超声与放射

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000760

低强度脉冲超声对阿糖胞苷所致新西兰兔白细胞、血小板减少的影响

张　愉[1],何瑞欣[1],周微尘[1],刘宝茹[1],罗月萍[1],王　嫣[1],汪　伟[2],陈文直[1]

(1. 重庆医科大学生物医学工程学院,省部共建国家重点实验室培育基地—重庆市超声医学工程重点实室,重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆　400016;2. 中国人民解放军总医院超声科,北京　100853)

【摘　要】目的:探讨低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound,LIPUS)对阿糖胞苷所致新西兰兔白细胞、血小板减少的影响。**方法**:将 28 只新西兰兔随机分为 2 组:正常组(n=8)和模型组(n=20),模型组耳缘静脉注射阿糖胞苷(50 mg/kg),连续 3 d。再将模型组随机分为 2 组:LIPUS 辐照组(n=10)和对照组(n=10),LIPUS 辐照组(辐照参数 0.2 W/cm^2;0.6 MHz)辐照 7 d。于给药前、给药后、辐照后 3、5、7、11、14、17、21 d 测定各组新西兰兔白细胞、血小板计数;白细胞分类计数;血小板活化代谢功能。**结果**:(1)模型组新西兰兔外周血白细胞、血小板与注射阿糖胞苷后降低(t=10.770,P=0.000;t=6.751,P=0.000)。(2)辐照后 LIPUS 组白细胞计数、中性粒细胞于辐照后 5 d 开始上升,与正常组比较无统计学意义(P=0.777、P=0.993),与对照组相比上升明显(P=0.017、P=0.028);LIPUS 组淋巴细胞计数于辐照后 3 d 开始上升,但较正常组与对照组差异均不显著(P=0.304、P=0.519);LIPUS 组单核细胞计数于辐照后上下波动,与对照组差异均无统计学意义(P=0.926、P=0.855、P=0.858、P=0.255、P_{18}=0.760、P=0.746、P=0.644);(3)辐照后 LIPUS 组血小板计数上下波动,趋势与对照组一致(P=0.198、P=0.610、P=0.021、P=0.291、P_{18}=0.465、P=0.777、P=0.008)。(4)辐照后 LIPUS 组血清兔血栓素 B_2(thromboxane,TXB_2)含量较对照组差异不明显(P=0.725、P=0.096)。(5)辐照后 LIPUS 组骨髓有核细胞数量增加,且辐照处皮肤、肌肉未见异常。**结论**:低强度脉冲超声可提高阿糖胞苷化疗后白细胞计数,可能是因为其能升高化疗后中性粒细胞数量所致。低强度脉冲超声可能对血小板数量及血清 TXB_2 无影响。

【关键字】低强度脉冲超声;阿糖胞苷;白细胞减少、血小板减少;兔血栓素 B2

【中图分类号】R318　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-03-12

Influence of low intensity pulsed ultrasound on chemotherapy-induced leukopenia and thrombocytopenia by Ara-C in rabbit

Zhang Yu[1], He Ruixin[1], Zhou Weichen[1], Liu Baoru[1], Luo Yueping[1], Wang Yan[1], Wang Wei[2], Chen Wenzhi[1]

(1. State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-Founded by Chongqing and the Ministry of Science and Technology, College of Biomedical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University; 2. Department of Ultrasound, Chinese PLA General Hospital)

[Abstract]*Objective*: To observe the influence of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on chemotherapy-induced leucopenia and chemotherapy-induced thrombocytopenia by Ara-C in rabbit. ***Methods***: Totally 28 rabbits were divided randomly into normal group (n=8) and model group(n=20). Ara-C(50 mg/kg) was injected into rabbits in model group from the ear vein for 3 days. Then rabbits in model group were randomized into LIPUS group(n=10,0.2 W/cm^2,0.6 MHz) and control group(n=10);the cell number of white blood cell(WBC),platelet(PLT),NE,LY,MO and thromboxane(TXB2) were counted. ***Results***: (1)The cell number of WBC and PLT of rabbits in model group decreased after Ara-C injection(t=10.770,P=0.000;t=6.751,P=0.000). (2)The cell number of WBC and NE of rabbits in LIPUS group increased compared with that of control group from 5th day after treatment(P=0.017;P=0.028);the cell number of LY of rabbits in LIPUS group increased from 3th day after treatment,but there was no significant difference compared that of with normal and control group(P=0.304;P=0.519). The cell number of MO of rabbits in LIPUS group were fluctuated, but there was no significant difference compared with that of control group(P=0.926;P=0.855;P=0.858;P=0.255;P=0.760;P=0.746;P=0.644). (3)The cell number of PLT of rabbits in

作者介绍:张　愉,Email:joy_zhangyu@163.com,研究方向:肿瘤学。

通信作者:陈文直,Email:chenwz@haifu.com.cn。

基金项目:国家科技部 973 计划资助项目(编号:2011CB707900);重庆市教委资助项目(编号:KJ130329)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1517.006.html (2015-09-10)

LIPUS group were fluctuated, and there was no significant difference compared with that of control group (P=0.198; P=0.610; P=0.021; P=0.291; P=0.465; P=0.777; P=0.008). (4)There was no significant difference in the serum TXB_2 levels of rabbits between control group and LIPUS group (P=0.725; P=0.096). (5)The nucleated cells number of bone marrow were increased. The skin and muscle had not been seen abnormal after treatment. ***Conclusion***: LIPUS could increase the cell number of WBC, which may be related with its increase of cell number of NE. LIPUS had no effect on the number of platelets and the serum TXB_2.

