

目的: 研究高血压大鼠(SHR)脑和胸髓中苯环利定受体密度变化与高血压发生的关系。
方法: 4, 8, 12, 16周大鼠中枢中³H]Phe 标记的苯环利定受体密度用放射自显影法检测。
结果: 高血压稳定期(12, 16周), SHR 海马和胸髓背角中苯环利定受体明显少于非高血压大鼠(WKY); 而血压升高前, 4周的 SHR 则相

反: 8周血压开始上升时, SHR 海马苯环利定受体增加, 而在背角无差别。
结论: 苯环利定受体可能参与了 SHR 的发病过程。

关键词 苯环利定受体; 高血压; 放射自显影术; 近交 SHR 大鼠; 近交 WKY 大鼠

61-64



12

双香豆素对癌细胞的光敏反应及二乙基二硫代氨基甲酸钠的增敏作用¹

周秀芳, 杨宣武², 郑荣梁² (兰州大学生物系, 兰州 730000, 中国)

R965

Photosensitization of dicoumarol on tumor cells and enhancement by sodium diethyldithiocarbamate¹

ZHOU Xiu-Fang, YANG Xuan-Wu, ZHENG Rong-Liang² (*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*)

AIM: To study the photosensitization of dicoumarol (Dic) on tumor cells and any effect by sodium diethyldithiocarbamate (DDC).

RESULTS: Dic, 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration-dependently inhibited the DNA synthesis (81 % - 93 %) and increased the mortality (50 % - 70.4 %) of ascitic hepatoma (Hep A) cells exposed in light. These 2 indices were changed slightly by Dic alone even in non-illuminating group. DDC enhanced the photosensitization of Dic group.

CONCLUSION: Photosensitization of Dic showed strong antitumor activities against Hep A cells. The mortality of Hep A and inhi-

bition of the DNA synthesis in Dic-DDC-light group significantly stronger than in Dic-light group. Photosensitization of Dic was not due to $^1\text{O}_2$ and OH^\cdot , but closely related to O_2^- and H_2O_2 .

KEY WORDS bishydroxycoumarin; diethyldithiocarbamate; photosensitizing agents; free radicals; neoplasm DNA

A 目的: 研究双香豆素(Dic)对肿瘤细胞的光敏反应及二乙基二硫代氨基甲酸钠的增敏作用。
结果: Dic 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 光敏反应使腹水型肝癌细胞(Hep A)死亡率增加(50 % - 70.4 %), 照光组始终高于避光组30 %左右。照光组细胞 DNA 合成抑制率(81 % - 93 %)明显高于避光组(19 % - 53 %), 且有浓度依赖性。避光组 Dic 对细胞也有轻微的损伤。
结论: Dic 光敏反应对 Hep A 细胞有较强抗肿瘤活性, DDC 能增强 Dic 对细胞的光敏杀伤作用。Dic-DDC 照光组细胞死亡率及 DNA 合成的抑制率比单独的 Dic 照光组明显增高。Dic 光敏反应与 $^1\text{O}_2$ 和 OH^\cdot 无关, 而与 H_2O_2 与 O_2^- 密切相关。

¹Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No 38970238.

²To whom correspondence should be addressed.

Received 1993-11-05

Accepted 1994-05-31

“关键词在下页”

关键词 双香豆素; 二乙基二硫代氨基甲酸酯; 光敏剂; 自由基; 肿瘤脱氧核糖核酸

双香豆素是四大类光敏剂之一, 在自然界腐败的植物中香豆素可变成双香豆素(dicoumarol, Dic)又名败坏翘摇素, 它在体外能抑制艾氏腹水癌(EAC)细胞的增殖, 主要通过抑制核酸的合成, Dic通过氧化磷酸化与呼吸链的解耦联作用而产生超氧阴离子自由基(O_2^-), 并进而使线粒体膜胀大和破坏^[1]。 O_2^- 是光敏杀伤的因素之一, 因为超氧化物歧化酶(SOD)是 O_2^- 的高效清除剂, 可以设想如果能抑制癌细胞中的SOD活性, 则 O_2^- 将可以较多地积累, 从而有利于发挥双香豆素的抗癌作用。 我们已证实二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)能抑制SOD活性^[2], 不仅如此, DDC还是辐射增敏剂^[3], DDC本身能抑制癌细胞生长^[2], 据此, 我们推测如果将Dic^[4]与DDC^[2]合用, 将对抑制癌细胞的生长起到协同作用。

