

由于本文测到的 PMN 释放的氧自由基的 ESR 波谱是由自旋加合物 DMPO-OOH 和 DMPO-OH 叠加而成.因此,对药物的作用只能给出定性结果⁽³⁾.为了定量研究药物对 O₂⁻ 和 OH[·] 的作用,本实验采用了两个产生 O₂⁻ 和一个产生 OH[·] 的非细胞体系对两药做了定量观察.结果表明两药对 O₂⁻ 和 OH[·] 均有明显的清除作用.

PMN 呼吸爆发时除了释放 O₂⁻ 和 OH[·] 外,还有 H₂O₂ 等活性氧化代谢物生成.O₂ 的清除剂超氧化物歧化酶,OH[·] 的清除剂苯甲酸钠及 H₂O₂ 的清除剂过氧化氢酶均抑制 PMN 产生化学发光⁽⁷⁾.文献报道 SF 和 GA 有清除 H₂O₂ 的作用⁽²⁻³⁾,故认为 SF 和 GA 抑制化学发光是它们清除 O₂⁻、OH[·] 和 H₂O₂ 的综合结果.

ACKNOWLEDGMENTS 本所 ESR 技术组提供技术支持,中国医学科学院药物研究所徐理纳研究员提供阿魏酸钠.

REFERENCES

1 Yin ZZ, Wang JP, Xu LN. Effect of sodium ferulate on malondialdehyde production from platelets of rats. *Acta Pharmacol Sin* 1986;

7 : 336
2 Pan HZ, Zhao CY, Xu LN. The effect of sodium ferulate on lipid peroxidation of erythrocyte membrane. *Chin J Integr Tradit West Med* 1985; 5 : 678
3 Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Hattori M, Sakamoto T, Namba T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med* 1984; 51 : 298
4 Markert M, Andrews PC, Babior BM. Measurement of O₂⁻ production by human neutrophils. *Methods Enzymol* 1984; 105 : 358
5 Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 1989; 14 : 175
6 Lai CS, Hopwood LB, Hyde JS, Lukiewicz S. ESR studies of O₂ uptake by Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79 : 1166
7 Shult PA, Graziano FM, Wallow IH, Busse WW. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J Lab Clin Med* 1985; 106 : 638
8 Britigan BE, Rosen GM, Chai Y, Cohen MS. Do human neutrophils make hydroxyl radicals? *J Biol Chem* 1986; 261 : 4426
9 Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1987; 235 : 529

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 470-473

博来霉素 A₃ 与钙调素抑制剂合用对体外 S-180 细胞增殖的影响¹

张鸿青、何农高、薛绍白(北京师范大学生物系细胞生物研究室,北京 100875, 中国)

Effect of bleomycin A₃ with calmodulin inhibitor on the proliferation of S-180 cells in vitro¹

Shao-Bai (Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

ZHANG Hong-Qing, HE Nong-Gao, XUE

ABSTRACT The effect of bleomycin A₃ (BLM) alone and along with calmodulin inhibitor N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphthalene sulfonamide (W-13) on the proliferation of S-180 cells in vitro were studied. IC₅₀ of BLM alone to the cells was about 2.63 μg/ml, which was decreased

Received 1989 May 20 Accepted 1990 May 15

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No. 9388002

to 1/3.8 and 1/9.5 of 2.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ when plus W-13 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. The results indicated that nontoxic doses of W-13 enhanced the inhibition of cell proliferation under the condition of BLM 0.5-2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In colony forming test, the survival fraction of S-180 cells treated with BLM plus W-13 was decreased to 1/87-240 of the cells treated with BLM alone. The results suggest that W-13 can enhance antitumor activity of BLM *in vitro* and may be used as an enhancer of BLM *in vivo*.

KEY WORDS bleomycins; calmodulin; combined antineoplastic agents; sarcoma 180; cultured tumor cells; sulfonamides

摘要 本文报道了博来霉素 A_5 (BLM) 与钙调素抑制剂 W-13 单独和合用对体外 S-180 细胞增殖的影响的研究结果。低剂量 BLM 和无毒剂量的 W-13 合用对细胞增殖的抑制比单独应用 BLM 增加, 其 IC_{50} 值下降到单独应用 BLM 的 1/10; 联合用药后的细胞集落形成率也比单独用 BLM 下降 240 倍。结果提示 W-13 能增强 BLM 对体外 S-180 细胞的抗癌活性。

关键词 博来霉素类; 钙调素; 多剂联用抗肿瘤药; 肉瘤 S-180; 培养肿瘤细胞; 磺胺类

钙拮抗剂和钙调素抑制剂能增强抗癌药物的抗癌作用⁽¹⁻⁵⁾。钙调素抑制剂 W-13 (*N*-aminobutyl-5-chloro-2-naphthalenesulfonamide) 能增强博来霉素对中华仓鼠卵巢细胞的毒性⁽⁶⁾。博来霉素 A_5 (bleomycin A_5 , BLM) 对多种肿瘤有较好的疗效, 但是对肺的毒性限制了它在临床上的应用。如能获得一种能增强 BLM 活性的药物, 使低剂量的 BLM 在增强后达到与高剂量同等疗效, 就可以克服或减少高剂量引起的包括肺毒性在内的一些毒副作用, 促进该药的应用。本文利用体外 S-180 细胞对 BLM 和 W-13 单独和合用进行了对比研究, 得到了初步结果。