【Key words】low intensity pulsed ultrasound; Ara-C; chemotherapy-induced leukopenia and thrombocytopenia; thromboxane

近年，我国恶性肿瘤的发病率、死亡率呈逐年上升趋势，已然成为我国居民的首要死因之一，其死亡率居世界较高水平[1]。化疗是中晚期恶性肿瘤病患的主要治疗手段，但随着化疗药物的不断研究开发、化疗方案的不断更新，多种化疗后副反应接踵而至，最严重的当属骨髓抑制[2]。阿糖胞苷作为细胞周期时相特异性化疗药物，具有免疫抑制和抗肿瘤作用，临床多用于恶性肿瘤的化疗治疗，然而阿糖胞苷可直接损伤骨髓细胞，导致骨髓功能障碍，引发患者出现化疗所致白细胞减少和血小板减少，严重影响后续治疗的正常进行，降低患者的生存期和生活质量。低强度脉冲超声（low intensity pulsed ultrasound，LIPUS）作为近年兴起的一种物理机械波疗法，Nakamura[3]、Warden 等[4]已证实其具有促进人成纤维细胞、骨膜细胞、成骨细胞等细胞的增殖、细胞外基质和生长因子分泌等作用。本课题组前期研究也表明 LIPUS 能促进骨髓间充质干细胞（bone mesenchymal stem cells，BMSCs）[5]、骨髓有核细胞[6]的增殖。故本研究拟通过阿糖胞苷诱发新西兰兔白细胞减少和血小板减少的模型，观察 LIPUS 对白细胞、血小板数量，白细胞分类计数，血小板活化代谢功能的影响，旨在为探讨 LIPUS 能否治疗阿糖胞苷所致白细胞减少和血小板减少提供实验依据及数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 月龄、同批次新西兰兔 28 只，雌雄不拘，体质量（2.0 ± 0.2）kg，均由重庆医科大学实验动物中心提供[生产许可证：SYXK(渝)2012-0001]。所有动物在相同实验室条件[湿度（45 ± 5）%，温度（22 ± 2）℃，12 h 光暗周期]下正常饮食饲养 1 周。实验过程中对所有动物的处置符合 2006 年科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 实验试剂及检测设备

注射用盐酸阿糖胞苷，100 mg/支，批号：110902-1，购自国药一心制药有限公司；兔血栓素 B2（thromboxane B2，TXB2），购自上海沪尚生物科技有限公司；快速瑞姬氏染液，批号：20131012，购自南京建成科技有限公司。LIPUS 仪（重庆海扶医疗科技股份有限公司）；一次性采血管（重庆医科大学附属第一医院检验科）；一次性注射器（上海金塔医用器材有限公司）；石蜡切片机（Leica SM2000R，德国）；光学生物显微镜（iMark-14047，上海）；酶标仪、双蒸水、离心机、电子天平等（由重庆医科大学生物医学工程重点实验室提供）。

1.3 阿糖胞苷诱发新西兰兔白细胞减少、血小板减少模型的建立

因目前国内外尚无使用阿糖胞苷诱发新西兰兔白细胞减少和血小板减少模型的文献记载，故本研究参照小鼠相关模型构建的方法[7-8]。将 28 只新西兰兔随机分为 2 组：正常组（n=8）和模型组（n=20）。将模型组随机编号，用生理盐水溶解阿糖胞苷（比例：2 ml:100 mg）后，按 50 mg/kg 的剂量于兔耳缘静脉注射，连续给药 3 d；正常组同期注射等量生理盐水。

1.4 实验分组及治疗方法

将 20 只模型组新西兰兔随机分为 2 组：LIPUS 辐照组（n=10）和对照组（n=10）。LIPUS 辐照组采用本课题组前期筛选出来的适宜参数（辐照强度：0.2 W/cm^2；辐照频率：0.6 MHz）进行辐照，辐照前，局部脱毛清洁。辐照时，将超声治疗头紧贴兔左腿股骨干骺端皮肤，治疗头与皮肤之间涂以超声耦合剂，开启电源，辐照过程中不移动治疗头位置，每日 1 次，每次辐照 20 min，连续辐照 7 d。对照组兔与 LIPUS 辐照组操作相同，但不开启电源。正常组兔不进行 LIPUS 辐照。

1.5 指标的采集与检测

1.5.1 一般情况　实验进展过程中观察各组新西兰兔体质量变化、饮食饮水、精神状态、排泄及活动度等情况。

1.5.2 血常规检测　给药前、给药后、辐照后 3、5、7、11、14、17、21 d，将新西兰兔耳中动脉附近的兔毛拔除，酒精棉球擦拭血管使其充盈后，抽取 1 ml 血液快速注入一次性采血管（含 EDTA）中，来回混匀采血管以防血液凝固，2 h 之内将采血管送至重庆医科大学附属第一医院检验科进行血常规检测。

