

## 丙双吗啉的抗肿瘤作用、毒性及对小鼠免疫功能的影响

张覃沐、王绵英、王庆端 (河南省医学科学研究所药理研究室, 郑州 450052)

任云峰 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 丙双吗啉(probimane)对小鼠 S 37, L 1210, L 615, 脑瘤 B 22 及肝癌等有明显抗肿瘤作用; 不抑制

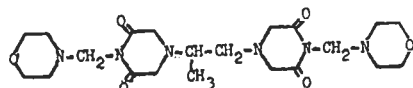
Lewis 肺癌原发病灶生长的剂量可明显减少肺转移灶数, 对 S 37 的  $ID_{50}$  为 2.8 mg/kg ip 及 4.0 mg/kg ig. 对小鼠的亚急性  $LD_{50}$  为 165 (159-172) mg/kg ip 及 112 (107-116) mg/kg ig. 对小鼠的溶血素形成有

1985年9月30日收稿 1986年12月9日修回

抑制作用，对移植物抗宿主反应及肿瘤相伴免疫则无明显影响。

**关键词** 丙双吗啉； 实验性肿瘤； 半数致死量； 溶血素； 细胞免疫； 移植物抗宿主反应

七十年代任云峰等合成了乙双吗啉(bimolane)，实验证明它具有广谱抗肿瘤作用，毒性小，并有放疗增效，抗转移及选择性抑制体液免疫等作用<sup>(1-3)</sup>。临床研究证明，它对银屑病、葡萄膜炎及恶性淋巴瘤等有良好疗效，与放疗合用对放疗不敏感肿瘤亦有肯定疗效<sup>(4-6)</sup>。但乙双吗啉水溶性差，临床上抗肿瘤范围不够广，疗效尚不够满意。为了寻找水溶性较好，抗肿瘤作用强，毒性更小的同系化合物，任云峰等合成了一系列乙双吗啉的衍生物，经筛选发现，丙双吗啉的抗肿瘤作用较好，它与乙双吗啉的不同点仅在于中心链的乙基换成异丙基。本文就其抗肿瘤作用，毒性及对小鼠免疫功能的影响进行了研究。



Probimane

## 材 料

丙双吗啉(probimane, AT-2153)由中国科学院上海药物研究所合成<sup>(7)</sup>，化学名为 *dl*-1,2-bis(4-morpholino-methyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane，为白色粉末，能溶于水，溶解度为 20 mg/ml(20℃)及 25-30 mg/ml(45℃)。实验前配成水溶液供试验用。

## 方法 及 结果

**抗肿瘤试验** 抗肿瘤试验方法系根据1973年全国抗癌药物合成及筛选会议的规定。本实验中所用移植性肿瘤有：小鼠白血病L 1210，L 615，Lewis肺癌、肉瘤S 37，肝癌实体型HCS，脑瘤B 22及网织细胞肉瘤ARS等。L 1210用DBA小鼠，L 615用615小鼠，其余均用昆明种小鼠。于常规接种瘤株后d 1予以ip或ig给药，L 1210，L 615均连用6d，其余则10d。L 1210，L 615以存活期延长率(ILS)，其余则以瘤重抑制率(TWI)作为疗效指标。

1. 丙双吗啉对L 1210，L 615白血病有明显抗肿瘤作用，于25及50 mg/(kg·d) × 6 ip时，对L 1210小鼠存活期延长47及89%；

Tab 1. Effects of probimane on leukemia L615 and L 1210 in mice.  $\bar{x} \pm SD$ . All  $p < 0.01$  vs control

