

维拉帕米联用阿霉素、长春新碱、 足叶己甙体外净化白血病细胞

戴木水^① 洪文德 庞国元 彭爱华 罗绍凯

(中山医科大学附属第一医院血液病研究室; 广州, 510080)

摘要 采用体外克隆形成培养技术研究维拉帕米(VPL)联用阿霉素(ADM)、长春新碱(VCR)和足叶己甙(VP-16)体外净化白血病细胞,结果显示: VPL 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 能明显增加单一应用的不同浓度 ADM、VCR或VP-16对白血病细胞克隆形成单位(L-CFU)的抑制作用,而不增加其对正常粒巨系克隆形成单位(GM-CFU)的毒性。0.92 $\mu\text{mol/L}$ ADM、0.0250 $\mu\text{mol/L}$ VCR及 1.70 $\mu\text{mol/L}$ VP-16联合应用下, L-CFU集落存活率为 11.6%,再联用 2.20 $\mu\text{mol/L}$ VPL则为 3.52%;而相同条件下 GM-CFU集落存活率分别为 35.8%及 26.05% (与相应 L-CFU组相比, $P < 0.01$),提示 VPL能明显增加上述化疗药物联合应用下的选择性体外净化白血病细胞作用。

主题词 维拉帕米 治疗应用; 白血病,髓系,急性 药物疗法; 骨髓清除; 抗肿瘤药,多剂联用

中图分类号 R 733.71

移植物骨髓中微量残留白血病细胞体内克隆再增殖将引起复发,从而影响自体骨髓移植(ABMT)的疗效,因此对其实施有效的体外净化将十分必要。药物净化较常用,但单一药物不易达到最佳净化效果,且移植物骨髓中微量残留白血病细胞易对化疗药物产生多药耐药性(MDR)。已有研究证明维拉帕米(VPL)能明显增加MDR或非MDR白血病细胞对化疗药物杀伤的敏感性^[1,2]。本研究设计作用于细胞不同增殖周期的3种化疗药物阿霉素(ADM)、长春新碱(VCR)及足叶己甙(VP-16)联合应用,并用VPL提高联合用药的体外净化效果,为临床提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 骨髓单个核细胞悬液的制备

正常骨髓 15例,取自非恶性血液病患者手术切除的肋骨,其中男 9例,女 6例;年龄 12~73岁,中位年龄 41岁。急性非淋巴细胞白血病(ANLL)骨髓 15例,取自我科住院病例,其中男 7例,女 8例;年龄 18~80岁,中位年龄 37岁;初治 13例,复治 2例;根据 1985年 FAB分型: M₁ 3例, M₂ 4例, M₃ 2例, M₄ 2例, M₅ 3例, M₆ 1例;骨髓白血病细胞占有核细胞比例平均为 77.5% (6%~94%)。

所有骨髓细胞均用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,用 RPMI-1640培养液洗涤、稀释,并配制成浓度为 $2 \times 10^5/\text{L}$ 的单个核细胞悬液。

1.2 体外药物净化方法

正常及白血病骨髓单个核细胞悬液均取 0.1 mL (含 2×10^5 个细胞),用 RPMI-1640稀释成 1 mL,按表 1 分组加入药物。各组摇匀后置 37°C 孵育 1 h,每 10 min 轻轻摇匀 1 次,最后离心洗涤 3 次去药物,收集沉淀细胞用于细胞培养。

1.3 体外甲基纤维素半固体培养

白血病祖细胞克隆形成单位(L-CFU)及正常骨髓粒巨克隆形成单位(GM-CFU)培养总体积 1 mL,均含 2×10^5 个单个核细胞、3% 小牛血清、10% PHA-LCM、0.88% 甲基纤维素(Sigma公司产品)、青链霉素各 100 U、丁胺卡那霉素 20 μg 。充分混匀后每组分两孔,每孔 0.5 mL 加入 24 孔培养板中,置 5% CO₂、37°C、完全饱和湿度下培养 8 d,分别计 40 个细胞以上的集落数,取两孔集落数的均数用于资料统计。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数的比较用 t 检查,多组均数的比较用 F 检验,GM-CFU 及 L-CFU 两组率的比较用 χ^2 检验。集落存活率 = 试验组集落均数 / 对照组集落均数 $\times 100\%$ 。

