

宽筋藤对辐射损伤小鼠造血功能的影响

段 伟¹, 毕良文², 李文辉³

中图分类号: R818 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)01-0138-02

【摘要】 目的 研究宽筋藤对辐射损伤小鼠造血功能的影响。方法 小鼠被分为五组: 阴性对照组、照射对照组、药物高、中、低剂量组。实验组小鼠在⁶⁰Coγ射线 6Gy照射后, 药物组被给予不同剂量药物, 其余两组给予生理盐水。分别在照射前 4小时、照后第 7、14天检测血象三次。在照后 14d处死小鼠, 观察药物对骨髓 DNA含量、骨髓有核细胞数、脾结节的影响。结果 宽筋藤照后给药, 给药组小鼠外周血红细胞、血小板、骨髓有核细胞计数及骨髓 DNA含量比照射对照组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 宽筋藤照后给药能促进放疗后骨髓造血功能的恢复, 具有一定的抗辐射作用。

【关键词】 宽筋藤; 辐射损伤; 造血功能; 防护作用

Experimental Study of the Effects of Kuan Jin Teng on Hematopoietic Function in Radiation-injured Mice DUAN Wei, BI Liang-wen, LI Wen-hui, Oncology Department of Yunnan University Affiliated Hospital, Yunnan 716000 China

【Abstract】 Objective To study the effects of Kuan Jin Teng on hematopoietic function in radiation-injured mice. Methods In this experiment, 50 mice were randomly divided into five groups of normal control, irradiation (IR), high dose, medium dose and low dose. The last three groups were given medicines after they were irradiated by ⁶⁰Coγ. The others were given physiological saline. Peripheral blood routine were measured at 4h before irradiation, the 7th and 14th after irradiation. DNA content and quantity of nucleocyte in bone marrow, CFU-s in spleen were observed at the 14th day after irradiation. Results The results showed the protective action of Kuan Jin Teng on peripheral blood routine, DNA content and quantity of nucleocyte in bone marrow of radiation-damaged mice is obvious. There was significant difference between the irradiation and experimental groups ($P < 0.05$). Conclusion Kuan Jin Teng can improve the quantities of peripheral blood routine and promote the recovery of the cells of building blood in bone marrow and it is effective in anti-irradiation.

【Key words】 Kuan Jin Teng; Radiation Damage; Hematopoietic Function; Radioprotective Effects

宽筋藤是云南藏族和纳西族地区习用的高原植物药, 分布于广东、海南、广西、云南、西藏墨脱等地。性苦、寒。具有活血化瘀、舒筋活络、祛风除湿的作用^[1]。目前尚未见到文献报道关于其在辐射防护方面的研究。本研究通过对辐射损伤小鼠造血系统的影响来观察宽筋藤的辐射防护作用, 为进一步深入研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物来源及制备 宽筋藤购自云南丽江药材公司。将宽筋藤加入 70% 乙醇 3 000ml 浸泡 24h 用乙醇回流法煮沸 30min 倾出液体, 得滤液, 重复操作二次, 合并滤液, 静置 12h 以上。取上清液回收乙醇, 浓缩成浸膏, 置于 85℃ 烘箱中烘干。得醇提物粉末。药物临用前用蒸馏水配制成相应浓度, 并经 0.45 μm 微孔滤膜除菌。

1.2 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养液 (GIBCO 公司), 高氯酸 (天津鑫源化工厂), 氯化钙 (成都金山化工试剂厂), 冰醋酸 (重庆川江化学试剂厂), 苦味酸 (广东合山化工厂), 乙二胺四乙酸二钾 (上海试剂一厂), ⁶⁰Co 远距离治疗机 (国产, GWGR0 型), 血细胞计数仪 (Sysmex 公司, KX-21N), 分光光度计 (Kyoto 公司, UV-190), 高速水平离心机 (国产, TGL-168), 电子天平 (Sartorius 公司, BP310S BP3100S), 普通光学显微镜 (Olympus 公司, CX-31), 烘箱 (国产, 2002020001)。

1.3 实验动物 健康 SPF 级昆明种小鼠 50 只, 雄性, 体重 18~22g, 6~8 周龄。由昆明医学院实验动物中心提供。

1.4 照射条件 用 ⁶⁰Coγ 射线一次性全身均匀照射, 剂量率

3.2 Gy/照射野 25 cm × 25 cm, SSD 80 cm, 照射剂量 6Gy 在云南省肿瘤医院放射治疗中心进行。

1.5 方法 小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。实验组: 给予 ⁶⁰Coγ 射线 6Gy 一次性全身照射, 照射后第 2 天, 分别给予 0.984 g/kg/d (高剂量组)、0.492 g/kg/d (中剂量组) 和 0.246 g/kg/d (低剂量组) 灌胃, 连续 14d。另设阴性对照组 (生理盐水) 及照射对照组 (⁶⁰Coγ 射线 6Gy 照射 + 生理盐水)。

