量。40 mg/kg 的 Ver 分别与 2.5 和 5mg/kg 的 BLM 合用后, 其存活时间分别为单独应用 BLM 的 112% 和 121%。而 5mg/kg 的 BLM 与 20 mg/kg Ver 联合应用后, 小鼠存活时间比 10mg/kg BLM 单独应用还高 12%。说明 Ver 能在一定程度上增强 BLM 的化疗效果。

Tab 1. Mean survival time (MST) of mice bearing sarcoma 180 ascites to BLM or plus Ver.  $n=15$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$  vs control or single drug group.

BLM (mg/kg, ip)	Ver (mg/kg, ip)	MST+SD (d)	T/C(%)	T/B(%)
0	0	15.5 $\pm$ 2.4	100	
10	0	18.3 $\pm$ 1.4	117*	
0	40	14.0 $\pm$ 2.0	90*	
2.5	0	15.2 $\pm$ 3.7	97*	100
2.5	20	16.4 $\pm$ 2.8	105*	109*
2.5	40	16.9 $\pm$ 1.9	108*	112**
5	0	17.5 $\pm$ 3.3	112**	100
5	20	20.1 $\pm$ 1.6	129**	115**
5	40	21.1 $\pm$ 3.5	136**	121**

T: Test group; C; Control group; B: Treated with BLM alone.

**单独和联合用药的抑瘤效应** 抑瘤实验结果见 Tab 2. 10 mg/kg BLM 单独处理, 抑瘤率为 78.2%; 40mg/kg Ver 单独处理, 抑瘤率为 5.1%; 接近对照组。两种药物合用, 抑瘤效应增强, 抑瘤率大于二者单用之和。与对照组比较, 2.5mg/kg BLM 单用和与 40 mg/kg Ver 合用的抑瘤率分别为 28.4 和 48.8%, 合用在单用的基础上增加 28.4%。说明 Ver 对 BLM 的抑瘤效应有协同作用, 而且抑瘤效应的增强与两种药物的剂量相关。但是药物剂量增加, 小鼠体重有减轻的趋势。

Tab 2. Effect of Ver on the growth-inhibitory actions of BLM on S-180 solid tumors.  $n=15$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P>0.05$ , \*\* $P<0.05$  vs control or single drug groups.

BLM (mg/kg,ip)	Ver (mg/kg,ip)	Body wt Change(g)	Tumor wt (mg)	Inhibitory rate (I-T/C)%	(I-T/B)%
0	0	+7.2±1.7	408±33	0	
10	0	+2.5±2.2	89±3	78.2**	
0	20	+5.8±2.4	440±21	-7.2*	
0	40	+4.3±3.1	390±15	5.1*	
2.5	0	+6.3±0.9	292±13	-28.4*	0
2.5	20	+4.0±1.5	251±9	40.5**	14.0*
2.5	40	+3.8±2.7	209±16	48.8**	28.4**
5	0	+5.4±1.8	255±24	37.8**	0
5	20	+3.5±1.9	140±17	65.7**	45.1**
5	40	-1.1±2.2	107±20	73.8**	62.7**

T, C, B: The same meaning as tab 1.

## DISCUSSION

结果表明,在体外无毒剂量的 Ver 能增强 BLM 对小鼠肉瘤 S-180 细胞增殖的抑制作用,还能增强 BLM 对这种细胞的毒性;在体内 Ver 能显著增强 BLM 的抑瘤效应,在 BLM 单用的基础上适当延长了荷瘤动物的存活时间.二药合用在体内体外效果都大于二者单独应用之和,出现协同作用.这些事实说明有可能以低剂量的 BLM 加上 Ver 获得高剂量 BLM 单用相同的疗效,从而减轻该药对肺的毒性. Ver 对抗癌药物活性增强的幅度依赖于癌细胞对这种抗癌药物抗药性程度的增加<sup>(5,6)</sup>.本文用 S-180 细胞与其它细胞比较,也发现 S-180 细胞对 BLM 较敏感,实验结果表明,尽管 Ver 对 BLM 体外抗癌活性和抑瘤效应有较大幅度增强,但最终的疗效仅提高 21%.可见,以 Ver 克服肿瘤细胞对 BLM 抗药性可能更具有临床意义.应该指出,Ver 虽为临床用药,但对心脏和肝也有毒性,从本文结果还可以看出,要增强 BLM 的抗癌活性,需要较大剂量的 Ver.因此,这种联合用药是否可行,还需要更多的实验证据.

Ver 增强 BLM 抗癌活性的机理还不清楚. BLM 主要是通过扰乱 DNA 合成杀伤细胞(主

要是 M 期细胞),并能使细胞阻断在 G<sub>2</sub>-M 期<sup>(7-9)</sup>.集落实验证明 Ver 可增强 BLM 对 S-180 细胞的杀伤作用;结合我们目前已经完成的工作表明,Ver 增强 BLM 抗癌活性很可能是:Ver 可以增加 BLM 在肿瘤中的积聚,从而增强药物的 G<sub>2</sub>-M 阻断效应,最后导致细胞的杀伤增多(待发表资料).

## REFERENCES

- 1 Zhen YS, Tian PY, Li WZ, Ying GH. An electron microscopic study on the lung toxicities of bleomycins A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>. *Acta Biochem Biophys Sin* 1980; 12 : 71
- 2 Watanabe M, Takabe Y, Katsumate T. Response in macromolecular synthesis of mouse L cells to bleomycin, with special reference to cell-antibiotic interaction. *J Antibiot* 1973; 26 : 417
- 3 Tsuruo T, Lida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41 : 1967
- 4 Tsuruo T, Kawabata H, Nagumo N, et al. Potentiation of antitumor agents by calcium channel blockers with special reference to cross-resistance patterns. *Cancer chemother Pharmacol* 1985; 15 : 16
- 5 Tsuruo T, Lida H, Masami Y, et al. Enhancement of vincristine- and adriamycin-induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochem Pharmacol* 1982; 31 : 3138
- 6 Tsuruo T. Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics. *Cancer Treat Rep* 1983; 67 : 889
- 7 Liu HT, Xue SB, Wang XY, Cheng RX, Liu YF, Lu RL. The effects of pingyangmycin on the synthesis of nucleic acid in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Acta Biochim Biophys Sin* 1983; 15 : 415
- 8 Xue SB, Cheng ZH, Liu HT, et al. Effects of bleomycin A5 on cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 112
- 9 Zhang HQ, Liu HT, Deng ZX, Pan WL, Hu YY, Xue SB. Cell cycle phase sensitivity of CHO cells to pingyangmycin. *Acta Pharm Sin* 1982; 17 : 755