DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.037

可能性极小。

^{153}Sm-EDTMP 治疗较之其它化疗药物及放疗毒副作用较小，仅表现出部分病人消化道症状，暂时性骨痛加剧，白细胞轻微降低，而在停止治疗后3周内多数自行上升4.0×10^9/L。该疗法临床应用安全可靠，用药剂量可依病情灵活掌握。根据本回顾性研究结果，我们认为在病人可以耐受的剂量范围内适当加大用药剂量。^{153}Sm-EDTMP 不失为一种应用前景良好的治疗肿瘤骨转移灶的内照射药物。

关键词 ^{153}Sm-EDTMP；转移性骨癌；疼痛缓解；生活质量

中图法分类号 R730.55

参考文献

1 Lattimer JC, Carwin LA, Stapleton J *et al*. Clinical and clinicopathologic effects of Samarium-^{153}Sm-EDTMP adiministered intravenously to normal beagle dogs. J Nucl Med, 1990;31:586

2 Farhanghi M, Holmes RA, Vorhut W *et al*. Samarium-^{153}Sm-EDTMP: pharmacokinetics, toxicity and pain respones using an escalating dose schedule in treatment of metastatic bone cancer. J Nucl Med,1992;33:1451

3 邓侯富，谭天秩，匡安仁等. 新的骨显像及骨肿瘤治疗剂^{153}Sm-EDTMP的初步应用. 中华核医学杂志,1992;12:27

4 Tumer JH, Martindale AA, Witt CG *et al*. Samarium-^{153}Sm-EDTMP chelate localization in melignant melanoma. Eur J Nucl Med,1987;13:432

5 唐 谨，李家秀，曹秀华等. ^{153}Sm-EDTMP 治疗多发性转移癌的临床研究. 中华核医学杂志,1994;14:211

6 Eary IF, Press OW, Badger CC *et al*. ^{153}Sm-EDTMP treatment of hormone refractory prostate carcinoma. J Nucl Med (Supplement),1990;31:755

7 Campa JA, Payne R. The management of intractable bone pain a clinical perspective. Semin Nucl Med,1992;22:3

(收稿:1995-04-11;修回:1995-12-10)

(编辑 沈锡庚、王 红)

绞股蓝皂甙与 AWS 减轻庆大霉素对培养肾小管上皮细胞损伤的探讨

Preliminary study of the effect of gypenoside and AWS on the gentamicin-induced damages in cultured renal tubular epithelial cells

喻 陆 廖立生 (第三军医大学附属新桥医院肾脏内科) 重庆,630037

随着肾小管上皮细胞培养技术的发展，庆大霉素(GM)肾毒性的研究从原有的整体、器官、细胞水平已进展到亚细胞与分子水平。本文采用兔近端肾小管上皮细胞原代培养技术制作体外 GM 损伤模型，观察了细胞分裂增殖指数(PI)、S 期细胞数、G_2M 期细胞数的变化及膜 Na^+-K^+-ATPase 活力变化，并首次使用中药绞股蓝皂甙及 AWS 对 GM 肾毒性进行体外防治研究。现报告如下：

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绞股蓝皂甙(粉剂，纯度80%，重庆中药研究所提供)，AWS(一种能改变肾功能的中药，四川职业病防治所提供)，RNA 酶(Sigma USA)，碘化丙啶(Sigma USA)，哇马因(瑞士 Flank 公司)，ATP(上海生化研究所，批号:930187)，GM(四川长征制药厂，批号:931206)。

1.2 实验动物

新西兰大白兔，体重0.5～1.1 kg，由本校动物所提供。

1.3 肾小管上皮细胞培养

按文献[1]进行，将兔处死后无菌取肾，去包膜，分离肾皮质，剪碎后移入80目钢网筛，研磨并用生理盐水冲洗，于100目钢网筛上收集肾小管节段(过筛后相差显微镜检查肾小管纯度可达90%)，将其置于离心管内，用无血清 RPMI 1640培养液冲洗，3000×g 离心5 min，上述小管节段离心后弃洗液，经0.2%胰蛋白酶37℃消化10 min，中止消化后加入含10%小牛血清的 RPMI 1640培养液(无青、链霉素)，置37℃，5%CO_2孵箱中培养，细胞贴壁后约1 d 其外周开始长出细胞，3 d 后细胞增多，此时降低小牛血清浓度至5%，6 d 左右细胞铺满培养瓶。

1.4 肾小管上皮细胞鉴定

采用扫描电镜，透射电镜及碱性磷酸酶染色。

1.5 实验分组

取原代培养第3天的细胞，倒去原培养液。实验分4组：①正常组即含5%小牛血清的 RPMI 1640培养液中培养的细胞。②致伤组即暴露在含1 mmol/L GM 和5%小牛血清的 RPMI 1640培养液的培养细胞。③绞股蓝皂甙组(GPS)即在加入含1 mmol/L GM 和5%小牛血清的 RPMI 1640培养液12 h 后再加

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

入 GPS 40 mg/L(终浓度)的培养细胞。④AWS 组即加入含1 mmol/L GM 和5%小牛血清的 RPMI 1640培养液12 h 后再加入 AWS 40 mg/L(终浓度)的培养细胞。四组培养72 h 分别观察指标的改变。

