

美登新对小鼠艾氏腹水癌细胞周期的影响

樊亦军 周 军 李 茂 (广西中医药研究所, 南宁 530012)

提要 给小鼠接种 10^7 癌细胞后 d 4 或 d 11, ip 美登新 0.1 mg/kg, 测定有丝分裂中期细胞 [^3H]TdR 标记

1983年1月25日收稿 1984年3月30日修回
1982年9月在中国药学会全国药理学术会议上宣读

曲线, [^3H]TdR 脉冲及连续 LI, [^3H]TdR 及 [^3H]UR 标记颗粒数、MI 等参数. 美登新对 M 中期细胞的阻滞作用长达 25 h, 并延长一代周期时间约 7.2 h. 暂时受阻于 M 中期的细胞, 可部分同步化地移行至 S 期. 美登新不能促使 G_0 期细胞进入周期.

关键词 美登新; 自体放射造影; 艾氏腹水癌; 细胞周期; [^3H]胸腺嘧啶脱氧核苷; [^3H]尿嘧啶核苷; 标记指数; 有丝分裂指数

美登新(maytansine)是具有抗癌活性的大环内酯化合物⁽¹⁾, 它能抑制微管蛋白聚合, 或使已聚合的微管解聚, 使细胞阻滞在有丝分裂中期^(2,3)。临床上对淋巴细胞白血病及肺癌等均有一定疗效^(4,5)。由于美登新对骨髓毒性较小, 对周期内细胞的敏感顺序为 $M > G_2 > S > G_1$ ⁽⁶⁾, 故可考虑与其他抗癌药合用。为此, 我们对美登新的细胞动力学作用进行了进一步研究。

材 料 和 方 法

美登新系本所化学室从密花美登木 *Maytenus confertiflorus* J Y Luo et X X Chen sp nov 中分离得到的白色结晶⁽⁷⁾, 溶解及配液同以往方法⁽⁸⁾。 [^3H]胸苷([^3H]TdR, 25 Ci/mmol) 及 [^3H]尿苷([^3H]UR, 20 Ci/mmol) 均为上海原子核研究所制备, 试验时以注射用水分别稀释至 100 及 200 $\mu\text{Ci/ml}$ 。核子乳胶为中国科学院原子能研究所生产的核-4 乳胶。动物及瘤株同文献⁽⁹⁾。

分裂中期细胞标记试验 带瘤小鼠 36 只, ip 美登新 0.1 mg/kg 后立即 ip [^3H]TdR 15 μCi /鼠, 并于标记后 1, 2, 4 h 及随后每隔 4 h 分别取 2 鼠腹水细胞涂片, 放射自显影处理, 测定有丝分裂中期(包括后期)细胞标记%⁽⁹⁾。

[^3H]TdR 脉冲标记 带瘤小鼠 42 只, 其中给药组 28 鼠, 对照组 14 鼠, 分别于 ip 美登新 0.1 mg/kg 或与药物同体积生理盐水后不同时间, 各取 2 鼠用 [^3H]TdR 15 μCi /鼠标记, 按上法进行放射自显影处理, 镜检并计算标记指数(LI)、有丝分裂指数(MI)及细胞平均标记颗粒数⁽⁹⁾。

[^3H]TdR 连续标记

1. 将接种癌细胞后 4 d 的小鼠 28 只平均分为 2 组, 给其中 1 组 ip 美登新 0.1 mg/kg 后立即以 [^3H]TdR 15 μCi /鼠标记, 标记后 15 min

取 2 鼠腹水细胞涂片。余 12 鼠在给药后 4 h 用同法进行标记, 标记后 15 min, 又取 2 鼠腹水细胞涂片。所余 10 鼠依此类推, 每隔 4 h 标记 1 次, 直至 24 h。对照组 14 鼠除以生理盐水代替美登新外, 其余均同给药组。全部标本按前法进行放射自显影处理, 镜检并计算 LI。

