

邻脂苯芥对家兔 Brown-Pearce 癌的疗效 及对细胞核分裂的影响*

楊金龍 胥 彬

(中国科学院药物研究所, 上海)

提要 邻脂苯芥实验室编号为 AT-581, 是一个新的氮芥化合物, 化学名为: 邻双(2-氯乙基) 氨甲基-苯丙氨酸二盐酸盐。本工作进一步研究了该药对家兔 Brown-Pearce 癌的疗效和对细胞核分裂及一般形态的影响。获得的结果如下:

(1) 以 Brown-Pearce 癌组织匀浆或瘤块接种于家兔眼前房, 3 天后开始以 AT-581 治疗。静脉注射 0.7 毫克/公斤时, 肿瘤重量抑制率为 48—78%, 疗效非常显著。眼内注射 0.015, 0.03 和 0.06 毫克/每眼时, 肿瘤重量抑制率分别为 57, 61 和 63%, 与对照组比较, 差异非常显著。

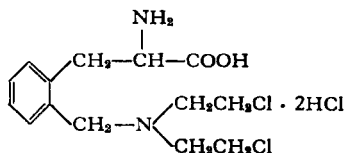
(2) 用 AT-581 0.7 毫克/公斤/天静脉注射 3 和 7 天, 能使癌细胞核分裂指数减低, 对分裂象各期也有抑制作用。其中以注射 7 天组的作用最明显。癌细胞一般形态的改变包括细胞排列紊乱和体积缩小, 核固缩、破裂和出现癌组织的大批坏死。

(3) 一次静脉注射 AT-581, 小剂量时先呈现刺激细胞生长的作用, 继之出现强烈的抑制效能。大剂量时一开始就出现核分裂抑制, 各期分裂象明显下降和细胞体积缩小。

邻脂苯芥(AT-581)是一种脂肪型氮芥, 系将 HN_2 甲基上的一个氮原子由苯丙氨酸基(在苯环邻位上)取代而得, 其化学名为邻双(2-氯乙基)氨甲基-苯丙氨酸二盐酸盐。我们曾发现它对静脉接种的家兔 Brown-Pearce 癌有较好的疗效^[1]。本工作进一步研究 AT-581 对家兔眼前房内接种的肿瘤的治疗作用; 同时还观察它对癌细胞有丝分裂和一般形态的影响, 以期对其作用机制有所阐明。

材 料 与 方 法

AT-581 系白色粉末。其化学结构式如下:



此药易吸水, 需在干燥环境中快速称取, 用生理盐水配制成所需的溶液。

实验动物选用体重 1.5—2.5 公斤的雌性家兔, 严格剔除有外眼病者, 经短期饲养后应

本文于 1964 年 3 月 26 日收到。

* 本文曾在 1963 年 11 月上海市药学会 1963 年年会上宣读。

用。肿瘤是用眼内转移或鞣丸内接种后 2—3 周的 Brown-Pearce 癌。在无菌操作下取出肿瘤,按 1:1 (体积/重量)的比例加入 5.3% 葡萄糖溶液,研磨成匀浆;或切成 1 毫米直径的肿瘤块。接种方法有插块和匀浆法两种。前者参考文献报导^[2,3],以套管针在角膜边缘刺入前房,接种瘤块 1 枚。后者的接种法即以 2.5% 戊巴比妥钠静脉麻醉动物,用结核菌疫苗注射器吸取悬液,从家兔眼球的巩膜进针,穿过睫状韧带,经后房和瞳孔到达前房,每侧眼内注射肿瘤悬液 0.1 毫升。此方法操作简便,肿瘤成活率高。由于角膜仍然保持完整,大大降低接种污染率,肿瘤生长比较均匀。

(一) 疗效试验

在肿瘤接种后 3 天开始给药,每天静脉注射 1 次,共 7 天;对照组以同样方法注射等量生理盐水。眼内给药方法与肿瘤匀浆接种法相似,于一侧眼内注射药物 0.1 毫升,每天 1 次,共 2 天;另一侧眼作为空白对照。所有家兔分别于 11 或 15 天,用气栓窒息处死。参考 Gellhorn 等^[4,5]的方法,将虹膜和肿瘤一并取出,称其重量。用生物统计方法(t 测验)比较给药与对照组瘤重的差异显著性,以判断药物有无抑制肿瘤的作用。

(二) AT-581 对细胞有丝分裂和一般形态的影响

肿瘤以匀浆法接种于眼前房,实验分下列二部分:

1. 多次给药的影响 选家兔 16 只,分成 4 组,每组 4 只。第 1 组,在肿瘤接种后 3 天开始静脉注射 AT-581 0.7 毫克/公斤,每天 1 次,共 3 天;第 2 组注射生理盐水作对照。第 3 组,用同样方法注射 AT-581 0.7 毫克/公斤,共 7 天;第 4 组作对照。停药后次日处死动物,取出肿瘤,以福尔马林或 Zenker 液固定,石蜡切片,苏木素-伊红染色,进行细胞核分裂观察。对细胞分裂数的观察,采用一般计数方法^[6,7],于每片中取均匀五点,检查 3000 个瘤细胞中有丝分裂细胞的数目,并求其分裂指数。另按通常分期标准^[8,9],检查 100 个有丝分裂细胞中分裂象各期的比例数。此外,还进行一般形态的观察。

2. 单次给药的影响 选家兔 30 只,分成 3 组,每组 10 只。于肿瘤接种后 3 天,选其中二组,分别于家兔耳缘静脉内注射 AT-581 0.7 和 2.8 毫克/公斤;另一组注射生理盐水作对照。在给药后第 1, 2, 3, 5 和 10 天,每组任选动物 2 只,处死后取出肿瘤,如上述方法,检查分裂指数和分裂象各期的比例数及作一般形态的观察。

结 果

(一) 疗效试验

静脉注射 AT-581 对家兔眼前房接种 Brown-Pearce 癌的影响 在第 I 批实验中,肿瘤接种采用插块法,瘤块粘附在虹膜上呈局部结节性生长。于肿瘤接种后 3 天开始治疗,结果如表 1。对照组平均瘤重为 1.08 克,而给药组为 0.56 克,两者差异非常显著。实验结束时,对照组体重下降 15%,治疗组下降仅 6%。在第 II 和 III 批实验中,肿瘤均以匀浆法接种,瘤组织吸附在整个虹膜上呈弥漫性生长。用 AT-581 治疗后的平均瘤重分别为 0.47 和 0.34 克,相当于对照组瘤重的 22%,疗效非常显著。治疗结束时,动物体重分别比对照组少下降约 10% 和 6%。

眼内注射 AT-581 对家兔眼前房接种 Brown-Pearce 癌的影响 实验分三组进行,采用匀浆法接种肿瘤。接种后 3 天开始用 AT-581 治疗,每天 1 针,共 2 天。治疗后 9 天

解剖动物,称取瘤重。结果对照组一般瘤重为 3.6—4.6 克;用 0.03, 0.015 和 0.0075 毫克三个不同剂量治疗后,瘤重均明显下降,抑制率分别为 63, 61 和 57%,疗效非常显著(表 2)。

表 1 静脉注射 AT-581 对家兔眼前房接种 Brown-Pearce 癌的影响*

实验批号	组别	接种法	眼前房接种数	药物剂量毫克/公斤/天	平均瘤重±标准差克	与对照组比较抑制率,%	P 值	平均体重,公斤		体重变化 %
								给药前	给药后	
I	对照	插块	31	生理盐水	1.08±0.96	—	—	2.0	1.7	-15
			29	0.7	0.56±0.24	48	<0.001	1.9	1.8	-6
II	对照	匀浆	16	生理盐水	2.08±1.54	—	—	2.0	1.8	-10
			14	0.7	0.47±0.15	78	<0.001	1.7	1.7	0
III	对照	匀浆	8	生理盐水	1.69±0.37	—	—	1.9	1.7	-11
			6	0.7	0.34±0.18	78	<0.001	2.0	1.9	-5

* 肿瘤接种后 72 小时开始给药,每天 1 针,共 7 天,第 11 天解剖

表 2 眼内注射 AT-581 对家兔眼前房接种 Brown-Pearce 癌的影响*

组 别	眼前房接种数	剂 量 毫克/每眼	平均瘤重±标准差 克	与对照组比较 抑制率,%	P 值
对 照	3	—	3.65±0.03	—	—
给 药	3	0.03	1.10±0.06	63	<0.001
对 照	3	—	4.55±0.46	—	—
给 药	3	0.015	1.79±0.50	61	<0.001
对 照	3	—	3.64±1.18	—	—
给 药	3	0.0075	1.56±0.18	57	<0.001

* 肿瘤接种后 72 小时开始给药,每天 1 针,共 2 天,第 15 天解剖。

(二) AT-581 对细胞有丝分裂和一般形态的影响

1. 多次给药的影响 在给药 3 次的治疗组中,分裂指数为 7%,与对照组比较,显著下降。在各期中,以前和中期分裂象的下降较明显(表 3)。在给药 7 次的治疗组中,分裂指数仅为对照组的 1/3,其中分裂各期均有显著的抑制现象。为了进一步了解各期分裂细胞下降百分数,又计数了 100 个分裂细胞。结果证明,中期下降最显著。在注射 3 次组,中期分裂象从对照组的 45% 下降为 36%;7 次组从 43% 下降为 33%,差异显著。

