

- 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<sup>1</sup>、张培楼、田 瑄<sup>2</sup>、李景新<sup>2</sup>

(兰州医学院药理教研室, <sup>2</sup>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-Qing<sup>1</sup>, ZHANG Pei-Yan, TIAN Xuan<sup>2</sup>, LI Jin-Xin<sup>2</sup>

(Department of Pharmacology, Lanzhou Medical College; <sup>2</sup>Applied 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 of [<sup>3</sup>H]TdR, [<sup>3</sup>H]UR, and [<sup>3</sup>H]Leu into DNA, RNA and protein synthesis in leukemia 7712 cells. The inhibition correlated with drug concentration and duration. IC<sub>50</sub> of GP-7 and etoposide on DNA synthesis at 24 h were 0.21 and 0.37 μg · mL<sup>-1</sup>, respectively. The inhibition of GP-7 or etoposide on DNA synthesis retained even after the drug were washed out for 4 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 of single-strand DNA.

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

Received 1990 Nov 26

Accepted 1991 Dec 27

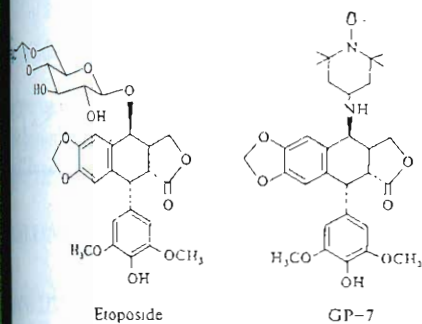
<sup>1</sup> Now in Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China.

**提要** 用液体闪烁计数法对 GP-7 的抗肿瘤作用

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  $\text{IC}_{50}$  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; 胸腺嘧啶; 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<sup>(1)</sup>,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<sup>(1,2)</sup>。本实验用液闪技术,探讨 GP-7 对 DNA 大分子合成及 DNA 链损伤方面探讨 GP-7 抗肿瘤作用及机制。



MATERIALS

细胞 小鼠白血病 L7712 细胞<sup>(3)</sup>(上海医药工业研究所提供)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提供,两者均用灭菌二甲基亚砜(DMSO)

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<sup>(4)</sup> 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  $37^\circ\text{C}$  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  $37 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$  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 型自动液闪计数器测每分钟脉冲数。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

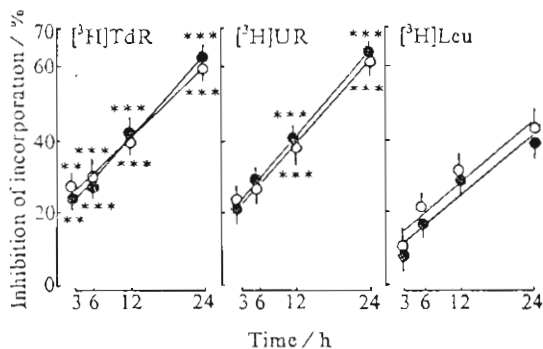


Fig 1. Inhibition of GP-7 (●) and etoposide (○) ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) on  $[^3\text{H}]\text{TdR}$ ,  $[^3\text{H}]\text{UR}$ , and  $[^3\text{H}]\text{Leu}$  incorporation into mice leukemia 7712 cells in vitro.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$  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  $\text{IC}_{50}$  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  $[^3\text{H}]\text{TdR}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 24 h 后测 cpm. 结果 GP-7 和 etoposide 对 DNA 合成抑制的  $\text{IC}_{50}$  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,  $37^\circ\text{C}$  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

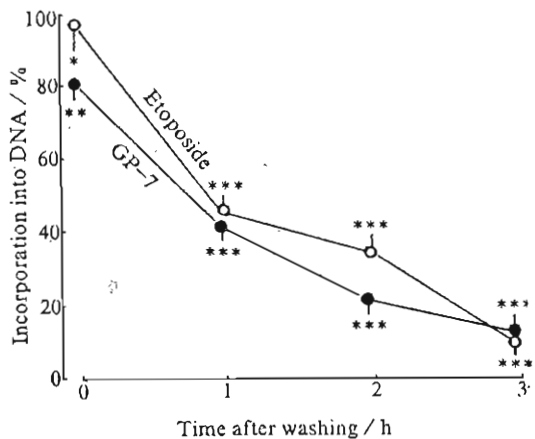


Fig 2. After-effect of GP-7 and etoposide ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) on DNA synthesis of mice leukemia 7712 cells.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs vehicle.

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<sup>(5)</sup>, 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  $37^\circ\text{C}$  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  $R = \frac{\Sigma M \cdot (\Sigma M + \Sigma E)}{\Sigma M + \Sigma E} \times 100\%$ .  $\Sigma M$ : 膜上 DNA 的 cpm;  $\Sigma E$ : 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:  $\hat{Y} = 54.70 - 15.25 \lg X$ ,  $r = -0.9854$ .

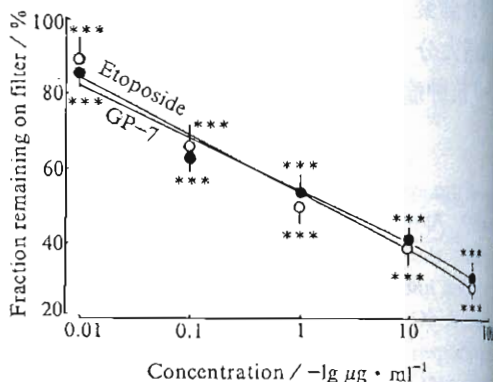


Fig 3. Alkaline elution of DNA from L7712 cells exposed to GP-7 (●) and etoposide (○) for 11 h.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs vehicle.

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<sup>(6)</sup>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<sup>(7)</sup>。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<sup>(8)</sup>, 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 的作用方式可视为模板损伤型<sup>(10)</sup>。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医学院郑荣梁教授、王肖葳副教授及张龙为的精心指导。

#### 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.