1.5.3 血小板功能检测 给药前、给药后、辐照后 3、7 d，采用同上方法采血 2 ml，立即离心（3 000 r/min，15 min），分离血清。采用酶联免疫吸附法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测新西兰兔血清 TXB2 含量，严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.4 骨髓涂片 给药前、给药后、辐照后 5 d，18 号骨髓穿刺针连接 5 ml 注射器，抽取兔骨髓液 0.5~1.0 ml，瑞姬氏染色[9]，用低倍镜（×10 倍）在体尾部涂片较均匀处，观察视野内有核细胞情况。

1.5.5 声通道内肌组织肉 HE 染色 辐照 21 d 后，新西兰兔经耳缘静脉 3%戊巴比妥（30 mg/kg）深度麻醉，取辐照处声通道肌肉组织后，行耳缘静脉空气注射处死。4%多聚甲醛固定肌肉组织 24 h 后，进行常规脱水、透明、石蜡包埋、切片（4 μm）。切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水、苏木精染色 5 min、0.1%伊红复染 5 min、二甲苯透明后封片。每个组织观察 10 个（×10 倍）视野。

1.6 统计学处理

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。各组间不同时间点的比较采用重复测量方差分析；各组间相同时间点的比较采用单因素方差分析（LSD-t 法）；造模组造模前后的比较采用配对 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 阿糖胞苷诱发新西兰兔白细胞减少、血小板减少模型的建立

模型组新西兔耳缘静脉注射阿糖胞苷之后，由表 1 可知：较给药之前，给药之后模型组血常规检测白细胞计数下降明显（t=10.770，P=0.000），下降 55.047%；血小板计数下降明显（t=6.751，P=0.000），下降 28.947%。提示，使用阿糖胞苷诱发新西兰兔白细胞减少、血小板减少模型建立成功。

2.2 LIPUS 辐照对白细胞计数的影响

辐照 1 d 后，LIPUS 组死亡 1 只，对照组死亡 2 只，死亡原因不明，分析原因可能是由化疗药物毒性所致。由表 2 可知：时间会对新西兰兔的白细胞计数产生影响（P=0.001），但时间和分组的交互效应不会对新西兰兔的白细胞计数产生影响（P=0.072）。辐照后 3 d，LIPUS 组白细胞计数较正常组没有明显升高（P_4=0.000）；而较对照组差异无统计学意义（P_6=0.359）。但从辐照后 5 d 开始，LIPUS 组白细胞计数明显上升，与正常组比较无明显统计学差异（P_7=0.777、P_{10}=0.887、P_{13}=0.894、P_{16}=0.207、P_{19}=0.155、P_{22}=0.808），与对照组比较差异具有统计学意义（P_9=0.017、P_{12}=0.022、P_{15}=0.010、P_{18}=0.030、P_{21}=0.025、P_{24}=0.026）。结果表明 LIPUS 能改善阿糖胞苷诱发的的白细胞减少。

表 1 新西兰兔给药前后白细胞、血小板计数变化比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Changes in WBC, PLT by Ara-C to make chemotherapy -induced leucopenia and thrombocytopenia model（$\bar{x} \pm s$）

组别	数量	时间	WBC（×10⁹ 个/L）	PLT（×10⁹ 个/L）
模型组	20	给药前	9.541 ± 1.944	266.000 ± 44.369
		给药后	4.289 ± 0.840	189.000 ± 45.248
配对样本 t 检验		t 值	10.770	6.751
		P 值	0.000	0.000

2.3 LIPUS 辐照对白细胞分类计数的影响

2.3.1 LIPUS 辐照对中性粒细胞计数的影响 由表 3 可知：时间（P=0.001）、时间和分组的交互效应（P=0.016）均会对新西兰兔的中性粒细胞计数产生影响，交互作用结果表明 LIPUS 辐照组和正常组在辐照后不同时间点（辐照后 5、7、11、14、17 d 和 21 d）的中性粒细胞计数均明显高于对照组。辐照后 3 d，LIPUS 组中性粒细胞计数较正常组没有明显升高（P_4=0.000）；而较对照组差异无统计学意义（P_6=0.546）。但从辐照后 5 d 开始，LIPUS 组中性粒细胞计数明显上升，与正常组比较无统计学差异（P_7=0.993、P_{10}=0.980、P_{13}=0.628、P_{16}=0.615、P_{19}=0.915、P_{22}=0.768），与对照组比较差异具有统计学意义（P_9=0.028、P_{12}=0.035、P_{15}=0.009、P_{18}=0.034、P_{21}=0.004、P_{24}=0.012）。结果表明 LIPUS 能提高中性粒细胞数量。

