

## EFFECT OF KANGLAITE INJECTION ON THE CELL CYCLE OF TUMOR

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

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of Kanglaite (KLT) on the tumor cell cycle. The results reveal that the blank emulsion has a slight inhibiting action on tumor cells: the inhibition rate of 1:20 diluted emulsion (corresponding to 50  $\mu\text{l/ml}$ ) for KB cells being 10%. The IC<sub>50</sub> values for KB cell and K562 cell being 22,65  $\mu\text{l/ml}$  and 38,57  $\mu\text{l/ml}$  KLT respectively. The mechanism by which KLT blocks the growth of tumor cells as showed by the flow cytometry is the inhibition of the multiplication of cancer cells, characterized by a decrease in the number of S-period cells and an increase in the G<sub>2</sub>+M period cells with a dose-dependent relationship, thus resulting in the apoptosis of tumor cells.

## ЭФФЕКТ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

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

### РЕЗЮМЕ

Целью исследования явилось изучение влияния препарата «Канглайт для инъекций» (КЛТ) на клеточный цикл в опухолевых клетках. Результаты показали, что инкубация клеток линии KB с контрольной ультраэмульсией, разведенной 1:20, что соответствует концентрации препарата КЛТ 50 мкл/мл, привела к ингибции 10% клеток. IC<sub>50</sub> для клеток линии KB и K562 был 22,65 мкл/мл и 38,57 мкл/мл препарата КЛТ соответственно. Методом проточной цитофлуорометрии показали, что КЛТ дозо-зависимым образом блокирует рост опухолевых клеток. КЛТ снижает количество клеток в S фазе клеточного роста, повышает количество клеток в G<sub>2</sub>+M фазе и индуцирует апоптоз.

**Введение.** «Канглайт для инъекций» (КЛТ) является ультраэмульсией для инъекционного применения, полученной с помощью современной технологии из активной части экстракта семян *Coix*. В экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что КЛТ имеет выраженную противоопухолевую активность для многих типов опухолевых клеток, а также повышает иммунную реактивность организма. Изучение цитотоксического действия КЛТ на опухолевые клетки дало возможность использовать его лечения больных злокачественными заболеваниями.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния КЛТ на клеточный цикл опухолевых клеток.

### Материалы и методы

1. *Реактивы и реагенты.* 10% раствор КЛТ и чистая контрольная ультраэмульсия предоставлены Zhejiang Kanglaite Pharmaceutical Co., Ltd. (3-(4,5 диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н тетразолий бромистый (МТТ); среда RPMI-1640, пропидиум иодид (PI) производства Merck, Sigma и Gibco company; митомицин С (ММС), произведен Kyowa Co., Ltd.

2. *Клеточные культуры.* Линия клеток KB челове-

ческой плоскоклеточной карциномы полости рта получена из Шанхайского Института Биологии Китайской Академии Наук; линия клеток K562 эритробластного лейкоза человека предоставлена Исследовательским Институтом Иммунологии Кильского Университета (Германия).

3. *Оборудование.* Проточный цитофлуориметр (FACScan) фирмы Becton Dickinson (США).

4. *МТТ тест.* МТТ тест выполнен по стандартной методике [1]. В опытах использовали клетки на следующий день после пассажа. В каждую лунку 96-луночной платы помещали по 200 мкл клеток в логарифмической фазе роста (2×10<sup>5</sup>/мл). В опыте были следующие группы: 1) контроль - инкубация клеток с физиологическим раствором; 2) экспериментальные группы - клетки с различными концентрациями КЛТ и 3) положительный контроль - клетки инкубированные с митомицином С. В каждой группе было по 6 дублированных лунок. Клетки с препаратами инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч, затем добавляли МТТ (рабочий раствор 5 мг/мл) по 10 мкл в каждую лунку за 4 часа до конца эксперимента. После чего определяли оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре,

при длине волны 570 нм. Коэффициент ингибирования роста опухолевых клеток рассчитывался по формуле:

$$\text{Коэффициент ингибирования (\%)} = 1 - \frac{\text{средняя ОП экспериментальной группы}}{\text{средняя ОП контрольной группы}} \times 100 \%$$

50% ингибирующую концентрацию (IC50) лекарственного препарата рассчитывали логарифмическим графическим методом.

