

1,2-双-(异丁氧甲酰氧甲基-二氧哌嗪)乙烷(MST-16)对小鼠淋巴瘤细胞白血病L1210细胞动力学的影响

何 华、王绵英、张覃沐 (河南省医学科学研究所, 郑州 450052)

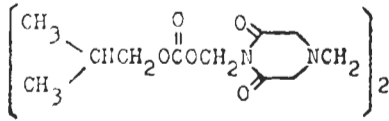
提要 利用放射自显影术研究了MST-16及其同类物丙亚胺、乙亚胺和丙双吗啉对小鼠白血病L1210细胞动力学的影响。结果表明: MST-16延长细胞周期时间 T_C 及 T_{G_2} , T_S , 并延缓G2期细胞向M期、G1期细胞向S期的过渡。对G0期细胞无损伤作用。丙亚胺和乙亚胺均明显延长 T_{G_2} 和 T_S , 丙双吗啉延长 T_S 的作用最强, 对 T_{G_2} 无作用。

关键词 1,2-双-(异丁氧甲酰氧甲基-二氧哌嗪)乙烷; 丙亚胺; 乙亚胺(双-二氧哌嗪乙烷); 丙双吗啉; 白血病L1210细胞; 放射自显影术; 近交DBA小鼠

丙亚胺(razoxane)和乙亚胺[1,2-bis(3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane, ICRF-154]是一类具有抗癌活性的二氧代哌嗪类化合物⁽¹⁾。

1987年1月13日收稿 1987年12月16日接受

丙亚胺已应用于临床, 已成为美国国立癌症研究所癌症治疗部认可的抗癌药之一。丙双吗啉 (probimane) 和双-(异丁氧甲酰 氧甲基-二氧哌嗪)乙烷 (MST-16) 均为二氧哌嗪类衍生物^(2, 3), MST-16 由我国蔡俊超首先合成。两药对动物移植性肿瘤有抗癌活性, 并已试用于临床。为探讨 MST-16 的抗癌作用机理及其与同类物对 S 期和 G₂ 期的作用, 本文研究了 MST-16 对小鼠白血病 L 1210 细胞动力学的影响, 并比较上述四药对 L 1210 细胞的 G₂ 期和 S 期时长 (T_{G₂}, T_S) 的影响。



1,2-Bis(4-isobutoxycarbonyloxymethyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane (MST-16)

材 料

小鼠白血病 L 1210 从中国医学科学院药物研究所引进, DBA/2 小鼠每 7 d 腹腔传代 1 次, ♀♂兼用。丙亚胺、乙亚胺、丙双吗啉和 MST-16 均为中国科学院上海药物所合成, 0.5% 羧甲基纤维素 (CMC) 制成混悬剂。 [³H] TdR 和核-4 乳胶为中国科学院 401 厂产品。秋水仙碱为 E Merck 产品。

方 法 和 结 果

一般采用接种 L 1210 细胞后 d 6 小鼠。一次 ip 给药, 剂量为 50 mg/kg。对照组 ip 0.5% CMC 0.2 ml/鼠。腹水涂片用甲醇固定, 暗室内涂以核-4 乳胶, 4℃ 曝光 10 d。ID-19 b 显影 5 min, 酸性坚膜定影液中定影 15 min, 干燥后 Giemsa 染色。显微镜下, 一个细胞或细胞核带有 5 个以上银颗粒者计为标记细胞。实验重复 2-3 次, 取一次实验结果。

MST-16 对细胞周期的影响 采用标记分裂指数即 PLM 法⁽⁴⁾。取接种 d 6 荷瘤小鼠 6 只分为对照及用药组, ip [³H] TdR 0.74 MBq/

鼠。0.5 h 后取腹水涂片, 给药。不同时间分别取腹水涂片作放射自显影, 镜检 100 个有丝分裂细胞中标记细胞的比率即标记分裂指数 (PLM), 并对时间作图 (图 1)。据图形计算出细胞周期各参数: T_C = 16.5 h, T_{G₁} = 2.1 h, T_S = 10.2 h, T_{G₂} = 3.7 h, T_M = 0.5 h。

