

冬凌草甲素和博来霉素 A 5 联合应用对肿瘤和骨髓细胞 DNA 合成的影响

寿马钢¹、王绵英、王 琪、张覃沐

(河南医科大学和河南省医学科学研究所药理室, 郑州 450052)

提要 采用标记前体物参入法和放射自显影术观察冬凌草甲素与博来霉素 A 5 合用对小鼠体内外 P 388 白血病、艾氏腹水癌细胞大分子合成的影响, 发现两药合用明显抑制 DNA 合成, 不影响 RNA 和蛋白质合成, 对肿瘤 DNA 合成的抑制作用强于对骨髓细胞。

关键词 冬凌草甲素; 博来霉素类; 合并用药; 聚合物; 抗肿瘤药; Ehrlich 癌; 白血病 P388; 骨髓; [³H]胸苷; 放射自显影术

动物实验及临床研究发现, 冬凌草甲素 (oridonin, 简称 Orid) 可明显增强博来霉素 A 5 (bleomycin A 5, 简称 BLM) 等化疗药物的

1985年6月17日收稿 1986年3月17日修回

¹ 现在军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800

抗肿瘤疗效^(1,2), 而 Orid 和 BLM 单用对肿瘤细胞 DNA 的生物合成有抑制作用^(3,4). 为探讨增效机制, 本文研究了二药联用对肿瘤和骨髓细胞之大分子合成的影响.

材 料

Orid 为郑州化学制药厂生产, BLM 为天津河北制药厂生产, [³H]TdR(比活 1062 MBq/mmol) 为中国科学院上海原子能研究所生产, 核-4 乳胶为中国科学院北京原子能研究所生产, P 388 白血病、艾氏腹水癌细胞(EAC)由本室提供, 昆明小鼠, DBF 1 小鼠均由本院动物室供应.

方 法 和 结 果

对体外 EAC 之 DNA 合成的影响 无菌

Tab 1. Effects of oridonin (Orid) and bleomycin A5 (BLM) *in vitro* on [³H]TdR incorporation into DNA of Ehrlich ascitic carcinoma cells. cpm per 2×10⁶ cells for 10 min. Compared with control *p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01

Concentration (μg/ml)		Time(h) after the end of 1-h treatment							
Orid	BLM	0 h		0.5 h		1 h		2 h	
		cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%
0	0	4000±785	100±19	4800±1372	100±21	3700±565	100±15	5600±1153	100±20
0.5	-	3700±1730	92±43*	4200±1086	88±23*	3200±1413	86±38*	5700±1221	102±22*
-	20	4600±2191	115±54*	4000±572	83±12*	2100±560	57±15**	3797±399	68±7*
0.5	20	3100±991	78±25*	2100±1197	44±20**	1800±343	49±9***	3200±630	57±9**
0	0	1600±118	100±8	5300±831	100±15	4400±312	100±7	2800±352	100±13
2	-	1700±154	106±10*	4300±539	81±10*	2300±542	52±12***	3000±1160	107±42*
-	40	1380±117	86±7**	3900±755	74±14*	2790±219	63±5***	2020±122	72±4**
2	40	1400±372	88±22*	3620±216	68±4**	2000±202	45±5***	1200±416	45±15***

Tab 2. Effects of Orid 15 mg/kg and BLM 3 mg/kg *in vivo* on DNA synthesis of Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) and bone marrow cells (BMC) in mice after 2-24 h. cpm per 10⁷ cells. Compared with control *p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01

	2 h		6 h		12 h		24 h	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%
EAC Control	1310±238	100±18	3300±485	100±14	1700±154	100±9	1900±306	100±16
Orid	1100±442	80±34*	1500±767	45±23**	1500±328	88±14*	2600±957	140±51*
BLM	1100±514	80±31*	1900±1213	60±36*	1400±511	80±30*	1800±1032	100±56*
Orid + BLM	700±254	53±14**	1100±809	30±24**	1500±335	88±19*	1800±405	95±22*
BMC Control	2700±433	100±16	2000±853	100±43	2900±455	100±15	1100±124	100±11
Orid	2100±858	78±32*	1800±340	90±22*	1800±894	60±31*	1140±143	104±13*
BLM	2600±711	96±26*	2000±728	100±37*	2100±410	72±14*	1500±457	140±41*
Orid + BLM	2200±406	81±15*	1800±373	90±34*	2000±341	69±12**	1300±511	120±46*