^① 第一作者,1966年出生,男,硕士,主治医师

表 1 不同浓度的 V PL, ADM, V CR及 V P-16体外对 L-CFU及 GM-CFU集落数形成的影响

组 别	药物处理 ($\mu\text{mol/L}$)				GM-CFU ($n=15$)		L-CFU ($n=15$)	
	V PL	ADM	V CR	V P-16	集落数 (个)	存活率 (%)	集落数 (个)	存活率 (%)
1 a	0	0	0	0	115.50± 61.07	100.00	115.73± 56.01	100.00
	b	2.20	0	0	112.43± 58.36	97.34	104.93± 49.71	90.67
2 a	0	0.46	0	0	95.26± 51.51	82.48	66.53± 33.60	57.49
	b	2.20	0.46	0	81.79± 46.17	70.81	40.70± 26.81 ¹⁾	35.17
3 a	0	0.92	0	0	74.89± 28.96	64.84	51.03± 27.89	44.09
	b	2.20	0.92	0	67.46± 41.35	58.41	26.07± 20.16 ¹⁾	22.53
4 a	0	1.84	0	0	62.80± 44.21	54.37	36.77± 24.65	31.77
	b	2.20	1.84	0	51.65± 34.62	44.72	15.77± 14.05 ¹⁾	13.63
5 a	0	0	0.0125	0	101.48± 55.29	87.86	71.77± 27.25	62.02
	b	2.20	0	0.0125	85.38± 48.01	73.92	49.50± 30.49 ¹⁾	42.77
6 a	0	0	0.0250	0	82.57± 46.88	71.49	61.87± 31.39	53.46
	b	2.20	0	0.0250	73.22± 44.23	63.29	37.40± 24.43 ¹⁾	32.32
7 a	0	0	0.0500	0	65.48± 44.33	56.69	43.57± 24.58	37.65
	b	2.20	0	0.0500	62.60± 42.15	64.20	25.37± 17.34 ¹⁾	21.92
8 a	0	0	0	0.85	93.98± 54.36	81.37	60.03± 29.98	52.39
	b	2.20	0	0	78.62± 36.38	68.07	33.37± 21.23 ¹⁾	29.15
9 a	0	0	0	1.70	78.06± 43.97	67.58	44.77± 27.22	38.69
	b	2.20	0	0	66.27± 33.81	57.38	22.93± 17.27 ¹⁾	19.81
10 a	0	0	0	3.40	57.83± 38.80	50.07	32.30± 23.45	27.91
	b	2.20	0	0	49.73± 26.42	43.06	15.00± 13.07 ¹⁾	12.96
11 a	0	0.46	0.0125	0.85	60.94± 36.72	52.81	30.20± 26.54	26.10
	b	2.20	0.46	0.0125	48.57± 23.82	42.05	13.13± 13.71 ¹⁾	11.35 ²⁾
12 a	0	0.92	0.0250	1.70	41.36± 33.26	35.81	13.43± 8.57	11.61
	b	2.20	0.92	0.0250	30.09± 18.06	26.05	4.07± 2.93 ¹⁾	3.52 ²⁾

注: 1) b与同组 a相比 $P < 0.05$; 2) 与同组 GM-CFU集落存活率相比, $P < 0.01$

2 结 果

2.1 V PL对 ADM, V CR或 V P-16分别应用下 L-CFU及 GM-CFU集落存活率的影响

由表 1可见,单独应用 V PL对 L-CFU和 GM-

CFU集落存活率均无明显影响;而 V PL明显增加各浓度 ADM, V CR或 V P-16对 L-CFU集落的抑制作用,其中 $2.20\mu\text{mol/L}$ V PL分别与 $0.92\mu\text{mol/L}$ ADM, $0.0250\mu\text{mol/L}$ V CR或 $1.70\mu\text{mol/L}$ V P-16联用下, L-CFU集落存活率为 22.53% 、 32.32% 及 19.81% ,分别为相应不加 V PL组的 1.96 、 1.65 、 1.95 倍 ($P < 0.05$);而 V PL并不增加上述 3种化疗药

