

抗放射性肺炎方对放射性肺损伤大鼠免疫功能的影响

陈不尤^{1*}, 王伟¹, 肖明兵², 江枫², 倪温慨², 袁菊萍¹, 马剑波¹, 顾红梅¹

(1. 南通大学附属医院肿瘤放疗科, 江苏 南通 226001;

2. 南通大学附属医院消化病研究室, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:**探讨抗放射性肺炎方(ARPD)对放射性肺损伤大鼠免疫系统的影响。**方法:**128只SD雄性大鼠随机分成正常对照组(A组)、单纯X射线照射模型组(B组)、地塞米松治疗组(C组)、ARPD治疗组(D组)。B、C、D组麻醉后行直线加速器(6 MV X射线)20 Gy单次胸部照射,C、D组照射后每日分别ig给予地塞米松($1.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和中药(ARPD, $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)治疗。A、B组ig给予等容积生理盐水灌服。照射后第7、15、30、50天取材,观察脾脏组织病理学改变;检测免疫器官指数、外周血淋巴细胞亚群、血清溶血素水平及腹腔巨噬细胞吞噬率。**结果:**ARPD治疗组较其他X射线照射组病变程度轻,且恢复快。至第50天,胸腺指数、脾脏指数、 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ T淋巴细胞、血清溶血素水平、腹腔巨噬细胞吞噬率ARPD治疗组均高于单纯X射线照射模型组和地塞米松治疗组($P < 0.05$)。**结论:**抗放射性肺炎方(ARPD)可以提高放射性肺损伤大鼠的免疫功能。

[关键词] 抗放射性肺炎方;放射性肺损伤;免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0248-04

Effects of Anti-radiation Pneumonia Decoction on Immune Function in Rats with Radiation-induced Pulmonary Injury

CHEN Bu-you^{1*}, WANG Wei¹, XIAO Ming-bing², JIANG Feng²,

NI Wen-kai², YUAN Ju-ping¹, MA Jian-bo¹, GU Hong-mei¹

(1. Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of anti-radiation pneumonia decoction (ARPD) on immune function in the rats with radiation-induced pulmonary injury. **Method:** SD rats were randomly divided into four groups: normal control group (group A), model group (group B), dexamethasone treatment group (group C) and ARPD treatment group (group D). Rats in group B, C and D were exposed to 6 MV X-ray at a dose of 20 Gy thoracically. After X-ray exposure group C and D were treated with dexamethasone ($1.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and ARPD ($35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) respectively by gastrogavage one time a day. The rats in group A and B were gavaged with equal volume 0.9% sodium chloride. The rats were sacrificed at days 7, 15, 30, 50 after X-ray exposure. Pathological changes in spleen tissues were observed and the index numbers of thymus and spleen, T-cell subgroups of peripheral blood, serum hemolysin level, phagocytotic rates of macrophage in abdominal cavity were detected respectively. **Result:** The pathological changes in group D were slighter and recovered sooner than those in other groups exposed to X-ray. After 50 days, the thymus and spleen indexes, CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , hemolysin levels, phagocytotic rates of macrophage in group D were higher than that in group B and C ($P < 0.05$). **Conclusion:** ARPD can improve the immune function in the rats with radiation-induced pulmonary injury.

[Key words] anti-radiation pneumonia decoction; radiation-induced pulmonary injury; immune function

[收稿日期] 20120729(004)

[基金项目] 江苏省南通市社会发展计划(S2008035)

[通讯作者] * 陈不尤,主任医师,从事肿瘤诊疗及其免疫学研究, Tel:15151365290, E-mail:15151365290@163.com

放射治疗可使患者免疫功能下降^[1],从而易发感染、导致肿瘤多发转移、诱发多种放射疾病。因此,提高机体免疫功能,增强机体抵抗力是提高辐射防护疗效的重要手段之一。目前临床抗放射损伤常规使用激素,但副作用较大。中医学认为^[2],放射损伤主要是造成人体热毒过盛,以致阴液亏损,气血不和,脾胃失调,以及肝肾阴津枯竭,多以清热解毒、养阴生津、益气活血、健脾开胃、滋肝补肾之法配合治疗,可减轻放疗的不良反应,增加患者的耐受性。先前我们运用中药经验复方-抗放射性肺炎方(ARPD)早期防治放射性肺损伤,临床获得良好的疗效。本实验旨在通过免疫指标的观察对比 ARPD 与激素治疗放射性肺损伤大鼠的差异,进一步探讨 ARPD 优于激素的原理,为临床进一步推广应用提供实验数据。

1 材料

1.1 药物、试剂 各中药材购自南通大学附属医院中药房,根据大鼠数量、每只大鼠的每日生药剂量、饲养天数算得生药总量。当归、赤芍、水蛭、黄芪、川芎、生地黄、丹参、香附、百部、瓜蒌、紫金牛以 1:0.8:0.65:0.8:0.8:1:1:2:1:2:1 的 ARPD 处方比例组成,使用中药煎药机,按下列步骤进行汤剂制备及质量控制:生药浸泡 40 min、加水量为生药总质量的 2 倍、煎药机工作压力 1.5 个大气压,温度 120 ℃ 煎煮 40 min。地塞米松(南京金陵制药厂,批号 081201),FITC anti-Rat CD3, APC anti-Rat CD4, R-PE anti-Rat CD8(均为联科生物试剂有限公司产品,批号分别为 85-11-0030-81, 85-17-0040-82, HH-MR5204)。