Tumor	Dose mg/(kg·d) × d	Mice Begin/End	Body wt (g) Begin/End	Mean survival time (d)	Increase in life span(%)
L 615	CMC ip	7/0	23.8 ± 1.0/25.6 ± 1.5	7.0 ± 0.6	
	25 × 6 ip	5/0	23.6 ± 1.4/23.4 ± 1.6	10.3 ± 0.8	47 ± 12
	50 × 6 ip	5/0	24.8 ± 2.2/24.2 ± 1.9	10.7 ± 0.8	53 ± 12
L 615	CMC ig	7/0	25.1 ± 1.4/26.7 ± 1.5	7.4 ± 0.2	
	25 × 6 ig	5/0	24.2 ± 1.2/25.2 ± 1.3	9.8 ± 0.6	32 ± 9
	50 × 6 ig	5/0	24.6 ± 1.6/24.8 ± 1.0	12.5 ± 1.1	69 ± 17
	100 × 6 ip	5/1	24.6 ± 1.4/22.0 ± 1.8	17.8 ± 7.3	140 ± 113
	100 × 6 ig	5/1	22.0 ± 1.1/21.4 ± 1.7	16.5 ± 6.7	123 ± 91
L 1210	CMC ip	7/0	17.0 ± 1.5/21.8 ± 2.2	12.9 ± 0.8	
	25 × 6 ip	5/1	18.6 ± 0.5/19.0 ± 1.2	19.0 ± 7.4	47 ± 42
	50 × 3 ip	5/1	18.0 ± 1.1/19.2 ± 1.6	18.7 ± 6.6	45 ± 41
L 1210	CMC ip	7/0	21.3 ± 0.9/26.0 ± 2.6	10.1 ± 1.7	
	50 × 6 ip	5/2	21.2 ± 0.7/20.4 ± 1.0	19.1 ± 10.2	89 ± 78

50 mg/kg 隔天一次, 共三次, L 1210 小鼠存活期延长 45%。25 及 50 mg/kg ip 和 ig 对 L 615 亦有明显抗肿瘤作用, ILS 为 32-69%, 如剂量增加到 100 mg/kg ip 及 ig, 对 L 615 的疗效明显提高, ILS 在 100% 以上, 且有部份小鼠长期存活。(表 1)

2. 丙双吗啉对 S 37 有明显抗肿瘤作用, 25 mg/kg ig 及 50 mg/kg ip 时可使全部小鼠的肿瘤消失, 随着剂量减少, 抗肿瘤作用亦减弱。采用 Finney's probit analysis 法计算, 丙双吗啉的 50% 抑制剂量 ( $ID_{50}$ ) 为 ip 2.8 及 ig 4.0 mg/kg  $\times$  8 d

3. 丙双吗啉 50 mg/kg ip 及 ig 时, 对 Lewis 肺癌的原发病灶亦有抗肿瘤作用, 其 TWI 分别为 80 及 43%; 剂量增加到 100 mg/kg ig 时, 对原发病灶的 TWI 虽可升高到 71%, 但小鼠体重下降, 部份小鼠死亡。

丙双吗啉 25 及 12.5 mg/kg ip 及 ig 时, 对 Lewis 肺癌原发病灶无明显影响, 对继发性肺转移有明显抑制作用, 使 Lewis 肺转移灶数目明显减少, 剂量降到 6.25 mg/kg 时, 肺转移灶数未见明显减少。(表 3)

4. 丙双吗啉 25 mg/kg ip 及 ig 时, 对脑瘤 B 22 及 HCS 亦有一定抗肿瘤作用, 对它们的 TWI 分别为 43 及 43% ( $p < 0.01$ )。

### 毒性试验

1. 急性毒性 小鼠单次 ip 的  $LD_{50}$  (用 Finney's probit analysis 法计算) 为 376 (361-392) mg/kg。

Tab 2. Effects of probimane on sarcoma S37 and the primary tumor of Lewis lung cancer (LLC) in mice. n (begin/end) = 16/16 (CMC), 8/8 (treated),  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Tumor	Dose mg/(kg·d)	Body wt(g) Begin/End	Mean tumor wt (g)
S37 CMC ip	20.5 $\pm$ 1.7	23.2 $\pm$ 2.4	2.1 $\pm$ 0.5
	1.56 $\times$ 8	20.4 $\pm$ 1.3/23.0 $\pm$ 1.8	1.4 $\pm$ 0.5**
	3.125 $\times$ 8	20.5 $\pm$ 1.5/21.8 $\pm$ 1.8	0.9 $\pm$ 0.4***
	6.25 $\times$ 8	20.5 $\pm$ 1.6/20.8 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 0.4***
	12.5 $\times$ 8	20.5 $\pm$ 1.3/22.0 $\pm$ 1.7	0.4 $\pm$ 0.2***
	25.0 $\times$ 8	20.5 $\pm$ 1.4/22.4 $\pm$ 1.9	0.1 $\pm$ 0.2***
50.0 $\times$ 8	22.4 $\pm$ 1.3/18.9 $\pm$ 1.4	0***	
S37 CMC ig	21.8 $\pm$ 1.0	24.7 $\pm$ 1.6	1.7 $\pm$ 0.9
	3.125 $\times$ 8	21.9 $\pm$ 1.2/24.2 $\pm$ 3.8	1.1 $\pm$ 0.5**
	6.25 $\times$ 8	22.0 $\pm$ 0.9/24.5 $\pm$ 2.7	0.5 $\pm$ 0.4***
	12.5 $\times$ 8	22.0 $\pm$ 1.2/25.4 $\pm$ 1.5	0.1 $\pm$ 0.2***
	25.0 $\times$ 8	22.0 $\pm$ 1.6/22.1 $\pm$ 3.8	0***
	LLC CMC ip	18.0 $\pm$ 1.0	23.1 $\pm$ 2/1
25 $\times$ 10	19.9 $\pm$ 0.8	22.9 $\pm$ 1.9	2.9 $\pm$ 0.6**
50 $\times$ 10	19.9 $\pm$ 1.1	22.9 $\pm$ 2.3	0.9 $\pm$ 0.4***
LLC CMC ig	18.0 $\pm$ 0.6	25.7 $\pm$ 2.9	3.8 $\pm$ 1.2
50 $\times$ 10	18.1 $\pm$ 0.8	19.1 $\pm$ 2.3	2.2 $\pm$ 0.9**
100 $\times$ 10	19.0 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.5***

