

## 二氯二羟二异丙胺合铂CHIP对小鼠 艾氏腹水癌细胞动力学的影响

曹瑾\* 潘启超

(中山医科大学肿瘤研究所, 广州)

**提要** 本文采用  $^3\text{H-TdR}$  标记的放射自显影术,秋水仙碱阻断法和显微分光技术,研究了CHIP对小鼠艾氏腹水癌细胞动力学的影响。实验发现:CHIP (30 mg/kg)对呈指数生长和坪区生长的肿瘤细胞具有抑制增殖的效应,并可见对G<sub>1</sub>细胞的损伤作用,对S期和M期细胞未见特异性杀伤。CHIP还能引起细胞周期进程的广泛延缓,尤其以G<sub>1</sub>-S阻缓最为明显。上述结果表明CHIP为周期非特异性药物。

**关键词** 二氯二羟二异丙胺合铂;艾氏腹水癌;细胞动力学;放射自显影;显微分光技术

二氯二羟二异丙胺合铂 cis-dichloro-trans-dihydroxy-bis-isopropylamine (IV) (CHIP),是近年来颇受关注的第二代铂类化合物。与母体药物顺铂相比,CHIP的抗癌作用强,且几无肾毒性<sup>(1~3)</sup>。在国外已进入II期临床试用阶段。有关CHIP对肿瘤细胞动力学的影响目前尚未见文献报道。本文采用放射自显影术,秋水仙碱阻断法及显微分光技术,研究CHIP对艾氏腹水癌(EAC)细胞动力学的影响,探讨CHIP的抗癌作用方式,以期为临床用药提供依据。

### 材料来源

**动物** 实验用18~22g昆明种小白鼠(本校动物房饲养)。雄雌兼用。每次实验用同一性别。每只小鼠腹腔接种EAC  $1 \times 10^7$ 个细胞。每7天传代一次。

**药品** CHIP由南京大学配位化学研究所唐雯霞等惠赠; $^3\text{H-TdR}$ 为中国科学院上海原子能研究所产品比活性 $20 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ;核-4乳胶为中国科学院北京原子能研究所产品;秋水仙碱为意大利米兰Carlo Erba产品;碱性品红为北京化工厂产品批号:640221。所有药品均用生理盐水配制至规定浓度。腹腔给药。对照组生理盐水0.2 ml/只,用药组CHIP 30 mg/kg,秋水仙碱 $20 \mu\text{Ci}/\text{只}$ ; $^3\text{H-TdR}$ ,如无注明, $20 \mu\text{Ci}/\text{只}$ 。

### 实验和结果

#### 一. CHIP对EAC细胞增殖生长的影响<sup>(4)</sup>

用台盼蓝染色法进行活瘤细胞计数。每时间点取3只小鼠均值。结果如图1所示。

接种后1~8天细胞近指数生长,8天后生长趋于坪区。即刻用药和第8天用药后次日的活瘤细胞数较对照组明显减少,尤以即刻用药组为甚,其抑制率为78.2%,第8天用药组的为38.3%,提示CHIP对EAC指数生长和坪区的细胞均有抑制作用,其中以指数生长的细胞较为敏感。

#### 二. CHIP对EAC细胞周期进程的效应<sup>(5~7)</sup>

本文于1986年3月5日收到。

\* 现在南京医学院药理教研组

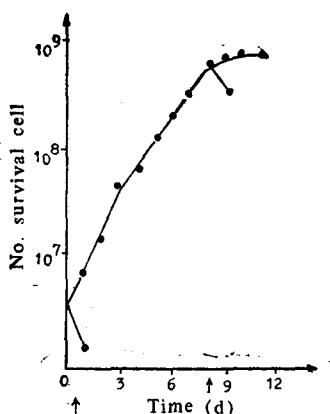


Fig 1. Effect of CHIP on the proliferation of EAC cells. • Control; ○ CHIP (30 mg/kg); ↑ indicates injection of CHIP

