BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; 13 (5): 471-473

维拉帕米增强三尖杉酯碱在体外人早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞的抗癌活性[1]

王 磊[2]、张鸿卿、王瑞虹、何农高、薛绍白 (北京师范大学生物系，北京 100875，中国)

Enhancement of antitumor activity of harringtonine in human leukemia -60 cells *in vitro* by verapamil

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

ABSTRACT The effect of harringtonine (Har) alone and in combination with verapamil (Ver) on the proliferation of human leukemia-60 (HL-60) cells *in vitro* were studied. IC_{50} of Har alone to the cells was about 49 ng · ml^{-1} which was reduced to its 1 / 3.3 and 1 / 4.5 when used with Ver 1 and 2 μg · ml^{-1}, respectively. In colony forming test, the survival fraction of the HL-60 cells treated with Har 15 and 30 ng · ml^{-1} plus Ver 2 μg · ml^{-1} was reduced to 1 / 3.3 and 1 / 8 of the cells as when treated with Har alone, respectively. The results suggested that Ver enhanced the antitumor activity of Har *in vitro* and may used as an enhancer of Har *in vivo*.

KEY WORDS harringtonines; verapamil; cytotoxins; leukemia; cultured tumor cells; combination drug therapy

提要 无毒剂量的 Ver 1，2 μg · ml^{-1} 与 Har 合用可使 Har 抑制 HL-60 细胞增殖的作用比单独应用 Har 分别提高 3.3 和 4.5 倍。合并应用使 Har 对 HL-60 细胞毒性的增强更为显著，分别为 3.3 和 8.0 倍。结果说明 Ver 可以增强 Har 对体外培养的 HL-60 细胞的抗肿瘤活性。

关键词 三尖杉酯碱类；维拉帕米；细胞毒素；白血病；培养的肿瘤细胞；联合药物疗法

三尖杉酯碱(harringtonine, Har)对急性粒细胞性白血病、急性单核细胞性白血病等有良好疗效[1]，是一个受到重视的抗癌药物。但它的心脏和造血系统毒性限制了其临床疗效的提高[2]。钙通道抑制剂维拉帕米(verapamil, Ver)能增强某些抗癌药物的抗癌活性[3,4]，但它对 Har 是否有增强作用尚未见报道。本文目的在于验证 Ver 能否增强 Har 对体外培养的人早幼粒白血病 HL-60 细胞的抗癌活性。

MATERIALS AND METHODS

盐酸 Ver (Sigma)和 Har (中国医学科学院药物所)两种药品均用含 10-15% 小牛血清的 DMEM (Gibco) 培养液溶解，过滤除菌。

体外培养的 HL-60 细胞由本系生化教研室提供，用含 10-15% 小牛血清的 MEM 培液，在 5% CO_2 和 37 ℃培养。

体外培养细胞增殖抑制实验 将对数生长期的 HL-60 细胞按(3-3.5)× 10^4 · ml^{-1} 的浓度接种于小方瓶，分 4 组：不加药组；Ver 组；Har 组和 Ver+Har 组。培养 72 h 后收集细胞，用细胞计数器(Coulter Electronics, UK)计数，结果以加药组占对照组细胞数%表示。

体外培养细胞集落形成率实验 采用软琼脂集落法，收集对数生长期细胞并计数，按终浓度为 10^3 · ml^{-1} 的细胞数加入 30 ml 广口瓶中，加血清 2 ml 及不同浓度的药物溶液，以无血清培液补足至 7.2 ml 混匀、37 ℃温育。加入 0.4 ml 经高压灭菌的 5% 琼脂，用注射器吹打均匀，迅速种入 35 mm 培养皿，每皿 1 ml 共种 5 皿。将培养皿置 37 ℃，5% CO_2 湿盒中培养至多数集落达到含 50 个细胞以上。镜检计数>50 个细胞集团为一个集落，结果以实验组占对照组集落数%表示。