2.3.2 LIPUS 辐照对淋巴细胞计数的影响 由表 4 可知：时

表 2 LIPUS 辐照后白细胞计数的变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Changes in WBC by LIPUS（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	给药后	辐照后 3 d	辐照后 5 d	辐照后 7 d	辐照后 11 d	辐照后 14 d	辐照后 17 d	辐照后 21 d
正常组	8	11.645 ± 2.155	10.530 ± 2.418	10.899 ± 2.222	10.705 ± 2.900	11.756 ± 2.498	10.573 ± 3.122	11.209 ± 2.248	10.689 ± 2.361
LIPUS辐照组	9	4.388 ± 0.976	5.773 ± 1.312	10.538 ± 3.139	11.452 ± 5.172	11.556 ± 4.093	9.051 ± 2.387	9.501 ± 2.513	10.396 ± 3.215
对照组	8	4.236 ± 0.828	5.028 ± 0.794	7.294 ± 2.206	8.814 ± 3.732	7.373 ± 1.997	6.716 ± 1.481	7.588 ± 1.176	8.168 ± 2.614
重复测量方差分析	Pillai' s Trace 分析不同时间点的比较 F=6.981，P=0.001；时间点和分组的交互效应 F=1.846，P=0.072；主体间效应检验 F=35.514，P=0.000								
LSD-t 检验		F_1=71.555	F_2=26.824	F_3=4.770	F_4=3.679	F_5=5.333	F_6=6.358	F_7=7.269	F_8=4.052
	正常 vs. LIPUS	P_1=0.000	P_4=0.000	P_7=0.777	P_{10}=0.887	P_{13}=0.894	P_{16}=0.207	P_{19}=0.155	P_{22}=0.808
	正常 vs. 对照	P_2=0.000	P_5=0.000	P_8=0.011	P_{11}=0.035	P_{14}=0.009	P_{17}=0.002	P_{20}=0.001	P_{23}=0.018
	LIPUS vs. 对照	P_3=0.829	P_6=0.359	P_9=0.017	P_{12}=0.022	P_{15}=0.010	P_{18}=0.030	P_{21}=0.025	P_{24}=0.026

间会对新西兰兔的淋巴细胞计数产生影响(P=0.005)，但时间和分组的交互效应不会对新西兰兔的淋巴细胞计数产生影响(P=0.071)。从辐照 3 d 开始，LIPUS 组淋巴细胞计数升高，较正常组比较差异无统计意义(P_4=0.304、P_7=0.304、P_{10}=0.745、P_{13}=0.168、P_{16}=0.382、P_{19}=0.534、P_{22}=0.339)，但较对照组比较差异仍无统计学意义(P_6=0.519、P_9=0.009、P_{12}=0.379、P_{15}=0.253、P_{18}=0.104、P_{21}=0.487、P_{24}=0.665)。提示，在本实验中LIPUS对淋巴细胞数量无明显影响。

2.3.3 LIPUS 辐照对单核细胞计数的影响 由表 5 可知：时间会对新西兰兔的单核细胞计数产生影响(P=0.000)，但时间和分组的交互效应不会对新西兰兔的单核细胞计数产生影响(P=0.425)。LIPUS 组及对照组单核细胞计数随时间上下波动，辐照后 3、7、11、17、21 d 明显低于正常组(P_4=0.000、P_{10}=0.036、P_{13}=0.004、P_{19}=0.010、P_{22}=0.037)；而辐照后 5、14 d 与正常组相比差异无统计学意义(P_7=0.135、P_{16}=0.138)。但LIPUS组与对照组相比差异始终无统计学意义(P_6=0.926、P_9=0.855、P_{12}=0.858、P_{15}=0.255、P_{18}=0.760、P_{21}=0.746、P_{24}=0.644)。提示，在本实验中 LIPUS 对单核细胞数量无明显影响。

2.4 LIPUS 辐照对血小板计数的影响

由表 6 可知：时间(P=0.000)、时间和分组的交互效应(P=0.003)均会对新西兰兔的血小板计数产生影响，交互作用结果表明 LIPUS 辐照组和对照组在辐照后不同时间点(辐照后 3、5、7、11、14 d 和 17 d)的血小板计数均低于正常组。辐照后 3 d，LIPUS 组血小板计数较正常组没有明显升高(P_4=

表 3 LIPUS 辐照后中性粒细胞计数的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Changes in NE by LIPUS($\bar{x}\pm s$)

组别		n	给药后	辐照后 3 d	辐照后 5 d	辐照后 7 d	辐照后 11 d	辐照后 14 d	辐照后 17 d	辐照后 21 d
正常组		8	4.49±1.12	5.58±1.57	4.42±1.61	5.71±2.46	5.12±1.04	4.93±2.67	5.31±1.41	5.59±1.68
LIPUS辐照组		9	0.90±0.38	1.18±0.77	4.08±2.97	5.87±4.51	5.50±2.06	4.08±1.66	5.23±1.78	5.29±2.97
对照组		8	0.89±0.39	0.86±0.67	2.61±1.30	3.88±3.59	3.25±1.49	2.98±1.47	3.08±0.69	2.55±0.67
重复测量方差分析		Pillai's Trace 分析不同时间点的比较 F=15.085，P=0.000；时间点和分组的交互效应 F=2.469，P=0.016；主体间效应检验 F=21.444，P=0.000								
LSD-t 检验			F_1=70.233	F_2=55.082	F_3=3.553	F_4=3.216	F_5=4.645	F_6=4.128	F_7=6.742	F_8=5.381
	正常 vs. LIPUS		P_1=0.000	P_4=0.000	P_7=0.993	P_{10}=0.980	P_{13}=0.628	P_{16}=0.615	P_{19}=0.915	P_{22}=0.768
	正常 vs. 对照		P_2=0.000	P_5=0.000	P_8=0.032	P_{11}=0.042	P_{14}=0.030	P_{17}=0.013	P_{20}=0.004	P_{23}=0.007
	LIPUS vs. 对照		P_3=0.972	P_6=0.546	P_9=0.028	P_{12}=0.035	P_{15}=0.009	P_{18}=0.034	P_{21}=0.004	P_{24}=0.012

