

冬凌草甲素对小鼠白血病 L1210 细胞动力学的影响

王绵英 林 晨 张覃沐 (河南省医学科学研究所, 郑州 450052)

提要 用拒染法测定 DBA 小鼠 ip 1×10^6 个 L1210 细胞, 0-7 d 呈指数生长, 后趋于“坪期”。ip 冬凌草甲素 15 mg/kg, 对 d 5 和 d 8 瘤细胞的杀伤率分别为 73 和 39%。用自体放射造影术研究 d 6 细胞周期参数分别为: $T_C = 14.6 \pm 2.0$ h, $T_S = 9.2 \pm 0.8$ h, $T_M = 0.40 \pm 0.07$ h, $T_{G1} = 3.2 \pm 0.5$ h, $T_{G2} = 1.8 \pm 0.6$ h。冬凌草甲素对 T_{G2} , T_M , T_S 及 T_C 均有不同程度的延缓。

关键词 冬凌草甲素; 白血病; 自体放射造影; 细胞周期

冬凌草甲素 (oridonin) 是从冬凌草 (*Rabdosia rubescens*) 中提取的一种有效抗肿瘤成份⁽¹⁾, 属四环二萜类化合物。其化学结构中 与环外亚甲基共轭的环戊酮结构是生理活性中心, 裂环或亚甲基饱和则作用消失⁽²⁾。体内外实验证明它对多种人癌细胞株和移植性动物肿瘤有效⁽³⁾, 临床用于治疗食管癌、肝癌和胰腺癌⁽⁴⁾。

本文以 [³H]TdR 参入的自体放射造影和秋水仙碱阻断法研究冬凌草甲素对小鼠白血病 L1210 细胞动力学的影响。

材 料

小鼠白血病 L1210 用 DBA/2 纯系传代, q 7 d。实验用 C 57 BL 和 DBA/2 杂交 F1 小鼠, ♀♂ 兼用, 每次接种 L1210 细胞 1×10^6 。

冬凌草甲素为郑州化学制药厂生产, 批号 800601。 [³H]TdR (比活性 18 Ci/mmol) 由中国科学院上海原子核研究所出品。秋水仙碱为德国 E. Merck 产品。核-4 乳胶由中国科学院 401 厂提供。

方 法 和 结 果

实验对照组均 ip 6% 丙二醇 0.2 ml/鼠;

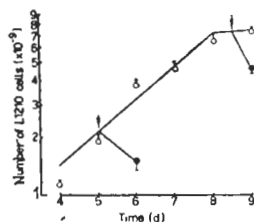


Fig 1. Effect of oridonin 15 mg/kg (●) on the growth of L1210 cells in mice. Treated (●) and control (○).

给药组均 ip oridonin 15 mg/kg。腹水涂片用甲醇固定, 涂布核-4 乳胶, 4℃ 曝射 1 周, 显影, 定影后 Giemsa 染色。

对 L1210 细胞生长增殖的影响 接种 1×10^6 L1210 细胞的小鼠 27 只, 对照组于接种后 3-9 d, 用药组于次日同一时间取 3 鼠断颈处死, 用生理盐水冲出腹水细胞, 以 0.5% 伊红稀释, 计数, 作图, 并作直线拟合。L1210 细胞在 0-8 d 呈指数生长。由公式 $TD = \ln 2/K$, 算出群体倍增时间 (TD) = 0.61 d。8 d 后为“坪期”。ip 冬凌草甲素后, 对 d 5 和 d 8 瘤细胞的杀伤率分别为 73 和 39% ($p < 0.001$)。

对小鼠 L1210 细胞周期的影响 接种 d 6 小鼠 6 只, ip [³H]TdR 20 μCi/鼠, 0.5 h 后取腹水涂片, 给药, 不同时间分别取腹水涂片作自体放射造影, 镜检 100 个有丝分裂细胞中标记细胞的比率 (PLM)。PLM 对时间作图, 并用 3 次多项式拉条拟合得 PLM 曲线, 仿文献⁽⁵⁾方法算出细胞周期参数: $T_C = 14.6 \pm 2.0$ h, $T_{G2} = 1.8 \pm 0.6$ h, $T_{G1} = 3.2 \pm 0.5$ h, $T_S = 9.2 \pm 0.8$ h, $T_M = T_C \cdot \text{Log}(1 + MI) / 0.301 = 0.40 \pm 0.07$ h。

用药组 PLM% 出现较对照组晚, 且曲线第一峰值只有 60% 左右, 表现为低平、宽大畸形、难以准确计算细胞周期各参数。

对 L1210 细胞 T_{G2} 和 T_S 的影响 仿文

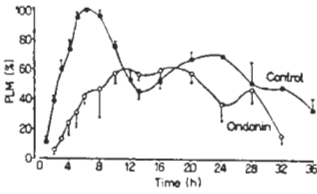


Fig 2. Effect of oridonin 15 mg/kg on the % labeled mitotic curve of leukemia L 1210 cells on d 6 of tumor growth.

