

# 去甲斑蝥素对喜树碱引起的白细胞减少症的缓解作用

金琳, 胡晓炜, 邵好珍, 罗广彬\*, 马志涛\*  
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**观察去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)能否缓解喜树碱(camptothecin, CPT)用药引起的骨髓抑制。**方法:**取 Balb/c 小鼠,采用概率单位法计算 CPT 半数致死量(median lethal dose, LD<sub>50</sub>)。以 1 mg·kg<sup>-1</sup>作为 CPT 给药剂量,使用全血分析仪检测 24 h 内不同时间点白细胞浓度变化,为后续联合用药提供检测时间点参考。随后取 Balb/c 小鼠随机分为 6 组,分别为空白组, CPT(1 mg·kg<sup>-1</sup>)组, NCTD 低、高剂量(10, 20 mg·kg<sup>-1</sup>)组, CPT(1 mg·kg<sup>-1</sup>) + NCTD(10 mg·kg<sup>-1</sup>)组和 CPT(1 mg·kg<sup>-1</sup>) + NCTD(20 mg·kg<sup>-1</sup>)组。连续灌胃 2 周,采用眼球采血法,应用全血分析仪检测进行相关指标的测定。流式细胞仪检测各组小鼠骨髓中性粒细胞的差异。病理组织切片评估肠道的毒性情况。**结果:** CPT LD<sub>50</sub>为 1 mg·kg<sup>-1</sup>。CPT 单独给药后 6 h 小鼠白细胞数目降至最少。24 h 内与 CPT 单独用药比较, CPT + NCTD 联合给药组白细胞、中性粒细胞数目明显上升( $P < 0.05$ ),嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞等无明显变化。连续灌胃 2 周,比较 CPT 单独用药, CPT + NCTD 联合给药组白细胞数目明显上升( $P < 0.05$ ),其中淋巴细胞升高显著( $P < 0.01$ ),其他细胞无明显变化。流式细胞仪检测各组小鼠骨髓中性粒细胞的无明显差异,苏木素-伊红(HE)染色显示 CPT 主要毒靶器官小肠的病理变化短期、长期均不明显。**结论:** NCTD 可减轻 CPT 用药引起的白细胞减少症,并没有增加其肠道毒性,为临床 CPT 应用,并减轻其毒性提供一定理论参考。

**[关键词]** 喜树碱; 去甲斑蝥素; 骨髓抑制; 白细胞减少症; 肠道毒性

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0061-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181619

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1533.011.html>

**[网络出版时间]** 2018-05-24 10:41

## Effect of Norcantharidin in Alleviating Camptothecin-induced Myelosuppression

JIN Lin, HU Xiao-wei, SHAO Hao-zhen, LUO Guang-bin\*, MA Zhi-tao\*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore whether norcantharidin (NCTD) could reduce camptothecin (CPT)-caused myelosuppression. **Method:** Balb/c mice were collected. Probit analysis was made to calculate CPT median lethal dose (LD<sub>50</sub>). With 1 mg·kg<sup>-1</sup> dose as CPT, whole blood analyzer was used to detect white blood cell (WBC) concentration at different time points within 24 h, so as to provide a reference for the subsequent detection time point in the subsequent combined administration. Subsequently, Balb/c mice were randomly divided into six groups: control group, CPT (1 mg·kg<sup>-1</sup>) group, low-dose NCTD (10 mg·kg<sup>-1</sup>) group, high-dose NCTD (20 mg·kg<sup>-1</sup>) group, CPT (1 mg·kg<sup>-1</sup>) + low-dose NCTD (10 mg·kg<sup>-1</sup>) group and CPT (1 mg·kg<sup>-1</sup>) + high-dose NCTD (20 mg·kg<sup>-1</sup>) group. After continuous gavage for 2 weeks, eyeball sampling method and whole blood analyzer were used to measure relevant indicators. Flow cytometry was used to detect the differences of bone marrow neutrophils in each group. Histopathological sections evaluated the intestinal toxicity. **Result:** The CPT LD<sub>50</sub> is 1 mg·kg<sup>-1</sup>. The number of white blood cells in mice was reduced to a minimum at 6 h after the single

