

LZ-410 盼生安对肝癌细胞细胞周期时相的影响 及对 DNA 损伤效应的观察

李 煜 杨素霞 樊飞跃 曹珍山 周淑珍 涂开成 刘国廉
(北京放射医学研究所 100850)

LZ-410盼生安(以下简称 LZ-410)是我室研制的一种新型广谱抗肿瘤药物,本实验室在体外细胞及荷瘤裸鼠身上进行药效学研究,发现该药对体外培养的人肝癌细胞、肺癌细胞、白血病细胞、S180 细胞、裸鼠移植性人肝癌和人肺癌等有明显抑制作用,抑瘤率达 60%-80%,而对正常人胚肺细胞则影响较小。对 2000 多例用药的中晚期癌症病人临床疗效的初步观察表明,总有效率为 65%左右,是一种很有希望的抗肿瘤药物。5-Fu 是另一种临床常用治疗消化道肿瘤的化疗药。本文以 5-Fu 作为阳性对照药物从对 BEL-7402 肝癌细胞 细胞周期时相的影响及对 DNA 损伤效应两个方面对 LZ-410 的作用机理进行了初步探讨。

材 料 和 方 法

1. 细胞培养

人肝癌细胞系 BEL-7402 为陈瑞铭等于 1974 年建系,保存于中科院上海细胞所。细胞培养液均为含 15%小牛血清(天津市生化制品厂)的 RPMI-1640 培养基(Gibco),另添加适量的 HEPES 及抗菌素(100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),用 0.25% 胰蛋白酶(sigma 1:125)消化,分散细胞,37℃恒温箱内静置培养,每隔 2—3 天传代一次。

2. 药物配制

LZ-410:本实验室制备的粉末制剂,微溶于水。用生理盐水配成 3 mg/ml,抽滤除菌。

氟尿嘧啶(5-Fu):天津市河北制药总厂生产,注射用,50mg/支,25mg/ml,用生理盐水稀释至 50 μ g/ml。

3. 细胞周期的测定

将指数生长期 BEL-7402 肝癌细胞 1×10^6 接种于 100 ml 培养瓶中,8 小时细胞贴壁后加药。阴性对照组不加药,阳性对照组加 5-Fu,终浓度为 0.6 μ g/ml;药物组加 LZ-410,终浓度为 40 μ g/ml(均为其各自半数抑制浓度 IC_{50})。药物作用 8 小时后,取样。方法为:用 0.25%胰酶消化细胞,吹打使其分散成单个细胞,用 PBS 离心洗涤两次,调节每个样品细胞数为 2×10^6 个/ml,用微量移液器通过 350 目尼龙滤网注入 70%冷乙醇中,4℃固定。以后每隔 4 小时取样一次。样品固定 18 小时后可测定。测定前,倒掉酒精,用 PBS 洗一遍后加入 RNA 酶,37℃温育 30 分钟后,放入冰浴中中止消化。用碘化丙啶(PI)染色 2 小时。采用美国 Decton-Dickinson 公司 FACS 440 型流式细胞仪进行测定。光源为 5 W 氩离子激光器,输出功率为 200 mW,激发光波长 488 nm。PDP 11/73 计算机收集细胞数据,每个样品收集约 10,000 个细胞的数据,计算机拟合分析得出 DNA 含量分布图,以 G_0/G_1 、S 和 G_2M 各期所占百分比比例予以照相或打印。

4. 对 DNA 损伤的影响⁽¹⁾

收集指数生长期细胞,用 PBS 制成 10^6 /ml 细胞悬液。将实验分为处理组(包括阳性对照药 5-Fu 处理组和 LZ-410 处理组)及对照组。对照组设 T(未变性)、B(空白)和 P(部分变性)三组,处理组只设 Pi(部分变性)组,每组三个平行管。0.6 ml/管。应用 DNA 解旋的荧光检测法(Fluorometric Assay of DNA Unwinding, FADU)进行检测,由 T、P、B 管荧光值计算残存双链 DNA 百分数(D)

$$D = [(P-B)/(T-B)] \times 100\%$$

为获得直线型剂量效应关系曲线,引入 Qd

$$Qd = 100(\log P_0 - \log P_i)$$

Qd 的大小反映了 DNA 链断裂程度的高低, Qd 值越大,表明 DNA 链断裂越多。式中 P_0 : 未处理细胞 D 值; P_i : 处理细胞 D 值。

结 果

1. LZ-410 对 BEL-7402 肝癌细胞周期时相的影响

对照组(图 1 a)细胞随药物作用时间的延长, G₀/G₁ 期细胞有所增加, 从 8 小时的 44.5% 增加到 24 小时的 61.1%, 同时 S 期细胞略有下降, 从 47.4% 降到 36.2%, G₂M 期细胞从 8.1% 降至 2.7%, 这主要是由于随着细胞增殖, 细胞数目增多, 细胞增长逐渐达饱和密度, 从而使 G₁ 期细胞增多。图 1 b 的结果表明, LZ-410 处理 BEL-7402 肝癌细胞在

