

氯化光花椒碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响

柴亦军 周军 李茂 (广西壮族自治区医药研究所, 南宁)

提要 用放射自显影方法研究了氯化光花椒碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响。腹腔接种 10^7 癌细胞后第 4 d 进行标记, 艾氏腹水癌细胞生长周期时间(T_c)为 38.8 h, 其中 G_1, S, G_2, M 期分别为 8.0, 25.8, 3.8, 1.2 h; 生长比 0.86。氯化光花椒碱均为 ip。剂量为 20 mg/kg 时, 26 h 内癌细胞 [3H] 胸苷脉冲标记指数不变, 但有丝分裂指数降低, 大细胞比例增加, 表明细胞被阻滞于 G_2 期。剂量为 40 mg/kg 时, 对 S 期细胞可能有杀伤作用。分别以 [3H] 胸苷及 [3H] 尿苷脉冲标记, 以细胞平均颗粒数为指标, 观察到药物能明显抑制 DNA 合成, 对 RNA 合成的抑制作用较弱。

关键词 氯化光花椒碱; 艾氏腹水癌细胞; 细胞周期; 放射自显影

近年来发现, 芸香科花椒属植物中某些氮杂菲类生物碱具有抗癌活性, 其中氯化光花椒碱活性最高, 对小鼠淋巴细胞白血病 L1210, P388 等均有效⁽¹⁾。为了探索药物作用机制, 为临床合理用药提供实验依据, 我们研究了氯化光花椒碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响。

材料和方法

一、材料 氯化光花椒碱: 本所化学室从芸香科花椒属植物两面针 (*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.)) 中提得的黄色结晶⁽²⁾, 溶于去离子水, 制成 1 mg/ml 及 2 mg/ml 两种溶液。配制 2 mg/ml 溶液时, 加温(不超过 70°C)使溶。

[3H] 胸苷 ([3H] TdR): 中国科学院原子能研究所制备, 比度为 13.3 Ci/mM, 试验时以注射用水稀释至 100 μ Ci/ml。

[5- 3H] 尿苷 ([3H] UdR): 上海原子核研究所制备, 比度为 21.8 Ci/mM, 试验时以注射用水稀释至 200 μ Ci/ml。

核子乳胶: 中国科学院原子能研究所生产的核-4 乳胶。

动物: 本所动物室饲养繁殖的 CFW 小鼠, 体重 18-24 g, 每次试验用同一性别。

瘤株: 小鼠艾氏腹水癌 (EAC), 腹腔接种 10^7 细胞, 每 7 d 传代一次, 除另有说明外, 均于接种后第 4 d 进行试验。

二、方法 EAC 细胞增殖试验: 1) 27 鼠作为对照, 于接种癌细胞后不同时间, 分别取 3 鼠断颈处死, 用 0.1-0.2 g 脱脂棉吸尽腹腔液(如腹水较多, 先用注射器抽取), 每 0.1 g 脱脂棉置于 10 ml 冰冷生理盐水中轻轻搅拌, 使细胞脱落于盐水中, 与抽取的腹水合并, 以血球计数板用伊红盐水稀释计数活细胞, 并算出每一时间 3 鼠平均细胞数; 2) 21 鼠, 接种癌细胞后立即 ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg, 药后不同时间按“1) 组”方法计数细胞; 3) 6 鼠, 接种癌细胞后第 4 d ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg, 药后 24 及 48 h 按“1) 组”方法测癌细胞数。

EAC 细胞生长周期的测定: 带瘤小鼠 40 只, 每鼠 ip [3H] TdR 15 μ Ci, 标记后 0.5, 1, 4 h 及随后每隔 4 h 分别取 2 鼠腹水涂片, 用放射自显影方法处理, 测定有丝分裂中期细胞标记%⁽³⁾。按 Wheeler 等的方法计算细胞周期及周期中各期时间⁽⁴⁾。并按下式计算生长比 (growth fraction)⁽⁵⁾:

$$\text{生长比} = \frac{LI}{(e^{T_s \ln 2 / T_c} - 1) e^{T_{G_2+M} \ln 2 / T_c}}$$

LI, 标记指数, T_s , T_c , T_{G_2+M} : 分别为 S 期, 细胞周期及 $G_2 + M$ 期时间 (h)。

测定有丝分裂指数: 带瘤小鼠 22 只, 其中 6 鼠为对照, 另 16 鼠 ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg, 药后不同时间分别取 2 鼠腹水涂

片, 测定有丝分裂指数⁽³⁾。

测量细胞直径: 带瘤小鼠 20 只, ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg 后不同时间, 取腹水涂片, 染色, 用显微测微器测量每一标本 500 个间期细胞直径, 按测微器刻度将其分为Ⅳ级: I 级 ≤ 6, II 级 = 7-8, III 级 = 9-10, IV 级 ≥ 11; 每一刻度相当于 1.8 μm。