**[收稿日期]** 20180305(015)

**[基金项目]** 北京中医药大学自主选题——特聘教授启动基金项目(1040053310002/002)

**[第一作者]** 金琳, 硕士, 从事肿瘤转化医学研究, E-mail: jinlin\_2015@163.com

**[通信作者]** \* 罗广彬, 博士, 教授, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: luol35@hotmail.com;

\* 马志涛, 博士, 助理研究员, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: mzht@buem.edu.cn

administration with CPT. Within 24 hours after the single treatment with CPT, the numbers of leukocytes and neutrophils in CPT and NCTD combined groups increased significantly ( $P < 0.05$ ), with no significant change in the number of eosinophils and basophils. After continuous gavage for 2 weeks, compared with the single treatment with CPT, the number of white blood cells in CPT and NCTD combined groups also increased significantly ( $P < 0.05$ ), and lymphocyte was significantly increased ( $P < 0.01$ ). No significant changes were observed in other cells. No significant difference in the mouse bone marrow neutrophil was detected by flow cytometry, hematoxylin-eosin (HE) staining showed no significant short-term or long-term pathological changes in intestine, the main target organ of toxicity of camptothecin. **Conclusion:** Norcantharidin can reduce the incidence of leucopenia caused by camptothecin, without increasing the intestinal toxicity. It provides a theoretical reference for the clinical application of camptothecin and its toxicity reduction.

**[Key words]** camptothecin; norcantharidin; myelosuppression; leukopenia; enteric toxicity

肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一。世界癌症研究基金会 2015 年统计,仅在 2012 年就有 78.2 万新诊断肝癌病例<sup>[1]</sup>。肝癌发现时大多已到中晚期,患者多采用化疗治疗<sup>[2]</sup>。喜树碱 (camptothecin, CPT) 是从中药喜树分离出的、靶点明确的抗癌药物单体, CPT 通过结合 I 类拓扑异构酶,引起拓扑异构酶 I (Topo I) 中毒,无法修复,最终导致处于 S 期肝癌细胞死亡<sup>[3-5]</sup>。CPT 在 DNA 复制时,阻碍 DNA 链的闭合,导致 DNA 的单链断裂 (SSB),当可切割的复合物与正在进行复制的 DNA 又相遇时,然后会继发导致双链断裂 (DSB) 的形成,当细胞中双链断裂的数量累积到一定量时,会诱导肿瘤细胞凋亡。从而发生抗肿瘤作用。同时, CPT 体内代谢及药理清楚。它能够在肠道和肝组织之间形成特殊的肝肠循环 (enterohepatic circulation) 而得到较高浓度的积累<sup>[6]</sup>。CPT 不仅口服生物利用度高,而且缺乏能被糖化的特性,所以能在肝癌细胞里特异性积累。综上, CPT 具备肝癌治疗的“高效性”潜能。但目前 CPT 临床应用存在严重副作用,易引起骨髓抑制和肠道毒性<sup>[7-13]</sup>。迟发性腹泻是 CPT 类药物的毒性反应之一,临床发生率高达 40%,且个体差异大,严重者有致患者死亡<sup>[12]</sup>。因此, CPT 用药需要进一步改良优化。

CPT 引起的骨髓抑制主要表现为外周血白细胞降低<sup>[13]</sup>。去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是斑蝥素的化学衍生物,具有抗肿瘤作用<sup>[14-18]</sup>。同时研究提示 NCTD 有升高白细胞作用<sup>[16]</sup>。NCTD 是一种很有发展前景的抗癌药物,为了使其更好的应用临床,需要进一步的研究。因此本实验尝试 CPT 和 NCTD 联合应用,评估 NCTD 是否能够缓解 CPT 引起的骨髓抑制作用,为探索 CPT 减毒增效提供思路。

## 1 材料

**1.1 动物** 正常 6 周龄 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠 218 只,体质量 ( $20 \pm 2$ ) g,由北京斯贝福实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2016-0002。小鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验室,经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号 2015BZHYYL0201),符合实验动物伦理委员会规定。