条件下, 取昆明小鼠接种后 d 7 的 EAC 细胞, 洗涤后悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 以供实验, 按表 1 分组和用药, 每组设 3 个平行管, 每管接种 1×10⁶ 个 EAC 细胞, 其它根据文献 5. 实验结果以用药组的参入计数相当于对照组参入计数(参入率)表示. 表 1 说明, 两种剂量的 Orid 和 BLM 合用在停药后的 [³H]TdR 参入曲线随时间明显下降, 参入率最低达 40-50%, 这种抑制作用均程度不同地大于相应剂量的单用组(p<0.05).

对小鼠体内 EAC 和骨髓细胞 DNA 的合成作用 按文献 6, 取 48 只♂昆明小鼠, 分 4 组, ip 接种 10⁷ EAC 细胞/鼠, 按表 2 分组和剂量, d 5 分别 ip 给药, 于药后 2, 6, 12, 24 h 每鼠腋部 sc [³H]TdR 55.5 MBq/kg, 1 h 后取腹水 EAC 细胞, 将小鼠断颈处死, 分离

Tab 3. Effects of Orid and BLM on labeling index of leukemia P388 cells in mice after 4-24 h. Compared with control * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Dose(mg/kg)		4 h	8 h	12 h	24 h
Orid	BLM				
0	0	34±3.5	36±5.2	35±4.1	32±3.7
7.5	-	26±3.6*	24.6±0.5**	26.7±1.8**	30±3.2*
-	1.5	26±5.4*	28±4.0*	32±5.0*	33.2±1.6*
7.5	1.5	17±3.5***	18.5±0.9***	18.9±2.6***	28.1±1.2*

股骨, 5 ml 生理盐水将骨髓细胞自髓腔冲出, 所取细胞离心洗涤, 计数后移至玻璃纤维纸片, 结果以 3 只小鼠的平均参入率表示(表 2)。实验证明, Orid, BLM 及合用组作用后 2 和 6 h, 均可明显抑制 $[^3\text{H}]$ TdR 参入肿瘤细胞 DNA, 以 6 h 为著。参入率分别为 45, 60 和 30%, 其中合用组的抑制作用最强($p < 0.05$), 对骨髓细胞的参入抑制不明显。说明二药合用在肿瘤组织对前体物参入的抑制作用强于骨髓。

对 DBF1 小鼠体内白血病 P388 细胞标记指数的影响 取接种后 d 5 的 P388 小鼠 48 只, 分 4 组, 每组 12 只, 各组按表 3 剂量给药, 于 4, 8, 12, 24 h 各取 3 只小鼠, 每鼠 ip $[^3\text{H}]$ TdR 0.74 MBq, 1 h 后取腹水涂片做放射自显影, Giemsa 染色, 镜检统计 1000 个细胞中含有标记的细胞数, 即标记指数(LI%)。实验发现(表 3), 合用组的 LI% 明显低于单用组, 以给药后 4, 8, 12 h 为著, 由对照组的 34% 标记细胞依次下降为 17, 18.5 和 18.9% ($p < 0.01$)。合用组的标记指数明显低于各单用组($p < 0.01$ 或 0.05)。

讨 论

抑制 DNA 合成是药物抑制肿瘤细胞增殖的主要原因, 同时又是药物对宿主敏感组织的毒性指标之一。除了上述方案对小鼠肿瘤 DNA 合成有抑制作用外, 同时发现上述药物剂量的合用组对 RNA 和蛋白质合成无影响。Orid 15 mg/kg 可使小鼠 EAC 和 L 1210 细胞的 LI% 下降⁽³⁾, S 期细胞减少。而 BLM 可明显抑制多种肿瘤细胞的 DNA 合成(EAC,

