DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.020
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1296 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1296-03

rhGM-CSF对小鼠口腔粘膜损伤的防治作用

钟大平,张翼军 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 观察rhGM-CSF对MTX致实验性小鼠口腔粘膜损伤的疗效。方法 按随机分组原则将501只昆明种小白鼠分成8组,分别在相应时间给予不同药物(MTX、CF或rhGM-CSF)的处理因素,于第1~10天光镜下观察小鼠口腔粘膜的病理改变和积分情况。结果 IDMTX致口腔粘膜损伤病变率(45%~63%)和积分率(19.4%~56%)较其它组高,且死亡率很低(小于5%);IDMTX+GM_0(或GM_2)组的口腔粘膜损伤病变率(30.53%和30.99%)和积分率(19.47%和17.25%)比IDMTX组(55.56%和36.31%)明显减少,且溃疡严重程度较轻,二者相差显著($P<0.01$)。结论 IDMTX致小鼠口腔粘膜损伤模型可以用于粘膜损伤的研究;rhGM-CSF可以减少MTX致小鼠口腔粘膜损伤,并促进粘膜损伤恢复。

关键词:rhGM-CSF;氨甲喋呤;口腔粘膜损伤;动物模型
中图法分类号:R392.11;R781.59 文献标识码:A

Preventive effect of rhGM-CSF on oral mucosa lesions in mice

ZHONG Da-ping, ZHANG Yi-jun (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of rhGM-CSF on MTX-induced oral mucosa lesions. Methods After a total of 501 mice were randomly divided into eight groups with various medicines of different concentration (MTX, CF or rhGM-CSF) were administered at the same time, respectively. The integral rate and the pathological changes of oral mucosa were observed during 10 consecutive days after administration of MTX. Results The incidence (45.0%~63.0%) and the integral rate (19.4%~56.0%) of mice oral mucosa lesions in the group of IDMTX were significantly higher than those in other groups. The death rate (<5%) in the group of IDMTX was lower than that in other groups. The incidence (30.53% and 30.99%) and the integral rate (19.47% and 17.25%) of mice oral mucosa lesions in groups of IDMTX+GM_0(or GM_2) were significantly lower than those in group IDMTX (55.56% and 36.31%). The degree of severity of ulcers in the former groups was lighter than that in the latter. The difference of the two groups was statistically significant ($P<0.01$). Conclusions The model of IDMTX-induced oral mucosa lesion can be applied in the studies of mucosa lesions. The MTX-induced oral mucositis and ulcers can be alleviated by rhGM-CSF.

Key words: rhGM-CSF; MTX; oral mucosa lesion; animal model

重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)是一种具有谱系特异性的细胞因子,可以刺激造血细胞生长特别是粒细胞的增殖、分化和成熟,并增强成熟中性粒细胞及单核细胞的功能[1]。氨甲喋呤(Methotrexate, MTX)[2]是一种常用的抗代谢类化疗药物,体内与二氢叶酸和一氢叶酸还原酶结合,使叶酸不能形成四氢叶酸,导致嘌呤及胸腺嘧啶核苷酸合成的障碍,引起DNA、RNA及蛋白质合成的抑制,影响肿瘤细胞增殖,也影响更新较快的造血细胞及上皮细胞,从而引起口腔炎、骨髓抑制等副作用。近几年国外有文献报道rhGM-CSF对创伤的愈合有很好的疗效[3]。那么其对化疗所致口腔粘膜炎或溃疡是否有疗效呢?为了研究rhGM-CSF对口腔粘膜损伤的疗效,首先应建立MTX致小鼠口腔粘膜损伤动物模型,并在此模型基础之上观察rhGM-CSF对实验性小鼠口腔粘膜损伤的疗效。