**1.2 药物、试剂与试剂盒** CPT (成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-16061312,纯度 98.82%), NCTD (瀚香生物科技有限公司,批号 L016032809,纯度 98%), 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司,批号 20140520), 40  $\mu\text{m}$  细胞滤网 (BD Falcon 公司,批号 124825), PE-ly6G (Gr-1), APC-CD11b [艾博抗 (上海) 贸易有限公司,批号分别为 E01925-1632, E07073-1635]。

称取羧甲基纤维素钠 5 g 溶于双蒸水 1 L,加热溶解制成 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,冷却备用。CPT 20 mg 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 5 mL 中,超声 100 MHz, 20 min 至药物完全混匀,制成  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  混悬液, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。称取 NCTD 100 mg,将其溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 10 mL,制成  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  混悬液, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。4% 多聚甲醛配制,称取多聚甲醛 4 g 溶解于去离子水中,加入少许粉末后,混匀,在恒温磁力搅拌器上充分搅拌至完全溶解,定容至 100 mL,存放于密封瓶中,保存 4  $^{\circ}\text{C}$  备用。红细胞裂解液配制,取红细胞裂解液,然后用滤膜过滤除菌,保存备用。

**1.3 仪器** Centrifuge 5417R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); ASP200S 型组织脱水仪, EG1150H 型包埋仪, RM2235 型切片仪 (德国莱卡公司); XI800 型全自动血液分析仪 (日本 Sysmex 公司);

FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 半数致死量(LD<sub>50</sub>)测量** 根据预实验结果, CPT 的最小致死剂量为 2.0 mg·kg<sup>-1</sup>。由于 LD<sub>50</sub> 的精确求算会造成不必要的动物等资源浪费, 而药物研究通常没有必要求出精确 LD<sub>50</sub>, 所需要关注的是动物出现毒性与剂量间的量效关系<sup>[19]</sup>。概率单位法计算简便易行, 无需出现全部致死剂量且各剂量间无需等间隔和等量分组, 所得结果与寇氏法及线性回归法无显著性差异, 因此结果数据将根据概率单位法来计算<sup>[20]</sup>。设计实验剂量时不再重复预实验绝对致死量(LD<sub>100</sub>)的给药剂量, 为此设 CPT 5 个给药剂量(1.8, 1.4, 1.2, 0.8, 0.6 mg·kg<sup>-1</sup>)组, 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成 5 组, 每组 10 只。同时设正常组, 小鼠每隔 24 h 灌胃给药 1 次, 连续给药 2 周。给药期间观察并记录小鼠生存情况。给药结束后, 按照概率单位法, 将给药剂量及死亡率对应变化成对数剂量和概率单位, 计算得该药的 LD<sub>50</sub> 及置信区间。

**2.2 CPT 给药后小鼠白细胞数目检测** 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成 9 组, 每组 8 只。以 CPT LD<sub>50</sub> 1 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃给药, 给药 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 h 后, 小鼠摘眼球取血约 500 μL, 混匀, 用全自动血细胞分析仪检测白细胞情况。

**2.3 NCTD 与 CPT 联合用药小鼠外周血白细胞检测** 36 只小鼠, 随机分为空白组, CPT 1 mg·kg<sup>-1</sup> 组, NCTD 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组, NCTD 20 mg·kg<sup>-1</sup> 组以及 CPT 1 mg·kg<sup>-1</sup> + NCTD 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组和 CPT 1 mg·kg<sup>-1</sup> + NCTD 20 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 每组 6 只, 适应性饲养 1 周。NCTD LD<sub>50</sub> 为 20 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[21]</sup>。检测白细胞变化。

**2.4 采血方法及血常规测定** 实验前 12 h 禁食, 禁水 1 h, 眼球采血 500 μL, 采用全自动血细胞分析仪检测各项血常规标。

**2.5 小鼠骨髓细胞的提取与检测** 小鼠常规处死后, 取其双侧股骨, 用无菌纱布剥除黏附肌肉组织, 眼科剪将股骨剪成两段。用眼科镊钳夹住骨头, 准备一个 15 mL 离心管, 将 40 μm 细胞滤网放置在离心管管口, 用 5 mL 注射器吸取磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗骨髓腔, 直至骨头变白。吹打混匀为细胞悬液, 放入 15 mL 离心管中, 以 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。以红细胞裂解液 5 mL 重悬细胞, 吹打混匀, 冰上放置 15 min, 以 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。用 PBS 缓冲液重悬, 以 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。对细胞