Received 1991-05-07 *Accepted 1992-04-18*

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

[2] Now in *Department of Biology, Anhui Normal University, Hefei 241000, China.*

RESULTS

Ver 对 Har 抑制癌细胞增殖作用的增强 用 15–75 ng · ml^{-1} 的 Har 作用于 HL–60 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，30 ng · ml^{-1} 时，细胞数约为对照组的 70%，75 ng · ml^{-1} 时抑制作用强烈，细胞几乎没有增殖(Fig 1). 以 Ver 1–8 μg · ml^{-1} 单独作用于 HL–60 细胞，在高浓度时对细胞也有抑制作用，但 <2 μg · ml^{-1}，则 Ver 对 HL–60 细胞增殖基本无影响. 联合用药实验选用对细胞增殖有一定抑制的 Har 浓度(<60 ng · ml^{-1})和对细胞基本无影响的 Ver 浓度(1–2 μg · ml^{-1}). 实验以 Har 单独处理为对照，其半数抑制浓度为 49 ng · ml^{-1}，与 Ver 1 μg · ml^{-1} 合用时，IC_{50} 值从 49 降到 15 ng · ml^{-1}，即 IC_{50} 约下降到单独使用 Har 的 30%；Ver 2 μg · ml^{-1} 与 Har 合用时，IC_{50} 为 11 ng · ml^{-1}，即下降到单独使用 Har 的 22%. 这说明 Ver 对 Har 的体外抗癌活性有增强作用，并且这种增强作用与 Ver 浓度相关.

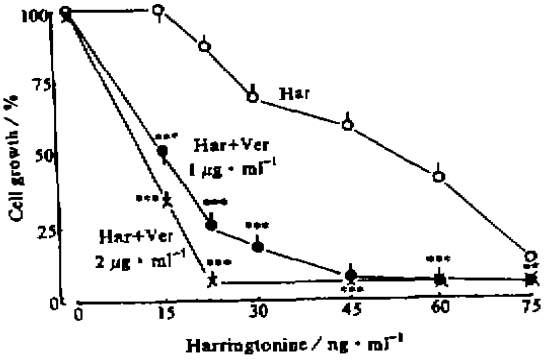

Fig 1. Effect of verapamil (Ver) on growth-inhibitory actions of harringtonine (Har) on HL–60 cells *in vitro*. Number of cells was counted after 72-h continuous incubation. $n=5–7$ times, $\bar{x} \pm s$, $^{**}P<0.05$, $^{***}P<0.01$ *vs* Har groups.

Ver 对 Har 细胞毒性的增强 用 Har 15 和 30 ng · ml^{-1} 单独处理，细胞集落形成率均比对照组低，但仍保持在 80%左右. Ver 1–2 μg · ml^{-1} 单独处理，集落形成率为对照组的 86%以上. 不同浓度 Ver 与 Har 联合处理细胞，各组集落数均比单独应用 Har 低，分别从单独应用 Har 的 79%，81%下降到 24%，10%. 即联合用药后 Har 的细胞毒性分别为单独应用 Har 的 3.3 倍和 8 倍(Tab 1).

Tab 1. Effect of Ver on cytotoxicity of Har in HL–60 cells by colony forming test. $n=5$, $\bar{x} \pm s$, $^{*}P>0.05$ *vs* drug-free group, $^{**}P<0.05$, *vs* drug-free group, $^{***}P<0.01$ *vs* Har 15 and 30 ng · ml^{-1} groups.

Har / ng · ml^{-1}	Ver / μg · ml^{-1}	Colony number	Survival / %
0	0	515 ± 39	100
0	1	447 ± 68	87*
0	2	421 ± 48	86*
15	0	409 ± 57	79**
30	0	420 ± 68	81**
15	1	271 ± 68	53***
30	1	146 ± 42	28***
15	2	122 ± 14	24***
30	2	52 ± 13	10***

DISCUSSION

无毒剂量的 Ver 与对细胞有轻度抑制作用的 Har 合用，细胞增殖速度显著低于 Har 单独应用. 这说明 Ver 能显著增强 Har 的细胞增殖抑制作用. 软琼脂集落实验结果也表明 Ver 对 Har 细胞毒性的明显增强(Fig 1, Tab 1). 两种方法都证明二药合并应用效果大于二者单独应用之和，出现协同作用. 还可看出这种协同作用既与 Ver 的浓度相关，也与 Har 的浓度相关(Tab 1). 上述事实意味着有可能以低剂量的 Har 与无毒剂量的 Ver 合用获得与高剂量 Har 单独应用同样的效果，从而减轻 Har 的毒副作用.