1.6 观察指标

1.6.1 血象分析 于照射当天, 取小鼠尾血约 250 μl 加 EDTA-K₂ 20 μl 抗凝, 送云南省肿瘤医院检验科自动分析仪检测。分别于照射后第 7、14 天, 再各取血 1 次, 测量白细胞、红细胞、血小板值。

1.6.2 骨髓有核细胞计数 照射后 14d 脱臼处死小鼠, 置超净工作台, 解剖小鼠, 取其左侧股骨, 用 7 号针头刺穿股骨末端, 再用 10ml RPMI 1640 培养液冲洗骨髓, 至少冲洗 10 遍, 直至股骨冲为白色为止, 将冲出的骨髓液通过 4 号针头过滤待用, 取 10 μl 混匀的骨髓细胞溶液, 加入冰醋酸, 充分混合, 然后滴入计数板, 在显微镜下计数有核细胞。有核细胞数 (L) = 4 个大方格有核细胞总数 / 4 × 10⁴ × 稀释倍数。

1.6.3 骨髓 DNA 含量测定 取其右侧股骨, 剔去肌肉, 用生理盐水冲洗干净, 剪去两端骨髓, 用 7 号针头刺穿股骨末端, 用 5mmol/L 的 CaCl₂ 10 ml 冲洗骨髓, 将全部骨髓冲入离心管中, 至少冲洗 10 遍, 直至股骨冲为白色为止。4℃ 冰箱放置 30min 然后 2 500 rpm 离心 15min 弃上清液。加入 0.2mol/L 的 HClO₄ 5ml 将沉淀物充分混匀, 90℃ 加热 15min 冷却, 用滤纸过滤, 滤液用紫外分光光度计在 268 nm 处测定吸光度 A₂₆₈ 值。按下列公式计算每根股骨所含 DNA (μg): DNA (μg) = 40 × 50 × A₂₆₈。

1.6.4 脾结节计数 (CFU-S)^[2] 照射后 14d 脱臼处死小鼠, 取其脾脏, 称重后, 将脾脏放入 Bouin 液 (用苦味酸饱和和水溶

基金项目: 云南省自然科学基金项目 (编号: 2003 C0008R)

作者单位: 1 延安大学附属医院肿瘤科 陕西 延安 716000 2 南京医科大学第二附属医院放疗科; 3 云南省肿瘤医院放疗治疗中心

作者简介: 段伟 (1976~) 女, 陕西韩城人, 硕士, 从事肿瘤放化综合治疗工作。

通讯作者: 李文辉

液、37%~40%福尔马林液、冰醋酸按体积以 15:5:1混合)固定 24h取出后冲洗干净,肉眼计数脾脏表面的白点,即脾结节数。

1.7 统计学处理 统计学分析采用 SPSS 2.0 软件进行处理,所得数据均用均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法使用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 宽筋藤照后给药对小鼠血象的影响

2.1.1 对小鼠白细胞的影响 小鼠接受⁶⁰Co γ 射线 6Gy照射后,白细胞数明显降低($P<0.05$),照后给予宽筋藤组,与照射对照组相比,可促进白细胞的恢复,但无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

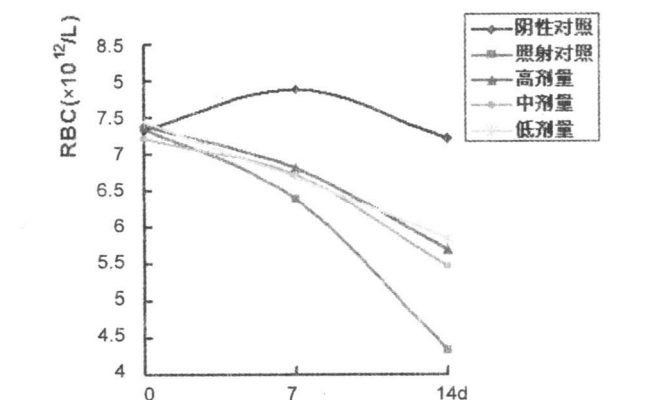
表 1 宽筋藤对辐射小鼠白细胞的影响($\times 10^9/L$)					
组别	剂量 (g/kg/d)	动物数 (只)	照射前	照射后	
				第 7 天	第 14 天
阴性对照		10	7.43±1.09	8.31±1.58	4.37±1.24
照射对照		9	6.60±0.98	0.51±0.11 ¹⁾	1.56±0.55 ¹⁾
高剂量	0.984	9	6.58±0.89	1.00±0.34 ¹⁾	1.64±0.41 ¹⁾
中剂量	0.492	10	7.30±1.24	0.87±0.23 ¹⁾	1.77±0.52 ¹⁾
低剂量	0.246	10	7.14±1.23	0.99±0.35 ¹⁾	1.86±0.50 ¹⁾

