



Российский Биотерапевтический Журнал

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



2/2003

EFFECT OF KANGLAITE INJECTION ON MULTIDRUG RESISTANCE TUMOR CELL

Yang Hua, Wang Xianping, Yu Linlin, Zheng Shu
Cancer Research Institute, Zhejiang Medical University

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is a main cause of failure of chemotherapy in the treatment of tumor. The study on MDR reversal agents opened up a vast range of prospect for making use of these drugs in the treatment of tumors clinically. In this study, the action of Kanglaite injection (KLT) on MDR tumor cells was investigated. Using human erythroleukemia drug-resistance K562/vcr cells, assayed with MTT method; and the efficacy of KLT on MDR tumor cells was compared with a variety of chemotherapy drugs; the effect of KLT on the sensitivity of doxorubicin (DOX) was investigated and compared with the MDR reverse agent-verapamil (VER). Results: the sensitivity of drug-resistant K562/vcr to KLT was less than that of the sensitive K562/vcr with drug tolerance multiple (RF) being 3.54; the test on the reverse of MDR for K562/vcr showed that the Resistance modification index (RMI) of 6mg/ml verapamil (VER) on K562/vcr was 125; and that of KLT 8mg/ml was 54.1, indicating that KLT has a reverse action on MDR cells, and the sensitivity of tumor cell to chemotherapy increased.

ВЛИЯНИЕ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ НА МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Ян Хуа, Ванг Ксянпин, Ю Линлин, Зенг Шу
Онкологический Научный Институт,
Шейангский Медицинский Университет, КНР

РЕЗЮМЕ

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является главной причиной неудач в лечении опухолей. Реверсия МЛУ является важной научной проблемой. Целью настоящего исследования было изучение влияния Канглайта для инъекций (КЛТ) на МЛУ опухолевых клеток. Использовали устойчивую к препаратам эритробластодную линию клеток K562/vcr и МТТ метод. Влияние КЛТ на МЛУ сравнивали с другими химиопрепаратами. Изучали реверсию чувствительности к доксорубину в резистентных клетках под действием КЛТ по сравнению с влиянием верапамила. Было обнаружено, что клетки устойчивой линии K562/vcr были высоко резистентны к растительным алкалоидам (винкристин, харрингтонин), циклическим препаратам (доксорубин, эприубин), антибиотикам (митомицин С) и слегка устойчивы к КЛТ. Верапамил дозо-зависимым образом снимал устойчивость этих клеток в доксорубину. КЛТ также ингибировал МЛУ, но в меньшей степени, чем верапамил. Так как КЛТ не обладает токсичностью, предполагается, что он найдет клиническое применение как ингибитор Pgp-гликопротеида.

Введение. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является главной причиной неудач в химиотерапии злокачественных заболеваний. Развитие МЛУ вызывает гиперэкспрессия гена MDR-1 и его продукта гликопротеина Pgp170. Pgp выполняет функцию насоса, выкачивающего токсические вещества из клетки. Pgp усиливает выведение химиопрепаратов из цитоплазмы и снижает накопление препарата в клетке. Реверсирующие МЛУ агенты ингибируют действие Pgp, восстанавливают чувствительность к терапии резистентных опухолей и могут быть потенциальными агентами в курсах химиотерапии злокачественных заболеваний. Многими авторами описано сильное реверсивное действие на МЛУ верапамила при комбинации с химиопрепаратами в процессе

терапии резистентных опухолей, но его применение ограничено сильной собственной токсичностью. Реверсивное действие верапамила является дозо-зависимым. Максимальная клиническая толерантная концентрация верапамила составляет 3 $\mu\text{mol/l}$; лучший реверсивный для МЛУ эффект был у верапамила в диапазоне 3 - 6 $\mu\text{mol/l}$. В связи с этим многие исследователи пытались найти лучший агент, изменяющий МЛУ, с высоким реверсивным действием и низкой токсичностью. Из экспериментальных и клинических протоколов было видно, что КЛТ в комбинации с химиотерапией или радиотерапией обладал аддитивным действием и синергизмом. Механизм этого феномена не ясен. Целью настоящего исследования была оценка влияния КЛТ на МЛУ опухолевых клеток.

Материалы и методы. *Клеточные линии.* Человеческая эритробластная линия клеток K562 получена из института иммунологии университета Кельна, Германия. Устойчивый к МЛУ штамм клеток K562/vcr получен в институте онкологии Шейангского медицинского университета.

Препараты и реактивы. Канглайт для инъекций (КЛТ) производства Zhejiang Kanglaite Pharmaceutical Co., Ltd, Doxorubicin (Dox), Epirubicin (EPI), Daunorubicin (DNR), Harringtonine (HAR), Mitomycin C (MMC), Verapamil (VER), Methotrexate (MTX), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) производства Tou Bin Factory, Farmitalia Carlo Erba Hangzhou Minsheng Factory, Kyowa and Serva соответственно.