1 材料和方法

1.1 动物实验

501只昆明种小白鼠,本校实验动物中心提供,雌雄各半,体重18~28 g,6~8周龄,在动物中心室温下分笼饲养。

1.2 实验分组

按照随机分组原则将501只小鼠分为8大组:(1)对照组:22只;(2)MTX小剂量组:19只,MTX 10 mg/kg;(3)MTX中剂量组(Intermediate-dose MTX, IDMTX),126只随机分为3小组:①MTX_{20}组:40只,MTX 20 mg/kg;②MTX_{30}组:40只,MTX 30 mg/kg;③MTX_{40}组:46只,MTX 40 mg/kg;(4)MTX大剂量组。97只随机分为2小组:①MTX_{50}组:69只,MTX 50 mg/kg;②MTX_{75}组:28只,MTX 75 mg/kg;(5)IDMTX+GM_0组:95只随机分为3小组,注射MTX的同时用rhGM-CSF。①MTX_{20}+GM_0:30只,MTX20 mg/kg;②MTX_{30}+GM_0:30只,MTX30 mg/kg;③MTX_{40}+GM_0:35只,MTX40 mg/kg;(6)IDMTX+GM_2组:71只随机分为3小组,注射MTX后第2天用rhGM-CSF。①MTX_{20}+GM_2:23只,MTX20 mg/kg;②MTX_{30}+GM_2:24只,MTX30 mg/kg;③MTX_{40}+GM_2:24只,MTX40 mg/kg;(7)MTX_{40}+CF(亚叶酸钙)组:35只,注射MTX(40mg/kg)12 h后用CF;(8)MTX_{40}+CF+GM_0组:36只,注射MTX(40 mg/kg)的同时用rhGM-CSF,12 h后用CF。

1.3 药物配制及给药方法

用生理盐水将MTX配制成各种浓度(0.4、0.8、1.2、1.6、

作者简介:钟大平(1969-),女,重庆市梁平县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事临床血液学白血病的诊断及治疗方面的研究。电话:(023)68754129

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.0、3.0 mg/ml)备用; 用生理盐水将 rhGM-CSF 配制成 0.35 μg/ml 备用; 用生理盐水将 CF 配制成 16.5 μg/ml 备用。

小鼠腹部皮肤消毒后按指定浓度及药量给予 MTX、CF(15 $mg \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$)和 rhGM-CSF(5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)。对照组一次性腹腔注射生理盐水 0.5 ml, 其余各组行一次性腹腔注射不同浓度 MTX 0.5 ml; IDMTX+GM_0 和 MTX_{40}+CF+GM_0 组在用 MTX 同时行皮下注射 rhGM-CSF 0.3 ml; MTX_{40}+CF 和 MTX_{40}+CF+GM_0 组在用 MTX 12 h 后腹腔注射 CF 0.5 ml; IDMTX+GM_2 组在用 MTX 后第 2 天皮下注射 rhGM-CSF 0.3 ml; CF 及 rhGM-CSF 连续使用 5 d, 每日 1 次。注意潜行穿刺, 勿注射过深。

1.4　动物口腔粘膜的采集

IDMTX+GM_2 组于注射 rhGM-CSF 后第 1 天开始杀鼠, 其余各组从注射 MTX 或生理盐水后第 1 天开始杀鼠, 每组每天 2~6 只, 拟 10 d 将全部小鼠断颈处死, 仔细解剖取下舌、口腔颊部及唇部粘膜, 在滤纸上铺平, 借助放大镜取典型病变处组织, 用福尔马林固定 12~24 h, 石蜡包埋, 5~6 μm 切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察口腔粘膜上皮炎性细胞的多少, 有无变性、坏死、溃疡形成以及成纤维细胞、新生血管等肉芽组织的增生。

1.5　光学显微镜下口腔粘膜损伤程度评分标准

0 分: 口腔粘膜无炎细胞、坏死、溃疡等改变; 1 分: 口腔粘膜有少数炎细胞, 无坏死及溃疡; 2 分: 口腔粘膜有较多炎细胞, 无坏死及溃疡; 3 分: 口腔粘膜上皮固有层有大量炎细胞浸润, 部分有坏死, 但无溃疡; 4 分: 口腔粘膜溃疡已形成, 有坏死组织, 其周围有成纤维细胞、新生毛细血管等。