2. 小鼠亚急性毒性 小鼠 ip 或 ig 丙双吗啉 qd, 连用 8 次, 计算 14 d 内死亡数, 按 Finney's probit analysis 法计算亚急性  $LD_{50}$  为 165 (159-172) mg/kg ip 及 112 (107-116) mg/kg ig。给药后大剂量组出现毛蓬松, 体重下降, 食量减少, 胃肠道气胀等。

3. 大鼠亚急性毒性 取  $\sigma^7$  Wistar 大鼠, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组, 小

Tab 3. Effect of probimane on the lung metastases of Lewis lung cancer in mice.  $\bar{x} \pm SD$ , \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Dose mg/(kg·d) $\times$ 10	n Begin/End	Body wt (g) Begin/End	Number of metastases
CMC ip	15/15	20.4 $\pm$ 1.1/21.4 $\pm$ 1.2	57.8 $\pm$ 17.9
25 ip	8/8	20.4 $\pm$ 0.9/21.2 $\pm$ 1.7	3.8 $\pm$ 1.9***
12.5 ip	8/8	20.4 $\pm$ 1.2/19.4 $\pm$ 1.6	20.4 $\pm$ 13.1***
6.25 ip	8/8	20.0 $\pm$ 1.0/20.0 $\pm$ 1.5	45.3 $\pm$ 24.8**
25 ig	8/8	19.8 $\pm$ 0.9/20.0 $\pm$ 1.9	4.6 $\pm$ 4.3***
12.5 ig	8/8	19.8 $\pm$ 1.1/19.4 $\pm$ 1.8	16.9 $\pm$ 12.9***
6.25 ig	8/8	19.8 $\pm$ 1.2/19.1 $\pm$ 2.1	52.3 $\pm$ 14.9*

剂量 ip 及 ig 组, 以及大剂量 ip 及 ig 组。小剂量 ip, ig 组于第 1, 2 及 3 个月分别为 10, 20 及 40 mg/(kg·d); 大剂量 ip, ig 组于第 1, 2, 3 个月分别为 15, 30 及 60 mg/(kg·d)。给药前及给药后每 2 wk 各称体重及测周围血象一次, 每月作肝、肾功能一次。实验发现: 大剂量及小剂量组大鼠的体重, 白细胞, 血红蛋白以及肝、肾功能均无明显变化。大剂量组于给药第三个月, 血小板计数下降(从  $5-9 \times 10^5/\text{mm}^3$  下降到  $1.9-4 \times 10^5/\text{mm}^3$ ), 停药后一个半月可恢复正常。

病理学检查发现: 大、小剂量丙双吗啉对心、肝、肾、胃肠、脑等脏器均无明显影响。

### 对免疫功能的影响

1. 对溶血素形成的影响 实验用♂昆明小鼠, 以绵羊红细胞(SRBC)作抗原, 给小鼠致敏后 d 1 开始用药, qd, 每次 25 及 50 mg/kg ip 和 ig, 连用 5 d, 另有环磷酰胺及生理盐水作对照, 停药后次日, 由眼内眦取血, 分离血清, 并于 56℃ 放置 30 min 以灭活补体成份, 取 0.2 ml 用生理盐水成倍稀释, 每管加入 1:30 SRBC 0.2 ml 及 1:5 豚鼠血清 0.2 ml, 摇匀, 于 37℃ 孵育 30 min, 观察溶血反应。结果发现: 对照组的最大溶血稀释度为 1:256, 丙双吗啉 25 mg/kg ip, ig 组均下降到 1:128, 50 mg/kg ip, ig 组分别为 1:64 及 1:32, 环磷酰胺 10 mg/kg ip 组为 1:16。

