

R
008.8
4362

中山醫學院

口腔醫學研究所

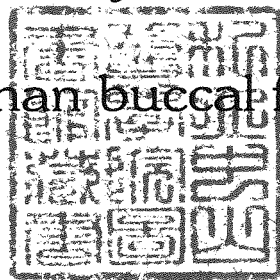
碩士論文

平陽黴素對 KB 細胞的抑制機轉

及對人類頰部纖維母細胞的毒性作用

Mechanism of pingyangmycin in inhibition
of KB cells activity and toxicity on cultured

human buccal fibroblasts



指導教授：周明勇教授

研究生：戴國維

中華民國八十七年元月

中山醫學院圖書館



C048579

參考書恕不外借

授權書 (博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 口腔醫學研究所
86 學年度第 1 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 平陽黴素對 KB 細胞的抑制機轉及對人類纖維母細胞的毒性作用

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要, 授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心, 得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路, 並與台灣學術網路及科技網路連線, 得不限地域時間與次數, 以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料, 授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心, 得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行, 並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請, 請將本論文全文延後至民國 90 年 7 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料, 授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館, 為學術研究之目的以各種方法重製, 或為上述目的再授權他人以各種方法重製, 不限時間與地域, 惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 周明勇

研究生簽名: 戴國維 學號: R85401

(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 1 月 23 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選, 本人同意視同授權。

2. 授權第二項者, 請再交論文一本予承辦人員。

3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 戴國維 聯絡電話: (04) 2355747

地址: 台中市北屯區柳陽西街5巷1號

本論文為中山醫學院授予牙醫學碩士學位
之必備條件之一，經中山醫學院口腔醫學研究所
碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中國醫藥學院中藥研究所所長 謝明材 博士

謝明材

中山醫學院口腔醫學研究所所長 江 濤 博士

江 濤

中山醫學院牙醫學系系主任 周明勇 博士

(論文指導教授)

周明勇

中華民國八十七年元月五日

學生戴國維，論文題目為：平陽黴素對 KB 細胞的抑制機轉
及對人類頰部纖維母細胞的毒性作用；其論文已經中山醫
學院口腔醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試
通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：周明勇博士

簽名：

周明勇

中華民國八十七年元月

謝 誌

在一年半的學習過程中，不但在醫學領域裡豐富了我的視野，同時在待人處事上也有了更深一層的認識；在順利取得碩士學位的同時，要感謝指導教授周明勇主任的提攜與教導，謝明材所長及江濤所長對論文的審查指正，尤其是學長張育超醫師在實驗過程中不厭其煩的盡心指導，讓我能以極短時間進入情況，並順利完成研究工作。此外，要向實驗室中的伙伴們：世煌大哥及秀鈴道謝，有了他們的熱心協助，我的工作才能如期完成。

最後，要向在三十年的歲月裡無怨無悔付出的父母親致上最深的謝意，沒有他們全力的支持，不可能會有今天的我；只是十分遺憾父親在論文口試當天與世長辭，無法與我一同分享喜悅。願他在另一個世界裡平安喜樂，也祝我的母親身體健康，萬事如意。

在提早半年畢業之際，僅以此感謝所有幫助過我的師長、同事及朋友們，你們的關懷我會永遠銘記在心。

戴國維

1998, 1, 15

目錄

中文摘要	4
英文摘要	6
壹、前言	8
貳、材料與方法	11
一、實驗材料	11
(1) 試藥	11
(2) 儀器	12
(3) 藥品及試劑的配製法	13
(4) 細胞培養方法	14
二、實驗方法	16
(1) 藥物濃度的選擇	16
(2) 細胞生長曲線	16
(3) 細胞附著生存率	17
(4) DNA 合成抑制試驗	17

(5) DNA 斷鏈試驗-----	18
三、統計方法-----	19
參、結果-----	20
肆、討論-----	28
伍、圖表-----	35
圖一、平陽黴素與 bleomycin 的化學結構-----	35
圖二、KB細胞的生長受不同平陽黴素濃度的影響-----	36
圖三、不同濃度平陽黴素對KB細胞增殖之影響-----	37
圖四、平陽黴素作用完24小時後，KB細胞型態之變化-----	38
圖五、不同濃度平陽黴素對纖維母細胞增殖之影響-----	40
圖六、平陽黴素作用完 24 小時後，纖維母細胞型態之變化-----	41
圖七、在不同藥物濃度及不同時間作用後之 KB 細胞生存率--	43
圖八、在不同平陽黴素濃度作用後，對 KB 細胞 DNA 合成之影 響-----	44
圖九、不同濃度平陽黴素對纖維母細胞 DNA 合成抑制之影響	45
圖十、比較不同濃度平陽黴素作用下，造成 KB 細胞 DNA 鏈斷 裂的程度-----	46
圖十一、在不同濃度平陽黴素作用下，纖維母細胞 DNA 鏈斷裂	

的程度-----	47
陸、參考文獻-----	48

附錄

發表於 Oral Oncology 雜誌之部份論文內容 (接受函及原稿)-----	56
---	----

摘要

平陽黴素 (pingyangmycin, bleomycin A₅, PYM) 是大陸地區學者從平陽鏈黴菌 (*Streptomyces pingyangensis*) 所產生的多種成分中，經過篩選後，開發出來的抗腫瘤藥物。平陽黴素與目前被普遍使用來治療惡性腫瘤的 bleomycin 同樣屬於水溶性抗生素類藥物；二者的化學結構相類似，只在末端支鏈有所差異。在本研究中，我們利用組織培養的方法來研究平陽黴素對口腔上皮癌 KB 細胞的生長抑制作用及觀察細胞在藥物作用後型態上的變化，並進一步探討其作用機轉。實驗結果顯示：當以 5 μ g/ml 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，對 KB 細胞的生長及群落的形成有明顯的抑制作用 ($p < 0.05$)；在顯微鏡下，細胞型態在藥物作用下呈現顯著變化；而平陽黴素的作用機轉可由實驗結果證實為切斷細胞 DNA 鏈而抑制細胞 DNA 的合成 ($p < 0.05$)。另一方面，我們利用人類頰部纖維母細胞 (fibroblast) 來評估平陽黴素對正常人類組織的毒性作用。研究顯示：當以 1 μ g/ml 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，明顯抑制纖維母細胞的生長及細胞 DNA 的合成 ($p < 0.05$)；同時在同樣的條件下，會造

成細胞 DNA 鏈的斷裂 ($p < 0.05$)。因此，我們可以推論：在體外試驗中，平陽黴素能有效抑制腫瘤細胞的生長，而其作用機轉為抑制細胞 DNA 的合成。另外，平陽黴素能造成人類正常細胞 DNA 鏈的斷裂，說明它具有基因毒性；因此在臨床上，當需要使用平陽黴素作為化學治療藥物時，醫師必須給與高度注意，以避免造成正常組織的過度傷害。

關鍵語：平陽黴素，KB 細胞，纖維母細胞，細胞毒性，基因毒性。

Abstract

The antitumor antibiotic pingyangmycin (PYM; bleomycin A5) is produced by *Streptomyces pingyangensis*. The chemical structure of PYM is similar to that of bleomycin (BLM), but their terminal amine moieties are different. In this study, we used cell growth curve and plating efficiency method to assess the inhibition KB cells growth by PYM. In the meantime, the morphological variations of drug-treated cells were also observed. And then, we used DNA synthesis inhibition assay and DNA precipitation assay to evaluate the antitumor mechanism of PYM. Our results indicated that the effect of PYM significantly inhibit cell growth and colony-forming ability of KB cells in a dose-dependent manner. The morphological variations of drug-treated cells were also noted. Furthermore, when treated with 5 μ g/ml of PYM for 24 hours on cultured KB cells, DNA strand breaks can be induced ($p < 0.05$). Therefore, it is considered that the action mechanism of PYM is due to its ability to inhibit the synthesis of DNA and split the DNA chains. On the other hand, we used human buccal fibroblasts to demonstrate the toxicity of PYM. We found that the effects of PYM significantly inhibit

cell growth and DNA synthesis of cultured human buccal fibroblasts in a dose-dependent manner. At the concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$, the genotoxic effects of PYM can induce DNA strand breaks of cultured human buccal fibroblasts ($p < 0.05$). Therefore, we affirm that oral-maxillofacial surgeons and physicians should take care to reduce the possibility of normal tissue damage from effective chemotherapy in the treatment of oral cancer patients.

Key Words: pingyangmycin, KB cells, fibroblasts, cytotoxicity, genotoxicity.

壹、前言

出現在口腔顎面部的惡性腫瘤，一般人俗稱為口腔癌，發生率約佔所有惡性腫瘤的 3.45 % – 25.6 %¹；其中更以鱗狀上皮癌 (squamous cell carcinoma) 最為常見²。對於牙醫師來說，如何能早期發現並有效的治療發生在口腔顎面部的惡性腫瘤，是目前牙醫師所必須面對的重要課題。雖然各種新式治療方法不斷被學者所提出；但是截至目前為止，為各界所公認對惡性腫瘤最有效的治療方式，仍然以外科手術、放射治療及化學治療為主³。以化學治療而言，雖然目前有不少癌症病種可以利用藥物達到令人滿意的治療效果，不過開發並研製新型抗腫瘤藥物的工作仍不斷的進行中。如果能找到更為有效的治療藥物，將可造福許許多多有需要的患者。

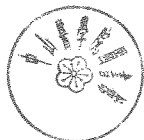
平陽黴素 (pingyangmycin, bleomycin A₅, PYM) 為大陸地區學者從平陽鏈黴菌 (*Streptomyces pingyangensis*) 所產生的多種成分中，經過篩選後，開發出來的抗腫瘤藥物 (圖一)。根據文獻報導⁴⁻⁸，平陽黴素與目前台灣或歐美、日本等地所廣泛使用來治療惡性腫瘤

的 bleomycin，同樣屬於水溶性抗生素類藥物。在化學結構上，二者都具有相同的主鏈 (L-glucose and 3-O-carbamoyl-D-mannose and five amino acids, one amine)，僅在末端支鏈有所不同；平陽黴素為單一成分 A₅ (spermidine derivative)；而 bleomycin 則由多成分組成，其中主要成分為 A₂ (dimethyl sulfonium aminopropyl derivative)，占 55-70%，其次為 B₂ (agmatine derivative)，占 25-32%；bleomycin 同樣含有 A₅ 成分，不過只占 1% 左右。

由於平陽黴素的化學性質及結構與 bleomycin 相類似；所以我們想進一步了解平陽黴素的抗腫瘤活性及研究其作用機轉，以供日後臨床使用上的參考。另外，由於鱗狀上皮癌是口腔顎面部發生率最高的惡性腫瘤，所以本研究選用人類口腔鱗狀上皮癌細胞株-KB 細胞^{9, 10}，來作為藥物作用細胞。我們首先用多孔培養皿法¹¹來決定藥物作用濃度，然後再用細胞生長曲線¹²、細胞附著生存率¹³等實驗方法來研究平陽黴素對 KB 細胞的生長抑制作用，同時利用位相差顯微鏡來觀察細胞在藥物作用後型態上的變化；最後利用 DNA 合成抑制試驗¹⁴、DNA 斷鏈試驗¹⁵來探討平陽黴素對 KB 細胞可能的抑制機轉。

另一方面，在化學治療中，運用抗癌藥物來殺傷腫瘤細胞以達到治療效果的同時；不可避免的，對正常的組織細胞也會造成一定的傷害，尤其是增殖快速的骨髓造血細胞及胃腸道細胞¹⁶。因此，任何一種抗癌藥物在臨床使用前，除了須證明藥物對腫瘤組織有明顯的抑制作用外，還必須審慎評估藥物對正常組織的毒性作用。

因此，我們接下來想繼續研究平陽黴素對人類正常組織的毒性作用，並進而探討其是否具有潛在基因毒性的可能。在實驗中，我們選用人類頰部纖維母細胞 (human buccal fibroblasts)¹⁷⁻¹⁹，來作為藥物作用的細胞。利用細胞生長曲線，DNA 合成抑制試驗等實驗方法來評估平陽黴素對人類頰部纖維母細胞的毒性作用；並以位相差顯微鏡來觀察細胞在藥物作用後型態上的變化。另外我們同樣利用 DNA 斷鏈試驗，來偵測平陽黴素對纖維母細胞是否具有基因毒性作用，以避免臨床使用平陽黴素進行化學治療時，造成正常組織的過度傷害。



貳、材料與方法

一、實驗材料

(1) 試藥

1. Acetic acid-----Merck, Germany
2. Aqueous scintillation counting fluid-----Dupont, USA
3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)---Gibco, USA
4. EDTA-----Bio Rad, USA
5. FBS (fetal bovine serum)-----Gibco, USA
6. Giemsa dye-----Merck, Germany
7. HEPES-----Gibco, USA
8. ³H-thymidine-----Amersham, UK
9. KCl-----Merck, Germany
10. KH₂PO₄-----Merck, Germany
11. K₂HPO₄-----Merck, Germany
12. NaHCO₃-----Sigma, USA
13. PBS (phosphate buffer solution)-----Gibco, USA
14. PSA (penicillin-streptomycin-amphotericin B)---Gibco, USA

15. SDS (sodium dodecyl-sulfate)-----Bio Rad, USA
16. TCA (trichloroacetic acid)-----Sigma, USA
17. Tris -----Bio Rad, USA
18. Trypsin-----Gibco, USA
19. 平陽黴素-----河北製藥廠, 大陸

(2) 儀器

1. Cover slip-----Bellco, USA
2. Immunofluorescence microscope--Nikon diaphot 300, Japan
3. Incubator-----Forma, USA
4. Liquid scintillation counter-----Aloca LSC-900, Japan
5. Laminar flow-----Holton, Germany
6. Mettler toledo-----AB104, Switzerland
7. Multiwells-----Nunc, Denmark
8. Phase contrast microscope-----Nikon TMS, Japan
9. Pipetman-----Gilson, USA
10. Plastic petri dish-----Nunc, Denmark
11. Plastic flask-----Nunc, Denmark

(3) 藥品及試劑的配製

1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)

per liter (with d₂-H₂O)

