

羟基喜树碱诱发中国仓鼠卵巢细胞染色体畸变和在小鼠骨髓、胎肝血中形成微核的作用

屠曾宏、王美瑛、肖伟琪、祁晓东、唐卫东 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Effects of 10-hydroxycamptothecin on induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells and micronuclei in mouse bone marrow and fetal liver

TU Zeng-Hong, WANG Mei-Ying, XIAO Wei-Qi, QI Xiao-Dong, TANG Wei-Dong (*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

ABSTRACT 10-Hydroxycamptothecin (HC) is a new antitumor principle isolated from *Camptotheca acuminata* indigenous to China. The genetic toxicity of HC was assessed by mouse bone marrow and transplacental micronucleus test as well as Chinese hamster ovary cell chromosomal aberrations. All of these tests showed positive results. The highest rate of chromosomal aberrations was 83% at 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes in bone marrow of mice was remarkably increased in 19.8% cells at 12.5 mg/kg for 24 h. The micronucleus formation was most often seen at 16 h after im HC in fetal liver and 24 h in maternal bone marrow. The peaks were 36 ± 19 and $31 \pm 10\%$, respectively. The results from *in vivo* and *in vitro* suggest HC is a mutagen, furthermore, a transplacental mutagen in mouse.

KEY WORDS hydroxycamptothecin; chromosome aberrations; mutagenicity tests; micronucleus tests

摘要 10-羟基喜树碱(HC)明显地抑制中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的有丝分裂, 25% $I_{g_{50}}$ 剂量诱发 CHO 细胞染色体畸变率达 83%。HC 还诱发小鼠骨髓 PCE 微核的形成。妊娠 15 d 小鼠 im HC 25 mg/kg 后 16 h 胎肝血微核率达峰值 $36 \pm 19\%$, 母鼠骨髓微核率 24 h 达高峰 $31 \pm 10\%$ 。体内外实验都证明 HC 是诱变剂而且是一个可以经胎盘转移的诱变剂。

关键词 羟基喜树碱; 染色体畸变; 致突变试验; 微核试验

羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin, HC)是从我国特有植物喜树(*Camptotheca acuminata* Decne)中分得的一个抗癌有效成分, 动物试验和临床资料都显示了较好的疗效⁽¹⁾。临床的应用需要更多的药物遗传毒性资料, 但迄今仅见到用培养细胞 SCE 方法测试致突变作用的报道⁽²⁾。因单一方法评价致突变作用的局限性, 本文用体内外致突变法检测和评价 HC 的致突变作用以及对胎儿可能的遗传毒性。

MATERIALS AND METHODS

中国仓鼠卵巢细胞(CHO)染色体畸变试验 CHO 细胞置于 37℃ 含 RPMI 1640 和 10% 小牛血清的营养液中培养 3 d 后, 分别加入不同浓度 HC 作用 48 h。固定, 染色, 求得半数生长抑制量 $I_{g_{50}}$ 作为选择剂量的依据。实验时营养液中加药后于 24, 48 h 分别收集细胞, 制备染色体。镜检 100 个中期分裂相的细胞。按 Ishidate 标准判断实验结果⁽³⁾。整个实验包括测药物直接致突变作用和加 S_0 经代谢活化后的作用两大类。分别以丝裂霉素 C 和环磷酰胺作为阳性对照。

正常小鼠微核试验⁽⁴⁾ ICR 小鼠, 体重 $19.8 \pm SD 1.2$ g 由中国科学院上海动物饲养中心供应。实验分二步。先以 ip HC 25mg/kg(约 $1/8 LD_{50}$)作小鼠骨髓多染性红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)微核形成的时间-效应曲线, 即在给药后 12, 18, 24, 36, 48, 72 h 取出两侧股骨用小牛血清冲洗出全部骨髓, 离心沉淀, 涂片 Giemsa 染色, 每片至少检查 1000 个 PCE。镜检按城墙式逐个移动视野, 直至积累到第 1000 个 PCE 的视野并数

完此视野的 PCE, 计算微核率. 然后在出现微核率峰值的时间点上, 测羟喜 50, 25, 12.5 mg/kg 的剂量-效应关系, 进一步肯定其作用.

