

五种抗肿瘤药对小鼠造血干细胞和 P 388 白血病干细胞的作用比较

周岐新* 潘震昆 冯健波 韩 锐 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

提要 采用琼脂扩散盒(ADC)方法研究和比较了5种抗肿瘤药对小鼠造血粒系定向干细胞(NCFU-C)和P 388白血病干细胞(LCFU-C)的作用。三尖杉酯碱(H)、高三尖杉酯碱(HH)、半合成三尖杉酯碱(PSH)和环磷酰胺(CY)对两类干细胞作用的剂量反应曲线呈指数形,效能比的大小依次为1.8, 3.5, 4.7和5.7。阿糖胞苷(Ara-C)各剂量组对NCFU-C和LCFU-C

的作用相似,无明显的剂量效应关系;1000 mg/kg剂量组使两类干细胞的存活比下降至38%左右。

关键词 琼脂扩散盒; 粒系定向干细胞; P 388白血病干细胞; 三尖杉酯碱; 高三尖杉酯碱; 半合成三尖杉酯碱; 环磷酰胺; 阿糖胞苷

1982年8月9日收稿 1983年4月29日修回

* 重庆医学院药理教研组

H和HH是三尖杉属(*Cephalotaxus*)植物中提取的生物碱,目前已能人工半合成。对实

验动物肿瘤治疗证明,天然品和人工半合成品均有显著抗肿瘤活性^(1,2),临床应用显示二者对非淋巴细胞性白血病有较好疗效^(3,4)。与大多数抗肿瘤药一样,其主要副作用为骨髓抑制。因此,定量比较它们对造血干细胞和肿瘤干细胞的杀伤作用,在评价这些药物选择性作用高低方面具有重要意义。我们采用琼脂扩散盒(agar diffusion chamber, ADC)方法,研究了H, HH和PSH对DBA/2小鼠NCFU-C和LCFU-C的作用,并把作用结果与已知抗肿瘤药Ara-C和CY的结果进行了比较。

材料和 方法

动物 DBA/2纯系小鼠和昆明种小白鼠均由中国医学科学院动物中心提供,鼠龄5-7周,♀♂兼有。

小鼠P388白血病细胞 由本所肿瘤组提供。取腹水以生理盐水稀释25倍,用DBA/2小鼠每周ip传代1次。

药物 H, HH和PSH由本所药厂提供; Ara-C系北京医学院药厂出品,批号800617; CY系上海第十二制药厂出品,批号770119。上述各药用生理盐水稀释, CY现用现配。

培养基 RPMI-1640由日本Nissui Seiyaku Ltd.制,用灭菌重蒸水配制, Seitz滤器过滤消毒,置冰箱保存。用时加入马血清和抗生素(每ml含青霉素100U,链霉素100μg),使培养液中马血清最终浓度为20%。

琼脂 Difco厂的Bacto-agar,用重蒸水配成6%溶液,沸水中煮10min消毒,再用20%马血清RPMI-1640液稀释成0.6%的琼脂液,置45℃水浴中待用。

扩散盒 有机玻璃的单面扩散盒,内径10mm,盒的一面用粘合剂(天津北郊区北仓曙光化工厂出品)贴上1张微孔滤膜(孔径0.3-0.45μm)。置盒于80℃烤箱中干热灭菌24h。

药物对小鼠NCFU-C和LCFU-C的作用 按Gordon⁽⁵⁾的方法,取DBA/2小鼠股骨髓和传代第5d的P388白血病腹水细胞,用20%马

血清RPMI-1640液分别作成单细胞悬液,经血细胞计数池计有核细胞数后稀释成适当浓度,分盛于带橡皮塞的15ml灭菌三角烧瓶中,37℃温育10min后分别加入等体积的0.6%琼脂培养液,混均匀后加入扩散盒(根据用药剂剂量不同,给药组细胞数比对照组多1-5倍)。石蜡封口后置盒于5%马血清Hank's液中保存。用乙醚麻醉未照射的昆明种小鼠,把盒埋入腹腔(每鼠2盒)。待小鼠从麻醉状态下恢复后4-6h,iv不同剂量的药物(对照组给生理盐水)。iv后18-20h,把盒转移到经700rad深度X线全身照射的昆明种小鼠腹腔。5d后取盒,计每盒集落数。

全部实验分7次进行,每次均设对照组。每个剂量组至少6只扩散盒,对照组盒数8-12只。药物对两类干细胞的杀伤程度用存活比表示。存活比=(用药组平均CFU-C数/单位有核细胞数)/(对照组平均CFU-C数/单位有核细胞数)。

为了表示药物对LCFU-C作用的选择性,采用了效能比⁽⁶⁾,表示在指数性剂量反应曲线的直线部分上,杀伤50%NCFU-C和LCFU-C所需药量之比。效能比= $D_{50}(NCFU-C)/D_{50}(LCFU-C)$ 。

结果和 讨论

结果见图。各次对照组的NCFU-C和LCFU-C的集落生成率分别介于0.11-0.16%和16-35%。H, HH, PSH和CY对NCFU-C和LCFU-C作用的剂量反应曲线呈直线关系,随剂量增加,杀伤NCFU-C和LCFU-C的作用呈指数性增强,存活比表现为指数性下降。

