

羟基喜树碱和四种其它抗癌药对 KB 细胞的杀伤作用

王心伟、俞伟娟、沈祖铭、杨金龙、胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 采用克隆形成法与台盼兰染色法比较羟基喜树碱等 5 种抗癌药对 KB 细胞的作用。结果表明用克隆法评价的细胞杀伤作用远较台盼兰法为客观与灵敏, 尤其适合于评价周期特异性抗癌药。在 [^3H]TdR 参入实

验中, 大剂量羟基喜树碱虽能抑制 [^3H]TdR 参入 DNA, 但在细胞杀伤剂量时并不表现此种抑制, 提示其细胞杀伤作用与 DNA 合成抑制不一定相关。

关键词 10-羟基喜树碱; KB 细胞; 集落形成单位测定; [^3H]胸腺嘧啶核苷; [^3H]尿苷; [^3H]亮氨酸; 高三尖杉酯碱; 石蒜碱胺;

1985年7月20日收稿 1986年2月5日修回

¹ 本所 81 级研究生

5-氟尿嘧啶; 长春新碱

在肿瘤生物学研究中, 干细胞的生长状况具有决定性的意义, 它具有不断增殖的能力, 最终导致宿主死亡; 它与肿瘤的复发、播散及转移有密切的关系, 是化学治疗最有意义的靶点, 许多研究者⁽¹⁾采用各种体外试验法观察一些已知抗癌药物的作用, 认为运用克隆形成法研究干细胞以此评价细胞死亡及观察药物的作用, 在理论及实际应用方面都具有较大的价值。本文采用体外常用模型 KB 细胞, 观察羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin, HCPT), 高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHAR), 石蒜碱铵(lycobetaine, LBT), 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)及长春新碱(vincristine, VCR)对 KB 细胞的作用, 比较台盼兰染色法, 平板克隆形成等方法对上述药物灵敏度的差异, 试图建立一个较可靠的评价体外细胞杀伤的指标。

材料与方 法

药品 HCPT, HHAR, LBT 均为粉剂, 分别由本所抗菌素室、植化室及合成室提供。HCPT 先用少许 0.5 mol/L NaOH, HHAR 用 1 mol/L HCl, LBT 用 10%醋酸溶解后, 再用生理盐水稀释, 过滤灭菌, 置于低温保存。临用前以灭菌培养液稀释至所需浓度, 5-Fu 注射液, 上海第十三制药厂生产。VCR 针剂, 上海第十二制药厂生产。 $[^3\text{H}]\text{TdR}$, $[^3\text{H}]\text{UR}$, $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 的放射比活性分别为 1.37 TBq/mmol, 0.74 TBq/mmol, 2.11 TBq/mmol 由中国科学院上海原子核研究所提供。台盼兰为西德 E. Merck 公司产品。

细胞株及其培养 细胞株从北京第二医学院引入, 以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 浓度接种于塑料培养瓶(Corning 产品)中, 每瓶盛有含 10%新生牛血清、100 IU/ml 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 Eagle 氏 MEM 完全培养液 10 ml, 置于含 5% CO_2 , 37°C 的饱和湿度环境中生长, 每 3-4 d 传代一次。

台盼兰排染法及克隆形成法

1. 排染法 于 40 孔微孔板内, 每孔接种 2×10^4 细胞, 并加 0.2 ml 完全培养液。待细胞生长贴壁, 加入药物, 作用适当时间, 弃去药物后加 0.1 ml 胰酶消化液(含 0.05%胰蛋白酶、0.02% EDTA Na_2 的无 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ Hanks 液), 2 min 后加 0.1 ml 台盼兰染液, 充分混匀, 立即镜下计数。不染色者为存活细胞。与对照组比较, 按以下公式, 即实验组活细胞数/对照组活细胞数 $\times 100\%$, 求得活细胞的相当率(percent of control, PC), 每一浓度 4 个样本, 实验重复三次。

