

# 博莱霉素 A5 对体外培养中国仓鼠卵巢细胞增殖周期的影响

薛绍白 程之华\* 柳惠图 李素文 张鸿卿 成汝宣 胡云英 徐 洪

(北京师范大学生物系, 北京 100082)

**摘要** 用显微荧光光度术, 流式细胞光度术和放射自显影细胞周期分析方法测定了博莱霉素 A5 对中国仓鼠卵巢细胞(CHO)增殖周期的影响。发现博莱霉素 A5(100  $\mu\text{g/ml}$ )对于 CHO 细胞 G1 $\rightarrow$ S, S $\rightarrow$ G2 的进行无影响, 而阻断 G2 $\rightarrow$ M 期的进行与博莱霉素在相同浓度下的作用相同。

**关键词** 博莱霉素 A5, 细胞周期, G2 期阻断, 中国仓鼠卵巢细胞

博莱霉素(bleomycin) A5 已在我国临床试用<sup>(1)</sup>。我们发现<sup>57</sup>Co-博莱霉素 A5 的亲瘤性很强<sup>(2)</sup> 并仅参入到细胞核中<sup>(3)</sup>。博莱霉素 A5 抑制 DNA 合成, M 期的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)对博莱霉素 A5 最敏感<sup>(4)</sup>。我们用细胞周期分析方法、显微荧光光度法和流式细胞光度术探讨了博莱霉素 A5 对 CHO 细胞周期进行的影响, 以供临床肿瘤化疗参考。

## 材 料 和 方 法

博莱霉素 A5 为华北制药厂提供, 博莱霉素由中国医学科学院抗菌素研究所提供, [<sup>3</sup>H]TdR 由上海原子核所提供, 秋水仙酰胺为 Ciba 产品。

CHO 细胞单层培养在 10% 小牛血清的 MEM Eagle's 培养液中。

细胞荧光光度术: 单层培养的 CHO 细胞经吖黄素染色, 用 MPV II 型显微荧光光度计测定细胞核中吖黄素荧光值, 照明光源为 100 W 高压汞灯, 激发滤片为 2X KP490, 双色束分光反射镜为 TK 510, 内装阻断滤片为 K 515, 外加阻断滤片为 590 nm, 54 倍油浸物镜 NA

0.95, 八角型测量光栏, 激发时间为 0.25 s。

流式细胞光度术(FCM): 细胞用碘化丙锭(PI)染色<sup>(5)</sup>, 用 FACS III 型荧光激活细胞分类器进行分析, 2 W 氩离子激光器, 波长 514 nm。

细胞周期动力学分析: 按文献<sup>(6)</sup>方法, 在对数生长期的 CHO 细胞中加入秋水仙酰胺 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , [<sup>3</sup>H]TdR 0.05  $\mu\text{Ci/ml}$  (比活性 34 Ci/mM), 再分别加入博莱霉素 A5 100  $\mu\text{g/ml}$ , 博莱霉素 100  $\mu\text{g/ml}$ , 以及不加药的对照组。药后不同时间从 3 组中各取 1 培养瓶, 把培养液倒入试管中留用, 细胞经胰酶消化后, 再与原培养液(含有 M 期细胞)混合, 离心, 用生理盐水洗 3 次, 涂片, 干燥后, 经 MeOH:HAc(3:1)固定, 涂布核 4 型乳胶(中国科学院原子能研究所产品), 4 $^{\circ}\text{C}$  曝光, 显影定影后, Giemsa 染色。计数标记和分裂相细胞。有丝分裂指数 = 标记的和未标记的有丝分裂细胞数/计数所有的有丝分裂和间期细胞数。标记有丝分裂指数 = 标记的有丝分裂细胞数/计数所有的有丝分裂和间期细胞数。标记指数 = 标记的有丝分裂和间期细胞数/计数所有的有丝分裂和间期细胞数。

为了测定 S 期向 G2 期的转移, 在培养瓶中放置盖玻片, 使对数生长期的 CHO 细胞生长在盖片上, 加入秋水仙酰胺 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , 并分别加入博莱霉素 A5 100  $\mu\text{g/ml}$ , 博莱霉素 100  $\mu\text{g/ml}$ , 加药后不同时间取出盖片, 放入 [<sup>3</sup>H]TdR 2  $\mu\text{Ci/ml}$  的培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$  标记 30 min, 进行放射自显影, 测定标记指数。

## 结 果

细胞荧光光度测定 (图 1) 对照组在

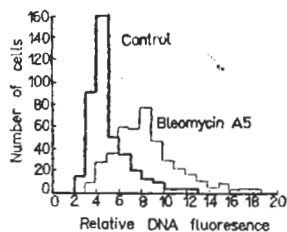


Fig 1. Effect of bleomycin A5 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on the cell cycle progress of Chinese hamster ovary (CHO) cells by microfluorophotometry.