献⁽⁶⁾方法直接测定是 T_S 和 T_{G2} 。取 d 6 的 L1210 小鼠 6 只, ip $[^3H]TdR$ 20 μCi /鼠脉冲标记, 并 ip 秋水仙碱 0.6 mg/kg q 4 h. 给 $[^3H]TdR$ 0.5 h 后涂片, 给药。以后每隔 0.5-1 h 取腹水涂片作自体放射造影。镜检 1000 个细胞中标记细胞/非标记细胞(LIC/ULIC)之比值, 并对时间作图。

注入 $[^3H]TdR$ 时处于 S 期的细胞全部被标记, 此时 $LIC/ULIC = S/(G_1 + G_2 + G_0)$ 。随着 G_2 期细胞进入 M 期, 在秋水仙碱作用下, M 期细胞完全被阻断于有丝分裂中期, 该比值随 G_2 期细胞的减少而增大。当 G_2 期细胞全部进入 M 期时, 比值为 $S/(G_1 + G_0)$, 并达峰值, 其所需时间即为 T_{G2} 。此后, 由于标记的 S 期细胞经 G_2 期进入 M 期, 该比值渐降低。当 S 期细胞全部进入 M 期时, 该比值为 0, 所需时间即为 T_S 。指数生长期的细胞群体中 G_0 期细胞可以略而不计。上述比值的上升和下降均与时间呈直线关系, 其斜率为细胞从一个时相向下一时相流动的速率。由图 3 计算: 对照组 $T_{G2} = 2.3$ h, $T_S = 12$ h。用药组 $T_{G2} = 2.8$ h, $T_S = 14.2$ h。与对照组相比分别延长 22 和 18%。

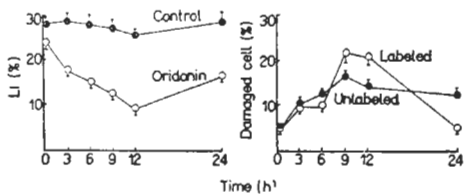


Fig 3. Effect of oridonin 15 mg/kg on the ratio of labeled to unlabeled L 1210 cells in interphase after continuous blocking with colchicine.

对 L1210 细胞 T_{G1} 的影响 接种 L1210 后 d 6 小鼠 6 只分两组, 每隔 1 h 连续 ip $[^3H]TdR$ 5 μCi /鼠, 同时 ip 秋水仙碱 0.6 mg/kg q 4 h. 首次 ip $[^3H]TdR$ 0.5 h 后取腹水涂片并给药, 不同时间取腹水涂片作自体放射造影。镜检标记指数(LI)并对时间作图。由于秋水仙碱完全阻断 M 期细胞不能流向 G_1 期, 但并不能阻断 G_1 期细胞进入 S 期。对照组 LI 随时间的推移渐升高, 当 G_1 期细胞全部进入 S 期时, 达峰值, 其所需时间为 $T_{G1} = 3$ h. 用药组 LI 明显下降, 无法准确估算 T_{G1} 。

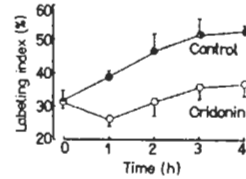


Fig 4. Effect of oridonin 15 mg/kg on LI after continuous blocking with colchicine.

对标记和非标记细胞的影响。接种 L 1210 后 d 6 小鼠 6 只分 2 组。ip $[^3H]TdR$ 20 μCi /鼠脉冲标记, 0.5 h 后取腹水涂片并给药, 不同时间分别取腹水涂片作自体放射造影。镜检 LI, 损伤标记指数(DLI)和损伤非标记指数(DULI)。损伤细胞见核固缩, 染色体短粗紊乱, 核碎裂或崩解。

结果给药后 LI 自 28% 下降到 9% ($p < 0.001$)。DLI 和 DULI 至 9 h 为 22 和 16% 达峰值, 对照组两种细胞的损伤率只有 4 和 3%。两者相比 $p < 0.001$ 。

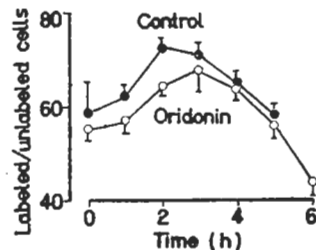


Fig 5. Effect of oridonin 15 mg/kg on LI and damaged cells.

对 G₀ 期细胞的影响 接种 L1210 后 d 8 小鼠 6 只, 每隔 4 h 每鼠 ip [³H]TdR 5 μCi, 连续 7 次。每次 ip [³H]TdR 后 0.5 h 取腹水涂片, 在第 6 次抽腹水后给药, 经 4 h 涂片作自体放射造影。镜检 LI 并对时间作图表明: 连续 20 h ip [³H]TdR 后, LI 不再上升, 故将未被标记的视为 G₀ 期细胞, 约为 64%。镜检 G₀ 期细胞损伤率为 34%、对照组仅为 7%, 两者相比 p < 0.001。

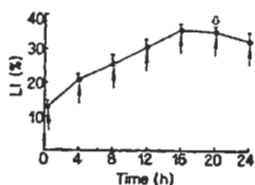


Fig 6. Effect of oridonin 15 mg/kg (↓) on LI of L1210 cells after continuous [³H]TdR (↑) labeling.

