

## 10-羟基喜树碱对小鼠肝癌和肝组织中 cAMP 和 cGMP 水平的影响

杨金龙 韩家娟 沈祖铭 胥 彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** ip 羟基 10 mg/kg, qd × 3 d 组肿瘤生长有显著抑制, cAMP 量也明显升高。此时, 细胞中 DNA 含量下降, 对蛋白质无明显影响。羟基对正常肝组织中 cAMP 和 DNA 量无显著影响。给小鼠 ip 羟基 2 和 10 mg/kg 时, 肝癌和肝组织中 cGMP 含量均无显著影响。cAMP/cGMP 比值提示, ip 羟基 2 和 10 mg/kg, 肝癌组织中有升高趋势。8Br-cAMP 和

氧代赖氨酸对肝癌组织的 cAMP 量无明显影响。

**关键词** 羟基喜树碱; 肝癌; 肝; cAMP; cGMP; DNA; 蛋白质; 肿瘤重量

1980年7月15日收稿 1981年1月10日修回  
本文曾在国际抗癌化疗药物学术讨论会(1980年5月北京、上海、广州)上交流

10-羟基喜树碱简称羟基(OPT)是从喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)中提取的生物碱。此碱能显著抑制小鼠白血病P388的生长,延长带瘤小鼠的生存时间<sup>(1)</sup>。喜树在我国资源丰富。我所从其果实中分离到羟基<sup>(2)</sup>。动物实验证明,羟基有很广的抗癌谱,临床报告对肝癌、头颈部肿瘤、胃癌等恶性肿瘤有效<sup>(3)</sup>,表明羟基对肿瘤细胞生长有很强的抑制作用。cAMP和cGMP是细胞生长的调节物质,与细胞的生长、分裂和分化有关<sup>(4)</sup>。本文研究羟基对此类环核苷酸的影响,以及与细胞生长,DNA和蛋白质质量的相关性。

## 材料与方 法

**一、动物和肿瘤** ICR纯种小鼠,体重18—22g,由中国科学院上海分院动物饲养场供给。每批实验用同一性别。肿瘤选用小鼠腹水型肝癌腹腔接种 $1 \times 10^7$ 癌细胞/鼠,生长至第6—8d时再种于小鼠右腋下,细胞数亦为 $1 \times 10^7$ /鼠<sup>(5)</sup>。

**二、药物** 羟基为注射用钠盐,由上海第十制药厂生产。氧代赖氨酸(oxalysine),是由玫瑰绿褐链霉菌产生的抗癌抗菌素,由上海第四制药厂生产。<sup>3</sup>H-cAMP由上海生物化学制药厂生产。上述药物用生理盐水稀释成所需浓度。

**三、DNA和蛋白质测定** 停止注射抗癌药后24h,处死小鼠取出肿瘤,制成细胞匀浆。在冰浴中加入10%TCA,取沉淀按Schmidt-Thannhauser氏法分离出DNA,用二苯胺试剂测定DNA量<sup>(6)</sup>。蛋白质测定按Lowry氏法<sup>(7)</sup>。DNA和蛋白质均以每mg干重组织折算。

**四、cAMP测定** 采用蛋白结合测定法,测定试剂选用中国科学院原子能研究所提供的cAMP测定药箱。Tris-EDTA缓冲液pH为7.5 [<sup>3</sup>H]cAMP比度为27.8 Ci/mmol。实验小鼠在末次ip羟基后24h断头放血,取出肝癌和肝组织,切块后立即置于干冰中,冻结后

称取组织块约30mg,加1N过氧酸少量,在低温条件下匀浆,离心取上清液0.5ml,用20%KOH中和,在70—75℃水浴中蒸干,加入缓冲液0.5ml溶解,取上述溶液40 $\mu$ l,加入[<sup>3</sup>H]cAMP和蛋白激酶,置冰浴内2h后,用孔径为0.22—0.3 $\mu$ m的微孔薄膜吸滤,薄膜烘干后置于闪烁液中测定。

