

## 研究论文

小鼠造血干细胞和P<sub>388</sub>白血病干细胞  
对5种抗癌药的敏感性比较

周岐新\* 冯剑波 韩锐

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

**提要** 用脾集落形成法比较了5种抗癌药对小鼠造血干细胞(NCFU-S)和P<sub>388</sub>白血病干细胞(LCFU-S)的作用。三尖杉酯碱、半合成三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱和环磷酰胺对两类干细胞作用的剂量—反应曲线呈指数形,效能比依次为5.15, 6.01, 7.96和9.98。阿糖胞苷对NCFU-S无明显作用,但对LCFU-S杀伤作用强,大剂量时剂量—反应曲线趋于水平。当三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱和半合成三尖杉酯碱的剂量分别低于0.30, 0.28和0.75 mg/kg时,对LCFU-S无明显作用,剂量—反应曲线上出现“肩形”,提示LCFU-S在小剂量三尖杉酯类生物碱作用下,有一受亚致死性损伤后修复过程。

**关键词** 三尖杉酯碱;高三尖杉酯碱;干细胞

三尖杉酯碱(H)和高三尖杉酯碱(HH)是从三尖杉属(Cephalotaxus)植物中提取出的生物碱,目前已能人工半合成。实验动物肿瘤治疗显示,天然品和半合成品均有显著抗肿瘤活性<sup>(1,2)</sup>。临床应用表明,对非淋巴细胞性白血病有较好疗效<sup>(3,4)</sup>。与大多数抗肿瘤药相似,其主要副作用为骨髓抑制。为了评价这些药物的选择性,我们采用脾集落形成法(spleen colony-forming assay)研究了H, HH和半合成三尖杉酯碱(PSH)对小鼠造血干细胞和P<sub>388</sub>白血病干细胞的作用,并把结果与已知抗肿瘤药阿糖胞苷(Ara-C)和环磷酰胺(CP)的作用结果进行了比较。

## 材料和方 法

**动物** 纯系小鼠615和DBA/2, CDF 1(C<sub>57</sub>BL × DBA/2)由中国医学科学院动物中心提供,鼠龄5~7周,雌雄兼有。

**小鼠P<sub>388</sub>白血病细胞** 由本所肿瘤组提供,取腹水以生理盐水稀释2.5倍,用DBA/2小鼠每周ip传代一次。

**药物** H, HH和PSH由本所药厂提供。Ara-C系北京医学院药厂合成,批号800617。CP系上海第十二制药厂出品,批号770119。上述各药均用生理盐水配成适当浓度,CP于配制后1小时内使用。

(一) P<sub>388</sub>白血病干细胞平均倍增时间(TD)测定

取传代第7天的P<sub>388</sub>腹水细胞,用10%马血清RPMI-1640液配成10倍稀释的一系列细胞悬液,把这些悬液分别iv注入数组CDF<sub>1</sub>小鼠(每组9~12只),观察小鼠生存时间,并从注入的细胞数与小鼠生存时间的关系中求出TD<sup>(5)</sup>。

## (二) 内源性脾集落形成试验

615 纯种小鼠经不同剂量的深部 X-线(220 KV, 15 mA, 滤过板 1.5 cm Cu, 半价层 2 mm Cu, 照射距离 40 cm, 剂量率 65 伦琴/min) 全身照射, 8 天后, 以颈椎脱臼法杀鼠取脾, 用 Bouin's 液固定, 肉眼计内源性脾集落数。

## (三) 615 小鼠骨髓 NCFU-S 对药物的敏感性

供体鼠每 3 只一组(同批实验各鼠体重相差不超过 3 g), ip 注入一定剂量药物, 对照组给生理盐水(0.1 ml/10 g 体重)。给药后 24 小时, 杀鼠取右侧股骨, 以一定量 Hank's 液冲出全部骨髓, 用 4 $\frac{1}{2}$  号针头分散骨髓细胞。经 3% 冰醋酸液稀释后用血细胞计数池计有核细胞数。然后取一定量骨髓细胞 iv 注入事先受到 750 拉得全身照射的受体鼠中。8 天后, 按上法杀鼠、取脾、固定、计脾集落数。

