

小分子化合物 ZL-004 升高白细胞的作用

孙海燕*, 李春刚, 肖 璘, 王国平, 刘全海

(上海医药工业研究院, 上海 200437)

关键词: 小分子化合物 ZL-004; 白细胞减少; 升高白细胞

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0797-04

Effect of ZL-004 on raising leukocyte count

SUN Hai-yan*, LI Chun-gang, XIAO Lin, WANG Guo-ping, LIU Quan-hai

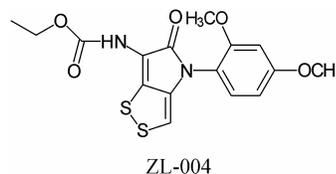
(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

Abstract: This study is to investigate the effect of ZL-004 on normal mouse and mice with leukopenia induced by chemotherapeutic agents. 5-Fluorouracil were administered intraperitoneally to mice to develop leucopenia, and the mice were treated with ZL-004. The number of peripheral leukocytes and the percentage of granulocyte in total WBC were examined. The results are that ZL-004 markedly raise peripheral blood leukocytes in the normal mice and the mice model of leukopenia. So, ZL-004 could protect mice against 5-fluorouracil damage and raise peripheral blood leukocyte. Features of bone marrow smears is myeloproliferative hyperactivity in the mice, particularly the matured granulocytic series were observed. The mechanism of ZL-004 is to act on the mouse bone marrow causing proliferation and differentiation.

Key words: small molecular chemical compound ZL-004; leucopenia; raising leukocyte count

化疗、放疗、手术治疗单独或联合是目前治疗恶性肿瘤的主要手段。放疗、化疗引起的骨髓抑制,造成外周血白细胞减少,是常见和较严重的合并症^[1]。临床上除了一般的支支持治疗,控制感染,必要时输注粒细胞外,最主要的是应用重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF, 如赛格力)和重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF, 如特尔立),缩短白细胞低下维持的时间,促使白细胞尽快恢复,使化疗或放疗顺利按计划进行^[2, 3]。但是 G-CSF 和 GM-CSF 属于蛋白多肽类药物,其储藏、运输不便,容易失活而影响疗效,价格也较为昂贵,目前尚未有疗效明确的小分子化合物应用于临床。因此积极研制具有防治骨髓抑制,促进白细胞升高,疗效确切的小分子化合物,是非常必要的。由上海医药工业研究院化学部自行合

成的系列二硫杂环并吡咯酮类小分子化合物中,发现 ZL-004 具有升高外周血白细胞的作用,已申请发明专利^[4]。曾有文献报道二硫杂环并吡咯酮类化合物具有抗微生物的活性和抗癌活性^[5, 6],国内外尚无升高外周血白细胞活性的报道。作者对 ZL-004 升高外周血白细胞,改善细胞毒类化疗药物所导致的白细胞减少,以及是否促进骨髓粒系细胞的成熟分化进行了研究。



材料与方法

实验动物及试剂 雄性 BALB/c 小鼠, 体重 18~20 g; 昆明种小鼠, 雌雄各半, 18~20 g (由中国科学院上海实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (沪):

收稿日期: 2009-12-28.

*通讯作者 Tel: 86-21-55514600-332, Fax: 86-21-65179533,

E-mail: sunny701219@yahoo.com.cn

2007-0005)。动物架笼饲养, 动物房保持安静通风, 室温 20~25 °C, 湿度 50%~60%, 光暗周期 (12 h/12 h)。实验动物使用许可证号: SYXK(沪): 2007-0015。给予标准小鼠饲料, 所用饲料为中国科学院上海实验动物中心提供, 饮水为高压灭菌自来水。

原药 ZL-004 由本院王国平教授课题组合成, 为棕黄色粉末, 纯度 >96% (批号: 20060323)。配制时用 Tween 80 (用量小于总液体量的 4%) 研磨后, 使用 0.5% CMC-Na 稀释至所需浓度。注射用 5-氟尿嘧啶 (5-FU), 由江苏恒瑞制药有限公司提供 (批号: 061125)。赛格力 (重组人粒细胞集落刺激因子注射液), 上海三维生物技术有限公司生产 (批号: 051001)。

实验分组

正常小鼠 取 BALB/c 小鼠 50 只, 随机分成 5 组 ($n=10$), 分别为空白对照组、阳性对照组、ZL-004 (20、10 和 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组。阳性对照组给予 rhG-CSF (22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 皮下注射, 每天 1 次, 连续给药 7 d; ZL-004 各组灌胃给药 (1 次/d, 0.5 mL/只), 连续给药 7 d。空白对照组小鼠灌胃等体积 0.5% CMC-Na 溶液。