Метод определения лекарственной устойчивости (МТТ метод). Клетки в логарифмической фазе роста помещали в 96-луночное плато по 2х10⁴ клеток на лунку. Затем в лунки к клеткам добавляли противоопухолевые препараты в различных концентрациях и культивировали в течение 72 ч. После этого в каждую лунку добавляли по 50 μ л МТТ в концентрации 1 mg/ml и инкубировали при 37 С в течение 4 ч. Плато центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости в лунки внесли по 100 μ л закисленного изопропанола. После растворения кристаллов определяли на колориметре оптическую плотность при длине волны 570 нм.

Множественную лекарственную резистентность (МЛР) определяли по формуле:

$$\text{МЛР} = \frac{\text{IC50 резистентной линии клеток}}{\text{IC50 чувствительной линии клеток}}$$

Метод определения реверсии лекарственной устойчивости. Этот метод похож на метод определения лекарственной устойчивости. Агенты, изменяющие МЛУ, и доксорубин были добавлены в лунки одновременно. Индекс модификации резистентности (ИМР) был высчитан следующим образом:

$$\text{ИМР} = \frac{\text{IC50 для доксорубина}}{\text{IC50 для доксорубина в сочетании с модифицирующим агентом}}$$

Результаты и обсуждение. Клетки устойчивой линии K562/vcr были высоко резистентны к растительным алкалоидам (винкристин, харрингтонин), циклическим препаратам (доксорубин, эпирубин), антибиотикам (митомин С) и слегка устойчивы к КЛТ (табл. 1).

Было обнаружено, что верапамил отменял лекарственную устойчивость клеток линии K562/vcr к токсическому действию доксометазона (табл. 2). Верапамил оказывал сильное обратимое действие на МЛУ в концентрациях 1,5 – 6 μ г/мл. IC50 снижался с 30 μ л/мл при применении одного доксорубина до 0,2 – 0,5 при использовании в комбинации с верапамилем. Индекс

Таблица 1
Чувствительность к препаратам клеток линии K562 и K562/vcr

Препарат	IC50 (μ л/мл)		
	K562	K562/vcr	RF
Доксорубин	0,9	30	33,3
Эпирубин	0,8	20	25
Даунорубин	0,6	2,5	4,2
Верапамил	<0,0012	4	33,33
Харрингтонин	0,064	20	31
Митомин С	4	18	4,5
Метотрексат	20	20	1
Канглайт	38,5	136,4	3,54

модификации резистентности был дозо-зависимым и повышался от 55 при дозе верапамила 1,5 μ л/мл до 125 при концентрации препарата 6 μ л/мл.

КЛТ также оказывал реверсивное действие на лекарственную чувствительность клеток линии K562/vcr к доксорубину (табл. 3). IC50 снижался с 30 μ л/мл до 0,7 – 0,5 μ л/мл. ИМР был более чем в 2 раза ниже по сравнению с верапамилем.

Таким образом, было продемонстрировано, что КЛТ модифицирует множественную лекарственную устойчивость, хотя в меньшей степени по сравнению с верапамилем. Однако, применение верапамила ограничено его сильной кардиотоксичностью, тогда как Канглайт не имеет токсичности.

Таблица 2
Реверсивное действие верапамила на лекарственную устойчивость клеток K562/vcr

Доксорубин	Верапамил (μ л/мл)		
	6	3	1,5
0	0,817	0,808	0,802
0,01	0,809	0,889	0,703
0,1	0,458	0,512	0,639
1	0,146	0,181	0,01
10	0,147	0,189	0,190
Доксорубин в комбинации с верапамилем			
IC50	0,24	0,285	0,546
ИМР	125	105,3	55
Доксорубин без верапамила			
IC50	30		

Таблица 3
Реверсивное действие КЛТ на лекарственную устойчивость клеток K562/vcr

Доксорубин	КЛТ (μ л/мл)		
	6	3	1,5
0	0,846	0,765	0,805
0,01	0,692	0,718	0,782
0,1	0,686	0,701	0,804
1	0,166	0,192	0,207
10	0,086	0,141	0,175
Доксорубин в комбинации с КЛТ			
IC50	0,555	0,664	0,705
ИМР	54,1	45,2	42,6
Доксорубин без КЛТ			
IC50	30		

Лекарственная резистентность является главной причиной неудач химиотерапии злокачественных новообразований. Рецидив опухоли после первой успешной стадии терапии опухоли связан с появлением клона резистентных клеток. Множественную лекарственную устойчивость вызывают растительные алкалоиды, антибиотики и другие препараты. При развитии устойчивости к одному препарату развивается резистентность и к другим. При использовании КЛТ для терапии резистентных опухолей его доза

может быть увеличена. Результаты этой работы показали, что КЛТ вызывает дозо-зависимую реверсию МЛУ даже в маленьких дозах (1,5 – 6 $\mu\text{l}/\text{мл}$). Этот факт помогает понять эффективное противоопухолевое действие комбинации КЛТ с другими химиопрепаратами и служит основанием для его широкого клинического применения. На основании этого исследования рекомендуется использовать КЛТ для лечения опухолей у больных с развившейся множественной лекарственной устойчивостью.