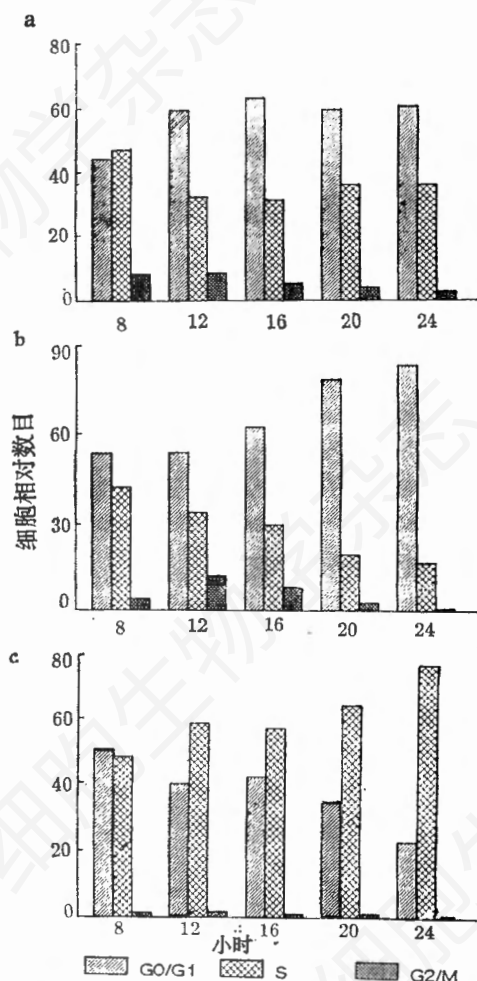


图 1 LZ-410 和 5-Fu 对 BEL-7402 肝癌细胞周期时相的影响
(a: 对照组; b: LZ-410 处理组; c: 5-Fu 处理组)

24 小时内, 随时间延长, G₀/G₁ 期细胞逐渐增多, 持续用药 20 小时后出现 G₀/G₁ 的积聚, 明显高于对照组细胞 ($P < 0.01$), 到 24 小时可高达 82.9%, 而 S 期细胞则持续减少, 从 8 小时的 42.5% 降至 24 小时的 16.4%, G₂M 期细胞起初有所降低, 12 小时时增高到 12%, 后下降, 24 小时达 0.7% (对照为 2.7%)。这表明 LZ-410 能明显阻滞细胞于 G₀/G₁ 期。阳性对照 5-Fu 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理细胞后 (图 1 c), 随时间延长, S 期细胞逐渐增多, 药物持续作用 12 小时时明显高于对照组细胞 ($P < 0.01$), 24 小时时可高达 76.9%, 表明 5-Fu 将细胞阻滞于 S 期。

2 LZ-410 对 DNA 链损伤效应的观察

(1) 不同浓度药物处理两天后 DNA 链损伤效应观察

5-Fu 阳性对照组分别用 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 2 天, 其浓度各为 5-Fu IC_{50} 的 25%, 50%, 100%, 150%; LZ-410 药物组分别用 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 2 天, 其浓度亦各为 LZ-410 IC_{50} 的 25%, 50%, 100%, 150%。图 2 分别为 5-Fu 和 LZ-410 浓度和 DNA 链断裂效应关系图。未发现 Qd