小鼠胎肝血的微核试验⁽⁵⁾ 昆明种♀小鼠查到阴栓日定为 d 0. 于 d 15 一次 im HC 25 mg/kg. 再于给药后 16, 24, 36, 48 h 解剖母鼠, 取出胎鼠. 同时制备母鼠骨髓和胎肝血涂片, Giemsa 染色, 镜检微核形成率. 并以环磷酸胺作为阳性对照, 生理盐水作为阴性对照. 每组孕鼠 5 只, 每胎至少 3 只胎鼠制备涂片.

羟基喜树碱由湖北黄石制药厂中心实验室提供; 环磷酸胺为上海第十二制药厂的产品(批号 861012); 丝裂霉素 C 是日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司产品.

RESULTS

诱发 CHO 细胞染色体畸变 HC Ig₅₀ 为 0.59 μg/ml. 此剂量可完全抑制 CHO 细胞的有丝分裂. 浓度降至 0.25 μg/ml 时偶见分裂相, 染色体粉碎化, 有丝分裂仍受抑制. 浓度为 0.125 μg/ml 时才出现满意的中期分裂相, 并诱发明显的染色体畸变, 以染色单体断裂断片为主, 易位次之, 偶见环状染色体形成. 24, 48 h 染色体畸变率分别为 45%, 83%. 依次降低剂量测试, 染色体的畸变率呈现较好的剂量反应关系(Tab 1). 丝裂霉素 C 也诱发明显的染色体畸变. HC 在有 S₀ 代谢活化系统实验中, 低剂量组(0.031 μg/ml)染色体畸变率高于相应的-S₀ 组, 其它两个组获得相似的结果.

骨髓微核试验 一次 ip HC 25 mg/kg 后 72 h 内时-效关系如 Fig 1 所示. 由图可见 18 h 微核率已显著提高, 24 h 达高峰. 以后逐渐下降, 在 24 h 时间点上测 12.5, 25, 50 mg/kg 羟喜诱发微核的作用. 结果均为阳性并呈现较好的剂量-反应关系. 12.5 mg/kg 组微核率已达 19.8 ± 2.5%. 与对照组 2.8 ± 1.3% 比较, 按标准表⁽⁶⁾两组差别非常显著, 结果见 Tab 2.

胎肝血与母鼠骨髓微核试验 孕鼠于 d 15 im HC 25 mg/kg 后 16 h 胎肝血的微核率

Tab 1. Chromosome aberration test of Chinese hamster ovary cell line for 10-hydroxycamptothecin (HC), mitomycin C (MMC), cyclophosphamide (CPA). b: break, f: fragmentation, g: gap, p: polyploid, r: ring, t: translocation, o: other aberrations.

Drug	Concn (μg/ml)	S ₀	Time (h)	Chromosome aberrations Type	%	Scale*
MMC	0.2	-	24	fbortp	42	++
CPA	20	+	24	fbortp	76	+++
HC	0	-	24	gtp	3	-
		+	24	opt	4	-
	0.031	-	24	btpo	11	+
		+	24	btpo	28	++
	0.062	-	24	bfortp	38	++
		+	24	bfortp	42	++
0.125	-	24	bfortp	45	++	
	+	24	bfortp	49	++	
MMC	0.2	-	48	bfort	51	+++
HC	0	-	48	bp	4	-
		-	48	bfort	14	+
		-	48	bfortp	64	+++
		-	48	bfortp	83	+++

* Criterion⁽²⁾: -, negative (<4.9%); +, suspicions (5.0-9.9%); ++, positive (10.0-19.9%); +++, (20.0-49.9%); +++++ (>50%).

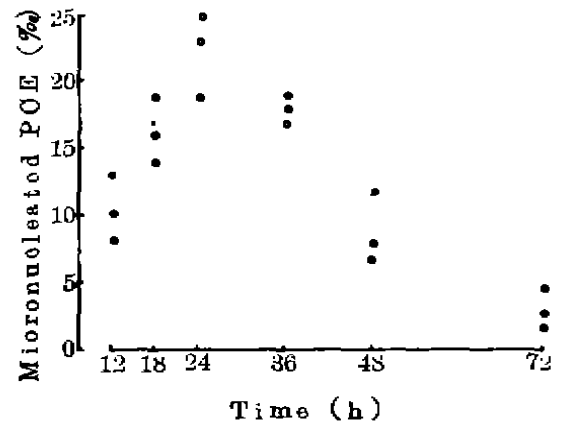


Fig 1. Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCE) in mouse bone marrow after ip 10-hydroxycamptothecin 25 mg/kg.