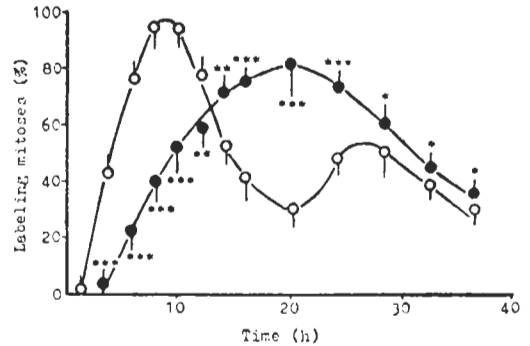


Fig 1. Effects of MST-16 on cell cycle of leukemia L 1210 cells. Labeled mitoses after [³H] TdR (0.74 MBq/mouse) and ip MST-16 (50 mg/kg). Control (○), MST-16 (●), n = 6. $\bar{x} \pm SD$.

用药组的 PLM 曲线明显不同于对照组。标记分裂细胞出现较对照组晚, 波形宽、低平, 第 2 波在 36 h 仍未出现。T_C, T_{G₂} 及 T_S 较对照组明显延长。

MST-16、丙亚胺、乙亚胺和丙双吗啉对 T_{G₂} 和 T_S 的影响 测定 T_{G₂} 和 T_S⁽⁵⁾。取 d 6 荷瘤小鼠 15 只, 分 5 组。ip [³H] TdR 0.74 MBq/鼠, 作单次标记, ip 秋水仙碱 0.7 mg/kg, 每 4 h 1 次。0.5 h 后取腹水涂片, 给以不同药物。不同时间分别取腹水涂片作放射自显影, 染色。镜检 1000 个细胞, 统计间期标记细胞/间期未标记细胞之比率 (LIC/ULIC), 并对时间作图 (图 2)。

注入秋水仙碱后, S 期细胞被标记, 同时 M 期细胞被阻断, 此时 LIC/ULIC 为 S/(G₂ + G₁ + G₀)。随时间的推移, G₂ 期细胞进入 M 期, 比值升高。从注入 [³H] TdR 到比值达峰值的时间为 T_{G₂}。经过一个 T_{G₂} 后, 标记细胞始进入 M 期, 比值下降。从峰值降到 0 的时间为 T_S。用最小二乘法作直线拟合并计算 T_{G₂} 和

T_S , 结果见图 2、表 1。

从图表可看出: 丙亚胺明显延长 T_{G_2} 及 T_S , 使 T_{G_2} 及 T_S 各延长近 1 倍。乙亚胺的作用相似于丙亚胺, 但稍弱于丙亚胺。丙双吗啉对 T_{G_2} 无明显延长作用, 但延长 T_S 的作用最强 (延长 1.3 倍)。MST-16 也明显延长 T_{G_2} , 对 T_S 的作用稍弱于其他三药。

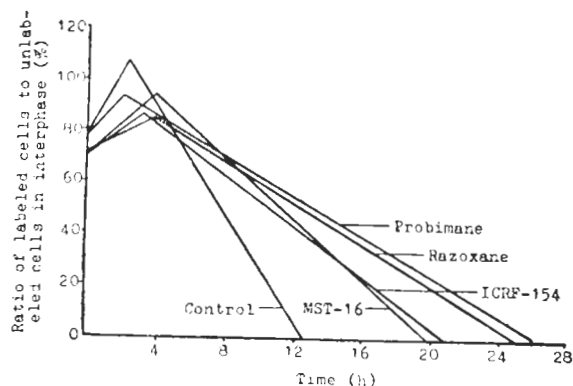


Fig 2. Effects of ip MST-16, probimane, razoxane and ICRF-154 (50 mg/kg) on T_{G_2} and T_S of leukemia L 1210 cells. The ascending limbs of the curves stand for T_{G_2} and the descending limbs for T_S .

