

亚硝脲类药物对中国人 Mer⁻型肿瘤细胞的高特异治疗效果¹

章扬培, 贺涛, 陈建敏, 陈月能, 徐惠英, 范国才, 吴英

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京100850, 中国)

Specific curative effects of nitrosourea drugs on tumor cells with Mer⁻ phenotype in Chinese¹

ZHANG Yang-Pei, HE Tao, CHEN Jian-Min, CHEN Yue-Neng, XU Hui-Ying, FAN Guo-Cai, WU Ying
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase (O⁶-MT) activity and cellular sensitivity to nitrosourea drugs of 10 kinds of tumor cell strains derived from Chinese patients were measured by ³H radioactivity and colony-forming ability, respectively. The results *in vitro* showed that nimustine (Nim) 25 μg·ml⁻¹ and carmustine (Car) 20 μg·ml⁻¹ exhibited specific killing effects on Mer⁻ phenotype tumor cells characterized by low O⁶-MT activity. *In vivo* both Nim and Car (25 mg·kg⁻¹·wk⁻¹ × 4 wk, ip) had specific curative ability to Mer⁻ tumor cells implanted in nude mice. These findings suggested that assay of O⁶-MT activity in tumor biopsy could be used as a predictable guide to human tumor chemotherapy with nitrosourea compounds.

KEY WORDS nimustine; carmustine; antineoplastic agents; nitrosourea compounds; cultured tumor cells; methyltransferases; inbred BALB c mice

摘要 分析了10株中国人肿瘤细胞中 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O⁶-MT)活性及对亚硝基脲化合物的敏感性。体内体外实验都证明尼氮芥(nimustine, Nim)和卡氮芥(carmustine, Car)对 O⁶-MT 酶活性低的 Mer⁻型肿瘤细胞有很强的治疗效果。提示对肿瘤组织中 O⁶-MT 活性的分析可以作为使用亚硝基脲类药物对肿瘤化疗的预见性指标。

关键词 尼氮芥; 卡氮芥; 抗肿瘤药; 亚硝基脲化合物

Received 1991-02-05

Accepted 1992-12-21

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 38970824.

物; 培养的肿瘤细胞; 甲基转移酶; 近交 BALB c 小鼠

O⁶-甲基鸟嘌呤 NDA 甲基转移酶(O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, O⁶-MT)是一种修复 DNA 烷化损伤的酶。在抵御烷化剂所致的细胞突变和死亡中起重要作用^[1]。按此酶活性高低, 可把肿瘤细胞分为两种类型, 第一类 O⁶-MT 活性高, 称 Mer⁺型; 第二类 O⁶-MT 活性低, 为 Mer⁻型。尼氮芥(nimustine, Nim)能有效地杀死 Mer⁻型肿瘤细胞^[2]。我们曾观察到 Nim 对体外培养或移植到裸鼠体内的 Mer⁻型 HeLa MR 细胞有很强的杀伤作用^[3]。本文探讨 Nim 和卡氮芥(carmustine, Car)两种亚硝基脲类药物对中国人 Mer⁻型肿瘤细胞的治疗效果, 期望能以分析 O⁶-MT 酶活性为根据, 指导更合理地使用亚硝基脲类抗癌药物, 对 Mer⁻型肿瘤进行预见性化疗。

MATERIALS AND METHODS

细胞培养 10株中国人肿瘤细胞均在含10%新生牛血清的 DMEM medium 中培养, 37℃, 5% CO₂。10株细胞名称及其建株者是: (1) BT-325 脑多型胶质母细胞瘤细胞(北京神经外科研究所邵文利); (2) SMMC-7721 肝癌细胞(上海第二军医大学董荣春); (3) AGZY 83-a 肺腺癌细胞(鞍钢肿瘤防治所王玉利); (4) Bcap-37 乳腺腺样癌细胞(北京人民医院张嘉庆); (5) CNE-2 鼻咽癌细胞(中山医学院); (6) Cc801 宫颈癌细胞(中国医科院肿瘤医院鲍家驹); (7) HR-8348 直肠癌细胞(杭州肿瘤医院张宗显); (8) Tca-8113 舌鳞状细胞癌细胞(上海第九人民医院何荣根); (9) SGC-7901 胃腺癌细胞(上海第六人民医院林超鸿); (10) SHG-44 脑恶性胶质瘤细胞(苏州医学院杜子威)。标

准 Mer⁻型 HeLa S3 和 Mer⁻型 HeLa MR 人宫颈癌细胞由日本京都大学池水满生教授赠送。

药物 Nim, 日本 Sankyo 公司 Dr S Minato 赠送, 溶于三蒸水, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 用无血清 DMEM 液稀释到实验浓度。Car, 天津新华药厂产, 用无水乙醇溶解, 无血清 DMEM 液稀释, 乙醇浓度不超过 0.4%。药物均在 37°C 下与细胞接触 1 h。