2. 取接种癌细胞后 11 d 的小鼠 6 只, 给药组及对照组各 3 鼠, 分别 ip 美登新 0.1 mg/kg 及生理盐水, 各鼠于给药后 0 h 开始, 每隔 8 h 用 [^3H]TdR 15 μCi 标记 1 次, 直至 48 h, 每次标记后 15 min 分别取腹水细胞涂片, 按前法进行放射自显影处理, 镜检并计算 LI。

[^3H]UR 脉冲标记 带瘤小鼠 16 只, 给其中 12 鼠 ip 美登新 0.1 mg/kg, 每隔 2 h 分别取 2 鼠以 [^3H]UR 40 μCi /鼠标记后 15 min, 取腹水细胞涂片; 对照组 4 鼠于 ip 生理盐水后 0 和 10 h 分别取 2 鼠以同法标记, 全部标本按前法制作放射自显影片, 镜检并计算每一细胞平均标记颗粒数。

结 果

给予美登新后, 小鼠 EAC 细胞中期标记曲线见图 1, 细胞增殖周期时间约为 46 h, 与对照曲线比较, 延长了约 7.2 h。给药组曲线 0-8 h 之间斜率较小, $G_2 + M$ 期明显延长, S 期变化不大。

[^3H]TdR 脉冲标记试验表明, 正常 EAC 细胞 MI 约为 2%。给药后 4 h 为 12%, 8 h 后 MI 曲线明显上升, 最高可达 73%, MI 在 50% 以上高水平可持续 18 h。给药后 28 h, MI 锐减, 经 4 h, 从 68% 降至 5%。LI 的变化与 MI 恰相反, 从 28 至 36 h 有一个由低至高的突跃, 结果见图 2。此外, 给药 6 h 后, 分裂后期及末期细胞消失, 并逐渐出现多核细胞和巨细胞。给药后 8 h, 细胞 [^3H]TdR 平均标记颗粒数略低于对照组, 32 h 后则多于对照组(图 3)。

小鼠接种癌细胞后 4 d, 以 [^3H]TdR 连续标记, 对照组 LI 在 12 h 达 96%; 给药组 LI 曲线上升较缓慢, 12 h 达 81% 后上升速度进一步减

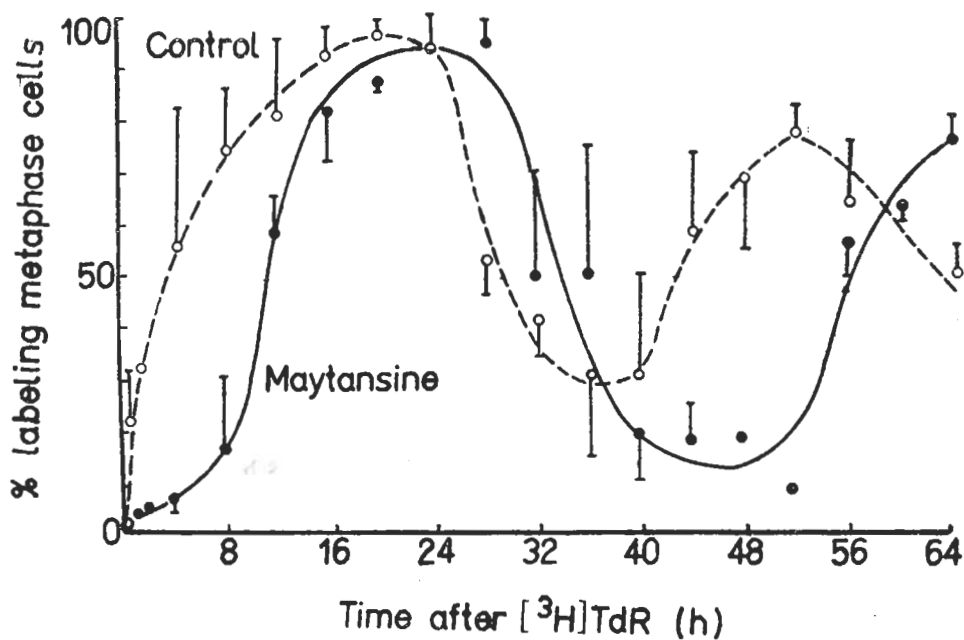


Fig 1. Labeled metaphase cells for EAC on d 4 of tumor growth, $\bar{x} \pm \text{SD}$

