

三尖杉酯碱对小鼠白血病L-1210 细胞和正常骨髓干细胞的影响

樊亦军* 韩 锐

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 用放射自显影技术观察了三尖杉酯碱对小鼠白血病 L-1210 细胞周期的影响。氘标记的胸腺嘧啶脱氧核苷脉冲标记试验证明, 接种后第 6 天的 L-1210 细胞的一代周期时间(T_C)为 15.8 小时, 其 S 期(T_S), G_1 期(T_{G_1}), G_2 期(T_{G_2})及 M 期时间(T_M)分别为 10.7, 2.0, 2.7, 0.4 小时。腹腔注射三尖杉酯碱 30 μ g/只一次, L-1210 细胞的有丝分裂指数 (MI) 明显降低, 其标记指数 (LI) 及每个细胞的标记颗粒数也明显减少, 由 S 期向 G_2 及 M 期移行时间延长。鉴于三尖杉酯碱的限制性毒性为骨髓抑制, 我们用脾集落形成试验 (CFU-S) 研究了三尖杉酯碱对 CFU 纯种小鼠骨髓干细胞的影响。实验表明, 三尖杉酯碱的剂量小于 0.5 mg/kg 时, 对骨髓干细胞无明显影响。当剂量高于此剂量时, 三尖杉酯碱对骨髓干细胞的杀伤呈剂量依赖性。实验证明, 人参皂甙对三尖杉酯碱的骨髓毒性有一定保护作用。

三尖杉酯碱系由海南粗榧 (*Gephalotaxus hainanensis* Li) 中提取的生物碱, 对白血病, 尤其是急性粒细胞白血病有较好疗效^[1]。药理试验表明, 对某些动物移植性白血病和实体瘤有效, 同时能降低 L-1210 和 S 180 细胞的有丝分裂指数^[2], 抑制蛋白质及核酸的合成^[3]。为探讨三尖杉酯碱的作用特点, 我们观察了该药对小鼠 L-1210 白血病细胞周期和小鼠骨髓干细胞的影响。

材 料 和 方 法

动物 皆为医科院药物所动物房饲养繁殖的纯种小鼠或杂交第一代小鼠。瘤株传代及 L-1210 中期细胞标记试验用 DBA/2 小鼠, 间期细胞标记试验用杂交第一代 (DBA/2 \times C57BL) 小鼠, 体重均为 22~25 g。脾集落形成试验用 CFU 小鼠, 体重 22~28 g。

瘤株 小鼠淋巴白血病 L-1210, 每 7 天取腹水传代一次, 取接种后第 6 天的小鼠供用。

药物 三尖杉酯碱系医科院药物所生产的三尖杉酯碱注射液, 以蒸馏水稀释至 0.1 mg/ml 的溶液备用。

人参皂甙由医科院药物所分析室供给, 以蒸馏水制成 1 mg/ml 的溶液备用。

氘-胸腺嘧啶脱氧核苷系上海原子能研究所生产, 比度为 34 c/mM, 浓度为 1 mc/ml。无菌操作下以氯化钠注射液稀释至 200 μ c/ml 供用。

核-4 乳胶 中国科学院原子能研究所生产, 使用时以无离子水 1:1 稀释。

(一) L-1210 白血病的细胞周期及三尖杉酯碱对细胞周期的作用

1. 有丝分裂中期细胞标记试验 参照 Yanke^[4] 和 Layde^[5] 等的方法, 取同性别的 L-1210 白血病小鼠 6 只, 其中 3 鼠为对照, 另 3 鼠为给药组。每鼠分别腹腔注射氩—胸腺嘧啶脱氧核苷 20 μc , 1 小时后, 给药组每鼠一次腹腔注射三尖杉酯碱 30 μg 。标记前及标记后不同时间抽取腹水涂片, 甲醇固定 5 分钟, 涂核—4 乳胶, 置暗盒于 4°C 曝光 7~10 天后, 以 ID196 显影液显影, 酸性坚膜定影液定影, 姬姆萨染色, 镜检。一般每一标本观察 50~100 个有丝分裂中期(加后期, 下同)细胞, 计数有丝分裂中期细胞标记百分率(中期细胞标记指数)。此外, 计数每 1 标本 2000 个细胞中的有丝分裂细胞数, 换算成有丝分裂指数(%)。