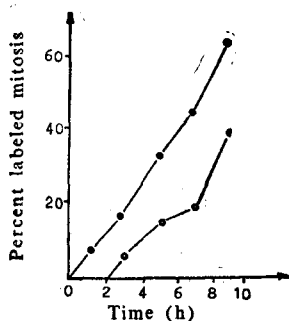


Fig 2. Effect of CHIP on the traverse of S phase cell through  $G_2$  phase into M phase. - - - Control; ○—○ CHIP (30 mg/kg)

### (一) 对 $G_1$ 期细胞向 S 期运转的影响

取荷瘤第 7 天小鼠 6 只, 每只 ip  $^3\text{H-TdR}$   $5 \mu\text{Ci}$ /只, 第一次标记 0.5 h 后, 取腹水涂片。用药组 (3 只), ip CHIP 30 mg/kg, 0.5 h 后, 二组小鼠同时 ip  $^3\text{H-TdR}$   $5 \mu\text{Ci}$ /只, 0.5 h 后取腹水涂片。将二次涂片作放射自显影。每张涂片随机镜检 1000 个细胞中的标记细胞数 (标记指数, LI), 统计二次标记的 LI。

在指数生长期, 细胞在其周期中的分布和转运都是随机的。这二次标记所得的 LI 应是第一次标记的标记细胞与二次间隔中 (短于  $T_{G1}$ ) 进入 S 期的细胞数之和。对照组第二次标记后, LI 由第一次标记的  $27.9 \pm 0.7\%$ , 上升至  $44.9 \pm 6.9\%$ , 增加了 17%, 而用药组仅增加了 3.1%, 提示 CHIP 有阻滞细胞  $G_1$ -S 进程的作用。

### (二) 对 S 期细胞向 M 期运转的影响

对照组在给秋水仙碱后, 因阻滞细胞在分裂中期, 致使标记分裂细胞百分率 (PLM) 随时间的迁移而上升。用药组在相应时间内, 标记有丝分裂细胞的出现和 PLM 上升与对照组比较明显推迟和降低。在第 9 h, 对照组的 PLM 值为 61%, 用药组为 36%。差别有显著性 ( $P < 0.025$ )。

### (三) 对 $G_2$ 期细胞向 M 期运转的影响

对照组的 MI 在 4 h 之内变化不大; CHIP 组的 MI 呈下降趋势; 秋水仙碱的 MI 随时间的迁移而上升; 合并用药组的 MI 曲线高于对照组, 而低于单用秋水仙碱组, 表明 CHIP 能部份逆转秋水仙碱引起 MI 上升的作用, 有阻止细胞从  $G_2$  期向 M 期转运的效应。

### (四) 显微分光观察

应用 Leitz MPV<sub>3</sub> 显微分光光度计进行单个细胞 DNA 含量的测定。测定 EAC 分裂后期和末期细胞染色体的单极 (single pore) 部分, 作为  $G_1$  DNA 含量的参照标准<sup>(8)</sup>, 据此将 0~9 通道作为  $G_1$  DNA 含量区间; 18~27 通道作为  $G_2 + M$  DNA 含量区间; 二个区间中的 9~18 通道为 S 期细胞相应的含量, 按上述方法计算, S 期细胞的比例为 31.3%, 与前面放射自显影实验所得的 LI 基本一致 (29.6~35.2%)。用药 4 h 后, 细胞向低通道移动, 堆积在  $G_1$  DNA 含量区间。这种由药物作用后引起的细胞分布的改变持续较久, 在第 48 h 尚有 20% 以上的细胞滞留在  $G_1$  期, 说明在 30 mg/kg 剂量下, CHIP 抑制  $G_1$ -S 进程的作用

较强，且难于恢复。

### 三. CHIP 对 EAC 细胞的损伤作用<sup>(5)</sup>

#### (一) 对 G<sub>0</sub> 细胞的影响

对荷瘤第 8 天的小鼠，用 <sup>3</sup>H-TdR 重复标记后，LI 曲线的变化见图 5。

多次重复标记后，LI 近似呈线性上升，到第 45 h 达到坪区，LI 为 50.0% 左右，说明此时约有一半的细胞始终不被标记，处于非增殖的 G<sub>0</sub> 状态。用药 2 h 后，镜检非标记细胞损伤情况。损伤细胞形态学变化为核固缩，核膜破裂，染色体紊乱。用药组的非标记细胞的损伤率为 24.2±1.2%，对照组的为 10.8±0.9%，有显著性差别 (P<0.025)，说明 CHIP 对 G<sub>0</sub> 细胞有杀伤作用。