MATERIALS AND METHODS

BLM 为无铜精制品, 购自天津河北制药厂。W-13 购自 Sigma 公司。两种药品均用磷酸缓冲液配制, 过滤除菌, 放 4℃ 备用。

S-180 细胞系由中国科学院发育所赠送。用含 10-15% 小牛血清的 DMEM (GIBCO) 培养液, 5% CO_2 和 37℃ 培养, 每 3 d 传代一次。

细胞增殖抑制率的测定 无菌收集对数生长期细胞, 以 3-3.5 万/ml (共 3ml) 接种小方瓶, 实验组按不同浓度加入药物, 以加入与药液等量的无药磷酸缓冲液为对照组。加药后置 37℃ 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 3 瓶细胞计数, 共取得 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 Coulter counter (英国) 计数, 结果以加药组与对照组细胞数% 表示。

细胞集落形成率的测定 收集对数生长期细胞并计数, 按实验分成若干等分, 分别用含不同浓度药物的培养液 37℃ 培养 1.5 h, 用无菌磷酸缓冲液离心 3 次, 洗去药物, 细胞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 ($n=9$), 置 CO_2 培养箱培养。至大多数集落细胞数达到 50 以上时, 吸去培养液, 用 Giemsa 液 (1:20) 染色, 镜检计数各孔集落数, 结果以实验组与对照组集落数的% 表示。

RESULTS

BLM 和 W-13 单独应用对 S-180 细胞增殖的影响 BLM 单独处理 S-180 细胞, 结果如 Fig 1。与对照组比较所有加药组细胞数均有减少, 并与浓度相关。BLM 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 影响很小, 生长曲线接近对照组; 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时细胞数为对照组的 70%; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度抑制作用强烈, 与接种细胞数相比, 几乎没有增殖。用不同浓度 W-13 单独处理细胞, 随浓度增大细胞增殖受到抑制作用也加强, 尤其是 10 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 其细胞数仅为对照的 41% 和 14%, 但在 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下 W-13 对细胞增殖影响极小, 其细胞数都在对照组 90% 以上。

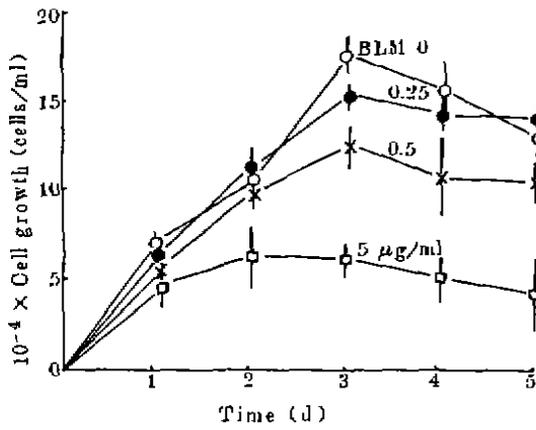


Fig 1. Effect of bleomycin A_2 (BLM) on the growth S-180 cells. $n=9$, $\bar{x} \pm SD$.

BLM 和 W-13 合用对 S-180 细胞增殖的影响 两药合用时,选用了 对细胞增殖有一定抑制的 BLM 浓度(2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)和对细胞增殖基本无影响的 W-13 浓度(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)。结果如 Fig 2 所示,以 BLM 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 单独处理为对照, BLM 浓度增加,细胞数目下降,半抑制浓度(IC_{50})约为 2.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以上浓度的 BLM 分别与 W-13 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 合用时,曲线

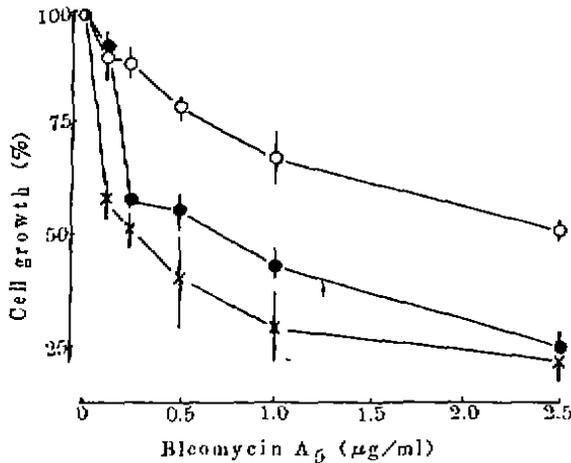


Fig 2. Effects of W-13 on the growth-inhibitory actions of BLM on S-180 cells. The cells were treated with graded BLM 5 h after seeding the cells. $n=9$, $\bar{x} \pm SD$.

