

· 论 著 ·

氨磷汀对足叶乙甙所致小鼠 DNA 损伤和造血损伤的预防作用研究

张红宾¹, 张翼军²

(1 重庆医科大学附属第一医院血液科 400016; 2 第三军医大学西南医院血液科, 重庆 400038)

摘要:目的 了解细胞保护剂氨磷汀(WR-2721)在拓扑异构酶 II 抑制剂足叶乙甙(VP-16)对小鼠遗传损伤和造血损伤中的预防作用。方法 以昆明小鼠为研究对象,采用随机数字表法将小鼠分为 1、5、15 mg/kg VP-16 处理组(A1、A2、A3);上述不同剂量 VP-16 联合 200 mg/kg WR-2721 处理组(B1、B2、B3);C 组给予等体积生理盐水;D 组给予 WR-2721。通过单细胞凝胶电泳,计数拖尾细胞发生率和 DNA 迁移度;比较各组嗜多染红细胞(PCE)中微核(MN)比率的差异;统计各组小鼠存活率、外周血白细胞和骨髓粒-巨噬系集落形成单位(CFU-GM)。结果 联合 WR-2721 后,MN 发生率、DNA 受损淋巴细胞百分率、DNA 迁移度及小鼠 30 d 存活率、平均存活时间、外周血白细胞计数、骨髓 CFU-GM 计数均较单用 VP-16 对照组改善明显。结论 WR-2721 能有效降低 VP-16 所致的小鼠遗传损伤和骨髓造血损伤。

关键词:氨磷汀;足叶乙甙;DNA;造血

中图分类号:R73-361;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)06-0656-03

Effect of WR-2721 on preventing DNA damage and hematopoietic lesion of mice induced by VP-16

ZHANG Hong-bin¹, ZHANG Yi-jun²

(1. Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of WR-2721 on preventing DNA damage and hematopoietic lesion in mice treated with VP-16. **Methods** The Kunming strain mice were randomly divided into nine groups ($n=10$ in each group) and received different doses of VP-16 alone (A1, A2, A3), VP-16 combined with WR-2721 (B1, B2, B3), equal volume of saline (C) and WR-2721 alone (D). The ratios of cells with DNA damage and DNA migration were resolved by single cell gel electrophoresis. The ratios of cells with micronuclei in PCE were compared in different groups. The protective effect of WR-2721 was also tested in terms of survival rates, PWBC, CFU-GM. **Results** After combined with WR-2721, both the ratios for micronuclei in PCE, lymphocytes with DNA damage, the DNA migration and the survival rate of 30 d, mean survival days, PWBC and CFU-GM were ameliorated significantly. **Conclusion** WR-2721 could lessen effectively DNA damage and hematopoietic lesion of the mice induced by VP-16.

Key words: amifostine; etoposide; DNA; hemopoietic

足叶乙甙(etoposide, VP-16)是半合成的鬼臼毒类药物,是一种拓扑异构酶 II 抑制剂,常用于治疗血液系统恶性肿瘤和实体瘤。氨磷汀(amifostine, WR-2721)是一种细胞保护剂,能选择性地保护正常细胞免受放疗和化疗的毒害,而不降低其疗效。已证实 WR-2721 可降低烷化剂的造血损害、肾毒性、出血性膀胱炎、神经毒性、胃肠道损害及肺损害等毒副作用,并能降低烷化剂造成的嗜多染红细胞微核的形成和 DNA 损伤^[1-3]。而氨磷汀能否保护和预防拓扑异构酶 II 抑制剂对正常造血影响和 DNA 损伤,预防治疗相关性白血病的发生,目前尚无定论。本研究通过观察 WR-2721 在 VP-16 对小鼠 DNA 损伤和造血系统损伤中的预防作用,为预防拓扑异构酶 II 抑制剂化疗和造血干细胞移植预处理时的不良反应提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 昆明小鼠(第三军医大学实验动物中心),WR-2721(江苏省药物研究所严相平研究员惠赠),VP-16(江苏恒瑞制药有限公司惠赠),环磷酰胺(上海华联),小牛血清(郑州佰安生物),正常熔点琼脂糖(Sigma),低熔点琼脂糖(Sigma),GM-CSF(麒麟公司),淋巴细胞分离液(天津 TBD),10-4M2-巯基乙醇(Sigma),3%谷氨酰胺(HyClone),马血清(郑州佰安生物),青霉素(华北制药),链霉素(华北制药),EB(Sigma),IMDM 培养基(HyClone)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及分组 昆明种小鼠 80 只,7~8 周龄,体质