已达 36 ± 19%. 随后逐渐降低. 而母鼠骨髓微核率在 16 h 仅为 13 ± 8%, 24 h 达高峰 31 ±

Tab 3. Micronucleus frequency in maternal and fetal polychromatic erythrocytes (PCE) after im 10-hydroxycamptothecin (HC). Number of dams and fetuses in parantheses. $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs Saline.

Drug	Dose (mg/kg)	Time after im drug(h)	Maternal bone-marrow		Fetal liver	
			MNPCE/PCE	%	MNPCE/PCE	%
Saline		24	5 / 5109(5)	1.0 ± 0.8	24 / 16600(16)	1.5 ± 1.4
HC	25	16	68 / 5176(5)	13 ± 8	676 / 18992(18)	36 ± 19***
		24	165 / 5349(5)	31 ± 10	328 / 23050(22)	14 ± 5***
		36	126 / 5871(5)	22 ± 6	102 / 15411(15)	6.6 ± 1.8**
		48	19 / 5051(5)	4 ± 3	24 / 18463(18)	1.3 ± 0.9*
Cyclophosphamide	40	24	90 / 5202(5)	17 ± 6	464 / 18639(18)	25 ± 4***

Tab 2. Micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in mouse bone marrow at 24 h after ip 10-hydroxycamptothecin (HC). $n = 10$ mice, *** $P < 0.01$ vs Saline.

Drug	(mg/kg)	MNPCE/PCE	%($\bar{x} \pm SD$)
Saline		29 / 10101	2.8 ± 1.3
Hc	12.5	204 / 10283	19.8 ± 2.5***
	25	283 / 10330	27 ± 7**
	50	314 / 10226	31 ± 6**
Cyclophosphamide	80	521 / 10218	50 ± 16***

10‰。随后逐渐下降，胎肝血和骨髓对照组的微核率分别为 $1.5 \pm 1.4\%$ 和 $1.0 \pm 0.8\%$ 。由 Tab 3 可见胎肝血的微核率与母鼠骨髓相比，不仅高峰出现得早，而且峰值也大。

DISCUSSION

本文用多种实验方法都证实了 HC 的致突变作用。与 V_{79} 细胞 SCE 的结果⁽²⁾相比，在 CHO 细胞染色体畸变实验中所用 HC 浓度要低得多。这可能是不同细胞株、不同遗传终点测定敏感性不同之故。HC 在无 S_0 代谢活化系统的实验中可诱发培养的 CHO 细胞产生明显的染色体畸变，因此，它不需经肝微粒体酶活化而本身就具有直接的致突变作用。加入 S_0 可使低浓度 HC 的致突变作用有所加强，对中高浓度影响不大，可能 HC 的代谢物亦有致突变作用，但尚需证实。

骨髓 PCE 微核率高峰出现的时间与骨髓内细胞周期和药物分布到骨髓的时间有关。从

红细胞生成的周期来看⁽⁷⁾，注射 HC 18 h 微核率显著提高，表明羟基很快分布到骨髓而影响细胞的有丝分裂。据代谢资料报道⁽¹⁾，注射 HC 1 h 后骨髓浓度已很高，4 h 后浓度明显下降，骨髓微核率的时间曲线上升与下降可能与此分布和代谢有关的。

HC 可以通过胎盘屏障而诱发胎肝血微核的形成，与母鼠骨髓 PCE 微核率相比，胎肝血微核率出现得早，峰值也大，这可能因胎鼠血细胞周期较短而且直接接触肝脏中的药物及其代谢物之故，因此在评价药物的遗传毒性上胎肝血微核法越来越引起人们的重视^(5,8)。