DMEM power	1PK
NaHCO ₃	3.79g/L
HEPES	4.75g/L
pH valve	7.35

2. cDMEM (10 %)

per	100ml
PSA	1ml
FBS	10ml
DMEM	89ml

3. PBS (phosphate buffer solution)

0.88g/500ml K₂HPO₄+ 1.01g/500ml KH₂PO₄

4. 平陽黴素

將其白色粉末溶於 PBS 液中，配製成濃度 1mg/ml 的保存溶液 (stock solution) 後，置於-20 °C 的冰箱中儲存。

(4) 細胞培養方法

I. KB 細胞

本實驗所用之 KB 培養細胞，係來源於人類口腔鱗狀上皮癌細胞，由中山醫學院口腔醫學研究所口腔生物研究室所提供。細胞的繼代培養，係將細胞植入培養皿內，在 37 °C，含 5 % CO₂ 的培養箱中培養 48 小時後，吸去舊培養液，此時細胞成單層 (monolayer) 附著在培養皿上。再以 PBS 液 (-) (phosphate buffer saline 中不含 Ca²⁺ 及 Mg²⁺) 洗滌後，加入 0.25 % trypsin (Gibco, USA) 作用，使細胞剝離懸浮形成單一細胞懸浮液 (single cell suspension)，再加入新的培養液，中止 trypsin 的作用，並利用血球計數盤計數，稀釋至所需之細胞數目為止，再置入新的培養皿中，並加入新的培養液，再放入 37 °C 自動恆溫培養箱中繼續培養，48 小時後更換培養液，即為繼代培養。細胞之培養液為 DMEM 液，其中加入 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, Gibco) 及抗生素 (10000 U/ml penicillin, 10mg/ml streptomycin and 0.025mg/ml amphotericin B)，並調整 pH 值為 7.35 後再使用²⁰。

II. 纖維母細胞 (fibroblasts)

實驗所用之纖維母細胞 (fibroblasts)，係取自於三名年輕成年男性，無不良煙酒及嚼檳榔嗜好；同時口腔內無其他黏膜病變。於門診手術拔除下顎阻生智齒時，經患者同意後，取下大約 0.2cm × 0.2cm 大小頰部組織供體外培養之用；將組織塊置於培養皿內，細切成小塊後，滴入 DMEM 培養液，其中加入 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 及抗生素 (10000 U/ml penicillin, 10mg/ml streptomycin and 0.025mg/ml amphotericin B)，並調整 pH 值為 7.35 後再使用。組織塊置於 37 °C 自動恆溫培養箱中培養。待 5-8 天後，利用位相差顯微鏡觀察到纖維母細胞已生成並貼附於培養皿上時，利用 0.25 % trypsin 與 0.05 % EDTA 作用 5 分鐘，將纖維母細胞剝離；再置入新的培養皿中，並加入新的培養液，再放入自動恆溫培養箱中繼續培養，即為繼代培養。根據研究指出²¹：第十世代 (passage) 以內之纖維母細胞，其細胞增殖旺盛，同時細胞性狀與體內細胞相似性大，是檢測藥物之較佳實驗對象；同時培養至第四世代後，才有足夠細胞數量供實驗所用，因此我們選用介於第四至第八世代的培養細胞進行本實驗。

二、實驗方法

(1) 多孔培養皿法 (Multiwells method)

取 5×10^4 個 KB 細胞懸浮液，植入 24 孔培養皿各孔洞中，置入 37°C 之恆溫培養箱中培養。24 小時後，將舊懸浮液吸去，以 PBS 液 (一) 洗滌後，除對照組外，在其餘各孔中加入含各種不同濃度的平陽黴素培養液 ($0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$)。培養 24 小時後，吸去培養液，以 PBS 液 (一) 洗滌兩次後，加入不含藥物的培養液，繼續培養 48 小時。再以 PBS 液 (一) 洗滌後，加入 10% Giemsa 染色液 (Merck, Germany) 染色 10 分鐘；水洗，乾燥後，觀察培養皿各孔細胞染色深淺的情形。

(2) 細胞生長曲線 (Cell growth curve)

分別取 1×10^5 個 KB 細胞及 1×10^5 個纖維母細胞，植入直徑 35mm 之塑膠培養皿中 (每一藥物濃度各三個培養皿)，置入 37°C 之恆溫培養箱中培養。24 小時後，吸去舊培養液，除對照組外，加入含各種不同濃度的平陽黴素培養液 ($0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$)。作用 24 小時後，捨棄舊培養液，以 PBS 液 (一) 洗滌兩次後，重新加入培養液培養，分別於作用 24、48 及 72 小

時後，取出培養皿，以 PBS 液 (-) 洗滌後，加入 0.1ml 的 0.25 % trypsin 將細胞剝離，再加入 0.9ml 之培養液，混合均勻後，以血球計數盤來計算細胞數目。另外在藥物作用後，利用位相差顯微鏡 (Nikon TMS, Japan)，來觀察 KB 細胞及纖維母細胞在藥物作用後型態上的變化。

(3) 細胞附著生存率 (Plating efficiency)

準備 30 個培養皿，分別種入 250 個 KB 細胞，並輕搖培養皿使細胞均勻擴散，置入培養箱中培養。24 小時後，捨棄舊培養液，除對照組外，加入含各種不同濃度的平陽黴素培養液 (0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml)。於作用 3 小時及 24 小時後，更換新培養液，繼續置入培養箱中培養 7 天，使其形成群落。培養終了，以 PBS 液 (-) 洗滌兩次後，加入 10 % Giemsa 染色 10 分鐘；洗去多餘染料後，於室溫下乾燥，利用實體顯微鏡計算各培養皿的群落數，並以對照組形成之群落數為 100 %，計算在不同藥物濃度下的生存率；並推算出半數細胞致死濃度 (IC₅₀)。

(4) DNA 合成抑制試驗 (DNA synthesis inhibition assay)

將滅菌完之直徑 15mm 圓形玻璃蓋玻片 (cover slip) 放入多孔

培養皿內，然後在各孔中分別植入 1×10^5 個 KB 細胞及 2×10^4 個纖維母細胞，培養 24 小時後，將培養液吸去，除對照組外，其他換成各種不同濃度的平陽黴素培養液 (0.5 μ g/ml , 1 μ g/ml , 5 μ g/ml , 10 μ g/ml , 50 μ g/ml)。作用 24 小時後，吸去含藥物之培養液，加入含 0.5 μ Ci/ml/well [methyl- 3 H] thymidine (Amersham, UK) 的培養液，繼續培養 24 小時。以 4 $^{\circ}$ C 之生理食鹽水洗滌，並以 4 $^{\circ}$ C 5% 之 TCA 液 (trichloroacetic acid) 固定細胞，反覆三次，每次 30 分鐘，再以 4 $^{\circ}$ C 之蒸餾水洗滌兩次。然後用加熱後的針頭，由多孔培養皿底部穿透，取出蓋玻片，於室溫下乾燥後，放入塑膠瓶中；加入 3 cc 之閃爍液 (aqueous scintillation counting fluid, Dupont, USA)，利用液體閃爍計數器 (liquid scintillation counter, Aloka LSC-900, Japan) 測定細胞內所含之放射能。

(5) DNA 斷鏈試驗 (DNA strand break assay)

取 5×10^4 個 KB 細胞及 2×10^4 個纖維母細胞，分別植入 24 孔培養皿各孔洞中，置入 37 $^{\circ}$ C 之恆溫培養箱中培養。24 小時後，吸去舊培養液，以 PBS 液 (-) 洗滌後，加入含 0.2 μ Ci/ml/well [methyl- 3 H] thymidine 的培養液，繼續培養 24 小時。吸去含放射能之培養液，除對照組外，其餘加入各種不同濃度的平陽黴素培養液

(0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml)。24 小時後，吸去培養液，以 PBS 液 (-) 洗滌後，在各孔中加入 0.25 % trypsin 將細胞剝離，置入塑膠試管中，然後加入 1ml 細胞溶解液 (內含 2 % SDS, 10mM EDTA, 10mM Tris, 0.05M NaOH)，於冰桶內作用 1 分鐘後，再加入 0.5ml 0.12M KCl，隨即置入 65 °C 水浴 10 分鐘；取出試管後，仍於冰桶內作用 5 分鐘，再以 3500 r.p.m 離心 15 分鐘。上清液倒入塑膠瓶中，並加入 1ml 0.05M HCl；沉澱物用 2ml 65 °C 蒸餾水溶解後，倒入另一塑膠瓶中。在各瓶中加入 5 cc 之閃爍液 (aqueous scintillation counting fluid)，利用液體閃爍計數器 (liquid scintillation counter) 測定各瓶內所含之放射能。

$$\% \text{ DNA precipitated} = \frac{\text{pellet radioactivity}}{(\text{pellet} + \text{supernatant}) \text{ radioactivity}} \times 100 \%$$

三、統計方法

本實驗統計上分析法採用 Student's t-test 比較各試驗組與對照組間的差異性，數據的表現方式為平均值 \pm 標準差 (Mean \pm Standard Deviation)，顯著水準 (Significant level) $\alpha = 0.05$ 。

參、結果

(1) 多孔培養皿法

於 24 孔培養皿中觀察結果，可發現對照組各孔中細胞生長良好；藥物濃度在 $50\mu\text{g/ml}$ 時，細胞生長完全被抑制，均無藍紫色之染色出現；而濃度在 $5\mu\text{g/ml}$ 時，染色範圍與色澤深淺與對照組相比，始有明顯變化 (圖二)。因此在以下實驗中，我們仍分別以平陽黴素濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$ 作為測試濃度。

(2) 細胞生長曲線

I. KB 細胞

1×10^5 個 KB 細胞植入直徑 35mm 之培養皿中，培養 24 小時後，細胞數目為 $(1.11 \pm 0.03) \times 10^5$ 個細胞；在藥物作用 24 小時後，對照組為 $(2.55 \pm 0.13) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 有 $(2.55 \pm 0.16) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1\mu\text{g/ml}$ 則下降至 $(2.24 \pm 0.11) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 有 $(1.64 \pm 0.19) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 有 $(1.18 \pm 0.06) \times 10^5$ 個

細胞。

藥物作用完 24 小時後，對照組為 $(6.33 \pm 0.69) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(5.87 \pm 0.31) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 則有 $(4.98 \pm 0.24) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(3.23 \pm 0.28) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(1.96 \pm 0.13) \times 10^5$ 個細胞。

藥物作用完 48 小時後，對照組為 $(12.4 \pm 1.25) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(11.3 \pm 0.54) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 則有 $(10.4 \pm 0.36) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(5.24 \pm 0.28) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(2.98 \pm 0.46) \times 10^5$ 個細胞。

藥物作用完 72 小時後，對照組為 $(22.3 \pm 1.7) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(19.9 \pm 0.63) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 則有 $(16.7 \pm 1.1) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(8.75 \pm 0.46) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(3.96 \pm 0.47) \times 10^5$ 個細胞。以濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 作用之細胞在實驗過程中全體逐漸呈現出細胞崩潰、溶解、自培養皿底部浮起等現象，因此判定已全數死亡。

將對照組與各試驗組做比較，並利用 Student's t-test 統計方法加以分析，可發現藥物濃度大於或等於 $5\mu\text{g/ml}$ 時，KB 細胞生長明顯受到抑制 ($t = 13.41, p < 0.001$) (圖三)。

另外利用位相差顯微鏡 ($\times 200$) 可觀察到：與對照組細胞相比較，在藥物作用下，KB 細胞外型明顯腫脹，細胞間指狀連接減少，細胞彼此遠離；而隨著藥物濃度增高，變化也越為顯著 (圖四 A, B, C)。

II. 纖維母細胞

1×10^5 個纖維細胞植入直徑 35mm 之培養皿中，培養 24 小時後，細胞數目為 $(9.69 \pm 0.13) \times 10^4$ 個細胞；在藥物作用 24 小時後，對照組為 $(1.18 \pm 0.10) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 有 $(1.09 \pm 0.11) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1\mu\text{g/ml}$ 則下降至 $(1.06 \pm 0.06) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 有 $(0.86 \pm 0.03) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 有 $(0.71 \pm 0.01) \times 10^5$ 個細胞。

藥物作用完 24 小時後，對照組為 $(1.58 \pm 0.12) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 有 $(1.35 \pm 0.21) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1\mu\text{g/ml}$ 則有

$(1.13 \pm 0.04) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(0.93 \pm 0.09) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(0.73 \pm 0.01) \times 10^5$ 個細胞。

藥物作用完 48 小時後，對照組為 $(2.65 \pm 0.10) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(2.41 \pm 0.07) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 則有 $(1.92 \pm 0.05) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(0.98 \pm 0.09) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(0.79 \pm 0.05) \times 10^5$ 個細胞。

藥物作用完 72 小時後，對照組為 $(3.68 \pm 0.05) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(3.50 \pm 0.1) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 則有 $(2.52 \pm 0.1) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 有 $(1.19 \pm 0.10) \times 10^5$ 個細胞，濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 有 $(0.88 \pm 0.02) \times 10^5$ 個細胞。而以濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 作用之細胞在實驗進行中全體同樣呈現出細胞崩潰、溶解、自培養皿底部浮起等現象，因此亦判定全數死亡。

將對照組與各試驗組之間做比較，並以 Student's t-test 統計方法加以分析，可發現藥物濃度大於或等於 $1 \mu\text{g/ml}$ 時，纖維母細胞生長明顯受到抑制 ($t = 17.85, p < 0.001$) (圖五)。

另外在顯微鏡下同樣可觀察到 ($\times 100$):與對照組細胞相比較,在藥物作用下,纖維母細胞外型改變,細胞明顯增大;而隨著藥物濃度增高,變化也越為顯著(圖六 A, B, C)。

(3) 細胞附著生存率

以不同藥物濃度作用KB細胞3小時後,其附著生存率與對照組比較為:0.5 $\mu\text{g/ml}$, (87.90 \pm 2.6) % ;1 $\mu\text{g/ml}$, (80.38 \pm 12) % ;5 $\mu\text{g/ml}$, (53.59 \pm 3.1) % ;10 $\mu\text{g/ml}$, (39.15 \pm 5.2) % 。當以不同藥物濃度作用KB細胞24小時後,其附著生存率與對照組比較則為:0.5 $\mu\text{g/ml}$, (85.59 \pm 15) % ;1 $\mu\text{g/ml}$, (61.53 \pm 6.1) % ;5 $\mu\text{g/ml}$, (15.59 \pm 4.6) % ;10 $\mu\text{g/ml}$, (0.67 \pm 0.5) % 。