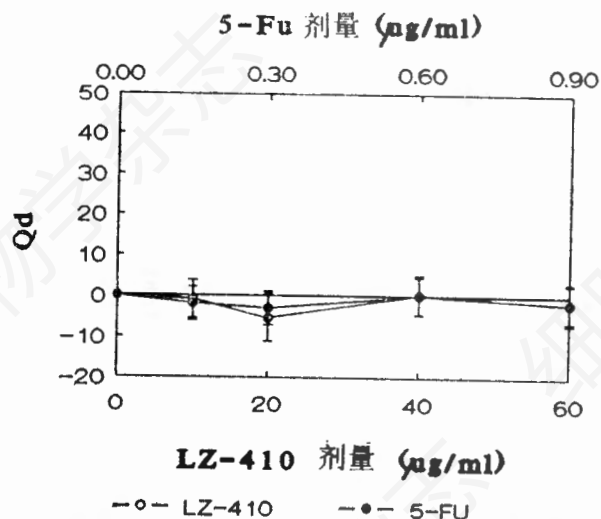


图 2 LZ-410 和 5-Fu 处理 BEL-7402 细胞 2 天对 DNA 损伤的影响

值随剂量增大而增大的变化趋势,各剂量点之间均无显著差别($P>0.05$)。Qd 值在 0 值附近上下波动,可认为在本实验条件下,两种药物处理 2 天均不引起 DNA 链断裂。

(2) 不同药物浓度处理 3 天后 DNA 链损伤的观察

图 3 是分别用不同剂量药物的 LZ-410 和 5-Fu 处理细胞 3 天的药物浓度和 DNA 链断裂效应关系图。各剂量点之间均无显著差别, $P>0.05$ 。Qd 值较低,亦可认为在本实验条件下经药物处理 3 天两种药物均不引起 DNA 链断裂。

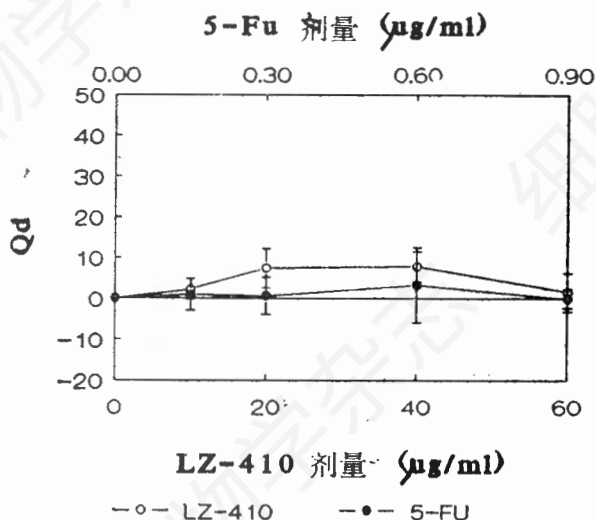


图 3 LZ-410 和 5-Fu 处理 BEL-7402 细胞 3 天对 DNA 损伤的影响

讨 论

抗恶性肿瘤化疗药物的主要作用是杀伤癌细胞,阻止其分裂繁殖。不同的药物对细胞增殖动力学的影响不同,因此根据药物对细胞周期的影响分成了周期特异性药物和周期非特异性药物两类。前者仅对细胞周期中的某一时相有较强的作用。如抑制核酸合成的药物-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤能抑制细胞于 S 期;影响蛋白质合成的药物长春碱类等作用于 M 期。后者则可杀灭增殖细胞群中各期细胞,

其作用机制是该类药物与 DNA 作用形成交叉连接或引起脱嘌呤作用,从而使 DNA 链损伤断裂或在复制中使碱基配对错码,造成 DNA 结构和功能的损害,使细胞死亡^[2]。由此可看出对细胞周期的影响及对 DNA 损伤效应研究是抗肿瘤药物作用机理研究的两个重要方面。

本实验研究了 LZ-410 和 5-Fu 对 BEL-7402 细胞的细胞周期时相的影响。结果表明,两者都对细胞周期产生特异性影响,但其作用机制不同。经 LZ-410 处理后, G₀/G₁ 期细胞数随时间延长而增加, 20 小时时出现积聚, 24 小时达到 82.9% (对照为 61.1%), 而 S 期细胞数目减少 (24 小时时为 16.4%), 说明 LZ-410 能将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 显示了 LZ-410 能够通过有效作用于细胞周期某一时相从而抑制肝癌细胞生长增殖作用。而 5-Fu 则将细胞抑制于 S 期。

肿瘤细胞的细胞动力学特点是细胞群体主体分布于 DNA 合成活跃的 S 期, 而分化细胞群体主体分布于 DNA 合成静止的 G₀/G₁ 期^[3]。本实验结果表明, LZ-410 处理后的 BEL-7402 细胞出现 G₁ 期延滞和 G₁-S 期转换的抑制, 出现分化细胞特有的周期分布, 因此该实验结果还提示我们 LZ-410 可能具有诱导细胞分化的作用。

