论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2406-04

染料木素对小鼠辐射造血损伤保护作用的研究

周 永[1],糜漫天[1],杨镇洲[2],朱俊东[1],陈 卡[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨染料木素(genistein, GEN)对小鼠辐射损伤的防护作用。**方法** 6.0 Gy γ射线全身照射前24 h,GEN以160 mg/kg剂量给小鼠灌胃,通过对辐射后小鼠30 d存活率、外周血象、骨髓有核细胞(bone marrow nucleated cells, BMNCs)计数、内源性脾集落生成单位(endogenous colony forming unit of spleen, endoCFUs)和粒细胞-单核细胞集落生成单位(granulocyte-macrophage colony forming unit, CFU-GM)形成等观察,研究GEN对小鼠辐射损伤的防护作用,并与已烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)的防护作用相比较。**结果** 辐射前给予GEN可显著提高辐射损伤小鼠30 d生存率,endoCFUs生成数较辐射对照组提高3.47倍,BMNCs和CFU-GM生成数也明显较对照组增多,并可促进外周血中白细胞、红细胞、淋巴细胞及血小板等恢复,且GEN在提高辐射后小鼠的30 d存活率和促进BMNCs、白细胞及淋巴细胞恢复的作用强于DES。**结论** GEN具有明显的辐射防护作用,可提高照射小鼠的存活率。该作用可能与其降低骨髓造血细胞的辐射敏感性、减少射线对造血细胞的直接或间接损伤、提高残留造血细胞的增殖分化能力、促进受损造血系统恢复和重建有关。

关键词: 染料木素;辐射防护;骨髓造血系统

中图法分类号: R282.71;R551;R818.74 **文献标识码:** A

Radioprotective effect of genistein on radiation injury in mice

ZHOU Yong[1], MI Man-tian[1], YANG Zhen-zhou[2], ZHU Jun-dong[1], CHEN Ka[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Cancer Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the radioprotection of genistein against mice radiation injury. **Methods** Adult male BALB/c mice were administered orally with genistein at dose of 160 mg/kg 24 h before whole-body γ-ray irradiation. The 30-day survival rate, hemogram of peripheral blood, endogenous hematopoietic spleen colony formation (endoCFUs), and number of nucleated cells, CFU-GM in bone marrow were tested following irradiation. Meanwhile, the radioprotective effect of genistein was compared with that of diethylstilbestrol (DES). **Results** The 30-day survival rate of irradiated mice subjected to genistein was significantly increased. The endoCFUs, number of bone marrow nucleated cells and CFU-GM in bone marrow in mice pre-treated with genistein were enhanced and endoCFUs number in those mice was 3.47-fold higher than in only irradiated mice. Moreover, the recovery of leukocytes, erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes was also observed in mice pre-treated with genistein. The radioprotective effects of genistein were similar to that of DES, but stronger in enhancing survival and promoting recovery of nucleated cells, leukocytes and lymphocytes. **Conclusion** Genistein was an effective radioprotector. The protective effect of genistein may be related with regeneration of hematopoietic stem cells through not only strengthening radioresistance to reduce radiation-induced damage of hematopoietic cells directly or indirectly, but also enhancing post-irradiation repair or promoting proliferation of hematopoietic stem cells.

Key words: genistein; radioprotection; bone marrow hematopoietic system

国内外学者经过多年的研究发现雌激素类药物如已烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)不仅可提高实验动物的存活率,还可促进辐射受损的造血系统恢复;同时对临床上因肿瘤放化疗导致的造血功能抑制也有一定的疗效,但由于其毒副作用大,实际临床应用受到极大

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100046)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100046)

作者简介: 周 永(1972-),女,重庆市人,博士,讲师,主要从事营养与肿瘤、营养与免疫方面的研究。电话:(023)68752291

通讯作者: 糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期: 2006-01-08;**修回日期:** 2006-03-02

的限制。

染料木素(genistein, GEN)为大豆异黄酮的一种，其结构与雌二醇非常相似，但雌活性仅为雌二醇的 10^{-3} ~ 10^{-2}，是一种天然植物雌激素[1]。已有研究证实，GEN 具有多种生理活性，对多种肿瘤如乳腺癌、前列腺癌等以及骨质疏松症、高脂血症、心血管疾病等具有良好的防治作用，且对人体无明显的毒副作用，因此受到国内外医学工作者的广泛关注[2-5]。近年来有报道 GEN 具有抗氧化活性，辐射前 1 h 给予裸鼠可减轻紫外线导致皮肤损伤[6]。另外，GEN 还可降低射线诱导的微核形成率[7]，提高亚致死剂量电离辐射小鼠后的存活率[8]。本实验通过观察 GEN 是否具有防护放射性造血损伤的作用来探讨其辐射防护效应，并与 DES 的防护作用进行比较。