2. 克隆法 按过去报道方法进行⁽²⁾。给药组与对照组比较, 求得细胞存活比(survival fraction, SF)。每一浓度的数据至少为三个样本的平均值。

放射性前体物参入实验 按文献(3)方法稍加改进, 取接种 48 h 的细胞, 药物作用一定时间, 终止反应前 1 h 加 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ (37 kBq/ml), $[^3\text{H}]\text{UR}$ (37 kBq/ml), 或 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ (185 kBq/ml)。橡皮小刀收集细胞, 用冷蒸馏水使细胞溶解, 10%TCA 使沉淀。沉淀物用玻璃纤维滤膜收集、烘干, 以国产 YSJ-78 型自动液体闪烁计数器测定 cpm 值。与对照组比较, 以公式: (给药组 cpm - 对照组 cpm)/对照组 cpm $\times 100\%$, 求得参入抑制率。每一浓度二个样本, 至少重复三次。

结 果

HCPT, HHAR, LBT, 5-Fu 和 VCR 对 KB 细胞杀伤作用的比较 实验分别以不同药物浓度与 KB 细胞作用 1-24 h, 并分别用染色法及克隆法测定其 PC 及 SF 值。结果表明, 5 种药物都能不同程度地杀伤细胞。在相同剂量下, 5 种药物的克隆形成抑制率较以染色法评价的细胞杀伤率为高(图 1)。其中, VCR 以 0.01-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 1 h, SF 降低了约 90%以上, 而 PC 仅降低 10%。HCPT 作用 1, 4 h, 当使 SF 明显下降时, PC 值几乎无变化, 24 h 作用后的 PC 值仅为 50%左右, 此时的 SF 值

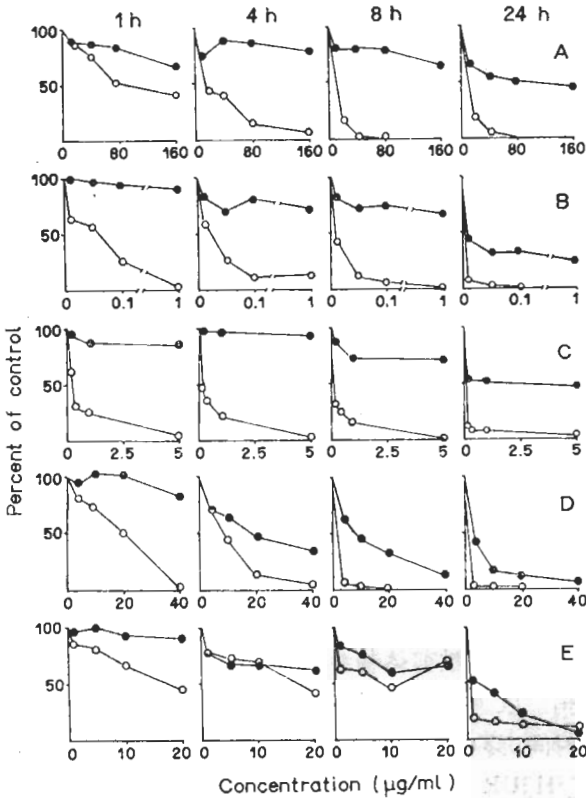


Fig 1. A comparison of cytotoxic effect of 5-fluorouracil (a), vincristine (B), hydroxycamptothecin (C), lycobetaine (D) and homoharringtonine (E) on growth of cultured KB cells by means of trypan blue dye exclusion (●) and colony formation (○) methods.