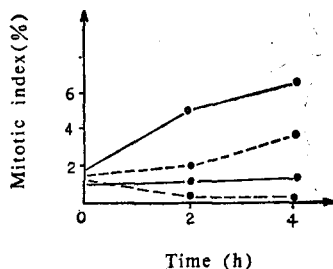


Fig 3. Effect of CHIP on the progression of G<sub>2</sub> cell into M phase. ●—● Control; - - - - - CHIP (30 mg/kg); ○—○ Colchicine (20 µg/mice); ○—○ Colchicine + CHIP

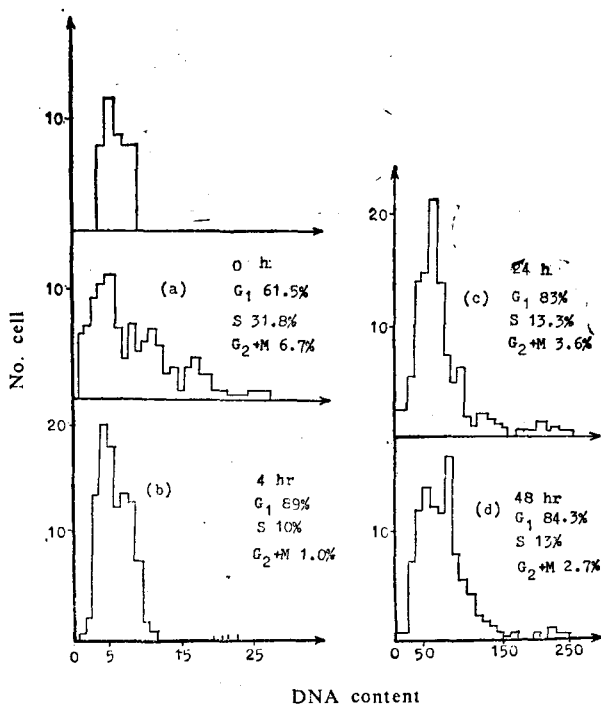


Fig 4. Changes in the DNA histograms of EAC cells treated with CHIP

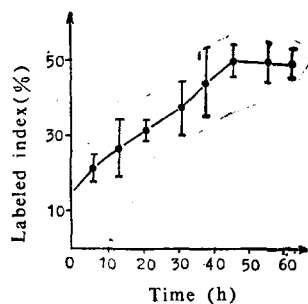


Fig 5. The LI curve of EAC cell obtained by injection of <sup>3</sup>H-TdR repeatedly

#### (二) 对 S 期细胞的影响

在实验时间内，对照组和用药组的 LI 没有明显的变化，均在一定范围内波动。用药 9 h，标记细胞损伤率为 6.4±1.2%，对照组的为 2.2±0.8%，差异无显著性。说明 CHIP 对 S 期细胞可能没有特异性杀伤作用。

#### (三) 对 M 期细胞的影响

取荷瘤第 6 天小鼠，于用药前后抽腹水涂片，统计 1000 个细胞中的分裂细胞数 (分裂指数，MI) 用药后可见 MI 下降，第 4 h 的 MI 值为用药前的 16.1%。观察此时 M 期细胞形态，