细胞活存率测定 参考文献[4]进行。

O⁶-MT 酶活性测定 参考文献[3,5]进行。

裸鼠治疗实验 将 10⁷ 个处于指数生长期的人肿瘤细胞注射到 BALB c (nu-nu) 裸鼠背部皮下, 鼠重 15—20 g, 4—6 wk。30 只裸鼠分成 6 组, 每组 5 只。按照 O⁶-MT 酶活性测定结果, 在每只鼠的左腋皮下移植 O⁶-MT 活性低的肿瘤细胞 (HeLa MR 或 Cc801), 右腋皮下移植 O⁶-MT 活性高的肿瘤细胞 (HeLa S3 或 SMMC-7721)。肿瘤细胞植人裸鼠后, 每两天测量一次肿瘤的体积, $V = ab^2/2$ 。其中 a 为瘤长, b 为瘤宽。

RESULTS

肿瘤细胞对 Nim 的敏感性 经 Nim 处理后, 10 株细胞对 Nim 的敏感性不同 (Fig 1)。以细胞活存率为 10% 时所对应的 Nim 的浓度 D₁₀ (μg·ml⁻¹) 做为比较细胞敏感性的指标, 得出: SHG-44 对 Nim 最敏感, D₁₀ = 4.45, 细胞活存率低, 与 Mer⁻型的 HeLa MR (D₁₀ = 10.01) 相似。Tca-8113 (D₁₀ = 35.03) 和 Cc801

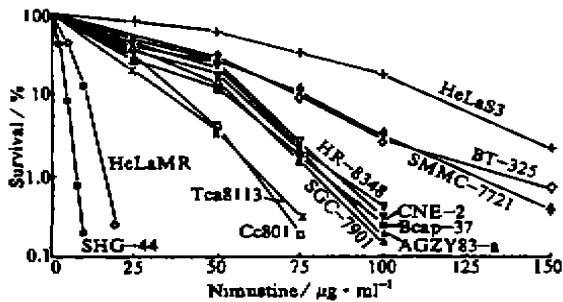


Fig 1. Lethal nimustine (Nim) sensitivity in 10 kinds of Chinese tumor cell strains measured by colony-forming ability. (○) HeLa MR; (●) SHG-44; (×) Tca8113; (□) Cc801; (■) Bcap-37; (△) SGC-7901; (▲) AGZY83-a; (▽) CNE-2; (▼) HR-8348; (◇) BT-325; (◆) SMMC-7721; (+) HeLa S3.

(D₁₀ = 38.36) 2 株细胞, 对 Nim 有一定敏感性。HR-8348 (D₁₀ = 58.38), Bcap-37 (D₁₀ = 52.26), AGZY83-a (D₁₀ = 56.71), SGC-7901 (D₁₀ = 53.38), CNE-2 (D₁₀ = 60.60) 等 5 株细胞对 Nim 不敏感。BT-325 (D₁₀ = 77.28) 和 SMMC-7721 (D₁₀ = 73.95) 2 株细胞对 Nim 有一定抗性, 即使受较高浓度 Nim 处理后, 细胞活存率仍然较高, 接近标准的 Mer⁺型 HeLa S3 细胞 (D₁₀ = 112.30)。

肿瘤细胞对 Car 的敏感性 5 株细胞对 Car 敏感性高低的顺序为 SHG-44 > Cc801 > Tca-8113 > HR-8348 > SMMC-7721 (Fig 2), 与对 Nim 敏感性的顺序一致。

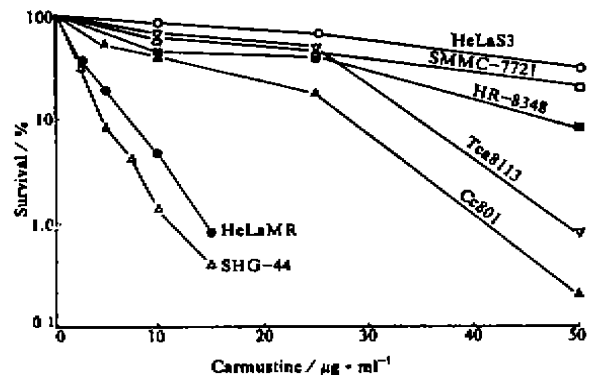


Fig 2. Lethal carmustine (Car) sensitivity in 5 kinds of Chinese tumor cell strains measured by colony-forming ability. (○) HeLa S3; (●) HeLa MR; (□) SMMC-7721; (■) HR-8348; (△) SHG-44; (▲) Cc801; (▽) Tca8113.

