

1,2:5,6-二去水卫矛醇对正常和黑色素瘤小鼠骨髓干细胞的作用

樊亦军 李茂 周军 (广西医药研究所, 南宁)

提要 用脾集落试验法研究了去水卫矛醇对 CFW 小鼠骨髓干细胞的作用。药物均腹腔注射。给药后 24h 测定, 剂量与反应呈指数关系, 正常小鼠骨髓干细胞的 D_{37} 为 1.7mg/kg, B16 黑色素瘤小鼠为 3.5mg/kg。1 次给药后 24 h, 药物杀灭干细胞的作用最强, 正常小鼠骨髓干细胞恢复至原水平需 14d, 带瘤小鼠恢复较慢。小量分次给药 (2mg/kg × 3 次或 1.5mg/kg × 4 次) 对骨髓干细胞的杀灭作用较 1 次给药为弱。药物对集落细胞组成无影响。用 CFW 小鼠进行脾集

落试验时, 以 800R 照射, 8—11 d 计数集落为宜。

关键词 抗癌药; B16 黑色素瘤; 1,2:5,6-二去水卫矛醇; 骨髓干细胞; CFW 小鼠

1,2:5,6-二去水卫矛醇 (以下简称去水卫矛醇) 系糖醇类抗癌药, 对肺癌、肾上腺癌、膀

1980年2月8日收稿

1980年4月30日修回

膀胱癌、喉癌及神经胶质瘤等有一定疗效⁽¹⁻⁴⁾，剂量限制性毒性为白细胞及血小板减少。为了进一步了解药物对造血机能的影响，探索降低毒性的方法，我们研究了去卫水矛醇对正常和黑色素瘤小鼠骨髓干细胞的作用；并对 CFW 小鼠的脾集落形成试验条件进行了观察。

材 料

去卫水矛醇由本所化学室供给，以注射用水溶解，溶液于 4℃ 保存，不超过 7 d。小鼠均为本所饲养繁殖的 CFW 纯种，每次试验用同一性别，供体鼠体重 18—22 g，受体鼠 22—28 g。瘤株为接种于 CFW 小鼠皮下的 B16 黑色素瘤。照射源用 ⁶⁰Co γ 射线，输出量为 120—145 R/min，照射距离为 65 cm。

方 法 和 结 果

一、正常小鼠内源性脾集落试验 5 组小鼠，分别以 600—1000R 剂量照射，第 9 d 记录小鼠死亡数，并处死存活小鼠，取脾计数集落 CFU-S⁽⁶⁾。结果见表 1，照射剂量达 800R 以上时，小鼠内源性脾集落数可降至 0.43 以下，

表 2 CFW 小鼠照射后死亡及脾集落生长情况

注射骨髓细胞后 d 数	试验鼠数	死亡鼠数	每一股骨 CFU-S ($\bar{x} \pm SE$)	集落直径 (mm)	集落组成 (%) (红:粒:复)*
4	5	0	0		100: 0: 0
6	6	0	4.5 ± 1.8	<1.0	60: 20: 20
8	7	2	7.4 ± 1.8	0.50—1.5	56: 30: 14
11	8	5	6.5 ± 3.5	0.50—2.0	56: 19: 25
15	10	7	17 ± 4.0	1.0—2.5	35: 40: 25
20	11	9	0		

* 主要由红细胞组成的集落:主要由粒细胞组成的集落:红+粒(+巨核)细胞组成的集落

三、去卫水矛醇对骨髓干细胞的作用

1. 剂量-反应关系 正常供体小鼠 6 组，其中 1 组为对照，其余 5 组分别腹注去卫水矛醇 1—8 mg/kg，药后 24 h 制备骨髓细胞悬液，按以往方法测定平均每一股骨 CFU-S，并计算存活比⁽⁵⁾；另以接种黑色素瘤 14 d 之小鼠为供体，按同法进行试验。结果见图 1，表

剂量越大，集落数越少，但小鼠死亡越多。故以下试验均选用 800 R。

表 1 CFW 小鼠内源性脾集落数

照射剂量 (R)	照射鼠数	死亡鼠数	脾集落数 ($\bar{x} \pm SE$)
600	7	0	2.56 ± 1.20
700	7	5	2.00 ± 0.00
800	21	7	0.43 ± 0.12
900	23	16	0.14 ± 0.14
1000	11	11

