

404±82 ng/ml)。上述血中浓度不同,囊虫患者血药浓度略高于健康者。但  $P>0.05$ , 差异不显著。

囊虫患者血中亚砷  $T_{+β}$  为 16±15 h, 健康者血中亚砷  $T_{+β}$  为 15±5 h,  $P>0.05$  差异不显著。阿苯达唑内服以后,在肝脏 P-450 单氧加氧酶及 NADPH,  $FP_1$  及  $FP_2$  的作用下,转化成亚砷、砷和二氨基化合物,排除体外,必然增加肝脏的负担。为降低对肝脏的毒性,间隔以 14-16 h 给药一次为宜。

#### REFERENCES

- 1 Bogan JA, Marriner SE. Pharmacokinetics of albendazole, fenbendazole and oxfendazole. In: Ruckebusch Y, Toutain PL, Koritz GG, eds. *Verterinary pharmacology and toxicology*. Westport: AVI Publ Co 1983: 235-40
- 2 Bogan JA, Marriner S. Analysis of benzimidazoles in body fluids by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1980, 69: 422
- 3 Prichard K, Hennessy DR, Steel JW, et al. Metabolite concentrations in Plasma following treatment of cattle with five anthelmintics. *Res Vet Sci* 1985, 39: 173
- 4 Marriner SE, Bogan JA. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am J Vet Res* 1980, 41: 1126
- 5 Gyurik RJ, Chiw AW, Zaber B, et al. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice. *Drug Metab Dispos* 1981, 9: 503
- 6 Meulemans A, Giovanangeli MD, Mohler J, Vulpillat M, Hay JM, Saimot AG. High performance liquid chromatography of albendazole and its' sulfoxide metabolite in human organs and fluids during hydatidosis. *J Liq Chromatogr* 1984, 7: 569
- 7 Delatour P. Evaluation of drug residues in animal tissue. In The same as Ref 1, 659-70
- 8 Marriner SE, Morris DL, Dickson B, Bogan JA. Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986, 30: 705
- 9 Galtier P, Alvinerie M, Delatour P. *In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: Assay and frequency of various xenobiotics. *J Vet Res* 1986, 47: 447

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jan, 11 (1): 72-75

### 用血卟啉衍生物及光照在体外净化骨髓中的癌细胞<sup>1</sup>

徐承熊、林琳、黄夜莹、刘红若、王秀荣、王云霞

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050, 中国)

张伯龙、李秀荣、侯虞华 (中国医学科学院北京协和医院, 北京 100730, 中国)

**Purge of malignant cells from bone marrow by hematoporphyrin derivatives and light exposure *in vitro***

XU Cheng-Xiong, LIN Lin, HUANG Ye-Ying, LIU Hong-Yan, WANG Xiu-Rong, WANG Yun-Xia (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China) ZHANG Bo-Long, LI Xiu-Rong, HOU Yu-Hua (Peking Union College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Received 1989 Apr 07 Accepted 1989 Aug 30

<sup>1</sup> Project supported by the Fund for the 7th Five-Year Plan Key Projects, No 75610324

**ABSTRACT** During autologous bone marrow graft in treatment of malignant diseases, it is critical to purge malignant cells from the marrow. In the present study, the sensitivity to photodynamic inactivation of 3 leukemic cell lines was compared with their counterpart normal hematopoietic cells. After mouse leukemic L1210 cells were treated with a preparation of hematoporphyrin derivatives, YHpD, 10 µg/ml for 1 h and irradiated with blacklight (peak wavelength 395 nm, light intensity 0.6 mW/cm<sup>2</sup>) for 5 min, the survival rate of clonogenic cells decreased to <10%, while that of bone marrow granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in DBA/2 mice remained at nearly normal level (>80%). Similar results were obtained when human leukemic HL-60 cells were compared to

human CFU-GM and mouse leukemic L615 cells to CFU-GM in 615 strain mice. It is suggested that hematoporphyrin photoradiation may be useful for selectively killing leukemic cells in bone marrow.