注: 1)与阴性对照组比, $P<0.05$ 。

2.1.2 对小鼠红细胞的影响 由表 2 可以看出,各照射组小鼠红细胞数明显降低,无论照后第 7、14 天,各照射组红细胞数与阴性对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);照后给药可减缓红细胞的下降,高、中、低剂量组均有较好的保护红细胞的作用,3 个给药组红细胞数与照射对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

表 2 宽筋藤对辐射小鼠红细胞的影响($\times 10^{12}/L$)					
组别	剂量 (g/kg/d)	动物数 (只)	照射前	照射后	
				第 7 天	第 14 天
阴性对照		10	7.32±0.41	7.89±0.31	7.21±1.51
照射对照		9	7.35±0.46	6.39±0.64 ¹⁾	4.32±0.88 ¹⁾
高剂量	0.984	9	7.39±0.41	6.81±0.54 ¹⁾²⁾	5.69±1.44 ¹⁾²⁾
中剂量	0.492	10	7.21±0.26	6.71±0.20 ¹⁾	5.47±0.76 ¹⁾²⁾
低剂量	0.246	10	7.44±0.44	6.67±0.35 ¹⁾	5.84±0.69 ¹⁾²⁾

注: 1)与阴性对照组比, $P<0.05$; 2)与照射对照组比, $P<0.05$ 。



2.1.3 对小鼠血小板的影响 实验结果表明:各照射组小鼠血小板数明显降低,在照后 14d 下降更明显。照后第 7、14 天各照射组小鼠血小板数与阴性对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);宽筋藤高、中、低剂量组对血小板保护作用较显著,3 个给药组血小板数,与照射对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3 图 2。

表 3 宽筋藤对辐射小鼠血小板的影响($\times 10^9/L$)

组别	剂量 (g/kg/d)	动物数 (只)	照射前	照射后	
				第 7 天	第 14 天
阴性对照		10	1036±120	1703±178	1135±278
照射对照		9	1125±126	734±229 ¹⁾	215±99 ¹⁾
高剂量	0.984	9	1155±144	1052±257 ¹⁾²⁾	713±213 ¹⁾²⁾
中剂量	0.492	10	1012±145	959±207 ¹⁾²⁾	701±269 ¹⁾²⁾
低剂量	0.246	10	1079±136	877±248 ¹⁾	724±212 ¹⁾²⁾

注: 1)与阴性对照组比, $P<0.05$; 2)与照射对照组比, $P<0.05$ 。

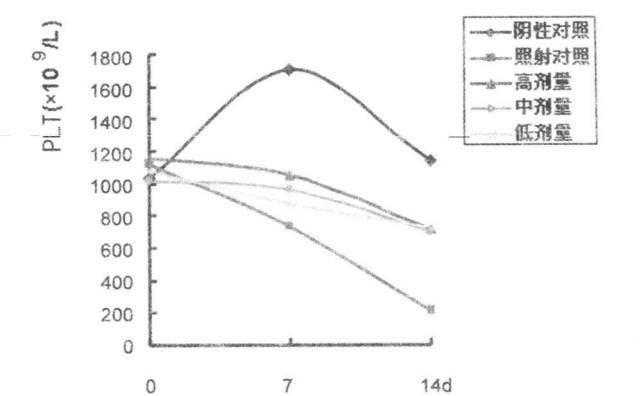


图 2 宽筋藤对辐射小鼠血小板的影响

2.2 宽筋藤照后给药对小鼠骨髓 DNA 含量、有核细胞数及脾结节的影响 从表 4 可以看出,4 个照射组小鼠骨髓 DNA 含量下降明显,与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P=0.000$),中、低剂量组与照射对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),说明宽筋藤对骨髓 DNA 有保护作用;而有核细胞计数,药物组与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明宽筋藤能促进髓外造血,保护骨髓造血功能,中剂量组与照射对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);照射后小鼠出现脾结节,宽筋藤低剂量组与照射对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。以上说明宽筋藤对造血系统的保护作用可能是通过促进造血干细胞增殖分化,保护骨髓 DNA 来实现的。

