

# 维生素C、氯化钴、乙双吗啉(AT<sub>1727</sub>)及甘草次酸与阿霉素毒性关系的实验研究

沈励坚 潘启超

(肿瘤研究所)

**提要** 在小鼠的毒性及毒性抑瘤试验表明维生素c对阿霉素有一定减毒作用,但有方案依赖性。先用阿霉素后用维生素c可见毒性减低而抑瘤作用不减。但当阿霉素分别与乙双吗啉、甘草次酸、氯化钴联合用药时,则毒性增加、抑瘤作用减弱。

**关键词** 阿霉素(Doxorubicin HCl, ADM) 氯化钴(Cobalt Chloride) 甘草次酸(Glycyrrhetic acid) 乙双吗啉(AT<sub>1727</sub>) 维生素C(Vitamin C) 毒性(Toxicity)

阿霉素(ADM)是一个广谱高效的抗癌药物,但严重的心肌毒性成为主要的限量因素<sup>[1]</sup>,我们就减轻阿霉素毒性方面进行了一些工作,除了发现维生素B<sub>12</sub>能减低阿霉素毒性而不降低其抑瘤作用外<sup>[2]</sup>,还先后对阿霉素与抗癌新药乙双吗啉(AT<sub>1727</sub> Bimolane)以及甘草次酸、氯化钴、维生素C的相互作用作了探讨,发现维生素C对阿霉素有一定解毒作用,但有方案依赖性,而其余几个药均加强阿霉素毒性。

## 材料和方法

### 一、毒性试验

药物:盐酸阿霉素(Doxorubicin HCl ADM)为意大利Farmitalia药厂Arcamone博士惠赠。待试的药物有4个:乙双吗啉(AT<sub>1727</sub>, 1,2-双[N'N'-吗啉甲撑-3,5-二氧哌嗪-1]-乙烷),由上海药物研究所提供。甘草次酸(glycyrrhetic acid),由广东佛山制药厂提供,氯化钴(Cobalt chloride),由广州化学试剂厂生产。维生素C,是广州明兴药厂产品(批号840109-5)。盐酸阿霉素以生理盐水溶解。AT<sub>1727</sub>和甘草次酸均混悬于0.5%羧甲基纤维素钠溶液中。氯化钴以生理盐水稀释。维生素C为25%溶液。

取体重18~22克、同批、同性别的健康非

纯种小鼠随机分组,一般10只小鼠为一组,设①阿霉素组;②待试药物对照组;③联合用药组;④生理盐水或相应的溶剂对照组。给药途径为腹腔注射。详细观察并记录动物一般情况及毒性表现(活动、精神状态、体重变化、食欲、腹泻等)。实验结束时,处死全部动物,同上处理。

阿霉素按多种不同方案给药,其中一次给予亚急性半数致死量的阿霉素20mg/kg时,观察21天;按2mg/kg给药,每周1次,连用10周,观察90天。其余各不同剂量间歇给药,至总累积量20mg/kg,均观察30天以上。联合用药组在此基础上并用一种待试药物。参照任云峰的报告AT<sub>1727</sub>选用25mg/kg。甘草次酸是低毒药物,选用30~60mg/kg剂量。根据预初实验,氯化钴25mg/kg是无毒剂量,故选用该剂量。维生素C用25%溶液,175mg/kg。

中数存活时间一律按Brigg的调整均数指标的计算方法<sup>[3]</sup>。计算治疗组与对照组中数生存期的比值(T/C)。按照logrank test分析,比较两组差异的显著性<sup>[4]</sup>。

### 二、抑瘤试验

取移植肿瘤后7~8天的小鼠,在无菌操作下剥离肿瘤,称取瘤重,加入3倍体积的生理盐水,置于匀浆器中研磨,制成肿瘤悬

液, 然后接种于 18~22 g 的健康小鼠右前腋下, 每鼠 0.2 ml。艾氏腹水癌则自接种约 7~10 天的小鼠腹腔中抽取腹水, 显微镜下用计算机计算瘤细胞数, 以生理盐水适当稀释, 使细胞数约为  $10^6/\text{ml}$  悬液, 将肿瘤悬液接种入健康的 18~22 g 小鼠腹腔, 每鼠 0.2ml, 次日将已接种肿瘤的小鼠随机分组, 接种 24 小时开始给药, 实体瘤的抑瘤试验一般每天给药一次, 连续 7~10 天。停药后 2~3 天处死动物, 称取体重, 剥离肿瘤, 记录瘤重, 按常规计算抑瘤率, 并以 t 检验比较各组平均瘤重差异的显著性。若实验期间治疗组动物体重下降 >15% 或死亡 >20%, 表示这一剂量为有毒剂量。艾氏腹水癌以治疗组和对照组中数存活时间的比值为疗效指标,