**KEY WORDS** bone marrow; autologous transplantation; hematoporphyrin photoradiation; cultured cells; colony-forming units assay

**摘要** 清除骨髓中的癌细胞对用自体骨髓移植治疗恶性肿瘤具有重要意义。本研究比较了3种白血病细胞与其同源的骨髓粒、巨噬系祖细胞(CFU-GM)对光动力学疗法的敏感性。L 1210, HL-60及L 615白血病细胞各比其相应的DBA/2小鼠, 人体及615系小鼠骨髓CFU-GM的敏感性高4-5倍, 提示此法有可能用于选择性地杀死骨髓中的癌细胞。

**关键词** 骨髓; 自体移植; 血卟啉光辐射; 培养的细胞; 集落形成单位测定

用大剂量化疗及自体骨髓移植法治疗传统疗法无效的恶性肿瘤已被证明可使部份病人得到长期缓解。已知的适应症有何杰金氏病、淋巴瘤、急性白血病及慢性粒细胞白血病等<sup>(1)</sup>。这种疗法的问题之一是自体骨髓中可能混杂有癌细胞, 它们可成为癌症复发的原因<sup>(2)</sup>, 故设法在体外去除骨髓中的癌细胞就成为这种疗法能否用于癌症根治的关键。血卟啉衍生物及光照具有选择性破坏癌细胞的作用<sup>(3)</sup>。本研究通过3种不同类型白血病细胞与其同源造血祖细胞对光动力学作用敏感性的比较来判断将其用于净化骨髓的可能性。

## MATERIALS AND METHODS

**细胞系** 实验用体外培养的小鼠淋巴白血病L 1210细胞系, 人早幼粒白血病HL-60细胞系以及体内传代的小鼠淋巴白血病L 615细胞系。细胞培养及软琼脂集落形成分析法见文献<sup>(4,5)</sup>。

**骨髓粒、巨噬系祖细胞(CFU-GM)分析法** 小鼠CFU-GM的测定用双层琼脂法<sup>(6)</sup>。人骨髓CFU-GM的测定用造血正常的胸外科病人

手术切下的肋骨中取得的骨髓。将骨髓用含50 IU肝素的RPMI-1640液(GIBCO出品, NY)配成悬液, 以等量淋巴细胞分层液分离出单个有核细胞, 通过5号针头使之充分分散后计数。在35 mm塑料平皿(Falcon 1003)中加入含 $2 \times 10^5$ 个有核细胞, 0.3%琼脂的生长培养基1 ml。此培养基由含13% AB型人血清, 20%马血清, 20%人胎肌条件培养液的RPMI-1640液组成。将平皿置于灭菌的150 mm大玻璃平皿中, 再放入37℃, 5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的温箱内培养7 d。在倒置显微镜下计数50个细胞以上的集落。每一测定点由3个重复平皿组成, 取平均数。

**人胎肌条件培养液制备** 取早期引产的人胎儿的大腿肌肉, 在无菌条件下将肌肉剪成约0.3 cm<sup>3</sup>大小的碎块, 用0.9% NaCl液洗去血液等后, 按1份肌组织加10份含30%马血清的RPMI-1640液, 在5% CO<sub>2</sub>中37℃培养9 d, 离心取上清液, 分装后-20℃保存。

**光动力学作用敏感性测定** 受试细胞用血卟啉衍生物制剂光卟啉(扬州生化药厂出品)10 μg/ml在37℃处理1 h后接种于平皿, 用主波长为395 nm的两支30 W黑光灯管(北京灯泡厂出品)照射不同时间。培养细胞与灯管中心的距离为5 cm, 光照强度为0.6 mW/cm<sup>2</sup>。经照射后的平皿作集落形成培养。

**L 615 白血病小鼠生存时间测定** 取成年615近交系小鼠(中国医学科学院实验动物研究所供给), 接种L 615白血病细胞, 记录小鼠的生存天数。在观察L 615细胞对光动力学作用的敏感性时, 每只小鼠接种 $2 \times 10^5$ 个L 615细胞。

## RESULTS

**L 1210 细胞与 DBA/2 小鼠骨髓 CFU-GM 对光动力学作用敏感性比较** L 1210细胞诱发于DBA小鼠<sup>(7)</sup>, 故用DBA小鼠正常造血祖细胞作为对照。从Fig 1可见, 白血病细胞的敏感性较正常细胞高许多倍。当光照5 min