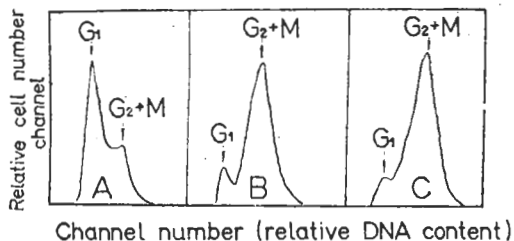


Fig 2. Effect of bleomycin A5 and bleomycin on the cell cycle of CHO cells after 16 h by flowcytometry. (A) Control; (B) Bleomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; (C) Bleomycin A5 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

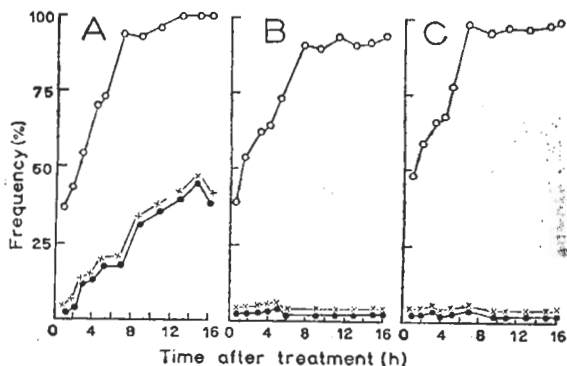


Fig 3. Cell cycle analysis of control (A), bleomycin-treated (B) and bleomycin A5-treated (C) CHO cells. The exponential growth cells [were] plated in 3 culture flasks for 1 d. [ $^3\text{H}$ ]TdR 0.05  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  and colcemid 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  were added to all the flasks. Bleomycin or bleomycin A5 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was added to the flasks.  $\circ$  labeling index (LI);  $\bullet$  labeled mitotic index (LMI);  $\times$  total mitotic index (TMI).

DNA 荧光相对含量 4-5(随意单位)处有一分布高峰为 G1 期细胞, 在 8-9 处为 G2+M 期细胞, 二者之间为 S 期细胞, 可见在对数生长期的 CHO 细胞中 G1 期细胞占绝大多数, 而

G2+M 较少。博莱霉素 A5 作用 15 h 后, 4-5 的峰消失, 而在 8-9 附近出现新的峰, 说明细胞被阻断在 G2+M 期。从形态上看, 在所测细胞中, M 期是极个别的(或几乎不见), 说明细胞被博莱霉素 A5 阻断在 G2 期。

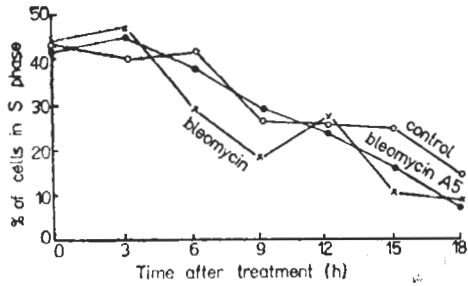
**流式细胞光度测定** (图 2) 与细胞荧光光度术结果相同, 博莱霉素 A5 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和博莱霉素 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  处理后 16 h 的 G1 期峰显著减小, 而 G2+M 峰增高, 由于流式细胞光度术测定几个万个细胞, 所以更为可靠, 进一步证明博莱霉素 A5 的 G2 期阻断效应。

