DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.013
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1280 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1280-04

川芎嗪对大剂量化疗小鼠骨髓基质细胞损伤的保护作用

梁后杰,李建军,胡绍毅 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 观察川芎嗪对大剂量甲氨喋呤(MTX)化疗所致骨髓基质细胞(BMSC)损伤的保护作用及其量效关系。方法 建立大剂量MTX化疗损伤BMSC的小鼠模型后,按每千克体重腹腔注射川芎嗪0mg(对照组)、20 mg(Ⅰ组)、40mg(Ⅱ组),1次/d,第21天采取骨髓细胞进行体外BMSC培养、成纤维细胞集落(CFU-F)计数、BMSC层粘附率测定和BMSC层上造血细胞混合集落培养。结果 BMSC生长、CFU-F计数、BMSC层粘附率、BMSC层上造血细胞混合集落数目均表现为Ⅱ组>Ⅰ组>对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 川芎嗪对大剂量MTX引起的BMSC损伤有明显的保护作用,且呈剂量依赖性。

关键词:骨髓;基质细胞;甲氨喋呤;川芎嗪
中图法分类号:R282.71;R331.2;R730.53 文献标识码:A

Protective effects of ligustrazine on murine bone marrow stromal cells damage in mice after high-dose chemotherapy

LIANG Hou-jie, LI Jian-jun, HU Shao-yi (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the role of ligustrazine in the damaged murine bone marrow stromal cells (BMSC) after the administration of high-dose methotrexate (MTX) and its dose efficacy relationship. Methods After the murine models of BMSC damaged due to high-dose MTX were established, each mouse was intraperitoneally injected with ligustrazine of 0 (control group), 20 (group Ⅰ) or 40 mg/kg (group Ⅱ) once a day. On the 21st day bone marrow cells were harvested, then BMSCs were cultured; number of colony forming unit-fibroblast (CFU-F) was counted; the adhesive rate of BMSC was assayed and the growth of colony forming unit-mixed hematopoietic cells (CFU-Mix) on the BMSC layer was observed *in vitro*. Results The number of CFU-F and the adhesive rate of BMSC layer in group Ⅰ or group Ⅱ were significantly higher than those in control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and those in group Ⅱ were also significantly higher than those in group Ⅰ ($P<0.05$ or $P<0.01$). The growth of BMSC or CFU-Mix on the BMSC layer in group Ⅱ was faster than that in group Ⅰ, and that in group Ⅰ grew faster than that in control group. Conclusion Ligustrazine can significantly protec the damaged BMSC caused by high-dose MTX in dependence on its dose.

Key words: bone marrow; stromal cells; MTX; ligustrazine

肿瘤大剂量化疗为某些肿瘤的彻底治愈带来了希望之光,但大剂量化疗引起的骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells,BMSC)损伤却是导致患者造血功能长期不能恢复的重要原因之一,进而影响患者依从性和临床疗效[1]。研究证实,活血化淤药川芎嗪具有改善免疫诱导再生障碍性贫血小鼠造血微环境的作用[2]。因此,我们用川芎嗪进行实验,以探讨其是否具有预防或改善大剂量化疗所致BMSC损伤、促进骨髓造血功能重建的作用,为临床大剂量化疗后造血重建的中药调控和治疗提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性BALB/c小鼠20只,清洁级,10~12周龄,体重(20±2)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂

IMDM培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清(Hyclone),马血清(郑州佰安),Percoll分离液(Pharmacia),磷酸川芎嗪注射液(丽珠利民,批号:010208),甲氨喋呤(浙江万马,批号000705)。

1.3 动物分组及处理

小鼠20只,随机排列表法分为4组,每组5只,相对无菌饲养。川芎嗪Ⅰ组(简称Ⅰ组):小鼠尾静脉注射MTX 40 mg/kg体重制成BMSC损伤模型后,次日腹腔注射磷酸川芎嗪注射液20 mg/kg,1次/d,连用20 d;川芎嗪Ⅱ组(简称Ⅱ组):按以上方法制模后腹腔注射川芎嗪40 mg/kg,用法如上;对照组:按以上方法制模后腹腔注射生理盐水0.2 ml,用法如上;正常组:尾静脉注射0.01 mol/L PBS液,腹腔注射生理盐水0.2 ml,用法如上。MTX注射当日计为第0天。