Brown-Pearce 癌是未分化的鳞状上皮细胞癌。当眼内接种后第 7 和 11 天观察,细胞成巢或索状排列,巢与巢之间围有少量纤维组织。细胞为上皮类型的,其大小、形态和染色很不一致。胞浆呈伊红色细颗粒状;核圆形或囊状,可见 1—2 个核仁和不同时期的核分裂。在接种后第 7 天的肿瘤中,坏死较少;第 11 天时,坏死增多,且有嗜中性细胞浸润。用 AT-581 0.7 毫克/公斤 3 针治疗后,形态有明显的改变:细胞排列紊乱,细胞总数下降。大部分细胞体积缩小,少量细胞变大,染色质疏松和核内空泡形成。异常核分裂象增

表 3 AT-581 多次注射对 Brown-Pearce 癌细胞分裂象的影响

药 物	3000 个 瘤 细 胞 中 分 裂 象				分裂指数 (%)
	前	中	后	末	
生理盐水	18±5	20±1	5±0.8	3±0.8	15.3
AT-581 0.7 毫克/公斤 3 针	11±2*	5±1.4**	3±0.6	2±0.6	7.0**
生理盐水	19±2	19±3	4±1.3	3±0.8	15.0
AT-581 0.7 毫克/公斤 7 针	8±1.4**	5±0.8**	2±0.6**	2±0.6*	5.7**

[注] 每组兔数各为 4 只;表内数字为分裂平均数±标准差;有*与注射生理盐水组比较 $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

多,包括染色质浓缩、粘滞,不对称分裂和胞浆粘连、外溢。注射药物 7 针以后,细胞破坏更为明显:细胞核固缩、破裂和出现成批坏死。

2. 一次给药的影响 以 AT-581 0.7 毫克/公斤一次注射,于注射后第 1, 2, 3, 5 和 10 天取样本作显微镜检查。每一样本数 3000 个细胞,结果列于图 1。注射后第 1 天,细胞总数与对照组相近,第 2 天时,分裂指数从对照组 13.5% 增加到 17.5%;

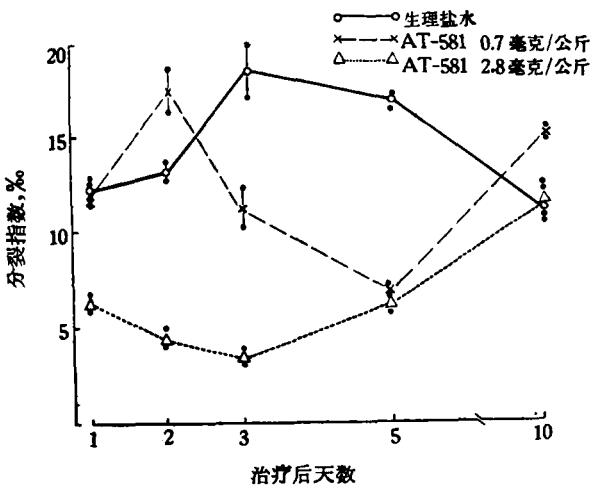


图 1 AT-581 一次注射对 Brown-Pearce 癌细胞分裂指数影响

注: 每组各有家兔 2 只,每一样本数细胞 3000 个。

第 3 天以后,分裂指数开始下降,下降主要是中、后和末期,到第 5 天时,对照组的分裂指数为 16%,而治疗组仅为 6.7%,此时下降包括前、中、后和末期;在第 10 天时,分裂指数回升到正常范围,分裂各期的数值也接近于对照组。当用 2.8 毫克/公斤一次治疗时,第 1 天分裂象各期就有下降,下降最低在第 3 天,分裂指数从 16% 下降至 4%;第 5 天开始回升,第 10 天时接近对照组水平。

AT-581 0.7 毫克/公斤一次注射时,对肿瘤分裂各期的影响如下: 注射后第 1 天,对照组 100 个核分裂细胞中,前、中、后和末期分别占 42, 39, 14 和 5%,而治疗后各期影响不大。第 2 天,前期略有增加,后和末期有所下降,但中期无变化。到第 3 和第 5 天时,中期有较多的下降,与对照组相差 10—11%。第 10 天时,分裂象各期均开始回升。在注射 2.8 毫克/公斤组,于注射后第 1, 2, 3 和 5 天,中期分裂象均比对照组低,其中第 3 天时,比对照组下降 20%,相差很显著。第 10 天时,回复达正常范围。

