

铜紫红素 18 对小鼠红系造血作用的研究

项莺松 杨如俊 孟祥顺 高建国 李百龙 杨 平

(第二军医大学放射医学研究室 上海 200433)

摘要 为了寻找再生障碍性贫血治疗药物,从四吡咯化合物中设计合成了铜紫红素 18,观察铜紫红素 18 对受照射昆明种小鼠红系造血的作用。结果表明:铜紫红素 18 能明显促进造血干细胞 (CFU-S) 优先向红系祖细胞 (CFU-E) 转化;在恢复期也有提升 WBC 和骨髓有核细胞计数的作用。本结果提示,铜紫红素 18 作为再生障碍性贫血防治药物具有良好的发展前景,值得进一步研究。

关键词 辐射,铜紫红素 18,造血干细胞

第二军医大学 523 研究所设计合成的铜紫红素 18($P18-Cu^{2+}$) 是一种有发展前景的防治再生障碍性贫血新药,本文进一步研究其促进红系造血重建的作用,观察对受照射小鼠外周血白细胞计数、骨髓有核细胞计数、红系祖细胞及造血的变化。

1 材 料 与 方 法

1) 试剂:铜紫红素 18(自备),苯甲酸雌二醇(上海第九制药厂);小牛血清、牛血清白蛋白购自杭州四季青生物制品研究所;马血清购自军事医学科学院;EPO 购自 Sigma 公司;G-CSF(治疗用)购自日本中外制药株式会社。2) 动物:昆明种小鼠,体重 22~25g(6~8 周龄),雌雄各半,以常规条件饲养。按随机方法分组。3) 照射: ^{60}Co γ 射线源,源距动物中心点 2m,照射剂量率为 1.2 Gy/min,照射剂量为 7~8Gy。4) 分组:照射动物 G-CSF 治疗组(阳性治疗组);照射对照组;正常动物给再障新药组(正常给药组);正常对照组。5) 用药:铜紫红素 18 药用生理盐水配制成 0.2% 浓度,照后当天至第 5 天,每天腹腔注射 0.5 mL/只,共 6 次;苯甲酸雌二醇,照后当天至第 5 天,每天腹腔注射 1mg/只,共 6 次;G-CSF 用纯水配制成 1 μ g/mL,照后当天至第 5 天,每天腹腔注射 0.4mL/只,共 6 次;对照组与各实验组平行用生理盐水腹腔注射 0.5mL/只。6) 指标:照后不同时间按常规方法观察以下指标:照后 21 天小鼠存活率;外周血白细胞计数;骨髓有核细胞计数;造血干细胞测试;红系祖细胞测试^[1]。7) 统计学方法:平行实验组的 t 测验作为比较各实验组相差的显著程度。

2 实 验 结 果

2.1 铜紫红素 18 对受照小鼠白细胞计数的影响

由表 1 可见,照射前各实验组的白细胞计数值没有显著性差别。照后第 1d,阳性治疗组高于照射治疗组和对照组,且有显著性差别。照后第 3~6d,各实验组间均有显著性差别,其中阳性治

国家自然科学基金资助课题 (39600077)

收稿日期:初稿 1997-11-13,修回 1998-07-10

疗组最高,照射对照组最低,说明阳性治疗组疗效显著,而铜紫红素 18 也有疗效。阳性治疗组在第 9d 仍保持较高水平,且与对照组比较有显著性差别,第 12d 下降至与对照组相同的水平。铜紫红素 18 治疗组在第 9d 仍保持较高水平,但与对照组比较未达显著性差别,但在恢复期却恢复至正常水平。正常给药组与正常对照组比较没有显著性差别。综上所述, G-CSF 组在用药期间有明显促进粒系造血的作用,而停药后则作用消失。铜紫红素 18 在用药期间促进粒系造血的作用不如 G-CSF,但在停药后的恢复期仍有促进粒系造血的可能性。铜紫红素 18 对正常动物没有促进造血的作用。