1.6　死亡率、病变率、积分率的定义

死亡率= 死亡只数/总只数 × 100%

口腔粘膜损伤病变率= (口腔粘膜炎症+溃疡)只数/取材只数 ×100%

口腔粘膜损伤积分率= 口腔粘膜损伤积分/(取材只数×4)× 100%

1.7　统计学处理

用 SPMR 统计软件包进行多个率之间的 χ^2 检验。

2　结果

2.1　动物转归

本试验中发现腹腔注射后双下肢瘫痪 1 只, 双下肢皮肤糜烂 1 只, 腹泻 2 只, 皮疹 1 只; 小鼠注射 MTX 后的第 1 天有 3 只小鼠口腔粘膜组织可见明显水肿, 粘膜上皮轻微脱落, 表面出现少许分泌物; 第 1 天因出血死亡 2 只, 第 2 天死亡 2 只, 第 3、4、5 天死亡 56 只, 共有 60 只小鼠死亡, 其中 MTX 大剂量组(50~75 mg/kg)占 55 只(91.7%)。

2.2　光学显微镜下口腔粘膜损伤

2.2.1　不同 MTX 剂量组对小鼠口腔粘膜的损伤　IDMTX 组(20~40 mg/kg)的口腔粘膜损伤病变率(45%~63%)和积分率(19.4%~56%)较其它组高, 相差显著($P<0.01$), 且死亡率很低(<5%); MTX 大剂量组(50~75 mg/kg)的口腔粘膜损伤病变率与对照组和小剂量组比相差显著($P<0.01$), 死亡率(>47.8%)也比其它组高, 相差显著($P<0.01$)。MTX 大剂量组与 IDMTX 组的口腔粘膜损伤病变率差异不明显($P>0.05$), 见表 1。

2.2.2　GM-CSF 对 IDMTX 致小鼠口腔粘膜损伤的作用　IDMTX+GM_0 和 IDMTX+GM_2 组的口腔粘膜损伤病变率(30.53%和 30.99%)和积分率(19.47%和 17.25%)比 IDMTX 组(55.56%和 36.31%)减低, 且溃疡严重程度减轻, 相差显著($P<0.01$)。IDMTX+GM_0 组的死亡率最低(2.11%), 见表 2。

表 1　不同 MTX 剂量组对小鼠口腔粘膜的损伤

Tab 1　Effects of various doses of MTX oral mucosa lesions in mice

Group	n	No. of death(%)	No. of specimen	Lesions of oral mucosa	
				Number(%)	Integral(%)
Control	22	0(0)	22	5+0(22.7)	7(7.9)
MTX_{10}	19	2(10.5)	19	4+0(21.1)	9(11.8)
MTX_{20}	40	0(0) *	40	17+1(45.0) **	31(19.4)
MTX_{30}	40	2(5) *	40	18+5(57.5) **	49(30.6)
MTX_{40}	46	1(2.2) *	46	8+21(63.0) **	103(56.0)
MTX_{50}	69	33(47.8) ***	46	20+8(60.9) **	81(44.0)
MTX_{75}	28	22(78.6) ***	7	1+5(85.7) **	21(75.0)

*: $P>0.05$ *vs* control and MTX_{10} groups; **: $P<0.01$ *vs* control and MTX_{10} groups; ***: $P<0.01$ *vs* the other groups; Number: the number of mucositis + ulcers

表 2　GM-CSF 对 IDMTX 致小鼠口腔粘膜损伤的作用

Tab 2　Effects of GM-CSF on IDMTX-induced oral mucosa lesions in mice

Group	n	No. of death (%)	Lesions of oral mucosa	
			Number(%)	Integral(%)
Control	22	0(0.00)	5+0(22.73)	7(7.95)
IDMTX	126	3(2.38)	41+29(55.56) **	183(36.31)
IDMTX+GM_0	95	2(2.11)	17+12(30.53)	74(19.47)
IDMTX+GM_2	71	5(7.04)	16+6(30.99)	49(17.25)

**: $P<0.01$ *vs* the other groups; Number: the number of mucositis + ulcers

2.2.3　GM-CSF 及 CF 对 IDMTX 致小鼠口腔粘膜损伤的作用　MTX_{40}+GM_0、MTX_{40}+GM_0+CF 和 MTX_{40}+CF 组的口腔粘膜病变率均比 MTX_{40}减低, 且溃疡严重程度减轻, 相差显著($P<0.01$)。MTX40+CF+GM_0、MTX_{40}+GM_0 和 MTX_{40}+CF 组的口腔粘膜损伤病变率相近, 相差不显著($P>0.05$), 见表 3。

