

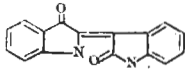
靛玉红对正常造血细胞生成的影响

万景华 尤育初 糜静娴 应红光 (中国医学科学院血液学研究所, 天津 300061)

提要 用正常小鼠、大鼠及豚鼠研究长期、大剂量靛玉红对正常造血细胞生成的3个不同水平造血环节的影响。结果: 靛玉红对CFU-S和CFU-DC无抑制作用, 骨髓细胞的DNA合成不受抑制, 对骨髓容量和外周血象均无明显影响。这些结果与目前已知的“杀细胞”抗癌化疗药物的作用明显不同。

关键词 靛玉红; 慢性粒细胞白血病; 造血干细胞; [³H]胸腺嘧啶核苷参入; 血细胞

靛玉红(indirubin, Δ^{2,31}-双氢吲哚-2',3-双酮)是我国发现的治疗慢性粒细胞白血病的吲哚类新药⁽¹⁾。其化学结构式不同于目前已



知的抗白血病药物。我国53个医疗单位治疗314例慢性粒细胞白血病病人的缓解率为60%, 有效率达87%, 而且付作用轻^(1,2)。

本文用正常小鼠、大鼠及豚鼠研究了长期大量靛玉红对造血细胞生成动力学(包括多能造血干细胞CFU-S, 粒系定向干细胞CFU-DC, 骨髓细胞增殖能力, 骨髓容量以及外周血象)的作用。并以马利兰及阿糖胞苷作比较。

实验方法

一、小鼠造血干细胞的测定⁽³⁾

1. CFU-S 内源法 采用♀昆明种小鼠, 体重20±2g ig qd×3d后(剂量见表1), ⁶⁰Co照射6.5 Gy(剂量率0.98 Gy/min), 以后继续ig qd×2d。照射后9d取脾固定在Bouin液中24h, 计数脾脏表面集落数。

2. CFU-S 外源法 骨髓细胞供鼠及受鼠均为♀A系纯种小鼠, 体重21±1g, 供鼠先ig qd, 共14d(剂量见表1)。第14d处死供鼠, 在无菌条件下制备骨髓细胞悬液(1×10⁶/ml)。将0.3ml细胞悬液注入2h内接受⁶⁰Co照射9.50 Gy(剂量率0.95 Gy/min)的受

鼠尾静脉中, 9d后取脾称重, 并在Bouin液中固定24h, 计数脾脏表面集落数。

3. CFU-DC 体内扩散琼脂培养 骨髓细胞供鼠及受鼠均为体重22±2g♂昆明小鼠, 供鼠给药剂量同CFU-S外源法。实验日将各组供鼠处死, 在无菌条件下制备股骨骨髓细胞悬液, 取0.3—0.5ml细胞悬液加入199培养液3.5ml和1ml马血清中, 经37℃预热后再加入在0.3ml沸水中熔化的5%琼脂(细胞浓度5×10⁵/ml)。每个扩散盒中注入0.1ml上述含有0.3%琼脂的细胞悬液。石蜡封口后, 将扩散盒埋入受⁶⁰Co 7.50 Gy照射的受体小鼠腹腔中。5d后取出扩散盒, 揭去盒上微孔滤膜, 于解剖镜下计数琼脂上生长的细胞集落(以多于50个细胞组成者计为1个CFU-DC)。

二、骨髓细胞[³H]胸腺嘧啶核苷([³H]TdR)参入的测定

小鼠: 将体重为22±2g昆明种小鼠分组(♂♀不限), 靛玉红溶于花生油中ig qd(剂量见表3), 对照组仅给花生油, 同时以马利兰及阿糖胞苷给药组作对照。给药结束后, 每只小鼠ip [³H]TdR 20 μCi(比放射性为39 Ci/mmol)1h后处死, 取双侧股骨测骨髓有核细胞数, 以三氯醋酸酒精沉淀, 纸片抽滤法测定10⁷骨髓细胞的cpm。

大鼠: 体重100±8g分为对照及实验组, 靛玉红混于饲料中, 每天摄入60—160 mg/kg。3月后处死, 取股骨骨髓制成2×10⁷骨髓细胞/ml悬液。将0.5ml细胞悬液加于2ml RPMI 1640培养液(含小牛血清10%)中, 每个培养管加入2 μCi [³H]TdR于37℃培养1h, 以下步骤同小鼠[³H]TdR参入实验。

表 1. Effect of indirubin on CFU-S in mice ($\bar{x} \pm SD$)

Method	Drug	No. of mice	Dose (mg/kg × d)	CFU-S/spleen	Spleen wt (mg)
Internal source	Indirubin	23	200 × 5	24 ± 9	45 ± 11
	Myleran	23	6 × 5	11 ± 8*	33 ± 8*
	Control	21	—	21 ± 11	47 ± 15
External source	Indirubin	8	200 × 14	25 ± 4	48 ± 4
	Myleran	10	6 × 14	4 ± 3**	20 ± 4**
	Control	10	—	27 ± 5	58 ± 12