## (四) 小鼠骨髓 LCFU-S 对药物的敏感性

取传代第 7 天的 P<sub>388</sub> 腹水细胞计数, 用冷 Hank's 液稀释后, 以 10<sup>6</sup>/0.2 ml iv 注入 CDF<sub>1</sub> 小鼠。第 6 天, 随机把小鼠分成 3 只一组, ip 给药(对照组给生理盐水)。给药后 24 小时, 按上法杀鼠、取右侧股骨, 用 Hank's 液冲出全部骨髓, 制成单细胞悬液, 计数后, 取一定量 iv 注入 CDF<sub>1</sub> 小鼠。8 天后取脾, 固定, 计脾集落数。

各药不同剂量组杀伤干细胞的作用以股骨存活比表示

$$\text{股骨存活比} = \frac{\text{用药组 CFU-S 数/股骨}}{\text{对照组 CFU-S 数/股骨}}$$

采用回归分析方法作出各药对两类干细胞作用的剂量—反应曲线。为了比较各药对两类干细胞作用的选择性, 引用了效能比(efficacy ratio), 它表示在剂量—反应曲线的直线部分上, 杀伤一半 NCFU-S 和一半 LCFU-S 所需剂量之比。效能比越大, 表明药物对 LCFU-S 作用的选择性越高。

## 结 果

### (一) P<sub>388</sub> 白血病细胞 TD 测定

图 1 示 iv 接种不同 P<sub>388</sub> 白血病细胞数的 CDF<sub>1</sub> 小鼠的平均存活天数。表明, 注入细胞数的对数与小鼠生存天数呈良好的直线关系。TD 为 16.85 小时。iv 接种 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 和 10<sup>7</sup> 细胞的小鼠分别在 14 天内死亡, 而接种 10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 和 10<sup>2</sup> 细胞的小鼠分别有 1、3 和 6 只直到接种后 30 天仍未死亡, 这些小鼠均经病理切片检查证明未发病, 故不计在内。

### (二) 内源性脾集落测定

选用 615 小鼠进行内源性脾集落试验, 结果表明当照射量为 750 拉得时, 内源性脾集落产生数明显小于 1(0.17±0.11)。12 只受试小鼠, 仅两只各产生 1 个集落, 因此, 以下实验选用的照射剂量为 750 拉得。

### (三) 小鼠骨髓 NCFU-S 和 LCFU-S 对药物的敏感性

除 Ara-C 外, 其他四药对两类干细胞作用的剂量—反应呈直线关系(图 2~5), LCFU-S

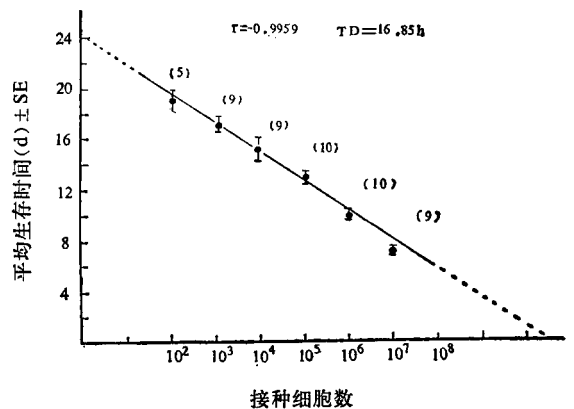


图 1 iv 接种 P<sub>388</sub> 白血病细胞数与小鼠平均生存时间关系(括号内为实验动物数)

对各药的敏感性明显比 NCFU-S 大。效能比的大小依次为：CP 9.98, H 7.96, PSH 6.01 和 H5.15, 表明 CP 和 HH 对 LCFU-S 的选择性作用最好。图 2~4 还表明, 当 H, HH 和 PSH 的剂量分别低于 0.30、0.28 和 0.75 mg/kg 时, 对 LCFU-S 不再有明显作用, 剂量—反应曲线上出现“肩形”, 提示三药小剂量给予时, 细胞可能存在受亚致死性损伤后修复的过程。