物对 GM-CFU 的抑制作用。

2.2 VPL 对 ADM VCR 及 VP-16 联合应用下 L-CFU 和 GM-CFU 集落存活率的影响

由表 1 可见, VPL 能明显提高 2 种浓度 ADM VCR 及 VP-16 联合应用对 L-CFU 集落的抑制作用, 而不增加其对 GM-CFU 的毒性, 提示 VPL 能明显增加 3 种化疗药物联合应用的净化效果。其中 VPL 联用 $0.92 \mu\text{mol/L}$ ADM $0.0250 \mu\text{mol/L}$ VCR 和 $1.70 \mu\text{mol/L}$ VP-16 作用下, L-CFU 仅存活 3.52%, 而 GM-CFU 集落尚存活 26.03% ($P < 0.01$), 提示该联合方案有明显的选择性体外净化作用。

3 讨论

影响化疗疗效的重要原因之一是白血病细胞对化疗药物产生 MDR。移植骨髓微量残留白血病细胞产生 MDR 克隆也将影响 ABMT 药物体外净化的效果。较多的研究已证明 VPL 逆转 MDR^[1,3,4], 并可提高非 MDR 白血病细胞对化疗药物杀伤的敏感性^[2,5]。本研究结果显示, VPL 对不同浓度的 ADM VCR 或 VP-16 体外抑制 L-CFU 克隆生长均有增强作用, 而不增加它们对 GM-CFU 的毒性, 说明 VPL 可用于提高这些化疗药物体外净化的效果。用 VPL 联合上述 3 种化疗药物体外净化白血病细胞, 结果显示 VPL 能明显增加 3 种化疗药物联合应用对 L-CFU 克隆生长的抑制作用, 也不增加其对 GM-CFU 的毒性, 提示该联合净化方案有较好的体外净化效果, 且 26.05% 的 GM-CFU 回收率可足以保证骨髓的造血重建。

关于 VPL 逆转 MDR 的机制目前尚不完全清楚, 可能是基于其与 P-170 蛋白的结合, 而使细胞内化疗药物蓄积浓度增加, 提高药物对白血病细胞的杀伤敏感性。P-170 是由位于人染色体 7 q21.1 的 *mdr1* 基因编码的膜糖蛋白, 它是一种 ATP 依赖的流出泵, 可将化疗药物泵出细胞外, 从而使细胞内化疗药物浓度减少^[3,4]。本研究 15 例 ANLL 有 13 例属初治病人, 据有关资料, 初治白血病 MDR 出现率可达 23% ~ 75%^[7-9], 说明本组病例 MDR 也是存

在的, 本实验结果可能部分是由于 VPL 的逆转 MDR 作用, 但也可能还有其增加非 MDR 白血病细胞对化疗药物杀伤敏感性的作用。这些作用对于 ABMT 移植骨髓微量残留白血病细胞的体外净化将有重要的临床意义, 且无需考虑 VPL 的心脏毒副作用。

