

474-477

福莫司汀对培养的 HL60 细胞 DNA 的损伤

R 979.1

寿江¹, 冯杏婉 (北京药理毒理研究所, 北京 100850, 中国)

R 73-351

DNA damage induced by fotemustine in cultured HL60 cells

SHOU Jiang¹, FENG Xing-Wan
(Institute of Pharmacology and Toxicology,
Beijing 100850, China)

KEY WORDS fotemustine; cross-linking reagents;
DNA damage; leukemia HL60; cultured tumor cells

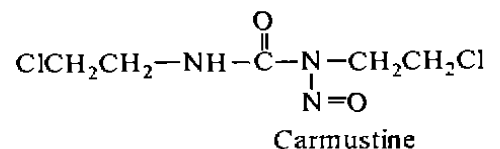
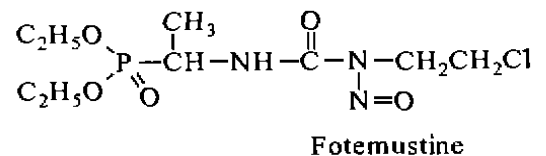
AIM: To detect DNA damage caused by fotemustine (Fot). **METHODS:** DNA damage in HL60 cells was evaluated by modified alkaline elution technique. DNA interstrand crosslink (ISC) and DNA-protein crosslink (DPC) were determined. Carmustine (Car) was used as control. Drug treatment time was 1 h. **RESULTS:** After treatment with Fot 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ISC and DPC index were 5.4 and 6.1 at 6 h, 2.7 and 1.2 at 12 h, respectively. ISC reached the maximum at about 6 h. For Fot 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ISC and DPC index at ISC peak time were 2.1 ± 0.9 and 3.55 ± 0.23 , 5.0 ± 0.5 and 7.7 ± 1.1 for Car 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Single strand break (SSB) was induced by Fot. **CONCLUSION:** Fot caused HL60 cell DNA ISC, DPC, and SSB. ISC was formed more quickly by Fot than that by Car.

关键词 福莫司汀; 交联试剂; DNA 损伤; 白血病 HL60; 培养的肿瘤细胞

目的: 检测福莫司汀(fotemustine, Fot)对 HL60 细胞 DNA 损伤作用。 **方法:** 改良的微孔滤膜碱洗脱技术。 细胞 DNA 链间交联(interstrand crosslink, ISC)和 DNA 蛋白质交联(DNA-protein crosslink, DPC)程度分别以 ISC 和 DPC 指数表示, 并与卡莫司汀(Carmustine, Car)进行比较。 药物作用时间 1 h。 **结果:** Fot ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 HL60 细胞后

6 h, ISC 和 DPC 指数分别为 5.4 和 6.1, 12 h 分别为 2.7 和 1.2。 Fot 的 ISC 高峰出现比 Car 早。 两种药物在相同浓度($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用后, 在形成 ISC 峰值时, Fot 引起的 ISC 和 DPC 指数分别为 2.1 ± 0.9 和 3.55 ± 0.23 , Car 分别为 5.0 ± 0.5 和 7.7 ± 1.1 。 **结论:** Fot 诱发 HL60 细胞 DNA 损伤; ISC、DPC 和 SSB, 并均呈药物剂量依赖性。 Fot 引起 ISC 的速度快于 Car

福莫司汀^[1] (fotemustine, (±)-diethyl[1-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]ethyl]phosphonate, Fot) 是含磷酸酯基团的氯乙基亚硝脲类药物。 动物实验^[2]及临床试验^[1,3,4]均证实它对多种肿瘤有效, 在临床对黑色素瘤及其脑转移的疗效更为明显^[5-7]。 有关 Fot 对肿瘤细胞 DNA 的损伤作用尚未见系统报道。 本文旨在了解 Fot 对 HL60 细胞 DNA 的损伤及其特点, 并以卡莫司汀(Carmustine, Car)^[8,9]为对照, 比较两种药物的 DNA 损伤特点。



MATERIALS AND METHODS

细胞 人早幼粒白血病细胞系 HL60 引自中国医学科学院药物研究所, 按常规培养。 实验前取指数生长期细胞, 以放射性比活度 $820 \text{ Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 标记 48 h, 然后在无 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 的培养液中继续培养 12 h 待用。

