

vasopressin on avoidance behaviour and hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuropharmacology* 1978; 17 : 239-47.

7 Kovács GL, Bohus B, Versteeg DHG, Kloet ER de, Wied D de. Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbicmidbrain structures. *Brain Res* 1979; 175 : 303.

8 Bures J, Petrán M, Zachar J, editors. *Electrophysiological methods in biological research 1960*. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1960: 426-67.

9 Burbach JPH, Bohus B, Kovács GL, van Nispen JW, Greven HM, de Wied D. Oxytocin is a precursor of potent behaviourally active neuropeptides. *Eur J Pharmacol* 1983; 94: 125-31.

10 Burbach JPH, Lebouille JLM. Proteolytic conversion of arginine-vasopressin and oxytocin in brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 1983; 258 : 1487-94.

11 de Wied D, Gaffori O, Burbach JPH, Kovács GL, van Ree JM. Structure activity relationship studies with C-terminal fragments of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviours of rats. *Pharmacol Exp Ther* 1987; 241 : 268-74.

12 Bohus B, Kovács GL, de Wied D. Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Res* 1978; 157 : 414-7.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 May; 13 (3) : 276-278

4-(4''-(2'',2'',6'',6''-四甲基哌啶氮氧自由基)氨基)-4'-去甲基表鬼臼毒 L7712 细胞的核酸、蛋白质及 DNA 链的影响

何小庆¹、张培楼、田 瑄²、李景新²

(兰州医学院药理教研室, ²兰州大学应用有机化学实验室, 兰州 730000, 中国)

Effects of 4-(4''-(2'',2'',6'',6''-tetramethyl-1''-piperidinyloxy)amino)-4'-demethylepipodophyllotoxin on nucleic acids, proteins, and DNA strand of L7712 cells in vitro

HE Xiao-Qing¹, ZHANG Pei-Yan, TIAN Xuan², LI Jin-Xin²
(Department of Pharmacology, Lanzhou Medical College; ²Applied Organic Chemistry Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT The antitumor activity of GP-7, a new spin-labeled epipodophyllotoxin, was studied by liquid scintillation spectrometry. There were many similarities between GP-7 and etoposide. Both GP-7

and etoposide inhibited the incorporation [³H]TdR, [³H]UR, and [³H]Leu into DNA, RNA and protein synthesis in leukemia 7712 cells. The inhibition correlated with drug concentration and duration. IC₅₀ of GP-7 and etoposide on DNA synthesis at 24 h were 0.21 and 0.37 μg · mL⁻¹, respectively. The inhibition of GP-7 or etoposide on DNA synthesis retained even after the drug were washed out for 24 h. GP-7 and etoposide caused DNA single-strand breaks, with a well concentration-response relationship. These data suggest that the inhibition of DNA synthesis by GP-7 or etoposide is likely due to the damage of DNA template and breaking single-strand DNA.

KEY WORDS podophyllotoxin; free radical; leukemia L7712; thymidine; uridine; leucine; single-stranded DNA; etoposide

提要 用液体闪烁计数法对 GP-7 的抗肿瘤作用

Received 1990 Nov 26 Accepted 1991 Dec 27
¹ Now in Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China.

研究, 发现它与鬼臼乙叉甙(etoposide)很相似, 均能显著抑制 $[^3\text{H}]\text{TdR}$, $[^3\text{H}]\text{UR}$, $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 参入小鼠白血病 L7712 抑制作用与浓度及时间呈正相关。GP-7, etoposide 对 DNA 合成的 IC_{50} 分别为 0.21, $0.15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。两者均可引起 DNA 单链断裂。这提示其抗肿瘤作用可能与造成肿瘤细胞 DNA 单链断裂, 损伤 DNA 模板有关。

