

卡氮芥与铜铁制剂 联合用于抗脑胶质瘤的动物实验

周永兴* 周 舒

(临床医学研究所生理病理生理室)

摘要 采用诱发小鼠脑胶质母细胞瘤 G₄₂₂ 瘤株进行卡氮芥 (BCNU) 与铜铁制剂 (AC 7851) 联合用于抗脑胶质瘤, 结果显示: 小剂量 BCNU (10 mg/kg) 与 AC 7851 (0.96 g/kg) 联合应用, 荷瘤小鼠生存期延长 23.62%~40.09%; 且能明显抑制肿瘤生长, 抑瘤率为 54.60%~81.90%。联合用药时使肿瘤细胞周期 G₁ 期细胞减少 10.6%, S 期细胞增加 10.4%。同时使骨髓造血祖细胞 (GM-CFU) 克隆形成率恢复正常。上述结果表明 AC 7851 可增强 BCNU 的抗脑胶质瘤作用, 同时减轻 BCNU 的骨髓抑制作用。

关键词 卡氮芥 克癌 7851 抗脑胶质瘤作用

THE EFFECT OF BCNU COMBINED WITH AC 7851 ON GLIOMA IN MICE

Zhou Yongxing and Zhou Shu

1993, 7(3): 136

(Department of Physiology & Pathophysiology, Institute of Clinical Medical Sciences)

Abstract: The animal model of glioblastoma (G₄₂₂) established in Kunming mice was used for studying the anticancer effect of BCNU combined AC 7851. The results showed: The survival time of tumor-bearing mice treated with BCNU and AC 7851 was markedly prolonged as compared with that of the control group. The life span was significantly increased by 23.60% to 40.09%. The tumor inhibitory rate was 54.60%~81.90%. Meanwhile, in BCNU combined with AC 7851 treatment group, the phase of G₁ cell increased by 10.6%, the phase of S cell increased by 10.4% as compared with those of control group. Moreover, in BCNU combined with AC 7851 treatment group GM-CFU maintained in normal level. The above results suggest that BCNU combined with AC 7851 might be used effectively for glioblastoma patient.

Key words: carmustine; anticancer 7851; effect of ntiglioma

中枢神经系统肿瘤中脑胶质瘤发病率占首位, 卡氮芥 (carmustine, BCNU) 疗效好, 但其致命的副作用是骨髓抑制。克癌 7851 (anticancer 7851, AC 7851) 在抗肿瘤的同时对骨髓造血功能有一定的促进作用。我们将小剂量 BCNU 与 AC 7851 联合应用于抗诱发脑胶质瘤的动物, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性昆明种小鼠, 体重 18~20g。

诱发昆明小鼠脑胶质母细胞瘤的瘤株 G₄₂₂ 由北京神经外科研究所提供。

无菌条件下取新鲜瘤组织 0.5 g, RPMI-1640 培养液内漂洗并剪成 1 mm³ 大小。10 ml

* 男, 29 岁, 病理生理学博士研究生

细胞匀浆器制成细胞悬液。台盘兰 (trypan blue) 染色后活细胞计数, 调节细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。取 0.1 ml 细胞悬液接种小鼠, 造成脑胶质瘤实体瘤模型。

1.2 观察项目及实验分组

观察生存期与生存期延长率; 测量瘤重与抑瘤率; 测定细胞周期分布及 DNA 含量; 测定骨髓造血祖细胞 (hemopoietic progenitor, GM-CFU)。每项实验均设对照组、单纯使用 AC 7851 组、单纯使用 BCNU 组、AC 7851 与 BCNU 联合用药组。各实验组重复实验 2 次, 每次用荷瘤 (G_{422}) 小鼠 10 只。

1.3 给药方法

对照组: 用去离子水灌喂小鼠, 0.3 ml/只 · d, 连续 30d。

AC 7851 组: 从接种肿瘤的第 3d 开始给小鼠灌喂 AC 7851, 0.3 ml/只 · d, 连续 30d。AC 7851 主要含有 Cu 2 mg、Fe 6 mg。在预实验的基础上, 选定 AC 7851 的临界剂量为 960 mg/kg, 配成 64 mg/ml 的 AC 7851 溶液。