由上述結果可知,平陽黴素對KB細胞的影響,在細胞生存方面,隨藥物濃度和作用時間的增加,使得群落形成的數目隨之減少;另一方面,我們利用作圖法來推算出平陽黴素對KB細胞的半數細胞致死濃度 (IC_{50}):藥物作用時間3小時為 6.2 $\mu\text{g/ml}$,作用24小時為 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 。(圖七)。

(4) DNA 合成抑制試驗

I. KB 細胞

DNA 前驅物 ^3H -thymidine 放射強度結果顯示：藥物濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 時，DNA 合成為對照組之 $(93.8\pm 3.6)\%$ ，而濃度 $1\mu\text{g/ml}$ 時為 $(87.9\pm 8.9)\%$ ，濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 為 $(80.7\pm 5.6)\%$ ，濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 為 $(65.9\pm 7.5)\%$ ，濃度 $50\mu\text{g/ml}$ 為 $(45.5\pm 2.0)\%$ 。以 Student's t-test 統計分析得知，當平陽黴素濃度為 $5\mu\text{g/ml}$ 時，對 KB 細胞 DNA 合成即有明顯抑制現象 ($t = 4.38, p < 0.05$)；濃度為 $10\mu\text{g/ml}$ 時 $t = 6.4, p < 0.01$ ，濃度為 $50\mu\text{g/ml}$ 時 $t = 12.1, p < 0.001$ (圖八)。

II. 纖維母細胞

DNA 前驅物 ^3H -thymidine 放射強度結果顯示：藥物濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 時，DNA 合成為對照組之 $(99.4\pm 3.5)\%$ ，而濃度 $1\mu\text{g/ml}$ 時為 $(81.2\pm 3.0)\%$ ，濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 為 $(58.1\pm 1.4)\%$ ，濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 為 $(30.5\pm 1.1)\%$ ，濃度 $50\mu\text{g/ml}$ 為 $(2.4\pm 0.5)\%$ 。同樣以 Student's t-test 統計分析得知，當平陽黴素濃度為 $1\mu\text{g/ml}$ 時，對纖維母細胞 DNA 合成即有明顯抑制現象 ($t = 5.18, p < 0.01$)，濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 時 $t = 13.73, p < 0.001$ ，濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 時 $t = 23.17, p < 0.001$ ， $50\mu\text{g/ml}$ 時 $t = 33.20, p < 0.001$ (圖九)。

(5) DNA 斷鏈試驗

I. KB 細胞

DNA 斷鏈試驗，乃由 Olive¹⁵ 所提出的一種簡便的實驗方法，可以用來偵測化學物質是否對哺乳類細胞內的 DNA 造成傷害；其原理是：當細胞受到化學物質作用，導致 DNA 鏈斷裂時，部份 DNA 片段會由 nucleoprotein 釋出 (上清液)，至於 DNA 的其他部份則仍附著於蛋白質上 (沉澱物)。因此，在上清液中所含 DNA 片段的量越多 (即所含放射能越強者)，表示 DNA 所受的傷害越大。在本實驗中，藥物濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，DNA 沉澱率 (% DNA precipitated) 為對照組之 (99.7 \pm 2.9) %，而濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時為 (98.5 \pm 1.5) %，濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為 (83.5 \pm 2.1) %，濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為 (75.4 \pm 4.0) %，濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為 (57.5 \pm 2.7) %。以 Student's t-test 分析數據後，得知：當以濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的平陽黴素作用 KB 細胞 24 小時後，能明顯造成細胞 DNA 鏈的斷裂 ($t = 7.8, p < 0.01$)；濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時 $t = 8.48, p < 0.01$ ，濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時 $t = 18.24, p < 0.001$ (圖十)。

II. 纖維母細胞

DNA 斷鏈試驗除了具有很好的敏感度之外，同時還有實驗操作

簡便、獲得結果迅速及試劑價格便宜等優點；可以用來偵測化學物質是否具有基因毒性而能造成哺乳類動物細胞 DNA 鏈的斷裂。當以不同濃度平陽黴素作用纖維母細胞 24 小時後，計算 DNA 沉澱率 (% DNA precipitated) 如下：藥物濃度 0.5 μ g/ml 時，為對照組之 (87.2 \pm 9.0) %，而濃度 1 μ g/ml 時為 (84.8 \pm 6.0) %，濃度 5 μ g/ml 為 (69.3 \pm 5.5) %，濃度 10 μ g/ml 為 (63.3 \pm 5.0) %，濃度 50 μ g/ml 為 (58.0 \pm 9.0) %。以 Student's t-test 分析後得知，以濃度 1 μ g/ml 的平陽黴素作用纖維母細胞 24 小時後，能明顯造成細胞 DNA 鏈的斷裂 ($t = 3.37, p < 0.05$)；同時，藥物濃度越高，對 DNA 所造成的傷害則越顯著，濃度 5 μ g/ml 時 $t = 7.13, p < 0.01$ 、10 μ g/ml 時 $t = 8.45, p < 0.01$ 與 50 μ g/ml 時， $t = 7.0, p < 0.01$ (圖十一)。

綜合以上實驗結果，我們認為：在體外試驗中，平陽黴素能有效抑制腫瘤細胞的生長，而其作用機轉為切斷細胞 DNA 鏈和抑制細胞 DNA 的合成。另一方面，平陽黴素能造成人類正常細胞 DNA 鏈的斷裂，說明它具有基因毒性；在使用平陽黴素進行化學治療時，值得臨床醫師加以重視。

肆、討論

近年來，由於在細胞動力學、藥物作用動力學及免疫學方面研究的進展，使得惡性腫瘤的化學治療方式不斷改進；諸如藥物的選擇、劑量的調整、給藥的途徑及療程的設計等都日趨完善。因此，在目前，化學治療與外科手術、放射治療已成為醫學界公認治療惡性腫瘤的三種主要方法。不過，化學治療在下列幾方面明顯優於外科手術與放射治療：第一，外科手術與放射治療只是局部治療，尤其是對來源於造血系統方面的腫瘤或已發生轉移的實體腫瘤等，往往無能為力；而化學治療有全身治療的效果。第二，利用輔助化學治療可以消滅手術及放射治療時不易徹底消滅的亞臨床瘤細胞，可藉此提高治愈率，並減少復發的可能性。第三，化學治療不需特定的手術條件與昂貴的儀器設備，只要臨床醫師能適當的使用抗癌藥物，即可進行治療^{2,3,22}。

鑑於化學治療有以上優點，因此醫學界不斷的為開發更有效的新型抗腫瘤藥物而努力。不過，由於化學治療的效果受到抗癌藥物

的選擇性、對正常組織的毒性作用及腫瘤細胞的抗藥性等因素的影響；所以任何一種新藥物的開發與研製，在臨床使用前都必須經過一系列體外及體內的試驗；除了證明藥物對腫瘤組織有明顯的抑制作用外，同時還必須將藥物對正常組織的毒性反應作審慎評估，以避免在化學治療時對正常組織細胞造成過度的傷害^{23, 24}。

平陽黴素是大陸地區學者所開發出來的抗腫瘤藥物，根據文獻報導，平陽黴素的化學性質與結構跟目前用來治療惡性腫瘤有顯著療效的抗癌藥物－bleomycin 相似⁴⁻⁸；由於bleomycin 在臨床上已被廣泛使用，關於它的抗癌效果與作用機轉在許多文獻當中都有清楚的描述²⁵⁻³⁵。不過，平陽黴素在這一方面的研究甚少，因此我們想先瞭解它的抗腫瘤活性並進一步探討它的作用機轉。而利用體外培養細胞來檢測抗癌藥物的實驗方法，由於可以直接用人類細胞來檢測藥物效應，同時具備有實驗結果獲得迅速、較進行動物實驗經濟等優點；所以普遍為科學界所應用。但是因為體內、外環境有所不同，不能以培養細胞檢測抗癌藥物的結果作為臨床使用的直接依據，而應該視為對受檢藥物生物效應的了解及進一步實驗的參考²¹。

在本研究中，我們首先採用來源於人類口腔鱗狀上皮癌細胞株—KB 細胞，來檢測平陽黴素的抗腫瘤活性及探討其可能的作用機轉。我們先用多孔培養皿法來決定平陽黴素的測試濃度後，再繼續進行其他實驗。在細胞生長曲線方面：當以 5 μ g/ml 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，可有效抑制 KB 細胞的生長 ($p < 0.05$)；同時隨著濃度的增加，抑制現象也愈趨明顯。關於細胞型態的觀察，學者指出³⁶⁻³⁸：在顯微鏡下觀察，當培養細胞外型明顯改變，細胞間指狀連接減少，細胞彼此遠離，甚至逐漸呈現出細胞膜破潰(rupture of cell membrane)、細胞內容物崩解 (disrupted of cytoplasmic organelles) 等現象時，是細胞變性並步入死亡的過程；而這些現象與我們利用位相差顯微鏡觀察到 KB 細胞在平陽黴素作用後，細胞型態的改變相類似。

另外，細胞生存附著實驗方法，是由 Puck 等所提出³⁹，用來定量細胞在不利的條件下，失去生存能力的方法，具有很好的敏感度¹¹。結果顯示：隨著作用時間和藥物濃度的增加，細胞的生存附著亦相對減少。綜合以上實驗結果得知：在體外試驗中，平陽黴素能有效抑制腫瘤細胞的生長。而這一方面則與部份學者所作之研究報告指出平陽黴素在體外實驗中能有效抑制人類腺樣囊性癌 SACC-83、

舌癌 Tca 8113、牙齦癌 Ca 9-22 等癌細胞株的實驗結果相似⁴⁰⁻⁴²。

在 DNA 合成抑制方面，以 5 μ g/ml 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，³H-thymidine 的放射強度降至對照組的 80.73 % ($p < 0.05$)，表示平陽黴素的作用機轉可能與抑制細胞 DNA 的合成有關。因此，爲了進一步證實，我們接著進行 DNA 斷鏈試驗：DNA 斷鏈試驗 (DNA strand break assay)，或稱 DNA 沉澱試驗 (DNA precipitation assay)，是由 Olive¹⁵ 所提出的一種操作簡便，同時敏感度高的實驗方法，可以用來評估化學物質是否對哺乳動物細胞具有潛在的基因毒性；換言之，即爲偵測細胞 DNA 受到化學物質傷害的程度。經由分析實驗結果得知：當以 5 μ g/ml 濃度的平陽黴素作用 KB 細胞 24 小時後，能明顯引發細胞 DNA 鏈的斷裂 ($p < 0.05$)。所以，可以證實平陽黴素對於體外培養腫瘤細胞的抑制機轉爲切斷細胞 DNA 鏈而抑制細胞 DNA 的合成。這一點則與文獻中所描述有關 bleomycin 的作用機轉相同³¹⁻³⁵。

不過，關於平陽黴素與 bleomycin 之間的比較，在本研究中並未加以探討。Lapi 曾分別比較 A₂、B₂、A₅ 等成分對 L-cells (mouse fibroblasts) 的抑制作用⁴²，發現 A₅ 成分的作用最強。另一方面，研

究指出³¹：bleomycin 對體外培養 Ehrlich ascites carcinoma cells 的 IC₅₀：藥物作用 2 小時為 33.0 mcg/ml，藥物作用 48 小時為 5.9 mcg/ml；因此可考慮以此作為依據，進一步實驗來比較平陽黴素與 bleomycin 二者之間，何者抗癌效果較佳⁴⁴。

另一方面，幾乎所有抗癌藥物在殺傷腫瘤細胞的同時，也會對正常的組織細胞造成一定程度的傷害。因此，在得知平陽黴素能有效抑制腫瘤細胞後，關於平陽黴素對正常細胞的毒性作用便成為我們繼續研究的主題。同時，近來有學者提出：bleomycin 對體外培養中國倉鼠 V79 及 CHO 細胞株具有基因毒性^{45, 46}；當反覆在小鼠皮下塗抹 bleomycin 時，可在塗抹部位誘發纖維肉瘤的產生⁴⁷，當長期使用 bleomycin 作為化學治療藥物時，甚至可能會導致另一種類惡性腫瘤的發生^{48, 49}。而探討其發生原因，則認為與 bleomycin 的藥物作用機轉有關^{50, 51}。雖然目前尚未發現關於平陽黴素在致突變性方面的研究，而由於平陽黴素與 bleomycin 的作用機轉相同，因此我們也對平陽黴素是否具有基因毒性加以探討。

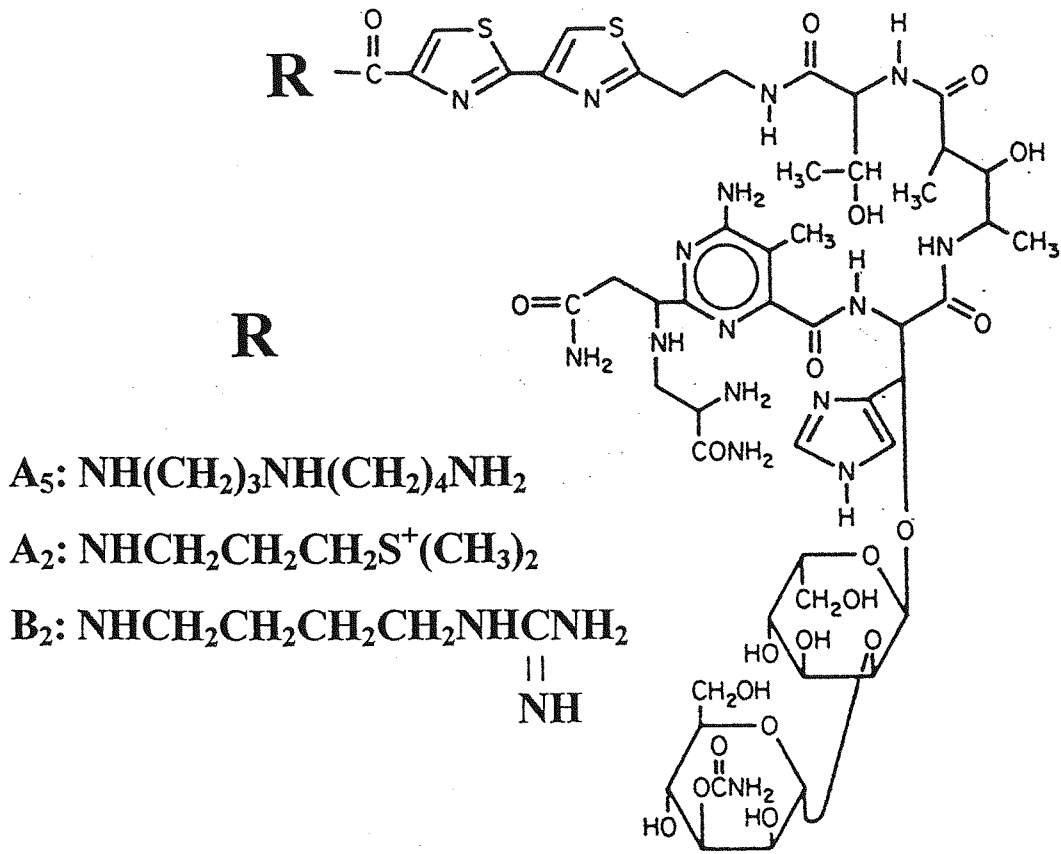
我們利用容易取得之正常人類頰部纖維母細胞來評估平陽黴素對正常組織細胞的毒性作用。不過，由於纖維母細胞與 KB 細胞的