1.4 外周血白细胞计数

第20天采集尾静脉血,按常规方法计数白细胞。

1.5 骨髓单个核细胞(BMMNC)制备

第21 d颈椎脱臼处死小鼠,无菌分离双侧股骨、胫骨,去两侧骨端,用IMDM培养基反复冲洗骨髓腔制成骨髓单细胞悬液,以1∶1的比例顺离心管壁加在比重为1.082 g/ml的Percoll分离液表面,离心(2 000 r/min离心15 min),吸取悬于分层界面的细胞,再离心洗涤3次,重新悬浮制成BMMNC悬液,鉴定活性、计数后备用。

1.6 细胞培养液制备

参照Dexter骨髓长期培养体系[3],IMDM培养基内含10%胎牛血清、10%马血清、10^{-6} mol/L氢化考的松、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素,pH 7.2~7.4。

作者简介:梁后杰(1964-),男,河南省商丘市人,博士,主任医师,教授,主要从事造血干细胞移植和肿瘤耐药机制研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754128

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-08-04

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

1.7　CFU-F 培养及计数

调整 BMMNC 浓度为 4×10^5/ml, 每孔 1 ml 接种于 24 孔培养板中, 于 37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。第 7 天半量换液, 第 14 天终止培养, 生理盐水洗涤, 倒置显微镜下计数, 40 个左右梭形细胞的集落计为 1 个 CFU-F[4]。

1.8　BMSC 培养[4]

调整 BMMNC 浓度为 2×10^6/ml, 每孔 1 ml 接种于 24 孔培养板中, 于 37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。第 3 天全量换液, 以后每周半量换液 1 次, 同时进行形态学观察并定期照相记录。

1.9　BMSC 层粘附率测定

第 4 周 BMSC 层以 PBS 冲洗 2 次, 充分去除悬浮细胞, 然后各孔加入细胞浓度为 4×10^5/ml 含 20% 胎牛血清的正常 BALB/c 小鼠 BMMNC 悬液 1 ml, 再次培养 2 h 后轻轻冲洗 2 次, 收集并计数未粘附细胞, 按下述公式计算 BMSC 层对正常 BMMNC 的粘附率:

$$\text{BMSC 层粘附率}=\left(1-\frac{\text{未粘附细胞数目}}{4\times 10^5}\right)\times 100\%$$

1.10　BMSC 层上造血细胞混合集落培养

第 4 周 BMSC 层用 ^{60}Co γ 射线照射 15Gy, 轻轻洗涤 2 次, 然后各孔加入细胞浓度为 2×10^5/ml 的含 20% 胎牛血清的正常 BALB/c 小鼠 BMMNC 悬液 1 ml, 继续培养 7 d, 观察并记录造血细胞混合集落生长情况。

1.11　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 SPSS 11.0 进行 t 检验。

2　结果

2.1　外周血白细胞计数

对照组、Ⅰ组、Ⅱ组白细胞计数均显著低于正常组($P<0.01$); Ⅰ组、Ⅱ组较对照组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Ⅱ组显著高于Ⅰ组($P<0.05$), 见表 1。

表 1　川芎嗪对大剂量 MTX 化疗后小鼠各指标的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of ligustrazine on mice after high-dose MTX ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	WBC ($\times 10^9$/L)	CFU-F (/4×10^5 BMMNC)	Adhesive rate (%)
Normal	6.24±0.17	20.4±1.7	80.5±1.7
Control	4.24±0.26**	12.4±1.8**	39.9±1.9**
Ligustrazine Ⅰ	4.76±0.26**△	14.9±1.5**△	62.0±1.7**△△
Ligustrazine Ⅱ	5.28±0.23**△☆	17.7±1.4*△△☆	78.7±1.5△△☆☆