1　材料与方法

1.1　辐射与给药方式

本校实验动物中心繁殖的昆明种健康成年雄性小鼠，体质量(25 ±2)g。根据预实验结果，GEN(西安交大保赛生物技术有限公司，纯度≥99%)溶于食用色拉油，辐射前 24 h 以 160 mg/kg 剂量给小鼠灌胃。DES 在辐射前 24 h 以 5 mg/kg 剂量给小鼠腹腔皮下单次注射[9]。对照动物辐射前分别以食用色拉油灌胃或生理盐水单次注射。实验动物分为 5 组：正常对照组(control)；染料木素 + 辐射损伤组(GEN + R)；食用色拉油 + 辐射损伤组(Oil + R)；DES + 辐射损伤组(DES + R)以及生理盐水 + 辐射损伤组(Saline + R)。药物处理 24 h 后，小鼠装在有机玻璃盒内，6.0 Gy ^{60}Co γ 射线一次全身照射，吸收剂量为 98.01 ~ 98.68 cGy/min。

1.2　生存实验

辐射后 30 d 内，每天记录动物的死亡情况，计算 30 d 存活率。每组 30 只小鼠。

1.3　血液学检查

照射后不同时相点(1、3、6、9、14、21、30 d)小鼠尾静脉取血，血细胞自动分析仪分析照射后小鼠外周血像变化，包括白细胞、红细胞及血小板。血细胞计数结果以(%)表示，即以照射前 1 d 的值为正常值，辐射后各时相点所得数值与正常值的百分比。每组不同时相点取小鼠 8 只。

1.4　造血干细胞分析

制备骨髓有核细胞(bone marrow nucleated cells, BMNCs)悬液并按常规方法计算内源性脾集落生成单位(endogenous colony forming unit of spleen, endoCFUs)和粒细胞-单核细胞集落生成单位(granulocyte-macrophage colony forming unit, CFU-GM)的数量 。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 统计软件计数资料进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　生存率

实验结果显示，未经照射的小鼠无死亡，而各照射组小鼠在辐射后 7 ~ 14 d 大量死亡。Saline + R 组和 Oil + R 组小鼠死亡率高，辐射后第 30 天存活率仅分别为 15.56% 和 16.67%。辐射前 24 h 给予 GEN 可明显提高小鼠 30 d 存活率，比 Oil + R 组提高 36.66%，且该作用强于 DES(DES + R 组 30 d 存活率为 45.56%)($P<0.05$)。表明 GEN 具有明显的辐射防护作用，能显著降低辐射后小鼠的死亡率。

2.2　外周血象变化

辐射后各组 WBC 急剧减少，约 1 周降至最低，并持续保持在较低水平，第 9 天左右才逐渐开始恢复。与辐射对照组比较，GEN + R 组 WBC 下降幅度小，辐射后各时相点均高于辐射对照组($P<0.05$)。同时，GEN + R 组 WBC 恢复较快，辐射后 30 d 基本恢复正常，而 Saline + R 组和 Oil + R 组 30 d 仅分别恢复至正常的 75.37% 和 78.46%。另外，GEN 促进辐射后外周血 WBC 恢复的作用较 DES 强，特别是辐射后 21 d 和 30 d，GEN + R 组 WBC 数分别为正常的 90.49% 和 102.76%，而 DES + R 组分别为正常的 77.16% 和 93.81%($P<0.05$)(表 1)。

表 1　各组小鼠外周血 WBC 数量的变化($n=8$, %)

组别	照射后时间						
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	30 d
正常对照组	102.27	103.13	99.52	100.44	98.95	100.09	101.58
Saline + R 组	31.45	15.54	11.42	14.18	30.53	49.07	75.37
Oil + R 组	33.41	17.69	10.32	15.61	33.64	45.31	78.46
GEN + R 组	48.13^{ab}	30.17^{ab}	26.60^{ab}	34.29^{ab}	58.20^{ab}	90.49^{ab}	102.76^{ab}
DES + R 组	45.56^{ab}	30.33^{ab}	20.54^{ab}	38.14^{ab}	54.33^{ab}	77.16^{abc}	93.81^{abc}

a：$P<0.05$，与 Oil + R 组比较；b：$P<0.05$，与 Saline + R 组比较；c：$P<0.05$，与 GEN + R 组比较

辐射后 RBC 数量缓慢下降，辐射后14 d达最低值。照射前给予 GEN，RBC 数下降幅度小而且恢复快，特别是辐射后 14 d 和 21 d，GEN + R 组分别为正常的 56.94% 和 85.71%，而 Oil + R 组仅分别为对照的 40.11% 和 66.32%($P<0.05$)。该作用与 DES 比较无明显差异($P>0.05$)(表 2)。