5-FU 诱导白细胞减少模型小鼠 取 BALB/c 小鼠 60 只, 随机分为 6 组 ($n=10$), 分别为空白对照组、阳性对照组、ZL-004 (20、10 和 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组、5-FU 模型组。空白对照组未做任何处理, 其他组均给予 5-FU 腹腔注射 (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 1 次, 于第 4 天用动物血液分析仪测定各组小鼠的白细胞总数, 结果均低于空白对照组 ($P<0.01$), 说明 5-FU 诱导小鼠白细胞减少模型建立成功。阳性对照组在第 4 天开始给予赛格力 (22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 皮下注射, 每天 1 次, 连续给药 7 d。ZL-004 各组从第 4 天开始每天灌胃给药 1 次 (0.5 mL), 连续给药 7 d。5-FU 模型组和空白对照组小鼠于第 4 天开始灌胃等体积 0.5% CMC-Na 溶液。

观测指标

外周血的白细胞计数及骨髓涂片 分别于给药前和给药后的第 3、5、7 天, 各“正常小鼠”实验组按常规方法小鼠眼眶静脉取血 (取血量约 50 μL), 用 EDTA- K_2 抗凝, 动物血液分析仪 (日本 DREW 公司, 型号: HEMAVET950; 仪器分析所需血量 20 μL) 进行常规血液学分析, 包括红细胞、白细胞、血小板计数以及白细胞的分类等, 分析 ZL-004 对正常小鼠外周血细胞的影响。于第 7 天麻醉后, 颈椎脱臼每组处死 3 只小鼠, 分离股骨后用微量胎牛血清冲出骨髓进行骨髓涂片, HE 染色显微镜下观察。每组剩余 7 只小鼠于停药 2 d 后, 即第 10 天眼眶静脉取血, 进行血液学分析。

分别于第 0、4、6、8、11 天, 对“5-FU 诱导白细胞减少模型小鼠”实验组按常规方法小鼠眼眶静脉取血, 动物血液分析仪检测外周血白细胞总数以及嗜中性粒细胞占白细胞总数的百分比, 分析 ZL-004 对 5-FU 诱导白细胞减少模型小鼠外周血白细胞的影响情况。

急性毒性试验 取昆明种小鼠 100 只, 参照《化学药物急性毒性试验技术指导原则》(编号: [H]GPT1-1) 进行试验。给药体积: 一次性灌胃给与 0.5 mL。给药剂量: 预试选定雌雄动物的剂量均在 252~460 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药后观察动物反应, 并于给药后 14 d 内每天记录动物死亡数。采用卫生部新药统计程序中的 bliss 法, 计算出小鼠灌胃给药的 LD_{50} 值。

统计学分析 使用 SPSS 12.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

结果

1 ZL-004 对正常小鼠外周血的白细胞计数及骨髓涂片的影响

与给药前以及与空白对照组比较, ZL-004 (20 和 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组的外周血白细胞总数均明显增高 ($P<0.01$), 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组未见明显的外周血白细胞升高现象 (表 1)。ZL-004 (20 和 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组的嗜中性粒细胞占白细胞总数的百分比与空白对照组比较明显增加 ($P<0.01$)。白细胞分类结果发现, 白细胞总数升高主要是由于嗜中性粒细胞数量的增加, 淋巴细胞、单核细胞数未见明显变化, 对红细胞及血小板数未见明显影响 (文中未列出数据)。停药 2 d 后发现, ZL-004 各组以及阳性对照组的白细胞总数及嗜中性粒细胞百分比均明显下降, 且恢复至正常范围 ($4\sim 12\times 10^3\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。

骨髓涂片结果 (图 1) 显示: 阳性对照组和 ZL-004 (20 和 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组均增生极度活跃, 主要是粒细胞的增殖分化增加; ZL-004 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组较空白对照组骨髓增生活跃。粒红比值: 阳性对照组 2.666 : 1, ZL-004 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 3.524 : 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 2.721 : 1, 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 1.862 : 1, 空白对照组 1.384 : 1。