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* normal group; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* control; ☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$ *vs* ligustrazine Ⅰ group

2.2　CFU-F 计数

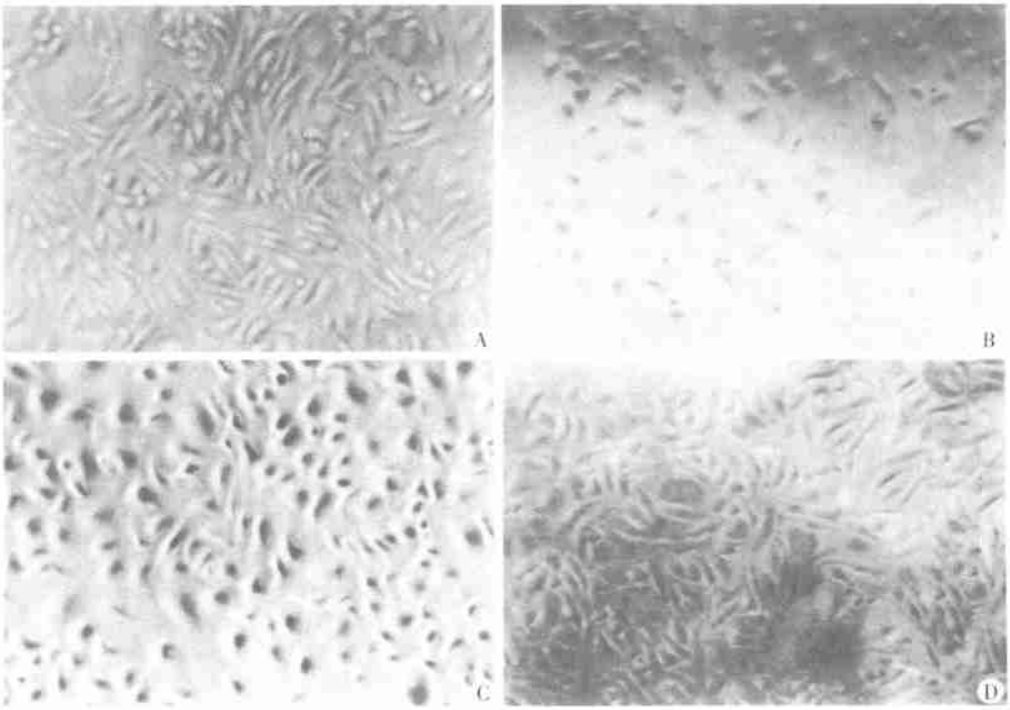
对照组、Ⅰ组和Ⅱ组 CFU-F 计数低于正常组($P<0.01$, $P<0.05$); Ⅰ组、Ⅱ组较对照组增多($P<0.05$, $P<0.01$); Ⅱ组高于Ⅰ组($P<0.05$)。

2.3　BMSC 层对正常小鼠 BMMNC 的粘附率

对照组和Ⅰ组粘附力较正常组显著降低($P<0.01$), 而Ⅱ组与正常组无显著性差异($P>0.05$); Ⅰ组和Ⅱ组较对照组显著升高($P<0.01$); Ⅱ组高于Ⅰ组($P<0.01$)。

2.4　BMSC 形态及生长情况

正常组在培养过程中 BMSC 逐渐增多, 以梭形成纤维细胞为主, 胞体较大, 伪足明显, 呈旋涡状或平行样生长, 培养 4 周后细胞融合成单层; 对照组 BMSC 较正常组显著减少, 梭形成纤维细胞比例降低, 胞体较小较短, 生长散乱, 培养 4 周后融合差; Ⅰ组梭形成纤维细胞也较少, 而圆形、不规则形细胞比例增加, 经 4 周培养细胞融合也较差, 但较对照组生长加快; Ⅱ组梭形成纤维细胞比例增多, 伪足较明显, 细胞排列较整齐, 培养 4 周基本能融合成层, 见图 1。