組織來源不同，因此實驗結果並不適合互相比較，而僅能作為後續研究及臨床使用的參考。實驗結果顯示：當以 $1\mu\text{g/ml}$ 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，可有效抑制纖維母細胞的生長 ($p < 0.05$)；隨著濃度的增加，抑制現象也愈趨明顯。在細胞型態上，利用位相差顯微鏡可以觀察到細胞型態上的改變，表示細胞正逐漸變性、死亡。這些與學者利用中國倉鼠 CHO 細胞株來研究平陽黴素對正常細胞的毒性作用結果相似³。在 DNA 合成抑制方面，以 $1\mu\text{g/ml}$ 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，能明顯抑制細胞 DNA 的合成 ($p < 0.05$)；而以 DNA 斷鏈試驗來進一步偵測平陽黴素是否具有基因毒性時，我們發現：以 $1\mu\text{g/ml}$ 濃度的平陽黴素作用 24 小時後，能明顯引發纖維母細胞的 DNA 鏈的斷裂 ($p < 0.05$)；證實平陽黴素對於體外培養人類正常細胞具有基因毒性。然而，平陽黴素是否如 bleomycin 一樣會造成組織細胞的突變，仍然需要進一步的研究探討。

依據以上實驗結果，我們認為：在體外試驗中，平陽黴素雖然能有效抑制腫瘤細胞的生長，同時也會對人類正常細胞產生基因毒性的作用。因此，我們建議：若將來臨床醫師考慮將平陽黴素作為化學治療用藥時，必須對藥物引起的毒性反應給與相當程度的注意，尤其是在長期使用時；以避免對患者正常組織造成無法挽救的

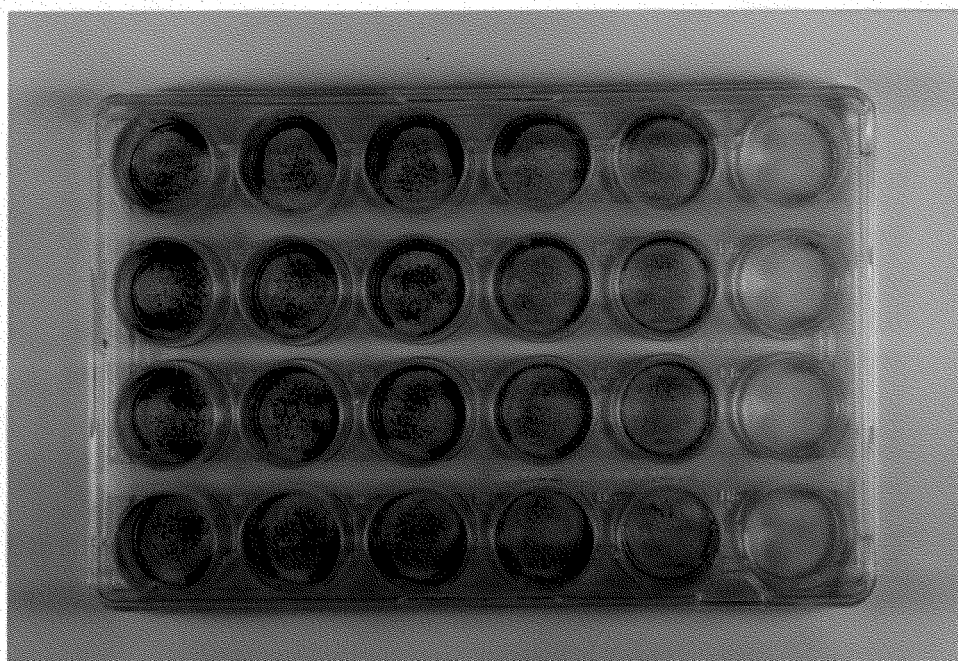
傷害。

伍、圖表



圖一、平陽黴素與 bleomycin 的化學結構式，

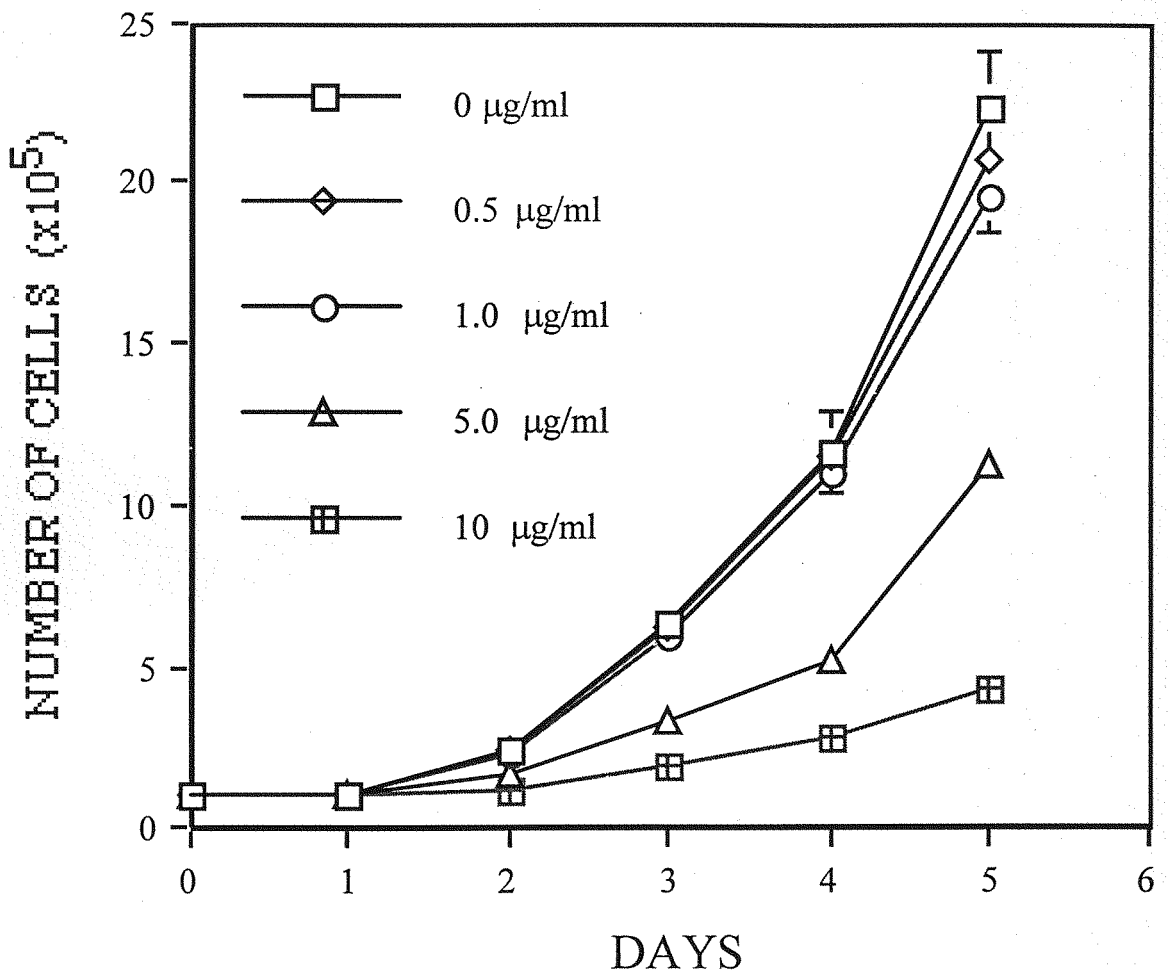
圖中“R”表示末端支鏈。



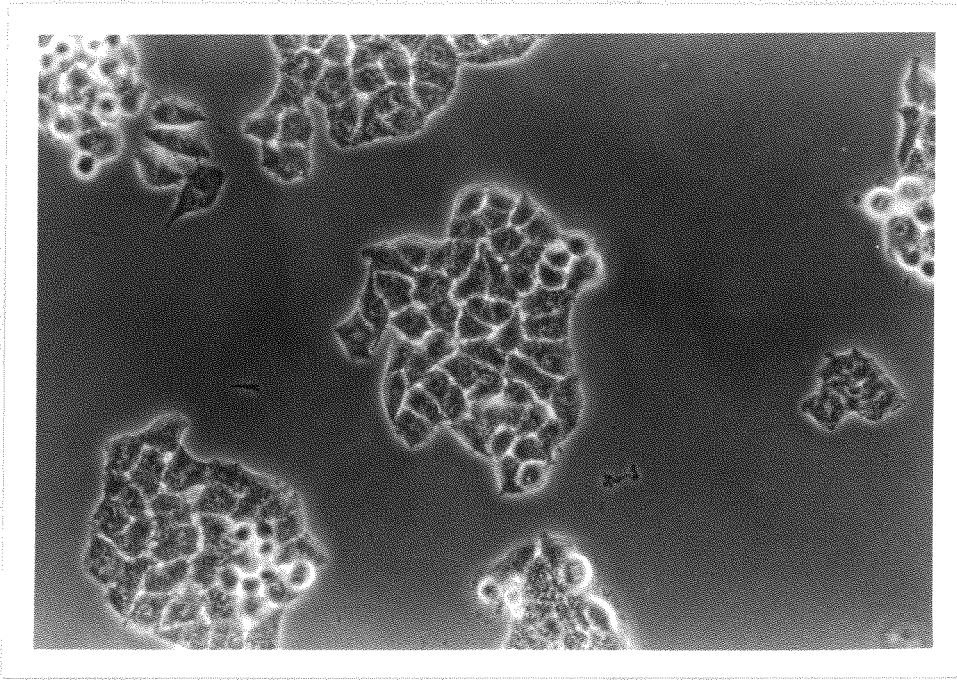
0, 0.5, 1, 5, 10, 50

Concentration of pingyangmycin ($\mu\text{g/ml}$)

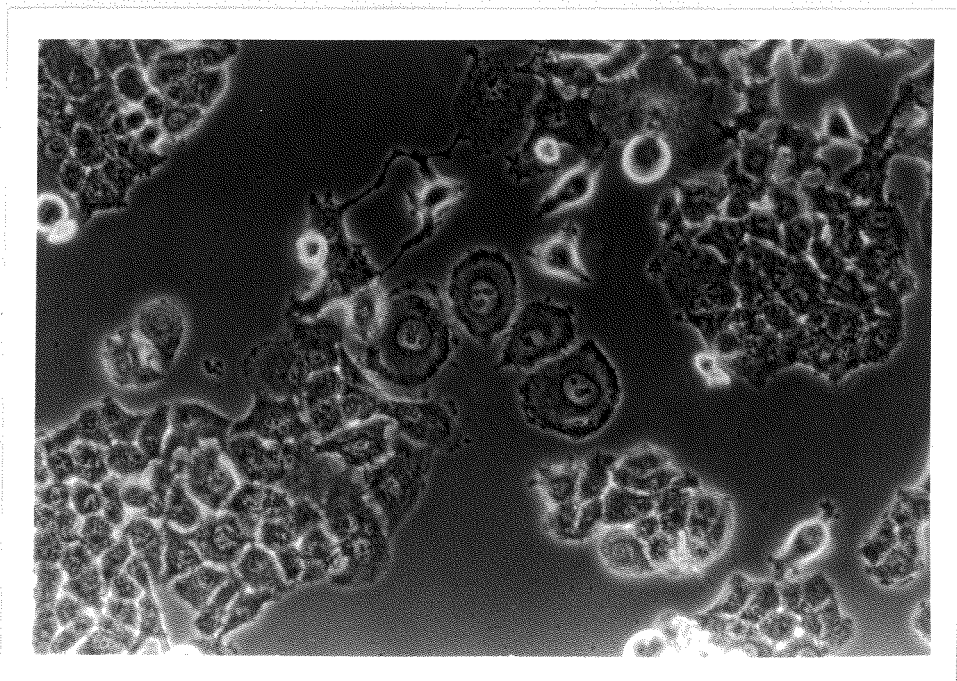
圖二、KB細胞的生長受不同平陽黴素濃度的影響。



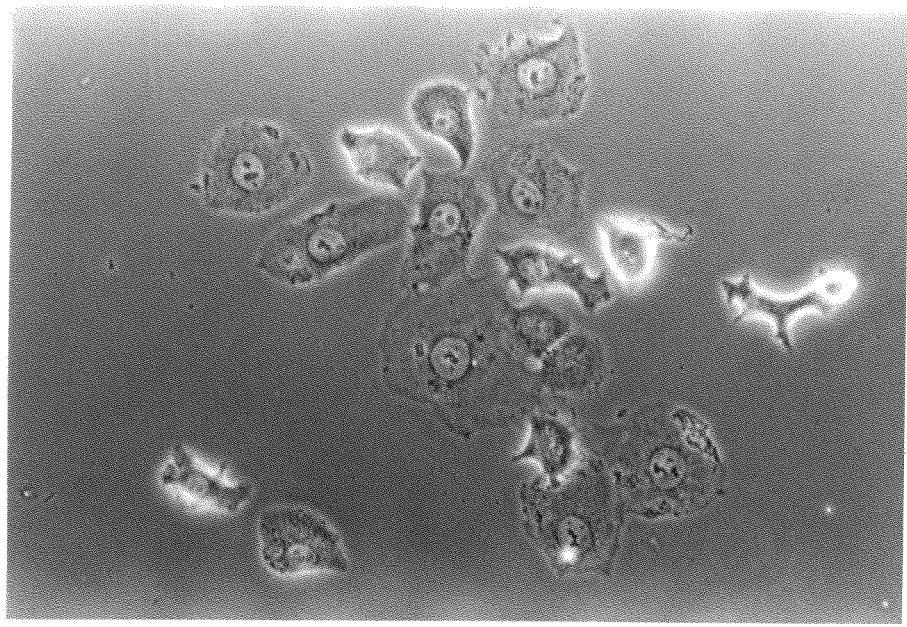
圖三、不同濃度平陽黴素對 KB 細胞增殖之影響。



圖四：(A)