Compared with control group *P<0.05, **P<0.01 (Same in the following tables)

表 2. Effect of indirubin on CFU-DC in mice ($\bar{x} = SD$)

Drug	Dose (mg/kg × d)	No. of chambers	CFU-DC/10 ⁵ marrow cells
Indirubin	200 × 11	11	64 ± 9
Myleran	6 × 11	12	9 ± 3**
Ara-C	50 × 13	10	31 ± 8*
Control	—	9	58 ± 9

豚鼠: 体重 260 ± 30 g 分为对照及实验组, sc 靛玉红花生油溶液 0.2 ml, 50 mg/kg, qd, 42 d 后处死, 取股骨骨髓制成 2 × 10⁷ 骨髓细胞/ml 悬液, 作 [³H]TdR 参入试验, 其步骤与大鼠同。

三、骨髓容量及外周血象的测定 各组小鼠给药前后均作外周血白细胞、网织红细胞计数及微量血红细胞压积测定。各组大鼠和豚鼠除作外周血白细胞计数和微量血红细胞压积测定外, 并根据股骨骨髓有核细胞数及胫骨切片组织学检查, 按骨髓细胞密度%进行 7 级分类以测定其骨髓容量(以有核细胞占 56—75% 为 5 级; 76—95% 为 6 级)。另取体重 235 ± 35 g ♂ 豚鼠 30 只, 分为 4 组, 每组 5—10 只。sc 1 mg 靛玉红花生油溶液于给药前及给药后 8, 12, 24, 32 h 作白细胞及嗜酸粒细胞绝对计数 (Manner 法)。每只豚鼠查血 2 次。

实验结果

一、靛玉红对小鼠造血干细胞的作用 大

剂量靛玉红(相当于临床成人量 50 倍)给药 5—14 d, 对正常小鼠多能造血干细胞(CFU-S)和体内扩散盒琼脂培养的粒系定向干细胞(CFU-DC)并无抑制作用。而马利兰及阿糖胞苷组抑制明显。(表 1, 2)

二、靛玉红对正常小鼠骨髓容量及骨髓细胞 [³H]TdR 参入的影响 大剂量靛玉红对小鼠股骨骨髓细胞数及其 [³H]TdR 参入 cpm 均与对照组相近, 而马利兰及阿糖胞苷组二者均明显减低。(表 3)

长期投予靛玉红的大鼠及豚鼠骨髓组织学容量及骨髓有核细胞 [³H]TdR 参入 cpm 与对照组均无差异。(表 4)

三、靛玉红对正常动物外周血象的影响

大剂量靛玉红给药 14 d 组及 30 d 组小鼠的白细胞、红细胞压积及网织红细胞与对照组比较均无明显改变, 而马利兰给药 30 d 组 3 项指标均明显受抑。大鼠在 po 靛玉红的 3 个月中体重均显著增加, 而外周血象无改变。sc 靛玉红油剂 42 d 的豚鼠, 白细胞、红细胞压积以及

表 3. Effect of indirubin on mice femur marrow nucleated cells and their [³H]TdR incorporation ($\bar{x} \pm SD$)

Drug	No. of mice	Dose (mg/kg × d)	Marrow cells 10 ⁻⁵ /femur	[³ H]TdR cpm/femur
Indirubin	10	200 × 14	83 ± 15	925 ± 306
Myleran	10	6 × 14	60 ± 21*	777 ± 207
Ara-C	10	50 × 3	43 ± 20*	227 ± 109**
Control	9	—	85 ± 21	848 ± 380
Indirubin	26	200 × 30	91 ± 21	880 ± 348
Myleran	15	6 × 30	53 ± 23**	614 ± 212*
Control	29	—	112 ± 26	812 ± 185

表 4. Effect of indirubin on bone marrow volume and [³H]TdR incorporation into marrow cells ($\bar{x} \pm SD$)

Group	No. of animals	Tissue volume of upper part of femur marrow (grade)		[³ H]TdR incorporation (cpm/10 ⁷ marrow cells)	
		indirubin	control	indirubin	control
Rats	5	5	5	2506 ± 816	1744 ± 803
Guinea pigs	5	7	6	9972 ± 11056	10946 ± 7055

表 5. Effect of indirubin on blood picture of normal animals ($\bar{x} \pm SD$)