表 4 LIPUS 辐照后淋巴细胞计数的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Changes in LY by LIPUS($\bar{x}\pm s$)

组别		n	给药后	辐照后 3 d	辐照后 5 d	辐照后 7 d	辐照后 11 d	辐照后 14 d	辐照后 17 d	辐照后 21 d
正常组		8	5.97±1.81	5.09±1.86	5.14±1.02	4.66±1.08	5.63±2.28	4.79±1.61	5.05±2.40	3.71±2.15
LIPUS辐照组		9	3.43±0.84	4.42±0.95	5.57±0.69	4.85±1.08	4.59±0.97	4.26±1.09	4.57±1.09	4.42±1.06
对照组		8	3.32±0.60	4.00±0.95	4.39±0.84	4.32±1.41	3.72±0.95	3.26±0.86	4.03±0.77	4.11±1.06
重复测量方差分析		Pillai's Trace 分析不同时间点的比较 F=4.741，P=0.005；时间点和分组的交互效应 F=1.851，P=0.071；主体间效应检验 F=11.142，P=0.000								
LSD-t 检验			F_1=12.941	F_2=1.406	F_3=4.154	F_4=0.425	F_5=3.201	F_6=3.273	F_7=0.848	F_8=0.478
	正常 vs. LIPUS		P_1=0.000	P_4=0.304	P_7=0.304	P_{10}=0.745	P_{13}=0.168	P_{16}=0.382	P_{19}=0.534	P_{22}=0.339
	正常 vs. 对照		P2=0.000	P_5=0.111	P_8=0.092	P_{11}=0.575	P_{14}=0.019	P_{17}=0.020	P_{20}=0.207	P_{23}=0.606
	LIPUS vs. 对照		P_3=0.846	P_6=0.519	P_9=0.009	P_{12}=0.370	P_{15}=0.253	P_{18}=0.104	P_{21}=0.487	P_{24}=0.665

表 5 LIPUS 辐照后单核细胞计数的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Changes in MO by LIPUS($\bar{x}\pm s$)

组别		n	给药后	辐照后 3 d	辐照后 5 d	辐照后 7 d	辐照后 11 d	辐照后 14 d	辐照后 17 d	辐照后 21 d
正常组		8	1.19±1.77	0.78±0.35	1.37±1.65	1.47±1.65	0.86±0.38	0.95±1.26	0.85±0.30	1.24±1.14
LIPUS辐照组		9	0.00±0.00	0.12±0.09	0.62±0.37	0.43±0.31	0.46±0.15	0.41±0.18	0.54±0.24	0.48±0.26
对照组		8	0.01±0.01	0.11±0.09	0.53±0.44	0.34±0.23	0.32±0.18	0.30±0.12	0.50±0.11	0.64±0.44
重复测量方差分析		Pillai's Trace 分析不同时间点的比较 F=10.399，P=0.005；时间点和分组的交互效应 F=1.059，P=0.071；主体间效应检验 F=27.086，P=0.000								
LSD-t 检验			F_1=3.873	F_2=26.301	F_3=1.745	F_4=3.472	F_5=9.778	F_6=1.874	F_7=5.712	F_8=2.691
	正常 vs. LIPUS		P_1=0.023	P_4=0.000	P_7=0.135	P_{10}=0.036	P_{13}=0.004	P_{16}=0.138	P_{19}=0.010	P_{22}=0.037
	正常 vs. 对照		P_2=0.027	P_5=0.000	P_8=0.105	P_{11}=0.028	P_{14}=0.000	P_{17}=0.086	P_{20}=0.006	P_{23}=0.102
	LIPUS vs. 对照		P_3=0.993	P_6=0.926	P_9=0.855	P_{12}=0.858	P_{15}=0.255	P_{18}=0.760	P_{21}=0.746	P_{24}=0.644

0.000）；而较对照组差异无统计学意义（P_6=0.198）。但辐照后 5 d，LIPUS 组和对照组血小板计数显著上升出现峰值，与正常组比较差异有统计学意义（P_7=0.030、P_8=0.012），但 2 组间差异不明显（P_9=0.610）。从辐照后 7 d，LIPUS 组与对照组血小板计数再次下降，与正常组比较差异有统计学意义（P_{10}=0.025、P_{11}=0.000、P_{13}=0.000、P_{14}=0.000、P_{16}=0.021、P_{17}=0.005、P_{19}=0.036、P_{20}=0.023）。辐照后 21 d，LIPUS 组血小板计数再次上升，与正常组比较差异无统计学意义（P_{22}=0.910）。结果显示 LIPUS 组血小板计数上下波动，幅度趋势与对照组一致，表明低强度脉冲超声对血小板计数无明显影响。