**五、cGMP测定** 用放射免疫法测定,药箱为英国Radio Chemical Centre产品。Tris-EDTA缓冲液pH为7.5, [<sup>3</sup>H]cGMP比度为20 Ci/mmol。小鼠断头放血后立即取出肝癌和肝组织,置于干冰中冻结,取组织约1g,加缓冲液1ml,研磨成匀浆,在沸水浴上加热3min,冰浴中冷却。取上清液100 $\mu$ l,加[<sup>3</sup>H]cGMP和抗血清后冰浴2h,再加1ml冰冷60%饱和硫酸铵溶液,5min后离心取沉淀,加0.1ml重蒸水溶解后测定。

## 结 果

**一、羟基对肝癌和肝组织中cAMP含量影响的比较** 取11只小鼠观察肝癌和肝组织中cAMP量的差异。在小鼠sc接种肝癌细胞后d11取瘤和肝组织,测定cAMP量。结果肝组织的cAMP量为1.86 pmol/mg组织,肿瘤中的量比较低,为1.27 pmol/mg ( $P > 0.05$ )。

用25只小鼠观察羟基对肝癌和正常肝组织的cAMP量的影响,同时计算肿瘤生长抑制率。全部小鼠在接种肿瘤后随机分成3组,d2开始分别ip羟基2,10 mg/kg和生理盐水,qd $\times$ 3d。测得各组肝癌和肝组织的cAMP浓度列于表1。对照组肝癌组织中的cAMP含量为1.03 pmol/mg组织,相应肝组织的量为1.44 pmol/mg。当带瘤小鼠ip羟基2 mg/kg剂量时,在肝癌组织中的cAMP量增至1.56 pmol/mg ( $P > 0.05$ )。在肝组织中的cAMP量未见上升。当剂量增至10 mg/kg时,肝癌中的cAMP量为1.81 pmol/mg,比对照组显著提高。肝组织中的量为2.12 pmol/mg,与对

表 1. Effect of OPT on cAMP levels in hepatoma and liver tissue of mice \* $P < 0.05$

OPT	No. of mice	Hepatoma	Liver
		cAMP (pmol/mg)	cAMP (pmol/mg)
—	9	1.03±0.10	1.44±0.16
2 mg/kg			
×3	8	1.56±0.57	1.18±0.16
10 mg/kg			
×3	8	1.81±0.23*	2.12±0.65

对照组比( $P > 0.05$ )。肿瘤细胞中的 cAMP 量改变与疗效有一定关系。在 ip 羟喜 2 mg/kg 时, 瘤重抑制率仅 20%, 此时 cAMP 量增加不显著。注射量增加至 10 mg/kg 时, 抑制率达 51%, 有显著疗效, 此时 cAMP 量增加 70% 以上 ( $P < 0.05$ )。

按上述方法观察氧代赖氨酸和 8Br-cAMP 的作用, 结果肝癌的 cAMP 量为 1.54 pmol/mg 组织, 给小鼠 ip 氧化赖氨酸 200 mg/kg 和 8 Br-cAMP 20 mg/kg, qd × 3 d 后, 肿瘤组织中的 cAMP 量分别为 1.59 和 1.55 pmol/mg ( $P > 0.05$ )。

**二、羟喜对小鼠肝癌组织中 DNA 和蛋白质含量的影响** 羟喜对肝癌组织中 DNA 含量的影响, 证明小鼠肝癌生长第 11 d 时, DNA 量为 47.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  干重组织。测定前 3 d 连续每天 ip 羟喜 2 mg/kg, 结果瘤组织中的 DNA 量为 45.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 与对照组比 ( $P > 0.05$ )。当注射量为 10 mg/kg 时, DNA 量降为 30.2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ( $P < 0.01$ ) 见表 2。