进行计数, 取 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞, 按照试剂盒要求加入 APC-CD11b 和 PE-Ly6G(Gr-1) 抗体, 避光常温孵育 30 min 后, 离心去上清。将细胞用流式缓冲液 500 μL 重悬, 通过细胞滤网后进行流式细胞分析。

**2.6 组织病理学检测** 取血后处死小鼠, 用 4% 中性缓冲多聚甲醛固定主要器官标本肠道 24 h, 石蜡包埋标本, 切成 3 μm, 苏木精和伊红染色。显微镜下观察组织病理学改变。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。流式细胞实验数据用 Flow Jo 软件处理。

## 3 结果

**3.1 CPT 不同给药剂量对小鼠存活的影响** 给药剂量和死亡率情况见表 1。根据概率单位法计算, 得到 CPT LD<sub>50</sub> 为 1.032 mg·kg<sup>-1</sup>, 95% 置信区间 [0.813, 1.232]。接下来的实验中以 CPT 的最大耐受给药剂量给药, 即 LD<sub>50</sub> 剂量 1 mg·kg<sup>-1</sup>。

表 1 CPT 对小鼠存活情况影响

Table 1 Effect of CPT on survival of mice

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	死亡数/只	死亡率/%
空白	-	0	0
CPT	1.8	9	90
	1.4	6	60
	1.2	5	50
	0.8	0	0
	0.6	0	0

**3.2 以 LD<sub>50</sub> 剂量 CPT 给药 24 h 对小鼠血液白细胞的影响** 与空白组比较, CPT 给药后 6 h 时白细胞总数降到最低( $P < 0.05$ )。其中, CPT 给药 6 h 后, 与空白组比较, 中性粒细胞和淋巴细胞有明显降低( $P < 0.05$ ), 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞数无显著变化。见表 2。

**3.3 NCTD 与 CPT 联合用药对小鼠外周血白细胞的影响** 本实验选择 NCTD 与 CPT 联合用药 6 h 后, 检测外周血白细胞数量变化情况, 以明确 NCTD 是否能够缓解 CPT 用药引起的骨髓抑制。同时参考本课题组前期实验结果, 以 1/2 LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> 为 NCTD 实验剂量, 分别为 10, 20 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[21]</sup>, 即为 NCTD 低、高剂量组。与空白组比较, CPT 组的白细胞、中性粒细胞有明显降低( $P < 0.05$ )。与 CPT 组

表 2 CPT 对小鼠外周血白细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of CPT on white blood cell counts ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) × 10<sup>9</sup> 个/L

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	时间 /h	白细胞	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞
空白	-	-	7.030 ± 1.162	0.223 ± 0.052	0.002 ± 0.004	0.702 ± 0.209	6.063 ± 0.981	0.035 ± 0.027
CPT	1	3	7.595 ± 0.728	0.175 ± 0.034	0.005 ± 0.005	0.698 ± 0.506	6.633 ± 0.999	0.082 ± 0.034
		6	5.570 ± 1.082 <sup>1)</sup>	0.142 ± 0.040 <sup>1)</sup>	0.003 ± 0.005	0.387 ± 0.369	5.102 ± 1.085 <sup>1)</sup>	0.027 ± 0.021
		9	8.160 ± 1.893	0.193 ± 0.060	0.002 ± 0.004	0.490 ± 0.080	7.420 ± 1.818	0.055 ± 0.048
		12	7.185 ± 0.709	0.150 ± 0.024	0.000 ± 0.000	0.468 ± 0.146	6.507 ± 0.593	0.060 ± 0.034
		15	6.082 ± 1.289	0.147 ± 0.031	0.002 ± 0.004	0.405 ± 0.105	5.502 ± 1.160	0.027 ± 0.019
		18	7.450 ± 1.502	0.228 ± 0.128	0.005 ± 0.008	0.388 ± 0.076	6.782 ± 1.344	0.047 ± 0.038
		21	6.802 ± 1.471	0.175 ± 0.066	0.022 ± 0.044	0.327 ± 0.054	6.247 ± 1.381	0.032 ± 0.019
		24	6.987 ± 0.872	0.305 ± 0.134	0.002 ± 0.004	0.485 ± 0.124	6.122 ± 0.851	0.073 ± 0.034

