

# 抗癌药 1,2:5,6-二去水卫矛醇与长春新碱联合用药的实验研究

樊亦军 韩锐\* 周军 李茂

(广西中医药研究所, 南宁; \*中国医学科学院药物研究所, 北京)

**提要** 去水卫矛醇 (DAG) 与长春新碱 (VCR) 联合使用, 对小鼠淋巴细胞白血病  $L_{1210}$  有协同疗效, 疗效强度决定于给药方案和剂量。先给 DAG, 24 h 后给 VCR, 协同疗效最高。DAG 剂量是影响疗效的主要因素, 最佳剂量为 3.0 mg/kg。琼脂扩散合试验亦证明二药有方案依赖性协同作用。二药合用对小鼠骨髓干细胞仅有微弱的协同杀灭作用。

**关键词** 1,2:5,6-二去水卫矛醇; 长春新碱; 琼脂扩散合试验; 骨髓干细胞; 小鼠白血病  $L_{1210}$

我们曾报道 DAG 与美登新以一定方式联合使用, 对小鼠淋巴细胞白血病  $L_{1210}$  及 EAC 有协同疗效, 而对骨髓干细胞的杀灭却未超过“相加作用”<sup>(1)</sup>。由于美登新来源不易, 且临床疗效不肯定, 为此, 我们选用与之药理作用类似的 VCR, 进行了联合用药研究。

## 材料和方 法

DAG 同以往试验<sup>(2)</sup>, VCR 为上海第十二药厂生产, 均临用时以生理盐水溶解配成所需浓度。实验用 DBA/2, CFW, BDF<sub>1</sub>(DBA/2 × C 57 BL) 及昆明种小鼠, 雌雄皆用, 但每次试验用同一性别。L<sub>1210</sub> 小鼠每 7 天用 DBA/2 小鼠腹腔接种传代; 实验用 BDF<sub>1</sub> 小鼠, 每鼠 ip 白血病细胞 10<sup>6</sup> 个。照射源为钴<sup>60</sup> γ 射线, 输出量分别为 19 rad/min (ADC 试验) 及 75 rad/min (CFU-S 试验), 小鼠照射总量均为 750 rad, 照射距离为 60 cm。

**对小鼠白血病  $L_{1210}$  的实验治疗** 用接种 L<sub>1210</sub> 细胞后 24 h 的小鼠 6 组, 分别按表 1 所列方式 ip, DAG 剂量为 3.0 mg/kg, VCR 为 1.3 mg/kg, 观察 60 天内小鼠存活情况, 并计算生命延长率。估计“相加作用”及观察协同疗效的方法同前文<sup>(1)</sup>。

**不同剂量 DAG 及 VCR 联合用药的疗效** 用 BDF<sub>1</sub> 小鼠 25 组, 每组不少于 5 鼠, 其中 1 组 ip 生理盐水, 其余 24 组分别 ip DAG 1.5, 3.0, 5.0, 8.0 mg/kg 或 VCR 0.8, 1.3, 2.0, 3.0 mg/kg, 或按图 1 所示方案联合给药。凡单用药组均于接种 L<sub>1210</sub> 细胞后 24 h 给药; 联合给药组则于接种 L<sub>1210</sub> 细胞后 24 h 给 DAG, 再隔 24 h 给 VCR。观察指标同“1”, 同时计算协同指数 (synergy index)<sup>(3)</sup>, 大于 1 者认为有协同作用; 该指数越大, 则协同作用越强。

$$\text{协同指数} = \frac{\text{联合用药组生命延长率}}{\text{“相加作用”生命延长率}}$$

**对  $L_{1210}$  干细胞的杀灭作用** 参照 Gordon 等的琼脂扩散合 (ADC) 方法<sup>(4)</sup>, 用有机玻璃单面扩散合, 微孔滤膜 (上海医药工业研究院产品) 孔径 0.4 μm。取接种于小鼠腹腔内 4 天

的  $L_{1210}$  细胞, 以 Fischer's 培养基(含 10% 马血清)稀释, 加入 CAD 中, 琼脂(Difco)最终浓度为 0.3%。乙醚麻醉下将扩散合植入经照射的昆明种小鼠腹腔, 一般每鼠 2 合, 第 7 天取合计数集落, 凡超过 50 个细胞的细胞团, 被认为是集落。药物试验时, 首先将扩散合植入未经照射的小鼠(第一受体), 4 h 后, 按规定腹腔给药, 经一定时间, 从第一受体取合, 植入经照射的小鼠(第二受体), 第 7 天再取合计数集落, 并按常规方法计算集落形成率(plating-efficiency)及细胞存活比(survival fraction), “相加作用”计算同前文<sup>(1)</sup>。受体均每组 7 鼠(14 个合)。