2. 间期细胞标记试验 仿 Layde 等的方法^[5], 取 L-1210 白血病小鼠 22 只, 均分为 11 组, 其中 1 组为对照, 10 组给药。给药组每鼠一次腹腔注射三尖杉酯碱 30 μg , 于不同时间分次取 1 组(2 只)小鼠的腹水涂片。取腹水前 15 分钟, 每鼠腹腔注射氩—胸腺嘧啶脱氧核苷 15 μc 。涂片后按前述相同方法做放射自显影观察, 镜下计数每组标本 400 个细胞的标记百分率(间期标记指数); 另计数 20~50 个标记细胞的平均颗粒数。

(二) 脾集落形成试验

试验方法 参照 Till 等的方法^[6], 取同性别的供体鼠分成若干组, 每组 3 鼠, 其中 1 组为对照, 其余为给药组。腹腔注射三尖杉酯碱于给药组动物, 一定时间后, 将对照组和给药组小鼠断颈处死, 用无菌操作切取一侧股骨(约 4 mm, 各鼠长度相等), 以 1 ml Hank's 液反复冲洗骨髓腔 4 次, 合并同组 3 鼠之骨髓细胞悬液(置冰浴中), 计数有核细胞数, 用 Hank's 液稀释至所需的细胞浓度, 一般对照组为 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 给药组则根据药物剂量适当增加浓度。将制备好的骨髓细胞悬液于 1 小时内静脉注射于受体小鼠, 体积均为 0.2 ml。受体为同一性别小鼠, 每组 8~10 鼠, 以 750~800 伦琴的剂量行全身照射(同批试验的照射剂量相同)。照射源为深部 X 射线, 15 mA, 220 kV, 半价层为 2 mm(铜), 滤板为 1.5 mm(铜), 距离为 40 cm, 剂量率为 69.3 伦琴/分。照射后 8 小时内注射供体骨髓细胞, 经 8~9 天, 取脾固定于 Bouin's 液, 以肉眼或放大镜计数脾集落, 换算成平均每一股骨的脾集落数(CFU-S), 反应以脾集落形成细胞存活比(简称存活比)表示。

$$\text{存活比} = \frac{\text{给药组平均每一股骨之CFU-S}}{\text{对照组平均每一股骨之CFU-S}}$$

1. 剂量反应曲线的测定 将供体鼠分为 6~7 组, 其中 1 组为对照, 其余各组一次腹腔注射三尖杉酯碱, 剂量分别为每公斤体重 0.5~3.0 mg, 24 小时后取股骨, 按上述方法测定脾集落。以存活比的对数为纵坐标, 剂量为横坐标作图, 得剂量反应曲线。

2. 时间反应曲线的测定 供体鼠 7 组, 其中 1 组为对照, 余为给药组。给药组分别在取股骨前 1、3、5、8、11、14 天腹腔注射三尖杉酯碱 1.5 mg/kg, 按前述方法取骨髓细胞注射于受体鼠, 计数脾集落, 并作图得时间反应曲线。

3. 人参总皂甙对骨髓干细胞的保护试验 将供体鼠分为 3 组, 第 1 组为对照; 第 2 组腹腔注射三尖杉酯碱, 总剂量为 2 mg/kg 分 3 次给予, 第 1 天 1 mg/kg, 第 2、3 天均为 0.5 mg/kg, 第 4 天按前法取股骨测定脾集落数, 第 3 组在给予三尖杉酯碱的同时, 加用人参总皂甙, 三尖杉酯碱给药方法同第 2 组, 在第 1 次给药前 1 天或两天开始给动物灌服人参总皂甙, 剂量为每天 10 mg/kg, 连续 5~6 天, 其余操作均同第 2 组。

实 验 结 果

(一) 小鼠 L-1210 白血病的细胞周期 为了测定细胞周期时间,将对对照组 3 鼠的中期细胞标记指数平均值按时间作图(图 1),并按 Wheeler 等的方法^[7],计算 L-1210 白血病细胞的周期时间为 15.8 小时, G_1 期(T_{G_1})为 2.0 小时, S 期(T_S)为 10.7 小时, G_2 期(T_{G_2})为 2.7 小时, M 期(T_M)为 0.4 小时。

(二) 三尖杉酯碱对 L-1210 白血病细胞周期的影响 图 2 为给药组的中期细胞标记曲线(3 只小鼠平均值),可以看出,在三尖杉酯碱的作用下, S 期显著延长。

图 3 表明,对照组 L-1210 白血病细胞的有丝分裂指数为 14.0%,给药后 1 小时的有丝分裂指数与对照组无差别,1 小时后则急剧下降,5 小时降至最低,约为 4.0%,直至 28 小时仍无回升趋势。