2.5 LIPUS 辐照对血小板活化代谢功能影响

由表 7 可知：时间会对新西兰兔的 TXB2 含量产生影响（P=0.001），但时间和分组的交互效应不会对新西兰兔的 TXB2 含量产生影响（P=0.384）。较给药前相比，给药后、辐照 3 d 后，LIPUS 组和对照组血清 TXB2 含量明显降低（P_1=0.005、P_2=0.008、P_4=0.037、P_5=0.018）。但辐照 7 d 后，LIPUS 组和对照组血清 TXB2 含量上升，较给药前相比差异无统计学意义（P_3=0.710、P_6=0.260）。给药前、给药后、辐照后 3、7 d，LIPUS 辐照组与对照组血清 TXB2 含量相比差异无统计学意义（P_7=0.937、P_8=0.625、P_9=0.725、P_{10}=0.096）。提示低强度脉冲超声对血清 TXB2 无明显影响。

2.6 LIPUS 辐照对骨髓有核细胞活跃度的影响

给药后，骨髓内有核细胞数量明显减少，可能由于阿糖胞苷骨髓抑制有关，但还未见明显幼稚细胞。而辐照 5 d 后观察，LIPUS 辐照组及对照组的骨髓有核细胞数量均有所增加，但 LIPUS 辐照组有核细胞数量优于对照组。推测低强度脉冲超声可能通过促进骨髓有核细胞增殖从而增加外周血白细胞数量。见图 1。

2.7 LIPUS 辐照对辐照处肌肉组织的影响

辐照 21 d 后，LIPUS 组辐照处皮肤正常完整无损伤。取

表 6 LIPUS 辐照后血小板计数的变化（$\bar{x}\pm s$）

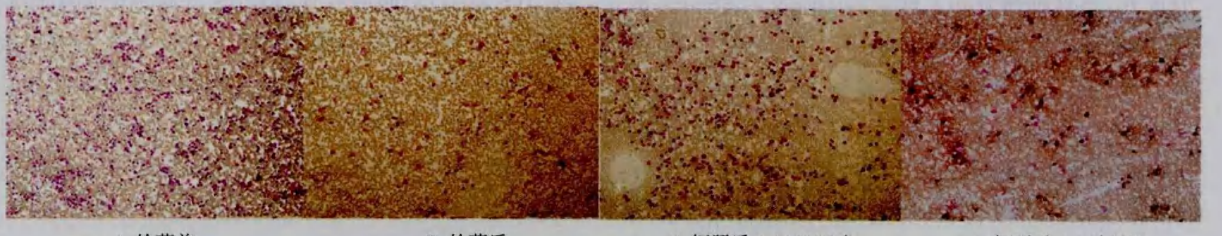
Tab.6 Changes in PLT by LIPUS（$\bar{x}\pm s$）

组别		n	给药后	辐照后 3 d	辐照后 5 d	辐照后 7 d	辐照后 11 d	辐照后 14 d	辐照后 17 d	辐照后 21 d
正常组		8	348.000±126.383	322.000±75.316	274.000±95.313	318.000±72.371	361.000±127.647	287.000±104.405	400.000±84.502	333.000±66.894
LIPUS辐照组		9	195.000±34.191	102.000±44.008	481.000±138.023	242.000±60.332	177.000±79.295	217.000±41.902	304.000±85.688	327.000±135.214
对照组		8	172.000±53.633	68.000±30.263	527.000±273.599	163.000±63.280	130.000±39.175	194.000±54.945	292.000±94.042	183.000±85.276
重复测量方差分析			Pillai's Trace 分析不同时间点的比较 F=17.379，P=0.000；时间点和分组的交互效应 F=2.236，P=0.016；主体间效应检验 F=17.758，P=0.000							
LSD-t 检验			F_1=11.518	F_2=55.001	F_3=4.337	F_4=11.269	F_5=15.113	F_6=5.405	F_7=3.646	F_8=5.676
	正常 vs. LIPUS		P_1=0.001	P_4=0.000	P_7=0.030	P_{10}=0.025	P_{13}=0.000	P_{16}=0.021	P_{19}=0.036	P_{22}=0.910
	正常 vs. 对照		P_2=0.000	P_5=0.000	P_8=0.012	P_{11}=0.000	P_{14}=0.000	P_{17}=0.005	P_{20}=0.023	P_{23}=0.007
	LIPUS vs. 对照		P_3=0.549	P_6=0.198	P_9=0.610	P_{12}=0.021	P_{15}=0.291	P_{18}=0.465	P_{21}=0.777	P_{24}=0.008

表 7 LIPUS 辐照对血小板活化代谢功能的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab.7 Changes in TXB2 by LIPUS（$\bar{x}\pm s$）

组别	数量	给药前	给药后	辐照后 3 d	辐照后 7 d
LIPUS辐照组	9	10.030±1.503	7.820±1.018	7.639±2.109	9.820±0.878
对照组	8	10.090±1.574	8.127±1.501	8.035±2.444	11.453±2.605
重复测量方差分析	Pillai's Trace 分析不同时间点的比较 F=10.034，P=0.001；时间点和分组的交互效应 F=1.100，P=0.384；主体间效应检验 F=1.675，P=0.215				
方差分析	LIPUS vs. 对照	F_1=0.060，P_1=0.937	F_2=0.250，P_2=0.625	F_3=0.129，P_3=0.725	F_4=3.156，P_4=0.096