下移, IC_{50} 值从 2.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下降到 0.70, 即 IC_{50} 约下降到单独用 BLM 的 1/4; W-13 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 BLM 合用时,细胞数进一步减少, IC_{50} 值为 0.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 即下降到接近单独应用 BLM 的 1/10。这说明 W-13 的使用能增强 BLM 对肿瘤细胞增殖的抑制作用,并且可以看出 W-13 这种增强作用与 W-13 的浓度有依赖关系。

W-13 对 BLM 细胞毒性的影响 细胞毒性实验结果见 Fig 3。BLM 单独处理,集落形成率有所下降,但仍能达到 10% 以上。与 W-13(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)联合处理,出现协同作用,集落形成率明显下降,分别从单独应用 BLM 的 78% (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 47% (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 12% (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)下降到 0.9%, 0.5% 和 0.05%, 联合用药细胞毒性分别为单独用药的 87 倍(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 94 倍(60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 240 倍(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(Tab 1)。这说明 W-13 增强了 BLM 对 S-180 细胞的毒性,对于同一 W-13 浓度,联合用药的集落形成率降低程度与 BLM 浓度相关。

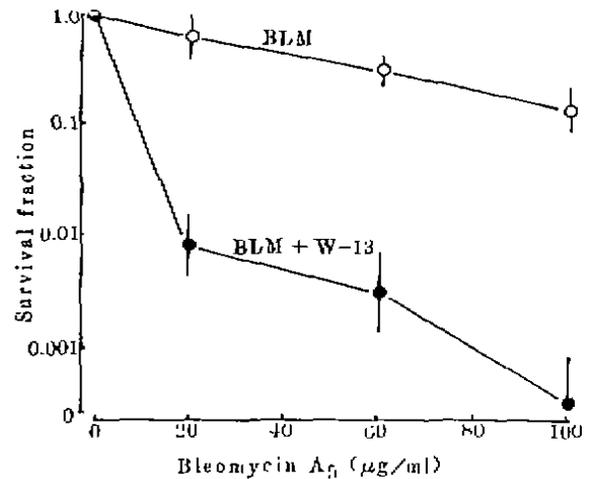


Fig 3. Cytotoxic response of BLM and BLM + W-13 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on S-180 cells. $n=9$, $\bar{x} \pm SD$.

DISCUSSION

在癌症化疗中失败的原因之一往往是由于

Tab 1. Cytotoxic response of BLM and simultaneous treatment with W-13 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on exponentially growing S-180 cells *in vitro*. $n=9$.

Survival fraction	BLM concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	20	60	100
BLM alone (%)	78	47	12
BLM + W-13 (%)	0.9	0.5	0.05
Folds of decrease in survival fraction	87	94	240

在治疗过程中肿瘤细胞对药物产生抗性^(7,8)。虽然高剂量药物能在一定程度上能克服抗性，但是剂量加大对正常组织的毒性也会增加。普尼拉明 (prenylamine)、三氟拉嗪 (trifluoperazine, TFP)、clomipramine 等钙调素抑制剂能增强长春花碱、阿霉素在肿瘤细胞中的积累，并能增强其活性，使 IC_{50} 值下降，延长单独用抗肿瘤药的肿瘤动物生存时间^(3,5)。本实验表明，无毒剂量的 W-13 能增强 BLM 对 S-180 细胞增殖的抑制作用，还能增强 BLM 对这种细胞的毒性，合并用药效果都大于二者单独应用之和，出现协同作用。这些事实意味着有可能以低剂量的 BLM 加上 W-13 获得与高剂量单独应用同样的疗效，从而减轻该药对肺毒性等毒副作用。此外，文献报道一些钙调素抑制剂能克服肿瘤细胞抗药性⁽⁵⁾，这表明用 W-13 克服肿瘤细胞对 BLM 的抗性也有一定意义。

ACKNOWLEDGMENT 张云同志参加部分工作。

REFERENCES

- 1 Tsuruo T, Iida 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
- 2 Tsuruo T, Iida H, Yamashiro M, Tsukagoshi S, Sakurai Y. 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
- 3 Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982; 42 : 4730
- 4 Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Ibid* 1983; 43 : 2267
- 5 Tsuruo T. Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics. *Cancer Treat Rep* 1983; 67 : 889
- 6 Chafouleas JG, Bolton WE, Means AR. Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: a role for calmodulin in DNA repair. *Sciences* 1984; 224 : 1346
- 7 Schabel FM Jr. Concepts for systemic treatment of micrometastases *Cancer (Phila)*. 1975; 35 : 15
- 8 Schabel FM Jr, Skipper HE, Trader MW, *et al* Concepts for controlling drug-resistant tumor cells. In : Mouridsen HT, Palshof T, eds. *Breast Cancer. Oxford: Pergamon Press, 1980; 199-211*

International Symposium on Metabolism in Drug Research and Development

Milan, Italy, 26-27 November 1990

Further information can be obtained from:

Professor Alberto Frigerio

Italian Group for Scientific Research and Study

Viale Lombardia, 8 - 20131 Milano, Italy

Phone 02 / 266.53.30 - Telefax 02 / 236.35.37