表 4 宽筋藤对辐射小鼠骨髓 DNA 含量、有核细胞数及脾结节含量的影响				
组别	动物数 (只)	DNA 含量 (μg)	有核细胞数 ($\times 10^7/L$)	脾结节 (个)
阴性对照	10	2757.2±551.5	1.33±0.34	0.0±0.0
照射对照	9	1409.6±401.76 ¹⁾	0.52±0.20 ¹⁾	6.7±4.6
高剂量	9	1725.2±381.98 ¹⁾	0.79±0.22	10.6±5.6
中剂量	10	2091.8±410.94 ¹⁾²⁾	0.94±0.28 ²⁾	11.0±4.4
低剂量	10	1921.3±426.74 ¹⁾²⁾	0.76±0.19	12.89±8.02 ²⁾

注: 1)与阴性对照组比, $P<0.05$; 2)与照射对照组比, $P<0.05$ 。

2.3 宽筋藤照射前给药对各项指标的影响 本实验在宽筋藤照后给药对辐射损伤小鼠造血功能有保护作用的基础上,进行了照前给药实验。我们期望预防用药能够减轻辐射后引起的造血系统损伤,但实验结果并不像我们所预期的那样,预防用药不仅不能保护外周血象,相反,宽筋藤照前给药组外周血象较照射对照组更低。预防用药不如治疗用药的可能原因,可能是预防用药促使照射前造血细胞增殖活跃,大量祖细胞从 G_0 期转入 G_1 期,较多的放射敏感细胞在照射时被杀伤,不利于造血的恢复有关^[5]。

3 讨论

辐射可以导致机体各系统的损伤,尤其对于更新活跃、增殖旺盛的造血系统常造成较为严重的损伤。由于造血系统受

到辐射后损伤早而重,其辐射修复能力却相对较弱,而造血系统又承担着机体适应防御、维持机体生命活动的重要功能。因此,电离辐射后常引起造血功能低下甚或衰竭,骨髓抑制,造血微环境损伤,白细胞、红细胞和血小板数明显减少,从而诱发感染、贫血、出血等并发症^[3,4]。辐射所致损伤的临床表现,从中医角度认识,应归属于中医学“虚劳”等疾病范畴。而造血功能损伤中医学认为其证候主要为精血不足、气血亏虚。因此,依据中医“虚者补之”的原则,我们所选药物宽筋藤具有“补益气血”的基本作用。本实验发现:小鼠接受⁶⁰Co γ 射线 6 Gy 全身照射后,照射组小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板明显降低。照射后给予宽筋藤,可促进辐射损伤小鼠外周血红细胞、血小板的恢复。

DNA 是生命信息的载体,是细胞中最重要的生命大分子之一,也是电离辐射的重要靶分子之一,放射生物学效应很多是通过 DNA 损伤表现出来的。DNA 不但是辐射直接作用的靶点,也是辐射所产生的自由基间接攻击的目标之一,最终引起 DNA 断裂、基因突变、染色体重组、细胞转化和细胞死亡等。其最终结果也可导致造血细胞的增殖抑制。骨髓的辐射损伤和恢复是外周血细胞数辐射后减少和回升的前提。造血组织中多能造血干细胞增殖分化的中心环节是 DNA 的合成。本实验结果显示:宽筋藤中、低剂量组骨髓 DNA 含量明显提高,中剂量组可促进骨髓有核细胞增殖。提示宽筋藤对骨髓 DNA 损伤有一定的促修复作用,骨髓有核细胞损伤的恢复可能与 DNA 损伤修复有关。

CFU-S 测试是最早、最经典的造血干细胞的测试手段^[2]。CFU-S 是动物受到低于致死量射线照射后,体内存活的小量造血干细胞在脾中增殖、分化,最后生成一定数量和大小不等的脾集落。它能代表动物经照射后体内存活的造血干细胞的

水平。造血干细胞是产生各系血细胞的最原始的细胞,它们是维系机体正常造血功能的重要保障;也是造血辐射损伤后得以重建的关键细胞。因此,脾结节计数可间接反映残存造血干细胞的增殖分化能力,提示骨髓辐射损伤的重建恢复能力。所以脾结节计数是观察抗辐射药物的可靠方法^[4]。脾结节计数有内源性脾结节法,外源性脾结节法。本实验采用内源性脾结节法。本实验结果显示:宽筋藤能增加受照小鼠 CFU-S 的数量,提示宽筋藤对外周血象的保护作用一方面可能是通过促进骨髓造血干细胞的分化、增殖而实现的。