Tab 1. The length of G 2 and S phase (T_{G_2} , T_S) of leukemia L 1210 cells after ip MST-16, razoxane, ICRF-154 and probimane (50 mg/kg).

Drugs	T_{G_2} (h)	T_S (h)
Control	2.1	10.5
Razoxane	4.0	21.0
ICRF-154	3.5	17.5
Probimane	2.0	24.0
MST-16	4.0	16.0

对 G 2 期细胞向 M 期过渡的影响⁽⁶⁾ 取 12 只 d 6 荷瘤小鼠分 4 组: 对照组、MST-16 组、秋水仙碱组, 秋水仙碱和 MST-16 合用组。给药后不同时间取腹水涂片, 固定染色, 镜检 1000-2000 个细胞中分裂细胞数, 换算成 % 即分裂指数 (mitotic index, MI)。结果见图 3。

对照组的 MI 在实验过程中无明显变化, 波动在 $2.3 \pm 0.1\%$ 。单用 MST-16 组, 用药后 2 h, MI 即明显下降, 4 h 降至 $0.6 \pm 0.2\%$ 。秋水仙碱组, MI 很快升高, 6 h 升至 $7.7 \pm$

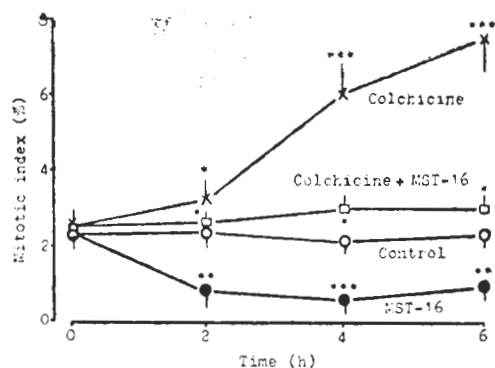


Fig 3. Effects of MST-16 on G 2 cells into M phase of leukemia L 1210 cells. Mitotic indices after ip MST-16 (50 mg/kg) or colchicine (0.7 mg/kg). $n=6$, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

2.0%。而秋水仙碱与 MST-16 合用组, MI 仅略有上升。说明 MST-16 延缓 G 2 期细胞向 M 期的过渡。

对 G 1 期细胞的影响 采用连续标记法⁽⁵⁾。取 d 6 荷瘤小鼠 6 只分 2 组, 每隔 1 h ip $[^3H]TdR$ 0.18 MBq/鼠, 同时 ip 秋水仙碱 0.7 mg/kg。首次 ip $[^3H]TdR$ 后 0.5 h 取腹水涂片并给药, 以后每隔 1 h 分别取腹水涂片作放射自显影, 镜检 1000-2000 个细胞中的标记细胞数即标记指数 (labeling index, LI)。结果见图 4。

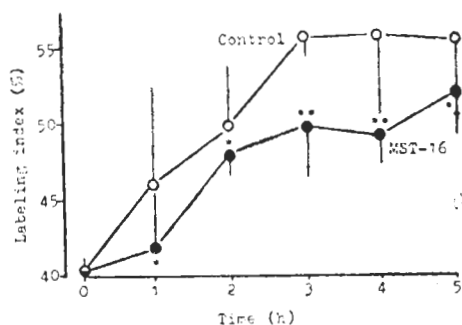


Fig 4. Effects of MST-16 on G 1 phase of leukemia L 1210 cells. Labeling indices after continuous $[^3H]TdR$ labeling and ip colchicine (0.7 mg/kg). Control (\circ), MST-16 (\bullet 50 mg/kg, ip). $n=6$, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$; ** $p < 0.05$.

给予秋水仙碱后, 阻断了 M 期细胞向 G 1 期的过渡, 而不影响 G 1 期细胞进入 S 期。随时间的推移, LI 渐升高, 当 G 1 期细胞全部

进入 S 期时, LI 达峰值, 其所需时间为 $T_{O_1} = 3 \text{ h}$. 用药组的 LI 升高较对照组稍缓慢, 说明 G 1 期细胞也延缓进入 S 期, 致 T_{O_1} 延长.