2. 对小鼠肿瘤相伴免疫的影响 先给♂昆明小鼠尾部 sc  $1 \times 10^8$  瘤细胞/ml 的悬液 0.05 ml, 瘤株为腹水型 ARS。致敏后 2 d 开始分别 ip 丙双吗啉 25, 50 mg/kg 及 ig 丙双吗啉 50 mg/kg, 环磷酰胺 ip 30 及 ig 50 mg/kg qd, 连用 7 d, 于致敏后 10 d 以同种瘤细胞攻击(即每鼠 sc 接种  $5 \times 10^6$  瘤细胞), 于攻击后 10 d 处死小鼠, 取瘤称重, 结果见表 4。

丙双吗啉 25 及 50 mg/kg ip 组及 50 mg/kg ig 组, 在长瘤小鼠数及瘤重方面与免疫攻击组(Cs)无差别, 环磷酰胺组则长瘤小鼠数增加, 瘤重抑制减小, 尤以 ip 30 mg/kg 组更为明显。

Tab 4. Effect of probimane (Pro, ×7d) on the tumor concomitant immunity in mice.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ , \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs control with immunization (C<sub>g</sub>).

Group	Dose mg/(kg·d)	Mice with tumor growth	Tumor wt (g)
C <sub>o</sub>		8/8	1.5 ± 0.8
C <sub>g</sub>		3/8	0.08 ± 0.1
Pro	25 ip	4/8	0.3 ± 0.3*
Pro	50 ip	5/8	0.2 ± 0.2*
Cyt	30 ip	8/8	1.0 ± 0.5**
C <sub>o</sub>		10/10	1.1 ± 0.5
C <sub>g</sub>		3/9	0.08 ± 0.1
Pro	50 ig	1/8	0.04 ± 0.1*
Cyt	50 ig	7/9	0.6 ± 0.5***

C<sub>o</sub>: control without immunization. Cyt: cytoxan.

3. 对移植抗宿主反应的影响 实验用 DBA(♂)及 615(♀)杂交第一代(F<sub>1</sub>)乳鼠。♂ DBA 小鼠 ip 丙双吗啉 25 mg/kg, qd, 共 5 次, 以不给药的 DBA 小鼠(♂)及给药鼠作为亲代供脾者。分别给鼠龄为 10 d 的乳鼠 ip 接种浓度为  $1 \times 10^8$  个脾细胞/ml 的悬液 0.1 ml, 于接种后 8 d 杀鼠, 称体重及脾重, 计算脾指数。在两次实验中丙双吗啉组的脾指数均较注脾对照组为低, 但差别均不显著。(见表 5)

Tab 5. Effects of probimane 25 mg/(kg·d) × 5 on graft vs host reaction in mice.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ , \* $p > 0.05$ , compared to untreated, \*\*\* $p < 0.01$  compared to normal

Group	Mice	Body wt (g)	Spleen wt (mg)	Spleen index
Normal	6	8.2 ± 1.3	35.1 ± 4.7	
Untreated	5	8.8 ± 2.1	68.7 ± 6.1***	1.82
Probimane	5	9.4 ± 0.9	63.0 ± 8.7	1.59*
Normal	8	7.9 ± 1.5	41.3 ± 3.0	
Untreated	7	8.0 ± 2.0	66.4 ± 3.5***	1.59
Probimane	7	8.0 ± 1.6	53.7 ± 5.1	1.40*

## 讨 论

丙双吗啉与乙双吗啉和丙亚胺相似, 对

S 37 有较强抗肿瘤作用, 对 L 615, L 1210, 脑瘤 B 22 及肝癌等亦有抑制作用。丙双吗啉的化疗指数(CI = LD<sub>50</sub>/ID<sub>50</sub>)为 59(ip) 及 28(ig), 乙双吗啉的 CI 分别为 48(ip) 及 37(ig); 而丙亚胺则分别为 60(ip) 及 11(ig)<sup>(8)</sup>。