[³H] TdR 脉冲标记: 带瘤小鼠分为 3 组。1) 低剂量组, 24 鼠, ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg; 2) 高剂量组, 18 鼠, ip 氯化光花椒碱 40 mg/kg; 3) 对照组, 6 鼠。药后不同时间分别取各组两鼠进行标记, 测定标记指数及 50 个标记细胞的平均颗粒数⁽³⁾。

[³H] UdR 脉冲标记: 带瘤小鼠 12 只, 其中 2 鼠作对照, 另 10 鼠 ip 氯化光花椒碱 20 mg/kg 后, 按上法操作, 仅以 [³H]UdR 40 μCi 代替 [³H]TdR, 计算标记细胞平均颗粒数。

结 果

小鼠接种 1×10^7 EAC 细胞后 0-3 d, 细胞数量呈指数增长, 平均倍增时间约 16 h。3 d 后, 生长曲线逐渐偏离对数直线, 倍增时间延长, 9-11 d 约为 120 h(图 1)。无论接种癌细胞后立即或第 4 d 给药, 细胞增长均受到抑制; “立即” 给药组细胞数在 3 d 后显著减少, 第 5 d 约为正常值的 15%。

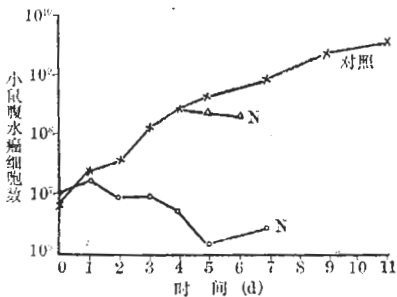


图 1 EAC 细胞生长曲线 N: ip 氯化光花椒碱 20mg/kg

[³H] TdR 一次标记, EAC 细胞有丝分裂中期标记曲线见图 2, 细胞周期时间为 38.8 h, 其中 G₁ 期 = 8.0h, S 期 = 25.8 h, G₂ 期 = 3.8 h, M 期 = 1.2 h。生长比为 0.86。

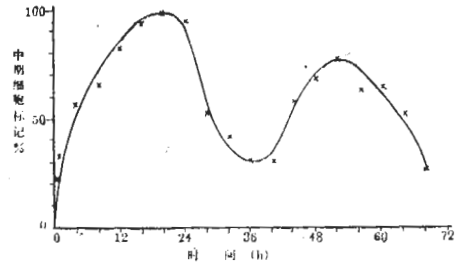


图 2 EAC 细胞中期标记曲线

给药后 2 h, EAC 细胞有丝分裂指数明显降低, 12 h 降至最低, 为正常值的 6%, 16 h 后逐渐回升(图 3)。在药物作用下, 大细胞(III + IV 级)不断增多, 至 43 h, 其比例由正常时的 14.2% 增至 93.2%(图 4)。并出现多核细胞和巨细胞。

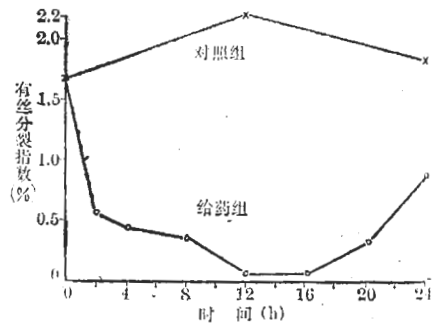


图 3 氯化光花椒碱对 EAC 细胞有丝分裂指数的影响

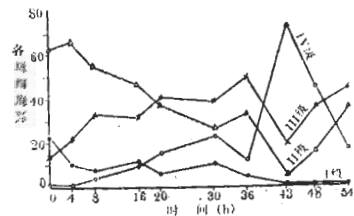


图 4 氯化光花椒碱对 EAC 细胞直径的影响

[³H] TdR 脉冲标记试验表明, 氯化光花椒碱 20 mg/kg 对癌细胞标记指数影响不大, 但平均标记颗粒数明显减少, 药后 9 h 约减至正常值的 20% 以下, 18 h 后开始回升; 给予 40 mg/kg 后, 标记指数及颗粒数均立即减少, 4 h 降至最低, 分别为正常值的 8% 及 9%, 20 h 开始回升(图 5)。

在氯化光花椒碱 20 mg/kg 作用下, $[^3\text{H}]$ UdR 脉冲标记细胞平均颗粒数明显减少(图 6), 但与 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入试验相比, 氯化光花椒碱抑制 $[^3\text{H}]$ UdR 掺入的作用较弱, 维持时间也短。