对 G 0 期细胞的影响⁽⁷⁾ 取 d 9 荷瘤小鼠 6 只, 每隔 4 h ip $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 0.18 MBq/鼠, 共 7 次. 第 6 次取腹水后给药, 观察不同时间的 LI 及给药后非标记细胞损伤率(图 5).

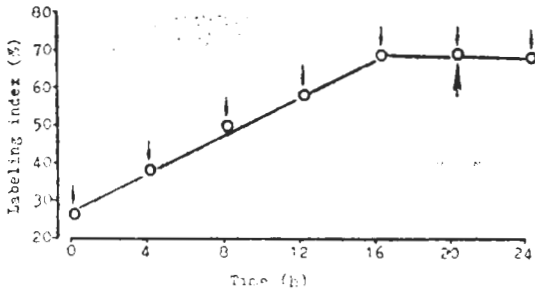


Fig 5. Labeling indices of leukemia L1210 cells after continuous $[^3\text{H}]\text{TdR}$ labeling. (\downarrow) ip $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 0.18 MBq/mouse, (\uparrow) ip MST-16 50 mg/kg. n = 6

连续给予 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 后, LI 线性上升, 至 16 h 达坪值. 将达坪值后的未标记细胞视为 G 0 期细胞, 约占 32.5%. 不具标记的损伤细胞视为损伤的 G 0 期细胞, 约为 1.7%, 与对照组的自然损伤率 2.7% 相比无显著意义. 说明 MST-16 对 G 0 期细胞无损伤作用.

讨 论

本文结果证明: MST-16 对 L 1210 细胞的 T_{O_2} , T_s 及 T_{O_1} 均有延长作用, 从而导致 T_c 延长. 这可能是其抑制肿瘤细胞增殖的原因之一. MST-16 对 G 0 期细胞无损伤作用, 可能是周期特异性抗癌药. G 2 期或 G 1 期的蛋白质合成被干扰, 细胞则不能进入 M 期或 S 期^(8,9), 本实验室的工作曾表明⁽¹⁰⁾: MST-16 较明显而迅速抑制蛋白质合成, 也抑制 DNA 合成. 推测, MST-16 的这一作用导致 T_{O_2} 及 T_{O_1} 的延长, 使细胞不能进入 DNA 合成期和细胞分裂期, 继之细胞死亡.

丙亚胺、乙亚胺、丙双吗啉和 MST-16 属

同类药物, 由于其结构上存有异同, 使其对 T_{O_2} 及 T_s 的作用也表现出异同. 丙亚胺可以阻断 G 2 期细胞, 导致 T_{O_2} 延长及 G 2 期细胞的堆积, 且堆积的 G 2 期细胞的集落形成能力明显低于其他期细胞. 说明丙亚胺的 G 2 阻断作用是其抑制肿瘤细胞增殖的原因之一^(11,12). 本实验表明: MST-16 延缓 G 2 期细胞向 M 期的过渡, 并延长 T_{O_2} , 且这一作用较延长 T_{O_1} 及 T_s 为强. 提示 MST-16 也有阻断 G 2 期细胞的作用, 而且可能是其抑制肿瘤细胞增殖的主要机理.

4 药物不同程度地延长 T_s , 以丙双吗啉的作用最强. 说明 S 期 DNA 合成受抑. 由于 DNA 合成是细胞分裂所必需的, 所以 DNA 合成受抑必然导致细胞分裂的抑制或异常分裂. 至于上述 4 药抑制 DNA 合成的具体环节及其与 G 2 期延长的相互关系, 则有待探讨.