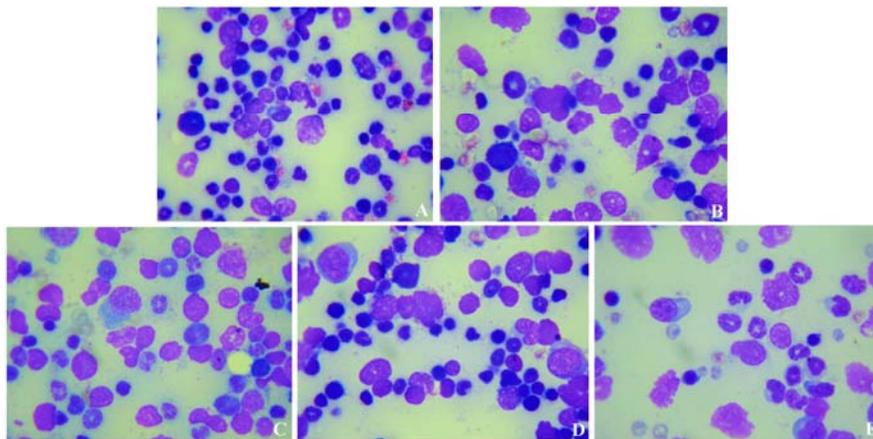
2 ZL-004 对 5-FU 诱导白细胞减少模型小鼠外周血白细胞的影响

ZL-004 (20 和 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组明显升高 5-FU 诱导白细胞减少模型小鼠的外周血白细胞总数, 主要是

Table 1 Effect of ZL-004 on WBC count of normal mice peripheral blood and percentage of neutrophil (NE) of total WBC (WBC unit: $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Group	d 0		d 3		d 5		d 7		d 10	
	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%
G-CSF (22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) sc $\times 7$ d	7.4 \pm 0.7	29.7 \pm 7.2	19.6 \pm 1.8**	52.9 \pm 4.3*	17.5 \pm 1.1**	60.7 \pm 5.4**	21.5 \pm 1.7**	65.9 \pm 6.2**	7.9 \pm 0.8	36.3 \pm 2.6
ZL-004 (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	7.8 \pm 0.7	34.2 \pm 5.6	19.5 \pm 1.6**	76.8 \pm 8.9**	28.3 \pm 1.7**	88.5 \pm 10.2**	26.2 \pm 1.8**	86.1 \pm 9.6**	11.4 \pm 1.1*	52.0 \pm 4.7*
ZL-004 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	8.2 \pm 0.7	30.3 \pm 6.4	14.3 \pm 1.6**	62.0 \pm 7.8**	15.6 \pm 1.4**	66.4 \pm 10.6**	18.8 \pm 1.2**	65.8 \pm 7.7**	9.3 \pm 1.0	44.7 \pm 3.9
ZL-004 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	8.5 \pm 0.6	28.9 \pm 5.1	9.5 \pm 0.9	35.1 \pm 5.6	9.8 \pm 1.1	38.0 \pm 6.7	9.2 \pm 1.0	41.4 \pm 8.4	7.1 \pm 0.6	28.9 \pm 3.7
Control	7.4 \pm 0.6	30.4 \pm 7.9	8.4 \pm 0.6	32.1 \pm 6.7	7.9 \pm 0.7	29.9 \pm 8.1	7.2 \pm 0.7	31.3 \pm 5.8	7.5 \pm 0.6	34.1 \pm 6.0

$n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

**Figure 1** Effect of ZL-004 on bone marrow smear of mice (HE, $\times 200$). A: ZL-004 (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig); B: ZL-004 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig); C: ZL-004 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig); D: G-CSF (22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, sc); E: Control**Table 2** Effect of ZL-004 on WBC count of 5-FU model mice peripheral blood and percentage of neutrophil (NE) of total WBC (WBC unit: $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Group	d 0		d 4		d 6		d 8		d 11	
	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%	WBC	NE/%
5-FU model (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip)	7.6 \pm 0.3	26.6 \pm 2.3	3.0 \pm 0.2	6.8 \pm 1.0	0.4 \pm 0.1	2.6 \pm 1.0	4.2 \pm 0.6	0.6 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	12.6 \pm 1.8
G-CSF (22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) sc $\times 7$ d	7.5 \pm 0.5	27.4 \pm 2.9	3.0 \pm 0.3	6.2 \pm 0.9	4.3 \pm 0.4	9.6 \pm 1.3	10.8 \pm 1.9*	30.2 \pm 4.0**	22.1 \pm 4.2**	82.5 \pm 9.2**
ZL-004 (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	7.2 \pm 0.6	30.4 \pm 3.4	2.8 \pm 0.2	7.5 \pm 0.9	4.4 \pm 0.3	10.8 \pm 2.4*	10.5 \pm 2.7*	28.9 \pm 4.8**	18.4 \pm 2.1**	86.7 \pm 10.7**
ZL-004 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	6.9 \pm 0.5	29.8 \pm 3.0	3.1 \pm 0.1	5.9 \pm 0.5	3.7 \pm 0.4	7.4 \pm 1.9*	9.6 \pm 1.9*	30.3 \pm 3.7**	14.6 \pm 2.0**	47.2 \pm 6.7**
ZL-004 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig $\times 7$ d	7.0 \pm 0.4	24.8 \pm 2.2	2.7 \pm 0.1	7.2 \pm 0.8	1.6 \pm 0.2	2.2 \pm 1.9	5.3 \pm 1.2	1.1 \pm 0.3	8.6 \pm 1.1	16.4 \pm 3.0
Control	6.8 \pm 0.3	30.5 \pm 4.3	6.9 \pm 1.1*	29.9 \pm 2.9*	7.8 \pm 0.7**	30.4 \pm 4.2**	7.7 \pm 1.0*	26.7 \pm 3.3**	6.9 \pm 0.9	30.1 \pm 6.5*