药物 Fot 为北京药理毒理研究所合成室合成的纯品, Car 为天津人民制药厂产品, 纯度 98%, 均为淡黄色粉末。 将二药以无水乙醇溶解, 4℃ 密封避光保存。 临

¹ Now in Department of Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Received 1995-05-30

Accepted 1996-05-04

用前以 RPMI-1640 液稀释。药物与细胞在无血清培养液中温育 1 h 后, 以 Hanks 液洗二次, 再培养或实验。

试剂 RPMI-1640 (Gibco), 小牛血清(北京放射医学研究所), $[^3\text{H}]\text{TdR}$ (中国科学院上海原子核研究所), 放射性比活度 $820 \text{ Bq} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。微孔滤膜的孔径 $1.2 \mu\text{m}$, $\text{O}25 \text{ mm}$ (上海医药工业研究院), 蛋白酶 K (Merck), 临用前以 2% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma) 溶液液配成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。四丁基氢氧化铵(上海试剂厂), 2% SDS 细胞溶胞液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 依地酸二钠 (disodium edetate) 0.025, 甘氨酸 100, SDS 69.3, pH 10。碱洗脱液: 依地酸 (edetate) $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 四丁基氢氧化铵 2%, SDS 0.1% (测 ISC, SSB 时加), pH 12.1-12.2。 ^{60}Co 源(北京放射医学研究所)。

改良的微孔滤膜碱洗脱^[10] 改良的步骤: 标记细胞 1×10^6 经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 线照射 (0°C) (测定 SSB 时此步省去) 后, 加到装有微孔滤膜的特制漏斗中 (0°C), 与冷 PBS 一起抽滤再加 2% SDS 5 mL 溶胞液, 以自然速度过滤。然后加蛋白酶 K 2 mL 溶液, 在暗条件下消化 30 min (测定总交联时此步省去)。放掉漏斗中的消化液后, 加入 20 mL 碱洗脱液。漏斗通过导管与八导蠕动泵 (Gilson) 相联, 在暗条件下恒速洗脱 7 h, 收集每小时的洗脱液。洗脱结束后, 滤膜加 HCl ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 mL, 在 70°C 消化 1 h, 以四丁基氢氧化铵 ($0.983 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 mL 中和, 加闪烁液 6 mL, 摇匀, 过夜, 测 dpm。取每小时洗脱液 1 mL, 以同样方式测 dpm。以 $[^3\text{H}]\text{DNA}$ 膜存留率 (R%) 计算 DNA 交联指数 (index)^[11], 并以后者代表交联的量。

$$R\% = \frac{\Sigma M}{\Sigma M + \Sigma E + \Sigma L} \times 100\%$$

ΣM : 膜上存留 dpm; ΣE : 碱洗脱液 dpm;

ΣL : 溶胞液 dpm。

DNA 链间交联指数 =

$$\frac{\lg(\text{加酶照射组 } R\% / \text{加酶对照组 } R\%)}{\lg(\text{药物加酶照射组 } R\% / \text{加酶对照组 } R\%)}$$

总交联指数 =

$$\frac{\lg(\text{不加酶照射组 } R\% / \text{加酶对照组 } R\%)}{\lg(\text{药物不加酶照射组 } R\% / \text{加酶对照组 } R\%)}$$

DNA-蛋白质交联指数 = 总交联指数 - ISC 指数

RESULTS

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 线照射剂量的确定 为测定 DNA 交联, 需选择一定剂量 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 线照射 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 标记细胞, 经洗脱后使 $[^3\text{H}]\text{DNA}$ 膜存留率在 20% 左右。本文选择 2, 4, 6, 8 和 10 Gy 剂量照射下分别进行碱洗脱。在 10 Gy 剂量下, 经 7 h 洗脱后 $[^3\text{H}]\text{DNA}$ 膜存留率在 20% 左右 (Fig 1A)。本文选择 10 Gy 为交联检测时的照射剂量。