即  $T/C = \frac{\text{治疗组中数生存期}}{\text{对照组中数生存期}} \times 100\%$  按照美国国立肿瘤研究所药物筛选方案, 常规于实验

完成时计算第 5 天存活 >65% 的各试验组 T/C。T/C  $\geq 125\%$  应考虑有活性, 重复出现 T/C  $\geq 125\%$  认为有进一步研究价值。T/C  $\leq 85\%$  或动物体重下降 >15% 表明此剂量有毒性。按规定, 于实验的第 20 天、第 30 天可以评价实验, 考虑本实验同时观察抑瘤作用与阿霉素对心机的慢性毒性, 故观察延长至 35 天以上或至全部动物死亡为止。

### 实验结果

- 一、AT<sub>1727</sub> 对阿霉素毒性的影响 (表 1-1, 2) 可使毒性增加, 抗瘤作用减弱。
- 二、甘草次酸对阿霉素毒性的影响 (表 2-1, 2); 不能减低毒性。
- 三、氯化钴对阿霉素毒性的影响 (表 3); 毒性加强, 抗瘤作用减弱。
- 四、维生素 C 对阿霉素毒性的影响 (表 4); 有用药方案依赖性。

表 1-1 阿霉素与 AT<sub>1727</sub> 联合应用的毒性试验

	方	案	动物数	中数存活天数	长期存活动物 (%)	ADM 的 LD <sub>50</sub> 累积量 (mg/kg)	
慢性毒性	ADM	2mg/kg/w × 10	ip	10	40.8	(90天)10	12
	AT <sub>1727</sub>	25mg/kg/w × 10	ip	10	71.1	40	—
	AT <sub>1727</sub> ADM	25mg/kg/w × 10 2mg/kg/w × 10 (15' 后注 ADM)	ip	10	*21.1	20	8
	NS	0.2ml/鼠/w × 10	ip	8	83.7	62.5	
亚急性毒性	ADM	20mg/kg × 1	ip	10	16.9	(21天)50	
	ADM AT <sub>1727</sub>	20mg/kg × 1 25mg/kg (1hr 后注 AT <sub>1727</sub> )	ip	10	6.2	0	
	AT <sub>1727</sub> ADM	15mg/kg × 1 20mg/kg (1hr 后注 ADM)	ip	10	5.4	0	
	ADM AT <sub>1727</sub>	20mg/kg × 1 15mg/kg (1hr 后注 AT <sub>1727</sub> )	ip	10	7.6	20	
	AT <sub>1727</sub>	25mg/kg × 1	ip	10	87.5	80	

\*与单用 ADM 组比: P < 0.001

表 1-2 阿霉素与AT<sub>1727</sub>联合应用抑瘤毒性试验

瘤株	方	案	动物数	平均瘤重 (g)	抑瘤率 %	体重变化 (g)	7 天内死亡率 %	
S <sub>180</sub>	NS	0.2ml/鼠	qd × 7 ip	10	1.6	—	+2.6	0
	AT <sub>1727</sub>	10mg/kg	qd × 7 ip	10	1.6	0	+3.3	0
	ADM	0.5mg/kg	qd × 7 ip	10	0.5	—	-4.0	50
	AT <sub>1727</sub>	10mg/kg	qd × 7 ip	10	1.0	37	0	0
艾氏腹水癌	方	案	动物数	中数生存期(天)	出现腹水时间(天)	无瘤存活	60天长期存活	
	ADM	1mg/kg	qd × 7 ip	7	71.1	34	2/7	4/7
	AT <sub>1727</sub>	25mg/kg	qd × 7 ip	7	74.7	31	2/7	5/7
	ADM	1mg/kg	qd × 7 ip	7	74.7	31	2/7	5/7
		(20'后给ADM)						