3 株肿瘤细胞的 O⁶-MT 3 株细胞是对 Nim 和 Car 有一定抗性的 SMMC-7721, 有一定敏感性的 Cc801, 以及敏感性很高的 SHG-44。发现 SMMC-7721 细胞中 O⁶-MT 酶活性最高, 与标准 Mer⁺型 HeLa S3 细胞的 O⁶-MT 活性相似。Cc801 细胞的 O⁶-MT 酶活性低于 HeLa S3 和 SMMC-7721。SHG-44 细胞的 O⁶-MT 活性很低, 与 Mer⁻型的 HeLa MR 细胞处于一个水平 (Fig 3)。综合 3 株细胞对 Nim 和 Car 的敏感性以及 O⁶-MT 酶活性测定结果, 看出细胞中 O⁶-MT 酶活性高低与细胞对亚硝酸类药

物的敏感性相关。O⁶-MT 活性高的细胞，对 Nim 和 Car 有一定抗性；O⁶-MT 活性低的细胞，由于不能有效地修复亚硝基脲类药物造成的细胞 DNA 烷化损伤，活存率低，表现出对药物敏感。

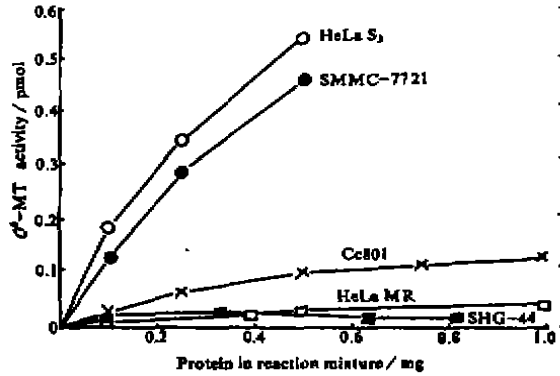


Fig 3. Activity of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (O⁶-MT) in cell extracts of 3 kinds of Chinese tumor cell strains.

Nim 对移植到裸鼠体内的 Cc801 细胞的疗效 将 O⁶-MT 酶活较低的 Cc801 人宫颈癌细胞植入裸鼠左腋下，右腋下则植入作为对照的 O⁶-MT 酶活性高的 SMMC-7721 人肝癌细胞。1 wk 后，待肿瘤移植物的体积超过 100 mm³ 时，开始 ip Nim 25 mg · kg⁻¹ · wk⁻¹ × 4 wk，Cc801 肿瘤移植体消失；若 Nim 剂量加大到 50 mg · kg⁻¹，治疗 2 wk 后，Cc801 肿瘤移植体消失。不经治疗的对照组在 36 d 观察期间内，Cc801 肿瘤的体积一直在增大，最后超过了 1 cm³ (Fig 4)。

Car 对移植到裸鼠体内的 Mer⁻ 细胞的疗效 将 Mer⁻ 型的 HeLa MR 和宫颈癌 Cc801 肿瘤细胞分别植入到裸鼠髓骨部皮下，待肿瘤体积长到 100 mm³ 时，开始 ip Car 25 mg · kg⁻¹ · wk⁻¹ × 4 wk，Cc801 和 HeLa MR 肿瘤移植体治愈消失，不治疗的对照组在 30 d 后，HeLa MR 体积长到 4 cm³，Cc801 超过 400 mm³ (Fig 5)。

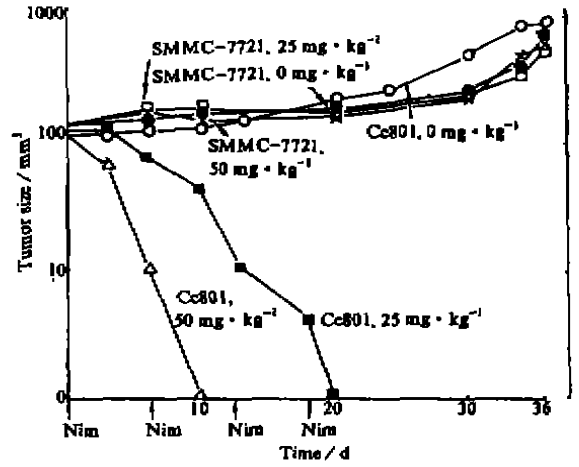


Fig 4. Effects of Nim (as indicated by arrows, ip) on Chinese tumor grafts implanted in nude mice.