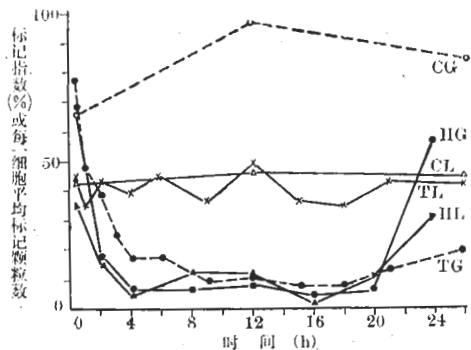


图 5 氯化光花椒碱对 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入 EAC 细胞的影响(标记时间: 15 min)

CG: 对照组标记颗粒数; CL: 对照组标记指数; TG: 20 mg/kg 组标记颗粒数; TL: 20 mg/kg 组标记指数; HG: 40 mg/kg 组标记颗粒数; HL: 40 mg/kg 组标记指数

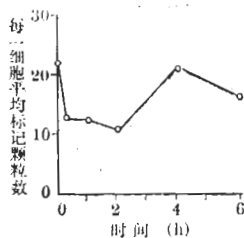


图 6 氯化光花椒碱对 $[^3\text{H}]$ UdR 掺入 EAC 细胞的影响

讨 论

体内 EAC 细胞由于接种数量及接种后时间不同, 生长周期各有差别, 从 12 乃至 83 h⁽⁶⁾。

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Mar; 2 (1): 46-49

EFFECT OF NITIDINE CHLORIDE ON THE LIFE CYCLE OF EHRlich ASCITES CARCINOMA CELLS IN MICE

FAN Yi-jun, ZHOU Jun, LI Mao

(Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences of Guangxi Chuang Autonomous Region, Nanning)

ABSTRACT The effect of nitidine-Cl on the life cycle of Ehrlich ascites carcinoma

我们的实验表明, 接种 1×10^7 细胞后 0-3 d, 细胞数量呈指数增长。但此时腹腔液甚少, 难以抽取, 故选择接种后第 4 d 进行试验, 测得的周期时间为 38.8 h, 生长比 0.86, 即 86% 的细胞处于增殖状态, 存在少量 G₀ 期细胞。对结果分析影响不大。

氯化光花椒碱 20 mg/kg, 在 48 h 内能阻止 EAC 细胞增殖, 促使大细胞比例增加, 有丝分裂指数降低, 但标记指数无大变化, 表明细胞被阻滞在 G₂ 期⁽⁷⁾。高剂量(40 mg/kg)氯化光花椒碱在减少细胞标记颗粒数的同时, 也降低标记指数, 提示氯化光花椒碱可能杀伤了 S 期细胞。

致谢 本文承中国医学科学院药物研究所韩锐教授审阅; 本所化学室黄治勋同志提供氯化光花椒碱。

参 考 文 献

- 1 Zec-Cheng RK-Y, Cheng CC. *J Med Chem* 1975 Jun; 18 (1): 66
- 2 黄治勋, 李志和. 化学学报 1980 年 12 月; 38 (6): 535
- 3 樊亦军, 韩 锐. 药学报 1979 年 8 月; 14 (8): 467
- 4 Wheeler GP, Bowdon BJ, Wilkoff LJ, Dulmage EA. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967 Dec; 126 (3): 903
- 5 Lala PK. Studies on tumor cell population kinetics. In: Busch H, ed. *Methods in cancer research*, vol 6, 1st ed. New York: Academic Press, 1971: 3-95
- 6 Tannock IF. *Cancer Res* 1969 Aug; 29 (8): 1527
- 7 Hoffman J, Post J. The effects of antitumor drugs on the cell cycle. In: Zimmerman AM, Padilla GM, Cameron IL, eds. *Drugs and the cell cycle*. 1st ed. New York: Academic Press, 1973: 217-42

(EAC) cells in CFW mice was studied by radioautography. The EAC cells were labelled on the 4th d after ip inoculation of 1×10^7 cells. The T_c of the cells was found to be 38.8 h. The T_{G_1} , T_S , T_{G_2} and T_M were 8.0, 25.8, 3.8 and 1.2 h, respectively. The growth fraction was 0.86. When nitidine-Cl 20 mg/kg was given ip, the [^3H] TdR pulse labelling index of EAC cells was unaffected within 26 h, but the mitotic index was reduced and the size of the cells in-

creased, which suggested a G_2 block. The cells in S phase might be killed by nitidine-Cl 40 mg/kg. When the cells were labelled with [^3H] TdR or [^3H] UdR, the average labelling grain counts per cell revealed that the synthesis of DNA and RNA could be inhibited by nitidine-Cl 20 mg/kg.

KEY WORDS nitidine-Cl; Ehrlich ascites carcinoma cells; cell cycles; radioautography

* * *

* * *