BCNU 组: 于接种肿瘤后 3d 给小鼠腹腔注射 BCNU 1 次, 0.2 ml/只。BCNU (天津人民制药厂生产) 为酒精溶液, 1.5 ml/支, 含 BCNU 125 mg。在预实验的基础上, 选定 BCNU 的临界剂量为 10 mg/kg, 用生理盐水配成 2 mg/ml 溶液, 按 10 mg/kg 小鼠给药。

AC 7851+BCNU 联合用药组: AC 7851 与 BCNU 按单纯给药组剂量和方法给药。

1.4 观察项目的指标

生存期与生存期延长率 逐日观察各组动物死亡与活存数, 计算第 40d 平均活存时间。

瘤重与抑瘤率 给药后第 14d 时测量肿瘤重量并计算抑瘤率。

细胞周期分布及 DNA 含量测定 用药后 14d 取各组新鲜瘤组织 0.5g, 每组取 5 个标本, 制成单细胞悬液。用 PI 对 DNA 染色, FACS 420 型流式细胞光度仪测细胞周期分布组方图、细胞周期分布百分比及 DNA 含量。

GM-CFU 测定 用药后 14d 处死动物, 无菌条件下每只小鼠取一根股骨, 将每组三根股骨骨髓细胞合并冲入 2 ml RPMI-1640 培养液中, 混匀稀释成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度有核细胞悬液, 冰浴中待培养。采用改良双层琼脂培养法^[1], CO_2 温箱, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度下培养 5d, 40 倍显微镜下计细胞集落数。

2 结果

2.1 生存期及生存期延长率见表 1

联合用药组生存期比对照组延长 3.93~8.37d, 生存期延长率为 23.62%~40.09%, 两组比较有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.2 瘤重及抑瘤率见表 2

联合用药组瘤重为 0.358~0.846 g。肿瘤抑制率为 54.6%~81.2%, 统计学分析均有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3 肿瘤细胞周期及 DNA 含量

BCNU 使 G_1 期细胞增加 5.4%, 与对照组比较有显著性差异 ($p < 0.05$)。联合用药组

表 1 荷瘤 (G_{422}) 小鼠各组生存期比较

批次	实验分组	动物数	药物剂量 mg/kg		生存天数 $\bar{x} \pm s$	活存延长率 %	t 检验		
			BCNU	AC 7851			A	B	C
I	对照	10			16.64 ± 1.03				
	BCNU	10	10		17.11 ± 2.25	2.28	$p > 0.05$		
	AC 7851	10		960	17.75 ± 3.06	6.67	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
	联合	10	10	960	20.57 ± 4.80	23.62	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
II	对照	10	10		20.88 ± 7.68				
	BCNU	10	10		25.75 ± 8.94	25.3	$p > 0.05$		
	AC 7851	10		960	24.07 ± 9.49	15.28	$p < 0.05$	$p > 0.05$	
	联合	10	10	960	29.25 ± 9.40	40.09	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

注 A: 与对照组比较; B: 与 BCNU 组比较; C: 与 AC7851 比较 (表 2、4 同)

表2 荷瘤 (G_{422}) 小鼠各组抑瘤率比较

批次	实验分组	动物数	药物剂量 mg/kg		瘤重 $\bar{x} \pm s$	抑瘤率 %	t 检验		
			BCNU	AC 7851			A	B	C
I	对照	10				1.862 ± 0.990			
	BCNU	10	10		1.751 ± 0.589	6.0	$p > 0.05$		
	AC 7851	10		960	1.723 ± 0.433	7.5	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
	联合	10	10	960	0.846 ± 0.897	54.6	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$
II	对照	10				1.900 ± 0.693			
	BCNU	10	10		1.751 ± 0.589	6.0	$p > 0.05$		
	AC 7851	10		960	1.703 ± 0.233	10.4	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
	联合	10	10	960	0.358 ± 0.170	81.2	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.05$