表 3　GM-CSF 及 CF 对 IDMTX 致小鼠口腔粘膜损伤的作用

Tab 3　Effects of GM-CSF and CF on MTX40-induced oral mucosa lesions in mice

Group	n	No. of death(%)	Lesions of oral mucosa	
			Number(%)	Integral(%)
Control	22	0(0.00)	5+0(22.73)	7(7.95)
MTX_{40}	46	1(2.17)	8+21(63.04) *	103(55.98)
MTX_{40}+GM_0	35	1(2.86)	3+9(34.29)	42(30.00)
MTX_{40}+CF+GM_0	36	1(2.78)	4+8(33.33)	37(25.69)
MTX_{40}+CF	36	1(2.78)	7+6(36.11)	38(26.39)

*: $P<0.01$ *vs* the other groups; Number: the number of mucositis + ulcers

我们将 60 只小鼠中的 17 只进行了病理检查, 其中 7 只有口腔粘膜炎症, 4 只有口腔粘膜溃疡, 口腔粘膜损伤率占取材只数中的 64.7%, 积分 28, 积分率 41.2%。

3　讨论

口腔粘膜炎或溃疡是恶性肿瘤化疗过程中最常见的并发症之一。化疗所致溃疡的主要原因是化疗药物可抑制口腔粘膜细胞内 DNA 和/或 RNA 及蛋白质合成, 甚至直接破坏 DNA 结构和功能, 导致细胞死亡而引发溃疡。同时当机体免疫功能低下, 中性粒细胞减少时, 口内细菌增殖活跃, 毒力增强, 菌群关系失调, 更易出现口腔粘膜炎症及溃疡。如何防治化疗所致粘膜损伤是我们临床面对的一个难题。

进行防治化疗药物所致口腔粘膜损伤的临床研

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

究,首先应建立稳定的动物模型。文献[4~6]中提供了多种引起口腔溃疡的方法,但化疗药物引起口腔溃疡的动物模型研究尚属空白。化疗引起粘膜损伤的最常见药物有MTX、阿霉素(Adr)、氟尿嘧啶(5-Fu)等,而MTX是血液学科常用药物中最易引起口腔粘膜损伤的药物,因此选择了MTX作为本实验的化疗药物,同时选择了昆明种小白鼠作为实验动物。根据临床经验我们对小鼠采用了MTX小、中、大剂量的分组法。从试验可以看出MTX中剂量组的口腔粘膜损伤病变率及积分率均较其它组高,但死亡率很低;大剂量组的口腔粘膜损伤病变率高,且死亡率也较高。在探索口腔粘膜损伤动物模型时,需要在使用MTX后出现较多口腔粘膜损伤的同时动物存活率较高(即死亡率较低),因此我们认为MTX中剂量组最适合建立化疗致口腔粘膜损伤动物模型,而MTX大剂量不适合作为动物模型。建立一种动物模型应遵循具有与人类疾病的相似性、重复性、可靠性、适用性、可控性、易行性的原则[7]。本实验经腹腔注射MTX建立化疗后口腔粘膜损伤动物模型的方法与临床很接近,具有一定的代表性。