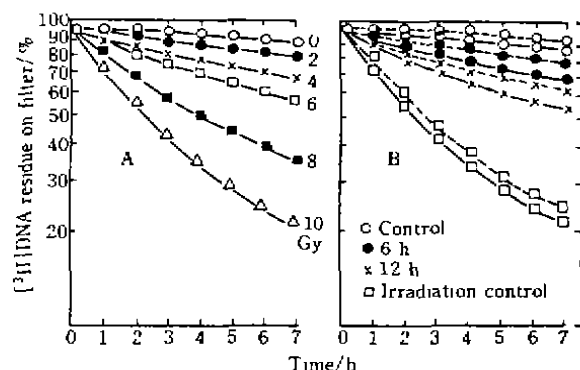


Fig 1. (A) Alkaline elution of HL60 cells labeled with $[^3\text{H}]\text{TdR}$ immediately after $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation 0-10 Gy. $n = 3$ duplicated experiments. (B) Alkaline elution of total DNA crosslink and interstrand crosslink (ISC) in HL60 cells at 6 h and 12 h after Fot 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ treatment with proteinase K (—) or without proteinase K (---). $n = 3$ experiments.

Fot 诱发 HL60 细胞 DNA 的 ISC 和 DPC 细胞经 Fot 作用后 6 h 和 12 h, 分别进行总交联和 ISC 测定。Fot 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用后 6 h 时的 ISC 和 DPC 指数, 分别为 5.4 和 6.1, 12 h 时的 ISC 和 DPC 指数分别为 2.7 和 1.2 (Fig 1B)。6 h 时的两类交联均高于 12 h, 提示 Fot 作用后 6 h, 12 h 均存在 ISC 和 DPC, 并且形成 ISC 的高峰时间在药物作用后 12 h 以前。

Fot 诱发 HL60 细胞 ISC 的动态过程 HL60 细胞经 Fot 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用后继续培养 0, 2, 6, 12, 24 和 48 h, 进行 ISC 测定, 并与 Car 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 平行比较。Fot 诱发 ISC 高峰时间在药物作用后 6 h, 明显比 Car 作用后形成 ISC 高峰时间 12 h 提前。两药在引起 ISC 中显示相似的动态过程: 先上升, 后下降 (Fig 2)。

Fot 诱发 HL60 细胞 ISC 和 DPC 的量-效关系 HL60 细胞经 Fot 100, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用后 6 h (Fot 诱发 ISC 高峰时间), ISC 和 DPC 指数均随剂量增加而递增 (Fig 3), 说明 DNA 交联的形成是 Fot 作用的基础。但在形成交联的程度上, 两药在相同浓度 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用下, 在形成 ISC 峰值时, Fot 的作用比 Car 轻。Fot 的 ISC 和 DPC 指数分别是 2.1 ± 0.9 和 3.55 ± 0.23 , 明显小于 Car 的 ISC 指数 5.0 ± 0.5 和 DPC 指数 7.7 ± 1.1 。

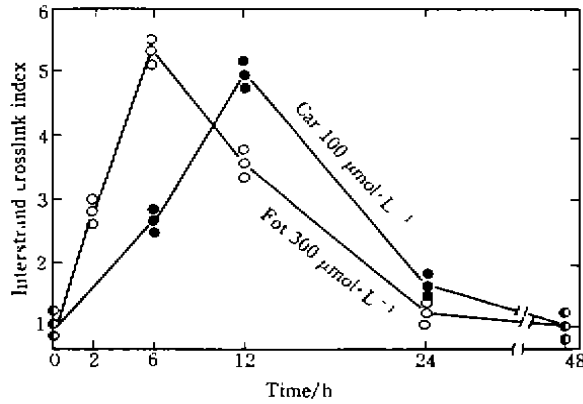


Fig 2. Kinetics of ISC in HL60 cells induced by Fot 300 μmol·L⁻¹ or Car 100 μmol·L⁻¹. n = 3 experiments.

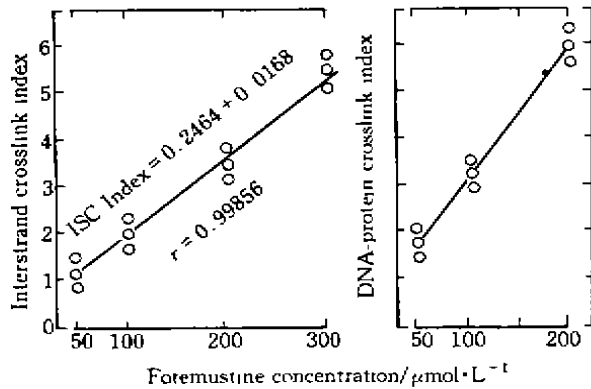


Fig 3. ISC index and DPC index 6 h after treatment with Fot in HL60 cells. n = 3 experiments, $\bar{x} \pm s$.