表3 荷瘤 (G_{422}) 小鼠各组 G_{422} 细胞周期及 DNA 含量的比较

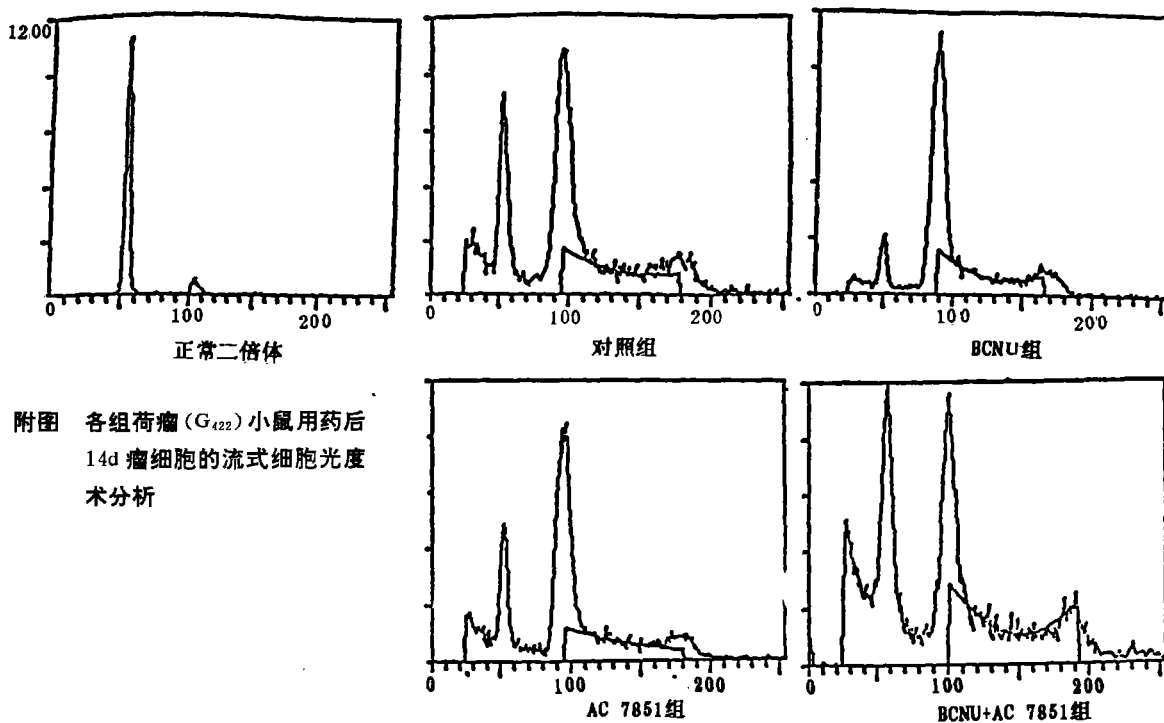
实验分组	动物数	药物剂量 mg/kg		细胞百分数			DNA 含量
		BCNU	AC 7851	G_1	S	G_2M	
对照	10			53.0 ± 2.74	37.2 ± 3.83	9.2 ± 3.03	120.34 ± 1.97
BCNU	10	10		$58.4 \pm 2.79^{**}$	34.2 ± 4.60	7.2 ± 2.39	121.30 ± 3.25
AC 7851	10		960	54.6 ± 3.13	39.4 ± 3.85	6.2 ± 2.68	120.37 ± 1.37
联合	10	10	960	$42.4 \pm 4.28^{***}$	$47.6 \pm 6.80^{**}$	9.8 ± 3.11	$116.44 \pm 3.00^{**}$

** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

G_1 期细胞减少 10.6%，S 期细胞增加 10.4%；DNA 含量减少，均有统计学差异 (表 3)。细胞周期分布组方图见附图。

GM-CFU 克隆形成数：BCNU 组降低 ($p < 0.01$)；AC 7851 组增加；联合用药组克隆数正常，与 BCNU 组比较有显著性差异 (表 4)。

2.4 造血功能



附图 各组荷瘤 (G_{422}) 小鼠用药后 14d 瘤细胞的流式细胞光度术分析

表4 荷瘤(G₄₂₂)小鼠各组骨髓造血功能比较

实验分组	动物数	药物剂量 mg/kg		GM-CFU/股骨 $\bar{x} \pm s$	t 检验		
		BCNU	AC 7851		A	B	C
对照	10			4390.2 ± 536.8			
BCNU	10	10		1375.5 ± 150.1	$p < 0.01$		
AC 7851	10		960	5828.0 ± 2335.4	$p > 0.05$	$p < 0.01$	
联合	10	10	960	4612.5 ± 461.3	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$