$n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 5-FU model group

嗜中性粒细胞百分比相应增加 ($P < 0.01$); 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组未见明显的升高现象, 而且在第 11 天时已经恢复正常 (表 2)。因此 ZL-004 能改善细胞周期特异性化疗药物引起白细胞下降的最低点, 尽快恢复外

周血白细胞至正常, 对受损伤骨髓有修复和保护作用。

3 急性毒性试验结果

昆明种小鼠灌胃给药后的 LD_{50} 值为 356 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

讨论

骨髓抑制是癌症患者化疗或放疗后最常见的不良反应,是主要的剂量限制性毒性反应;粒细胞平均生存时间最短,约为6~8 h,因此骨髓抑制常最先表现为粒细胞下降,从而造成白细胞总数的减少,重度白细胞减少症可导致严重感染的发生,甚至死亡^[7]。临床上,使用造血细胞集落刺激因子(colony stimulating factors, CSFs)可以通过作用于造血干细胞,促进其分化、增殖和成熟,并增加其功能,从而达到升高白细胞的作用,控制感染,保证化疗顺利进行。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是调节骨髓中粒系造血的主要细胞因子之一,选择性作用于粒系造血祖细胞,促进其增殖、分化,并可增加粒系终末分化细胞的功能。本研究证实了,小分子化合物 ZL-004 能有效升高正常小鼠以及细胞毒类化疗药物诱导白细胞减少模型小鼠的外周血白细胞数,主要是嗜中性粒细胞百分比相应增加,从而促进造血功能的恢复,并有一定的剂量依赖性,对红细胞数和血小板数未见明显影响。骨髓涂片结果显示,给药组小鼠骨髓增生活跃,主要是粒系增殖、分化成熟,由骨髓释放至外周血液,发挥升高外周血白细胞功效。ZL-004 (20 和 10 mg·kg⁻¹) 组能升高正常小鼠白细胞和纠正用化疗药后白细胞减少,而且数量超过正常对照组;但是停药后观察白细胞数发现,与临床使用赛格力一样,虽然数量超过正常对照组,停药后能恢复至正常范围,其作用与重组粒细胞集落刺激因子类似。本研究也使用了细胞毒类细胞周期非特异性化疗药物 CTX 诱导小鼠白细胞减少,然后给予 ZL-004 进行治疗,得到了

同样的结果(文中未列出数据)。药物对于造血系统的作用也是多环节、多途径的,ZL-004 的作用机制尚需进一步探索。ZL-004 能改善细胞毒类化疗药物引起的白细胞下降,且其小鼠灌胃的 LD₅₀ 值为 356 mg·kg⁻¹,最低有效剂量是 10 mg·kg⁻¹,初步认为是较为安全的,有望为癌症患者带来福音,因此具有广阔的开发和应用前景。

References

- [1] Gao J. Discussion about factors of the leukopenia [J]. Chin Gen Pract (中国全科医学), 2004, 7: 1170-1171.
- [2] Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A. Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions [J]. Pediatr Res, 2000, 48: 369-373.
- [3] Straka C, Oduncu F, Hinke A, et al. Responsiveness to G-CSF before leukopenia predicts defense to infection in high-dose chemotherapy recipients [J]. Blood, 2004, 104: 1989-1994.
- [4] Wang GP, Liu QH, Sun HY, et al. Dithiopyrrolones compounds and preparation method and application: CN, 200710045600.X [P]. 2009-03-11.
- [5] Li J, Chen G, Webster JM, et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiot [J]. Nat Prod, 1995, 58: 1081-1086.
- [6] Chen GH, Li B, Li JX, et al. Therapeutic effect of dithiopyrrolones compounds: CN, 03806882.6 X [P]. 2005-07-20.
- [7] Da WM, Pei XT. Modern Hematology (现代血液学) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2003: 575-581.