表 2-1 阿霉素与甘草次酸联合应用的毒性试验

方	案	动物数	中数生存天数	T/C*	体重变化 (g)	60天存活动物	
1. 甘草次酸	60mg/kg	q4d × 5 ip	10	66.3	—	+2.4	3/10
2. ADM	4mg/kg	q4d × 5 ip	10	11.5	(100)	-5.1	0/10
3. ADM	4mg/kg	q4d × 5 ip	10	14.2	123	-4.2	1/10
	甘草次酸 60mg/kg	(15'后给甘草次酸)					
4. 甘草次酸	60mg/kg p.o	q4d × 5	10	9.3	80	-3.1	0/10
	ADM 4mg/kg i.p	(2hr后给ADM)					
1. NS	0.2ml/鼠	q3d × 5 ip	7	371	—	+9.1	6/7
2. 甘草次酸	30mg/kg	q3d × 5 ip	5	300	—	+6.7	4/5
3. 羧甲基纤维素钠	0.2ml/鼠	q3d × 5 ip	7	217	—	+7.3	6/7
4. ADM	4mg/kg	q3d × 5 ip	7	24.9	62	-3.1	2/7
	甘草次酸30mg/kg	(混合)					
5. ADM	4mg/kg	q3d × 5 ip	7	39.8	(100)	-0.2	4/7

\*T/C =  $\frac{\text{联合用药组中数生存期}}{\text{ADM对照组中数生存期}} \times 100$

表 2-2 阿霉素与甘草次酸联合应用的抑瘤试验

瘤株	方	案	动物数前/后	体重变化 (g)	平均瘤重 (g)	抑瘤率 %	P值
L <sub>2</sub>	NS	0.2ml/鼠	qd × 7	7/7	+3.7	1.0	
	ADM	0.5mg/kg	qd × 7	7/7	+1.6	0.6	t = 1.008
	ADM	0.5mg/kg	qd × 7	7/7	-1.5	0.5	P > 0.05
	甘草次酸	30mg/kg					

表 3 阿霉素与氯化钴联合应用的抑瘤试验

方 案	动物数	中数生存天数	生存期 T/C	出现腹水时间(天)	45天存活动物数	45天无瘤存活动物	
艾氏腹水癌	1. NS 0.2ml/鼠 qod × 5	10	25	100	6	0/10	
	2. ADM 4mg/kg qod × 5	10	50	200	28	5/10	
	3. ADM 4mg/kg CoCl <sub>2</sub> 50mg/kg*	10	5.9	23.6	未及出现腹水已全死	0/10	0/10
	4. ADM 4mg/kg CoCl <sub>2</sub> 25mg/kg*	10	11.5	46.0	7	0/10	0/10
	5. ADM 4mg/kg B <sub>12</sub> 1mg/kg*	10	142.9	571.6	28	7/10	4/10
26天存活							
艾氏腹水癌	1. NS 0.2ml/鼠 qod × 5	9	18.2	100	6	3/9	
	2. ADM 4mg/kg qod × 5	9	10.6	58.2	未及出现腹水已全死	0/9	
	3. CoCl <sub>2</sub> 25mg/kg ADM 4mg/kg (30'后给ADM)	8	11.4	62.2	未及出现腹水已全死	0/8	
	4. ADM 4mg/kg CoCl <sub>2</sub> 25mg/kg (30'后给CoCl <sub>2</sub> )	8	9.3	53.8	未及出现腹水已全死	0/8	

\* 二药混合后给药

注: 另取同窝小鼠10只, 体重与上述各组相仿, 不带瘤。每日给予CoCl<sub>2</sub> 25mg/kg, 连续7天, 全部动物存活35天以上, 体重平均增加14.5克

表 4 维生素C对阿霉素毒性及抑瘤作用的影响

瘤株	药 物	动物数	中数生存(天)	T/C	出现腹水时间(天)	长期存活动物 %	无瘤存活动物 %	
艾氏腹水癌	NS 0.2 <sup>c·c</sup> /鼠	q3d × 5 ip	8	22.2	100	7	(60天) 0/8	(60天) 0/8
	Vit C 175mg/kg	q3d × 5 ip	8	17.9	80.6	7	0/8	0/8
	ADM 4mg/kg	q3d × 5 ip	7	55.5	250	35	1/7	0/7
	ADM 4mg/kg	q3d × 5 ip	8	62.5	231.5	55	6/8	5/8
	Vit C 175mg/kg	(20'后给Vit C)						
	Vit C 175mg/kg	q3d × 5 ip	8	45.5	204.9	35	4/8	1/8
艾氏腹水癌	NS 0.2 <sup>c·c</sup> /鼠	qd × 12 ip	8	18.5	100	7	(60天) 0/8	(60天) 0/8
	ADM 1mg/kg	qd × 12 ip	9	*50.0	270.3	45	4/9	2/9
	ADM 1mg/kg	qd × 12 ip	9	*73.7	398.4	35	5/9	2/9
	Vit C 175mg/kg	(20'后给Vit C)						
	Vit C 175mg/kg	qd × 12 ip	10	25	137.1	36	4/10	1/10
艾氏腹水癌	NS 0.2 <sup>c·c</sup> /鼠	q2d × 5 ip	7	21.0	100	10	(30天) 0/7	
	ADM 4mg/kg	q2d × 5 ip	8	35.1	167.1	30	0/8	
	Vit C 175mg/kg	q2d × 5 ip	7	24.5	116.7	30	0/7	
	ADM 4mg/kg	(3hr后给ADM)						
	Vit C 175mg/kg	q2d × 5 ip	6	20.4	97.1	13	0/6	

