

科研论文与科研成果报告

止血新药“8401”对辐射后小鼠血小板和体外受照内皮细胞增殖力的保护作用

盛民立 陈思白 金慰芳 许立明 郁爱国 沈立刚 刘宗亮
黄振东 董欣 周卫平

(上海医科大学放射医学研究所)

摘要 毛细血管壁的损伤是辐射引起出血的重要原因,实验明显地证实“8401”: 3、4、5——三甲氧基苯甲醛(芥子酸胺盐衍生物)能升高辐射后小白鼠的血小板量,本文同时表明不同剂量“8401”对血管内皮细胞生长有影响,使用培养细胞(R₂₂₋₂₅)在室温中以 γ 线 15 Gy 照射后,再以细胞密度为 $3.5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种在 12 只培养瓶中,每二只培养并为一组,分别加“8401”1、2、3、4、5 微克,二只培养瓶作对照,细胞培养七天后,每用胰蛋白酶消化后计数,结果 1 μg 组细胞数为 1.86×10^5 并, 2 μg 组为 2.17×10^5 , 3 μg 组为 2.21×10^5 , 而对照组为 1.23×10^5 ; “8401”用药组细胞量大大多于对照组 ($p < 0.01$), 结果表明一定剂量的“8401”能刺激辐射后内皮细胞的生长,这可能是内皮细胞损伤后“8401”能促进其增殖能力。

关键词 内皮细胞, 辐射, 生长, 出血, 血小板。

引言

放射损伤所致出血除与血小板数量减少有密切关系外,一个重要原因是血管壁的损伤,特别是内膜(由内皮细胞组成)损伤更为重要: 体外培养血管内皮细胞是研究辐射损伤的主要手段之一,“8401”是本室药物合成组合成^[1], 本文研究了不同剂量的“8401”对辐射后小鼠血小板和体外受照血管内皮细胞增殖力的保护作用。

材料和方 法

动物 上海生物制品所动物房提供。系昆明种雄性小白鼠, 体重 22—24 g, 分正常对照组, 辐射对照组, 辐射治疗组。

表 1 “8401”提高辐射小鼠血小板用药方法

Table 1. drug method of “8401” to increase platelet of irradiated mice.

组 别 group	动物数(只) number of animal	给药途径 route	剂 量 dose	给 药 时 间 time of given drug
8401 治疗组 treatment	64	腹腔注射 i. p	0.5 mg/0.2 ml	辐照前 5 天开始给药每日一次 $\times 5$ Fifth day beginning before irradiation
生理盐水对照组 control(N. S)	74	腹腔注射 i. p	0.2 ml	q.d*5

内皮细胞培养 本实验室培养的兔主动脉内皮细胞 R_{22-25} , 即传至 22—25 代的细胞, 实验前后细胞均以台盼兰染色, 以活细胞数为准计数。

“8401”药物制备 内皮细胞实验用药, 准确称取 10 mg 的“8401”, 溶于 200 ml 重蒸馏水中, 然后高压消毒(8 磅 10 min), 使成 50 mg/ml 灭菌药液。小白鼠实验用药方法见表 1。

细胞的照射: 用 ^{60}Co 源在距 40 cm 处, 在室温下对 R_{22-24} 内皮细胞进行照射, 剂量率为 78.2 Gy/min, 照射时间 1 分 55 秒、总剂量 15 Gy、在室温下。受照细胞置于 5% CO_2 培养箱中培养, 于第二天以 0.25% 胰蛋白酶消化传代备用。

R_{22-25} 培养后三天、以 0.25% 胰蛋白酶消化, 内皮细胞游离于消化液中, 收集各瓶细胞于离心管中, 1000 转离心 10 分钟, 弃上清液, 沉淀细胞加含 20% 小牛血清的 199 培养液, 使细胞充分悬浮, 取 0.5 ml 细胞悬液以台盼兰染色, 然后计数, 结果得出 3.5×10^5 活细胞/ml, 分别以 3.5×10^5 细胞接种于 55 mm $\times$ 13 mm 之培养瓶中(共 12 瓶), 然后将 50 mg/ml 的“8401”1 ml 以 9 ml 含 20% 小牛血清的 199 培养液稀释成 5 μg /ml 以 5 种不同剂量(每组 2 并)加入已接种内皮细胞的培养瓶中, 见表 2。对照组不加“8401”, 以上均在无菌条件下操作、于 5% CO_2 , 37℃ 培养箱中培养, 在培养后第 3 天换培养液, 至第七天弃培养液、加 2 ml 0.25% 胰蛋白酶消化, 每组取 8 个样品进行细胞计数(台盼兰染色以活细胞为准), 取平均值为每瓶细胞数。

表 2 “8401”的剂量分组
Table 2. Dose group of “8401”

8401原液 primary solution	Dose 剂量				
	1 μg	2 μg	3 μg	4 μg	5 μg
加 5 μg /ml 的毫升数 addition ml number of 5 μg /ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0 /