二、不同时间集落生长情况 供体小鼠骨髓细胞悬液注射于经照射过的受体小鼠（每鼠细胞数为 $6 \times 10^4/0.2$ ml），按表 2 所列的 6 个时间，分别观察各组小鼠死亡数、集落直径及平均 CFU-S。结果表明，6—15 d 以内，时间越长，集落越大，数量越多，但小鼠死亡亦多；当集落太大时，往往互相融合而难计数。故以下实验均选择 8—11 d，一般为 9 d。脾脏经石蜡包埋切片，苏木素伊红染色，镜检发现，最早出现由单纯红细胞组成之集落，以后逐渐出现粒细胞和复合细胞集落（见表 2）。

明药物剂量与每一股骨 CFU-S 存活比的对数呈直线关系，正常小鼠骨髓干细胞的 $D_{37}^* = 1.7$ mg/kg，相关系数 $r = -0.96$ 。黑色素瘤小鼠骨髓干细胞的 $D_{37} = 3.5$ mg/kg， $r = -0.98$ 。

* 剂量-反应指数曲线上杀灭 63% 骨髓干细胞所需剂量。

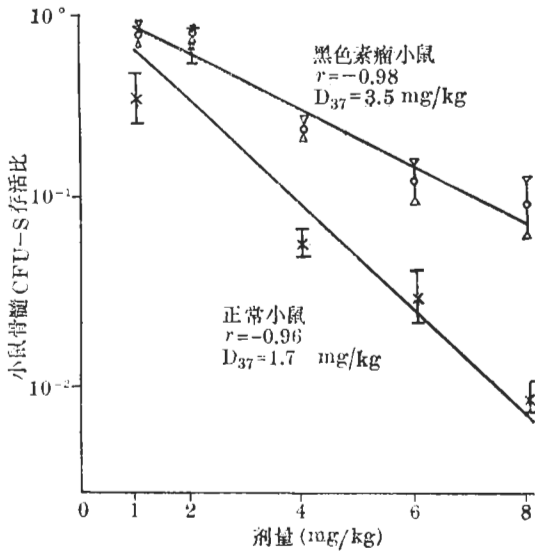


图 1 去水卫矛醇对小鼠 CFU-S 的剂量-反应曲线

2. 时间-反应关系 正常供体小鼠 8 组, 其中 1 组为对照, 余 7 组均腹注去水卫矛醇 4 mg/kg, 药后 1—15 d, 制备骨髓细胞悬液, 按三、1. 法测定平均每一股骨 CFU-S 存活比。另取接种黑色素瘤 10 天之供体小鼠 6 组, 参照上述方法进行试验。结果见图 2,

无论对正常或带瘤小鼠骨髓干细胞, 药物均在 24 h 表现出最大的杀灭作用, 正常小鼠骨髓干细胞数约经 14 d 可恢复至原水平, 带瘤小鼠恢复较慢。

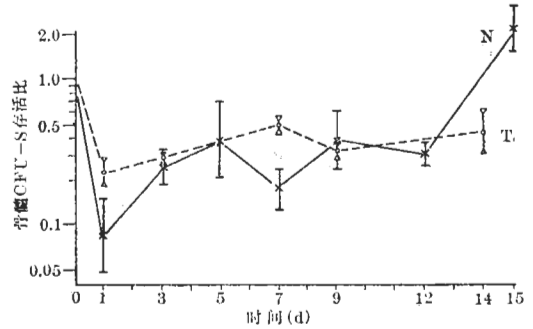


图 2 给去水卫矛醇后不同时间小鼠 CFU-S 的存活比

N: 正常小鼠; T: 黑色素瘤小鼠

3. 不同给药方案的作用

按三、1. 法进行试验, 将总量为 6 mg/kg 的去水卫矛醇分别分 1, 2, 3 或 4 次给予, 结果如表 3, 分 3—4 次给药比 1 次给药对骨髓的毒性要低, 各用药组脾集落细胞组成与对照组比较相差无几。