在临床上预防中、大剂量MTX致粘膜损伤,常规使用亚叶酸钙(CF)解救治疗,其机制是直接避开MTX的作用,为正常细胞DNA合成提供原料,防止粘膜损伤的形成。国内亦用长效核黄素解救的措施。CF解救这一途径,至今在解救时机上尚未统一,如果过早过多地应用CF解救MTX的不良反应,也一定程度地减轻了MTX对肿瘤细胞的细胞毒作用。在一些研究中局部应用CF不能有效阻止口腔粘膜炎的发生。而长效核黄素解救这一途径,至今也未正式推广。其它抗肿瘤药物治疗恶性肿瘤时,至今没有防治粘膜损伤的特效药物。rhGM-CSF是恶性肿瘤化疗过程中常用的一种集落刺激因子,主要作用是加快中性粒细胞的恢复,减少感染的并发症。人与小鼠GM-CSF同源性有54%,其增强子的同源性有76%[8,9]。从本实验的结果中显示早期预防使用rhGM-CSF不仅能减少动物死亡,还能减少口腔炎症及溃疡的形成,减轻溃疡严重程度。本实验还显示MTX_{40}+CF+GM_0、MTX_{40}+GM_0和MTX_{40}+CF组的口腔粘膜损伤病变率相近,说明在这个剂量组中rhGM-CSF与CF具有相似的预防口腔粘膜损伤的作用,rhGM-CSF与CF也具有一定的协同作用。因此,rhGM-CSF治疗化疗致口腔粘膜炎症或溃疡可能成为最有前途且疗效显著的方法之一,其作用机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Buzby J S, Lee S M, van-Winkle P, *et al*. Increased granulocyte macrophage colony stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation-dependent and associated with increased levels of A + U-rich element binding factor[J]. Blood, 1996, 88(8): 2889—2897.
[2] 陈新谦,金有豫. 新编药物学[M]. 第14版. 北京:人民卫生出版社, 2001.12
[3] Da-Costa R M, Aniceto C, Jesus F M, *et al*. Quick healing of leg ulcers after molgramostim[J]. Lancet, 1994, 344(8920): 481—482.
[4] 陈谦明,李秉琦,萧卓然. 氧自由基对口腔粘膜损伤的动物实验研究——动物模型的建立[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 11(1): 63—64.
[5] 洪占春,郑广娟,高苏堤,等. 溃疡红药抗口腔溃疡药理研究[J]. 时珍国医国药, 1998, 9(6): 523—524.
[6] 熊风琴,李善华,王 遒,等. 口腔溃疡药膜对豚鼠实验性口腔溃疡的治疗作用[J]. 现代口腔医学杂志, 1997, 11(4): 259—260.
[7] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001.11
[8] 陈 滨,吴秋茜,倪道明. GM-CSF基因的表达调节[J]. 国外医学:分子生物学分册, 1997, 19(6): 254—257.
[9] 王 昕,吴克复. 巨噬细胞集落刺激因子及其受体的研究进展[J]. 国外医学:输血及血液学分册, 1996, 19(5): 272—275.

(编辑 张 宁)

(上接1292页)

3 讨论

Rh系统HDN是由于母婴Rh血型不合所致。Rh免疫抗体作用于胎儿红细胞造成的高胆红素血症,此病只能由人类红细胞作为抗原刺激产生Rh免疫抗体,故极少发生在第一胎,除非以前有输血史或流产史[1]。该产妇血型为Rh阴性,于1999年行人工流产一次,此次妊娠刺激母体已致敏的淋巴细胞,引起免疫性回忆反应,产生足够的抗D,导致抗体效价迅速上升,达到64。当抗体效价达到1∶32~1∶64时,胎儿红细胞容易受到破坏,造成溶血。该患儿血清胆红素进行性升高,出生后第2天总胆红素已高达583 μmol/L(参考范围3~23 μmol/L),高于正常值25倍多,血红蛋白持续下降至92 g/L,符合换血指征,选择与母亲Rh血型相合的血液换血。

在患儿出生后第3天即行换血术,我们对换血前血样及换出的血样作梯度检测,换血前直接抗球蛋白实验为3+,换血200 ml时即为1+,术后当天及术后4 d查直接抗球蛋白实验均为阴性。另换血前抗D效价为1∶64,换血术后1 d抗D效价1∶2。换血前后相比总胆红素和直接胆红素及间接胆红素均明显降低。其间给予蓝光照射,输用白蛋白,药物等治疗措施,以促进间接胆红素结合氧化分解水溶性物质排出体外,患儿于术后第6天出院,出院当天检测抗D为0,患儿皮肤无黄染,精神正常,食欲好,轻度贫血。医嘱给予口服惠血佳,一月后复查均正常。

关键词:新生儿溶血病;换血
中图法分类号:R725.556.205 文献标识码:B

参考文献:

[1] 肖星甫. 输血技术手册[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1992.308—309.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net