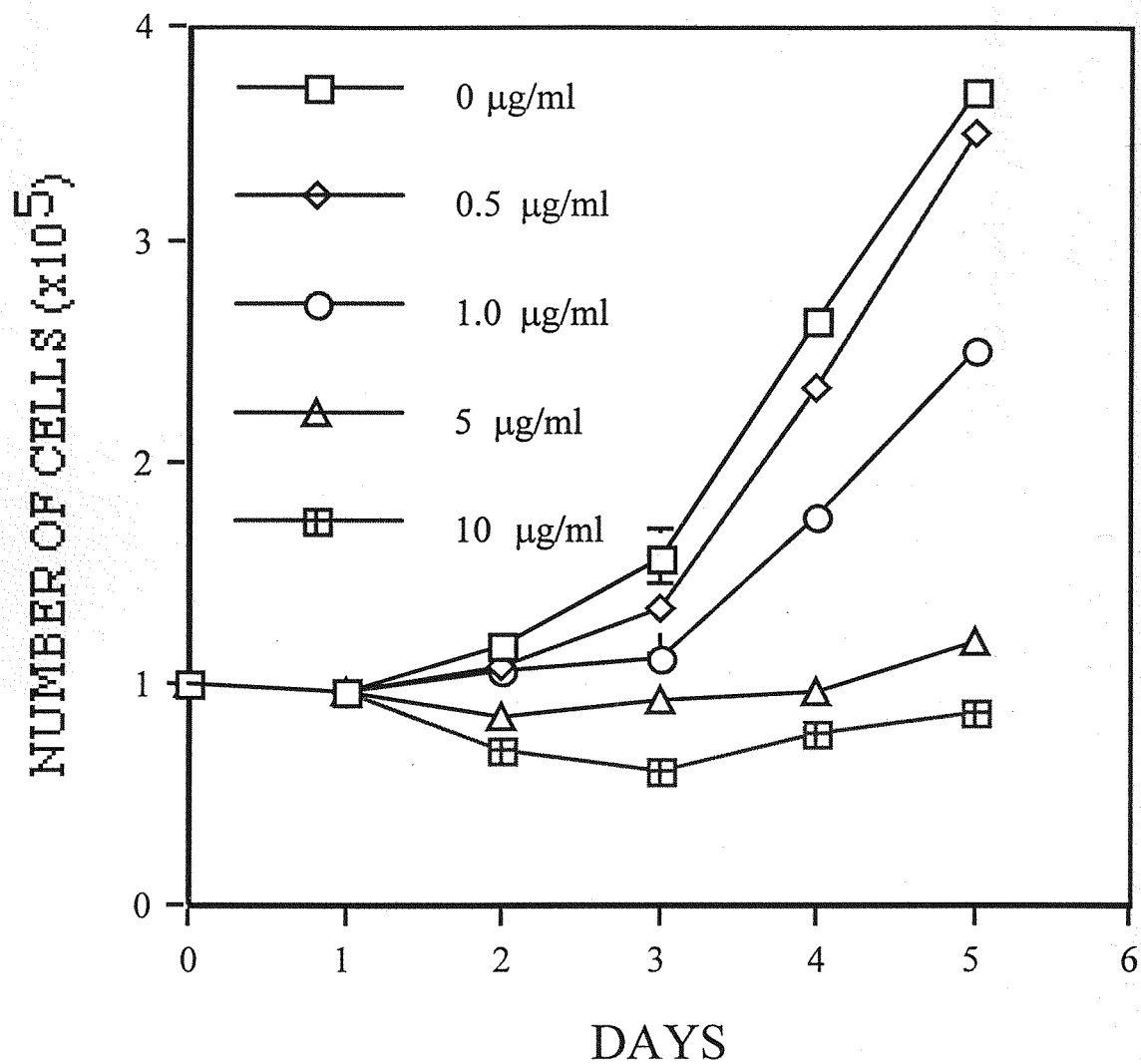


圖四：(B)

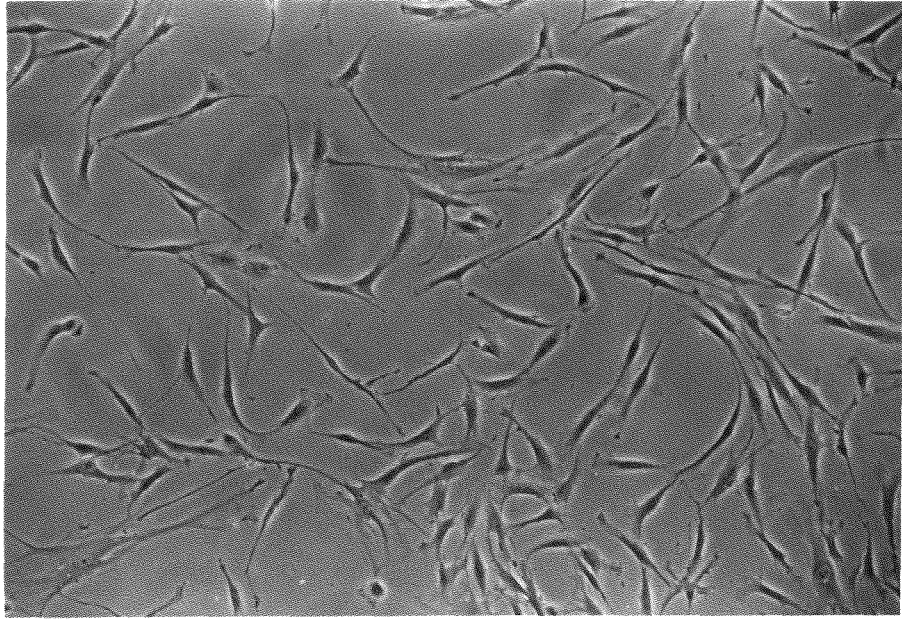


圖四: (C)

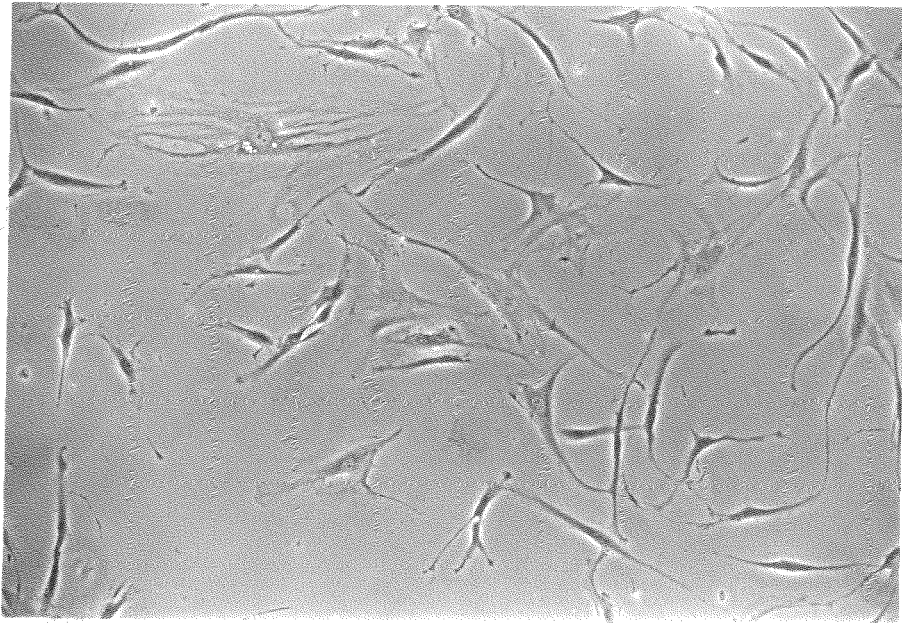
圖四、平陽黴素作用完 24 小時後，KB 細胞型態之變化：(A)對照組，(B)濃度 $5\mu\text{g/ml}$ ，(C)濃度 $50\mu\text{g/ml}$ ($\times 200$)。



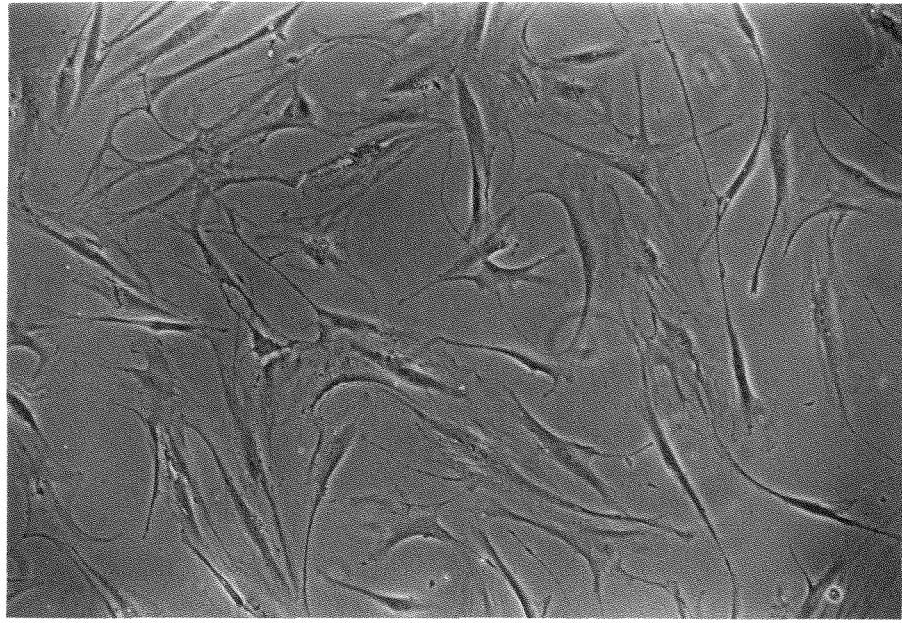
圖五、不同濃度平陽黴素對纖維母細胞增殖之影響。



圖六：(A)

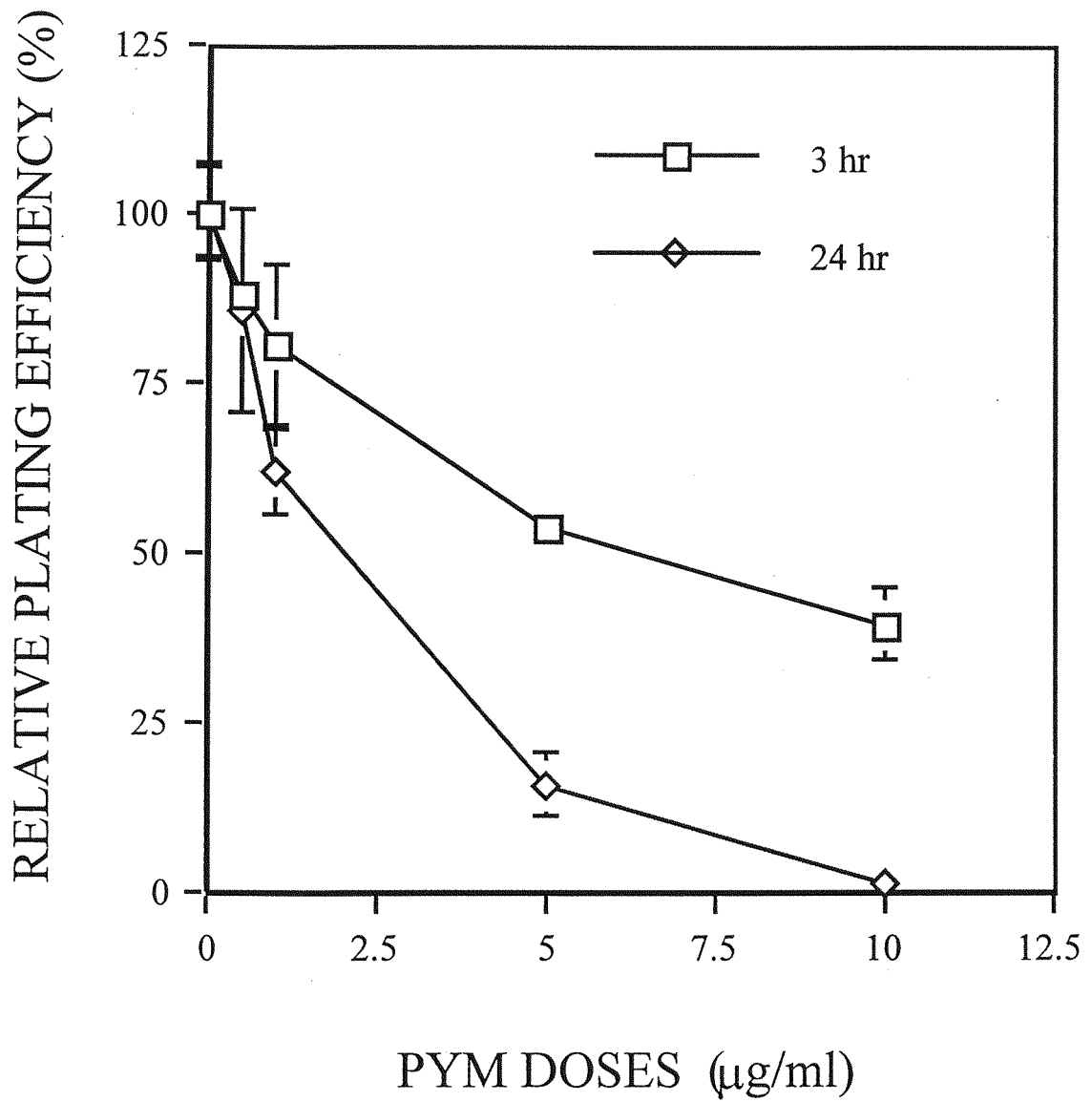


圖六：(B)