关键词 鬼臼毒素; 自由基; 白血病 L7712; 胸苷; 胸腺氨酸; 单链 DNA; 鬼臼乙叉甙

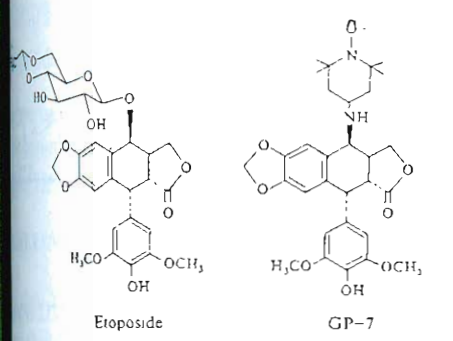
鬼臼毒素(podophyllotoxin)是小檗科鬼臼属植物中具有抗肿瘤活性的有效成分。由于其毒性太大而进行了一系列结构改造。4-(4''-2,6,6''-四甲基哌啶氮氧自由基)氨基)-1-去甲基表鬼臼毒(GP-7)是鬼臼毒类的新衍生物⁽¹⁾, 结构与临床用药鬼臼乙叉甙相似。药理学证明, 对体外培养及小鼠移植性肿瘤生长均有较强抑制作用, 且毒性较鬼臼乙叉甙低, 可降低有丝分裂指数, 对体外微管蛋白聚合解聚无影响^(1,2)。本实验用液闪技术, 探讨 GP-7 对细胞大分子合成及 DNA 链损伤方面探讨 GP-7 抗肿瘤作用及机制。

溶解稀释。 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ ($999 \text{ TBq} \cdot \text{mol}^{-1}$), $[^3\text{H}]\text{UR}$ ($724 \text{ TBq} \cdot \text{mol}^{-1}$), $[^3\text{H}]\text{Leu}$ ($2.96 \text{ PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$)均为上海原子核研究所产品。针头滤器, 混合纤维树脂微孔滤膜(直径 25 mm, 孔径 $1.2 \mu\text{m}$)均为上海医药工业研究院产品, 微量输液器 WSQ-A 型由江苏沙洲实验仪器厂出品。

培养基 RPMI-1640 培养基(日本制药株式会社产品)内含 20% 小牛血清, 青霉素 $100 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

METHODS AND RESULTS

GP-7 和 etoposide 对 DNA, RNA 和蛋白质合成的影响⁽⁴⁾ 将 L7712 细胞用 RPMI-1640 培养液配成 $2 \times 10^5 / \text{ml}$ 悬液, 分装成每瓶 5 ml, 置 37°C 温育 14 h 后随机分组, 各组加入终浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 GP-7 或 etoposide, 对照组加相应溶剂, 并立即加入 $0.01 \text{ ml } [^3\text{H}]\text{TdR}$, $[^3\text{H}]\text{UR}$ 或 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 使成 $37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$, 37°C 继续培育, 分别于 3, 6, 12, 24 h 取各时相细胞, 离心、洗涤、消化, 置 FJ-2100 型自动液闪计数仪测每分钟脉冲数。得到 GP-7 和 etoposide 对 DNA, RNA 和蛋白质合成的动态曲线(Fig 1)。GP-7 和



MATERIALS

细胞 无菌取接种于 615 近交系小鼠白血病 L7712 细胞⁽³⁾(上海医药工业研究... 生理盐水洗 1 次, 计数配成所需浓度。
药品与器材 GP-7 由兰州大学化学系... 提供, etoposide 是北京医药工业研究院... 两者均用灭菌二甲基亚砷 (DMSO)

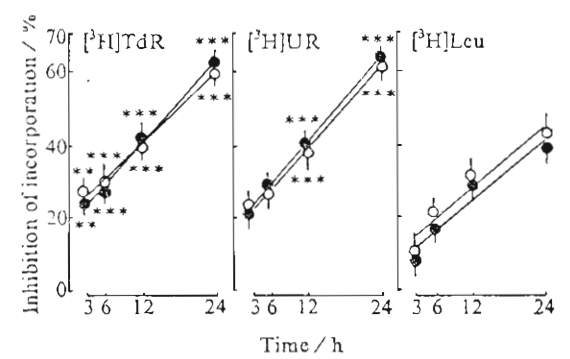


Fig 1. Inhibition of GP-7 (●) and etoposide (○) ($5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) on $[^3\text{H}]\text{TdR}$, $[^3\text{H}]\text{UR}$, and $[^3\text{H}]\text{Leu}$ incorporation into mice leukemia 7712 cells in vitro. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs vehicle.**

etoposide $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 24 h 对 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入抑制率分别为 61.0%, 61.8% ($P < 0.01$).