上述剂量对肿瘤组织的蛋白质含量无明显影响, 对照组为 172  $\mu\text{g}/\text{mg}$  干重组织, 给羟喜 2 和 10 mg/kg, 蛋白质质量分别为对照组的 93% 和 68% ( $P > 0.05$ )。

**三、羟喜对肝癌和肝组织中 cGMP 量的影响** 取 44 只接种肝癌细胞的小鼠, 在接种后, d 7 分成 3 组, 1 组对照, 另 2 组分别 ip 羟喜 2 和 10 mg/kg, qd × 3 d, 末次给药后 24 h

表 2. Effect of OPT on DNA and protein contents of hepatoma tissue

OPT	No. of mice	DNA		Protein	
		Contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	P value	Contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	P value
—	14	47±10	—	172±44	—
2 mg/kg					
×3	9	46±10	>0.05	159±27	>0.05
10 mg/kg					
×3	10	30±9	<0.01	117±29	>0.05

处死小鼠, 取瘤和肝组织测定 cGMP 量, 结果见表 3。肝组织的 cGMP 量为 10.8 pmol/mg 组织, 在肝癌中略低, 为 7.9 pmol/mg。给羟喜 2 mg/kg 后, cGMP 量无明显变化, 肝癌和肝组织中的量分别为对照组的 79% 和 97%。给大剂量也无明显改变。

cAMP/cGMP 比值在肝癌和肝组织分别为 130 和 133。给羟喜 2 mg/kg 后, cAMP/cGMP 比值在肝组织中无明显变化, 但肝癌组织中升高为 252。给羟喜 10 mg/kg 后, 肝癌和肝组织中的比值分别为 246 和 257。

## 讨 论

cAMP 是一个重要的细胞中介物质<sup>(8)</sup>, 恶性肿瘤常常伴有细胞内 cAMP 代谢的缺陷<sup>(9)</sup>。多数肿瘤细胞中的 cAMP 水平比正常组织的低, 而且与肿瘤细胞的生长速率有关, 生长缓慢的肿瘤 cAMP 量比生长快的高<sup>(10)</sup>。

表 3. Effect of OPT on cGMP levels in hepatoma and liver tissue of mice

OPT	No. of mice	Hepatoma		Liver	
		cGMP (pmol/mg)	P value	cGMP (pmol/mg)	P value
—	24	7.9±3.9	—	10.8±5.3	—
2 mg/kg					
×3	9	6.2±4.6	>0.05	10.5±7.9	>0.05
10 mg/kg					
×3	11	7.3±2.2	>0.05	8.3±4.3	>0.05

本实验表明, 小鼠肝癌组织中的 cAMP 量为相应肝组织的 68%。

给小鼠 ip 羟喜, 可以促进肝癌细胞中 cAMP 的积累, 而且 cAMP 量的改变与注射药物的剂量有关。注射小剂量羟喜, 瘤重抑制率较低, 瘤组织中的 cAMP 量增高也不明显; 注射大剂量(10 mg/kg)时, 药物能显著抑制肿瘤生长, 此时瘤组织中的 cAMP 量也有显著的升高。

cAMP 的代谢与 DNA 合成密切相关<sup>(11)</sup>。本实验见 cAMP 升高时 DNA 含量显著减少。Pastan 认为外源性 cAMP 可以使细胞阻止在 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 期, 进而抑制细胞进入 S 期和 M 期。我们曾发现羟喜能抑制肿瘤细胞的核分裂, 推测药物对 M 期也有一定作用。本实验证明, ip 羟喜 10 mg/kg 可使 DNA 含量下降, 推测 cAMP 的上升和 DNA 下降二者有密切的关系。