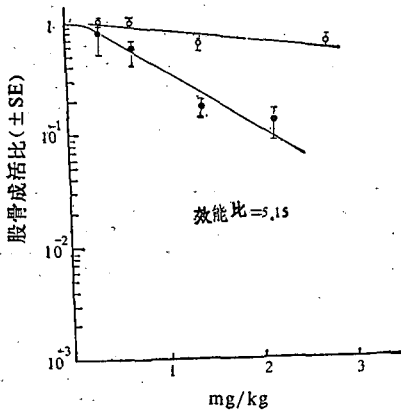


图 2 H 对小鼠骨髓 NCFU-S(○)和 LCFU-S(●)的作用

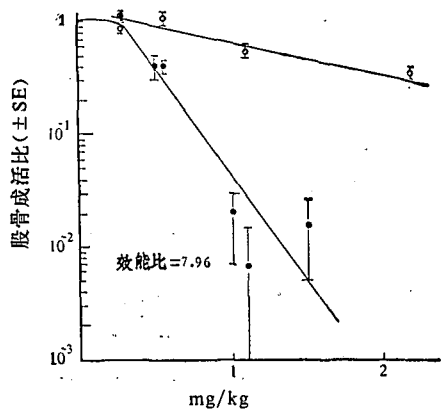


图 3 HH 对小鼠骨髓 NCFU-S(○)和 LCFU-S(●)的作用

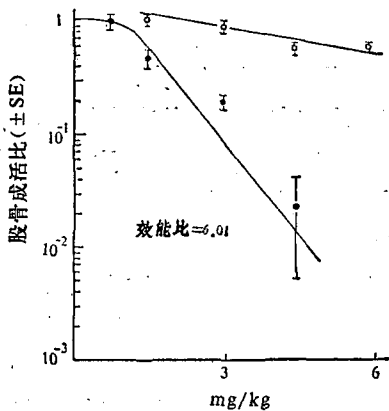


图 4 PSH 对小鼠骨髓 NCFU-S(○)和 LCFU-S(●)的作用

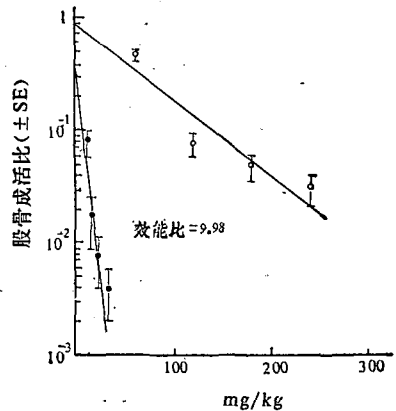


图 5 CP 对小鼠骨髓 NCFU-S(○)和 LCFU-S(●)的作用

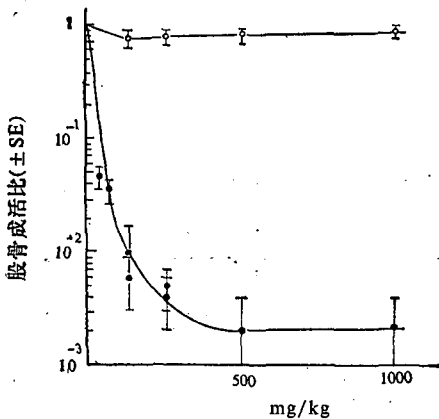


图 6 Ara-C 对小鼠骨髓 NCFU-S(○)和 LCFU-S(●)的作用

图 6 示, Ara-C 各剂量组对 NCFU-S 无明显杀伤作用, 存活比介于  $0.899 \pm 0.124$  与  $0.790 \pm 0.162$  之间, 但杀伤 LCFU-S 的作用却很强。31.25 mg/kg 可使 LCFU-S 存活比降至 5% 以下, 当剂量超过 250 mg/kg 后, 杀伤 LCFU-S 作用不再明显增加, 出现“坪曲线”, 坪值为 0.2%, 提示存在对 Ara-C 耐药的白血病干细胞群。