对 L7712 细胞 DNA 合成抑制的 IC_{50} 细胞培养方法同上. 给药组加入不同剂量的 GP-7 或 etoposide 对照组加相应溶剂, 同上法加 $[^3\text{H}]\text{TdR}$, 37°C 温育 24 h 后测 cpm. 结果 GP-7 和 etoposide 对 DNA 合成抑制的 IC_{50} 分别为 0.21 和 $0.37 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($P < 0.01$).

GP-7 与 etoposide 对 L7712 细胞合成的后作用 细胞悬液的分装与预培养同上. 分别加入 GP-7, etoposide 使成终浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 对照组加相应溶剂, 37°C 温育 11 h, 生理盐水洗涤 2 次, 加入新鲜培养液, 再分别温育 0, 1, 2, 3 h, 加入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ $37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$, 均再培育 40 min, 按上法测 cpm. 比较各时相实验组与对照组平均 cpm 的相对参入率, (Fig 2), 可见将 GP-7 和

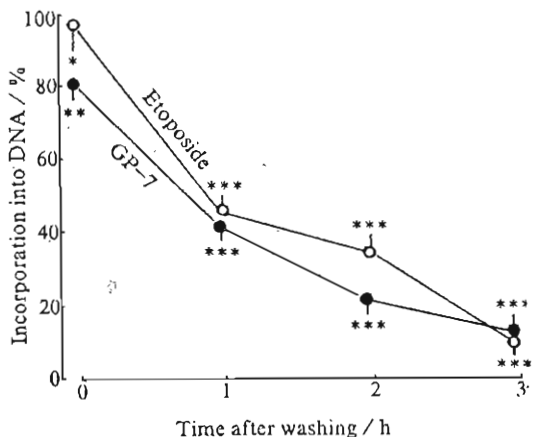


Fig 2. After-effect of GP-7 and etoposide ($5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) on DNA synthesis of mice leukemia 7712 cells. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs vehicle.

etoposide 清洗后, 癌细胞 DNA 合成是继续随时间延长而下降, 说明 DNA 合成没有恢复, GP-7 的后抑制作用大于 etoposide.

GP-7, etoposide 对 DNA 单链断裂的影

响 采用章扬培改良的 Kohn 氏碱洗脱滤膜法⁽⁵⁾, 细胞制备与预培养同上, 加入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 使终放射性为 $11.1 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$, 标记 24 h, 随机分组, 给药组分别加入不同剂量的 GP-7, etoposide, 对照组加入相应溶剂, 在 37°C 温育 1 h 后取出细胞悬液置 $0-4^\circ\text{C}$ 备用. 随依法进行碱洗脱. 滤膜处理及液闪计数.

膜上 DNA 残留率 $R = \frac{\Sigma M \cdot (\Sigma M + \Sigma E)}{\Sigma M + \Sigma E} \times 100\%$. ΣM : 膜上 DNA 的 cpm; ΣE : 全部收集的洗脱液中 cpm 之和.

DNA 断裂越多, 膜上 DNA 残留率 R 越低 (Fig 3). GP-7, etoposide 相近, 随剂量的增加, 膜上 DNA 残留减少, 两者呈直线相关. GP-7 与 etoposide 的曲线基本一致, 直线回归方程 GP-7: $\hat{Y} = 54.92 - 14.08 \lg X$, $r = -0.9909$; etoposide: $\hat{Y} = 54.70 - 15.25 \lg X$, $r = -0.9854$.

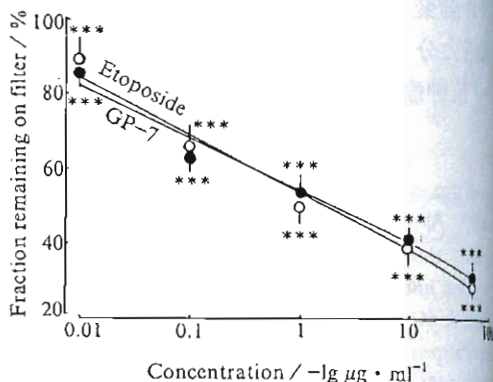


Fig 3. Alkaline elution of DNA from L7712 cells exposed to GP-7 (●) and etoposide (○) for 11 h. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.01$ vs vehicle.