参 考 文 献

- 1 Creighton AM, Hellmann K, Whitecross S. Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature* 1969; 222 : 384
- 2 张覃沐、王绵英、王庆端、任云峰. 丙双吗啉的抗肿瘤作用、毒性及对小鼠免疫功能的影响. *中国药理学报* 1987; 8 : 369
- 3 Cai JC, Shu HL, Tang CF, et al. MST-16 and ZSB-21, new antitumor agents. In: Ishigami J, ed. *Recent advances in chemotherapy*. Tokyo: Univ. Tokyo Press, 1985 : 582-4
- 4 Wheeler GP, Bowdon BJ, Wilkoff LJ, Dulmage EA. The cell cycle of leukemia L1210 cells *in vivo* and *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126 : 903
- 5 Maekawa T, Tsuchiya J. A method for the direct estimation of the length of G1, S and G2 phase. *Exp Cell Res* 1968; 53 : 55
- 6 王绵英、林晨、张覃沐. 冬凌草甲素对小鼠白血病 L1210 细胞动力学的影响. *中国药理学报* 1985; 6 : 195
- 7 Hartmann NR, Dombernowsky P. Autoradiographic and cytophotometric analyses of the resting stages of the L1210 ascites tumor. *Cancer Res* 1974; 34 : 3296
- 8 Terasima T, Yasukawa M. Synthesis of G1 protein preceding DNA synthesis in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 1966; 44 : 669

- 9 Donnelly GM, Siskin JE. RNA and protein synthesis required for entry of cells into mitosis and during the mitotic cycle. *Ibid* 1967; 46 : 93
- 10 何华、王绵英、张翠沐,等. MST-16对L1210细胞和EAC细胞的DNA, RNA和蛋白质合成的影响. 河南医科大学学报 1989; 24 (1)
- 11 Edgar DH, Creighton AM. ICRF 159-induced

- cell-cycle perturbation *in vitro*: its relationship to inhibition of colony-forming ability. *Br J Cancer* 1981; 44 : 236
- 12 Taylor IW, Bleehen NM. Changes in sensitivity to radiation and ICRF 159 during the life of monolayer cultures of EMT6 tumour line. *Ibid* 1977; 35 : 587

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul; 9 (4) : 369-373

Cytokinetic effects of 1,2-bis(4-isobutoxycarbonyloxymethyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane (MST-16) on leukemia L1210 cells in mice

HE Hua, WANG Mian-Ying, ZHANG Tan-Mu
(Henan Medical Institute, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT MST-16 is a new antitumor agent, which was first synthesized by Cai JC in China. The cytokinetic effects of MST-16 on leukemia L1210 cells were studied with autoradiography and stathmokinetic technique. By means of the method of percentage of labeling mitosis (PLM), the values of the cell cycle of logarithmically growing cells were obtained: $T_C = 16.5$ h, $T_{G_1} = 2.1$ h, $T_S = 10.2$ h, $T_{G_2} = 3.7$ h, and $T_M = 0.5$ h. The PLM curve became irregular, flattened and shifted to the right, and the prolongations of T_C , T_{G_2} and T_S after the treatment with MST-16 were evident. With mitotic index (MI) method, the blockage of G2 phase cells to M phase by MST-16 was shown. Using the pulse or continuous labeling technique, T_{G_2} , T_S and T_{G_1} were estimated as 2.1 h, 10.5 h and 3.0 h respec-

tively, and the prolongations of T_{G_2} , T_S and T_{G_1} by MST-16 were further proved. The percentage of the cells in G0 phase on d 9 was 32.5% after continuous labeling for 24 h, and MST-16 had no detrimental effect on them. Razoxane and 1,2-bis (3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane (ICRF-154) could prolong both T_{G_2} and T_S but ICRF-154 was less potent at the same dose level. probimane could prolong T_S and elicited no effect on T_{G_2} .

KEY WORDS 1,2-bis (4-isobutoxycarbonyloxymethyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane (MST-16); razoxane; 1,2-bis (3,5-dioxopiperazin-1-yl) ethane (ICRF-154); probimane; leukemia L1210; cell cycle; autoradiography; inbred DBA mice