REFERENCES

- 1 Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. Studies on the anticancerous action of 10-hydroxycamptothecin. *Natl Med J China* 1978; 58 : 598
- 2 Huang CC, Han CS, Yue XF, et al. Cytotoxicity and sister chromatid exchanges induced *in vitro* by six anticancer drugs developed in the People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* 1983, 71: 841
- 3 Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - a screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48 : 337
- 4 Yamamoto KI, Kikuchi Y. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei *Ibid* 1981; 90 : 163
- 5 Alaoui-Jamali MA, Rossignol G, Schuller HM, Castonguay A. Transplacental genotoxicity of a tobacco-specific *N*-nitrosamine, 4-(methyl-

nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, in Syrian golden hamster. *Ibid* 1989; 223 : 65
 6 Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Ibid* 1970; 9 : 527
 7 Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of

micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Ibid* 1983; 120 : 127
 8 Cole RJ, Taylor N, Cole J, Arlett CF. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Ibid* 1981; 80 : 141

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jul; 11 (4) : 381-384

维拉帕米增强博来霉素 A₅ 对体内外小鼠肉瘤 S-180 细胞的抗癌活性¹

何农高、张鸿卿、王瑞虹、杨新林、薛绍白(北京师范大学生物系, 北京 100875, 中国)

Enhancement of antitumor activity of bleomycin A₅ in mouse sarcoma 180 cells *in vitro* and *in vivo* by verapamil¹

HE Nong-Gao, ZHANG Hong-Qing, WANG Rui-Hong, YANG Xin-Lin, XUE Shao-Bai (Department of Biology Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

ABSTRACT Verapamil (Ver), a calcium influx blocker, enhanced the cytotoxicity of bleomycin A₅ (BLM) in cultured S-180 cells. IC₅₀ of BLM to the cells was about 2.6 μg/ml when the cells were treated with BLM alone, but when the cells were treated with BLM plus Ver 1, 5, 10 μg/ml, the IC₅₀ were 1/1.2, 1/5.2, 1/7.4 of the cells treated with BLM alone, respectively. In colony test, the survival fractions of the cells treated with BLM 20, 60, 100 μg/ml plus Ver 60 μg/ml were 1/7, 1/8, 1/11 of the cells treated with BLM alone, respectively. Ver enhanced the growth inhibitory actions of BLM in mice bearing S-180 sarcoma by 60% or over. The mean survival time of the mice bearing S-180 ascites sarcoma treated with BLM plus Ver was prolonged 21% from that of the mice treated with BLM alone. The results suggest that Ver may be used clinically as an antitumor enhancer of BLM.

KEY WORDS verapamil; bleomycins; sarcoma 180; cultured tumor cells; combination drug therapy

摘要 无毒剂量的维拉帕米(10 μg/ml)与低浓度的博来霉素 A₅(BLM, 0.37 μg/ml)合用,可使 BLM 抑制小鼠肉瘤 S-180 细胞增殖的作用比单独应用 BLM 增强 7.4 倍,使 BLM 对细胞的毒性增强 11 倍。维拉帕米 40 mg/kg 使 BLM 5mg/kg 的抑瘤效应增强 60% 以上,联合治疗的 S-180 腹水小鼠存活时间比单独用 BLM 5mg/kg 延长 21%。以上结果提示维拉帕米在临床有可能提高 BLM 的治癌效果。

关键词 维拉帕米; 博来霉素类; 肉瘤-180; 培养肿瘤细胞; 药物联合治疗

BLM 对头颈部鳞癌、宫颈癌和乳腺癌有较好的疗效,并具有不抑制机体免疫和造血功能的特点。但长期使用易产生肺毒性⁽¹⁾; 体外培养的肿瘤细胞在很短时间内就能对博来霉素产生抗性⁽²⁾。因此,如何减轻肺毒性,克服细胞的抗药性,充分发挥 BLM 的抗肿瘤作用,是该药临床应用中急待解决的问题。钙拮抗剂维拉帕米(verapamil, Ver)能增强长春新碱、阿霉素等抗癌药物的细胞毒性和治疗效果。对已具有抗药性的癌细胞,这种增强作用特别强^(3,4)。本文目的在于验证维拉帕米是否也能增强 BLM 的抗癌活性,以期可能将维拉帕米作为一种化疗增效剂用于 BLM 的临床治疗。

MATERIALS AND METHODS

盐酸 Ver(Sigma 公司产品), BLM 为天津河北制药厂生产,系无铜精制品。两种药品均用磷酸缓冲液配制,过滤除菌。

Received 1989 Jul 17 Accepted 1990 Apr 19

¹Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 9388002