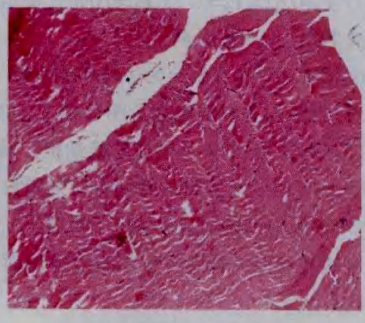


A. 给药前　B. 给药后　C. 辐照后 5 d LIPUS 组　D. 辐照后 5 d 对照组

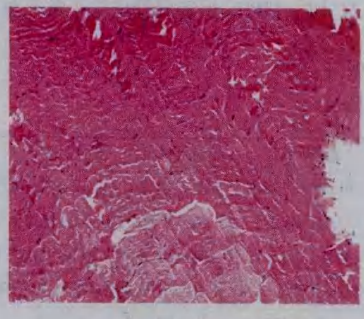
图 1 骨髓涂片有核细胞数量情况（100×）

Fig.1 Nucleated cells of bone marrow smear（100×）

声通道肌肉组织切片染色后观察，LIPUS 辐照组与对照组辐照处肌肉组织形态基本一致，肌肉组织纹理清晰，其内未见炎性细胞，表明低强度脉冲超声能安全升高白细胞数量，并不损伤超声波传递通道内的皮肤及肌肉组织。见图 2。



A. 辐照后 21 d 对照组



B. 辐照后 21 d LIPUS 组

图 2 辐照处肌肉组织变化（100×）

Fig.2 Change of muscle after 21d irradiation（100×）

3 讨 论

恶性肿瘤作为危害全球的公共卫生问题，极大的威胁着人类的生存与健康。2000 年，全球新发肿瘤病例 1 010 万，死亡 620 万，死亡率高达 61.38%[10]。而随着大范围的城镇化发展，导致日益显著的环境污染问题，发展中国家面临着更大的疾病负担。2008 年，恶性肿瘤发病人数发展中国家占 56%[11]，预计到 2015 年，发展中国家有 900 万人死于恶性肿瘤[12]。2011 年，我国恶性肿瘤发病率为 250.28/10 万（男：277.77/10 万；女：221.37/10 万）[13]，严重影响我国人民的生活质量和健康水平。化疗作为中晚期恶性肿瘤的主要治疗手段，因其能直接抑制肿瘤细胞的增殖而控制肿瘤细胞的生长，已广泛应用于临床。阿糖胞苷为 DNA 聚合酶的竞争性抑制剂，能够有效抑制体内 DNA 的生物合成，作为细胞周期时相特异性化疗药物，临床广泛应用与中晚期恶性肿瘤的治疗。但阿糖胞苷具有强烈的免疫抑制作用，在杀伤肿瘤细胞的同时，会引发不同程度的骨髓抑制，首要表现即为白细胞计数的降低，其次则是出现血小板计数的减少和出血倾向。白细胞减少会使机体免疫下降，易感性增高，个别可能合并严重感染而危机生命；血小板减少则可加重患者出血倾向，导致发生粘膜出血、胃肠道大出血和中枢神经内出血，严重时可危及生命[14]。因此，寻找解决化疗后血细胞减少的治疗手段已然刻不容缓。

超声波是以一定的形式在生物体内进行传播，可引起生物体功能或结构的变化。高强度超声波主要是对机体起破坏或损伤的作用，而 LIPUS 作为近年来兴起的物理机械波疗效，则起调节刺激的作用，临床上广泛应用于骨折的愈合、软骨的再生、关节缺损的修复等诸多领域，疗效显著[15]。在促进细胞增殖领域，Sun 等[16]证实 LIPUS 可促进成骨细胞的增生；Zhou 等[17]证实 LIPUS 可促进人成纤维细胞的增殖和细胞外基质的分泌；Peher 等[18]则进一步证明 LIPUS 是通过增加细胞的 DNA 合成，以及胶原、非胶原蛋白的合成来促进细胞的增殖。本课题组前期研究表明，LIPUS 能促进 BMSCs 的增殖、骨髓有核细胞的增殖[6]。Akiyama 等[19]研究比较了低频率超声与高频率超声对颅骨的穿透性，虽然低频超声穿透骨质能量有所衰减，但与高频率超声相比，低频率超声波能更有效的穿透骨质发挥作用。同时，LIPUS 为脉冲式发射，可有效避免因连续超声波辐照而使组织过热的副作用，具有安全有效、操作便捷、价格低廉的优势。

本研究将 LIPUS 作用于阿糖胞苷诱发的新西兰兔白细胞、血小板减少模型。利用本课题组前期筛选出来的适宜参数（辐照强度：0.2 W/cm^2；辐照频率：0.6 MHz）辐照后发现：LIPUS 可通过增加中性粒细胞的数量来提升白细胞计数。LIPUS 组白细胞数量始终维持在与正常组相持平的状态，可有效的防止新西兰兔在辐照时间内腹泻和死亡的发生，同时升高的中性粒细胞数量可以更加有效的抗感染。虽然 LIPUS 组淋巴细胞与单核细胞数量均有所波动，但与对照组比较差异无统计学意义，故不能证明这种波动是由 LIPUS 辐照所致；淋巴细胞是机体重要免疫细胞，可直接攻击肿瘤细胞；单核细胞具有直