A, B, C, D: normal, control, ligustrazine Ⅰ, ligustrazine Ⅱ group respectively

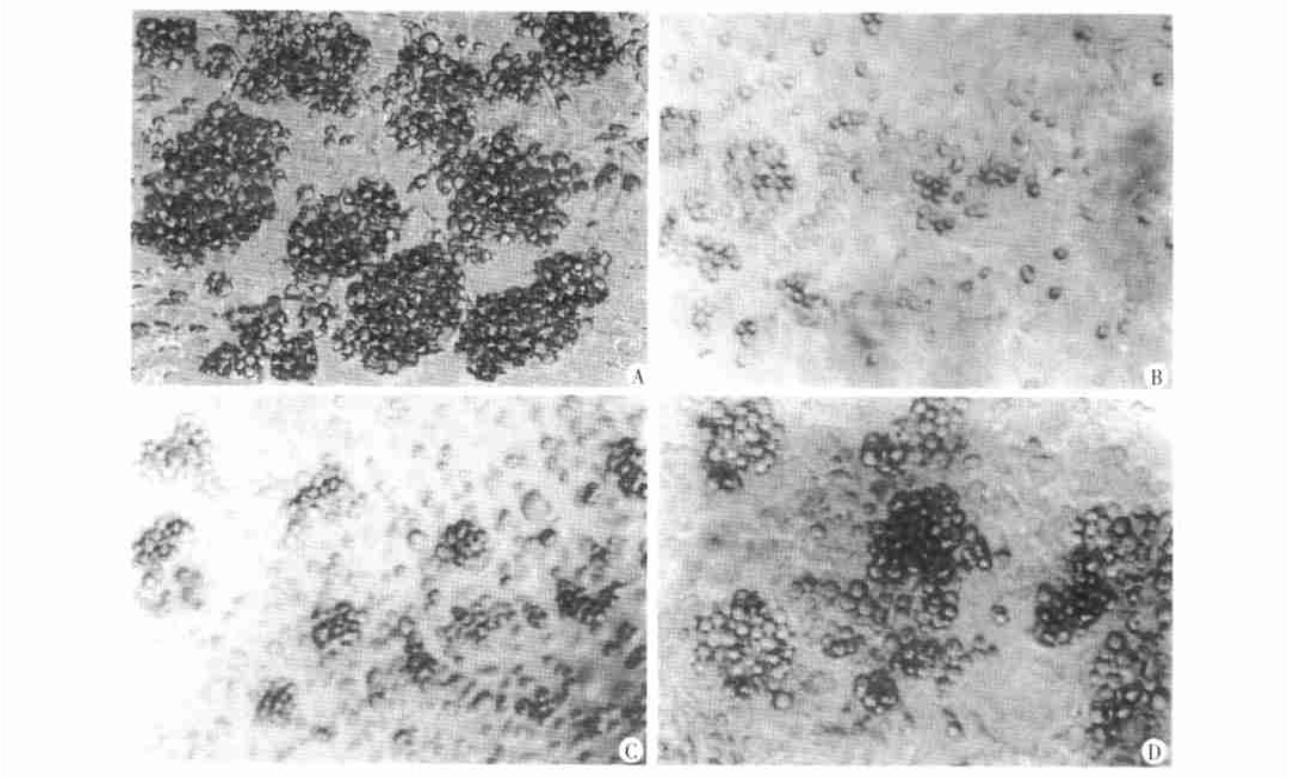
图 1　各组 BMSC 形态　(光镜×100)

Fig 1　Morphology of BMSC in different group　(LM×100)

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

2.5 BMSC 层上造血细胞混合集落生长情况

正常组 BMSC 层上造血细胞混合集落大而密集；对照组集落小，呈凋零状；Ⅰ组集落较小，排列松散；Ⅱ组集落较大而密集，与正常组无明显差异，优于对照组和Ⅰ组，见图 2。