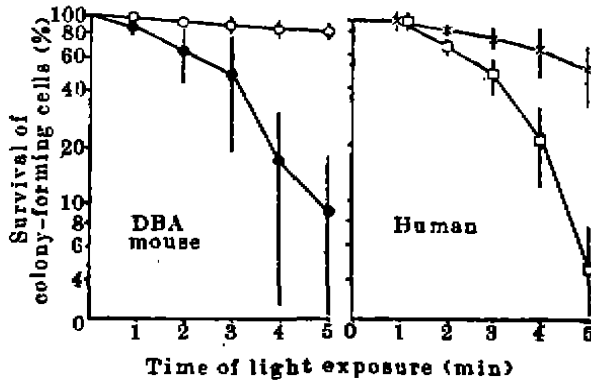


Fig 1. Sensitivity of CFU-GM and leukemic cells to hematoporphyrin derivatives (YHpD, 10 µg/ml, 37°C, 1 h) and light exposure (395 nm black-light, 0.6 mW/cm<sup>2</sup>).  $n = 3-5$  expts composed of 9-15 dishes.  $\bar{x} \pm SD$ . DBA mouse marrow CFU-GM (○), L1210 cells (●), Human marrow CFU-GM (×) and HL-60 cells (□).

时, L1210 细胞的存活率已不足 10%, 而 CFU-GM 在 80% 以上。

**HL-60 细胞与人 CFU-GM 对光动力学作用敏感性比较** 从 4 名造血功能正常的病人取得的骨髓细胞用光卟啉和光照处理后, CFU-GM 存活率的变化见 Tab 1。单纯光照或光卟啉处理对 CFU-GM 的集落形成能力均无明显影响。用光卟啉处理 1 h 后光照 5 min, 使存活率下降至 47.7%。

Tab 1. Sensitivity of human bone marrow CFU-GM to YHpD treatment (10 µg/ml, 37°C, 1 h) and light exposure (LE, 0.6 mW/cm<sup>2</sup>, 5 min).  $n = 4$  expts,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ .

	CFU-GM/ $2 \times 10^5$ BMC	Survival (%)
Control	133 ± 25	100 ± 18
LE	113 ± 41	85 ± 30*
YHpD	132 ± 34	100 ± 26*
YHpD + LE	63 ± 11	48 ± 8***

虽然光卟啉及光照处理后人骨髓 CFU-GM 的集落形成率有一定程度下降, 但与 HL-60 白血病细胞相比, 其敏感性较低。光照 5 min

后, HL-60 细胞的存活率约为 CFU-GM 的 1/10 (Fig 1)。

**L 615 细胞与 615 系小鼠骨髓 CFU-GM 对光动力学作用敏感性比较** L 615 白血病诱发于 615 系小鼠<sup>(8)</sup>, 故用 615 系小鼠的正常造血细胞作为对照。实验分 4 组, 每组 10 只小鼠, 共两批实验, 结果见 Tab 2。小鼠接受  $2 \times 10^5$  个单纯用光卟啉或光照处理的 L 615 细胞后, 生存天数与接受对照 L 615 细胞的小鼠无明显差别, 但接受经光卟啉加光照处理的 L 615 细胞的小鼠的生存天数明显延长。

Tab 2. Survival time of L 615 leukemic cells and CFU-GM in 615 strain mice to YHpD treatment (10 µg/ml, 37°C, 1 h) and light exposure (LE, 0.6 mW/cm<sup>2</sup>, 5 min).  $n = 10$  mice,  $\bar{x} \pm SD$ , \* $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ .

	Survival time (d)	
	Expt I	Expt II
Control	7.1 ± 1.0	7.8 ± 1.3
YHpD	7.4 ± 1.6*	7.8 ± 1.3*
LE	7.3 ± 1.5*	7.7 ± 1.5*
YHpD + LE	9.4 ± 1.6***	10.3 ± 2.6***

小鼠的平均生存天数与接种 L 615 细胞数的对数之间呈直线负相关(图未列出)。接种的细胞数越多, 生存时间越短。当接种的 L 615 细胞数为 100, 50, 25, 12.5 及  $6.25 \times 10^3$  时, 615 系小鼠的平均生存天数依次为  $7.5 \pm 0.4$ ,  $8.8 \pm 0.2$ ,  $9.4 \pm 0.2$ ,  $10.3 \pm 0.7$  及  $12.2 \pm 0.7$  d。接种  $20 \times 10^4$  个 L 615 细胞时小鼠平均生存 7.5 d, 接种  $2.5 \times 10^4$  个细胞时延长至 9.4 d。接受  $20 \times 10^4$  个经光卟啉加光照处理的 L 615 细胞的小鼠平均生存了 9.4-10.3 d, 故可认为其中有  $2 \times 10^4$  个细胞仍然具有致白血病的能力, 即经处理后 L 615 细胞的存活率约为  $2.5 \times 10^4 / 20 \times 10^4 = 12.5\%$ 。