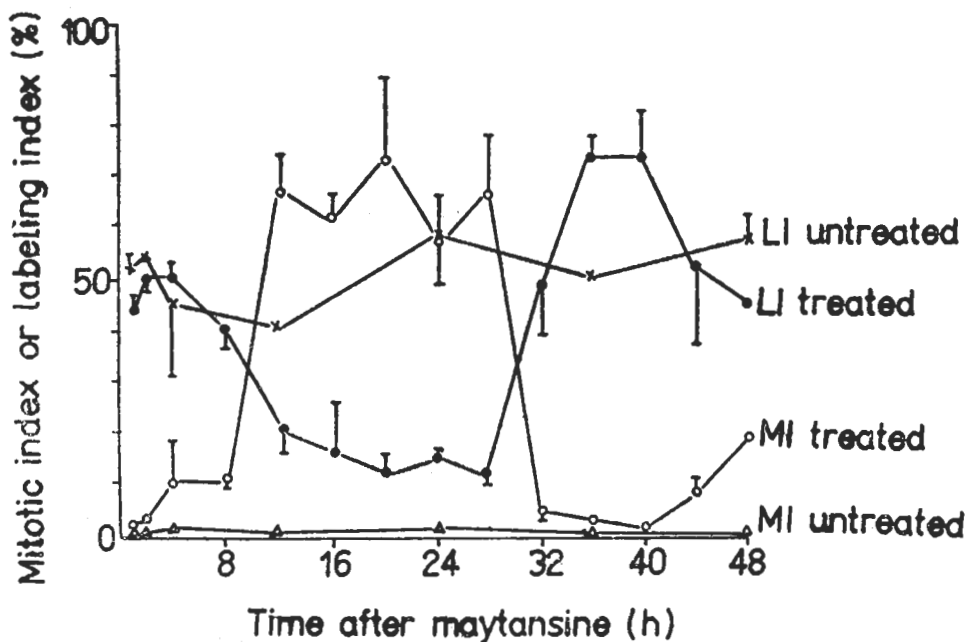


Fig 2. Effect of maytansine on mitotic index and $[^3\text{H}]\text{TdR}$ pulse labeling index for EAC cells on d 4 of tumor growth, $\bar{x} \pm \text{SD}$

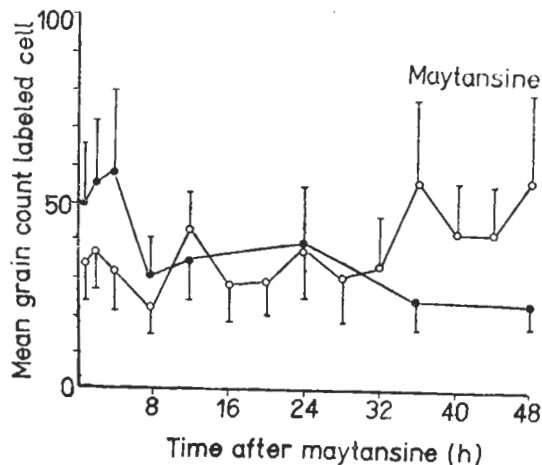


Fig 3. Effect of maytansine on mean grain count of EAC cells labeled by $[^3\text{H}]\text{TdR}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. control (●)

慢, 24 h 才达 96% (图 4)。接种瘤细胞后 11 d, 以 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 连续标记, 给药组及对照组 LI 均缓慢增加, 48 h 分别为 68% 及 62% (图 4)。

以 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 脉冲标记, 给药后 10 h 内细胞平均标记颗粒数变化不大 (图 5)。