小鼠的照射条件: ^{60}Co 源, 剂量率 78.2 Gy/min, 一次全身照射 5 Gy, 于照后第 10 天采用直接计数法计数血小板数。

结 果

培养兔主动脉内皮细胞融合时呈单层相嵌排列, 不出现重叠生长(图 1), 受照射后内皮细胞

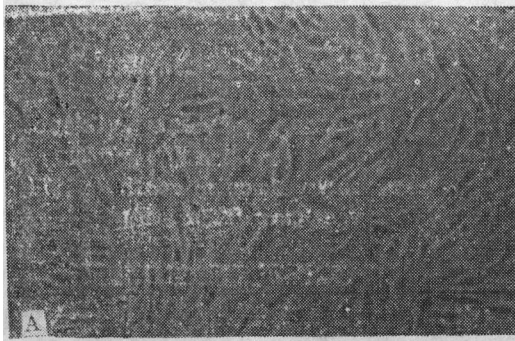


图 1 正常内皮细胞呈单层相嵌排列
 $R_{22-24} \times 100$

FIG. 1 Normal endothelial Cells show monolayer and mosaic in pattern



图 2 照射 15 Gy 后第七天, 细胞明显增大, 不规则 $R_{22-25} \times 100$

FIG. 2 Cell enlargement and its irregular pattern from the seventh day after irradiation for 15 Gy

的生长受到明显抑制,已被我们以前所做的受照内皮细胞生长曲线观察所证明。照射 15 Gy 后第七天的内皮细胞形态出现明显变化,特别是细胞体积明显增大,细胞边缘不规则[图 2],在使用不同剂量的“8401”以后,细胞形态和未照射组比较变化不大。

每瓶接种 3.5×10^5 细胞受照射后第 7 天后进行消化,收获的细胞大为减少(以台盼兰染色后计数活细胞为准)。但给“8401”药物实验组虽然细胞数也明显减少,但小剂量组(即 1、2、3 μg)细胞数较对照组有明显提高,分别达到 1.88×10^5 和 2.21×10^5 细胞数。经统计处理与对照组比有显著性差别($p < 0.01$),大剂量(即 4、5 μg)细胞数与对照组基本上没有差别,无统计意义(见表 3)。

表 3 不同剂量“8401”对培养内皮细胞增长影响

Table 3. influence of different dose “8401” on the Growth of cultured endothelial cells

组 别 group	1 μg	2 μg	3 μg	4 μg	5 μg	control
内皮细胞数 number of EC 10^5	1.86 ± 0.33	2.17 ± 0.20	2.21 ± 0.66	1.15 ± 0.14	1.16 ± 0.27	1.23 ± 0.17
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01			

用同样的“8401”不同剂量,对正常未经照射的内皮细胞无促进增殖的作用(表 4)。

表 4 不同剂量“8401”对正常内皮细胞生长影响*

Table 4. influence of different dose “8401” on The Growth of normal endothelial cells*

组 别 group	对 照 组 control	组 药 组 given “8401” drug group					(μg)
		1	2	3	4	5	
细 胞 数 number	2.42	2.76	2.84	2.45	2.43	2.65	
of cell, $\bar{x} + \text{SD} \times 10^5$	± 0.43	± 0.76	± 0.60	± 0.21	± 0.59	± 0.65	

* Cell count on seventh day after culture

* 为培养后第七天的细胞计数

从实验结果看,辐射对照组小鼠在第 10 天的血小板平均值是 10.99 ± 6.45 万/ mm^3 ,辐射治疗组为 22.04 ± 10.22 万/ mm^3 ,治疗组比对照组高 100%,经统计学处理表明两者的差异非常显著[表 5]。

同样,“8401”药给予正常小鼠后第 10 天计数血小板,结果表明与正常小鼠的血小板数无差异(表 6)。

表 5 “8401”对照后小鼠血小板的作用

Table 5. Effect of “8401” on platelets of irradiated mice

组 别 group	动 物 数 (只) number of animal	照后第十天血小板数 number of platelets	P 值 P
治 疗 组 treatment	64	$22.02 \pm 10.22/\text{mm}^3$	< 0.01
对 照 组 control	74	$10.99 \pm 6.45/\text{mm}^3$	

表6 “8401”给药正常小鼠与非给药组血小板比较

Table 6. A Platelet comparison between “8401” given drug group and control group

组别 group	药物 drug	动物数 number of animal	给药途径 Route	给药剂量 dose	血小板值 M±S value of platelet	P值
正常给药组 normal given drug	“8401”	10	i. p 腹腔	5 mg/0.2	86.12±4.45	<0.05
正常对照组 normal control	生理盐水 N. S	10	i. p 腹腔	0.2	85.16±6.47	