CY对两类干细胞的作用最强,PSH和HH次之,H最弱。效能比的大小依次为5.7,4.7,3.5和1.8。提示CY对LCFU-C作用的选择性最好,PSH和HH次之,H较差。因此PSH和HH值得推荐临床应用。Ara-C各剂量组对NCFU-C和LCFU-C的作用无明显差异,当剂量为1000mg/kg时,两类干细胞的存活比均下降到38%左右。这就提示本实验使用的

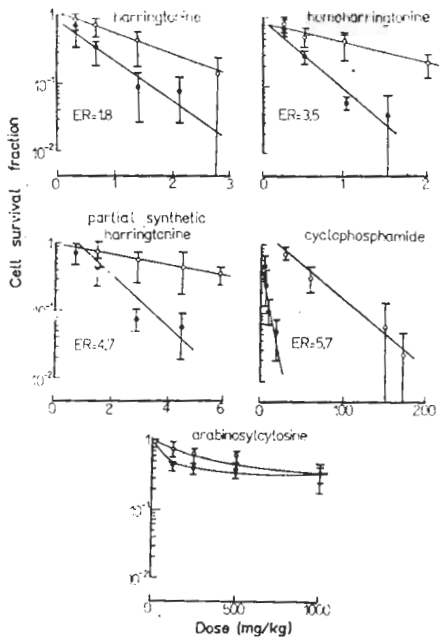


Fig 1. Comparison of effects of 5 antitumor drugs on normal hemopoietic colony-forming units in culture (NCFU-C, o) and P388 leukemic colony-forming units in culture (LCFU-C, ●) in mice by agar diffusion chamber technique. Drugs were injected iv into the 1st recipients of chamber. After 18–20 h the chambers were transplanted from the 1st recipients to the 2nd recipients that were given 700 rads whole-body irradiation. Incubation time following final chamber implantation were 5 d for both NCFU-C and LCFU-C. Mean \pm SD of at least 6 chambers. ER, efficacy ratio.

NCFU-C 和 LCFU-C 处于 S 期的细胞数大致相同。

作者曾用脾集落形成法测定了这几个药对小鼠多能造血干细胞(NCFU-S)和 P388 白血病干细胞(LCFU-S)的作用⁽⁷⁾, 证明用此方法

获得的各药效能比普遍较用 ADC 法获得的大。其大小依次为 CY>HH 和 PSH>H; NCFU-S 对 Ara-C 不敏感, 而 LCFU-S 却相当敏感。据文献介绍, 正常小鼠的骨髓 NCFU-S 处于周期中的细胞数远较 NCFU-C 少, 一般不足 20%, 而 iv 接种 d 5 的 LCFU-S 绝大多数处于增殖周期中^(8,9), 这就表明抗肿瘤药对肿瘤细胞的选择性杀伤作用在较大程度上取决于瘤细胞的增殖状态。许多作者的研究也充分地证明了这点^(10,11)。为此, 在对肿瘤病人化疗前, 采取防止造血干细胞大量进入增殖周期的措施, 如输血和抗感染等, 可以增强化疗药对瘤细胞的选择性杀伤作用, 而降低骨髓毒性。

参考文献

- 1 Powell RG, Weisleder D, Smith CR Jr. *J Pharm Sci* 1972; 61:1227
- 2 中国医学科学院药物研究所. 中华肿瘤杂志 1979; 1:176
- 3 中国人民解放军 187 医院白血病研究小组. 中华医学杂志 1978; 58:163
- 4 福建省白血病协作组. 中华内科杂志 1978; 17:162
- 5 Gordon MY. *Br J Cancer* 1974; 30:421
- 6 Veleriote F, Tolen S. *Cancer Chemother Rep* 1971; 55:43
- 7 周岐新、冯健波、韩锐. 药学学报 1983; 18:712
- 8 Rickard KA, Shadduck RK, Howard DE, Stohlman F Jr. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 134:152
- 9 Harris JW, Shon B, Meneses J. *Cancer Res* 1973; 33:1780
- 10 平嶋邦猛. 癌の臨床 1975; 21:69
- 11 Briganti G, Galloni L, Levi G, Spalletta V, Mauro F. *J Natl Cancer Inst* 1975; 55:53

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Mar; 5(1): 66–69

COMPARISON OF EFFECTS OF FIVE ANTITUMOR DRUGS ON THE HEMOPOIETIC AND P388 LEUKEMIC STEM CELLS IN MICE

ZHOU Qi-xin*, PAN Zhen-kun, FENG Jian-bo, HAN Rui

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050)

ABSTRACT The effects of 5 antitumor drugs on normal bone marrow colony-forming units

in culture(NCFU-C) and P388 leukemic colony forming units in culture (LCFU-C) of mice

were compared by agar diffusion chamber (ADC) technique. The dose-survival curves for both of the stem cells exposed to harringtonine (H), homoharringtonine (HH), partial synthetic harringtonine (PSH), and cyclophosphamide (CY) exhibited exponential forms. The values of the efficacy ratio: H 1.8, HH 3.5, PSH 4.7, and CY 5.7. In contrast, there was no clear dose-response relationship between the effects of arabinosylcytosine (Ara-C) on NCFU-C and LCFU-C at dosage of 125-1000 mg/kg;

dose-survival curves for both of the stem cells were decreased to about 38% at 1 g/kg.

KEY WORDS agar diffusion chamber; granulocytic committed precursor cells; P388 leukemic stem cells; harringtonine; homoharringtonine; partial synthetic harringtonine; cyclophosphamide; cytarabine

*Dept of Pharmacology, Chongqing Medical College, Chongqing