5. *Определение фаз клеточного цикла.* Фазы клеточного цикла определяли методом проточной цитофлюорометрии как описано ранее [2]. Клетки фиксировали в абсолютном спирте, обрабатывали РНК-азой, окрашивали PI в течение 30 минут. С помощью проточного цитофлюориметра определяли содержание ДНК, а процент клеток в разных периодах клеточного цикла вычисляли с помощью компьютерной программы Multicycle (Phoenix flow system, США, 1994).

**Результаты и обсуждение**

1. *Угнетение роста опухолевых клеток с помощью КЛТ.* КЛТ существенным образом тормозил рост клеток линий KB и K562 при инкубации в течение 72 часов. Уровень 50% ингибирующей концентрации для клеток линий KB и K562 составил 22,6 мкл/мл и 38,5 мкл/мл КЛТ соответственно. Контрольная ультраэмульсия, разведенная 1:20, соответствующая 50 мкл/мл КЛТ, показала 10% угнетение роста клеток линии KB. Уровень 50% ингибирующей концентрации для клеток KB в позитивном контроле группы с митомицином C составил 0,54 мкл/мл.

2. *Влияние КЛТ на клеточный цикл опухолевых клеток.* Влияние КЛТ на фазы клеточного цикла опухолевых клеток показано в таблице 1. После обработки клеток КЛТ в дозе 1мкл/мл процент клеток в S-фазе и G2+M периоде заметно увеличился. В то время как доза КЛТ в 5 мкл/мл снижала количество клеток в S-фазе. Когда дозу КЛТ увеличили до 10 мкл/мл, процент клеток в S-фазе снизился на 11,6% по сравнению с контрольной группой, а процент клеток в G2+M-периоде увеличился в 12 раз. При дозе КЛТ 50 мкл/мл, апоптоз наблюдался в 100% опухолевых клеток.

Выше описанные результаты показывают, что КЛТ имеет значимый дозо-зависимый ингибирующий эффект на клетки линии K562. Механизм, лежащий в основе апоптоза опухолевых клеток, является результатом препятствия перехода клеток из G<sub>2</sub>+M-фазы в G<sub>0</sub>- и G<sub>1</sub>-фазу. Таким образом, процент клеток в S-периоде

Таблица 1  
Действие КЛТ на клеточный цикл клеток K562

Группы	Концентрация препарата	Клетки в G <sub>1</sub> фазе (%)	Клетки в S фазе (%)	Клетки в G <sub>2</sub> +M фазе (%)
Интактный контроль	-	42,4	51,6	6,0
Контрольная эмульсия	1 мкл/мл	42	47,4	5,4
	5 мкл/мл	45,3	52,7	2,0
	10 мкл/мл	41	48,3	10,6
КЛТ	1 мкл/мл	26,2	58,1	15,7
	5 мкл/мл	27,2	24,1	48,8
	10 мкл/мл	26,4	6,1	67,5
	50 мкл/мл	Апоптоз		

снижается и митоз опухолевых клеток сокращается, ингибируется деление клеток, и, в конечном счете, индуцируется апоптоз. Результаты в контрольной группе с чистой эмульсией показали, что доза ниже 10 мкл/мл не оказывает никакого эффекта на клеточный цикл клеток K562. КЛТ в этих дозах оказывал видимый эффект на клеточный цикл опухолевых клеток.

Японские ученые сообщили о двух активных компонентах, извлеченных из семян Соix, которые оказывают ингибирующее действие на рост мышинной карциномы Эрлиха. Один из эффективных компонентов вызывал дегенерацию протоплазмы, а другой компонент останавливал клеточное деление на уровне метафазы [3, 4]. Наши результаты подтверждают, что КЛТ может ингибировать деление опухолевых клеток, путем препятствия делению ядра в опухолевых клетках [5, 6].

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *Camplin B.G., Pym J., Baker H.M. et al.* Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using MTT assay.// Br J Cancer, 1991, P. 63-75.
2. *Dosik Gm., Barligie B., Smith T.L. et al.* Pretreatment flow Cytometry of DNA content acute leukemia.// Blood, 1980, P. 55-74.
3. *Nakayama Muneharu* // The Journal of Japanese Surgery, 1960, 61, № 2, P. 234.
4. *Nakayama Tsuneaki* // The Journal of Japanese Engineer Association, 1959, 42, № 2, P. 945
5. *Li Fengyun* // The Journal of Practical Oncology, 1994, № 3, P. 59
6. *Liu Jiexiang, Liao Meilin, Yan Dejun.* Kanlaite Injection in the Treatment of Primary Lung Cancer - A Clinical Summary. Zhejiang Anticancer Drug Information, Aug. 1995