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

比较, NCTD 低、高剂量组白细胞数目显著升高 ( $P < 0.01$ )。与 CPT 组比较, CPT 与 NCTD 低、高剂量联合用药组升高白细胞效果明显 ( $P < 0.05$ ), 中性粒细胞明显升高 ( $P < 0.05$ ), 其他细胞无显著变化。见表 3。

3.4 NCTD 与 CPT 联合用药对小鼠外周血白细胞的影响 与空白组比较, CPT 单独用药组白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数目降低 ( $P < 0.05$ )。与 CPT 组比较, NCTD 低、高剂量组以及联合用药组白细胞、淋巴细胞均显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 3 CPT 与 NCTD 灌胃 6 h 对小鼠外周血白细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of CPT and NCTD on white blood cell counts in peripheral blood of mice by gavage for 6 h ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) × 10<sup>9</sup> 个/L

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	白细胞	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞
空白	0	6.89 ± 1.45	0.223 ± 0.052	0.002 ± 0.004	0.702 ± 0.209	6.063 ± 0.981	0.035 ± 0.027
CPT	1	5.68 ± 1.12 <sup>1)</sup>	0.142 ± 0.040 <sup>1)</sup>	0.003 ± 0.002	0.387 ± 0.369	5.102 ± 1.085	0.027 ± 0.021
NCTD	10	8.19 ± 1.05 <sup>3)</sup>	0.162 ± 0.074 <sup>2)</sup>	0.001 ± 0.002	0.387 ± 0.369	7.490 ± 0.968	0.058 ± 0.057
	20	8.20 ± 1.06 <sup>3)</sup>	0.188 ± 0.132 <sup>2)</sup>	0.002 ± 0.004	0.490 ± 0.080	7.087 ± 1.507	0.367 ± 0.674
CPT + NCTD	1 + 10	7.87 ± 1.60 <sup>2)</sup>	0.210 ± 0.032 <sup>2)</sup>	0.002 ± 0.001	0.593 ± 0.332	7.502 ± 1.244	0.117 ± 0.087
	1 + 20	7.86 ± 1.16 <sup>2)</sup>	0.225 ± 0.075 <sup>2)</sup>	0.003 ± 0.001	0.787 ± 0.545	6.878 ± 1.338	0.073 ± 0.047

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 CPT 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

表 4 CPT 与 NCTD 不同药物灌胃 2 周对小鼠外周血白细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of CPT and NCTD on white blood cell count in peripheral blood of mice for 2 weeks ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) × 10<sup>9</sup> 个/L

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	白细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞总和
空白	-	3.965 ± 0.345	0.638 ± 0.165	3.008 ± 0.236	0.320 ± 0.138
CPT	1	2.654 ± 0.362 <sup>1)</sup>	0.363 ± 0.056 <sup>1)</sup>	1.878 ± 0.348 <sup>1)</sup>	0.413 ± 0.113
NCTD	10	4.583 ± 0.500 <sup>3)</sup>	0.213 ± 0.090	4.030 ± 0.419 <sup>3)</sup>	0.340 ± 0.050
	20	5.685 ± 0.407 <sup>3)</sup>	0.310 ± 0.034	4.940 ± 0.519 <sup>3)</sup>	0.435 ± 0.149
CPT + NCTD	1 + 10	5.313 ± 0.492 <sup>3)</sup>	0.225 ± 0.123	4.580 ± 0.543 <sup>3)</sup>	0.580 ± 0.041
	1 + 20	5.610 ± 1.223 <sup>3)</sup>	0.220 ± 0.103	4.784 ± 1.124 <sup>3)</sup>	0.495 ± 0.105

3.5 NCTD 与 CPT 联合作用对骨髓中性粒细胞的影响 由以上结果得知, NCTD 能够缓解 CPT 用药引起的外周血白细胞降低。其中, 中性粒细胞和淋巴细胞有显著升高, 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞数无显著变化。中性粒细胞来源于骨髓,