表 3 不同给药方案对 CFU 小鼠骨髓干细胞的影响

剂 量 (mg/kg × 次数)	给药时间 (处理前)	试验 鼠数	死亡 鼠数	每一股骨 CFU-S ($\bar{x} \pm SE$)	集落 存活比	P 值 [*]	集落组成 (%) (红:粒:复)
对 照		8	1	2465 ± 124			63:27:10
6.0 × 1	5 d	8	1	687 ± 54	0.28		60:24:16
3.0 × 2	2, 4 d	8	2	840 ± 102	0.34	>0.1	59:22:19
2.0 × 3	2, 3, 4 d	8	0	869 ± 45	0.35	<0.05	59:23:18
1.5 × 4	1, 2, 3, 4 d	10	0	869 ± 48	0.35	<0.05	68:16:16

* 与“6mg/kg × 1”组进行“t”测验

讨 论

脾集落试验法已广泛用于抗癌药物研究, 我们选用白色 CFU 小鼠进行实验, 结果表明, 以 800 R 照射, 8—11 d 取脾计数集落是适宜的。此时, 平均内源性脾集落数不超过 1, 约 10^4 骨髓有核细胞可形成 1 个集落, 小鼠死亡一般不超过 50%。

Fuzy 等测得皮下注射去水卫矛醇对 F_1 (DBA/2 × C57BL) 小鼠骨髓干细胞的 D_{37} 为 2.64 mg/kg⁽⁹⁾, 我们的结果为 1.7 mg/kg, 这可能是动物及给药途径不同引起的差异。一般认为, 带瘤机体的造血细胞易受到化疗药伤害。实验结果表明, 对去水卫矛醇来讲, 黑色素瘤小鼠的骨髓干细胞并不比正常小鼠敏感, 但受损骨髓干细胞的恢复却相当缓慢。由此认为,

去水卫矛醇对带瘤机体造成的较大损害,是由于受损干细胞恢复较慢所致。此外,去水卫矛醇不影响脾集落的细胞组成,提示决定干细胞定向分化的微环境及激素等无大变化。

致谢 本文承中国医学科学院药物研究所韩锐教授审阅,广西壮族自治区人民医院放疗室协助照射小鼠。

参 考 文 献

1 Eagan RT, Moertel CG, Hahn RG, Schutt AJ. *J Natl Cancer Inst* 1976 Jan; 56 (1) : 179

2 Hass CD, Stephens RL, Hollister M, Hoogstraten B. *Cancer Treat Rep* 1976 May; 60 (5) : 611

3 Eagan RT, Ingle JN, Frytak S, Rubin J, Kvols LK, Carr DT, Coles DT, O'Fallon JR. *ibid* 1977 Oct; 61 (7) : 1339

4 Espana P, Wiernik PH, Walker MD. *ibid* 1978 Aug; 62 (8) : 1199

5 樊亦军、韩 锐. 药学学报 1979年8月; 14 (8) : 467

6 Fuzy M, Lelieveld P, Van Putten LM. *Eur J Cancer* 1975 Mar; 11 (3) : 169

Acta Pharmacologica Sinica 1980 Dec; 1 (2) : 112—115

EFFECTS OF 1,2:5,6-DIANHYDROGALACTITOL ON THE BONE MARROW STEM CELLS IN NORMAL AND MELANOMA-BEARING MICE

FAN Yi-jun, LI Mao, ZHOU Jun

(Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences of Guangxi Chuang Autonomous Region, Nanning)

ABSTRACT The effects of 1,2:5,6-dianhydrogalactitol (DAG) on the bone marrow stem cells in CFW mice were tested by using the spleen colony-forming technique. The ip dose-response curves at 24 h were exponential, with a D_{37} of 1.7 mg/kg for the bone marrow stem cells in normal mice and 3.5 mg/kg for the B16 melanoma-bearing mice. There was a nadir of survival of 10% at 24 h after ip 4 mg/kg. It took 14 days for the bone marrow stem cells in normal mice to recover to initial level, but the cells in the melanoma-bearing mice could not recover to the initial level in 14 days. Doses of 2 mg/kg

$\times 3$ or 1.5 mg/kg $\times 4$ were less toxic to the marrow stem cells than a single dose of 6 mg/kg. The cell type distribution of colonies was REC: pure granulocytes: mixed cells = 56:30:14. This ratio was not altered by DAG.

When spleen colony-forming assay was carried out in CFW mice, it was expedient to give 800 R of gamma radiation and to count the number of colonies in spleen on days 8—11 after the injection of bone marrow cells.

KEY WORDS anticancer drug; B16 melanoma; 1,2:5,6-dianhydrogalactitol; bone marrow stem cells; CFW mice