**对骨髓干细胞的作用** 用脾集落形成法进行试验<sup>(2)</sup>, CFW 小鼠 6 组, DAG 剂量为 3.0 mg/kg, VCR 为 1.3 mg/kg, 按表 2 所列方式腹腔给药。计算脾集落(CFU-S)及协同疗效方法同前文<sup>(1)</sup>。

## 结 果

### 一. 对小鼠 $L_{1210}$ 的实验治疗

DAG 与 VCR 联合使用时, 具有一定的协同疗效。二药单用时生命延长率的“相加作用”为 85.4%, 无一鼠存活。先给 DAG, 后给 VCR, 生命延长率高达 269.4%, 近半数动物(6/13)存活; 二药同时使用则协同疗效较差, 先给 VCR 后给 DAG 的协同疗效更差, 生命延长率为 88.4%, 仅稍高于二药的“相加”疗效。重复二次实验, 结果相近, 其中一次实验结果列于表 1。

Tab 1. Combined effects of DAG and VCR on  $L_{1210}$  in mice

| Schedule                    | Mean survival     |         | No. of survivors on day 60 |
|-----------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
|                             | time $\pm$ SD (d) | ILS (%) | Total No. of mice          |
| Saline                      | 12.1 $\pm$ 1.5    |         | 0/9                        |
| DAG                         | 18.5 $\pm$ 1.8    | 53.2    | 0/13                       |
| VCR                         | 16.0 $\pm$ 0.7    | 32.2    | 0/13                       |
| DAG + VCR                   | 26.7 $\pm$ 15.1   | 120.7*  | 2/13                       |
| DAG $\xrightarrow{24h}$ VCR | 44.7 $\pm$ 17.3   | 269.4*  | 6/13                       |
| VCR $\xrightarrow{24h}$ DAG | 22.8 $\pm$ 6.1    | 88.4*   | 0/13                       |
| Additive                    |                   | 85.4    |                            |

\*Represents synergistic effect

为了探讨联合用药剂量与协同作用的关系, 用不同剂量 DAG 与 VCR, 单用或合用。结果如图 1, 除 DAG 8.0 mg/kg + VCR 3.0 mg/kg 外, 各联合用药组均有不同程度协同作用, 而以 DAG 3.0 mg/kg + VCR 1.3 mg/kg 组协同疗效最高, 协同指数达 3.53。

### 二. 对 $L_{1210}$ 干细胞的杀伤作用

(一) 扩散合细胞数与集落数的关系 用三种不同浓度细胞悬液, 结果见图 2。每合细胞数为  $2.0 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^4$  时, 细胞数与集落数成线性关系, 集落形成率为 1.3%。

(二) DAG 剂量—反应关系 第 1 受体鼠 7 组, 分别 ip 生理盐水及不同剂量 DAG, 经 24 h, 取合植入第二受体鼠, 结果见图 3。DAG 剂量为 1.5~8.0 mg/kg 时, 随着剂量增加, 细胞存活比呈指数降低。

(三) VCR 剂量—反应关系 方法同“2”, 仅以不同剂量 VCR 代替 DAG, 结果见图 4。

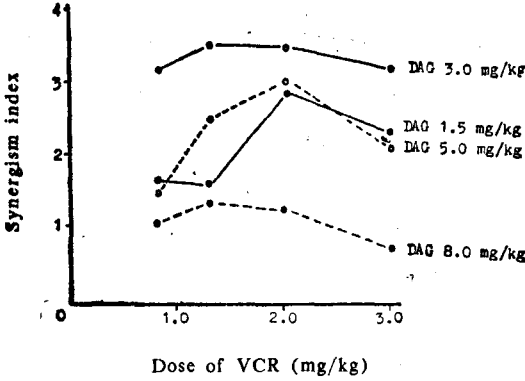


Fig 1. Combined effects of DAG and VCR with different schedule on  $L_{1210}$  mice

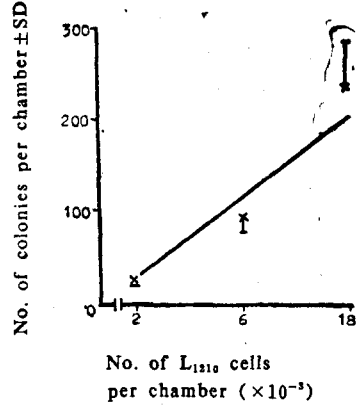


Fig 2. Relation between number of  $L_{1210}$  cells and number of colonies per chamber