MATERIALS AND METHODS

试剂 双香豆素(AR, Sigma)用NaOH 10 mmol·L⁻¹配成4 mmol·L⁻¹溶液。 二乙基二硫代氨基甲酸钠(sodium diethyldithiocarbamate, DDC, AR, 北京化工厂)配成1 mmol·L⁻¹溶液。 氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT, AR, 上海前进试剂厂)配成0.5 mmol·L⁻¹溶液。 SOD(superoxide dismutase, AR, 甘肃夏河生化试剂厂)配成2 g·L⁻¹溶液。 过氧化氢酶(catalase, CAT, AR, Sigma)配成1 g·L⁻¹溶液。 甲酸钠(sodium formate, AR, 北京化工厂)配成10 mmol·L⁻¹溶液。 甘露醇(mannitol, AR, 成都化学试剂厂)配成10 mmol·L⁻¹溶液。 叠氮钠(sodium azide, CR, 上海化学试剂厂)配成10 mmol·L⁻¹溶液。 以上试剂均用灭菌三蒸水配制。 β -胡萝卜素(β -carotene, AR, Fluke)用1,2-丙二醇配成1 mmol·L⁻¹。

光源 1000 W 碘钨灯, 光距37 cm, 用水(厚16 cm)隔热, 九五料玻璃厚5 mm, 室温20℃左右, 光强度 1.0×10^3 lx, 最大吸收波长470 nm。 避光组在细胞瓶外包一层黑纸。

DNA合成的测定 将昆明种小鼠腹水肝癌细胞(Hep A) 1×10^5 /瓶, 培养于含20%小牛血清的RPMI-1640培养液中, pH 7.2, 加青霉素 10^5 IU·L⁻¹及链霉素 100 mg·L⁻¹, 置37℃, CO₂恒温箱内培养20 h后加Dic, 由于Dic溶于碱性溶液, 所以须先加入NaOH (0.3, 0.2, 0.1 mmol·L⁻¹)以增加培养液pH值^[1](加NaOH后pH不超过7.5), 再分别加入(40, 80, 120 μ mol·L⁻¹) Dic, 温育1 h后照光10 min, 照光后立即加入 [³H]脱氧胸苷([³H]deoxythymidine, [³H]TdR, 上海原子核研究所, 1036 TBq·mol⁻¹), 终浓度为37 MBq·L⁻¹, 24 h后收获细胞, 用生理盐水洗两次, 洗去Dic, 干燥后加HClO₄和H₂O₂各1滴, 在80℃消化40 min, 加闪烁液置FJ-2100液体闪烁仪测定放射性。

细胞死亡率的测定 将照光后24 h的细胞用台盼蓝(0.5%)染色, 细胞计数。

O_2^- 的测定 O_2^- 与NBT反应产生蓝色的甲腈, λ_{max} 560 nm。 取Dic (4 mmol·L⁻¹) 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ml, 分别加入NBT (0.5 mmol·L⁻¹) 0.5 ml, 用NaOH (10 mmol·L⁻¹) 补充至3 ml, 照光20 min, 照光后用UV-120-02分光光度计测定 $A_{560 nm}$ 。

RESULTS

Dic的光敏反应 Dic作用1 h, 照光10 min, 无论照光或避光, 细胞均有死亡, 说明Dic本身对细胞有一定的损伤作用, 但照光组细胞死亡率始终高于避光组30%左右, 照光组细胞DNA合成抑制率(81%—93%)明显高于避光组(19%—53%) ($P < 0.01$, Fig 1), 且有浓度依赖性, 溶剂NaOH对细胞的毒害作用与对照组相近, 其死亡率均在0.1%以下。

DDC增强Dic的光敏反应 单独的DDC组(4.4 mg·L⁻¹)无论照光或避光对细胞DNA合成抑制及细胞死亡率均有一定的作用, 照光组死亡率在10%左右, 避光组在5%以下, 而Dic-DDC照光组比Dic照光组的DNA合成抑制及细胞死亡率明显增高($P < 0.01$), 说明DDC有增强Dic光敏杀癌的效果。 在避光条件下, Dic-DDC组比单独的Dic组的死亡率及

DNA 合成的抑制也有一定的增加, 因为 DDC 本身对癌细胞增殖率有一定抑制作用 (Fig 1).