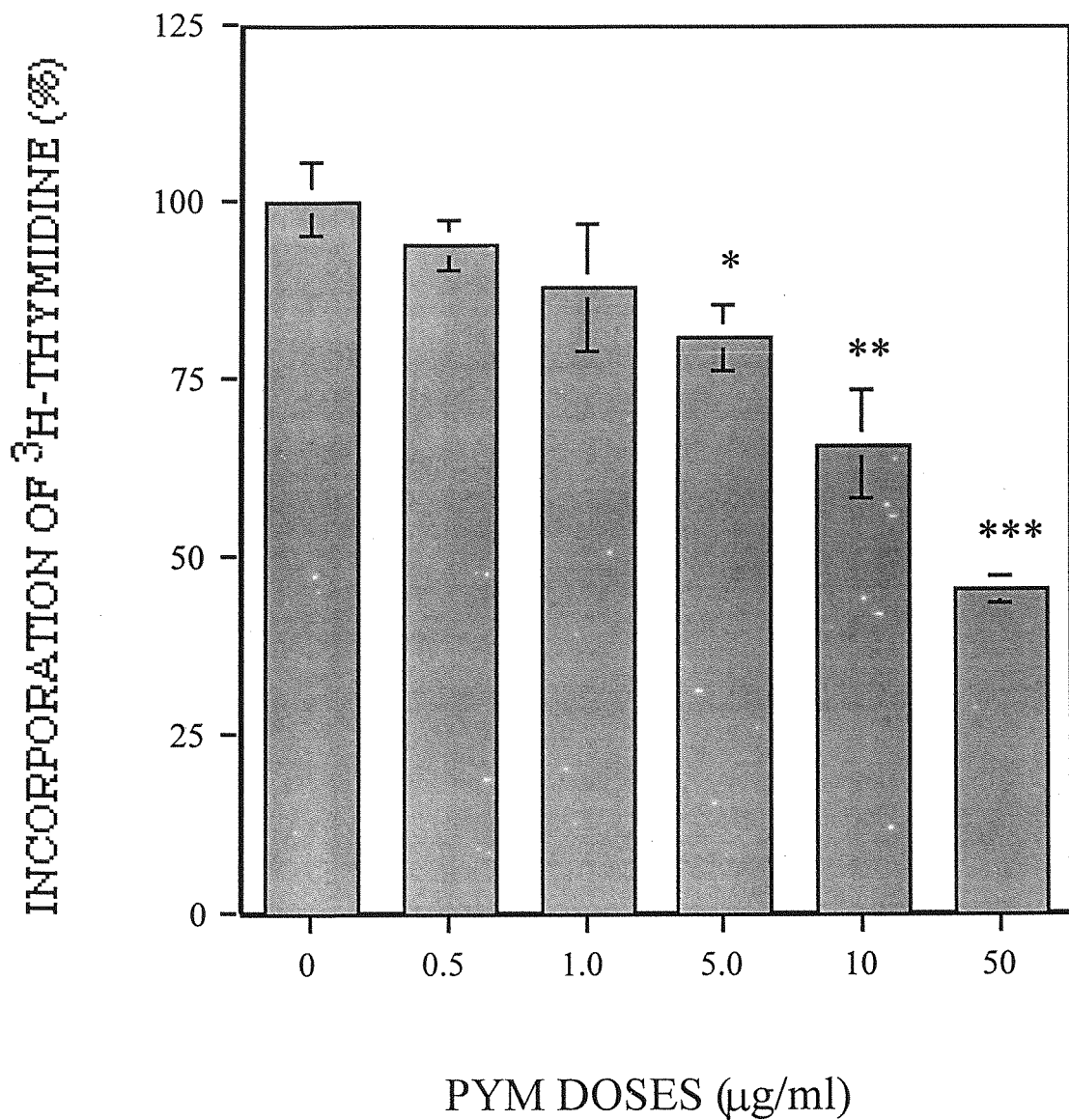


圖六: (C)

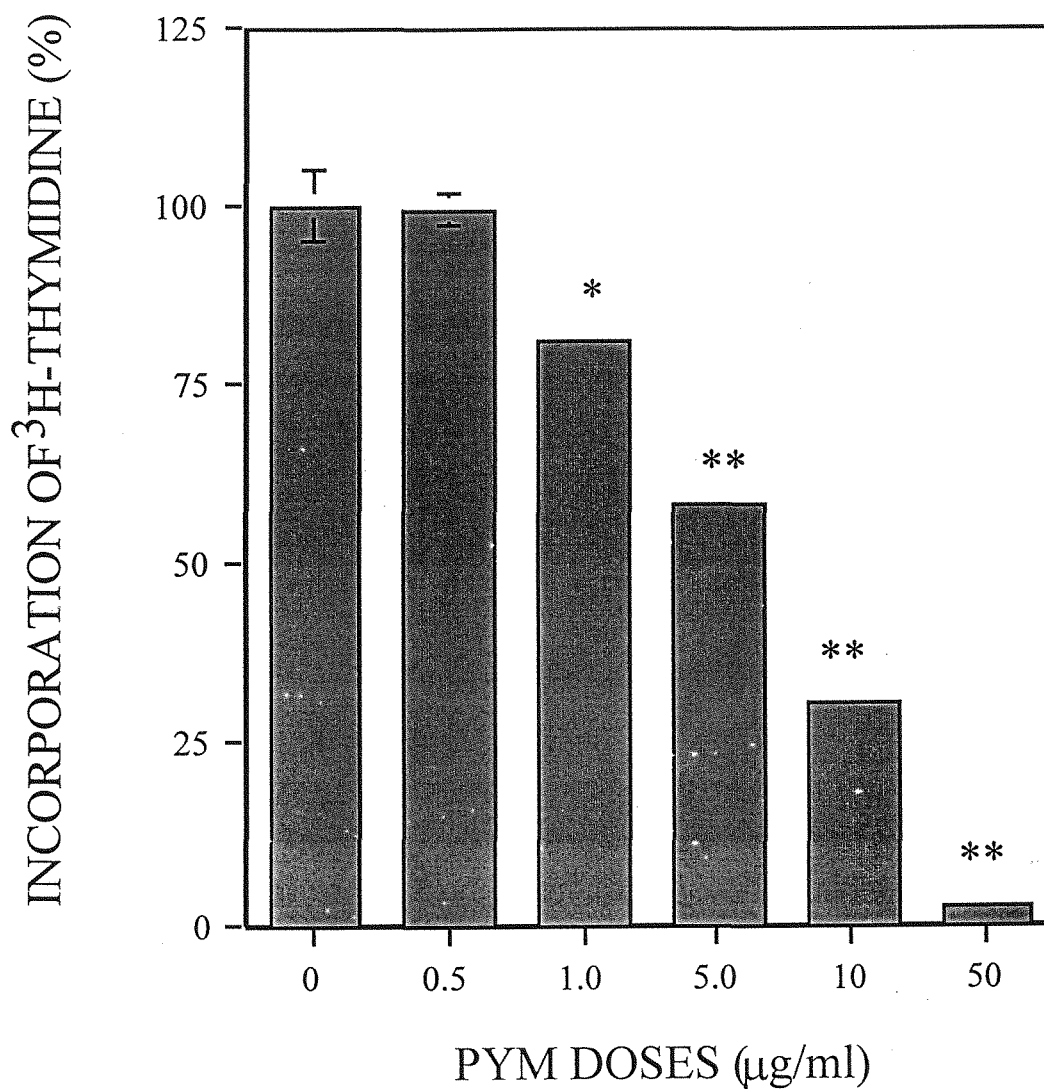
圖六、平陽黴素作用完 24 小時後，纖維母細胞型態之
變化：(A)對照組，(B)濃度 $1\mu\text{g/ml}$ ，(C)濃度
 $50\mu\text{g/ml}$ ($\times 100$)。



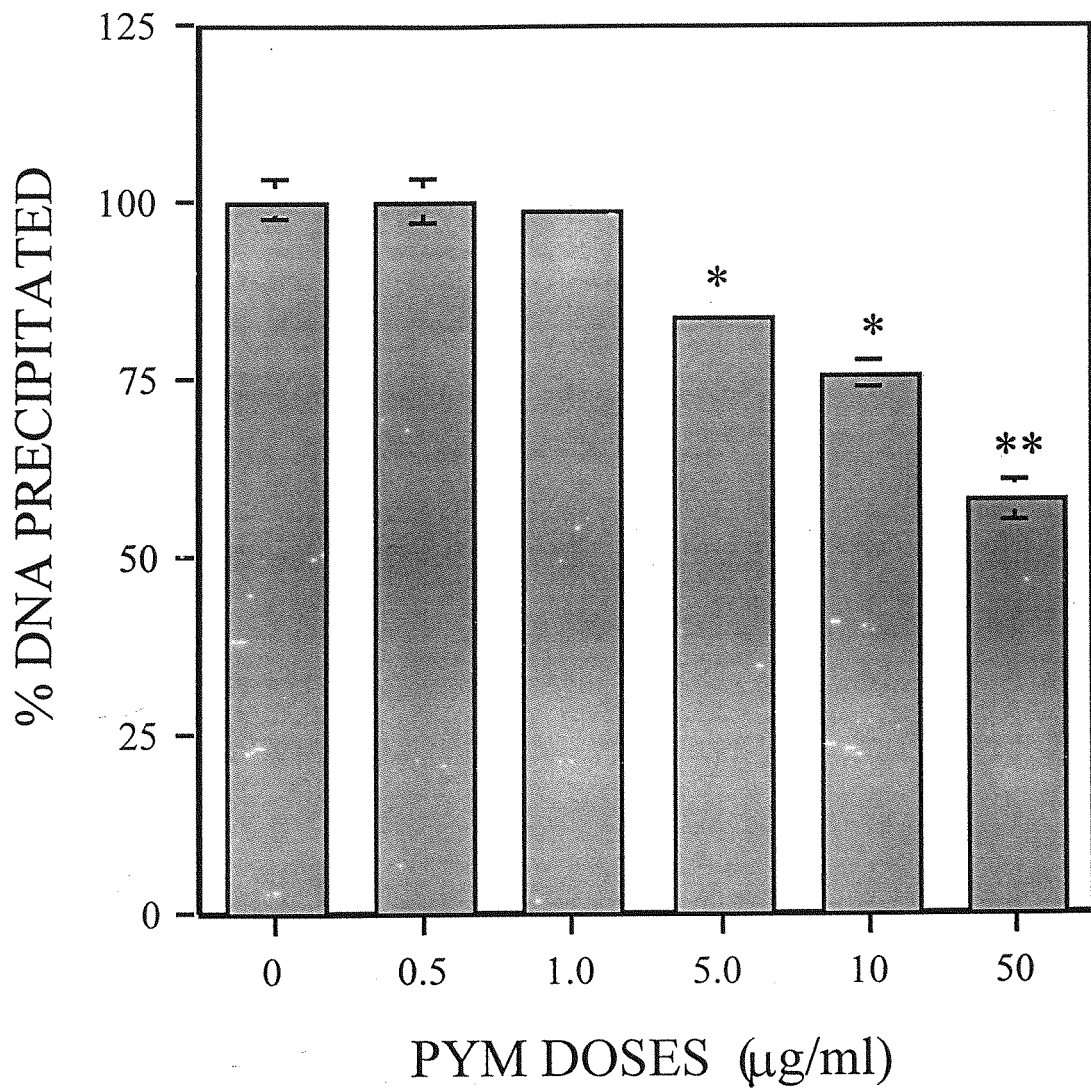
圖七、在不同藥物濃度及不同時間作用後之 KB 細胞生存率。



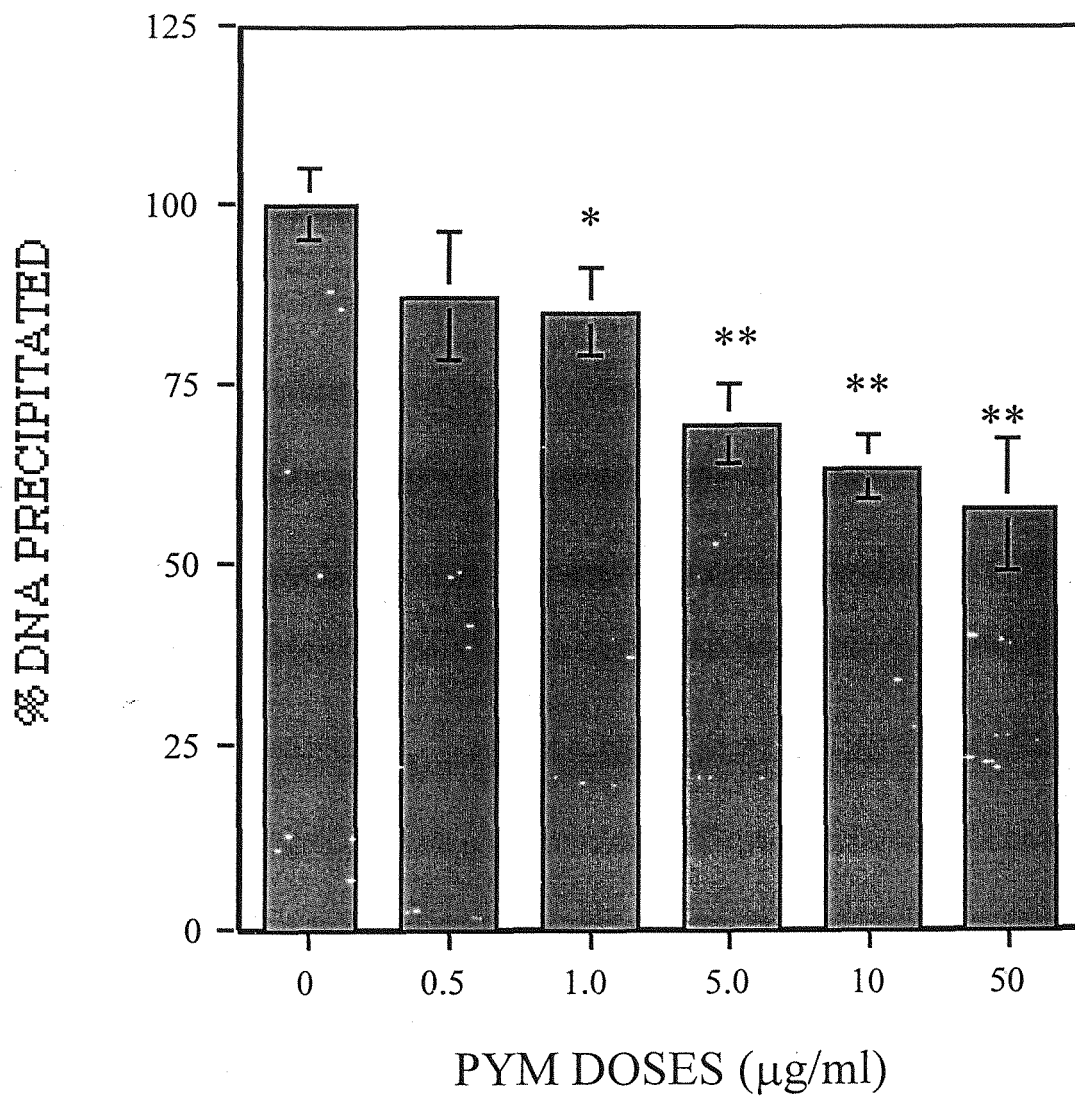
圖八、在不同平陽黴素濃度作用後，對 KB 細胞 DNA 合成之影響 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)。



圖九、不同濃度平陽黴素對纖維母細胞 DNA 合成抑制之影響 (*: $p < 0.01$, **: $P < 0.001$)。



圖十、比較不同濃度平陽黴素作用下，造成 KB 細胞 DNA 鏈斷裂的程度 (*: $p < 0.01$, **: $P < 0.001$)。



圖十一、在不同濃度平陽黴素作用下，纖維母細胞

DNA 鏈斷裂的程度 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

陸、參考文獻

1. 李樹玲. 頭頸腫瘤學. 第一版, 天津科學技術出版社, 天津, pp.3-9, 1993.
2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp.112-127, 1983.
3. Haskell CM. Cancer treatment. 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp.3-18, 1995.
4. Xue SB, Cheng ZH, Liu HT, Li SW, Zhang HQ, Cheng RX, Hu YY, Xu P. Effects of bleomycin A5 on cell cycle of Chinese hamster ovary cells. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 5: 112-114, 1984.
5. He NG, Zhang HQ, Song PG, Liu ZM, Xue SB. Mechanism of enhancement of bleomycin A5 antitumor activity by verapamil. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 26: 15-19, 1991.
6. Li A, Wang T, Yang R. Pingyangmycin-induced chromosome damage in lymphocytes of laryngeal cancer patients. *Chung Hua Erh Pi Yen Hou Ko Tsa Chih*, 29: 333-335, 1994.
7. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot*, 19: 200-209, 1966.