在我们的试验条件下, L-1210 白血病细胞的间期标记指数为 48%,平均标记颗粒数为 73.5,以此正常值为 100%,将给药组的结果换算成相应的百分率,得到间期细胞标记指数曲线和平均标记颗粒数变化曲线,如图 4 所示,给药后 1 小时,标记颗粒数已降至正常值的 22.3%,而间期标记指数仅略有减少,两者分别在 4 小时和 10 小时降至同样的最低水平,相当于正常值的 6~7%,10~12 小时后,开始逐渐回升,经过 24 小时,标记颗粒数已达正常值的 80%,而间期标记指数仅为 28%。说明三尖杉酯碱显著抑制了 S 期细胞 DNA 的合成。

(三) 三尖杉酯碱对骨髓干细胞的作用 根据脾集落形成试验,三尖杉酯碱的剂量低于 0.5 mg/kg 时,对骨髓干细胞没有明显影响,超过 0.5 mg/kg 以后,随剂量增加,骨髓干细胞的存活比呈指数降低(图 5)。照射剂量 750 伦琴和 800 伦琴得到的曲线一致。时间反应曲线(图 6)表明,一次腹腔注射 1.5 mg/kg 的三尖杉酯碱,药物在第 24 小时的作用最强,可杀灭 80% 的骨髓干细胞,24 小时之后,随着时间延长,作用逐渐减弱,给药后 11 天,骨髓干细胞数已超过对照组 4%。

(四) 人参总皂甙对骨髓干细胞的保护作用。使用总剂量为 2 mg/kg 的三尖杉酯碱时,两次

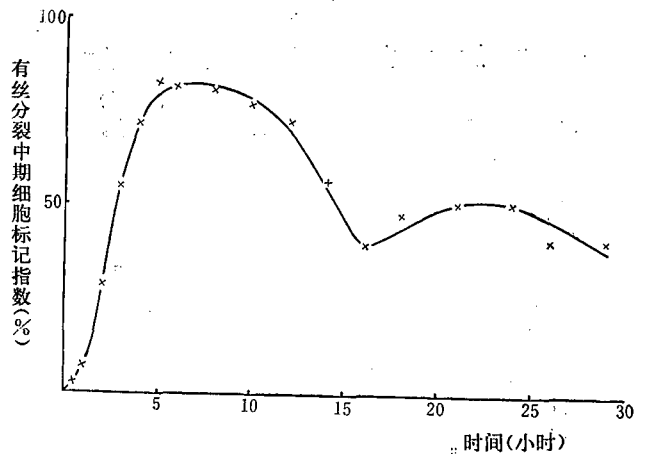


图 1 小鼠 L-1210 白血病细胞的有丝分裂中期细胞标记曲线(三只小鼠平均值)

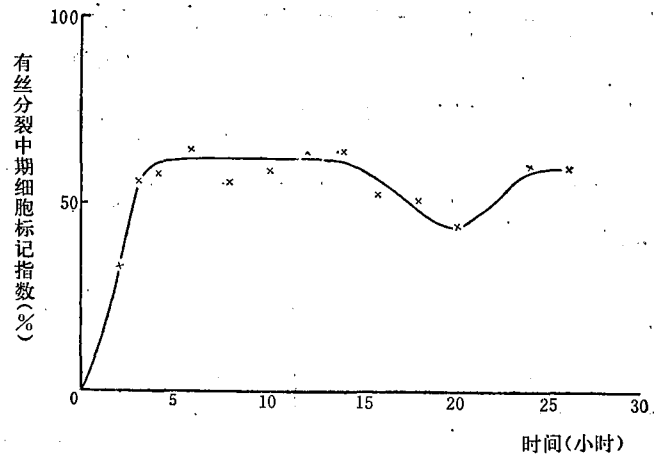


图 2 腹腔注射三尖杉酯碱(30 μg/鼠)后, L-1210 白血病细胞的有丝分裂中期细胞标记曲线(三只小鼠平均值)