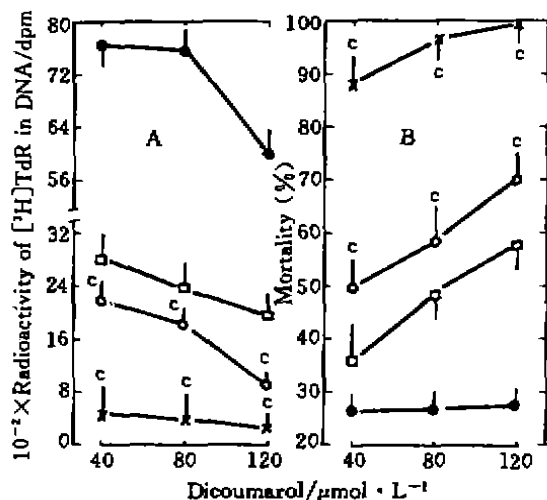


Fig 1. $[^3\text{H}]\text{Tdr}$ incorporation into DNA and mortality of ascitic hepatoma cells by dicoumarol (Dic) and the enhancement by sodium diethyldithiocarbamate (DDC). (○) Dic-light, (●) Dic-dark, (∨) Dic-DDC-light, (□) Dic-DDC-dark. $n=6$, $\bar{x} \pm s$, $^*P < 0.01$ vs dark.

Dic 光敏反应中的 O_2^- 的产生 将不同浓度的 Dic 分别加入 NBT 溶液, 照光 20 min, 有蓝色的甲产生, 而避光组却没有, 加 SOD 后的照光组也没有, 说明 Dic 光敏反应中产生了 O_2^- 。照光组 $A_{560 \text{ nm}}$ 随 Dic 浓度的增加而增加。无论有无 SOD 或 DDC, 各避光组之间 A 差异不明显 ($P > 0.05$), 照光组与避光组之间 A 差异却极显著 ($P < 0.01$, Fig 2).

DDC 使 Dic 光敏反应中 O_2^- 的积累增多 DDC 是 SOD 的抑制剂^[3], 而 SOD 又是 O_2^- 的清除剂, 在 Dic-SOD 组中加入 DDC, 然后照光, A 明显高于 DIC 照光组和 Dic-SOD 照光组 ($P < 0.01$), 证明 DDC 抑制了 SOD 活性, 使 Dic 光敏反应中产生的 O_2^- 不被立刻清除, 进一步证明 Dic 光敏反应中确有 O_2^- 产生 (Fig 2).

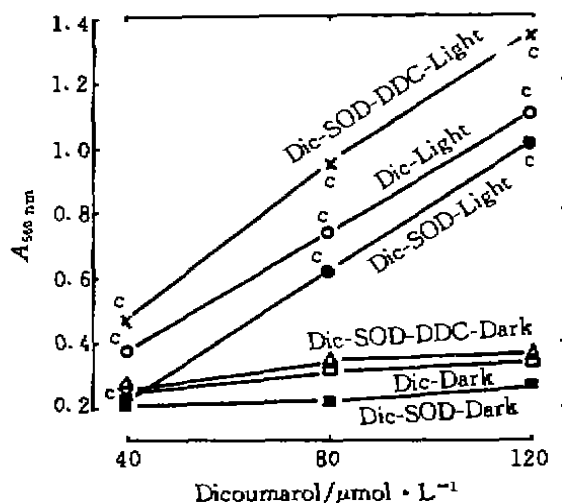


Fig 2. Effect of DDC on O_2^- generation during photosensitization of Dic. $n=6$, $\bar{x} \pm s$, $^*P < 0.01$ vs dark.