可见有轻微染色体短粗紊乱, 少见破碎的M期细胞, 提示CHIP降低MI的作用可能不是直接损伤M期细胞所致, 而是由于延缓细胞周期进程, 使进入M期细胞减少之故。

## 讨 论

实验发现: CHIP抑制EAC细胞的增殖生长, 尤其对指数生长的细胞的抑制更为明显, 提示CHIP可能对迅速增殖的肿瘤疗效更佳; CHIP对EAC细胞的 $G_1$ -S及 $G_2$ -M进程都有不同程度的延缓作用。从显微分光观察的结果来看, CHIP的 $G_1$ -S阻抑效果很为显著, 且难以恢复, 说明延缓 $G_1$ -S进程可能是CHIP的主要细胞动力学行为。在DNA直方图中未见有 $G_2$ 细胞堆积, 这可能是CHIP的 $G_1$ -S阻滞作用过强, 掩盖了其后期时相的进程延缓作用, 此有待今后探讨; CHIP对EAC细胞有损伤作用, 对S期细胞未见特异性杀伤。Layde等<sup>(9)</sup>在研究氮芥对EAC细胞动力学影响时也有类似结果报道。由于都能在 $G_1$ -S期引起DNA单链损伤, 形成所谓的延迟性染色体畸变, Bocian等<sup>(10)</sup>把CHIP与氮芥同归于Bender氏化学物分类的第三类。我们的实验也证实CHIP与氮芥在细胞水平上其作用方式也有相似之处。

综上所述, CHIP具有细胞周期时相非特异性的作用特点。可以设想、利用CHIP对 $G_1$ -S期的延缓, 引起 $G_1$ 细胞的堆积现象, 在临床给予CHIP后, 联合应用对 $G_1$ 期敏感的药物如放线菌素, 或是辅助放射治疗, 有希望达到增效作用。由于CHIP可引起S期细胞减少, 故不适于和主要杀伤S期细胞的抗代谢药同时联用。

## 参 考 文 献

1. Cleare MJ, et al. Antitumor platinum complexes: structure-activity relationships. In: Prestayko AW, et al, eds. *Cisplatin: Current Status and New Developments*. New York: Academic Press, 1980:149.
2. 潘启超, 等. 二羟二氯二异丙胺合铂的抗癌作用及药理研究. *癌症* 1984;3:1.
3. Creaven PJ, et al. Phase I clinical trial of cis- dichloro-trans-dihydroxy-bis-isopropylamine (IV)(CHIP). *Cancer Treat Rep* 1983;67:795.
4. 樊亦军, 等. 氯化光花碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响. *中国药理学报* 1981;2:46.
5. 张覃沐, 等. 冬凌草甲素对EAC细胞动力学的影响. *河南医学院学报* 1982;17:227
6. Baserga R. Inhibition of DNA synthesis in EAC cells by ACTD II: The presynthetic block in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1935;54:1141.
7. 王永潮, 等. 三尖杉酯碱对白血病L<sub>1210</sub>细胞杀伤动力学研究II显微分光光度观察. *中华肿瘤杂志* 1980;2:47.
8. Lala KP. Study on tumor cell population kinetics. In: Harris B, ed. *Methods in Cancer Research*. Vol 6. London: Academic Press, 1971:49.
9. Layde JP and Baserga P. The effect of nitrogen mustard on the life cycle of Ehrlich ascite tumor cells *in vivo*. *Br J Cancer* 1964;18:150.
10. Bocian E, et al. The mode of action of cis-dichloro-bis-(isopropylamine)-trans-dihydroxy-platinum IV (CHIP) studied by the analysis of chromosome aberration production. *Ibid* 1983;47:503.

## THE EFFECTS OF CHIP (Pt IV) ON THE CYTOKINETICS OF EHRlich ASCITE CARCINOMA CELLS

CAO Jin and PAN Qi-Chao

*(Cancer Research Institute, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou)*

**ABSTRACT** Cis-dichloro-trans-dihydroxy-bis-isopropylamine platinum (IV) (CHIP), a second-generation platinum compound, is known to have high antitumor activity and low renal toxicity. The effects of CHIP on the cytokinetics of Ehrlich ascite carcinoma (EAC) growing in mice were studied by means of autoradiography, Stathmokinetic and microcytometry methods. After an i. p. dose of 30 mg/kg, CHIP was shown to inhibit the proliferation of either the cells in exponentially growing phase or the cells on plateau phase. The  $G_0$  cells may also be damaged while no specific killing effect was found for the cells in the S or M phase. CHIP induced extensive delay of the progression through the whole cell cycle of EAC, especially the progression from  $G_1$  to S phase. The findings suggest that CHIP may be classified as a cell cycle non-specific agent.

**Key words** Cis-dichloro-trans-dihydroxy-bis-isopropylamine platinum (CHIP), Ehrlich ascite carcinoma; Cytokinetic; Autoradiography; Microcytometry