8. Umezawa H, Takeuchi T, Hori S, Sawa T, Ishizuka M. Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J Antibiot*, 25: 409-420, 1972.
9. Bentley J, Quinn DM, Piyman RS, Warr JR, Kellett GL. The human KB multidrug-resistant cell line KB-C1 is hypersensitive to inhibitors of glycosylation. *Cancer Letters*, 115: 221-227, 1997.
10. Bentley J, Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. 2-Deoxy-D-glucose toxicity and transport in human multidrug resistant KB carcinoma cell lines. *Oncol Res*, 8: 77-84, 1996.
11. Lin SS, Chou MY. Effect of eugenol on cultured Don-6 cells. *Chin Dent J*, 4: 1-7, 1985.
12. 日本組織培養學會. 增殖曲線於組織培養之技術, 第一版, 朝倉書店, 東京, pp.25-26, 1982.
13. 日本組織培養學會. 菌落形成法於組織培養之技術, 第一版, 朝倉書店, 東京, pp.34, 1982.
14. Chou MY. Effect of guaiacol on cultured cells. *Odontology*, 73: 38-51, 1985.
15. Olive PL. The DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, 11: 487-495, 1988.

16. 李振. 惡性腫瘤的化學治療與免疫治療. 第一版, 人民衛生出版社, 北京, pp.1-9, 1990.
17. Van Wyk CW, Olivier A, Hoal-Van Helden EG, Grobler-Rabie AF. Growth of oral and skin fibroblasts from patients with oral submucous fibrosis. J Oral Pathol Med, 24: 349-353, 1995.
18. Meghji S, Scutt A, Harvey W, Canniff JP. An *in vitro* comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. Archs Oral Biol, 32: 213-215, 1987.
19. Schneider EL, Mitsui Y. The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. Proc Natl Acad Sci USA, 73: 3584-3588, 1976.
20. 日本組織培養學會. 細胞之繼代法於組織培養之技術, 第一版, 朝倉書店, 東京, pp.23-24, 1982.
21. 鄂征. 組織培養和分子生物學技術. 第一版, 北京出版社, 北京, pp.202-206, 1995.
22. Wright BA, Wright JM, Binnie WH. Oral cancer: Clinical and pathological considerations. 1th ed. CRC Press Inc, pp.89-125, 1988.
23. Venitt S, Parry JM. Mutagenicity testing. IRL Press limited, pp.1-22, 1984.

24. Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1: 83-89, 1991.
25. Wennerberg J, Kjellen E, Lybak S, Rydell R, Pero R. Biochemical modulation of chemotherapy and radiotherapy in head and neck cancer. *Anticancer Res*, 13: 2501-2506, 1993.
26. Schilsky RL, Janisch L, Berezin F, Mick R, Vogelzang NJ, Ratain MJ. Phase 1 clinical and pharmacological study of iododeoxyuridine and bleomycin in patients with advanced cancer. *Cancer Res* 53: 1293-1296, 1993.
27. Bienvenu P, Caron L, Gasparutto D, Kergonou JF. Assessing and counteracting the prooxidant effects of anticancer drugs. *EXS*, 62: 257-265, 1992.
28. Teicher BA, Herman TS, Holden SA. Combined modality therapy with bleomycin, hyperthermia, and radiation. *Cancer Res*, 48: 6291-6297, 1988.
29. Seymour CB, Mothersill C, Cusack A, Hennessy TP. The effect of radiation on the growth of normal and malignant human esophageal explant cultures pre-treated with bleomycin. *Br J Radiol*, 61: 383-387, 1988.
30. Vogelzang NJ. Continuous infusion chemotherapy: a critical review.

- J Clin Oncol, 2: 1289-1304, 1984.
31. Byrnes RW, Templin J, Sem D, Lyman S, Petering DH. Intracellular DNA strand scission and growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by bleomycins. *Cancer Res*, 50: 5275-5286, 1990.
 32. Sidik K, Smerdon MJ. Bleomycin-induced DNA damage and repair in human cells permeabilized with lysophosphatidylcholine. *Cancer Res*, 50: 1613-1619, 1990.
 33. Sikic BI. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. *Cancer Surv* 5: 81-91, 1986.
 34. Giloni L, Takeshita M, Johnson F, Iden C, Grollman AP. Bleomycin-induced strand-scission of DNA : mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem*, 256: 8608-8615, 1981.
 35. Paika KD, Krishan A. Bleomycin-induced chromosomal aberrations in cultured mammalian cells. *Cancer Res*, 33: 961-965, 1973.
 36. Wyllie AH, Kerr JFR Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68: 251-356, 1980.
 37. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 142: 67-77,

1984.

38. Tounekti O, Pron G, Belehradek J, Mir LM. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res*, 53: 5462-5469, 1993.
39. Puck TT, Marcus PI. A rapid method for viable cell titration and clone production with Hela cell in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Natl Acad, USA* 41: 432-437, 1955.
40. 吳軍正, 司徒鎮強, 陳建元, 劉斌, 王爲. 腺樣囊性癌、舌癌、牙齦癌細胞系的藥物敏感性實驗. *中華口腔醫學雜誌*, 27: 107-108, 1992.
41. 段繼光, 毛天球, 吳軍正. LAK 細胞聯合平陽黴素對人舌鱗癌細胞 Tca8113 的體內外殺傷作用. *中華口腔醫學雜誌*, 28: 231-233, 1993.
42. 步榮發, 邱蔚六. 硒及平陽黴素對 Tca8113 細胞 DNA 含量及細胞增殖周期的影響. *華西口腔醫學雜誌*, 10: 11-13, 1992.
43. Lapi L, Cohen SS. Inhibition of the lethality of bleomycin A5 in L-cells by hirudonine. *Cancer Res*, 37: 1384-1388, 1977.
44. Matkhanov IE, Galanova YuV, Voschinnikov EI, Archakov AI.

- Cytotoxic effect of free bleomycin A5-iron (II) complex and its conjugates with concanavalin A, insulin and calcitonin on mouse thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 85-91, 1993.
45. Nishi Y, Hasegawa AM, Taketomi M, Ohkawa Y, Inui N. Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. *Cancer Res*, 44: 3270-3279, 1984.
46. Cortes F, Panneerselvam N, Mateos S, Ortiz T. Poly-D-lysine enhances the genotoxicity of bleomycin in cultured CHO cells. *Carcinogenesis*, 14: 2543-2546, 1993.
47. Habs M, Schmahl D. Carcinogenicity of bleomycin sulfate and peplomycin sulfate after repeated subcutaneous application to rats. *Oncology*, 41: 114-119, 1984.
48. Cannellos GP. Can MOPP be replaced in the treatment of advanced Hodgkin's disease? *Semin Oncol*, 17: 2-6, 1990.
49. Bonodonna G, Valagussa P, Santoro A, Viviani S, Bonfante V, Banfi A. Hodgkin's disease: the Milan Cancer Institute experience with MOPP and ABVD. *Recent Results Cancer Res*, 117: 169-174, 1989.
50. Povirk LF. Austin, M.J.F., Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res*, 257: 127-143, 1991.

51. Vig BK, Lewis R. Genetic toxicology of bleomy 84-3588, 1976.

附錄

發表於Oral Oncology雜誌之論文：

Cytotoxic effect of pingyangmycin on cultured KB cells

Editor
Crispian Scully

Senior Advisors

Allan Balmain
Peter Boyle
Barry Gusterson
Jean Claude Horiot
Peter Reichart
Gordon Snow 16/09/97



Professor Crispian Scully
Eastman Dental Institute
for Oral Health Care Sciences
University of London
256 Gray's Inn Road
London
WC1X 8LD
Tel: +44 171 915 1038
Fax: +44 171 915 1232
E-mail: c.scully@eastman.ucl.ac.uk

Prof Ming-Ying Chou
Dentistry
Chung Shan Medical & Dental College
23 section 1, Taichung-Kang Rd
Taichung
TAIWAN. ROC

Dear Prof Chou
MANUSCRIPT : OO-97049

TITLE: CYTOTOXIC EFFECT OF PINGAMYCIN
FIRST AUTHOR: TAI

We found this an interesting paper and would like to provisionally accept the above titled paper for publication in Oral Oncology, if you are prepared make the revisions suggested by the referees, as attached, within the next 6 months.

Could you please

1. let us know by return of post or by fax whether you are willing and able to address these comments satisfactorily,
2. return the revised manuscript **and any figures** to me as soon as possible for consideration, and certainly within 6 months. Please then indicate how you have changed the manuscript.
3. complete and return the *enclosed copyright form*.

I am pleased to inform you that the circulation of Oral Oncology has increased even more, as has the Impact Factor.

Yours sincerely

Professor Crispian Scully

Attachments: 1 Referees' comments; 2 Copyright form

Editor
Crispian Scully

Senior Advisors

Allan Balmain
Peter Boyle
Barry Gusterson
Jean Claude Horiot
Peter Reichart
Gordon Snow



Professor Crispian Scully
Eastman Dental Institute
for Oral Health Care Sciences
University of London
256 Gray's Inn Road
London
WC1X 8LD
Tel: +44 171 915 1038
Fax: +44 171 915 1232
E-mail: c.scully@eastman.ucl.ac.uk

November 16, 1997
PROF MING-YUNG CHOU
DENTISTRY
CHUNG SHAN MEDICAL & DENTAL COLLEGE
23 SECTION 1, TAICHUNG-KANG RD, TAICHUNG
TAIWAN

Dear ProfessorChou

97049 **CYTOTOXIC EFFECT OF PINGYANGMYCIN ON**
CULTURED KB CELLS

RECEIVED 4.7.97 ACCEPT REVISED 6.10.97

I am pleased to inform you that the revised paper has been accepted for publication in Oral Oncology and has been sent to Elsevier Science for typesetting.

You should receive the proofs in due course and if you have any queries regarding the paper then please contact Elsevier quoting the above manuscript number.

I am pleased to inform you that the journal is now in the top ten for Impact Factor in the oral field.

Yours sincerely

Professor Crispian Scully

cc
Elsevier Science
For attention of Sarah GOODING
Bampfylde Street
Exeter EX1 2AH
Enclosed; copyright form

Fax: 01392425370
Tel: 01392251558
email: S.gooding
@elsevier.co.uk

Cytotoxic effect of pingyangmycin on cultured KB cells

**Kuo-Wei Tai, Yu-Chao Chang,
Lin Shin-Shen Chou and Ming-Yung Chou**

School of Dentistry, Chung Shan
Medical and Dental College,
Taiwan, R.O.C.

Please send all correspondence to:

Prof. Ming-Yung Chou,

School of Dentistry, Chung Shan Medical and Dental College,

23 Section 1, Taichung-Kang Rd, Taichung, Taiwan, R.O.C.

TEL: 886-4-2015111 Ext 2522

FAX: 886-4-2024349

Kuo-Wei Tai, Yu-Chao Chang,
Lin Shin-Shen Chou and Ming-Yung Chou

Cytotoxic effect of pingyangmycin on cultured KB cells

Abstract

The antitumor antibiotic pingyangmycin (PYM; bleomycin A₅) was isolated from many components of bleomycin (BLM) produced by *Streptomyces pingyangensis*. PYM has the similar chemical structure to that of BLM but their terminal amine moiety are different. Therefore, it would be significant to demonstrate the antitumor effect and action mechanism of PYM on cultivated tumor cells. In this article, we used the cell growth curve, plating efficiency, and DNA synthesis inhibition assay to demonstrate the cytotoxicity of PYM on cultured KB cells. In the meantime, the morphological variations of drug-treated cells were also observed. On the other hand, we used the DNA precipitation assay, a simple and rapid assay, for detecting DNA damage caused by PYM on cultured KB cells for potential genotoxicity. Our results indicate that the effect of PYM significantly inhibit the cell growth, colony-forming ability, and DNA synthesis of KB cells in a dose-dependent manner. Furthermore, when treated with 5 μ g/ml of PYM for 24 hours on cultured KB cells, DNA strand breaks can be induced ($p < 0.05$). Therefore, it is considered that the action mechanism of PYM is due to its ability to inhibit the synthesis of DNA and split the DNA chains.

Key Words: pingyangmycin; bleomycin A₅; KB cells; cytotoxicity.