表 2　各组小鼠外周血红细胞数量的变化($n=8$, %)

组别	照射后时间						
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	30 d
正常对照组	103.13	100.12	105.47	98.72	102.15	99.78	101.21
Saline + R 组	99.31	82.17	61.28	52.69	45.63	63.62	89.87
Oil + R 组	97.25	83.81	65.72	56.93	40.11	66.32	87.02
GEN + R 组	98.26	89.59	72.19^{ab}	66.82^{ab}	56.94^{ab}	85.71^{ab}	96.09^{ab}
DES + R 组	99.03	88.21	76.43^{ab}	68.33^{ab}	60.53^{ab}	80.13^{ab}	95.01^{ab}

a：$P<0.05$，与 Oil + R 组比较；b：$P<0.05$，与 Saline + R 组比较

辐射后各组血小板进行性减少，14 d 降至最低。GEN + R 组血小板降低幅度较辐射对照组小且恢复较快，第 6 天起各时相点血小板数均高于辐射对照组，30 d 恢复至正常的 96.24%，而 Oil + R 组仅恢复至正常的 80.45%。与 DES + R 组比较，辐射后 14 d 和 21 d，GEN + R 组血小板数低于 DES + R 组($P<0.05$)。提示 GEN 对血小板的保护作用较 DES 低(表 3)。

辐射后各组淋巴细胞数量明显减少，辐射后 6 d 达最低点。与 Oil + R 和 Saline + R 比较，GEN + R 组各时相点淋巴细胞下

降幅度小且恢复较快($P<0.05$)。与 DES + R 比较,辐射后 21 d和 30 d,GEN + R 组淋巴细胞数明显高于 DES + R 组($P<0.05$)。提示 GEN 促进淋巴细胞恢复的作用较 DES 强(表4)。

表3 各组小鼠外周血血小板数量的变化($n=8$, %)

组别	照射后时间						
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	30 d
正常对照组	105.23	102.11	98.79	101.28	103.19	102.48	103.42
Saline + R 组	96.02	97.40	84.28	63.52	50.69	70.05	85.34
Oil + R 组	95.64	96.92	82.89	65.99	52.35	68.87	80.45
GEN + R 组	98.27	97.46	92.87^{ab}	77.51^{ab}	63.33^{ab}	80.03$^{a\,b}$	96.24^{ab}
DES + R 组	96.19	98.37	90.91^{ab}	80.76^{ab}	77.58^{abc}	90.41^{abc}	99.12^{ab}

a: $P<0.05$, 与 Oil + R 组比较; b: $P<0.05$, 与 Saline + R 组比较; c: $P<0.05$, 与 GEN + R 组比较

表4 各组小鼠外周血淋巴细胞数量的变化($n=8$, %)

组别	照射后时间						
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	30 d
正常对照组	100.64	105.32	97.51	97.23	104.16	101.05	100.91
Saline + R 组	37.21	28.44	15.07	23.11	31.38	44.95	59.39
Oil + R 组	35.17	27.06	17.46	21.77	34.76	47.71	61.77
GEN + R 组	40.87	37.84^{ab}	29.22^{ab}	34.79^{ab}	53.78^{ab}	75.41^{ab}	94.52^{ab}
DES + R 组	43.67	39.20^{ab}	27.05^{ab}	31.07^{ab}	48.31^{ab}	64.52^{abc}	81.71^{abc}

a: $P<0.05$, 与 Oil + R 组比较; b: $P<0.05$, 与 Saline + R 组比较; c: $P<0.05$, 与 GEN + R 组比较

2.3 BMNCs、endoCFUs 以及 CFU-GM

辐射后各组 BMNCs 数急剧减少,造血系统明显抑制,6 d 左右开始恢复。与辐射对照组比较,GEN + R 组 BMNCs 数量一直保持较高水平且恢复较快,辐射后 21 d 已经恢复正常的 89.96%(Saline + R 组和 Oil + R 组辐射后 21 d 仅分别恢复至正常的 56.05% 和 56.70%)。与 DES + R 组比较,辐射后 9、14、21 d,GEN + R 组 BMNCs 数量较 DES + R 组多($P<0.05$)。提示 GEN 对 BMNCs 的防护作用较 DES 强。此外,预防性的给予 GEN 可提高该组小鼠 endoCFUs 形成能力,为 Oil + R 组 4.47 倍,同时 CFU-GM 形成能力也增强,该作用与 DES 相似,但两者之间比较无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