因此, 可以通过流式细胞技术追溯其来源, 检测 NCTD 是否通过促进骨髓中性粒细胞生成而增加血液中性粒细胞数目。CD11b + Ly6G + 可以作为外周血与骨髓内成熟中性粒细胞表面的特异性标记<sup>[22]</sup>。小鼠骨髓中性粒细胞流式分析显示各个组中性粒

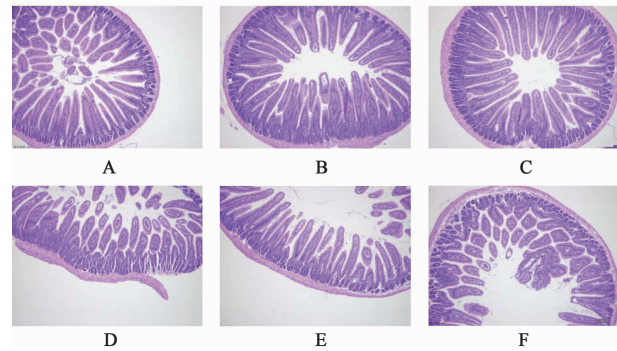
细胞比例无明显差异,见表 5。

表 5 CPT 与 NCTD 对小鼠骨髓中性粒细胞 CD11b + Ly6G + 群比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of CPT and NCTD on mice bone marrow neutrophil CD11b + Ly6G + group ratio ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	中性粒细胞比例/%
空白	-	27.040 ± 3.019
CPT	1	24.000 ± 7.202
NCTD	10	27.500 ± 8.269
	20	23.480 ± 4.703
CPT + NCTD	1 + 10	23.850 ± 2.840
	1 + 20	26.250 ± 4.512

3.6 NCTD 联合 CPT 用药后对小鼠肠病理变化的影响 CPT 副作用主要表现在骨髓抑制和肠道毒性。药物处理 6 h, 14 d 后, 各组小肠黏膜上皮绒毛结构清晰, 绒毛充盈无缺损, 且未见炎性细胞浸润。见图 1, 2。



A. 空白组; B. CPT (1 mg·kg<sup>-1</sup>) 组; C. NCTD (10 mg·kg<sup>-1</sup>) 组; D. NCTD (20 mg·kg<sup>-1</sup>) 组; E. CPT + NCTD (1 mg·kg<sup>-1</sup> + 10 mg·kg<sup>-1</sup>) 组; F. CPT + NCTD (1 mg·kg<sup>-1</sup> + 10 mg·kg<sup>-1</sup>) 组 (图 2 同)

图 1 CPT 与 NCTD 灌胃 6 h 对小鼠肠道的影响 (HE, ×100)

Fig.1 Effect of CPT and NCTD on intestinal tract of mice by gavage for 6 h (HE, ×100)

#### 4 讨论

白细胞减少症在肿瘤化疗过程中是最为常见的一种副作用, 其主要发病机制是由于抗肿瘤药物缺乏特异性, 不仅杀伤肿瘤细胞, 同时也对正常细胞尤其是增殖旺盛的骨髓造血细胞造成一定程度的损伤, 从而导致血液中白细胞下降<sup>[23]</sup>。临床常因白细胞减少而引发患者的不良反应, 甚至引起继发感染, 从而影响化疗顺利进行, 导致临床疗效降低, 影响患者生存质量。因此, 预防和减轻化疗后骨髓抑制, 促进骨髓造血功能恢复, 升高外周血白细胞, 已成为保证化疗顺利完成、提高临床疗效的关键。

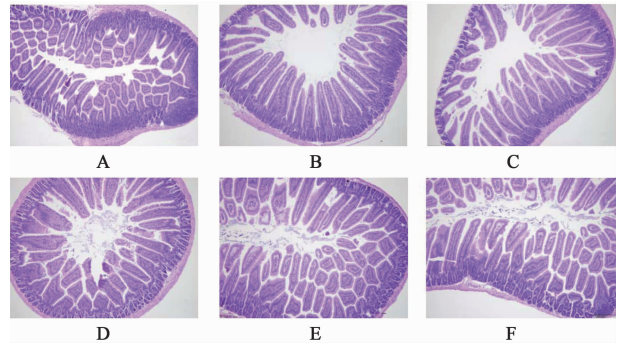


图 2 CPT 与 NCTD 灌胃 2 周对小鼠肠道病理的影响 (HE, ×100)  
Fig.2 Effect of CPT and NCTD on intestinal pathology of mice by gavage for 2 weeks (HE, ×100)