A, B, C, D: normal, control, ligustrazine Ⅰ, ligustrazine Ⅱ group respectively

图 2 各组 BMSNFC 层上造血细胞混合集落形态 （光镜× 100）

Fig 2 Morphology of BMSNFC in different groups （LM× 100）

3 讨论

BMSC 主要由成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞和外膜网状细胞等组成，通过与造血细胞的紧密接触、分泌细胞外基质和多种细胞因子，对机体造血调控具有重要作用[3]。BMSC 的损伤可导致 BMSC 造血调控功能障碍，进一步影响造血细胞的存活、定居、增殖、分化、发育和成熟，结果引起机体自主造血功能重建延迟或不能重建[1, 6]。

本实验尽量模拟人体化疗或治疗模式，MTX 或川芎嗪的剂量均根据人-鼠体表面积换算公式[7]计算而来。大剂量 MTX 可引起小鼠 BMSC 生长变慢、CFU-F 形成能力降低、粘附力下降、对造血细胞生长的支持作用减弱、外周血白细胞计数减少，表明我们建立的大剂量化疗导致 BMSC 损伤的模型是成功的。

在免疫诱导再生障碍性贫血小鼠的研究中，已有作者发现经川芎嗪治疗后，CFU-F 计数较再障组增加约 2.5 倍，BMSC 以梭形成纤维细胞为主，生长浓密且均匀，BMSC 的粘附能力增加约 29%[2]，表达 VCAM-1 的 BMSC 数目增加，阳性率接近正常，是再障组的 2 倍[8]。另有研究发现川芎嗪能明显增加放射损伤小鼠的 S 期 BMSC 数目，促进 BMSC 增殖和减少细胞凋亡[4,9]。这些研究结果均提示川芎嗪具有促进免疫或放射损伤 BMSC 的生长和改善粘附功能的作用，但川芎嗪对大剂量化疗损伤的 BMSC 是否具有保护或改善作用尚未见报道。我们的研究结果表明：川芎嗪对大剂量 MTX 所致 BMSC 损伤具有保护作用，以恢复损伤 BMSC 的粘附功能为主，同时促进生长和造血支持作用。提示川芎嗪通过改善损伤 BMSC 与造血细胞的粘附而促进二者的紧密接触、通过促进损伤 BMSC 的生长而增加细胞外基质和造血细胞因子的分泌，从而增强调控造血的作用，达到辅助机体造血重建的目的。目前尚无证据表明川芎嗪能促进造血细胞的生长，本研究发现外周血白细胞计数较对照组增多，即从侧面证实川芎嗪具有促进造血重建的作用。

我们在研究中还发现较低剂量川芎嗪对大剂量 MTX 化疗所致 BMSC 损伤的保护作用不太明显，而较高剂量川芎嗪的保护作用明显增强，其量效关系显示川芎嗪对损伤 BMSC 的保护作用具有剂量依赖性的特点。

我们的研究结果表明，在肿瘤的大剂量化疗中，同时应用川芎嗪治疗，可减轻化疗所致 BMSC 损伤，有利于骨髓自主造血功能的恢复。

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

参考文献：

[1] Banfi A, Bianchi G, Galotto M, *et al*. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment[J]. Leuk Lymphoma, 2001, 42(5): 863－870.
[2] 孙汉英, 舒砚君, 刘文励, 等. 川芎嗪改善免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境作用的研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(4): 178－180.
[3] Dexter T M, Allen T G, Lajtha L G. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 1977, 91(3): 335－344.
[4] 郑德先, 吴克复, 褚建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999. 24－35.
[5] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 875－884.
[6] Keating A, Berkahn L, Filshie R. A phase I study of the transplantation of genetically marked autologous bone marrow stromal cells[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(4): 591－599.
[7] 孙瑞元. 定量药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 243－248.
[8] 董凌莉, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞粘附分子作用研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(4): 178－179.
[9] 孙 岚, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对放射损伤小鼠骨髓基质细胞 FAK 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(5): 266－267.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2002)11-1283-01

个案与短篇

适形放疗治疗胸腺类癌并异位 ACTH 综合症术后复发 1 例

A case report of treating postoperative recurrence of thymic carcinoid combined with ectopic ACTH syndrome by conformal radiotheray