Introduction

The antitumor antibiotic pingyangmycin (PYM; bleomycin A₅) was screened out and developed from many components of bleomycin (BLM) produced by *Streptomyces pingyangensis* (1). PYM is a water-soluble glycopeptide containing the same disaccharide moiety (L-glucose and 3-O-carbamoyl-D-mannose) and a peptide part (five amino acids, one amine) as BLM. But in its terminal amine moiety, the spermidine derivative (A₅) is the major component (1). Compared to PYM, the dimethyl sulfonium aminopropyl derivative (A₂) and the agmatine derivative (B₂) are the major components of BLM (2, 3).

Earlier reports have shown that the therapeutic efficiency of BLM for treatment of malignant tumors is considered to be related to its ability to cause single- and double-strand DNA breaks *in vitro* (4, 5). Because PYM has the similar chemical structure to that of BLM, it would be significant to demonstrate the antitumor effect and action mechanism of PYM on cultivated tumor cells. Furthermore, the potential genetic toxicity of PYM should be evaluated. On the other hand, the epidermoid carcinoma is the most common malignant neoplasm of the oral cavity (6); therefore, the human oral epidermoid carcinoma cell line KB was used as target cells in this article. And then we used the cell growth curve, plating efficiency, DNA synthesis inhibition assay, and DNA strand break assay to detect the cytotoxic effect of PYM on cultured KB cells. In the meantime, the morphological variations of drug-treated cells were also observed by a phase-contrast microscope.

Materials and methods

Cells and chemicals

KB cells, human oral epidermoid carcinoma cell line (ATCC CCL-17; American Type Culture Collection, Rockville, MD) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml fungizone) (Gibco). Cells were cultivated as monolayers in plastic culture flasks (Nunc, Denmark) at 37°C in an incubator (Forma, U.S.A) perfused with a water-saturated 95% air-5% CO₂ mixture (growth conditions).

Pingyangmycin hydrochloride was purchased from Hebei pharmaceutical factory (Tianjin, China). A stock solution of PYM was prepared (1 mg/ml PBS); appropriate concentrations were set up in Dulbecco's Modified Eagle medium.

Cell growth curve

Cultures of cells in the exponential phase were diluted in fresh complete medium and seeded in 6-well plates (Falcon; Oxnard, CA) (10^5 cells/well). After 24 h incubation time, cells were treated with various concentrations of PYM (0.5, 1, 5, 10, 50 µg/ml) for 24 h, then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and added fresh complete medium. The morphological variations of cells were observed under a Nikon phase-contrast microscope. After changing fresh medium, cells were immediately harvested by trypsinization; respectively in 24 h, 48 h, 72 h, they were counted in a hemocytometer.

Plating efficiency

The ability to form colonies after PYM treatment was taken as a survival assay. Cells were collected by trypsinization and seeded in complete culture medium (250 cells/cell culture dish, 60 mm in diameter). After treated with each PYM doses (0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) for 3 h and 24 h, cells were added fresh medium and incubated for 7 days under growth conditions. Finally, cells were stained in 10% Giemsa solution and the numbers of colonies were counted.

DNA synthesis inhibition assay

Exponentially growing cells were diluted in complete medium and seeded in 24-well plates (10^5 cells/well). Before seeded, the sterilized cover slips (Bellco, USA) were put into the plate. After treated with different doses of PYM (0.5, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, the fresh medium supplemented with $1\mu\text{Ci/ml/well}$ [methyl- ^3H] thymidine (Amersham, UK) was added for 1 h. Then the radioactive medium was discarded and cells were treated with 4°C 0.9% NaCl twice and fixed with 4°C 5% trichloroacetic acid solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) 30 min three times. Finally, cells were washed with 4°C distilled water twice. The cover slips were taken up and put into the scintillation vials. Liquid scintillation cocktail (Du Pont, USA) was added to each vial and ^3H activity was counted in a scintillation counter (Aloka LSC-900, Japan).

DNA strand break assay

KB cells were plated 5×10^4 cells per well into 24-well plates. After overnight attachment, cells were labeled with $0.2 \mu\text{Ci/ml/well}$ [methyl- ^3H] thymidine for 24 h. After labelling, the radioactive medium was discarded and the cells were treated with different doses of PYM (0.5, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Then the cells were harvested with trypsin (Gibco) and placed in plastic tubes; added 1.0 ml lysis solution containing 2% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM Tris and 0.05 M NaOH on ice for 1 min. 0.5 ml 0.12 M KCl was added and the tubes were immediately transferred to 65°C water bath for 10 min. Finally, the tubes were cooled on ice for 5 min and centrifuged at 3500 r.p.m. for 15 min at 4°C . The supernatant was decanted into a liquid scintillation vial and 1 ml 0.05 M HCl was added. The pellet was dissolved in 2×1 ml 65°C distilled water, poured into a scintillation vial. Liquid scintillation cocktail was added to each vial and ^3H activity was counted in a scintillation counter.

Statistical analysis

Three samples were made for each condition in this study and data were analyzed by Student's t-test. Means and standard deviations were calculated. Probability values of $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results

Figure 1 presents a comparison of the effect of different concentrations of PYM on the cell growth of KB cells. When treated with 5 $\mu\text{g/ml}$ PYM, the cell growth was obviously inhibited ($p < 0.05$). Furthermore, the cells treated with high concentration of PYM (50 $\mu\text{g/ml}$) were all dead in this experiment (data not shown). On the other hand, phase-contrast microscope observations showed the morphological variations of the drug-treated cells (Fig. 2). Some treated cells were greatly enlarged compared to the untreated cells but several shrunken cells which appear to be losing their attachment were also noted (Fig. 2 B,C). Cells displayed the morphological changes were usually associated with degeneration and death.

Clonogenic survival was studied in cells treated with different doses of PYM. As it can be seen in Figure 3, PYM had a clear negative effect on colony-forming ability as compared to that of control cultures. Cells treated with PYM resulted in a dose-dependent decline in the colony count. When cells treated with PYM for 3 h, the relative plating efficiency (%) was as follows: 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 87.90%; 1 $\mu\text{g/ml}$, 80.38%; 5 $\mu\text{g/ml}$, 53.59%; 10 $\mu\text{g/ml}$, 39.15%. When cells treated with PYM for 24 h, the relative plating efficiency (%) was as follows; 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 85.59%; 1 $\mu\text{g/ml}$, 61.53%; 5 $\mu\text{g/ml}$, 15.59%; 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.67%.

In DNA synthesis inhibition assay, we studied the effect of PYM on [methyl- ^3H] thymidine incorporation on KB cells. Figure 4 shows that the different doses of PYM reduce the rates of ^3H -thymidine incorporation (%) in a dose-dependent manner (0.5 $\mu\text{g/ml}$, 98.48%; 1 $\mu\text{g/ml}$, 97.14%; 5 $\mu\text{g/ml}$, 86.52%; 10 $\mu\text{g/ml}$, 80.98% ; 50 $\mu\text{g/ml}$, 11.33%). When the cells were treated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of PYM, the synthesis of DNA

was significantly inhibited ($P < 0.05$).

DNA strand breaks were detected by the DNA precipitation assay. When DNA strand breaks were created by chemicals, the amount of DNA released from the nucleoprotein (supernatant) was compared to that still attached to the protein (precipitate) (7). Thus, the proportion of DNA remaining in the supernatant was a measure of the amount of DNA damage. Figure 5 shows that treatment with increasing doses of PYM resulted in a dose-dependent decrease in the percentage of precipitated DNA as damage increase. When treated with $5\mu\text{g/ml}$ of PYM for 24 h on cultured KB cells, DNA damage can be induced ($p < 0.05$).

Discussion

Our results show that the antitumor effect of PYM significantly inhibit the cell growth and colony-forming ability of cultured KB cells. In addition, that 5 μ g/ml of PYM significantly reduced the rate of synthesis of DNA on cultured KB cells can also be demonstrated in our data. Some studies indicate that PYM has the similar effects on mouse S-180, human HEP-2, and CHO cell lines (1, 8). According to Umezawa *et al.*(2, 3), PYM has the same effect as BLM to block DNA synthesis and cause cell death *in vitro*. On the other hand, the obviously morphological variations can be noted by the phase contrast microscopy observations between the drug-treated cells and the control group. As indicated by Wyllie *et al.*(9), cell death can be categorized as either necrosis or apoptosis. At a morphological level, necrosis is associated with cell swelling, the rupture of cell membrane, and the dissolution of an organized structure. In contrast, apoptosis is characterized by cell shrinkage and chromatin. Therefore, the possibility that PYM may induce a form of programmed cell death cannot be excluded in our study. For further information, the in-situ DNA fragmentation assay could be used to see if DNA fragmentation localized to a larger, necrotic type of cell or a shrunken, putative apoptotic cell (10).

DNA precipitation assay provides a simple method for measuring DNA strand breaks and the advantages of this assay such as speed, cost, sensitivity which are better than other used assays (7). This assay for detecting DNA damage and repair has proved it useful in screening agents for potential genotoxicity (7, 11). In our study, when treated with 5 μ g/ml of PYM for 24 h on cultured KB cells, DNA damage can be induced ($p < 0.05$). Therefore, the action mechanism of PYM could be considered to

be linked to its ability to cause DNA strand breaks *in vitro*. Previously reports have shown that BLM-induced cell killing is due to DNA strand cleavage, and the resulting loss of chromosome fragments (4, 5, 12, 13). Thus, PYM has the similar action mechanism to that of BLM. However, it is considered that the antitumor activity or toxicity of PYM would be different to that of BLM because of the different terminal amine moiety (8, 14-17). Lapi and Cohen have reported that the spermidine derivative (A₅) is more toxic to cultured cells than the dimethyl sulfonium aminopropyl derivative (A₂) or the agmatine derivative (B₂) (18). Whether the therapeutic efficiency of PYM is better than BLM or not, more clinical researches are needed.

Recently, because of the fairly extensive use of BLM in clinical chemotherapy, its genetic toxicity has considerable and practical significance. Some studies have been reported on bleomycin-induced mutagenesis on cultured mammalian cells (19-21). Furthermore, a few data on carcinogenic effects in humans are available, since most tumors commonly treated with BLM are associated with high morbidity (22, 23). Thus, that BLM is at most a weak carcinogen in humans can be considered (12, 13). On the contrary, there is no evidence to verify that PYM will induce mutagenesis on cultured mammalian cells. However, the action mechanism of PYM to induce DNA strand breaks *in vitro* is similar to that of BLM, so we affirm that the genetic toxicity of PYM should be noted when the cancer patients are treated with PYM in clinical chemotherapy.

In summary, it has been shown that pingyangmycin has a cytotoxic activity against cultivated tumor cells (KB cells). The action mechanism of pingyangmycin is due to its ability to induce DNA strand breaks *in vitro*.

References

1. Xue, S.B., Cheng, Z.H., Liu, H.T., *et al.*, Effects of bleomycin A₅ on cell cycle of Chinese hamster ovary cells. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*. 1984, **5**, 112-114. (in Chinese)
2. Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y., New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot*. 1966, **19**, 200-209.
3. Umezawa, H., Takeuchi, T., Hori, S., Sawa, T., Ishizuka, M., Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J Antibiot*. 1972, **25**, 409-420.
4. Byrnes, R.W., Templin, J., Sem, D., Lyman, S., and Petering, D.H., Intracellular DNA strand scission and growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by bleomycins. *Cancer Res*. 1990, **50**, 5275-5286.
5. Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C., Grollman, A.P., Bleomycin-induced strand-scission of DNA : mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem*. 1981, **256**, 8608-8615.
6. Shafer, W.G., Hine, M.K., Levy, B.M., *A textbook of oral pathology*. 4th edn. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1983, pp. 112-127.
7. Olive, P.L., The DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*. 1988, **11**, 487-495.
8. He, N.G., Zhang, H.Q., Song, P.G., Liu, Z.M., Xue, S.B., Mechanism of enhancement of bleomycin A₅ antitumor activity by verapamil. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1991, **26**, 15-19. (in Chinese)
9. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980, **68**, 251-356.

10. Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J., Mir, L.M., Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res.* 1993, **53**, 5462-5469.
11. Cortes, F., Panneerselvam, N., Mateos, S., Ortiz, T., Poly-D-lysine enhances the genotoxicity of bleomycin in cultured CHO cells. *Carcinogenesis.* 1993, **14**, 2543-2546.
12. Vig, B.K., Lewis, R., Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat Res.* 1978, **55**, 121-145.
13. Povirk, L.F., Austin, M.J.F., Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res.* 1991, **257**, 127-143.
14. Li, A., Wang, T., Yang, R., Pingyangmycin-induced chromosome damage in lymphocytes of laryngeal cancer patients. *Chung Hua Erh Pi Yen Hou Ko Tsa Chih.* 1994, **29**, 333-335. (in Chinese)
15. Wennerberg, J., Kjellen, E., Lybak, S., Rydell, R., Pero, R., Biochemical modulation of chemotherapy and radiotherapy in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 1993, **13**, 2501-2506.
16. Teicher, B.A., Herman, T.S., Holden, S.A., Combined modality therapy with bleomycin, hyperthermia, and radiation. *Cancer Res.* 1988, **48**, 6291-6297.
17. Seymour, C.B., Mothersill, C., Cusack, A., Hennessy, T.P., The effect of radiation on the growth of normal and malignant human esophageal explant cultures pre-treated with bleomycin. *Br J Radiol.* 1988, **61**, 383-387.
18. Lapi, L., Cohen, S.S., Inhibition of the lethality of bleomycin A₅ in L-cells by hirudonine. *Cancer Res.* 1977, **37**, 1384-1388.
19. Nagy, B., Grdina, D.J., Protective effects of 2-[(aminopropyl)amino]ethanethiol

- against bleomycin and nitrogen mustard-induced mutagenicity in V79 cells. *J Radiat Oncol.* 1986, **12**, 1475-1478.
20. Nishi, Y., Hasegawa, A.M., Taketomi, M., Ohkawa, Y., Inui, N., Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. *Cancer Res.* 1984, **44**, 3270-3279.
21. Akiyama, S., Kuwano, M., Isolation and preliminary characterization of bleomycin-resistant mutants from Chinese hamster ovary cells. *J Cell Physiol.* 1981, **107**, 147-153.
22. Cannellos, G.P., Can MOPP be replaced in the treatment of advanced Hodgkin's disease? *Semin Oncol.* 1990, **17**, 2-6.
23. Bonodonna, G., Valagussa, P., Santoro, A., Viviani, S., Bonfante, V., Banfi, A., Hodgkin's disease: the Milan Cancer Institute experience with MOPP and ABVD. *Recent Results Cancer Res.* 1989, **117**, 169-174.