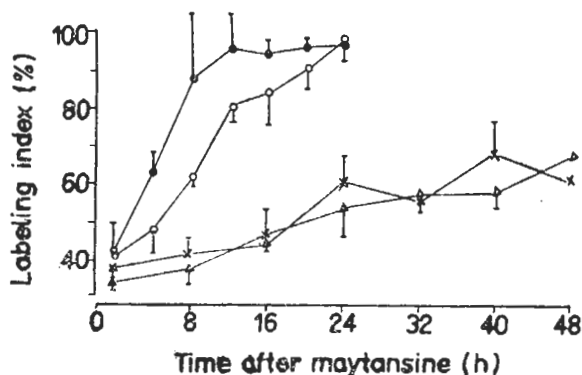


Fig 4. Effect of maytansine on $[^3\text{H}]\text{TdR}$ continuous labeling index for EAC cells, $\bar{x} \pm \text{SD}$. Untreated (●) & treated (○) cells on d 4; Untreated (×) & treated (▲) cells on d 11.

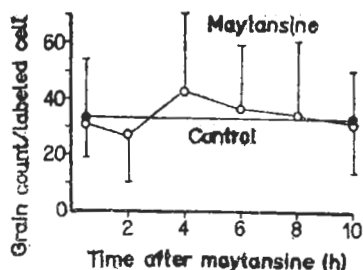


Fig 5. Effect of maytansine on mean grain count of EAC cells labeled by $[^3\text{H}]\text{UR}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$

讨 论

EAC 细胞 T_{G_1} , T_S , T_{G_2} , T_M 分别为 8.0, 25.8, 3.8 及 1.2 h⁽⁹⁾, $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 脉冲标记试验中, 给药后 4 h, MI 明显增高, G_2 前期细胞已受阻于 M 期。给药后 11—29 h 是 MI 高峰, 表明给药时处于 S 及 G_2 前期细胞移行至 M 期时受阻。已有学者证明, 美登新能与微管蛋白结合⁽¹⁰⁾, 而此蛋白主要在 G_2 及 S 末期合成⁽¹¹⁾。因此, 美登新可能是通过与 G_2 前期及 S 期细胞微管蛋白结合, 使细胞阻滞在 M 中期。脉冲标记 LI 在给药后 8 h 内降低不多, 12 h 后降至 20% 以下。图 3 表明, 细胞 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 平均标记颗粒数变化不大, 故 LI 降低与 DNA 合成无关。由于 EAC 细胞 $G_1 + M + G_2$ 期时间为 13 h, 表明大部分原处于 G_1 , M 及 G_2 末期细胞可照常进入 S 期, 而原处于 G_2 前期及 S 期细胞则由于受阻于 M 期, 不能经由 G_1 进入第二代周期的 S 期, 故给药 12 h 后, LI 降至 20% 以下达 17 h。

给予美登新 28 h 后, EAC 细胞 MI 剧减 (图 2), 而 LI 却由 28 h 的 12.4% 剧增至 36 h 的 $73 \pm 4\%$, 此时对照组仅为 $50.0 \pm 1.2\%$, 两者有显著差异 ($p < 0.05$)。下面将论述, 此时不可能有 G_0 期细胞进入 S 期, 表明一些阻滞于 M 中期的细胞, 当药物作用消失后, 可部分同步化地经过短暂的 G_1 期进入 S 期; 甚至还有一部分细胞可同步化地进入第二代周期的 M 期, 因 40 h 后 MI 又升高, 有出现第二峰的趋势。长春新碱等一些分裂中期阻滞剂也有类似的同步化作用^(12,13)。

根据图 4, 接种瘤细胞后 4 d 给药组 12 h 内 LI 曲线上上升较慢, 比对照组约差 4 h。从图 2 脉冲标记 LI 分析, 给药后 8 h, 给药组 LI 仅从 42.6% 降至 41.4%, 这似可排除 G_1 期受阻的因素。可能由于 M, G_2 期细胞较敏感⁽⁶⁾, 当这些细胞较多地被杀灭后, 最初几小时的 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 连续标记 LI 便明显降低。12 h 后, 给药组连续标记 LI 曲线上上升进一步减慢, 则