一次注射 AT-581 0.7 毫克/公斤对 Brown-Pearce 癌一般形态的影响: 第 1 天,细胞体积增大,细胞变圆,染色质排列疏松,血管周围细胞界限不清。第 2 天时细胞仍大,3 天

以后接近于正常大小。第 5 天时，細胞核有濃縮、空泡形成和出現較多的坏死細胞。第 10 天，于血管周圍見有瘤細胞增生，核分裂增多。AT-581 一次注射 2.8 毫克时，第 1 天見大量細胞体积增大，第 2 天开始縮小，核固縮和組織出血。第 3 和第 5 天，組織大批坏死，10 天时，可見少量完整的瘤細胞。

討 論

作者在研究多种藥物对家兔 Brown-Pearce 癌的疗效时，发现 AT-581 的效果較滿意^[1]。本工作进一步証明 AT-581 对眼前房接种的 Brown-Pearce 癌也頗有效，且表現了更強的抑制作用。眼內局部治疗时的疗效也很显著。根据本文的解剖材料，每只眼球的房水量为 0.2—0.3 毫升。以治疗剂量 15 微克計算，即当藥物在局部达到 50—70 微克/毫升浓度时就有很好的疗效。从以上資料可以看出，AT-581 抗 Brown-Pearce 癌的功效，既有直接接触时的作用，又有以靜脉注射通过血流轉运后产生的效果，是一个較強的肿瘤抑制剂。

AT-581 对細胞核分裂的影响和一般氮芥类藥物的作用很相似^[10-12]。将 AT-581 多次注射时，可使細胞分裂指数明显下降。用同一剂量，連續注射 7 針比注射 3 針組下降更显著。分裂象各期的数值均有減少，其中以中期下降最为明显。給药后对肿瘤一般形态的影响表現为：細胞排列紊乱，細胞总数下降、体积縮小和异常核分裂增多。藥物剂量增加时，可以出現核固縮、空泡形成和細胞破裂現象。

氮芥类藥物能影响染色体的合成^[13-15]，此作用可以是持久的，也可以是暫时的^[16,17]。我們用 AT-581 小剂量一次注射时，藥物对 Brown-Pearce 癌細胞的影响，起初有輕微的促进生长作用，表現为分裂指数增加；繼之出現強烈的抑制作用，核分裂明显下降。对一般形态的影响，开始时細胞体积变大，染色质排列疏松；繼之体积縮小，核空泡形成和出現成批坏死。以大剂量一次注射时，細胞分裂指数及分裂象各期第 1 天即有下降，最低在治疗后第 3 天。一次給药，無論是用 0.7 或 2.8 毫克/公斤，对細胞生长的抑制都是暫时的。在給药后 3 或 5 天，分裂指数逐漸回升，在第 10 天时，各期分裂細胞数均已接近正常。

以上实验，特别是連續注射 7 針的結果，是藥物的疗效与形态观察同时进行的。当 AT-581 抑制肿瘤的作用明显时，瘤細胞分裂数的下降及形态的改变也很明显。由此可見，該药的抗癌疗效同抑制核分裂的作用是密切有关的。关于藥物对細胞分裂影响的分类，目前尚无一致看法^[18]。根据本文資料，我們認為，AT-581 对肿瘤生长的抑制作用，主要是破坏靜止期細胞、阻滯細胞进入分裂，另外对分裂过程本身也有影响。

致謝 AT-581 系本所合成室任云峯先生合成并供給，呂腓理同志参加部分技术工作，特此致謝。

参 考 文 献

- [1] 楊金龍、任范友、胥 彬：抗肿瘤藥物的研究 XIX. 几种藥物对家兔 Brown-Pearce 癌的影响，药學学报，1964，11，609—616。
- [2] Greene, H. S. N. and Saxton, J. A.: Uterine Adenomata in the Rabbit. I. Clinical History, Pathology and Preliminary Transplantation Experiments, *J. Exper. Med.*, 1938, 67, 691—708.
- [3] Cohn, I. and Atik, M.: The Influence of Antibiotics on the Spread of Tumors of the Colon: An Experimental Study, *Ann. Surg.*, 1960, 151, 917—929.