615 系小鼠骨髓 CFU-GM 对光动力学作用的敏感性也低于 L 615 细胞, 在单用光卟啉 (10 µg/ml, 37°C, 1 h) 或单用光照 (5 min) 处理时, CFU-GM 的存活率分别为  $96 \pm 9$  及  $98 \pm$

3% ( $P > 0.05$ ), 在用光卟啉加光照处理后的存活率为  $89 \pm 7\%$  ( $P > 0.05$ )。

## DISCUSSION

在如何清除骨髓中的癌细胞方面, 已报道的方法有将骨髓用  $42^\circ\text{C}$  高温<sup>(9)</sup>或用单克隆抗体导向的毒素处理等<sup>(10)</sup>。光动力学疗法虽被认为对癌组织有选择性杀伤作用, 但至今未见将其用于自体骨髓的净化。

我们的研究表明, 无论是小鼠或人体的细胞, 在体外用光卟啉及光照处理时, 白血病细胞的敏感性均比正常造血祖细胞高。如以半数抑制剂量作为比较敏感性的指标, L 1210 细胞的敏感性约为 DBA/2 小鼠骨髓 CFU-GM 的 5.7 倍, HL-60 细胞为人骨髓 CFU-GM 的 4.3 倍。当白血病细胞的死亡率达 99% 以上时, CFU-GM 的死亡率尚不足 30% (DBA/2 小鼠) 及 60% (人类)。已知造血干细胞有很大的增殖能力, 只要有 0.1% 活存, 就可能使机体的造血重建<sup>(11)</sup>。因此, 采用光卟啉加光照的方法有可能清除自体骨髓中的癌细胞而保存正常的造血细胞。由于光卟啉本身对机体无显著毒性, 体外净化骨髓所需药量较少 (以 200 ml 骨髓液计, 总量约  $10 \mu\text{g}/\text{ml} \times 200 = 2 \text{mg}$ ), 故即使将此剂量的光卟啉连同骨髓一起输给病人也不致引起皮肤的光敏副反应。此法不需要价格昂贵的激光器, 故较实体瘤治疗易于推广, 值得作进一步研究。如能将光动力学作用与其它处理方法 (如高温) 相结合, 有可能达到较满意的效果。

感谢 黑光灯管的输出功率由北京光电技术研究所齐学工程师测定。

## REFERENCES

- 1 Peng Q, He DH, Zhang WY, Dong RC. Histocytochemical studies on hematoporphyrin photoradiation effect on two enzymes of human liver cancer cells in nude mice. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 272
- 2 Xu CX, Zhan HS, Lin L, Wang YQ, Han R. A comparative study on the photodynamic inactivation of tumor cells in the presence of several hematoporphyrin derivatives. *Acta Pharm Sin* 1985; 20 : 94
- 3 Xu CX, Han R, Guo ZR, Wang DF, Zhang JH. Effect of harringtonine and homoharringtonine on colony-forming efficiency of tumor cells *in vitro*. *Acta Acad Med Sin* 1987; 9 : 18
- 4 Testa NG, Hendry JH, Lajtha LG. The response of mouse hemopoietic colony-forming units to repeated whole body X-irradiation. *Biomed Express* 1974; 21 : 431
- 5 Emanuel NM. *Kinetics of experimental tumor processes*. Oxford : Pergamon, 1982 : 62
- 6 Experimental leukemia group, Laboratory No. 6 of the Chinese Academy of Medical Sciences. Laboratory studies on a transplantable mouse leukemia (L615). I. Establishment of the mouse leukemia L615 and its biological properties. *Acta Genet Sin* 1975; 2 : 37
- 7 Hu JP. Clinical application of autologous marrow transplantation. *Acta Shanghai Second Med Univ* 1989; 9 : 63
- 8 Hagenbeck A, Martens ACM. Reinfusion of leukemia cells with the autologous marrow graft: Preclinical studies on lodging and regrowth of leukemia. *Leuk Res* 1985; 9 : 1389
- 9 Moriyama Y, Narita M, Sato K. *et al.* Application of hyperthermia to the treatment of human acute leukemia: Purging human leukemia progenitor cells by heat. *Blood* 1986; 67 : 802
- 10 Gorin NC, Doyay L, Laporte JP. Autologous bone marrow treated with immunotoxin T101 for T-cell leukemia and lymphoma: First clinical reports. *Presse Med* 1986; 14 : 1909
- 11 吴祖泽. 造血细胞动力学概论. 北京: 科学出版社, 1978 : 369