\* 根据Logrank test, 两组差异有显著性 p<0.01

## 讨 论

曾有文献报告丙亚胺(ICRF<sub>159</sub>)类能对抗阿霉素心肌毒性<sup>[6]</sup>,但其后各实验者的结果不尽相符,临床试用表明阿霉素与丙亚胺(ICRF<sub>159</sub>, Razoxane)联合应用产生骨髓毒性的相加。国产抗癌新药乙双吗啉(AT<sub>1727</sub>)系同上系列双内酰亚胺类抗肿瘤药物,其结构是在乙亚胺的基础上连上两个吗啉甲撑基团。已报告乙双吗啉具有较低的毒性及较好的抗癌活性<sup>[6]</sup>。我们原期望乙双吗啉能保留丙亚胺类减低ADM毒性的特性,并能与ADM的抗癌作用协同。但本实验采用几种不同方案及剂量反复试验,结果表明ADM与丙亚胺类衍生物乙双吗啉联合应用毒性有所增加,在慢性毒性实验中,加用乙双吗啉组中数生存期比单用ADM组缩短一半,引起半数死亡的ADM累积量为单用ADM组的2/3。在亚急性实验中,于ADM给药前后加用乙双吗啉的几组小鼠中数生存期均短于单用ADM组。乙双吗啉本身毒性极低,据林晨等报告在大白鼠亚急性毒性试验总蓄积量高达1800mg/kg,慢性毒性试验总量达5850mg/kg时未见明显毒性,但本实验表明将低毒剂量的ADM与无毒剂量的乙双吗啉混合后注射,产生严重毒性,半数小鼠于一周内死亡。这种比单用ADM组更早出现死亡的原因有待探讨。

Herman 报告在小猪和 beagle 狗中,事先使用乙双吗啉能降低柔红霉素的心肌毒性的发生率及严重程度。但本实验表明乙双吗啉不能降低ADM的毒性。ADM与柔红霉素结构极为相似,仅在C<sup>14</sup>上增加一个OH基而已,而乙双吗啉对二者毒性影响相差甚大,其原因何在仍需探讨。但根据上述实验提示了在临床上应用AT<sub>1727</sub>的患者以不用ADM为宜,以免二者毒性相加。

甘草次酸本身毒性很低,又具有多种解毒功能,文献报告甘草次酸对番木鳖、水合氯醛等药物和某些食物以及海豚毒、蛇毒、细菌毒素等有一定解毒作用,亦有报告用甘草次酸减低链霉素及喜树碱毒性。但用甘草次酸对抗阿

霉素毒性未获成功。于ADM给药前或后给甘草次酸,中数生存期不增甚至减少,倘将二药混合后注射,毒性明显增加。二药联用的抗癌试验未见明显的疗效协同,反增加了死亡率。甘草次酸本身是一个低毒性药物,但与ADM联合应用,特别是混合配伍可能增加ADM毒性。机理有待阐明,甘草次酸有一定的水钠潴留作用,是否会加重因ADM引起的心肌损害值得考虑。

据报告EDTA(二乙胺四乙酸)和ICRF<sub>159</sub>(丙亚胺)对ADM有一定解毒作用,其机理可能与它们螯合二价离子的能力有关。另外,ADM的三铁螯合物—Quelamycin<sup>[7]</sup>的心脏毒性和骨髓毒性都较低。我们前阶段的工作表明维生素B<sub>12</sub>能减低ADM的毒性。维生素B<sub>12</sub>是含钴的螯合物,其减毒机制是否与钴离子与ADM的螯合有关?基于这种设想,我们检查了氯化钴与ADM的相互作用,25mg/kg的氯化钴已证明是无毒的,并且能促进小鼠生长,但以此剂量的氯化钴与ADM相配伍,则显示出毒性加强。而同时混合使用维生素B<sub>12</sub>组与单用ADM组相比,生命延长率为185%。氯化钴增加ADM毒性的机制未明,但提示了维生素B<sub>12</sub>对ADM毒性的解毒作用可能主要不是通过B<sub>12</sub>内的钴离子与ADM螯合产生。