造血系统和血细胞对射线极为敏感,较小剂量的辐射就可导致其损伤。当全身或大部分机体受到较大剂量射线照射后,造血组织的损伤是机体最早出现的基本损伤之一。射线对造血系统的损伤主要表现为造血功能的破坏和抑制。研究表明,中等剂量射线照射而引起的死亡与射线诱导的造血功能障碍有密切的关系。造血功能障碍主要表现为全血细胞减少,由此诱发机体感染、出血、免疫功能抑制、甚至死亡。有人认为,辐射防护剂提高生存率主要与其对造血细胞的影响有关。由于外周血中血细胞数量可反映骨髓的造血功能,因此,检测辐射后小鼠外周血中血细胞数量的变化可以用于评价辐射防护剂的防治作用。

本实验结果显示,辐射前 24 h 以 160 mg/kg 剂量的 GEN 给小鼠灌胃可显著提高照射小鼠的存活率,减小射线导致的白细胞、红细胞、血小板、淋巴细胞以及 BMNCs 下降幅度且恢复快,其中 GEN 在提高小鼠存活率,防护白细胞、淋巴细胞和 BMNCs 方面的作用强于 DES。推测 GEN 与雌激素类药物 DES 一样对放射性造血损伤有明显的防护作用,既能降低照射小鼠后的死亡率,还可促进辐射后造血系统的重建。进一步研究结果指出,预防性的给予 GEN 还可促进辐射后小鼠 endoCFUs、CFU-GM 数量的恢复,且与 DES 比较无明显差异。由于 endoCFUs 形成数量与造血干/祖细胞(hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells, HSCs/HPCs)的数量及增殖分化能力有关,CFU-GM 形成数量与髓系 HPCs 的数量和增殖能力有关,因此,endoCFUs 和 CFU-GM 生成数量增多提示 GEN 可能具有保护 HSCs/HPCs 并促进残留 HSCs/HPCs 增殖分化的作用,即 GEN 促进放射线造血损伤恢复与其降低 HSCs/HPCs 的辐射敏感性,减小射线对 HSCs/ HPCs 的直接杀伤作用,并促进残留 HSCs/HPCs 增殖分化有关。

已有实验证实,很多辐射防护剂通过清除自由基、阻滞 Ca^{2+} 通道、抑制脂质过氧化、提高机体免疫力、促进受损 DNA 修复以及刺激干细胞增殖等途径而发挥其抗辐射作用[10]。植物雌激素 GEN 具有雌激素活性,而且还具有抗氧化、调节机体免疫及抑制参与凋亡信号转导的拓扑异构酶、蛋白激酶和 caspases 等激酶活性的作用[11,12]。据此推测,GEN 防护放射性造血损伤机制也可能与其具有的这些特性有关,同时 GEN 的辐射防护作用比 DES 强也可能与其具有除雌活性以外的上述特性有关。至于 GEN 防护作用的分子机制本实验室将进一步探讨。

总之,GEN 预防性给药具有辐射防护作用,不仅可提高照射小鼠的生存率,还能促进受损造血系统的重建。该保护作用可能与其降低射线对骨髓造血干细胞和外周血血细胞的损伤、促进造血细胞增殖分化有关。尽管我们的实验显示 GEN 具有辐射防护作用,但其是否能作为临床辐射防护剂还需进一步深入的研究。

参考文献:

[1] BENASSAYAG C, PERROT-APPLANAT M, FERRE F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 777(1-2): 233-248.

[2] POWER K A, THOMPSON L U. Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 81(3): 209-221.