Tab.1 The effect of copper purpurin 18 on WBC($10^3/\text{mm}^3$) of irradiated mouse ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Before irradiation	Time after irradiation/d								
		1	3	6	9	12	15	18	22	25
Irradiated and treated	11.3 ± 0.5	7.0 $\pm 0.7^{(1)}$	3.0 $\pm 0.3^{(1)}$	5.4 $\pm 0.4^{(1)}$	3.6 ± 0.3	9.0 $\pm 2.0^{(1)}$	6.9 $\pm 1.0^{(1)}$	6.0 $\pm 0.6^{(1)}$	13.3 $\pm 1.1^{(2)}$	13.1 $\pm 10.1^{(2)}$
Positive treated	10.2 ± 0.4	11.0 ± 0.7	45 ± 0.1	9.5 ± 0.5	4.2 ± 0.4	4.6 ± 0.8	5.6 ± 0.8	4.7 ± 0.9	10.6 ± 0.7	10.8 ± 1.1
Irradiated controls	10.4 ± 0.6	5.8 ± 0.4	2.2 ± 0.1	4.2 ± 0.4	2.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.6 ± 0.5	5.2 ± 0.4	9.5 ± 0.8	8.1 ± 0.9
Normal treated	9.4 ± 0.4	10.6 ± 0.5	14.3 ± 2.6	12.5 ± 1.6	8.8 ± 0.9	9.7 ± 0.6	12.3 ± 1.6	14.0 ± 1.2	12.4 ± 0.8	10.1 ± 0.8
Normal controls	9.7 ± 0.6	11.3 ± 0.7	12.5 ± 1.1	13.2 ± 1.5	10.8 ± 0.9	11.74 ± 1.9	10.9 ± 1.3	11.6 ± 0.6	14.8 ± 1.3	12.3 ± 1.3

⁽¹⁾Significant difference from positive treated, ⁽²⁾ Significant difference from positive treated, but $p > 0.05$ compared with normal controls

2.2 铜紫红素 18 对受照小鼠骨髓有核细胞计数的影响

由表 2 可见,用药后显示铜紫红素 18 对骨髓有核细胞有些抑制作用,与阳性治疗组和对照组均显著性差别;阳性治疗组在停药后 10d,对骨髓有核细胞有抑制作用,它分别低于新药治疗组和对照组,且有显著性差别。正常给药组比正常对照组在 8、16d 要高,但无显著差别,而在第 25 d 则显示给药组明显地高于对照组,提示铜紫红素 18 对骨髓造血功能可能有促进作用。

Tab.2 The effect of copper purpurin 18 on number of nucleated cell in bone marrow ($10^5/\text{onefemur}$) of irradiated mouse ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Time after irradiation/d		
	8	16	25
Irradiated and treated	24.4 $\pm$ 1.04 ⁽¹⁾	118.7 $\pm$ 3.7 ⁽¹⁾	115.7 $\pm$ 9.0 ⁽¹⁾
Positive treated	42.8 $\pm$ 5.42 ⁽²⁾	87.7 $\pm$ 3.43 ⁽²⁾	109.8 $\pm$ 2.4 ⁽²⁾
Irradiated controls	43.66 $\pm$ 3.24	150.3 $\pm$ 3.24	118.0 $\pm$ 8.4
Normal treated	183.0 $\pm$ 11.04	188.3 $\pm$ 19.37	145.3 $\pm$ 4.5
Normal controls	174.0 $\pm$ 13.44	180.7 $\pm$ 18.43	175.3 $\pm$ 5.1

⁽¹⁾ $p < 0.01$ compared with positive treated, ⁽²⁾Significant lower than normal controls

2.3 铜紫红素 18 对受照小鼠红系祖细胞的影响

由表 3 可见,3 个实验组在第 8、16d,各组间均有显著性差别,新药组为最高,第 8 天 G-CSF 组最低,第 16 天对照组最低;第 25 天新药组仍高于对照组,且有显著性差别。结果表明再障新药对受照动物有明显的促进造血干细胞往红系转化;而 G-CSF 则往粒系转化,故第 8d 最低,停

药后会自然恢复。正常用药组与正常对照组，在第 8、16 和 25d，两组间均有非常显著差别，显示再障新药对正常动物也有促进造血干细胞往红系转化作用。

Tab.3 The effect of copper purpurin 18 on CFU-E/ $\times 10^5$ MBC of irradiated mouse ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after irradiation/d		
	8	16	25
Irradiated and treated	152.2 $\pm$ 17.7 ⁽¹⁾	222.5 $\pm$ 18.3 ⁽¹⁾	231.0 $\pm$ 8.4 ⁽¹⁾
Positive treated	7.8 $\pm$ 1.5	162.5 $\pm$ 15.3	207.0 $\pm$ 6.2
Irradiated controls	8.0 $\pm$ 5.9	85.2 $\pm$ 1.4	198.5 $\pm$ 4.1
Normal treated	224.5 $\pm$ 12.3 ⁽²⁾	269.5 $\pm$ 1.4 ⁽²⁾	205.5 $\pm$ 5.6 ⁽²⁾
Normal controls	128.2 $\pm$ 15.7	164.2 $\pm$ 20.6	130.5 $\pm$ 8.1

⁽¹⁾ $p < 0.01$ compared with positive treated, ⁽²⁾Significant higher than normal controls