显然是由于 G_2 前期细胞受阻于 M 中期的结果。用 $[^3H]TdR$ 连续标记接种 11 d 的癌细胞, 对照组 40 h 的 LI 已达 69% 的峰值(图 4), 表明有 30% 以上 G_0 期细胞; 给药组曲线与对照组差别不大, 提示美登新不能促使 G_0 期细胞进入周期。 $[^3H]UR$ 脉冲标记试验中, 给药组细胞平均标记颗粒数与对照组比较无大差异, 表明药物不抑制 RNA 合成。

致谢 本所化学室王雪芬同志提供美登新样品

参 考 文 献

- 1 Kupchan SM, Komoda Y, Court WA, et al. *J Am Chem Soc* 1972; 94 : 1354
- 2 Donoso JA, Watson DF, Heller-Bettinger IF, Samson FE. *Cancer Res* 1978; 38 : 1633
- 3 Johnson RK, Inouye T, Welpert-Defilippes

- MK. *Biochem Pharmacol* 1978; 27 : 1973
- 4 Chabner BA, Levine AS, Johnson BL, Young RC. *Cancer Treat Rep* 1978; 62 : 429
- 5 Eagan RT, Creagan ET, Ingle JN, Fritak S, Rubin J. *ibid* 1978; 62 : 1577
- 6 Rao PN, Freireich EJ, Smith ML, Loo TT. *Cancer Res* 1979; 39 : 3152
- 7 王雪芬、陈家源、韦荣芳、姜达衡. 药学学报 1981; 16 : 628
- 8 樊亦军、何绍雄、韦焕英, 等. 中草药 1981; 12 : 18
- 9 樊亦军、周 军、李 茂. 中国药理学报 1981; 2 : 46
- 10 Ramillard S, Rebhun LI. *Science* 1975; 189 : 1002
- 11 Klevecz R, Forrest G. *Ann NY Acad Sci* 1975; 253 : 292
- 12 Klein HO. *Cell Tissue Kinet* 1980; 13 : 425
- 13 Nomura T, Plager JE. *Cancer Treat Rep* 1981; 65 : 283

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Mar, 6 (1) : 63-67

EFFECT OF MAYTANSINE ON CELL CYCLE OF EHRlich ASCITES CARCINOMA CELLS IN MICE

FAN Yi-jun, ZHOU Jun, LI Mao

(Inst Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences of Guangxi, Nanning 530012)

ABSTRACT The effect of maytansine on the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells in mice was studied by autoradiography. Maytansine 0.1 mg/kg was injected ip on d 4 after ip inoculation of 10^7 cells. The metaphase labeling curve showed a prolongation of T_{G_2+M} . The $[^3H]TdR$ pulse labeling index (LI) was markedly reduced in 8 h; but the effect of maytansine on the mitotic index was contrary to the pulse LI. However, the anaphase and telophase cells were not noticed in 6 h. The $[^3H]TdR$ continuous LI in 12 h was 96% in the untreated cells, but 81% at the same time and 96% at the 24th h in the treated cells. The

grain counts of EAC cells labeled by $[^3H]TdR$ and $[^3H]UR$ did not decrease. These results showed that maytansine was extremely effective in producing mitotic arrest of the EAC cells, and the cells blocked in M phase could partial-synchronously enter S phase. LI curve of $[^3H]TdR$ continuous label for the cells on d 11 of tumor growth indicated that EAC cells in G_0 phase could not reenter the cell cycle after ip maytansine.

KEY WORDS maytansine; autoradiography; Ehrlich ascitic carcinoma; cell cycle; $[^3H]$ thymidine; $[^3H]$ uridine; labeling index; mitotic index