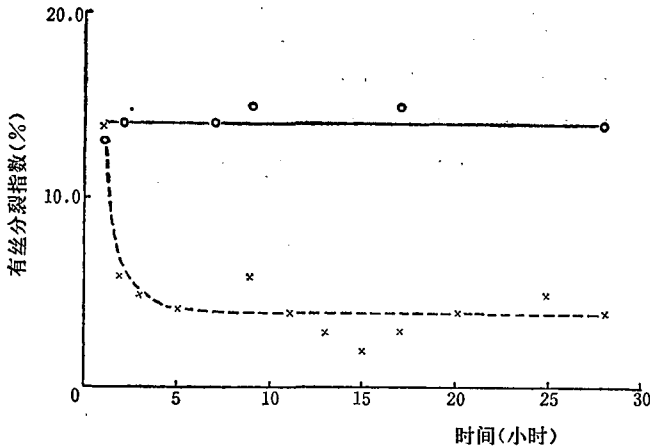
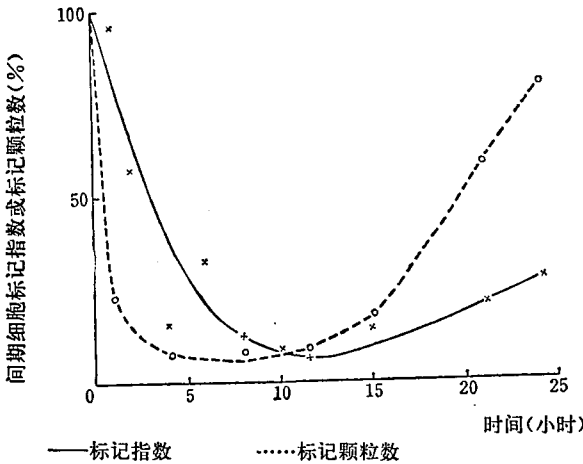


图 3 小鼠 L-1210 白血病细胞的有丝分裂指数曲线。
给药: 腹腔注射三尖杉酯碱 30 $\mu\text{g}/\text{鼠}$



— 标记指数 标记颗粒数
图 4 腹腔注射三尖杉酯碱 (30 $\mu\text{g}/\text{鼠}$) 后, 小鼠 L-1210 白血病细胞的间期标记指数及标记颗粒数变化曲线

试验结果表明, 骨髓干细胞存活比分别为 0.360 和 0.594, 加用人参总皂甙以后, 分别提高到 0.583 和 0.820 (见表 1)。说明人参总皂甙对三尖杉酯碱引起的骨髓干细胞减少, 有一定的对抗作用。

讨 论

小鼠 L-1210 淋巴白血病是国际上通用的, 研究抗癌药不可缺少的实验模型, 不少学者对其细胞动力学特点进行过研究, 但由于各家的实验条件不尽相同, 得出的数据互有出入^[8], Yankee 等腹腔接种 10^5 细胞, 第 6 天进行测定, T_C 为 11.8 小时, T_S 为 8.9 小时; 而第 7 天测定的结果, 则分别延长至 21 小时和 10.7 小时^[4]。Wheeler 等测得的 T_C 为 15.8 小时; T_{G_1} 为 2.1 小时; T_S 为 11.8 小时; T_{G_2} 为 1.4 小时; T_M 为 0.58 小时^[7]。Гончарова 等接种 5×10^6 细胞后 3 天进行测定, T_C 为 17.6 小时, T_S 为 9.8 小时^[9]。我们自国外引进此瘤株后已传代近 40 代, 为了解我们目前保种这一瘤株的细胞动力学特点, 我们进行了类似观察, 结果表明, T_C

为 15.8 小时, T_S 为 10.7 小时, 比较接近于 Wheeler 的结果。但我们测得的有丝分裂指数和间期标记指数都偏低, 这可能与我们的接种细胞数较多 (4×10^6) 有关。

表 1 人参总皂甙对小鼠骨髓的保护试验

实验	组 别	每 1 股骨有核细胞数 ($\times 10^6$)	注射骨髓细胞数	受 体动物数	平均 CFU-S \pm 标准误	每 1 股骨 CFU-S \pm 标准误	存活比
I	对 照	8.8	4×10^4	8	9.0 ± 0.93	1980 ± 204.6	1.000
	三尖杉酯碱*	6.5	4×10^4	8	4.4 ± 1.07	715 ± 162.5	0.360
	人参总皂甙 10 mg/kg/天 $\times 5$ + 三尖杉酯碱*	6.8	4×10^4	8	6.8 ± 1.37	1156 ± 233.2	0.580
II	对 照	12.0	4×10^4	10	10.8 ± 0.96	3240 ± 288.0	1.000
	三尖杉酯碱*	7.2	4×10^4	9	10.7 ± 0.88	1926 ± 158.4	0.594
	人参总皂甙 10 mg/kg/天 $\times 6$ + 三尖杉酯碱*	12.0	4×10^4	10	8.8 ± 1.20	2640 ± 360.0	0.820