**细胞周期动力学分析** (图 3) 实验组标记指数曲线与对照组相比无明显差别, 说明博莱霉素 A5 和博莱霉素对 G1 期 CHO 细胞向 S 期的转移没有影响。

对照组的有丝分裂指数和标记有丝分裂指数以直线方式递增, 而博莱霉素 A5 和博莱霉素组却保持原来水平, 说明博莱霉素 A5 和博莱霉素一样均阻止了 CHO 细胞由 G2 期向 M 期的转移。为了阐明该药物是否影响 S 期细胞向 G2 期转移, 我们用秋水仙酰胺阻止细胞在有丝分裂中期后, 在不同时间间隔作放射自显影标记并统计 S 期细胞百分数, 如果加药组的 S 期 CHO 细胞向 G2 期过渡受到影响, 则加药组的 S 期细胞百分数不能像对照组那样随着时间而下降。实验结果(图 4)表明加药组和对照组的 S 期百分数以相似方式下降, 说明博莱霉素 A5 和博莱霉素一样对 CHO 细胞由 S 期向 G2 期的转移无影响。

## 讨 论

博莱霉素 A5 和博莱霉素虽都表现了亲瘤和抑瘤的特性, 但博莱霉素 A5 在抗菌活性, 肝和肾脏分布及排出速度方面与博莱霉素不同<sup>(2)</sup>。文献<sup>(7)</sup>报道过博莱霉素的 G2 期阻断效应。在本实验中我们用细胞荧光光度术、流式细胞光度术和细胞周期分析三种方法, 都证明了博莱霉素 A5 使不同步的 CHO 细胞阻断在 G2 期, 而不影响 G1→S, S→G2 的进行, 说明



**Fig 4.** Effects of bleomycin and bleomycin A5 on the transition of CHO cells from S to G<sub>2</sub> phase. CHO cells in exponential growth were plated in 3 culture flasks with coverslips for 1 d. Colcemid was added to all the flasks. Bleomycin A5 or bleomycin 100 µg/ml was added. The coverslip was taken at different intervals and labeled by [<sup>3</sup>H]TdR 2 µCi/ml for 30 min. Labeling index was counted from the microautoradiograph.

博莱霉素 A5 和博莱霉素在细胞周期阻断效应方面是基本相同的。

能引起 G<sub>2</sub> 期阻断的药物都能引起 G<sub>2</sub> 期早熟凝集染色体的畸变如间隙、断裂和交换，畸变量与 G<sub>2</sub> 期停止的%有直接关系<sup>(8)</sup>。我们

看到了博莱霉素 A5 也有同样的作用。

### 参 考 文 献

- 1 争光霉素临床研究协作组. 中华肿瘤杂志 1979; 1:161
- 2 薛绍白、柳惠图、张鸿卿、李电东、蒯惠颜. 药学报 1980; 15:1
- 3 柳惠图、薛绍白. 生物化学与生物物理学报 1979; 11:139
- 4 张鸿卿、柳惠图、邓藻锡、胡云英、潘维琳、薛绍白. 药学报 1982; 17:755
- 5 Noguchi PD, Browne WC. Protocols 27. Ortho Instruments 1978
- 6 Puck TT, Steffan H. *Biophys J* 1963; 3: 379
- 7 Tobey RA, Oka MS, Crissman HA. Analysis of effects of chemotherapeutic agents on cell-growth kinetics in cultured cells. In: Melamed MR, Mullaney PF, Medelsohn ML, eds. *Flow cytometry and sorting*. 1st ed. NY: Wiley, 1979: 573-82
- 8 Rao PN. Cell kinetics by cell fusion. In: Drewinko B, Humphrey RM, eds. *Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells*. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1977: 113-30

*Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Jun; 5 (2) : 112-114

## EFFECTS OF BLEOMYCIN A5 ON CELL CYCLE IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS

XUE Shao-bai, CHENG Zhi-hua\*, LIU Hui-tu, LI Shu-wen, ZHANG Hong-qing, CHENG Ru-xuan, HU Yun-ying, XU Pu (Dept of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100082)

**ABSTRACT** The effect of bleomycin A5 on the cell cycle of Chinese hamster ovary cells was studied by microfluorophotometry, flow cytometry and cell cycle analyses. The progress of G<sub>1</sub>→S→G<sub>2</sub> was not affected by bleomycin A5, but the cells were blocked on the G<sub>2</sub>

phase.

**KEY WORDS** bleomycin A5; cell cycle; G<sub>2</sub> phase block; Chinese hamster ovary cells

\* Beijing Medical College