3 讨论

BCNU 是目前治疗脑胶质瘤最有效的化疗药物之一。是一种细胞周期非特异性药物,通过烷化反应损伤 DNA 而达到抗肿瘤作用。

BCNU 的重要副作用是骨髓抑制,影响了临床应用范围。既往采用大剂量 BCNU 和自体骨髓移植并用,取得一定疗效。本文利用 AC 7851 具有一定的抗肿瘤效应,同时对骨髓造血功能又有一定促进作用的特点^[1],将其与小剂量 BCNU 联合应用于荷瘤(G₄₂₂)小鼠,结果表明 AC 7851 可增强 BCNU 的抗肿瘤效应,减轻 BCNU 的骨髓抑制。这一结果与 AC 7851 的组成密切相关,AC 7851 是以铜铁微量元素为主的抗肿瘤药物,近年资料表明,铜可抑制或抵消多种致癌物的致癌作用。^[2] 某些铜化合物有抗肿瘤效应,而且铜离子在某些化疗药物抗肿瘤过程中起重要作用,如二异丙基水杨酸铜(Cu(II)₂(3,5-disopropylsalicylate)₄, CuDIPS)、硫酸铜等可抑制肿瘤的生长和癌细胞的增殖。^[3~5] CuDIPS 与吐温 80(tween 80)及环磷酰胺联合应用,可延长荷瘤动物生存期,增强抑瘤作用。^[5] 另外,化疗药如鬼臼乙叉甙(VP₁₆)、阿霉素等发挥抗肿瘤作用需要铜离子介导。^[6,7] 肿瘤患者血清铁水平显著降低。各种实体肿瘤常被含大量铁蛋白或铁的巨噬细胞所包绕。^[8] 严重缺铁可能有类似助癌剂的作用。Kapf-Maier^[9]研究了 4 种铁的复合物,证明其对 B₁₆黑色素瘤和结肠癌₃₈有明显的抑制作用。

流式细胞光度仪分析结果表明,BCNU 使肿瘤细胞阻滞在 G₁ 期,BCNU 与 AC 7851 联合

应用时 G₁ 期细胞减少而 S 期细胞增多。这与药物诱导 G₀ 期细胞进入增殖周期,及联合用药使肿瘤细胞阻滞在 S 期,抑制了肿瘤细胞的有丝分裂有关。同时联合用药使肿瘤细胞 DNA 含量减少,提示联合用药有诱导肿瘤细胞向正常细胞分化的趋势,这点还有待于进一步研究。

GM-CFU 克隆形成试验能直接反应骨髓再生能力。本结果(表 4)可以看出,BCNU 明显抑制骨髓造血功能;而 BCNU 与 AC 7851 联合应用时,BCNU 的骨髓抑制作用得以改善,这与 AC 7851 的铜铁成份作用有关。众所周知,铁是造血所必需的原料,而铜参与造血过程,影响铁的吸收、运送和利用,铜能促进铁由贮存场所进入骨髓。动物缺铜可出现组织贮存铁动员困难、骨髓内铁利用困难、骨髓造血基地缩小。铜能诱导骨髓干细胞金属硫蛋白的高表达,而金属硫蛋白能有效地消除烷化剂类药物如 BCNU、ACNU 对骨髓细胞的损伤作用,从而使骨髓抑制得以缓解。^[10] 铜、铁对 BCNU 造血系统毒性的保护作用的分子机制有待于进一步深入研究。

(本文得到迟永春副研究员、万方、徐梅、杜浩萍老师的大力协助,谨此致谢。)

4 参考文献

- 1 迟永春,周舒,赵武述,等.克癌 7851 对荷瘤小鼠造血与免疫功能的影响.中日友好医院学报,1991,5(3):135
- 2 Issaacs JP. Trace Substances in Environmental Health. Vol 2. Hemphill DD Ed. Univ Missouri, Columbia Missouri, 1973. 323
- 3 Crispens CG, Jr Sorenson JR. Evaluation of the anticancer activity of CuDIPS in SJL/mice. Anticancer Res, 1988, 8: 79
- 4 Sorenson JR, Soderberg LS, Chidambaram MV, et al. Bioavailable copper complexes offer a physiologic approach to treatment