已在 10% 以下。5-Fu 在 20-160 $\mu\text{g/ml}$ 范围内亦能观察到类似现象。另外，二种方法的灵敏性差异同样在 HHAR 20, LBT 40 $\mu\text{g/ml}$ 作用 1 h 时观察到，但差别较 VCR, 5-Fu 及 HCPT 为小。以克隆法测得的剂量反应曲线斜率与染色法曲线的斜率相比，获得两种方法的敏感度比值(表 1)。其中，VCR, 5-Fu, HCPT 用克隆法评价比染色法灵敏 25 倍左右，而 LBT 及 HHAR 仅有 5-10 倍。

HCPT 对放射性前体物参入到细胞大分子的影响 表 2 所示，1 h 作用的 HCPT 对 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入 DNA 有明显作用，80 $\mu\text{g/ml}$ 时的参入率为 60% ($p < 0.05$)。同样剂量的 HCPT 对 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 及 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 参入无明显作用，表明

Tab 1. A comparison of two methods *in vitro* to measure drug-induced cell lethality. Results are expressed as SCF (slope of colony formation)/SDE (slope of dye exclusion)

	1 h	4 h	8 h	24 h	Average
VCR	27	9	13	56	26
5-Fu	2	40	40	18	25
HCPT	30	41	22	4	24
LBT	8	5	10	17	10
HHAR	9	2	6	2	5

Tab 2. Effect of HCPT on the incorporation of radioactive precursors into macromolecules of KB cells which were treated 1 h with various concentrations of HCPT. Data are the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of 3 experiments performed in duplicate. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

HCPT ($\mu\text{g/ml}$)	Rate of incorporation (% of control)		
	$[^3\text{H}]\text{TdR}$	$[^3\text{H}]\text{UR}$	$[^3\text{H}]\text{leu}$
10	95 \pm 11*	88 \pm 4*	91 \pm 0.2*
20	85 \pm 10*	89 \pm 4*	87 \pm 12*
40	80 \pm 7*	98 \pm 9*	94 \pm 6*
80	60 \pm 21**	106 \pm 6*	87 \pm 4*

HCPT 主要影响 DNA 的合成。

以 1 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 与 KB 细胞作用不同时间，考察 HCPT 在杀伤细胞的剂量下对 TdR 参入的作用过程，结果见图 2。1 $\mu\text{g/ml}$ 作用至 12 h 时，其抑制率仅为 11.1%，24 h 后抑制率才达到 33.4% ($p < 0.01$)。5 $\mu\text{g/ml}$ 时，1 h 的抑制率为 10.9%，6 h 的抑制率为 23.3% ($p < 0.05$)，

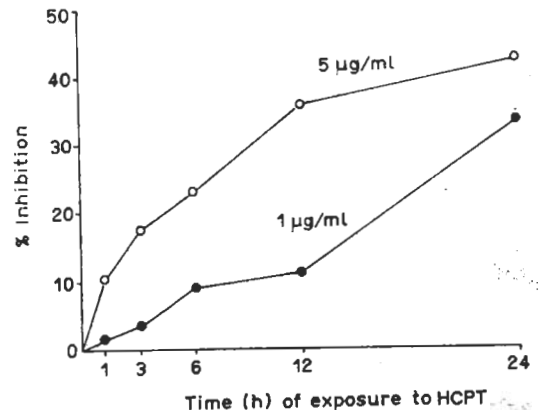


Fig 2. Effect of continuous exposure to HCPT on $[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation into DNA of KB-C7 cells.

开始出现明显效应, 24 h 时为 42.4% ($p < 0.01$). 表明 HCPT 影响 KB 细胞 DNA 合成具有时间依赖性。

讨 论

1955 年 Puck⁽⁴⁾ 建立了克隆形成法以测定体外细胞增殖死亡。1966 年 Bruce 首次采用克隆分析(Clonal Assay)概念来研究肿瘤干细胞⁽⁵⁾, 对体外评价抗癌药物的细胞杀伤作用提供了较理想的方法。本文以此观察 HCPT 等抗癌药对细胞的杀伤作用, 证明了克隆法对细胞杀伤作用的评价远较台盼兰法敏感, 其中, 克隆法更适合于具有周期特异性抗癌药如 HCPT, VCR 及 5-Fu 等。对周期非特异性药物如 HHAR, 二种方法差别较小。另外, 克隆法能反映出较短时间的药物作用, 而台盼兰法在较长时间作用下才有意义。

