

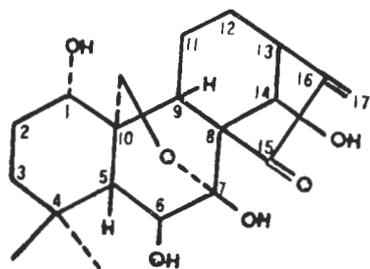
## 冬凌草甲素体外杀细胞作用的特点

李学汤、林晨、李珮茵 (中国医学科学院肿瘤研究所药理室, 北京 100021)

**提要** 使用集落培养技术测定细胞存活率, 观察了 oridonin 对人胃腺癌 MGc 80-3 细胞的杀灭特点。该药对指数生长期细胞作用的剂量-存活率曲线属阈值指数型。坪期细胞对药物耐受, 在所用剂量范围内未测及明确的指数杀灭效应。同步增殖细胞对药物的敏感性, 缺乏明显的时相差异。

**关键词** 冬凌草甲素; 抗肿瘤药; 培养细胞; 细胞存活

冬凌草甲素(oridonin)为二萜类抗癌成分, 可抑制动物肿瘤生长<sup>(1,2)</sup>, 并已在临床试用<sup>(3)</sup>。我们曾在7种人癌细胞系比较了它的体外活性, 人胃腺癌 MGc 80-3 为敏感细胞系之一<sup>(4)</sup>。本文使用集落培养技术, 就不同增殖状态的 MGc 80-3 细胞观察 oridonin 的杀细胞作用特点, 以期为临床试用提供进一步的实验依据。



Oridonin

## 材料和方法

**药品和试剂** Oridonin 由河南省医学科学研究所提供; [<sup>3</sup>H]TdR(1.52 TBq/mmol), 上海原子核研究所生产; 羟基脲, 广东佛山制药厂生产。

**细胞和培养条件** MGc 80-3 细胞单层生长, 用 0.5% 胰酶制备分散的单细胞悬液。培养液用 RPMI-1640 (GIBCO), 常规含 20% 灭

活小牛血清(贵阳产品), 低血清培养液含上述血清 0.25%。使用 5% CO<sub>2</sub> 温箱, 37℃ 培养。细胞接种于常规培养液中, 24 h 即进入指数生长期, 本文使用接种后 48 h 的细胞。在细胞刚长满瓶底时, 换以低血清培养液可维持坪期至少 3-4 d, 细胞数保持相对稳定, 细胞密度范围为 1.2-1.4 × 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>。

**同步化细胞的制备** 对低血清加羟基脲同步法<sup>(5)</sup>略加修改, 即细胞经低血清培养液培养 72 h 后, 加入 2.5 mM 羟基脲阻断 20 h, 释放时换以常规培养液使细胞同步增殖。换液开始至结束的中点时间定为 0 h。经流式细胞荧光测定仪测定, 约 80% 的细胞处于 G<sub>1</sub> 期。监测同步时, [<sup>3</sup>H]TdR 的终浓度为 37 kBq/ml, 掺入 30 min, 测定 cpm。

**存活率测定** 细胞经药物作用后, 制成分散的单细胞悬液, 适量接种于 60 mm 直径的平皿中, 集落培养 8-10 d, Giemsa 氏染色后计数, 仅多于 50 个细胞者计为集落。集落形成率即形成的集落数在接种细胞数中所占百分率。存活率按公式(给药组集落形成率/对照组集落形成率) × 100% 计算。

## 结果

本批实验中, 各对照组 MGc 80-3 细胞的集落形成率均高于 50%, 实验至少重复一次, 结果一致。每次实验的数据为至少 3 样本的均值。

**对非同步细胞的作用** Oridonin 的杀细胞作用有剂量、作用时间和细胞增殖状态依赖性(图 1)。药物与指数期细胞作用 1 或 24 h 半数存活剂量(D<sub>50</sub>)分别为 31 和 12 μg/ml; 与坪期细胞作用 1 h 的 D<sub>50</sub> 为 80 μg/ml, 24 h 约为 47 μg/ml(估计值), 比前者高 1.6-3.0 倍。