化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时, 一定程度上对机体正常分生细胞产生杀伤作用, 产生毒副作用, 如 CPT 用药引起骨髓抑制, 白细胞下降<sup>[24]</sup>。所以外周血白细胞的变化是评价化疗药物毒副作用的一个重要的指标。CPT 类药物因为其显著的抗肿瘤活性在临床上广泛用于多种癌症的治疗。然而, 其毒副作用也是不可忽视。本实验通过检测 CPT, NCTD 单独或者联合用药后白细胞数量变化情况, 来研究 NCTD 联合 CPT 用药能否缓解 CPT 单独用药引起的骨髓抑制, 从而为 CPT 抗肿瘤减毒增效、提高机体免疫力提供理论基础。实验研究了 CPT LD<sub>50</sub> 剂量 CPT 一次给药后, 血液中白细胞的变化情况。结果显示, LD<sub>50</sub> 剂量 CPT 一次给药 6 h 后白细胞数目降至最低, 其中主要以中性粒细胞和淋巴细胞降低最为显著。随后, 血液白细胞有所回升, 推测可能由于本实验室单次给药难以对血液白细胞造成长期性影响。后续研究以 6 h 为结点, 研究 NCTD 与 CPT 联合给药对血液白细胞影响, 结果显示低剂量 NCTD (1/2 LD<sub>50</sub>) 联合 CPT (LD<sub>50</sub>) 给药组外周血白细胞明显比 CPT 单独用药高, 与 CPT 单独用药组比较差异显著, 且高于空白组。同时发现, 联合给药组主要促进中性粒细胞与淋巴细胞细胞数目升高。因此, NCTD 可以促进小鼠血液中中性粒细胞和淋巴细胞数目增多。同时 NCTD 与 CPT 联合给药 2 周, 能够显著改善 CPT 单独给药引起的白细胞减少的情况。有研究发现, NCTD 能促进小鼠骨髓造血干细胞的增殖, 产生相关细胞因子, 增加白细胞从骨髓释放入血液中循环<sup>[25]</sup>。因此, 本研究进一步追溯, NCTD 与 CPT 联合给药是否通过增加骨髓细胞中性粒细胞数目, 增加血液中性粒细胞来源。流式细胞技术对小鼠骨髓中性粒细胞进行检测结果表明, 与空白组比较, NCTD 与 CPT 联合给药小鼠骨髓中性

粒细胞没有显著变化,即 NCTD 与 CPT 联合给药没有增加血液中中性粒细胞的来源。推测 CPT 与 NCTD 有可能通过增加血液中中性粒细胞的寿命,减少凋亡而使得血液中中性粒细胞数目有所回升,其机制有待后续进一步研究。

CPT 毒性还表现在肠道毒性。本实验通过 HE 染色反应肠道短期与长期的病理变化情况,结果显示,给药 6 h 无病理变化,同时 NCTD 与 CPT 联合给药没有对小鼠肠道有额外的损伤。给药 2 周,NCTD 与 CPT 联合给药没有对小鼠肠道造成损伤,两药联用不会进一步增加 CPT 对肠道的毒副作用,同时 CPT 单独给药无显著病理变化,可能原因是 LD<sub>50</sub> 给药剂量偏低,后续研究可以尝试适当加大 CPT 用量,进一步检测 CPT 和 NCTD 联用对小鼠小肠结构影响。综上,CPT 与 NCTD 联用可提高血液白细胞水平,降低对血液方面的毒副作用,且不会增加 CPT 用药在肠道方面的毒副作用,对于临床上更好的发挥 CPT 类药物的抗肿瘤作用具有重要意义,也可推动 CPT 类药物的进一步研究与开发。

[参考文献]

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 65 (2): 87-108.