量 18~22 g,分为 8 个组,每组 10 只,雌雄对半。均给予相同的水和饲料喂养。采用随机数字表法分组如下:VP-16 处理分别予 VP-16 1(A1)、5(A2)、15 mg/kg(A3)腹腔注射;VP-16 和 WR-2721 联合处理分别予 VP-16 1(B1)、5(B2)、15 mg/kg(B3)WR-2721,同时均在 VP-16 化疗前 30 min 注射 WR-2721 200 mg/kg;C 组给予等体积生理盐水腹腔注射;D 组给予 WR-2721 200 mg/kg 腹腔注射。本实验染毒方法采用欧洲经济合作组织化学物质毒性实验指南——哺乳动物红细胞微核实验^[4],采用双染毒法。

1.2.2 单细胞凝胶电泳 取末次处理后 24 h 小鼠眼眶内血,分离外周血单个核细胞,调整细胞悬液浓度至 1×10^5 /mL 备用。制片、细胞裂解、单细胞凝胶电泳^[5],在荧光显微镜下观察拖尾细胞数,测量细胞的彗尾长度,计算受损细胞 DNA 迁移度(彗尾长度)及受损细胞百分率[(受损细胞数/受损细胞+未受损细胞)×100%]。每张玻片计数 200 个细胞中拖尾细胞数,计算受损细胞百分率;每张玻片计数 25 个拖尾细胞彗尾长度,计算 DNA 迁移度。

1.2.3 微核实验 取小鼠胸骨骨髓涂片并染色。隔夜自然干燥,用甲醇固定,姬姆萨染色镜检。在油镜下观察 1 000 嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)中含微核(micronuclei, MN)的 PCE 出现的频率。MN 的大小上限一般应为细胞直径的 1/20 到 1/3。MN 形态以圆形为主,也可见椭圆形、新月形、半圆形、马蹄形等形态。MN 的色彩与有核红细胞的

核相同。PCE 在 Gimesa 染色时呈蓝色或灰蓝色。

1.2.4 实验动物处理 在对动物存活率和骨髓造血功能的实验中,受试动物于第 1、3、5 天分别给予处理因素。

1.2.5 存活率实验 各组小鼠自末次处理后开始观察并计算其 30 d 存活率,提高存活率,平均存活天数和保护系数 K(K=给药组小鼠 30 d 平均存活日/对照组小鼠 30 d 平均存活日)。

1.2.6 外周血白细胞计数 末次化疗结束后开始进行外周血白细胞计数,分别计数化疗后第 1、7、14 天的外周血白细胞。用 Sysmex 血细胞计数仪进行外周血白细胞计数。

1.2.7 骨髓粒-巨噬系集落形成单位(CFU-GM)计数 各组动物于末次处理后第 1、7、14 天分别做骨髓 CFU-GM 的培养和计数。将小鼠脱颈椎处死后,放入 75%酒精中浸泡 5 min,取出股骨和胫骨,制备单细胞悬液。培养体系为 IMDM 培养液,内含马血清 30%、甲基纤维素 0.9%、骨髓单个核细胞 1×10^5 /mL、GM-CSF 20 ng/mL、谷氨酰胺 2 mmol/L、2-巯基乙醇 5×10^{-5} mol/L、青霉素及链霉素各 100 u/mL。充分混匀后种于 24 孔板中。置于饱和湿度 5%CO₂ 培养箱内,37 °C 孵育 7 d,倒置显微镜下观察,CFU-GM 为大于或等于 50 个细胞组成的细胞团,计数集落形成率。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 WR-2721 对 VP-16 所导致的小鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤作用的影响 随着 VP-16 剂量的增加,淋巴细胞 DNA 损伤率和迁移度逐步增高,各剂量组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。加用 WR-2721 后同一剂量的 VP-16 所致的 DNA 损伤率和迁移度较未加 WR-2721 组显著降低,见表 1。