1.6　指标检测方法

细胞分裂增殖指数、细胞周期分布测定采用流式细胞仪法[2]。

培养细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 活性测定采用哇巴因抑制法[3]。

2　结果

2.1　肾小管上皮细胞的鉴定

透射电镜见细胞内有丰富的线粒体和粗面内质网，扫描电镜见细胞表面有微绒毛、碱性磷酸酶染色为阳性，以上结果表明细胞来源于肾的近端小管。

2.2　培养72 h 细胞分裂增殖指数、S 期细胞数、G_2M 期细胞数及细胞膜 Na^+-K^+-ATP 活力变化(见附表)

附表　培养细胞 PI、S 期细胞数、G_2M 期细胞数(%)及膜 Na^+-K^+-ATPase 变化

(μmol pi/mg pro/10 min)($\bar{x}\pm s$)

	n	GM 组	正常组	GPS 组	AWS 组
PI	6	11.04±1.93	22.72±1.57*	19.48±0.52*#	16.32±1.91*#@
S 期	6	6.95±0.79	11.00±1.82*	9.73±2.34*#	8.48±2.58*#@
G_2M 期	6	4.13±1.48	11.72±1.92*	9.78±2.67*#	7.87±3.76*#@
Na^+-K^+-ATPase 活力	6	14.41±0.91	37.06±1.12*	35.04±1.18*#	32.20±1.09*#△

*：与 GM 组相比，$P<0.01$；#：与正常组相比，$P<0.01$；@：与 GPS 组相比，$P<0.05$；△：与 GPS 组相比，$P<0.01$。

附表示 GM 组 PI 值、S 期细胞数、G_2M 期细胞数、膜 Na^+-K^+-ATPase 活力非常显著低于正常组，P 值均<0.01；GPS 组、AWS 组 PI 值、S 期细胞数、G_2M 期细胞数、Na^+-K^+-ATPase 活力非常显著高于 GM 期，P 值均<0.01；GPS 组 PI 值、S 期细胞数、G_2M 期细胞数显著高于 AWS 组，$P<0.05$；GPS 组膜 Na^+-K^+-ATPase 活性非常显著高于 AWS 组，$P<0.01$。

3　讨论

国外于80年代开始进行近端肾小管上皮细胞培养，并使其技术逐步完善。国内于80年代中晚期在沿海部分城市开展了此项研究。本实验采用筛网分离法成功地培养出兔原代近端肾小管上皮细胞，并在此基础上建立了体外庆大霉素损伤模型。

现已知所有细胞或处于分裂期或处于间期，G_1期主要发生 DNA 合成，G_2期 DNA 含量加倍，因此当 S 期细胞数、G_2M 期细胞数及细胞分裂增殖指数下降，表明细胞 DNA 合成，含量亦下降。本实验观察到 GM 组 PI，S 期细胞数、G_2M 期细胞数较正常组下降非常显著。($P<0.01$)，提示 GM 肾毒性致培养肾小管上皮细胞 DNA 含量下降。这与 Chan[4]报道的 GM 致肾小管上皮细胞 DNA 合成下降的结果一致。Na^+-K^+-ATPase 位于肾近曲小管侧膜，在维持细胞膜内电离子平衡起重要作用，若此酶活性和功能受损，则可导致细胞死亡。本实验观察到 GM 组 Na^+-K^+-ATPase 活性非常显著低于正常组 $P<0.01$。提示 GM 肾毒性致培养细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 活性下降。

绞股蓝为葫芦科绞股蓝属攀缘草本植物，其所含的皂甙中有4种与人参皂甙 Rb_1、Rb_3、F_2，Rd 结构完全相同，尚有多种皂甙经酶或酸水解后可转化为人参皂甙，该药具有抗脂质过氧化、降脂、抗衰老、耐疲劳、耐缺氧、镇静、催眠、促进学习记忆力，保护缺血心肌损伤，保护心肌缺血再灌注损伤，抑制血小板聚集等多方面的功效[5]。但其对 GM 肾毒性防治目前未见报道，本实验观察到：绞股蓝皂甙能非常显著减轻 GM 引起的 PI 值、S 期细胞数、G_2M 期细胞数及 Na^+-K^+-ATPase 活性下降。我科以往体内实验证明，AWS 能明显减轻 GM 对线粒体膜，溶酶体膜的损伤[6]。本实验观察到 AWS 能非常显著地减轻 GM 引起的培养细胞 PI 值、S 期细胞数、G_2M 期细胞数及膜 Na^+-K^+-ATPase 活性下降。实验结果提示：两种中药能减轻 GM 导致的肾小管上皮细胞的损伤，对于防治 GM 肾毒性均具有良好的应用前景。

关键词　绞股蓝皂甙；肾小管上皮细胞培养；庆大霉素；细胞分裂增殖指数；Na^+-K^+-ATPase

中图法分类号　R692.05

参考文献

1 田　劲，陈香梅. 冬虫夏草、大黄及肾大部切除大鼠血清对肾小管上皮细胞生长的影响. 中西医结合杂志，1991；11(9)：547

2 宋平根. 流式细胞仪的原理和应用. 北京师范大学出版社，1992：59～62

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

3 Kim MS. O_2 free radicals: cause of ischemic reperfusion injury to cardiac Na^+-K^+-ATPase. Am J Physiol, 1987; 252 (2): H252