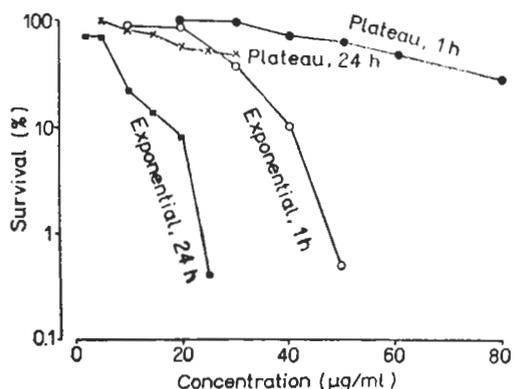


Fig 1. Survival of exponential and plateau-phase cells after 1 or 24 h exposure to varying concentrations of oridonin.

Oridonin 50 µg/ml 作用 1 h 或 25 µg/ml 作用 24 h, 对指数期细胞产生超过 2 个指数的杀灭效应(存活率分别为 0.70% 和 0.68%); 坪期细胞效应不及前者的 1%, 存活率分别为 84.2% 和 78.6% 显示明显的耐受性。

**对同步化细胞的作用** 释放后每 2 h 取样, 测定 [<sup>3</sup>H]TdR 的掺入。0-2 h 的 cpm 值改变提示细胞似被同步于晚 G<sub>1</sub> 期, cpm 在 6 h 达

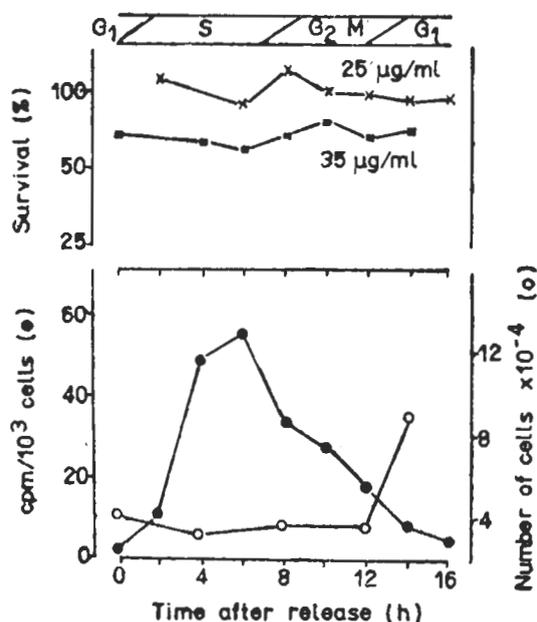


Fig 2. Survival of synchronized cells treated with oridonin (25 or 35 µg/ml) for 1 h at various stages of cell cycle.

最高值, 8 h 后明显降低。细胞数在释放后 0-12 h 内保持恒定; 14 h 突然倍增, 提示细胞已渡过 M 期且同步良好。据此可大致划分周期时相(图 2)。

Oridonin 剂量为 25 和 35 µg/ml, 在释放后不同时间加药, 作用 1 h 后测定细胞存活率。由图 2 可见, 释放后不同时间的细胞对药物无明显的敏感性差异。难以肯定 oridonin 是否较优先杀灭 S 期细胞。

## 讨 论

六十年代, Bruce 等利用动物体内集落形成技术, 评价淋巴瘤细胞和造血细胞对抗癌药物的敏感性, 提出按周期作用特点对药物分类的方法<sup>(6)</sup>。以后又有大量报道用指数生长期和坪期细胞在体外进行类似研究<sup>(5,7-9)</sup>。根据 Drewinko 的分类<sup>(9)</sup>, oridonin 对指数期 MGc 80-3 细胞作用的剂量-存活率曲线属阈值指数型。本文在高于指数期细胞所试剂量范围内, 对坪期细胞未测得明确的指数杀灭效应, 提示该类细胞对 oridonin 有明显耐受性。另外, 该药对同步化细胞未显示时相选择性杀灭特点。据此推测, oridonin 可能为周期特异性药物。