讨 论

小鼠白血病 L 1210 细胞动力学参数各家报道亦有出入⁽⁷⁾。一般认为接种后 0-7 d 为指数生长期, 以后生长变慢达“坪期”⁽⁸⁾。本文测得 L 1210 细胞生长规律接近文献报道⁽⁹⁾。

用标记有丝分裂法和直接测 T_s, T_{G₂} 和 T_{G₁} 的方法求得指数生长期 L1210 细胞周期参数稍有差别, 可能是两种不同的实验方法造成的。

对照组 PLM 曲线呈典型的双波形, 给冬凌草甲素后 PLM 曲线低平宽大、不规则且明显右移, 无法估算细胞周期参数, 但可看出 PLM 上升缓慢, 峰值只有 60% 左右, 这可能是冬凌草甲素引起 G₂ 期、M 期延缓和分裂中期阻断作用所致。

在 [³H]TdR 标记和秋水仙碱连续阻断条件下直接测定 T_{G₂}, T_s 和 T_{G₁} 的实验中, 进一步证实了冬凌草甲素对 T_{G₂} 和 T_s 均有延缓,

而对 T_{G₁} 似无明显影响。

在 [³H]TdR 脉冲和连续标记实验中, 证明冬凌草甲素对标记的 S 期和非标记的 G₁、G₂、M 和 G₀ 期细胞均有不同程度的杀伤作用。其中 M 和 S 期细胞对该药尤为敏感。

潘震昆等测定接种 L1210 后 d 7 的动物, G₀ 期细胞为 52.3%⁽¹⁰⁾。我们用连续标记方法确定接种 L1210 后 d 8 的 G₀ 期细胞为 64%。似乎偏高一点。这可能与制备自体放射造影过程中, 曝射时间较短有关。

上述结果表明, 冬凌草甲素对指数生长期或“坪期”L 1210 细胞的 S, G₁, G₂, M 和 G₀ 期均有一定的杀伤作用。并可延缓 T_M, T_{G₂+M}, T_s 和 T_c。提示冬凌草甲素可能是一种细胞周期非特异性药。

致谢 郑州大学数学系主任齐铁山帮助拟合 PLM 曲线。

参 考 文 献

- 1 河南省医学科学研究所药理药化组、河南医学院化学教研组、云南植物研究所植化室、郑州化学制药厂试剂室。科学通报 1978; 23: 53
- 2 Fujita E, Nagao Y, Kohno T, Matsuda M, Ozaki M. *Chem Pharm Bull* 1981; 29: 3208
- 3 葛 铭、马用法、张中兴、安 民、刘宏光。药学通报 1981; 16: 262
- 4 张覃沐。中华肿瘤杂志 1982; 4: 322
- 5 Wheeler GP, Bowdon B, Wilkoff LJ. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126: 903
- 6 Maekawa T, Tsuchiya J. *Exp Cell Res* 1968; 53: 55
- 7 Skipper HE. The cell cycle and chemotherapy of cancer. In: Baserga R, ed. *The cell cycle and cancer*. 1st ed. NY: Marcel Dekker, 1971: 358-88
- 8 Devita VT, Denhan C, Perry S. *Cancer Res* 1969; 29: 1067
- 9 樊亦军、韩 锐。药学报 1979; 14: 8
- 10 潘震昆、韩 锐。生物化学与生物物理学报 1980; 12: 13

CYTOKINETIC EFFECTS OF ORIDONIN ON LEUKEMIA L1210 CELLS

WANG Mian-ying, LIN Chen, ZHANG Tan-mu

(Henan Medical Inst, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT Oridonin is a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*. An ip injection of 1×10^6 L 1210 cells gave rise to an exponential growth during the first 7 d. The doubling time was about 0.61 d. The growth curve reached a plateau phase in 8 d. The cell killing rates of oridonin 15 mg/kg ip on d 5 and d 8 upon L1210 cells were 73 and 39% respectively.

The labeled mitotic curve of L1210 cells showed the prolonged T_C , T_{G_2+M} and T_S after ip oridonin 15 mg/kg.

Oridonin was injected ip 15 mg/kg 30 min after the pulse labeled with [3H]TdR, LI decreased gradually from 28% to 9%. The L1210 cells showed a remarkable nuclear damage without noticeable damage of cytoplasm in 1 h. The damaged labeled and unlabeled cells

amounted to 22 and 16% respectively.

By continuous labeling with [3H]TdR for 24 h, the fraction of cells in G₀ phase of L 1210 cells on d 8 was 64%, the damaged cells in G₀ phase were about 34%.

Using the colchicine-blocking technique in combination with the pulse and continuous labeling technique with [3H]TdR, T_{G_2} , T_S and T_{G_1} were 2.3, 12.3 and 3.0 h. The time of G₂ and S phase were prolonged, while T_{G_1} was unchanged.

Thus, oridonin appears to be a cell cycle non-specific agent.

KEY WORDS oridonin; leukemia L 1210; autoradiography; cell cycle