2.2 WR-2721 对 VP-16 所致的小鼠骨髓细胞微核形成的影响 随着 VP-16 剂量的增加,微核形成增加。*t* 检验显示微核的形成与 VP-16 的剂量呈显著的剂量反应关系。与 C、D 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合 WR-2721 后,微核率较未加 WR-2721 组显著降低,见表 1。

表 1 WR-2721 对 VP-16 所致 DNA 损伤率、迁移度和微核的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	DNA 损伤率(%)	DNA 迁移度(μ m)	MN(‰)
A1	26.5±5.1	35.3±6.1	7.8±2.6
A2	46.2±8.1	56.1±8.6	23.8±5.6
A3	70.2±7.2	87.9±10.5	47.3±9.8
B1	14.4±2.0 ^a	6.2±2.7 ^b	1.5±0.5 ^c
B2	24.6±4.4 ^a	29.9±5.7 ^b	12.9±3.5 ^c
B3	31.7±5.2 ^a	51.1±7.5 ^b	24.0±4.4 ^c
C	4.5±0.5	4.8±0.4	1.3±0.4
D	4.8±0.7	5.1±0.5	1.4±0.2

^a:与 A 组比较, $P < 0.01$;^b:与 A 组比较, $P < 0.01$;^c:与 A 组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 WR-2721 对 VP-16 化疗小鼠存活率的作用 可以发现 VP-16 剂量越大,小鼠的 30 d 存活率越低,小鼠平均存活时间较短。加用 WR-2721 后 30 d 存活率提高,平均生存时间较长,见表 2。

2.4 外周血白细胞计数情况 第 1、7 天 VP-16 剂量越大,外周血白细胞计数降低越明显,与 C、D 组相比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。加用 WR-2721 后与单用 VP-16 化疗组相

比,白细胞下降幅度较小($P < 0.01$),见表 3。

表 2 WR-2721 对 VP-16 作用的小鼠的存活率的影响

组别	30 d 存活率 (%)	增加存活率 (%)	平均存活天数 (d)	保护系数 K
A1	75.0	—	8.3±1.5	—
A2	50.0	—	7.5±1.9	—
A3	0.0	—	6.2±1.8	—
B1	91.7 ^a	16.7	9.0±1.1	1.2
B2	83.3 ^a	33.3	9.5±2.1	1.4
B3	41.7 ^a	41.7	8.1±1.6	3.0
C	100.0	—	—	—
D	100.0	—	—	—

^a:与 A 组比较, $P < 0.01$ 。—:表示无此项数据。

表 3 WR-2721 对 VP-16 作用后的小鼠外周血白细胞的影响 ($\times 10^9$ /L)

组别	1 d	7 d	14 d
A1	21.8±4.4	14.2±1.8	41.4±6.3
A2	15.1±4.2	11.2±1.7	53.0±8.7
A3	10.4±2.1	8.0±1.9	64.3±8.4
B1	32.4±5.2 ^a	28.3±4.0 ^b	63.3±8.0 ^c
B2	21.4±4.0 ^a	15.8±3.5 ^b	63.4±3.7 ^c
B3	13.8±3.3 ^a	11.2±2.1 ^b	81.5±7.6 ^c
C	31.6±5.3	30.7±2.4	31.5±4.9
D	38.7±5.3	38.3±4.2	37.8±4.8

^a:与 A 组比较, $P < 0.01$;^b:与 A 组比较, $P < 0.01$;^c:与 A 组比较, $P < 0.01$ 。

2.5 骨髓 CFU-GM 计数情况 随着 VP-16 剂量的增加,小鼠 CFU-GM 形成减少。加用 WR-2721 后骨髓 CFU-GM 生成增加($P < 0.01$)。各组间 CFU-GM 在第 14 天形成达到峰值,见表 4。