ADM毒性可能与其脂质过氧化作用及游离基的产生有关<sup>[8]</sup>,维生素C是强还原剂,参与体内重要的氧化还原反应,使酶分子中的-SH维持在还原状态。在谷胱甘肽还原酶催化下,维生素C可使氧化型谷胱甘肽(G-S-S-G)还原为G-SH,使G-SH不断得到补充<sup>[9]</sup>,并且维生素C亦与谷胱甘肽过氧化酶有关,还可促进叶酸转变为有生理活性的四氢叶酸。近年国内已有报告用大剂量维生素C抢救克山病,据称可减轻心肌损害。本实验结果表明维生素C对ADM确有一定减毒作用。但是这种减毒作用有一定的方案依赖性,先用ADM然后用维生素C能延长中数生存期,并且无瘤存活动物数亦有所增加。反之,先用维生素C,后用ADM则可能减低ADM的抗癌作用。ADM与其它药

物之间配伍的严格方案依赖性, 在我们以前的文章中已有所报告, 其原因待探讨。至于用维生素 C 来减低 ADM 毒性在国外亦有人做过类似工作, Fujita K 等报告<sup>[10]</sup>将维生素 C 2g/kg 与 ADM 混合后给药, 有一定减毒作用, 而不减低 ADM 的抗癌作用, 但文中未提及方案依赖性问题。可见, 维生素 C 的合理运用也许会对 ADM 治疗的病人有一定好处, 值得临床家们考虑。

## 结 论

一、在不带瘤小鼠实验中表明抗癌药乙双吗啉与 ADM 联合应用, 使 ADM 毒性增加。在带瘤小鼠中则使 ADM 毒性增加, 而抗癌作用降低。

二、在小鼠实验中不能证明甘草次酸对 ADM 有解毒作用。

三、25mg/kg 氯化钴单独应用能促进小鼠生长, 但与 ADM 联合应用则使毒性明显增加, 抑瘤作用减低。

四、在带艾氏腹水瘤小鼠的实验表明维生素 C 对 ADM 有一定减毒作用, 但有明显方案依赖性。先用 ADM 然后应用维生素 C 有一定减毒作用而不减低 ADM 的抑瘤作用, 但先用维生素 C 后用 ADM 则可能增加 ADM 的毒性。

## 参 考 文 献

[1] Lenaz L, Page JA. Cardiotoxicity of adriamycin and related anthracycline.

Cancer Treat Review 1976; 3:111.

[2] 潘启超 洗励坚. 维生素 B<sub>12</sub> 对阿霉素解毒作用的实验研究. 癌症 1983; 2(1):7.

[3] Т Н Лершин. 实验化学治疗方法. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1963; 18.

[4] Peto R, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient analysis and examples, Br J Cancer 1977; 35(1):1.

[5] Herman E H. Prevention of the cardiotoxic effects of adriamycin and daunomycin in the isolated dog heart. Proceedings Society Experimental Biology and Medicine 1972; 140:234.

[6] 任云峰, 等. 抗癌新药乙双吗啉的研究. 科学通报 1980; 3:189.

[7] Merrill J, et al. Murine pharmacology of iron (Fe): Adriamycin (ADR) Microaggregates. Proceedings of AACR and ASCO 1980; 1033.

[8] Oberley L W. 超氧化物歧化酶在癌症中的作用. 国外医学(分子生物学分册) 1980; 2(2):80.

[9] Ghiretti F, et al. The effect of vitamin C on the intracellular oxygen transport re-evaluation of vitamin C. ed by Hanck. A and Ritzed G, Verlag Hans Huber Bern Stuttgart wien 1977 41.

[10] Fujita K, et al. Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. Cancer Research 1982; 42:309.

## A Study on the Influences of Vitamin C, Cobalt Chloride, Bimolane and Glycyrrhetic Acid on the Toxicity Caused by Adriamycin

Xian Lijian Pan Qichao  
(Cancer Institute)

### Abstract

The experiments in mice bearing transplantable tumor showed that combination of bimolane, cobalt chloride and glycyrrhetic acid with adriamycin can increase the toxicity and reduce the antitumor activity of adriamycin. The influence of vitamin C on the toxicity of adriamycin is schedule-dependent. Vitamin C given after adriamycin can ameliorate the toxicity of adriamycin but not its anti-tumor activity. However, vitamin C given before adriamycin can enhance the toxicity of adriamycin.