丙双吗啉亦与乙双吗啉及丙亚胺相似, 在不抑制 Lewis 肺癌原发病灶的剂量下, 即可明显减少继发性肺转移灶数, 同样具有抗转移作用。

丙双吗啉对大鼠亚急性毒性试验发现, 连续用药三个月, 除产生血小板计数轻度下降外, 对肝、肾功能等均无影响; 主要脏器亦无明显病理性改变。

丙双吗啉对以溶血素形成为指标的体液免疫有抑制作用, 对以肿瘤相伴免疫及移植宿主反应为指标的细胞免疫则无影响。这一点亦与乙双吗啉及丙亚胺相似。本实验室采用多种免疫学方法试验, 进一步证明, 丙双吗啉对 B 淋巴细胞有较强大的抑制作用。

**致谢** 河南省肿瘤研究所祖鸿翔、沈国莉参加部份工作。

## 参 考 文 献

- 1 任云峰、舒汉丽、张覃沐、陈正玉、林 晨. 抗癌新药乙双吗啉(AT-1727)的研究. 科学通报 1980; 25 : 189
- 2 张覃沐、陈正玉、林 晨. 抗癌新药乙双吗啉的药理研究. 药学学报 1980; 15 : 577
- 3 Li XT, Hutchison GE, Pym BA, Finch M, Hellmann K. Effect of bimolane (AT-1727) on growth and metastasis of murine tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19 : 1293
- 4 王慧英、周茂恒、凌桂馥、刘承煌、陶玲姊. 乙双吗啉(AT-1727)治疗银屑病的研究(附100例报告). 临床皮肤科杂志 1984; 13 (增刊) : 3
- 5 Zhang ZY, Liu TF, Zhang XF. Phase II evaluation of AT-1727 in advanced human cancer. *Chin Med J* 1983; 96 : 601
- 6 Zhang ZY, Liu TF, Zhang XF. Preliminary report on AT-1727 as a potential radiosensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10 : 2305
- 7 Ren YF, Shu HL, Cai JC, et al. MST-02, a new antitumor agent. In: *Abstracts of 24th International Congress of Chemotherapy*. Japan Convention Services Inc. 1985; 18-33
- 8 张覃沐、陈正玉、林 晨. 抗癌新药乙双吗啉与乙亚胺, 丙亚胺的作用比较. 河南医学院学报 1980; 15 : 145

*Acta Pharmacologica Sinica* 1987 Jul, 8 (4) : 369-374

## Antineoplastic action and toxicity of probimane and its effect on immunologic functions in mice

ZHANG Tan-Mu, WANG Mian-Yin, WANG Qing-Duan (Department of Pharmacology, Henan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052) REN Yun-Feng (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** Probimane(AT-2153, MST-02), dlbis(4-morpholinomethyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane, exhibited good antitumor activities against S 37, L 1210, L 615, brain tumor B 22 and hepatoma HCS. The 50% inhibitory doses (ID<sub>50</sub>) of probimane against S 37 were ip 2.8 (2.3-3.4) and ig

4.0 (3.5-4.6) mg/(kg·d) × 8 d. At the dosage of 12.5 mg/kg insufficient to inhibit the primary lesion of Lewis lung cancer in mice, probimane decreased the number of the metastatic lesions in the lungs.

The acute ip LD<sub>50</sub> in mice was 376 (361-392) mg/kg, whereas the 8-day

subacute LD<sub>50</sub> in mice were ip 165 (159-172) mg/kg and ig 112 (107-116) mg/kg. The chemotherapeutic indices (LD<sub>50</sub>/ID<sub>50</sub>) of probimane were 59 (ip) and 28 (ig).

Subacute toxicity test in rats showed that probimane at the tolerated doses (60 mg/kg·d) caused slight decrease in platelet count but no significant changes in WBC count, Hb value and liver and kidney functions. No morphological damages in liver, kidney, stomach, intestine, heart and brain were noted.

At the dosage of 25 mg/kg ip or ig, probimane depressed the humoral-mediated immunity in hemolysin formation test, but did not inhibit the cell-mediated immunity in graft vs host reaction and tumor concomitant immunity tests in mice.

**KEY WORDS** probimane (AT-2153, MST-02); experimental neoplasms, lethal dose 50, hemolysin, cellular immunity, graft vs host reaction