Group	Drug	No. of animals	Dose (mg/kg × d)	WBC (10 ⁻⁴ /mm ³)	Hematocrit (%)	Reticulocyte (%)
Mice	Indirubin	29	200 × 30	1.5 ± 0.6	45 ± 5	6.9 ± 1.6
	Myleran	20	6 × 30	0.7 ± 0.2*	36 ± 5*	2.0 ± 1.2*
	Control	97	—	1.5 ± 0.3	49 ± 6	6.5 ± 1.7
Rats	Indirubin	5	60—100 × 90	2.3 ± 0.4	*11.8 ± 0.9	—
	Control	5	—	1.8 ± 0.8	*11.8 ± 1.2	—
Guinea pigs	Indirubin	5	50 × 42	1.2 ± 0.3	41.0 ± 2.0	—
	Control	25	—	0.9 ± 0.2	39.3 ± 3.5	—

* Hemoglobin (g/100ml)

嗜酸性粒细胞绝对计数与对照组均无差异(表5)。但sc 1 mg 靛玉红油剂后 12 h, 可见豚鼠外周血嗜酸细胞计数减少约 80%, 同时白细胞数也有轻度下降, 但 24 h 后二者均恢复正常。(表 6)

讨 论

靛玉红临床治疗 314 例慢性粒细胞白血病患者, 有效率达 87%, 见效时间为 1—2 周, 平均用药 72 d 可达到完全或部份缓解。而且付

表 6. Effect of single sc indirubin to leukocytes of guinea pigs ($\bar{x} \pm SD$)

Time	WBC ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	Eosinophil ($/\text{mm}^3$)
Before sc	5.6 \pm 1.2	53 \pm 44
8 h	5.1 \pm 1.3	38 \pm 18
12 h	4.9 \pm 1.6	15 \pm 6*
24 h	5.7 \pm 1.4	38 \pm 24
32 h	6.9 \pm 1.4	44 \pm 28

作用较小, 仅 1 例出现可逆的骨髓抑制现象^(1,2)。而一般治疗本病的抗癌药, 如马利兰、二溴甘露醇等虽然也有明显的降白细胞效果, 但同时也杀伤正常造血细胞, 易导致严重的骨髓衰竭。本实验结果表明, 大剂量长期给予靛玉红对实验动物的造血干细胞 (CFU-S, CFU-DC)、骨髓细胞 [^3H]TdR 参入以及骨髓容量和外周血象均无明显影响。此外, 豚鼠单次 sc 给予靛玉红油剂 1 mg 12 h 后, 可以引起一过性嗜酸粒细胞减少, 反映了对外周血的嗜酸粒细胞有短暂作用, 此点与 Landsheere⁽⁴⁾的观察相一致。这些结果与马利兰组动物中所见的造血干细胞、骨髓容量与外周血象严重受抑的情况形成了明显的对比。

靛玉红抗肿瘤作用在国外文献中迄今尚无

报道。靛玉红能使慢粒白血病骨髓中粒细胞大量变性坏死⁽⁵⁾, 而对正常造血细胞和免疫功能⁽⁵⁾并无明显抑制作用的现象与目前已知的“杀细胞”性抗癌药物明显不同, 是否作为一种对白血病细胞的特异作用, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 中国医学科学院分院附属医院、血液学研究所、成都中医学院附属医院、四川省中药研究所. 输血及血液学 1978 年 5 月; 2(2):17
- 2 靛玉红临床治疗协作组. 中华血液学杂志 1980 年 6 月; 1(3):132
- 3 吴祖泽. 造血细胞动力学概论. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1978: 116—21 & 182—86
- 4 Landsheere BC. *Experientia* 1951 Aug; 7(8):307
- 5 中国医学科学院血液学研究所、中国医学科学院分院附属医院、中国医学科学院基础医学研究所. 中华内科杂志 1979 年 2 月; 18(2):83

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Dec; 2 (4): 241—244

EFFECT OF INDIRUBIN ON HEMOPOIETIC CELL PRODUCTION

WAN Jing-hua, YOU Yu-chu, MI Jing-xian, YING Hong-guang
(Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tienjin 300061)

ABSTRACT Indirubin ($\Delta^{2,3}$ -biindoline-2',3-dione) is a new drug discovered in China for treatment of chronic myelocytic leukemia.

Mice, rats and guinea pigs were used in this study. The hemopoietic stem cell CFU-S (estimated by spleen colony forming technique), CFU-DC (estimated by *in vivo* diffusion chamber agar culture), proliferative ability of bone marrow cells (^3H]TdR incorporation) and the quantitative nucleated cells of bone marrow were

estimated. There was no inhibition by long-term and high dose of indirubin on CFU-S, CFU-DC and the DNA synthesis of bone marrow cells. Neither the volume of bone marrow nor the blood picture was affected. The mechanism of indirubin is different from that of cytotoxic chemotherapeutic agents.

KEY WORDS indirubin; CML; hemopoietic stem cell; ^3H]TdR incorporation; blood cell