讨 论

血管内皮在血液和其管壁组织之间形成有选择性屏障,并对调节止血和血管通透性均是重要的^[2];放射损伤时血管内皮细胞的机能和结构改变,是引起出血的主要原因之一。Гуськова等^[3]认为放射病出血除了血小板减少外,血管通透性障碍起了重要作用,而血管通透性增高是由于受照静脉和毛细血管内皮细胞收缩和变圆所致^[4],随着内皮细胞间隙增宽,加上基底膜的改变,导致大分子物质以致红细胞渗出,引起出血。

为了更好地研究内皮细胞在辐射损伤下的改变和修复,培养内皮细胞提供了一个很好的研究手段,“8401”是新合成的芥子酸胺盐衍生物,本实验证明其能提高辐射后小鼠血小板数,这与1978年报道的咖啡酸胺盐实验结果相类似^[5]。据报道^[6,7]芥子酸胺盐衍生物对辐射引起血小板减少具有一定的保护作用,在血小板生成没有完全抑制的情况下,对巨核母细胞或巨核系统较成熟也可能有一定的保护作用。这一报导与我们的实验结果也相一致。有学者证明^{[8][9]}:血小板对维持血管完整性起着明显作用,在血小板减少情况下,观察到血小板和血管内皮之间有着密切的相互关系,内皮细胞损伤时,血小板参与内皮细胞的修复,本实验的结果初步证明,“8401”在一定剂量时对受照射的培养内皮细胞生长有促进作用,而对未受照射的正常细胞没有促进作用,就是说在内皮细胞损伤的情况下,“8401”有促进其增殖的作用。鉴于“8401”对辐射后小鼠血小板和体外受照内皮细胞增殖力均有保护作用,我们初步认为芥子酸胺盐衍生物——“8401”可能有利于受照内皮细胞损伤的修复,从而对防止血管壁损伤所致出血具有一定的效果,为进一步了解“8401”的作用、有必要更深入研究。

参 考 文 献

- [1] 黄振乐,王礼嫻,董欣,林念芸,合成芥子酸胺盐衍生物的辐射防护机理研究,辐射研究与辐射工艺学报 4(3) 39~44 (1986).
- [2] Gordon PB. et al: Long-term culture of human endothelial cells In vitro 19(9) 661~671 (1983).
- [3] Гуськова, А. К, ИАП: In “Radiation Sickness in man” MOSCOW 69 (1971).
- [4] Ойван ЦАЦ АР: Пронцаемость сосудов прдцействчй на органчзм прфнчкаюпей радчацчч радчобччолччя 11(3)367 (1971).
- [5] 南京药学院编,“药物化学”1978年南京药学院止血药科研组,血凝酸胺实验及临床研究总结.
- [6] Macpherson G. G. Changes in megakaryocyte Development Following thrombocytenia—“Brit J. Heamat”. V. 29, N1: 105~115 (1974).
- [7] Odell T. T. Jaorson C. W. Friday T. J. Effect of Radiation on the thrombocytopoietic System of Mice—“Radiat. Res” V. 48, N1 107~115 (1971).
- [8] 金为翘等译,“急性放射病出血综合征”,109原子能出版社(1983).

[9] Chung-Hsin TS'AO et al: Acute radiation effects on the content and release of plasminogen activator activity in cultured aortic endothelial cells Radiat. Res 101, 394~401 (1985)

((稿件收到日期 1986 年 3 月 3 日))

THE PROTECTIVE EFFECT OF NEW HAEMOSTATIC “8401” ON THE PLATELET IN IRRADIATED MICE AND THE PROLIFERATION OF ENDOTHELIAL CELLS BY IRRADIATION

Sheng Minli Chen Sibai Jin Weifang

Xu Liming Yu Anguo Shen Ligang Iiu Zong Iiang

Huang Zheudong Don Xin Zhou Weipian

(Institute of Shanghai Radiation Medicine Shanghai Medical University)

ABSTRACT The damage of capillary wall is the important cause of hemorrhage induced by radiation. Experiment showed previously that “8401”: 3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-Propenoic acid ethylene diamine salt increased platelet number of the irradiated mice. This paper observed the “8401” effect of different dose on influence of proliferation of the endothelial cells. The cultured cells of R_{22-26} were irradiated with ^{60}Co r-ray (15 GY) at room temperature, then the Cells with an initial density of 3.5×10^5 cells/ml were plated on twelve dishes and 1-5 μg of “8401” were added into two dishes each (except the dishes as control.) By the seventh days after plating cells, each dish were trypsinized and counted with a blood counter. The result was: 1 μg group obtained cells count of 1.86×10^5 cells/dish, 2 μg group- 2.17×10^5 3 μg group- 2.21×10^5 respectively, but control group is 1.23×10^5 cells/dish. The cells count in “8401” group was much higher than control ($p < 0.01$). The results show that “8401” of a certain dose can stimulate growth of the irradiated endothelial cells and “8401” seem to promote proliferation of the endothelial cells in case of the endothelial cell injury.

KEY WORD Endothelial Cells; Radiation Growth; Haemostatic; platelet.