阮志华, 庞学利 （第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科, 重庆 400038）

患者男, 56 岁, 因“肥胖、双下肢水肿、夜尿增多半年, 加重伴心悸 1 月”入院。查体: 向心性肥胖, 双下肢膝下指压性水肿, 心、肺等检查无明显异常。患者血压偏高, 波动于 18～23/10～14 kPa, 曾行多次生化检查, 提示持续性低血钾(2.0～3.0 mmol/L), 口服氯化钾不能纠正。皮质醇节律试验提示皮质醇普遍高于正常, 节律消失, 血尿醛固酮值减低。CT 示胸部主动脉窗旁软组织块影, 边界清楚, 内有稍高密度条状影, 肺门及纵隔未见肿大淋巴结, 考虑纵隔肿瘤。遂行肿瘤切除术, 术中见肿瘤位于前纵隔, 约 6.0 cm×7.0 cm 大小, 质硬, 包块与心包紧密粘结, 包绕左侧膈神经, 与肺及其它组织无粘连, 肉眼下完整切除。手术标本病理检查结果为: 胸腺类癌。结合临床表现诊断为: 胸腺类癌合并异位促肾上腺皮质激素(ACTH)综合症。术后未行其他治疗, 患者肥胖及其他症状逐渐消失, 临床治愈。2 年半后患者渐感胸部闷胀, 头昏, 下肢乏力以及面部肥胖, 类似初次发病之症状。经 CT 检查发现前上纵隔肿瘤复发伴纵隔淋巴结转移。考虑手术无法完整切除肿瘤, 采用 6MV－X 线三维适形放射治疗, 靶区剂量每 4 周 60 Gy/20 次, 治疗过程顺利。放疗结束后 1 月复查, 患者自觉症状消失, 面部肥胖明显减轻, 接近正常; 3 月后复查, 患者面部恢复正常, CT 显示纵隔包块明显缩小, 疗效为部分缓解(PR), 目前仍在随访中。

讨论

目前研究表明胸腺类癌发生于胸腺内的 Kulehitsky 细胞, 一般认为胸腺类癌发病率较低, 且多不伴类癌综合症。国外有人统计类癌 1 342 例, 发生在胸腺和纵隔的类癌只有 69 例, 占 5.1%, 无 1 例伴类癌综合症; 但也有报道指出 40% 的胸腺类癌伴有不同程度的柯兴综合症。胸腺类癌的治疗以手术切除疗效最为确切, 凡能完整切除者多能治愈, 但局部复发率高达 20%[1]。张志庸[2]报道胸腺类癌的切除率仅为 50%, 故放疗在其术后治疗中有重要作用。胸腺类癌发病率低, 至今尚无有关放疗的详细统计学报告。何家琳[3]分析了 6 例异位 ACTH 综合症的放射治疗病例(其中胸腺类癌 3 例), 认为异位 ACTH 分泌瘤属于中等敏感的肿瘤, 根治剂量需 60 Gy, 术后预防照射需 50 Gy。结果显示, 给予 60 Gy 的剂量照射, 近期疗效显著, 说明放疗是胸腺类癌治疗的有效方法, 特别适合于复发、纵隔转移的患者。三维适形放射治疗具有治疗精度高, 剂量分布准确, 对周围正常组织保护好的优点, 较常规放疗具有较多的优越性。患者远期疗效尚待进一步观察。

关键词: 适形放疗; 胸腺类癌; 异位 ACTH 综合症
中图法分类号: R736.305 文献标识码: B

参考文献：

[1] 王德元. 胸部肿瘤学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1994. 227－228.
[2] 张志庸, 任 华, 于洪泉, 等. 影响胸腺肿瘤切除与预后的诸因素分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1994, 16(5): 375－377.
[3] 何家琳, 周觉初, 陆召麟. 异位促肾上腺皮质激素综合症的放射治疗[J]. 中华肿瘤杂志, 1992, 14(3): 204－206.

（编辑 薛国文）

作者简介: 阮志华(1971－), 男, 湖北省枝江县人, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的综合治疗方面的研究。电话: (023)68754000－73133
收稿日期: 2001-07-13; 修回日期: 2002-01-30

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