- [4] Gellhorn, A. Engelman, M. Shapiro, D. M., Graff, S. and Gillespie, H.: The Effect of 5-Amino-7-hydroxy-1H- δ -triazolo (d)-pyrimidine (guanazolo) on a Variety of Neoplasma in Experimental animals, *Cancer Res.*, 1950, **10**, 170—177.
- [5] Gellhorn, A., Kells, A. and Golino, M.: Mammary Adenocarcinoma 755, Glioma 26 and Brown-Pearce Carcinoma, *Cancer Res. (Suppl.)*, 1955, **3**, 38—43.
- [6] Shapiro, D. M., Weiss, R. and Gellhorn, A.: The Effect of Azaguanine on Mitosis in normal and Neoplastic Tissues, *Cancer*, 1950, **3**, 896—902.
- [7] DuBilier, B. and Warren, S. L.: The Effect of Colchicine on the Mitotic Activity of the Brown-Pearce Rabbit Epithelioma, *Cancer Res.*, 1941, **1**, 960—969.
- [8] Cowdry, E. V.: *Cancer Cells*, W. B. Saunders Company London, 1955, pp. 130—136.
- [9] 周金煦、吴德政、胥彬: 抗肿瘤药物的研究 IX. Sb-71 对 Ehrlich 腹水癌细胞核分裂的影响, *药学报*, 1962, **9**, 29—34.
- [10] Hendry, J. A., Homer, R. F., Rose, F. L. and Walpole, A. L.: Cytotoxic Agents. I. Methylolamides with Tumour Inhibitory Activity and Related Inactive Compounds, *Brit. J. Pharmacol.*, 1954, **6**, 201—234.
- [11] Friedenwald, J. S.: The Action on Nitrogen Mustards and Related Substances on Cell Division, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, **51**, 1423—1442.
- [12] MacCardle, R. C.: Effects of Mitotic Inhibitors on Tumor Cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, **51**, 1489—1496.
- [13] Butler, J. A. V. and Smith, K. A.: The Action of Ionizing Radiations and of Rediomimetic Substances on Deoxyribonucleic Acid. Part. I. The Action of some Compounds of the "Mustard" Type, *J. Chem. Soc.*, 1950, 3411—3418.
- [14] Boyland, E.: Different Types of Carcinogens and Their Possible Modes of Action: A Review, *Cancer Res.*, 1952, **12**, 77—84.
- [15] Boyland, E. and Koller, P. C.: Effect of Urethane on Mitosis in the Walker Rat Carcinoma, *Brit. J. Cancer*, 1954, **8**, 677—684.
- [16] Koller, P. C. and Casarini, A.: Comparison of Cytological Effects induced by X-Rays and Nitrogen Mustard, *Brit. J. Cancer*, 1952, **6**, 173—178.
- [17] Koller, P. C.: Comparative Effects of Alkylating Agents on Cellular Morphology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, **68**, 783—801.
- [18] Biesele, J. J.: *Mitotic Poisons and The Cancer Problem.*, Elsevier Publishing Comp. N. Y. 1958, pp. 5—8.

THERAPEUTIC EFFECT OF AT-581 ON THE BROWN-PEARCE CARCINOMA IN RABBITS AND ITS INFLUENCE ON MITOSIS OF THE TUMOUR CELLS

YANG JIN-LONG AND HSU BIN

(*Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai*)

ABSTRACT

o-[Bis-(2-chloroethyl)-aminomethyl]-phenylalanine dihydrochloride, designed as AT-581, is a new derivative of nitrogen mustard. In this paper we have studied further the therapeutic effect of the drug on the Brown-Pearce carcinoma and its influence on mitosis of the carcinoma cells.

1. In rabbits, the Brown-Pearce carcinoma was transplanted into the anterior chambers of the eye by using the suspension or tumour piece inoculation method, and the treatment with AT-581 was started on the 3rd day after the inoculation. It was found that intravenous injections of 0.7 mg/kg could markedly inhibit the tumour growth, the degree of inhibition being about 48—78%. When the drug was injected intraocularly at the dosages of 0.015, 0.03 and 0.06 mg/eye, the therapeutic effect was also significant.

2. When AT-581 was injected intravenously for 3 or 7 days to rabbits bearing the Brown-Pearce carcinoma, the mitotic index (counting 3000 cells) was decreased significantly and the percentages of all four stages of mitosis were depressed, among them the metaphase being affected most strikingly. Other morphologic changes such as disarrangement and pyknosis of the tumour cells, coagulation and fragmentation of the nuclei, and necrosis of the tumour tissue were also noticed.

3. A single intravenous injection of a small dose of AT-581 produced firstly a stimulating action on the growth of tumour cells, and then a remarkable inhibitory effect. Larger doses of the drug caused immediate mitotic inhibition including a decrease of mitosis in all four stages, and a pyknosis of the tumour cells.