4 Chan Du. Zinc-induced metallothionein synthesis could protect from gentamicin nephrotoxicity in suspended proximal tubules of rats. Renal Failure, 1994; 16(1): 61

5 李 林,形善田,周金黄. 绞股蓝总皂甙对离体大鼠肝脂质过氧化及膜流动性损伤的保护作用. 中国药理学通报, 1991; 7: 341

6 何娅妮,廖立生. AWS 对庆大霉素大鼠肾皮质亚细胞器膜损伤的保护作用. 四川医学, 1993; 14: 50

(收稿: 1995-04-24; 修回: 1996-03-06)

(编辑 冯崇英)

CB-HRP 电镜示踪技术在大鼠胚胎脊髓移植实验研究中的应用

Application of neuroanatomical tracing technique of electron microscopic CB-HRP histochemistry in experimental studies on transplantation of embryonic spinal cord tissue in rats

赵 刚* 廖维宏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室) 重庆, 630042

近年来,Jakeman 和 Reier[1]经采用麦芽凝集素结合辣根过氧化酶(WGA-HRP)、胶体金等神经示踪技术,在光镜下,观察到胚胎脊髓移植物与宿主脊髓之间可以建立良好的神经纤维联系,并推测移植物在重建宿主损伤脊髓的节间神经环路联系方面起重要作用。然而移植物与宿主之间其超微结构如何,能否建立神经突触联系,有关研究甚少。本研究将梁凤仪、万选才等学者[2]介绍的霍乱原 B 亚单位结合辣根过氧化物酶(Choleragen subunit B conjugated horseradish peroxidase, CB-HRP)神经组织化学电镜技术用于大鼠胚胎脊髓移植实验研究,取得了满意的结果,报告如下:

1 材料与方法

1.1 脊髓损伤模型与移植程序

健康 Wistar 大鼠,体重180～250 g,作为脊髓移植受体鼠。无菌条件下,咬除 T_{13}-L_1 椎板,暴露脊髓腰膨大部位[3],在腰膨大中段(L_1脊髓节段)横断左侧半脊髓,用显微手术刀损毁部分切断的脊髓组织,然后将其吸出,制成直径2～3 mm 的半切洞腔后备用。剖腹取出妊娠14 d 孕鼠完整的胚胎,在手术显微镜下,将胚胎脊髓与周围组织分离开来,用注射器将胚胎脊髓吸入尖端口径1 mm 玻璃管内,留少许吸至管口,再轻轻注入受体鼠脊髓洞腔内,显微镜下用8个零的无创缝合线,缝合切开的硬脊膜。

1.2 CB-HRP 的组织化学光、电镜检查

移植术后30～85 d,随机选取15只受体鼠,用梁凤仪、万选才所介绍的四甲基联苯胺(TMB)-钼酸铵(AHM)程序[2],分别进行 CB-HRP 组织化学光、电镜检查。其中5只受体鼠进行电镜检查,CB-HRP 由中国医学科学院基础所提供。

于宿主脊髓残端或坐骨神经干内注射0.3%CB-HRP, 8～10 μl,将其引入受体鼠脊髓及移植物内。存活48 h, 2.5%戊二醛及2%多聚甲醛混合固定液经左心插管灌注固定,移植部位取材,连续冰冻切片,厚40 μm,入新配制的含0.005%TMB 及0.25%AHM 的0.1 MPB(pH6.2)溶液中,预浸20 min, 0.3%双氧水呈色,至 HRP 呈墨绿色,反应达最佳效果,然后用 pH6.2 PB 换洗2次。

光镜检查切片,贴片于铬明矾处理过的载玻片上,阴干后,系列酒精脱水,二甲苯透明后 DPX 封片。

电镜检查切片入1%锇酸 PB 液(pH6.2)45℃锇化1 h,系列丙酮脱水,环氧树脂618包埋,包埋后切片挑于硅化载玻片上,以另一片压平,入烤箱聚合、硬化。光镜下选取移植物部位,修成1 mm×1 mm×1 mm 小块,用502粘于制备好的包埋块尖端。超薄切片后,铜、铀双染,JEM-1000SX 透射电镜观察。

2 结果

移植30 d,光镜下见胚胎脊髓移植物部分存活。移植45 d,光镜下可见移植物轮廓,但电镜下未发现 CB-HRP 标记结构。移植50 d,光镜下见移植物充满脊髓洞腔,虽为锇化后切片,移植物与宿主仍清晰可辨(图1)。电镜下观察到 CB-HRP 标记树突,此树突与多个非标轴突终末形成多对轴-树终末结构,此结构可能是突触发育或宿触重建中的前体结构,上述结构中非标轴突终末均含球形及椭圆形小泡,分布于与树突相接触的膜附

* 研究生,现在济南军区总医院骨创伤科 济南市, 250031

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