控制细胞分化的 cGMP 是另一个环核苷酸。cAMP 和 cGMP 的生理效应是相互拮抗的, 即所谓二元学说<sup>(12)</sup>。肿瘤细胞中 cGMP 量与正常相应组织中的量可有差异, 是高是低, 各家报道不一。在 3954A 肝癌的实验中表明, 肝癌组织的 cGMP 量高于正常肝组织<sup>(13)</sup>。本研究用小鼠肝癌是由化学致癌物诱发的可移植性肝癌, 实验中未见 cGMP 量高于正常肝细胞。在 ip 羟喜 2 和 10 mg/kg 后, 肝癌和肝组织中的 cGMP 量都有下降趋势。由此推测, 羟喜的抗癌作用机理除通过环核苷酸系统, 控制细胞分裂制动装置, 阻滞细

胞 DNA 生物合成, 影响细胞增殖。cAMP 量的升高也提示, 在羟喜作用下残存癌细胞有可能出现某些正常细胞分化的特征。

### 参 考 文 献

- 1 Wani ML, Wall ME. *J Org Chem* 1969 Feb; 34(2):364
- 2 徐任生、赵志远、林隆泽、胥传凤. 化学学报 1977 年 11 月; 35(3, 4):193
- 3 中国科学院上海药物研究所. 中华医学杂志 1978 年 10 月; 58(10):598
- 4 Sheppard JR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971 Jun; 68(6):1316
- 5 胥彬、张素胤、陈瑞婷、乐秀芳、杨金龙、吴富根、花泽、王龙江、韩家娴、吕腓理、王祖武. 科学通报 1975 年 5 月 15 日; 20(5):242
- 6 Volkin E, Cohn WE. Estimation of nucleic acids. In: Glick D, ed. *Methods of biochemical analysis*, vol 1. New York: Interscience, 1954: 290
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951 Nov; 193(1):265
- 8 杨金龙、沈祖铭、韩家娴、胥彬. 科学通报 1979 年 7 月 30 日; 24(14):670
- 9 Kemp RG, Hsu PY, Duquesnoy RJ. *Cancer Res* 1975 Sep; 35(9):2440
- 10 Heidrick ML, Ryan WL. *Ibid* 1971 Sep; 31(9): 1313
- 11 Coffino P, Gray JW, Tomkins GM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 Mar; 72(3):878
- 12 Goldberg ND, Haddox MK, Dunham E, Lopez C, Hadden JW. The Yin Yang hypothesis of biological control. In: Clarkson B, ed. *Control of proliferation in animal cells*. 1st ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974:609
- 13 Murad F, Kimura H. *Science* 1975 Oct 3; 190 (4209):58

*Acta Pharmacologica Sinica* 1981 Dec; 2 (4) : 248—252

## EFFECTS OF 10-HYDROXYCAMPTOTHECIN ON cAMP AND cGMP LEVELS IN HEPATOMA AND LIVER TISSUE OF MICE

YANG Jin-long (C L Yang), HAN Jia-xian, SHEN Zu-ming, XU Bin (B Hsu)  
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** The cAMP and cGMP levels of tumor and normal liver tissue in mice

bearing hepatoma were measured. The cAMP contents in hepatoma was lower than that of normal liver in mice. 10-Hydroxycamptothecin(OPT) could induce an accumulation of cAMP in hepatoma at the ip dose of 10 mg/kg which produced an inhibition of tumor growth. But it did not elevate the cAMP contents in normal liver. The cAMP concentration was related to DNA contents in the hepatoma cells. 10-Hydroxycamptothecin injected ip to mice with hepatoma produced a remarkable inhibition on DNA contents and increased cAMP concentration in the tumor cells. Oxalysine, an

antitumor antibiotic and 8Br-cAMP showed no effect on the cAMP levels in the hepatoma.

There was no difference between the levels of cGMP in the tumor and liver tissue. The cGMP contents of the hepatoma and liver tissue were not significantly changed when 10-hydroxycamptothecin was injected in mice bearing hepatoma. The ratio of cAMP/cGMP in hepatoma tissue was increased.

**KEY WORDS** 10-hydroxycamptothecin; hepatoma; liver; cAMP; cGMP; DNA; protein; tumor weight