总之,宽筋藤照后给药对辐射引起的血液系统损伤具有很好的保护作用。其作用机制可能是:宽筋藤促进骨髓细胞 DNA 的损伤修复,促进骨髓有核细胞损伤恢复,促进骨髓造血干细胞的分化、增殖,最终加快辐射后外周血象的恢复有关。宽筋藤可能是个有希望的辐射防护药物,其具体作用机理,值得作进一步研究。

参考文献:

- [1] 云南省药材公司. 云南中药资源名录 [M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [2] Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-222
- [3] 夏寿萱. 放射生物学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998
- [4] 陈家佩. 辐射血液学—基础与临床 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002
- [5] 张霞, 杨如俊. RSP-CM 对受不同剂量照射小鼠的疗效观察 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2000; 20(4): 235-238

(收稿日期: 2007-11-01)

【工作报告】

X射线检查在小肠肿瘤诊断中的意义

李锦荣, 杨忠玉

中图分类号: R816 文献标识码: D

小肠虽占胃肠道的极大部分,但因小肠的免疫防御机制比较健全,小肠肿瘤在消化道肿瘤中较为少见,仅占胃肠道肿瘤的 2%,而且检查方法有限,目前除 X 射线检查外,尚无其他更为有效、更清晰地显示病变及其部位、大小和范围的方法。笔者收集了我院 10 余年来经手术及病理证实的小肠肿瘤 21 例,进行临床及 X 射线分析,并对检查方法及漏诊原因等作进一步的探讨。现报告如下。

1 临床资料

1.1 性别与年龄 本组 21 例患者中男性 8 例,女性 13 例,女性多于男性,平均年龄 48 岁,病程 1 月~10 年,其中 31~60 岁者 15 例占 71.4%

1.2 症状与体征 本组病例症状时限长短不一,其中半年以内者占 70%。腹痛为本组小肠肿瘤的常见症状,18 例占 85.7%;多为隐痛、钝痛,并与饮食无关。腹部包块 13 例,呕吐 10 例,腹胀 8 例,不全梗阻 6 例,贫血头晕 5 例;腹泻 3 例,腹泻便秘相间 2 例;消化道出血 8 例,间断性发热 2 例,见于恶性淋巴瘤病人;黄疸 2 例。

1.3 手术和病理证实 本组病例中恶性肿瘤 17 例,其中恶性淋巴瘤 6 例占 35.3%,腺瘤 8 例占 47.1%,平滑肌肉瘤 3 例占 17.6%。良性肿瘤 4 例,其中平滑肌瘤 2 例占 50%,脂肪瘤 2 例占 50%。

2 X射线资料

2.1 肠腔狭窄 11 例,占 52.4%。由于肿瘤多沿肠壁生长,使肠壁局限性增厚,管腔变细。其主要 X 射线表现为肠管变细,呈环状狭窄,或较完整,或不规整僵直,有黏膜中断和蠕动波消失。病变可局限或广泛,单发或多发,呈分节状狭窄。狭窄段与扪及的腹部包块位置相一致,可有一定的移动度。

2.2 充盈缺损 9 例,占 42.8%。本组 4 例良性肿瘤中有 3 例小肠内有轮廓较完整的充盈缺损,小肠恶性肿瘤的充盈缺损多表现为不规则的结节状、菜花样或息肉样。表面可见不规则龛影,本组有 3 例。

2.3 管壁僵硬、黏膜破坏、环状皱襞消失 本组 17 例小肠恶性肿瘤中 11 例可见到黏膜破坏、增粗、紊乱、不规则及环状皱襞消失。小肠良性肿瘤均无管壁僵硬、黏膜破坏,仅可见到局部小肠黏膜被推移或展开,肠壁柔软,肠管扩张度好。向腔外生长为主的小肠肿瘤亦可见到附近肠管被推移的表现。

2.4 肿瘤性肠梗阻 随着肿瘤的进展可形成慢性肠梗阻。平片检查可见肠梗阻的线表现,本组有 6 例手术前 X 射线检查时表现为不全性小肠梗阻,其 2 例为良性肿瘤,4 例为恶性肿瘤。

2.5 肿瘤近侧端正常肠管出现动力性扩张和逆蠕动 此征象在小肠恶性肿瘤中较多见。本组有 3 例,均为恶性小肠肿瘤。当肿瘤侵及肌层时可使局部管壁增厚僵硬。小肠正常的有节律的蠕动波不能向前通过,而产生逆蠕动现象。狭窄段近端肠管长出现有扩张,是由于正常蠕动波受阻,当蠕动波到来时,肿瘤近侧端正常肠管内压增高使其管径增粗,形成动力性扩张,当术后肠管压力恢复正常时,其管径即可恢复正常。