Dic 光敏反应机制 β -胡萝卜素, NaN_3 , 甘露醇, 甲酸钠, SOD 和 CAT 分别是 $^1\text{O}_2$, OH^\cdot , O_2^- 和 H_2O_2 的清除剂^[6,7]。将 β -胡萝卜素, NaN_3 , 甘露醇和甲酸钠分别与已加入 Dic 的细胞温育 1 h 后照光 10 min, 照光后 24 h 未观察到它们对细胞有任何保护作用 (Tab 1), 说明 Dic 光敏反应不是 $^1\text{O}_2$ 与 OH^\cdot 所致, 只有在加入 Dic 的同时, 加入 SOD 和 CAT 后, 才有明显的保护作用 (Tab 1), 可见 Dic 光敏反应与 O_2^- 和 H_2O_2 有密切关系。

DISCUSSION

本文首次对双香豆素 (Dic) 光敏反应及其机制以及 DDC 对增强 Dic 光敏杀癌的效果进行了探讨。实验结果肯定了 Dic 对肝癌腹水癌细胞 (Hep A) 有非常明显的光敏杀伤作用, 使细胞死亡率明显增加, 细胞 DNA 合成受到抑制, 而且避光组细胞也受到一定损伤, 说明 Dic 本身对细胞有一定的毒害作用。

二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDC) 本身对

Tab 1. Effect of free radical scavengers on photosensitization of dicoumarol by DNA synthesis in ascitic hepatoma cells of mice. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P>0.05$, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$ vs control.

Scavengers/ mg·L ⁻¹	10 ⁻² · Radioactivity of [³ H]TdR in DNA/dpm			
	Dic 40 μmol·L ⁻¹		Dic 80 μmol·L ⁻¹	
	Light	Dark	Light	Dark
Control	180±19	772±120	157±52	783±30
β-Carotene (21.5)	161±62 ^a	549±97	153±28 ^a	308±66
NaN ₃ (26)	236±12 ^b	596±136	174±91 ^a	488±117
Sodium Formate (27)	191±65 ^a	745±98	135±11 ^a	645±106
Mannitol (73)	187±87 ^a	819±119	124±19 ^a	631±75
SOD (80)	471±11 ^c	873±90	488±11 ^c	746±74
Inactive SOD (80)	154±35 ^a	809±98	125±10 ^a	549±133
Catalase (CAT) (40)	408±51 ^c	709±138	292±99 ^c	603±21
Inactive CAT (40)	119±27 ^a	632±151	123±34 ^a	638±22

癌细胞增殖率有一定抑制作用, 在 Dic-DDC 照光组比 Dic 照光组的 DNA 合成抑制及细胞死亡率均有明显增高, 说明 DDC 能增强 Dic 光敏杀癌的效果。

DDC 是 SOD 的抑制剂, 而 SOD 又是 O₂ 的清除剂, 在 Dic-SOD 组中加入 DDC, 然后照光, A 值明显高于 Dic 照光组和 Dic-SOD 照光组, 证明了 DDC 抑制了 SOD 活性, 使 Dic 光敏反应中产生的 O₂ 不被立刻清除, 进一步证明了 Dic 光敏反应中确有 O₂ 产生。

Dic 光敏反应不是 ¹O₂ 与 OH[·] 所致, 而与 O₂ 和 H₂O₂ 密切相关, 本实验双香豆素用了两个浓度, 但各种清除剂只用了一个浓度, 未在一定浓度范围内作全面考察, 有待改进设计。

REFERENCES

1 Lee JH, Dong WL, Hi SL. Effect of dicoumarin on the

activities of superoxide dismutase and ATPase in the rat tissues. *Chung-Ang J Med* 1987; **12**: 55-64.

2 Zheng RL, Lesko SA, Ts'o POP. Toxicity of diethyldithiocarbamate on tumor cells with reference to superoxide dismutase. *Acta Biochim Biophys Sin* 1984; **16**: 585-8.

3 Zheng RL, Lesko SA, Ts'o POP. Biphasic toxicity of diethyl-dithiocarbamate to tumor cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 1984; **16**: 558-63.

4 Zhou XF. Photosensitization of dicoumarin on DNA synthesis in tumor cells and generation of superoxide. *J Lanzhou Univ* 1992; **28** (3): 136-9.

5 Ponti V, Dianzani MU, Cheeseman KJ, Slater TF. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem Biol Interact* 1978; **23**: 281-91.

6 Weitzman SA, Stossel TP. Effects of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis. *J Immunol* 1982; **128**: 2770-2.

7 Li YX, Fang YZ, Huang SM. Studies on the NAD(P)H photooxidation sensitized by hematoporphyrin derivative. *Acta Biophys Sin* 1985; **1**: 257-63.