[2] 黄庆英,肖静. 肝癌病人介入治疗术的护理[J]. *家庭护士*, 2006, 4(2): 27-28.

[3] Pommier Y, Leo E, ZHANG H, et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs [J]. *Chem Biol*, 2010, 17 (5): 421-433.

[4] 宋云龙,张万年,季海涛,等. DNA 拓扑异构酶 I 结构、功能及喜树碱类抗癌药物研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(9): 6-10.

[5] Oguma T. Antitumor drugs possessing topoisomerase I inhibition: applicable separation methods [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2002, 764 (1/2): 49-58.

[6] 杨玉焕,邵长敏,骆沙曼,等. 10-羟基喜树碱缓释微胶囊的组织分布学研究[J]. *中成药*, 2013, 35 (8): 1644-1648.

[7] Ikegami T, HA L, Arimori K, et al. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (1): 179-187.

[8] 文柳静. 10-羟基喜树碱经 2 种途径给药后在大鼠动、静脉血浆中的分布[J]. *中国药房*, 2013, 24 (13): 1174-1176.

[9] 陈军,方芸,张海霞,等. 雾化吸入羟基喜树碱在兔体内的组织分布[J]. *药理学报*, 2004, 39(9): 747-751.

[10] 王蓉,胡巍,吴松,等. 静脉注射不同内酯型比例的羟基喜树碱后原形药物经小鼠尿液和粪便排泄的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35 (7): 593-596.

[11] 梁斌. 羟基喜树碱抑制肝癌介入栓塞后缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达及血管生成的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.

[12] LIAN Q, XU J, YAN S, et al. Chemotherapy-induced intestinal inflammatory responses are mediated by exosome secretion of double-strand DNA via AIM2 inflammasome activation [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (6): 784-800.

[13] 于睿鹏,范潇婷,童宏选,等. 喜树碱对小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 表达及细胞凋亡影响的研究[J]. *江苏中医药*, 2017, 49(6): 80-82.

[14] 刘亚楠. 中药斑蝥研究进展[J]. *中药与临床*, 2013, 4 (4): 50-52.

[15] 李晓飞,陈祥盛,王雪梅. 贵州含斑蝥素昆虫资源调查及斑蝥素含量的测定[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46 (2): 300-302.

[16] 周长华,张青,欧瑞明,等. 急性髓系白血病应用 G-CSF 后对中性粒细胞碱性磷酸酶活性的影响[J]. *现代医院*, 2013, 13(3): 13-14.

[17] 王绮如,汪保和,夏晖. 粒-巨噬细胞集落刺激因子对小鼠骨髓内皮细胞增殖的刺激作用[J]. *中华血液学杂志*, 1998, 19(6): 41-42.

[18] 李先茜,李晓丽,吴嘉熙,等. 去甲斑蝥素诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10 (9): 1145-1146.

[19] 顾兵,张政,李玉萍,等. 半数致死量及其计算方法概述[J]. *中国职业医学*, 2009, 36(6): 507-508, 511.

[20] 李翠萍,吴民耀,王宏元. 3 种半数致死浓度计算方法之比较[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(9): 89-92.

[21] 范潇婷,于睿鹏,董瑞娟,等. 斑蝥素及去甲斑蝥素对小鼠毒性靶器官的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15): 118-123.

[22] Fischer M A, Davies M L, Reider I E, et al. CD11b (+), Ly6G (+) cells produce type I interferon and exhibit tissue protective properties following peripheral virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(11): e1002374.

[23] Othmani S, M'Saddek F, Zidi B, et al. Bicytopenia (leukopenia and thrombopenia) induced by cimetidine. A propos of a new case [J]. *Therapie*, 1992, 47 (1): 81-82.

[24] 李静,任小沧. 香菇多糖联合化疗治疗肺癌的疗效及免疫功能影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23 (S1): 98-99.

[25] 戴书静,王继峰,莫日根,等. 去甲斑蝥素增强 Bel 7402 中 I $\kappa$ B $\alpha$  表达和抑制细胞增殖的研究[J]. *解剖学报*, 2001, 32(2): 155-158.

[责任编辑 张丰丰]