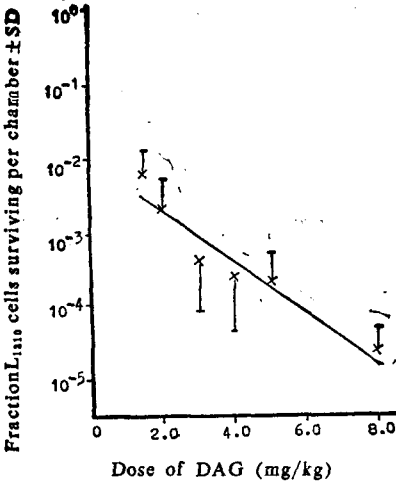


Fig 3. Dose-survival curve for DAG

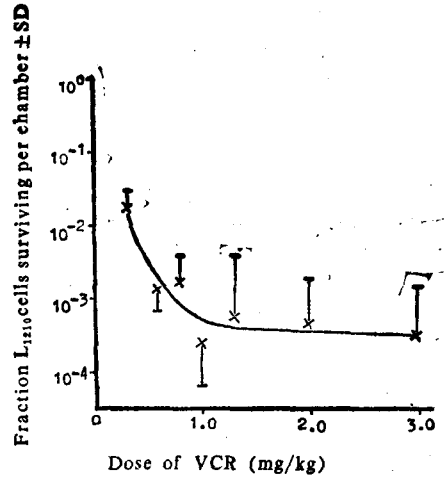


Fig 4. Dose-survival curve for VCR

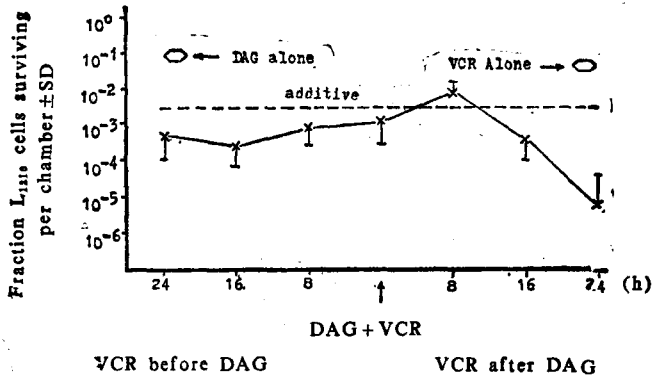


Fig 5. Fraction survival of  $L_{1210}$  cells as a function of sequence and interval between the administration of DAG and VCR

VCR 剂量低于 0.6 mg/kg 时, 细胞存活比呈指数降低; 剂量为 0.8~3.0 mg/kg 时, 曲线斜率明显降低, 存活比在  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$  出现坪值。

(四) DAG 与 VCR 联合用药 第 1 受体鼠 10 组, 依图 4 规定的方式 ip 生理盐水或 DAG 或 (和)VCR。DAG 剂量为 0.8 mg/kg, VCR 为 0.2 mg/kg。全部小鼠均于第一次给药后 40 h 取骨, 分别植入第二受体鼠, 结果见图 5。先给 DAG, 隔 8 h 给 VCR, 未观察到协同作用, 其余各组均有不同程度的协同作用, 尤以先给 DAG, 隔 24 h 给 VCR 方案的作用最好, 对  $L_{1210}$  细胞的杀伤, 超过“相加作用”100 倍以上。

### 三. 对骨髓干细胞的杀伤作用

DAG 与 VCR 杀灭小鼠骨髓干细胞的“相加作用”(存活比)为 0.17。先用 DAG 后用 VCR 为 0.15, 即有轻微的协同杀伤作用, 其余各联合用药组均未超过“相加作用”, 见表 2。

Tab 2. Combined effects of DAG and VCR on CFU-S in mice

| Schedule                    | Mean CFU-S per femur $\pm$ SD | Fraction CFU-S surviving per femur |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Saline                      | 1920 $\pm$ 1527               | —                                  |
| DAG                         | 475 $\pm$ 180                 | 0.25                               |
| VCR                         | 1266 $\pm$ 764                | 0.66                               |
| DAG + VCR                   | 354 $\pm$ 82                  | 0.18                               |
| DAG $\xrightarrow{24h}$ VCR | 297 $\pm$ 110                 | 0.15*                              |
| VCR $\xrightarrow{24h}$ DAG | 379 $\pm$ 201                 | 0.20                               |
| Additive                    |                               | 0.17                               |