在细致研究 HCPT 对 TdR 参入 DNA 的影响时发现, HCPT 在细胞杀伤剂量下并不表现对 TdR 参入的抑制作用, 只有加大剂量或延长其作用时间才观察到这种现象。HCPT 对 DNA 虽能产生很强的损伤作用, 且这种作用可能是导致细胞死亡的主要原因, 但在造成细胞明显生长抑制的条件下并不表现出明显的 DNA 合成抑制。Siegfried⁽⁶⁾ 等人亦发现, 药物对核酸合成抑制作用并不一定与细胞毒作用相平行。上述资料提示, 以参入法说明细胞的生长抑制或死亡还值得继续深入研究。

可以认为, 克隆形成技术是一种目前较好的, 剂量依赖的细胞存活及增殖动力的测定指标。此法在其他实验室的报道中亦得到较好的评价^(7,8)。克隆法应用范围很广, 它不仅可

说明药物的直接杀伤, 造成细胞膜性结构的改变, 也可表达因代谢障碍、调控紊乱而导致的增殖抑制, 故以本法研究抗癌药对癌细胞的杀伤作用, 不仅结果可靠, 且具有较大的实际意义。

参 考 文 献

- 1 Poper PR, Brewinko B. Comparison of *in vitro* methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res* 1976; 36 : 2182
- 2 Wang XW, Yue XF, Xu B, *et al.* Studies on cytotoxicity and induction of sister chromatid exchanges in V 79 cells with three antitumor agents. *Kexue Tongbao* 1984; 29 : 1268
- 3 Nishio A, Uyeki EM. Cellular uptake and inhibition of DNA synthesis by dihydroxyanthraquinone and two analogues. *Cancer Res* 1983; 43 : 1951
- 4 Puck TT, Marcus P. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955; 41 : 432
- 5 Bruce WR, Meeker BE, Valeriote FA. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered *in vivo*. *J Natl Cancer Inst* 1966; 37 : 233
- 6 Siegfried JM, Sartorelli AC, Tritton TR. Evidence for the lack of relationship between inhibition of nucleic acid synthesis and cytotoxicity of adriamycin. *Cancer Biochem Biophys* 1983; 6 : 137
- 7 魏丽惠, 丹羽太贯, 菅原努. 体外人癌细胞对抗癌药物的敏感性——集落法与小孔法的比较. *北京医学院学报* 1983; 15 : 307
- 8 Chang BK. Comparison of *in vitro* methods for assessing cytotoxic activity against two pancreatic adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 1983; 43 : 3147

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan; 8 (1) : 86-90

Cytotoxicity of hydroxycamptothecin and four other antineoplastic agents on KB cells

WANG Xin-Wei, YU Wei-Juan, SHEN ZU-Ming, YANG Jin-Long, XU Bin
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The cytotoxicity of 10-hydroxycamptothecin (HCPT), homoharring-

tonine (HHAR), lycobetaine (LBT), 5-fluorouracil (5-FU), and vincristine (VCR) on KB cell was studied by means of colony formation method and/or trypan blue exclusion method. The results showed that colony formation method was more sensitive to these drugs in comparison with trypan blue method. The order of sensitivity of two methods for these drugs was as follows: VCR > 5-FU > HCPT > LBT > HHAR. Colony formation method was particularly suitable for estimation of the cell cycle-specific antineoplastic agents, such as VCR, 5-FU and HCPT. This method seems to be more reliable for determining cell lethality *in vitro*.

HCPT at 80 µg/ml had slight inhibitory effect on incorporation of [³H]TdR into DNA of KB cells. This effect depended on the time and dose. No inhibitory effect was found under the cytotoxic doses. The results indicate that the extent of inhibition of precursor incorporation into DNA synthesis is not directly parallel to its cell killing.

KEY WORDS 10-hydroxycamptothecin; KB cells; colony-forming units assay; [³H]thymidine; [³H]uridine; [³H]leucine; homoharringtonine; lycobetaine; 5-fluorouracil; vincristine