表 4 WR-2721 对 VP-16 作用后的小鼠骨髓 CFU-GM 计数的影响

组别	1 d	7 d	14 d
A1	56.3±7.9	39.6±5.2	86.8±9.4
A2	34.7±6.1	31.9±5.9	77.4±8.7
A3	25.8±7.7	23.3±7.9	73.1±10.1
B1	67.6±9.0 ^a	73.6±6.7 ^b	96.8±12.1 ^c
B2	52.3±9.5 ^a	60.0±7.2 ^b	87.6±11.7 ^c
B3	30.6±5.4 ^a	46.8±7.0 ^b	82.0±11.7 ^c
C	103.0±10.4	101.6±10.1	103.0±12.8
D	117.3±11.1	112.1±13.0	109.5±13.6

^a:与 A 组比较, $P < 0.01$;^b:与 A 组比较, $P < 0.01$;^c:与 A 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

3.1 WR-2721 对 VP-16 所致 DNA 损伤的作用 拓扑异构酶 II 抑制剂类药物 VP-16 可以用来治疗所有年龄段的多种肿瘤。由于它在临床上的广泛应用,且和引起继发性肿瘤相关,

因此人们对它在体内的遗传毒性产生了极大的关注。VP-16 可与 DNA 拓扑异构酶 II 形成三联体阻断该酶连接活性,使 DNA 链断裂,这种断裂多发生于 ALL-1 基因的断裂点集中区,引起 ALL-1 基因重排,甚至引起 AF3p21 基因形成,并可通过脱氢酶诱导的自由基损伤 DNA,从而引发白血病^[6]。Krishnan 等^[7]的临床研究显示采用 VP-16 行干细胞动员可使伴 11q23 和 21q22 异常的治疗相关性急性髓细胞白血病 (t-AML) 发病危险性增加 12.3 倍 ($P < 0.006$)。研究表明 MN 在反映拓扑异构酶 II 抑制剂类药物效果方面是比细胞生长抑制更为敏感的指标,可能作为潜在的预测治疗相关性肿瘤的标志文献依据。因此本实验采用 MN 作为研究 VP-16 对正常细胞 DNA 损伤作用的主要指标之一。研究发现随着 VP-16 染毒剂量的增加,小鼠 PCE 的 MN 形成增加。在 WR-2721 预防组,WR-2721 对不同剂量 VP-16 所诱导的 DNA 损伤有明显保护作用。随 VP-16 剂量的增加,WR-2721 的保护作用减弱。提示提前给予 WR-2721 预防可减轻 PCE 的 MN 形成。

本研究发现随 VP-16 剂量的增加,外周血淋巴细胞受损比例增加,相应的慧尾长度不断增长。说明 VP-16 可导致外周血淋巴细胞 DNA 发生单链断裂,该损伤具有明显剂量反应关系。不同剂量组 VP-16 在加用 WR-2721 后 DNA 损伤率、迁移度均较同剂量对照组改善明显,提示 WR-2721 的预防性应用对 DNA 损伤具有明确的保护作用。

3.2 WR-2721 对 VP-16 所致造血损伤的作用 Walter Reed 中心首先发现 WR-2721 有造血活性作用。Kalotycho 和 Rombos^[8]用克隆分析法研究了 WR-2721 对去甲氧基柔红霉素 (IDA) 所致的多潜能外周血造血干细胞的保护作用,发现 3 mg/mL WR-2721 可使 0.05 mg/mL IDA 造成的 CFU-GM 较对照组增加 35%,使红系爆式形成单位 (BFU-E) 增加 53%,使粒红巨噬巨核细胞集落形成单位 (CFU-GEMM) 增加 25%。因此,认为 WR-2721 可以减轻 IDA 对正常多潜能外周血造血干细胞的毒性作用。也有研究发现 WR-2721 还能促进不成熟的巨核细胞向产板型巨核细胞分化^[9]。目前认为 WR-2721 的造血增强效应,与它们的硫醇结构有关。可对原始造血前体细胞能产生持续的促分裂效应,相应地导致集落形成能力大大增加。减少细胞丢失,延缓细胞因子缺乏引起的凋亡。