[3] 张 颐, 孙黎光, 尚 海, 等. 酸性成纤维细胞生长因子在卵巢癌

中的表达及其信号传导途径[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(11): 976-980.
[4] FANG Y C, CHEN B H, HUANG R F, *et al*. Effect of genistein supplementation on tissue genistein and lipid peroxidation of serum, liver and low-density lipoprotein in hamsters [J]. J Nutr Biochem, 2004, 15(3): 142-148.
[5] GOLDWYN S, LAZINSKY A, WEI H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2000, 17(1-4): 261-289.
[6] WEI H, ZHANG X, WANG Y, *et al*. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein [J]. Cancer Lett, 2002, 185(1): 21-29.
[7] SHIMOI K, MASUDA S, FURUGORI M, *et al*. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(11): 2669-2672.
[8] LANDAUER M R, SRINIVASAN V, SEED T M. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury[J]. J Appl Toxicol, 2003, 23(6): 379-385.
[9] LEBEDEV V G, MOROZ B B, VOROTNIKOVA T V, *et al*. Mechanism of radioresistance of the hematopoietic system after treatment with diethylstilbestrol [J]. Radiats Biol Radioecol, 1994, 34(4-5): 565-571.
[10] GOEL H C, PRASAD J, SINGH S, *et al*. Radioprotective potential of an herbal extract of Tinospora cordifolia[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2004, 45(1): 61-68.
[11] WANG H K. The therapeutic potential of flavonoids [J]. Expert Opin Investing Drugs, 2000, 9(9): 2103-2119.
[12] POLKOWSKI K, MAZUREK A P. Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data[J]. Acta Pol Pharm, 2000, 57(2): 135-155.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2006)24-2409-01

个案与短篇

早期宫颈癌行经阴道根治性宫颈切除后双胎妊娠1例

王 琳,梁志清,常 青 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

孕妇,33岁,因孕33^{+}周,双胎,发现血清抗A滴度升高,于2005-10-28入院,孕2产0。2003年6月因阴道镜下宫颈活检诊断为宫颈癌早期浸润,在我院行根治性宫颈切除术。术中经阴道沿宫颈切开阴道前后壁,分离上推膀胱及子宫直肠反折,暴露出宫颈峡部,于宫颈内口水平切断宫颈,以普林灵线环形缝扎宫颈内口1周。术中同时在腹腔镜下行淋巴清扫术。术后病理诊断:宫颈癌IA$_1$(FIGO分期),未发现淋巴结转移。2005年3月行体外受精-胚胎移植术(IVF-ET)后受孕。2005年5月孕2^{+}月时因右卵巢黄体囊肿扭转,右卵巢坏死,在腹腔镜下行右卵巢切除术,术后少量阴道流血,给予保胎治疗后流血停止。孕33周时,检查显示孕妇系"O"型血,丈夫为"A"型,孕妇血清抗A滴度为1:128,于2005-10-28再次入院。孕35周时,因胎儿宫内窘迫,于2005-11-17行子宫下段剖宫产术,术中娩出两女活婴,均评10分,体质量分别为2 620,2 740 g。术中宫缩乏力,出血700 ml,行子宫双侧动脉结扎及"U"字形子宫浆膜及肌层缝合后血止。术后5 d,母子平安出院。

讨论

宫颈癌早期浸润癌多行子宫全切除术[1]。但随着生育年龄的不断推迟,未生育妇女患者宫颈癌的比例呈上升趋势,患者往往强烈要求保留生育功能。我们认为保留早期宫颈癌患者的生育功能不仅必要,而且可行,可作根治性子宫颈切除术,切除包括宫颈峡部在内的宫颈,加腹腔镜下盆腔淋巴清扫,此法适用于宫颈浸润癌早期。Dargent等[2]报道了47例早期宫颈癌行根治性子宫颈切除术加腹腔镜下盆腔淋巴清扫,其中I$_{a}$期25例,平均随访52个月,诞生13个足月新生儿,复发2例,晚期流产率25%。我们认为该手术给未生育患者带来了希望,并不会增加术后复发率,但因有不孕及晚期流产的可能性,所以术前患者应充分知情。为了防止本例患者术后发生晚期流产,我们术中用不可吸收线行宫颈环扎术,宫口以能容纳6号扩宫器为原则。术后2年患者未能自然受孕,采用体外受精-胚胎移植术受孕成功。因采用了超排卵,故术后可发生卵巢过度刺激综合征,右卵巢增大后扭转,坏死,腹腔镜下切除右卵巢后继续妊娠。国内尚少见同类报道。但应注意:1)术前应在阴道镜下活检,明确诊断。2)术中快速冰冻切片病理检查,了解切缘有无癌残存。3)术后严密随访,及时发现癌复发。

关键词:早期宫颈癌;双胎妊娠;根治性宫颈切除
中图法分类号:R714 文献标识码:B

参考文献:

[1] 宋永勤,张国楠.年轻妇女宫颈癌169例临床分析[J].实用妇产科杂志,2005,21(3):168-170.
[2] DARGENT D, MARTIN X, SACCHETONI A, *et al*. Laparoscopic vaginal radical trachelectomy: a treatment to preserve the fertility of cervical carcinoma patients [J]. Cancer, 2000, 88(8): 1877-1882.

(编辑 周 芳)

作者简介:王 琳(1964-),女,四川省巴中市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事高危妊娠方面的研究,发表论文21篇。电话:(023)68765399
收稿日期:2005-12-26;修回日期:2006-01-01