Fot 诱发 HL60 细胞 SSB 细胞经不同浓度的 Fot 作用 6 h 后, 立即进行碱洗脱。 [³H]DNA 膜存留率分别随着 Fot 剂量增加而下降, 说明 SSB 为剂量依赖性(Fig 4)。

DISCUSSION

氯乙基亚硝脲类药物与 DNA 形成 ISC 是由于药物分解产物氯乙基重氮盐与 DNA 通过二步反应机制完成的^[9,12], ISC 的形成是氯乙基亚硝脲类药物抗肿瘤作用的主要分子机制。本文观察到 Fot 诱发 ISC 生成量具有高度药物剂量依赖性, 推测 ISC 的形成是 Fot 抗肿瘤效应的主要分子机制之一。Fot 结构上连有的氨基-1-乙基磷酸基团 (amino-1-ethylphosphonic acid) 具有磷酸二乙酯结构, 增加药物分子膜透过性^[13]; 同时此结构又类似于自然界存在的丙氨酸, 使药物通过丙氨酸通

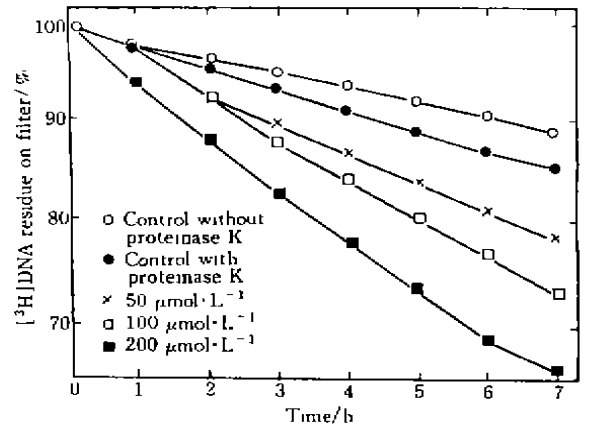


Fig 4. Alkaline elution of DNA SSB in HL60 cells 6 h after Fot treatment. n = 3 experiments.

道主动摄入细胞^[1]。本文结果表明 Fot 引起细胞 DNA 三种损伤: ISC, DPC 和 SSB。Fot 引起细胞 DNA 损伤的特点是在形成 ISC 的程度上, Fot 的作用明显比 Car 轻, 而 ISC 高峰时间则明显较 Car 提前, 说明 Fot 的细胞透过性较 Car 明显提高。

REFERENCES

- 1 Khayat D, Lokiec F, Bizzari J-P, Weil M, Meus L, Sellami M, et al. Phase I clinical study of the new amino acid-linked nitrosourea, S10036, administered on a weekly schedule. *Cancer Res* 1987; **47**: 6782-5
- 2 Filippeschi S, Colombo T, Bassani D, Francesco LD, Anoli P, D'Incalci M, et al. Antitumor activity of the novel nitrosourea S10036 in rodent tumors. *Anticancer Res* 1988; **8**: 1351-4
- 3 Lasset C, Merrouche Y, Negrier S, Rebattu P, Berille J, Bizzari J-P, et al. Phase II study of fotemustine as second-line treatment after failure of immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; **32**: 329-31
- 4 Fischel JL, Formento P, Berlion M, Berille J, Giovanni J, Bizzari J-P, et al. Sequence-dependent cytotoxic effects of the combination of a new nitrosourea, fotemustine, with 5-fluorouracil plus folinic acid. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; **28**: 448-54.
- 5 Jacquilat C, Khayat D, Banzet P, Weil M, Fumoleau P, Avril MF, et al. Final report of the french multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* 1990; **66**: 1873-8.
- 6 Schallreuter KU, Wenzel E, Brassow FW, Berger J, Breitbart EW, Teichmann W. Positive phase II study in the treatment of advanced malignant melanoma with fotemustine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; **29**: 85-7
- 7 Schallreuter KU, Wood JM, Mensing H, Breitbart EW. Local treatment of cutaneous and subcutaneous metastatic