### 讨 论

干细胞是指能无限自我复制的原始细胞。显而易见, 研究抗肿瘤药对造血干细胞和肿瘤干细胞的作用, 对正确评价药物作用的选择性有重要意义。

Till & McCulloch<sup>(6)</sup>发明的脾集落形成法能够直观地了解药物对啮齿类动物的多能造血干细胞及某些白血病和淋巴瘤干细胞的作用,因此它是抗肿瘤药对两类干细胞作用的定量研究中最常用的方法之一。

Harris<sup>(7)</sup>等研究了 P<sub>338</sub> 白血病细胞增殖动力学过程。他测得 ip 接种 10<sup>6</sup> 细胞后 TD, 第 1 天 8.5 小时, 第 5 天 22.0 小时, S 期细胞数在接种后第 2 天占整个细胞群的 70%, 第 6 天占 27%, 第 7 天占 12%。细胞生长曲线在接种第 4~5 天出现坪, 动物大都在第 7 天死亡。本实验采用 iv 接种法, 测得平均 TD 为 16.9 小时, 介于 Harris 测得的第 1 天 8.5 小时和第 5 天 22.0 小时之间; 接种 10<sup>6</sup> 个细胞, 动物平均生存时间为 10 天, 比 Harris 所用瘤株晚死 3 天, 提示本实验使用的 P<sub>338</sub> 白血病瘤株的毒性可能较 Harris 使用的小。

采用脾集落方法测定药物对 NCFU-S 的作用时, 必须保证在所用照射剂量下, 受体鼠不会有内源性造血集落产生。这点可通过提高照射量达到, 但随照射量提高, 动物死亡增加。为此必须选择一合适的照射剂量。我们的结果表明, 当照射量为 750 拉得时, 内源性脾集落产生数接近于零, 与 Wodinsky<sup>(8)</sup>用 CDF<sub>1</sub> 小鼠的报告一致。

抗肿瘤药对骨髓造血机能的抑制常是其应用受限的主要原因, H, HH 和 PSH 亦不例外。过去有人对这几个药的骨髓毒性进行过一定的研究<sup>(9,10)</sup>。我们的实验则着重于解决这些药对肿瘤干细胞的选择性作用究竟有多高这个问题。为此我们定量地比较了 H, HH, PSH, CP 和 Ara-C 对小鼠骨髓 NCFU-S 和 LCFU-S 的作用。结果清楚地表明 H, HH 和 PSH 均有较高效能比, 其值虽比 CP 小, 但与文献报告的红比脘(Rubidazone)和阿霉素<sup>(11)</sup>的效能比相当<sup>(11)</sup>, 而比柔红霉素<sup>(12)</sup>、丝裂霉素 C 或 N-甲基丝裂霉素(Profiromycin)<sup>(13)</sup>大。

H, HH 和 PSH 对 LCFU-S 作用的剂量—反应曲线存在“肩形”的事实提示, 这些药小剂量给予时, 白血病干细胞可能存在一个受亚致死性损伤后修复的过程。这点值得临床用药考虑。如果单剂给予, 宜用机体能耐受的最大量, 方能取得最佳杀白血病干细胞效果。相反, 小量多次给药, 可能降低疗效甚至促进耐药瘤株产生。

Ara-C 是 S 期特异性药。本实验显示, 各剂量组(125-1000 mg/kg)对 NCFU-S 几无影响, 存活比仅减少 11~12%, 但对 LCFU-S 作用甚强, 125 mg/kg 即使 LCFU-S 存活比降至 1% 以下; 剂量超过 250 mg/kg 后, 作用不再明显增加, 反应曲线趋于水平, 坪值为 0.2%, 提示接种第 6 天; 骨髓中 90% 以上的 LCFU-S 在 Ara-C 作用期间经过了 S 期, 与 Bruce<sup>(14)</sup>和 Wodinsky<sup>(15)</sup>报告的结果一致。