药物分别作用 2 天和 3 天, 不同药物浓度和 DNA 链断裂相关性皆较差, 说明在本实验条件下 DNA 链断裂与药物浓度无关。且表明 DNA 链断裂程度的 Qd 值也较低, 在 0 值附近上下波动。故可认为 LZ-410 并不引起 DNA 链断裂或损伤。

由以上两个实验可以得出以下结论: LZ-410 是一种周期特异性药物, 它阻滞肝癌细胞于 G₀/G₁ 期, 从而抑制细胞的生长增殖, 达到治疗效果而与 DNA 损伤致细胞死亡无关。

5-Fu 能将肝癌细胞抑制于 S 期, 与文献报道结果是一致的^[4-6]。5-Fu 能否引起 DNA 的单链及双链断裂, 从 1988 年以来开始有过报道。一般认为, 5-Fu 能引起 DNA 链断

裂^[7-9]。并认为 5-Fu 引起 DNA 损伤是通过两个不同机制,一个是药物掺入引起 DNA 链断裂,另一个机制是 DNA 链断裂实际上是“自发”的 DNA 损伤,由于 5-Fu 抑制胸苷酸合成酶,因而造成 dTTP 库缺乏,使断裂得不到修复造成的^[7,8]。文献报道 5-Fu 引起 DNA 损伤所用剂量大多数较高(>1 $\mu\text{g/ml}$)^[7,9]。也有部分文献报道 5-Fu 不易引起 DNA 损伤。如即使其浓度增加到 40 $\mu\text{g/ml}$,以至于造成细胞生长 99% 的抑制也不能引起 HCT-8 细胞 DNA 最小量的损伤^[10]。本实验未检测到 5-Fu 致 DNA 损伤可能与所用剂量较低有关。

摘 要

LZ-410 盼生安是一种广谱抗肿瘤药物。本文以 5-Fu 作为阳性对照药物从对 BEL-7402 肝癌细胞周期时相的影响及对 DNA 损伤效应两个方面进行了初步探讨。结果表明, LZ-410 能将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,抑制了细胞的生长增殖作用。并且在本实验条件下, LZ-410 并不引起 DNA 的损伤。这表明 LZ-410 抑制肝癌细胞生长增殖不是通过对 DNA 损伤引起

的,而主要是通过阻滞肿瘤细胞于 G₀/G₁ 期实现的。

关键词: LZ-410 盼生安 5-Fu 细胞周期 DNA 损伤

参 考 文 献

- [1] 贺 涛等, 1990, 军事医学科学院院刊, 14 (3): 170—173.
- [2] 江明性, 药理学, 第三版, 人民卫生出版社, 1989 年, 387—393.
- [3] Loton, R. and Nicolson, G. L., 1977, *J Natl Cancer Inst.*, 59: 1717.
- [4] Prat, F., et al., 1994, *Gastroenterology*, 126 (1): 937—944.
- [5] Cascinu, S., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53(22): 5429—5432.
- [6] Kido, Y., et al., 1991, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 28 (4): 251—254.
- [7] Lonn, U., et al., 1989, *Cancer Res.*, 49 (5): 1085—1089.
- [8] Yin, M. B., et al., 1992, *Cancer Res.*, 52 (21): 5900—5905.
- [9] Sugimoto, Y., et al., 1992, *Br J Cancer.*, 65 (6): 857—864.
- [10] Yin, M. B. and Rustum, Y. M., 1991, *Cancer Commu.*, 3 (2): 45—51.

THE EFFECT OF LZ-410 PANSHENGAN ON CELL CYCLE PHASE AND DNA DAMAGE IN HEPATOMER CELLS

LI Yu et al

(Institute of Radiation Medicine, Beijing, 100850)

ABSTRACT

LZ-410 panshengan is a kind of wide spectrum anti-tumor drug. The effect on cell cycle phase and DNA damage in BEL-7402 hepatomer cell line was preliminarily studied using 5-Fu as positive control. The results showed that LZ-410 could detain the cells at G₀/G₁ phase. So it could resist cell proliferation. The results also showed that LZ-410 couldn't induce DNA damage under this experimental conditions. This indicated that LZ-410 resisted cell growth not by DNA damage, but by detaining cells in G₀/G₁ phase.

Key words: LZ-410 panshengan 5-Fu Cell cycle DNA damage