接吞噬、清除病原体的作用，而 LIPUS 组淋巴细胞与单核细胞的数量没有进一步降低，故表明 LIPUS 对其没有损伤作用。

LIPUS组和对照组的血小板计数均下降，虽有所波动，但变化趋势一致，且 2 组间的比较无统计学意义。表明血小板的下降是由阿糖胞苷所致，不能证明这种变化波动与 LIPUS 辐照有关。同时，LIPUS 组的血清 TXB2 含量虽与对照组变化趋势一致，差异无统计学意义，但其水平回复到给药前水平，表明 LIPUS 不会过度提高 TXB2 水平而导致发生心绞痛、冠心病等疾病的风险，也不会降低 TXB2 水平而导致发生肾血管性高血压、肾病综合征等疾病的风险。同时，LIPUS 辐照处肌肉组织未见异常，表明 LIPUS 无明显不良反应，其应用安全、有效。

综上所述，LIPUS 能明显改善阿糖胞苷所致白细胞数量减少，能有效抗感染，虽无法证明血小板计数的上下浮动与 LIPUS 辐照有关，但能够表明其对淋巴细胞、单核细胞、TXB2 无明显的抑制或促进作用，保证了治疗的安全性。本课题组下一步将加大样本量，延长观察时间，收集更加完整的数据资料，力求能为低强度脉冲超声的临床应用提供更加严谨可靠的实验数据支撑。

LIPUS 可提高阿糖胞苷化疗后白细胞计数，可能是因为其能升高化疗后中性粒细胞数量所致。LIPUS 对血小板数量及血清TXB2 无明显影响。

参 考 文 献

[1] 张伟东，苗树军.我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析[J].中国教育健康，2009，4，25(4)：246-248.

[2] 李德爱，王大志，张书瑜，等.抗肿瘤药物瑜化疗患者发生骨髓抑制情况的药物流行病学研究[J].中国药学杂志，2010，45(24)：1968-1970.

[3] Nakamura T，Fujihara S，Katsura T，et al.Effects of low-intensity pulsed ultrasoundon the expression and activity of hyaluronan synthase and hyaluronidase inIL-1β-stimulated synovial cells[J].Ann Biomed Eng，2010，38(11)：3363-3370.

[4] Warden SJ，Favaloro JM，Bennell KL，et al.Low-intensity pulsed ultrasoundstimulates a bone-forming response in UMR-106 cells[J].Bio-chem Biophys ResCommun，2001，286(3)：443-450.

[5] 于海生，陈文直，王 嫣，等.低强度脉冲超声对体外培养的骨髓间充至干细胞增殖效应的研究[J].中国医科大学学报，2011，11(40)：971-974.

[6] 于海生.低强度脉冲超声促进骨髓来源细胞增殖的研究[D].重庆医科大学，2012.

[7] 田 枫，张 阔，康爱君，等.小鼠白细胞减少症模型的建立[J].中国比较医学杂志，2007，17(8)：41-43.

[8] 徐国良，肖兵华，陈 奇，等.阿糖胞苷诱发小树血小板减少模型的研究[J].中国临床药理学与治疗学，2005，10(4)：387-390.

[9] 叶应妩，王毓三.全国临床检验操作规程[M].2 版.南京：东南大学出版社，1997：70-71.

[10] Parkin DM，Bray F，Ferlay J，et al.Estimating the world cancer burden：globocan 2000[J].Int J Cancer，2001，94(2)：153-156.

[11] World Health Organization.Section of cancer information[DB/OL].GLOBOCAN 2008.2011-9-28.http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?wno=900.

[12] Kanavos P.The rising burden of cancer in the developing world[J].Ann Oncol ，2006，17(s8)：viii15-viii23.

[13] 吴 菲，林国桢，张晋薪.我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J].中国肿瘤，2012，21(2)：81-85.

[14] 丁生辉，雷招宝.药源性血小板减少症及其防治[J].海霞药学，2010，22(2)：91-94.

[15] Zhang ZJ，Huckle J，Francomano CA，et al.The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability，proliferation，gene expression and matrix production[J].Ultrasound Med Biol，2003，29(11)：1645-1651.

[16] Sun JS，Hong RC，Chang WH，et al.In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells[J].Biomed Mater Res，2001，57(3)：449-456.

[17] Zhou S，Schmelz A，Seufferlein T，et al.Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound inhuman skin fibroblasts[J].Biol Chem，2004，279(52)：54463-54469.

[18] Reher P，Doan N，Bradncck B，et al.Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis：an in vitro comparison between 1Hz and 45k Hzmachines[J].Eur J Cancer，2008，34(12)：1962-1968.

[19] Akiyama M，Ishibashi T，Yamada T，et al.Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro[J].Neurosurgery，1998，43(4)：828-832.

（责任编辑：冉明会）