何种原因导致 Ver 与 Har 合用的协同作用尚不清楚，Ver 可抑制抗药性肿瘤细胞膜上的药物外排系统—P–糖蛋白的功能，使细胞

内药物聚积增加，细胞毒性增强[5-7]. 我们的初步实验也证明 Ver 与 Har 合用时 Ver 可以使[^{3}H]Har 在 HL-60 细胞内滞留增加(未发表材料). Ver 增强 Har 对 HL-60 细胞的毒性是否也是通过抑制细胞内药物的外排，增加药物聚积来实现的，尚待证实.

REFERENCES

1 Cooperation Study Group of Harringtonine. Preliminary clinical evaluation of harringtonines therapy on acute leukemia. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1975; **10** : 712-5.

2 Zhang YJ, Yu H, Luo XY, Zheng YX, Li WJ, Lui XL *et al*. Toxicological studies of harringtonine and homoharringtonine. *Acta Pharm Sin* 1979; **14** : 135-40.

3 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. *Cancer Res* 1983; **43** : 2267-72.

4 He NG, Zhang HQ, Wang RH, Yang XL, Xue SB. Enhancement of antitumor activity of bleomycin A5 in mouse sarcoma 180 cells *in vitro* and *in vivo* by verapamil. *Acta Pharmacol Sin* 1990; **11** : 381-4.

5 Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* 1979; **254** : 12701-5.

6 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** : 1967-72.

7 Chatterjee M, Robson CN, Harris AL. Reversal of multidrug resistance by verapamil and modulation by α_1-acid glycoprotein in wild-type and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res* 1990; **50** : 2818-22

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; **13** (5) : 473-477

甲苯达唑对细粒棘球蚴囊摄入葡萄糖的影响[1]

肖树华、尤纪青、郭惠芳、冯建军、孙惠良、焦佩英、姚民一、柴君杰[2]

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所，世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心，上海 200025，中国)

Effect of mebendazole on glucose uptake of *Echinococcus granulosus* cysts[1]

XIAO Shu-Hua, YOU Ji-Qing, GUO Hui-Fang, FENG Jian-Jun, SUN Hui-Liang, JIAO Pei-Ying, YAO Min-Yi, CHAI Jun-Jie[2]

(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariases, Shanghai 200025, China*)

ABSTRACT Mice infected with secondary cysts of *Echinococcus granulosus* were treated ig with mebendazole (Meb) 25 mg · kg^{-1} · d^{-1} for 7-14 d. At 24 h after the last dose the endocysts in the treated mice were removed out for *in vitro* cultivation and exposed to [U-^{14}C]glucose 11.1 kBq · ml^{-1} for 2 min, no apparent difference in radioactivity content in the cyst walls between the treated and control groups was observed.

When [U-^{14}C]glucose was given iv to the infected mice 24 h after they had been treated ig with Meb 25 mg · kg^{-1} or 50 mg · kg^{-1} daily for 14 d, the radioactivity content in the cyst wall and cyst fluid decreased significantly as compared to the corresponding control group. Nevertheless, no apparent change in the incorporation of radioactivity into the endogenous glycogen of the parasites was observed, although the glycogen in the cyst wall decreased markedly.

Received 1991-08-23 Accepted 1992-04-14

[1] Project supported by the National Natural Science Foundation of China, № 39070759.

[2] *Xinjiang Institute for Endemic Disease Control and Research, Urumqi 830002, China.*