- malignant melanoma with fotemustine
Cancer Chemother Pharmacol 1991; 29: 167-71
- 8 Buckner JC, Brown LD, Kugler JW, Cascino TL, Brook JE, Mailliard JA, *et al*. Phase II evaluation of recombinant interferon alpha and BCNU in recurrent glioma.
J Neurosurg 1995; 82: 430-5
- 9 Kohn KW. Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas
Cancer Res 1977; 37: 1450-4
- 10 Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, Friedman CA. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution.
Biochemistry 1976; 15: 4629-37
- 11 Teicher BA, Holden SA, Kelley MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, *et al*. Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to *cis*-diamminedichloroplatinum (II).
Cancer Res 1987; 47: 388-93
- 12 Erickson LC, Bradley MO, Ducore JM, Ewig RAG, Kohn KW. DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with anticancer nitrosoureas.
Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 467-71
- 13 Vistica DT. Cytotoxicity as an indicator for transport mechanism. Evidence that melphalan is transported by two leucine-preferring carrier systems in the L1210 murine leukemia cell.
Biochim Biophys Acta 1979; 550: 309-17.

477-480

BIBLID: ISSN 0253-9756

Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报

1996 Sep; 17 (5): 477-480

氯代斯阔任对 D₂ 自身受体反馈调控作用的阻滞¹

R F66

陈丽娟, 张雪翔, 郭新 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国) R P64

Blockade of (±)12-chloroscoulerine on feed-back regulation of dopamine D₂ autoreceptors

CHEN Li-Juan, ZHANG Xue-Xiang, GUO Xin
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

KEY WORDS (±)12-chloroscoulerine; berbines; levodopa; dopamine; autoreceptors; substantia nigra; corpus striatum

AIM: To verify whether (±)12-chloroscoulerine (CSL) is antagonist or agonist effect to D₂ autoreceptors. **METHODS:** The levodopa content accumulated in the rat striatum was measured by HPLC-ECD, and the DA neuron firing activity in the substantia nigra zona compacta (SNC) was recorded. **RESULTS:** The accumulated levodopa content induced by CSL 40 mg·kg⁻¹ was much more than that of 1,4-butyro-lactone (BL) group ($P < 0.01$). After ip injection of apomorphine (Apo) 5 mg·kg⁻¹, the levodopa content was decreased below that of BL group ($P < 0.05$). The Apo inhibition on levodopa content was

completely reversed by CSL (40 mg·kg⁻¹, ip) and then increased the levodopa content ($2.5 \pm 1.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) over that of Apo group ($0.7 \pm 0.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $P < 0.01$). In the electrophysiologic recording, Apo (15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, iv) induced the decrease of SNC DA cell firing rate nearly to zero. At the accumulated dose of CSL up to 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (iv), the inhibition of Apo was attenuated and the firing activity was restored to predrug level. **CONCLUSION:** CSL showed an antagonistic action, an action to D₂ autoreceptors.

关键词 (±)12-氯代斯阔任; 小檗碱类; 左旋多巴; 多巴胺; 自身受体; 黑质; 纹状体

目的: 研究氯代斯阔任[(±)12-chloroscoulerine, CSL]对 D₂ 自身受体是激动作用或阻滞作用 方法: 用 HPLC-ECD 检测大鼠纹状体内 levodopa 累积量, 观察对 levodopa 含量的影响; 并用电生理方法, 观察 CSL 对黑质致密区(SNC) DA 神经元放电活动的影响. 结果: CSL 使纹状体内 levodopa 累积量增加, CSL 40 mg·kg⁻¹ 时, levodopa 含量($5.1 \pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)为 BL 组的($1.8 \pm 1.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 2.8 倍($P < 0.01$) CSL 能翻转激动剂 Apomorphine (Apo)对 levodopa 含量的抑制, ip Apo 后, levodopa 含量($0.7 \pm 0.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)仅为

¹Supported by the National Natural Science Foundation of China. No 39130091 and the State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, No K016. Received 1995-07-10 Accepted 1996-02-15