参考文献

- Haber DA. Multidrug resistance (MDR1) in leukemia. Is it time to test? *Blood*, 1992, 79: 295
- Gruber A, Briesse B, Arestron I, *et al.* Effect of verapamil on daunorubicin in human leukemic cells with different levels of MDR1 gene expression. *Leukemia Res*, 1993, 17: 353
- Reizenstein P. Resistance modifying agents are active in some patients with hematological malignancy. *Leukemia Res*, 1993, 17: 295
- Arceel RJ. Clinical significance of P-glyco protein in multidrug resistance malignancies. *Blood*, 1993, 82: 2215
- 沈世人, 苏颖, 邹长炎, 潘生丁, 维拉帕米对逆转 K562/MDR1 耐药性的研究. *癌症*, 1993, 12: 197
- Giohanu, aietta E, Andreeff M, *et al.* Etoposide as an in vitro purging agent for the treatment of acute leukemias and lymphomas in conjunction with autologous bone marrow transplantation. *Exp Haematol*, 1986, 14: 626
- Tiinkainen MI, Elonen E, Ruutu T, *et al.* Clinical significance of P-glycoprotein expression in acute leukemia as analysed by immunocytochemistry. *Eur J Haematol*, 1993, 50: 279
- 孙桂香, 李惠芬, 王观武, 等. 多药耐药基因在白血病细胞中的表达. *中华血液学杂志*, 1994, 15: 61
- Pirker R, Wallner J, Geissler K, *et al.* MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Invest*, 1991, 83: 703

(1995-08-13 收稿 1996-03-15 修回)

(下转第 36 页)

THE INDUCTION OF HUMAN IgG TO EPSTEIN-BARR VIRUS CAPSID ANTIGEN (EB-VCA) IN SCID MICE

Xiao Xibing¹ Chen Xigu² Zhang Changqing¹ Huang Bing²
Li Jinglue¹ Fong Kaitao¹ Ye Yongzhao¹ Sun Yun¹

(1 Central Laboratory of Tumor Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060

2 Laboratory of Animal Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

Severe combined immunodeficient disease-human peripheral blood lymphocyte (SCID-hPBL) and human peritoneal lymph node lymphocyte (SCID-hPLNL) mice models have been established by intraperitoneal injection of lymphocytes isolated from normal human peripheral blood or peritoneal lymph nodes into SCID mice. The mice were then immunized by EB-VCA positive B95-8 cells. The sera from the SCID mice were then tested for their level of human IgG and induction of human IgG to EB-VCA (IgG/VCA). The results revealed that 70% (7/10) of sera had positive human IgG/VCA in the immunized mice, in comparison to 17% (2/12) in the control group. The GMT (geometric mean titer) of human IgG/VCA and the level of human IgG in the sera were $1: 108$ and $(96.2 \pm 56.4) \mu\text{g/L}$ in 14 SCID-hPLNL mice and $1: 7.8$ and $(13.84 \pm 6.0) \mu\text{g/L}$ in 8 SCID-hPBL mice respectively. The results suggested that SCID-hPLNL mice may be more effective for induction of human IgG to some specific immunogen than the SCID-hPBL mice.

Subject headings herpesvirus 4, human/immunology; antibodies, viral; mice, SCID

(上接第 30页)

IN VITRO PURGING OF LEUKEMIC CELLS BY VERAPAMIL COMBINED WITH ADRIAMYCIN, VINCRISTINE AND ETOPOSIDE

Dai Mushui Hong Wende Pang Guoyuan Peng Aihua Luo Shaokai

(Laboratory of Hematology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Using semi-solid culture technique of clonal formation in vitro, we observed the influence of verapamil (VPL) upon ex vivo purging activity of adriamycin (ADM), vincristine (VCR) or etoposide (VP-16). The results showed that VPL significantly enhanced the killing activity of ADM, VCR or VP-16 on leukemia progenitor (L-CFU) cells, but did not add their toxicity to GM-CFU. When purged by combination of $0.92 \mu\text{mol/L}$ ADM, $0.0250 \mu\text{mol/L}$ VCR and $1.70 \mu\text{mol/L}$ VP-16 or VPL combined with them, the survival rate of L-CFU was 11.61%, 3.52%, respectively, with the survival rate of GM-CFU was 35.81%, 26.05%, respectively, suggesting that VPL selectively enhanced ex vivo purging activity of combination of the above chemotherapeutic agents on leukemic cells, but did not add their toxicity to GM-CFU.

Subject headings verapamil/therapeutic use; leukemia, myeloid, acute/drug therapy; bone marrow purging; antineoplastic agents, combined