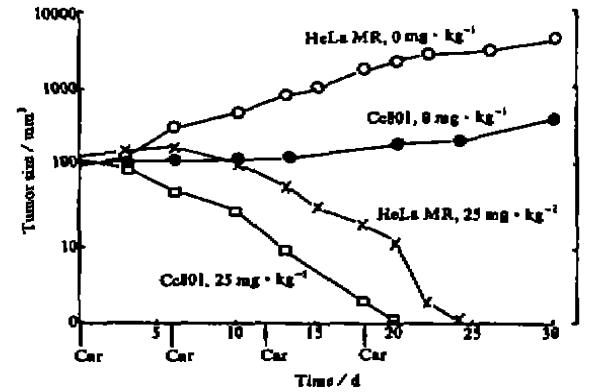


Fig 5. Effects of Car (as indicated by arrows, ip) on Mer⁻ tumor grafts implanted in nude mice.

光镜和电镜检查经 Nim 或 Car 治愈后的 Cc801 和 HeLa MR 肿瘤残留物中，未见典型癌细胞，仅见纤维细胞和脂肪细胞，继续观察一个月，未见被治愈的肿瘤复发。

DISCUSSION

肿瘤化疗迫切需要解决的问题是如何针对性地使用化疗药物，实现化疗前的预见性。本实验从体内和体外均证明 Nim 和 Car 对 O⁶-

MT 酶活性低的 HeLa MR 和 Cc801 肿瘤细胞有很好的疗效, 提示分析肿瘤组织中的 O^6 -MT 酶活性有可能成为一项判断使用亚硝基类药物化疗结果的预见性指标。只要确定癌症患者肿瘤组织中的 O^6 -MT 酶活性低, 就可以有针对性地使用 Nim 或 Car 进行治疗, 由此可望开拓出一条预见性化疗的新途径。

为了观察化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效果, 本文引入了 D_{10} 值的概念, 即杀伤 90% 肿瘤细胞时的药物浓度, 用此判断肿瘤细胞对 Nim 和 Car 的敏感性, 以接近临床实际。作者发现肿瘤细胞中 O^6 -MT 酶活性与对 Nim 的 D_{10} 值或 Car 的 D_{10} 值之间呈良好的线性关系(另文报道), 进一步阐述了以 O^6 -MT 酶活性为指标, 指导合理使用亚硝基类药物对肿瘤进行预见性化疗的理论基础。

实验表明在 10 株中国人肿瘤细胞中, 以 SHG-44 脑恶性胶质瘤细胞的 O^6 -MT 酶活性最低, 体外实验也证明 SHG-44 对 Nim 和 Car 都非常敏感, 但因它在裸鼠体内不能形成瘤块, 因此未能进行体内实验。

此外, O^6 -MT 是一种自杀性的酶, 它在接受 DNA 上的烷化基团后即失去活性。如果我们将 Mer^+ 型肿瘤中的 O^6 -MT 酶消耗掉或降低其活性, 然后再使用亚硝基类药物化疗, 有可能收到较好的治疗效果, 这将扩大亚硝基

类药物在肿瘤化疗中的应用。

REFERENCES

- 1 Karran P, Lindahl T. Cellular defence mechanisms against alkylating agents. *Cancer Surv* 1985; 4: 583-99.
- 2 Fujio C, Chang HR, Tsujimura T, Ishizaki K, Kitamura H, Ikenaga M. Hypersensitivity of human tumor xenografts lacking O^6 -methylguanine DNA methyltransferase to the anti-tumor agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea. *Carcinogenesis* 1989; 10: 351-6.
- 3 Zhang YP, Wang DW, Chen YN, Wu Y, Xu HY, Fan GC. O^6 -methylguanine DNA methyltransferase and human cancer chemotherapy. *Sci China (series B)* 1991; 34: 675-82.
- 4 Ikenaga M, Tsujimura T, Chang HR, Fujio C, Zhang YP, Ishizaki K, et al. Comparative analysis of O^6 -methylguanine methyltransferase activity and cellular sensitivity to alkylating agents in cell strains derived from a variety of animal species. *Mutat Res* 1987; 184: 161-8.
- 5 Tsujimura T, Zhang YP, Fujio C, Chang HR, Watatani M, Ishizaki K, et al. O^6 -methylguanine methyltransferase activity and sensitivity of Japanese tumor cell strains to 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 1207-15.
- 6 Tong WP, Kirk MC, Ludlum DB. Formation of the cross-link 1-(N^3 -deoxycytidyl), 2-(N^1 -deoxyguanosinyl) ethane in DNA treated with N,N' -bis(2-chloroethyl)- N -nitrosourea. *Cancer Res* 1982; 42: 3102-5.

11th Interdisciplinary World Congress on Antimicrobial and Anticancer Drugs

1994 Apr 25-27

Geneva, Switzerland

Please contact Organizing Secretariat,
11th FTC,
P O Box 112,
1218 Grand Saconnex (Geneva),
Switzerland.

Fax: 22-3002391