化疗药物 VP-16 可引起骨髓抑制及全身脏器功能损害,易导致小鼠并发感染、出血甚至死亡。本研究发现随着化疗药物 VP-16 剂量的增加,小鼠的 30 d 存活率明显降低,其中以 VP-16 15 mg/kg 组最低,30 d 存活率为 0。加用 WR-2721 后 30 d 存活率较相同剂量组明显提高。提示在 VP-16 化疗前给予 WR-2721 可以降低其化疗的毒副作用,提高其 30 d 存活率。

本研究发现化疗后第 1 天小鼠外周血白细胞计数随化疗药物 VP-16 剂量的增加而减低,加用 WR-2721 后可使其白细胞计数降低的幅度减小,统计学处理发现差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。生理盐水阴性对照组和 WR-2721 对照组 WBC 最高,两者无明显差异,说明 WR-2721 对外周血白细胞计数无明显影响。化疗后第 7 天的变化规律与第 1 天相似。化疗后第 14 天白细胞计数最高,加 WR-2721 组较单纯化疗组白细胞计数高。其中以 VP-16 15 mg/kg 加 WR-2721 组最高,提示加用 WR-2721 后可能有利于 WBC 的动员及释放。

骨髓 CFU-GM 在 VP-16 加保护剂组与单纯 VP-16 化疗组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。说明化疗前 30 min 给予 WR-2721 可以明显减轻 VP-16 对骨髓的毒副作用,增加 CFU-GM 形成。各组 CFU-GM 在药物作用后第 14 天达峰值。

本实验表明,WR-2721 可以保护正常造血细胞,减轻 VP-16 对正常细胞 DNA 和染色体的损伤,增加外周血白细胞计数和骨髓 CFU-GM 计数,提示 WR-2721 在预防拓扑异构酶 II 抑制剂类药物治疗相关性白血病方面有潜在的保护作用^[10]。

(志谢:感谢第三军医大学军事预防医学院罗成基教授、曹佳教授、孙华明老师、郭朝华技师和第三军医大学西南医院血液科张勇教授等对本试验的支持和帮助。)

参考文献:

- [1] Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector [J]. *Oncologist*, 2007, 12(6): 738.
- [2] Camelo RM, Kehdy FS, Salas CE, et al. Amifostine protection against mitomycin-induced chromosomal breakage in fanconi anaemia lymphocytes [J]. *Molecules*, 2008, 13(8): 1759.
- [3] Müller AC, Pigorsch S, Beyer C, et al. Radioprotective effects of amifostine in vitro and in vivo measured with the comet assay [J]. *Strahlenther Onkol*, 2004, 180(8): 517.
- [4] 曹佳, 林真, 余争平, 等. 微核实验 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 264.
- [5] 林海, 陈志龙, 董兆君, 等. 硫芥中毒犬外周血 IL-2、IL-6 含量变化和淋巴细胞 DNA 损伤 [J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(12): 1038.
- [6] Libura J, Ward M, Solecka J, et al. 222 Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in h μ m an primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential [J]. *Eur J Haematol*, 2008, 81(3): 185.
- [7] Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML, et al. Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors [J]. *Blood*, 2000, 95(5): 1588.
- [8] Kalotycho V, Rombos Y. Amifostine protects normal pluripotent peripheral blood stem cells against the toxicity of idarubicin [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(7): 123.
- [9] Kashiwakura I, Murakami M, Inanami O, et al. Effects of amifostine on the proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitor cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 437: 19.
- [10] 张红宾, 张翼军. 治疗相关性白血病的研究概况 [J]. *重庆医学*, 2004, 33(7): 1050.

(收稿日期: 2009-12-24 修回日期: 2010-01-22)