\* Represents synergistic effect

## 讨 论

DAG 与 VCR 以一定方式合用可发挥协同作用, 其强度与给药方案及剂量有关。先给 DAG, 隔 24 h 再给 VCR, 对小鼠  $L_{1210}$  的协同疗效最好。ADC 试验也得到同样结果, 在此试验中, 细胞数在一定范围内与集落数呈直线关系; DAG 与 VCR 的剂量-反应曲线也与此二药的细胞周期动力学特性相吻合。可以认为, 在我们的实验条件下, 用此法研究抗癌药联合使用对  $L_{1210}$  干细胞的杀灭作用是可行的。此外, 联合用药协同疗效主要决定于 DAG 剂量, 而 VCR 剂量对疗效影响较小。DAG 为 3.0 mg/kg 时, 无论 VCR 剂量如何, 协同指数均在 3.17 以上; 超过 5.0 mg/kg 时, 可能由于毒性增加, 协同指数反而降低。同一剂量 VCR, 疗效依 DAG 剂量不同而异。据报道, VCR 是一大分子量药物, 它通过某种载体中介(carrier-mediate)系统转运机制进入细胞内, 与微管蛋白等结合而发挥细胞毒作用<sup>(5)</sup>。膜结构改变, 将影响药物通透性。电镜下已观察到 DAG 杀伤的细胞呈“凋落性”坏死<sup>(6)</sup>, 细胞从出现芽突至完全溶解, 膜结构必将有改变, 是否此种改变激活了 VCR 的膜转运系统, 提高了药物通透性, 值得进一步探讨。

先给 DAG, 24 h 后给 VCR, 对小鼠骨髓干细胞的毒性有轻微协同作用, 所杀灭的骨髓干细胞超过“相加作用”12%, 而  $L_{1210}$  小鼠生命延长率却是“相加作用”的 3 倍以上, 对  $L_{1210}$  干细胞的杀灭则超过单药“相加”的 100 倍。因此, 在本实验条件下, 此方案应被认为是最佳联合用药方案。

致谢 北京友谊医院同位素科及广西壮族自治区人民医院放疗室协助照射小鼠, 中国医学科学院药物研究所林琳同志参加部份技术工作。

## 参 考 文 献

1. 樊亦军, 等. 1,2:5,6-二去水卫矛醇与美登新联合用药的实验研究. 药理学报 1983;18:648.
2. 樊亦军, 等. 1,2:5,6-二去水卫矛醇对正常和黑色素瘤小鼠骨髓干细胞的作用. 中国药理学报 1980;1:112.
3. Edelstein M, et al. Schedule-dependent synergism for the combination of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin. *Cancer Res* 1974;34:293.
4. Gordon MY, et al. The sensitivities of human and murine hemopoietic cells exposed to cytotoxic drugs in an *in vivo* culture system. *Ibid* 1976;36:2822.
5. Bleyer WA, et al. Uptake and binding of vincristine by murine leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 1975;24:633.
6. 李维信, 等. 1,2:5,6-二去水卫矛醇对慢性粒细胞白血病治疗作用的超微结构观察. 中华血液学杂志 1982;3:92.

## EXPERIMENTAL STUDIES OF COMBINATION OF VINCRI-STINE AND 1,2:5,6-DIANHYDROGALACTITOL

FAN Yi-Jun, HAN Rui\*, ZHOU Jun and LI Mao

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning; \*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

**ABSTRACT** The combined effect of 1,2:5,6-dianhydrogalactitol (DAG) and vincristine (VCR) on  $L_{1210}$  leukemia was studied. The results obtained *in vivo* suggest that simultaneous administration of DAG and VCR, or administration of these two agents within a 24 h interval, independent of order, produced a synergistic effect. The degree of synergism was dependent on dose and schedule. When DAG was given before VCR, the effect was more than the other two schedules of combination. Studies using different doses of DAG and VCR with an optimum schedule indicated that the degree of synergism was mainly dependent on the dose of DAG. When a dose of 3.0 mg/kg of DAG was given before 1.3 mg/kg of VCR within a 24 h interval, the survival time of the  $L_{1210}$ -bearing mice was four times as long as additive, but the cell killing effect of the combination on the bone marrow stem cells was only increased by 12% over the additive. The schedule-dependent synergism for  $L_{1210}$  cells was also studied by the agar-diffusion-chamber assay.

**Key words** 1, 2:5, 6-dianhydrogalactitol; Vincristine; Agar-diffusion-chamber assay; Bone marrow stem cells;  $L_{1210}$  leukemia