* 腹腔注射总剂量为 2 mg/kg 的三尖杉酯碱, 分三次给予。第 1 天 1 mg/kg, 第 2、3 天均为 0.5 mg/kg。

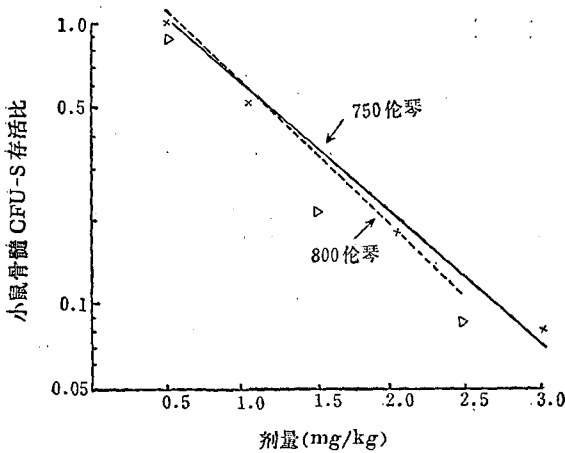


图 5 三尖杉酯碱对小鼠(CFW)骨髓 CFU-S 的剂量反应曲线。作用时间:24 小时

x——x: 750 伦琴, 为三次试验平均值。Δ-----Δ: 800 伦琴

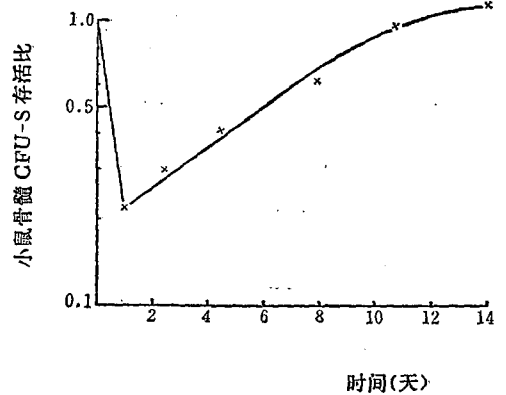


图 6 三尖杉酯碱(1.5 mg/kg)对 CFW 小鼠骨髓 CFU-S 的时间反应曲线

间期细胞标记试验表明, 给予三尖杉酯碱后, S 期细胞的标记颗粒数立即减少, 随后间期标记指数亦降低(图 4), 镜下还观察到破碎的标记细胞, 说明药物系通过抑制 DNA 合成, 从而杀灭 S 期细胞。有丝分裂指数变化曲线证明, 给药后 3~5 小时, 从 S 期经由 G_2 期进入 M 期的细胞极少。此外, 在给药后 1 小时, 细胞的有丝分裂指数与对照组相同, 表明对 M 期细胞可能没有作用。但 1 小时以后, 分裂指数急剧下降, 第 3 小时已接近最低值, 提示药物对 G_2 期细胞也可能有作用。

许多肿瘤化疗药都不同程度地损害骨髓造血机能, 这常常成为肿瘤化疗的限制因素。因此, 研究药物对造血机能的影响, 是药理学研究的一项重要课题。过去, 多从未梢血细胞数间接推测造血机能, 显而易见, 此法有其局限性。一般认为, 血细胞(红细胞、粒细胞、巨噬细胞、血小板和淋巴细胞)来源于共同的造血干细胞(或称多能干细胞、骨髓干细胞), 就小鼠而言, 这种共同的干细胞就是脾集落形成细胞^[10]。由于各种血细胞在血液的寿命不同, 因此, 在药物作用下, 造血干细胞的数量变化, 不一定能够立即从未梢血象反映出来。而目前直接测定骨髓干细胞的方法, 唯一的就脾集落形成试验。我们用此法研究了三尖杉酯碱的作用, 试验表明, 一次腹腔注射三尖杉酯碱 0.5 mg/kg 时, 对骨髓干细胞数没有影响, 随着剂量增加, 骨髓干细胞存活比呈指数降低(图 5), 这也说明三尖杉酯碱不是一种时相特异性药, 而具有烷化剂和抗肿瘤抗菌素一类药的特点^[11,12]。临床和动物实验中观察到的白细胞、血小板和红细胞减少, 以及免疫功能降低等^[1,2], 可能都与骨髓干细胞减少有关。正常骨髓干细胞约有 20% 处于增殖周期, 80% 是非增殖的 G_0 期细胞^[13], 而三尖杉酯碱的剂量超过 1.0 mg/kg 时, 被杀灭的骨髓干细胞数远不止于 20%, 表明药物对 G_0 期细胞可能也有作用, 这一点已为我们的另一试验所证明^[14]。