致谢 本工作得到本所潘震崑和苏秀玲同志的帮助; 北京市友谊医院放射科为小鼠照射提供种种方便, 特此致谢。

## 参 考 文 献

1. Powell R G, et al: Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: Structure and activity. *J Pharm Sci* 61:1227, 1972
2. 中国医学科学院药物研究所: 海南粗榧抗癌有效成分的化学、药理及临床研究。中华肿瘤杂志 1:176, 1979
3. 中国人民解放军 187 医院白血病研究小组: 三尖杉酯类生物碱治疗白血病 70 例疗效分析。中华医学杂志 58:163, 1978
4. 福建省白血病协作组: 高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱治疗 40 例急性非淋巴细胞性白血病的临床观察。中华内科杂志 17:162, 1978
5. Skipper H J, et al: Experimental evaluation of potential antitumor agents XIII. On the kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep* 35:3, 1964
6. Till J E & McCulloch E A: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 14:213, 1961

7. Harris J W, et al: Relationship between growth and radiosensitivity in the  $P_{388}$  murine leukemia. *Cancer Res* 33:1780, 1973
8. Wodinsky I: Spleen colony studies of leukemic  $L_{1210}$ . I. Growth kinetics of lymphocytic  $L_{1210}$  cells *in vivo* as determined by spleen colony assay. *Cancer Chemother Rep* 51:415, 1967
9. 樊亦军、韩锐: 三尖杉酯碱对小鼠白血病  $L_{1210}$  细胞及正常骨髓干细胞的影响. *药理学报* 14:467, 1979
10. 王端顺等: 几种三尖杉酯碱和内酯对小鼠白血病  $L_{1210}$  细胞及骨髓干细胞杀伤的比较. 北京市肿瘤学会论文摘要 p75, 1981
11. Alberts D S, et al: Rubidazone vs adriamycin: an evaluation of their differential toxicity in the spleen colony assay system. *Br J Cancer* 34:64, 1976
12. Razek A, et al: Survival of hemopoietic and leukemic colony-forming cells *in vivo* following the administration of daunubicin or adriamycin. *Cancer Res* 32:1496, 1972
13. Razek A, et al: Survival of hemopoietic and leukemic colony-forming cells *in vivo* after administration of mitomycin C or porfiromycin. *J Natl Cancer Inst* 51:1845, 1973
14. Bruce W R, et al: Comparison of the dose- and time-survival curves for normal hemopoietic and lymphoma colony-forming cells exposed to vinblastine, vincristine, arabinosylcytosine, and amethonpterin. *Ibid* 42:1015, 1969
15. Wodinsky I, et al: Spleen colony studies of leukemia  $L_{1210}$ . II. Differential sensitivities of normal and leukemic bone marrow colony-forming cells to single and divided dose therapy with cytosine arabinoside (NSC-63878). *Cancer Chemother Rep* 51:423, 1967

## COMPARISON OF THE SENSITIVITY OF MURINE HEMOPOIETIC AND $P_{388}$ LEUKEMIC STEM CELLS TO FIVE ANTITUMOR DRUGS

ZHOU Qi-xin, FENG Jian-bo and HAN Rui

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

### ABSTRACT

Effects of five antitumor drugs on the murine normal hemopoietic and  $P_{388}$  leukemic colony-forming cells were studied and compared by means of spleen colony assay. Dose-survival curves for the normal spleen colony-forming units (NCFU-S) and the leukemic spleen colony-forming units (LCFU-S) exposed to harringtonine (H), partial synthetic harringtonine (PSH), homoharringtonine (HH), and cyclophosphamide (CP) exhibited exponential forms. The value of efficacy ratios of the four drugs was 5.15, 6.01, 7.96, and 9.98 in the following order for H, PSH, HH, and CP, respectively. All dosage levels of arabinosylcytosine (Ara-C) used showed no distinct effect on the NCFU-S, but exhibited a strong effect on the LCFU-S with increasing dosage; the dose-survival curve for LCFU-S was decreased to a plateau value of 0.2% at the dosage of 500-1000 mg/kg. No obvious effect of H, HH, and PSH on the dose-survival curves was observed when the doses used were less than 0.3, 0.28 and 0.75 mg/kg, respectively.

**Key words** Harringtonine; Homoharringtonine; Stem cells