- of chronic disease. *Adv-Exp-Med-Biol*, 1989, 258: 229
- 5 Crispens CG, Jr Chidambaram MV, Torregrosa D, et al. Pharmacokinetics of CuDIPS in mice. *Anticancer Res*, 1989, 9: 1213
- 6 Shinha BK, Antholine WM, Kalyanaraman B, et al. Copper ion-dependent Oxy-radical mediated DNA damage from dihydroxy derivative of etoposide. *Biochim-Biophys-Acta*, 1990, 1096: 81
- 7 Wallace DB. Nonenzymatic oxygen activation and stimulation of lipid peroxidation by doxorubicin-copper. *Toxicol-Appl-Pharmacol*, 1986, 86: 69
- 8 Weinberg ED. Iron in neoplastic disease. *Nutrition and Cancer*, 1983, 4: 223
- 9 Kapf-Maier P, Skem-Len M, Wer-Klich D, et al. Tumor inhibition by ferric-nitrosyl complexes, Activity against some solid experimental tumors. *Arzneimittelforschung (Germany)*, 1989, 39: 369
- 10 Blalock TL, Durr MA, Cousins RJ, et al. Metallothionein gene expression in rats tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J Nutr*, 1988, 118: 222
- (1993-04-01 收稿 1993-05-29 修回)

• 短篇报道 •

前置胎盘 23 例临床分析

郭玉清 刘 颖 (妇产科)

1 临床资料

1989年1月1日~1991年12月31日我科共收治妊娠合并前置胎盘患者23例,占同期分娩总数(2113例)的1.09%。年龄24~34岁,平均28岁。23例中有流产史者14例;初产妇18例、经产妇5例(其中2例有2次剖宫产史、1例因前置胎盘剖宫产史;自然分娩中1例有胎盘粘连史)。

23例孕妇产前均做过B超声检查(1~9次),分娩前最后一次B超声检查结果均与临床符合(距分娩前1~4d)。23例中,中央性前置胎盘8例、部分性前置胎盘4例、边缘性前置胎盘4例、低置胎盘7例。

23例中产前有阴道出血者仅12例,占52.17%,出血量2~500 ml。其中3例出血量>200 ml者,均急行剖宫产;余20例出血量少和无出血者给予期待疗法,历时5~121d,平均42d。

23例孕妇分娩时孕周28周1d~40周4d。中央性、部分性、边缘性前置胎盘16例,均行剖宫产;低置胎盘7例中4例行剖宫产、3例顺产。剖宫产率86.96%,明显高于同期剖宫产率(32.4%)。12例中央性及边缘性前置胎盘中,因胎盘植入行子宫切除术2例。胎盘植入者占前置胎盘总数的8.7%;粘连胎盘5例。

23例中产后出血9例,占39.1%,明显高于同期产后出血率(1.13%)。其中中央性前置胎盘5例、部分性和边缘性前置胎盘各2例。9例产后出血者中出血量≥1000 ml者7例,余2例出血量<1000 ml。1例出血量多达5500 ml,为中央性前置胎盘合并胎盘植入。

新生儿体重<2500 g 3例,其中2例为双胎儿,胎龄31周,体重分别为1500 g及1020 g,均成活。1例28周1d,因产前出血剖宫,婴儿1300 g,家属放弃抢救。新生儿体重2500~4000 g者19例(其中>4000 g者2例)。围产儿死亡率为43.5%。

2 讨论

前置胎盘发病的高危因素有:多次人工流产史、剖宫产史等。前置胎盘常合并胎盘植入,这是因为子宫下段的蜕膜较薄,孕卵滋养层容易侵入肌层。粘连胎盘也常与前置胎盘合并存在,两者有共同的发病原因。因此降低人工流产及剖宫产率,可减少再次妊娠时前置胎盘、胎盘植入及粘连的发生。

妊娠晚期无痛性反复阴道出血被认为是前置胎盘的主要症状,但本组8例中央性前置胎盘中4例未发生产前出血,这与孕期常规超声检查得以早期提示胎盘位置并及时处理有关。

对于产前出血<200 ml及妊娠尚不足月的孕妇,我们采取期待疗法,维持妊娠达足月或近足月,新生儿全部成活。我们认为早期诊断前置胎盘并采用期待疗法是减少围产儿死亡率的有效措施。

前置胎盘产妇产后出血远高于正常产妇,如果前置胎盘合并植入或粘连,产后出血更多。因此选择恰当的分娩方式极为重要。本组除3例低置胎盘在严密观察下顺产外,其余20例均行剖宫产分娩。合并胎盘植入子宫下段时,由于组织脆弱往往难以逐层缝合止血,宜及早行全子宫切除术。

(1992-02-24 收稿 1993-04-14 第3次修回)