Hela 和 L 细胞等), 它的细胞毒作用与其 DNA 断裂和改变 DNA 理化性质(Tm 和粘度等)有关⁽⁷⁻⁹⁾。BLM 在体内可与 Fe^{3+} 结合成 BLM- Fe^{3+} 复合物⁽¹⁰⁾, 在 NADPH-P-450 还原酶作用下, 还原为 BLM- Fe^{2+} , 后者与氧结合形成 $\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ -BLM, 继之裂解为 O_2^- (超氧化物阴离子自由基), 从而引起脂质过氧化和 DNA 的断裂和损伤, 二药对肿瘤细胞 DNA 合成上的协同抑制作用, 究竟是对 DNA 模板的进一步损伤, 还是干扰其合成代谢或两者皆存, 有待研究。在组织选择上, 对肿瘤细胞 DNA 合成的抑制强于骨髓, 这对于指导临床用药和增效减毒将有一定意义。

致谢 李 瑛、叶启霞、刘腾先、李国栋参加部分工作

参 考 文 献

- 1 张覃沐、寿马钢、王绵英. 冬凌草甲素增效博莱霉素 A5, 消瘤芥抗肿瘤作用的研究. 中国药理学报 1986; 7: 457
- 2 王瑞林、高保罗、熊沐霖, 等. 冬凌草与化疗合用治疗食管癌增效作用的探讨. 中华肿瘤杂志 1986; 8: 297
- 3 张覃沐、王绵英、林 晨. 冬凌草甲素对 EAC 细胞动力学的影响. 河南医学院学报 1982; 17: 7
- 4 Watanabe M, Takabe Y, Katsumata T. Response in macromolecular syntheses of mouse L cells to bleomycin, with special reference to cell-antibiotic interaction. *J Antibiot* 1973; 26: 417
- 5 方福德、吴冠芸. 抑制 DNA 合成药物作用方式的简易测定法. 药理学报 1981; 16: 233
- 6 Fernandes DJ, Klubes P. A biochemical and pharmacological study of therapeutic synergism with 5-fluorouracil plus cyclophosphamide in murine L 1210 leukemia. *Cancer Res* 1979; 39: 1396

- 7 Suzuki H, Nagai K, Akutsu E, Yamaki H, Yanaka N, Umezawa H. On the mechanism of action of bleomycin. Strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA *in vitro*. *J Antibiot* 1970; 23 : 473
- 8 Suzuki H, Nagai K, Yamaki N, Yanaka N, Umezawa H. Mechanism of action of bleomycin. Studies with the growing culture of bacterial and tumor cells. *Ibid* 1968; 21 : 379
- 9 Nagai K, Suzuki H, Yanaka N, Umezawa. Decrease of melting temperature and single strand scission of DNA by bleomycin in the presence of 2-mercaptoethanol. *Ibid* 1969; 22 : 569
- 10 Scheulen ME, Kappus H, Thyssen D, Schmidt CG. Redox cycling of Fe(III)-bleomycin by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Pharmacol* 1981; 30 : 3385

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan; 8 (1) : 83-86

Effect of oridonin and bleomycin A₅ combination on DNA syntheses in tumor and bone marrow cells

SHOU Ma-Gang, WANG Mian-Ying, WANG Qi, ZHANG Tan-Mu

(Dept Pharmacology, Henan Medical University and Henan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT The inhibitory effect of oridonin (Orid) and bleomycin A₅ (BLM) in combination on DNA syntheses in Ehrlich ascitic carcinoma, P388 leukemia and bone marrow cells both *in vivo* and *in vitro* was determined by the technique of tritium-labelled uptake method and autoradiography. The results suggested that DNA synthesis was markedly inhibited by the combination of Orid (0.5, 2 µg/ml) and BLM (20, 40 µg/ml) *in vitro* as compared to that by each drug using alone. However, RNA and

protein syntheses were not significantly affected. The convergent inhibition on DNA syntheses of Orid (15 mg/kg) and BLM (3 mg/kg) in combination *in vivo* was stronger in the tumor cells than in the bone marrow cells.

KEY WORDS oridonin; bleomycins; drug combinations; polymers; antineoplastic agents; Ehrlich tumor carcinoma; leukemia P388; bone marrow; [³H]thymidine; autoradiography