2.4 铜紫红素 18 对受照小鼠造血干细胞的影响

由表 4 可见，各实验组在不同时间点虽有差别，但均未见显著性差别。

Tab.4 The effect of copper purpurin 18 on CFU-S/ $\times 10^5$ MBC of irradiated mouse ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after irradiation/d	
	8	25
Irradiated and treated	18.7 $\pm$ 2.2	18.0 $\pm$ 2.7
Positive treated	20.0 $\pm$ 4.1	17.8 $\pm$ 4.8
Irradiated controls	28.8 $\pm$ 5.7	16.8 $\pm$ 2.2
Normal treated	28.8 $\pm$ 4.0	15.8 $\pm$ 4.1
Normal controls	22.5 $\pm$ 2.1	15.7 $\pm$ 2.2

3 讨 论

3.1 微量元素与造血功能

(1) 目前已知微量元素如铁、钴、铜等参与造血；而维生素 B₁₂，又称造血调节因子，与造血功能密切相关，一般认为含有钴络合的四吡咯环是其生物活性的基础^[2,3]。因此，设想某些四吡咯化合物与金属络合物能发挥四吡咯化化合物的载体作用，使之能优势进入肝脏、骨髓等造血组织中，发挥微量金属元素的调节作用，促进造血功能的恢复和对再生障碍性贫血发挥防治作用。实验以蚕沙叶绿素为原料，经酸降解反应得到脱镁叶绿酸 a 粗品，后者在碱性无氧条件下降解得到二氢卟吩单甲酯。并以蚕沙叶绿素初提物为原料，在碱性条件下，经氧降解直接得到高纯度的紫红素 18。再制得铜紫红素 18(P18-Cu²⁺)。通过 H-NMR、IR、MS(FAB) 以及 UV/Vis 谱测定确认了上述化合物的结构系四吡咯金属络合物。另一方面，目前尚无理想的再生障碍性贫血动物模型供快速药物筛选和造血分析。作者利用辐射致各系造血障碍，包括红系造血障碍，而这正是再生障碍性贫血的一个重要致病机理^[4]，这样就可以利用受照小鼠进行药物的快速筛选；但是由于红细胞寿命较长，急性辐射致贫血症状并不严重，RBC 计数下降不明显，实验中不利观察其变化。

3.2 铜紫红素 18 对外周血白细胞计数的作用

在用药期间虽低于阳性治疗组，但比对照组有升高且有统计学上的意义；停药后阳性治疗组降至对照组水平，而铜紫红素 18 组则仍维持高于对照组水平，在恢复期达到正常水平。但对正常动物没有显示升白细胞的作用。

3.3 铜紫红素 18 对受照和正常动物的骨髓有核细胞计数的作用

在用药期间照射治疗组明显地低于对照组,但药后可恢复到正常水平。对正常动物在用药期间及用药后 10d,与对照组无差别,用药后 20d 则与对照组有明显的升高,初步提示该药有促进骨髓造血功能。

3.4 铜紫红素 18 对受照射和正常小鼠的红系祖细胞的作用

在照后第 8、16 和 25d 均显著高于各自对照组(有统计学意义),显示铜紫红素 18 有促进造血干细胞向红系转化的作用。

3.5 对受照射和正常小鼠的造血干细胞的影响

实验显示各实验组与对照组均无显著性差别。说明此药无促进造血干细胞增殖作用。

总之,铜紫红素 18 优先促进造血干细胞向红系造血,在后期则可促进粒系造血,又鉴于目前为止仍无理想的抗再障药物。因此认为,铜紫红素 18 的基本骨架与人体内固有的卟啉和平常经食物入体内的二氢卟吩类化合物相似,毒性普遍较低,且可方便地假廉价资源血红素及蚕沙叶绿素通过半合成得到,故在此类化合物中发展治疗再生障碍性贫血的新药具有良好的前景。

参 考 文 献

- 1 吴祖泽主编.造血干细胞移植基础,北京:人民卫生出版社,1988.823~826
- 2 储榆林.中华血液学杂志,1994,15(4):192~194
- 3 Morgles P M. Gac Med Mex, 1992, 128(3):227~236
- 4 林果为.再生障碍性贫血.见:丁训杰,等主编.实用血液病学.上海:上海医科大学出版社,1992,28~38

STUDIES ON THE EFFECTS OF COPPER PURPURIN18 ON ERYTHROPOIESIS

XANG Yingsong YANG Rujun MENG Xiangshun GAO Jianguo LI Bailong

(Institute of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT Attempts were afforded to search for new antiaplastic anemia drugs from tetrapyrroles. Observation of the effects of copper purpurin 18, a representative one of the metal tetrapyrroles was synthesized by ours, on erythropoiesis in Kungming mice lethally irradiated. It was shown that copper purpurin18 preferably increased stem cells (CFU-S) into erythroidpregenitor cells(CFU-E), and increase WBC and nucleated cells of bone marrow significantly in the phase of recover. It suggested that there may be good prospect in developing new drugs for treatment of aplastic anemia with copper purpurin 18 ,and it was worth to further investigations.

KEYWORDS Irradiation, Copper pupurin 18, Hematopoietic