DISCUSSION

TdR, UR 和 Leu 分别是 DNA, RNA 和蛋白质合成的前身物质, 它们的参入率可反映细胞的代谢活力. GP-7, etoposide 能显著抑制这些前身物质参入小鼠白血病 L7712 细胞, 故可认为药物对癌细胞的增殖能力有

制作用。其 IC_{50} 分别为: GP-7 $0.21 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, etoposide $0.37 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。从体外实验⁽⁶⁾看, GP-7, etoposide 均属非常有抗癌作用的药物。

报道 etoposide 等 4'-去甲基表鬼臼毒对肿瘤细胞有细胞毒作用, 抗肿瘤活性是通过 DNA topoisomerase II 介导引起 DNA 链断裂而发生的⁽⁷⁾。另报道氮氧自由基可作为抗癌药物使其优先累积于肿瘤组织⁽⁸⁾, 并损伤 DNA。GP-7 是 4'-去甲基表鬼臼毒的氮氧自由基衍生物。实验发现其对 DNA, RNA 的作用较蛋白质强且出现早, 提示其作用部分在 DNA。洗去作用药物后, 对 DNA 的抑制作用仍不恢复, 提示对 DNA 的作用方式可类似模板损伤型⁽¹⁰⁾。用碱洗脱法直接证明这种损伤为 DNA 单链断裂, 这说明 GP-7 的抗癌作用与 etoposide 等 4'-去甲基表鬼臼毒的作用机制相似, 也是通过损伤 DNA 来完成, 而 GP-7 分子中引入的氮氧自由基对母体 4'-去甲基表鬼臼毒部分的作用影响不大, 只是对 DNA 模板损伤较 etoposide 似有增强作用。

ACKNOWLEDGMENTS 本实验工作得到兰州大学化学教研室郑荣梁教授、王肖葳副教授及张龙为精心指导。

REFERENCES

1. Zhang YZ, Wang YG, Li JX, Tian X, Jia ZP, Zhang PY. Anticancer drugs II. Synthesis and biological evaluation of spin labeled derivatives of etoposide. *Lif Sci* 1989; **45**: 2569-75.

2. Jia ZP, Zhang PY, Liang ZD, Wang YG, Chen YZ, Tian X. Antitumor activity of 4-(4''-(2'',2'',6'',6''-tetramethyl-1''-piperidinyoxy)amino)-4'-demethyl epipodophyllotoxin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 1990; **11**: 549-53.
3. Zhen S, Meng DM, Zhang YJ, Cheng HM, Yang JL, Pan RP. Laboratory studies on transplantable mouse leukemia L7712. *Tumor* 1982; **2**(1): 6-9.
4. Liu LS, Xiao XH, Zhang LD, Zheng RL, Wu FE, Zhu ZQ. Effects of anemodanin A on DNA, RNA, and protein of tumor cells *in vitro* and plasma cAMP in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1985; **6**: 192-4.
5. Zhang YP, Xu HY, Xia SX. r-Ray induced DNA single strand breaks and their repair in Chinese hamster cells with membrane filtration method. *Chin J Radiol Med Prot* 1983; **3**(5): 3-6.
6. Smith CG, Lummis WL, Grady JE. An improved tissue culture assay I. Methodology and cytotoxicity of anti-tumor agents. *Cancer Res* 1959; **19**: 843-6.
7. Ross W, Rowe T, Glisson B, Yalowich J, Liu L. Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res* 1984; **44**: 5857-60.
8. Sosnovsky G, Rao NUM, Li SW. In the search for new anticancer drugs. 19. A predictive design of *N,N',N'',N''',N''''*-tri-1,2-ethanediyolphosphoric triamide (TEPA) analogues. *J Med Chem* 1986; **29**: 2225-30.
9. Sinha BK, Cysky RL, Millar DB, Chignell CF. Synthesis and biological properties of some spin-labeled 9-aminoacridines. *J Med Chem* 1976; **19**: 994-8.
10. Painter RB. Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 1977; **265**: 650-1.