人参总皂甙有提高血象的作用^[15], 并能增强机体免疫机能^[16]。我们的实验表明, 对三尖杉酯碱引起的骨髓干细胞减少, 人参总皂甙似有一定的保护作用。设想两药合用有可能减少三尖杉酯碱的毒性, 从而提高疗效, 值得进一步研究。

致谢 北京市友谊医院同位素科协助对小鼠进行 X-线照射, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 中国人民解放军187医院: 三尖杉酯碱治疗白血病72例疗效分析. 中华医学杂志, (3):163, 1978.
- [2] 中国医学科学院药物研究所: The antitumour effects and pharmacological action of harringtonine, *Chinese Medical J*, 3:131, 1977.
- [3] Huang M T: Harringtonine, an inhibitor of initiation of protein biosynthesis, *Molecular Pharmacology*, 11:511, 1975.
- [4] Yankee R A, et al: The cell cycle of leukemia L-1210 cells in vitro, *Cancer Res*, 27:2381, 1967.
- [5] Layde J P et al: The effect of nitrogen mustard on the life cycle of Ehrlich ascited tumour cells in vivo, *Brit J Cancer*, 18:150, 1964.
- [6] Till J E, et al: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiation Res*, 14:213, 1961.
- [7] Wheeler G P, et al: The cell cycle of leukemia L-1210 cells in vivo and in vitro, *Proc Soc Exp Biol and Med*, 126:903, 1967.
- [8] Baserga R: The cell cycle and cancer, *Marcel Dekker Inc*, New York, pp. 366, 1971.
- [9] Гончарова С А: Клеточный Цикл Перевываемой Лейкемии L-1210, *Вопросы онкол*, 19:60, 1973.
- [10] 三浦恭定: 制癌剤による骨髓造血干細胞の障害①臨床の事項. 臨床科学, 13:158, 1977.
- [11] Marsh J C: The effects of cancer chemotherapeutic agents on normal hematopoietic precursor cells: A review, *Cancer Res*, 36:1835, 1976.
- [12] Bruce W R, et al: Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo, *J Natl Cancer Inst*, 37:233, 1966.
- [13] 溝口秀昭: 赤芽球の増殖と分化. 臨床科学, 13:202, 1977.
- [14] 中国医学科学院药物研究所等: 三尖杉酯碱对白血病 L-1210 细胞杀伤动力学研究之一(放射自显影观察), 北京师范大学学报, (4):57, 1978.
- [15] Fulder S: Useless root or powerful medicine, *New Sci*, 73:138, 1977.
- [16] Yamamoto M, et al: Stimulatory effect of panax ginseng principles on DNA, RNA, protein and lipid synthesis in rat bone marrow, *Arzneim-Forsch*, 27:1169, 1977.

THE EFFECT OF HARRINGTONINE ON THE CELL CYCLE OF L-1210 CELLS AND THE BONE MARROW STEM CELLS IN MICE

Fan Ijun* and Han Rui

(*Institute of Materia Medica, The Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT

By use of autoradiographic method the duration of the cell cycle of L-1210 leukemic cells and the effect of harringtonine on the cell cycle of the leukemic cells in mice were studied. The T_C of L-1210 cells on the 6th day after transplantation was 15.8 hours, and the T_S , T_{G1} , T_{G2} , T_M were 10.7, 2.0, 2.7, 0.4 hours, respectively. Under the action of harringtonine the duration of S phase of the leukemic cells was prolonged and the mitotic index was lowered after 5 hours of the administration of the drug. The labelled index of the cell population and the average grain counts per cell by the 3H -TdR of the treated leukemic cells were lowered significantly. These results suggest that the DNA synthesis was inhibited profoundly after the treatment with harringtonine.

By means of the spleen colony assay technique the action of harringtonine on normal bone marrow stem cells was investigated. It was revealed that when the dosage of harringtonine was lower than 0.5 mg/kg no effect on the stem cells was found, while a dosage dependent effect on the survival rate of colony-forming unit in spleen was noted when the dosage was more than 0.5 mg/kg. It is interesting that the total saponine of *Panax Ginseng* was found to protect the stem cells of bone marrow in mice from the killing effect of harringtonine.

* Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences of Guangxi Chuang Autonomous Region, Nanning.