增殖细胞在恶性肿瘤细胞群体中所占比例(生长比例)不但决定其生长速度, 且与化疗效果有关。集落培养, 为迄今评价细胞增殖力最可靠的技术, 也用于人体肿瘤的干细胞试验。使用这种技术观察人癌细胞系中药物活性, 似有预告临床疗效的前途<sup>(10-12)</sup>; 研究药物对不同增殖状态细胞的作用特点, 则有助于合理用药<sup>(7-9,13)</sup>。本文提示 oridonin 在临床试用时, 宜选择生长比例大的肿瘤, 与优势杀灭非增殖细胞的药物(如博来霉素和亚硝脲类<sup>(7)</sup>)合用, 是否可能提高疗效, 值得研究。

## 参 考 文 献

- 1 Fujita E, Nagao Y, Node M, Kaneko K, Nakazawa S, Kuroda H. Antitumor activity of the isodon diterpenoids; Structural requirements for the activity. *Experientia* 1976; 32:203

- 2 河南省医学科学研究所药理药化组、河南医学院化学教研组、云南省植物研究所植化室、郑州化学制药厂试剂室。一种新的抗肿瘤物质——冬凌草素。科学通报 1978; 23 : 53
- 3 河南省冬凌草研究协作组。冬凌草治疗食管癌、贲门癌 95 例临床疗效结果。肿瘤防治研究 1984; 11 : 86
- 4 李学汤、林 晨、李珮茵、张覃沐。七种人癌细胞系对冬凌草甲素的敏感性比较。药学报 1985; 20 : 243
- 5 Hill BT, Whelan RDH. Lethal and kinetic effects of DDMP (2,4-diamino-5-(3'4'-dichlorophenyl)-6-methyl pyrimidine). *Eur J Cancer* 1980; 16 : 147
- 6 Bruce WR, Meekcr BE, Valerieole 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
- 7 Barranco SC, Novak JK, Humphrey RM. Response of mammalian cells following treatment with bleomycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea during plateau phase. *Cancer Res* 1973; 33 : 691
- 8 Bhuyan BK, Fraser TJ. Cell proliferation kinetics and drug sensitivity of exponential and stationary populations of cultured L 1210 cells. *Ibid* 1977; 37 : 1057
- 9 Drewinko B, Roper PR, Barlogie B. Patterns of cell survival following treatment with antitumor agents in vitro. *Eur J Cancer* 1979; 15 : 93
- 10 Carny DN, Gazdar AF, Mimma JD. *In vitro* chemosensitivity of clinical specimens and established cell lines of small cell lung cancer. *Stem Cells* 1982; 1 : 296
- 11 Hill BT, Whelan RDH Assessments of the sensitivities of cultured human neuroblastoma cells to anti-tumour drugs. *Pediatr Res* 1981; 15 : 1117
- 12 Hill BT, Dennis LY, Li XT, Whelan RDH. Identification of anthracycline analogues with enhanced cytotoxicity and lack of cross-resistance to adriamycin using a series of mammalian cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; 14 : 194
- 13 Pratt WB, Ruddon RW. *The anticancer drugs*. 1st ed. NY : Oxford University Press, 1979; 20-42

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 Jul, 7 (4) : 361-363

## Characteristics of cytostatic effects of oridonin *in vitro*

LI Xue-tang, LIN Chen, LI Pei-yin

(Dept Pharmacology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

**ABSTRACT** The cytostatic effects of oridonin on the MGc 80-3 human gastric adenocarcinoma cells in different proliferation stages were studied by colony-forming assay. An exposure of exponential-phase cells to oridonin for 1 or 24 h resulted in a threshold-exponential dose-survival curve. The plateau-phase cells exposed for the some periods of time seemed to be resistant to the drug. The synchronized cells caused

by pretreatment with low-serum and hydroxyurea were exposed to oridonin 25 or 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 h and there was no significant difference in the drug sensitivities between the different phases. These data suggest that oridonin seems to be a cyclespecific anticancer drug.

**KEY WORDS** oridonin, antineoplastic agents, cultured cells, cell survival