1.2 仪器 直线加速器(德国,西门子公司)、捷达 JEDA801D 形态学图像分析系统(江苏捷达科技发展公司)、流式细胞仪(美国,BD 公司)等。

1.3 动物 清洁级 SD 雄性大鼠 128 只,体重(200 ± 20) g,南通大学实验动物中心,生产许可证号 SCXK(苏)2008-0010。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠 128 只,随机分成 4 组:正常对照组(A组),单纯 X 射线照射模型组(B组),地塞米松治疗组(C组),ARPD 治疗组(D组),每组各 32 只。

2.2 放射性肺损伤大鼠模型建立 各组大鼠同等条件下饲养 3 d 后 B、C、D 组大鼠麻醉后以自行设计的固定及屏蔽装置行直线加速器照射(6 MV X-ray),剂量单次 20 Gy,照射野面积 4 cm × 4 cm (全

胸),肺表面 1.5 cm 填充物,受照射剂量率为 200 cGy·min⁻¹,照射距离 1 m。

2.3 给药 根据《医用实验动物学》人鼠剂量换算法^[3],ARPD 按成人每日每公斤体重生药量的 10 倍给药,每日 1 次,每次 10 mL·kg⁻¹(相当于生药 35 g·kg⁻¹·d⁻¹)。地塞米松治疗组照射后灌服地塞米松 1.5 × 10⁻³ g·kg⁻¹·d⁻¹。单纯 X 射线照射模型组和正常对照组大鼠同期每日给予等量生理盐水灌胃。分别在照射后第 7、15、30、50 天时,随机抽取每组大鼠各 4 只,用于器官指数、T 淋巴细胞亚群及巨噬细胞吞噬率测定,各组各时间点另 4 只用于血清溶血素检测。

2.4 指标检测

2.4.1 器官指数 于各时间点取每组大鼠 4 只,称重,完成巨噬细胞吞噬率检测后经胸、腹腔取胸腺、脾脏,称重,计算指数。

胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg)/体重(g)

2.4.2 T 淋巴细胞亚群 心脏取血 4 mL,肝素抗凝,以细胞分离液分离淋巴细胞,流式细胞仪分析 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 各 T 淋巴细胞亚群。

2.4.3 血清溶血素及腹腔巨噬细胞吞噬率的测定 按文献方法进行^[4],血清中溶血素的量以 HC₅₀ 表示;按下式计算巨噬细胞吞噬率。

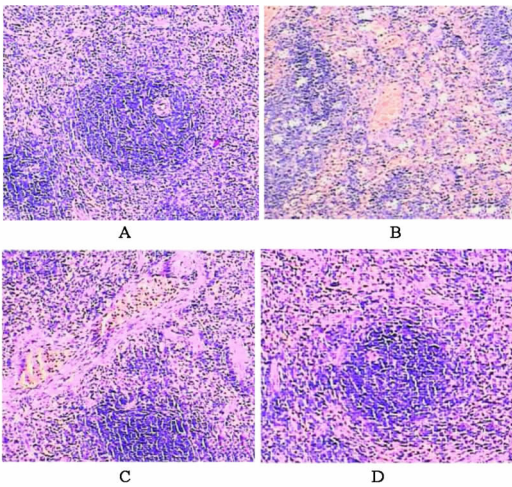
吞噬率 = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞/200 个巨噬细胞 × 100%

2.5 统计学处理 SPSS 17.0 统计软件分析数据,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般状况 正常对照组(A组)无异常。照射后 10 ~ 12 d B、C、D 组大鼠出现精神萎靡,反应迟钝,饮食、活动均减少,持续 4 ~ 5 d 后一般情况较前稍好转。照射 29 ~ 32 d 后,地塞米松治疗组大鼠精神状态、饮食、活动、体重日趋下降,明显脱毛,而 ARPD 治疗组大鼠照射 25 d 后,精神状态、饮食、活动、体重等一般情况好于模型组及地塞米松治疗组,无脱毛。

3.2 脾脏组织学观察 受照后第 7 天,脾小体结构消失,脾小梁变密,脾窦扩张充血,可见小出血灶, D 组较 B、C 组稍轻;第 15 天,脾小体结构仍有紊乱,脾窦扩张充血较前稍改善,仍可见小出血灶, D 组较 B、C 组轻;第 50 天, D 组脾小体及脾小梁结构恢复,脾窦无明显扩张充血, B、C 组较前无改善。(图 1)。



A. 正常对照组; B. X 射线照射模型组; C. 地塞米松治疗
 $1.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. ARPD 治疗 $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 X 射线照射后第 50 天各组脾脏病理
组织学改变(HE 染色, $\times 100$)

3.3 对胸腺及脾脏指数的影响 受照各组胸腺及脾脏指数均明显下降,在治疗初期(15 d),地塞米松治疗组、ARPD 治疗组均有恢复。但随着治疗时间的延长,地塞米松治疗组则下降,而 ARPD 治疗组则持续恢复。至照射后第 50 天 ARPD 治疗组两指数均高于模型组,而地塞米松治疗组脾脏指数明显低于模型组(表 1)。

表 1 照射后第 50 天 ARPD 对胸腺及脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)
 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾脏指数
正常对照	-	$1.32 \pm 0.15^{2)}$	$2.85 \pm 0.49^{2)}$
X 射线照射模型	-	0.73 ± 0.08	1.53 ± 0.13
地塞米松	1.5×10^{-3}	0.66 ± 0.07	$0.83 \pm 0.13^{2)}$
ARPD	35	$0.97 \pm 0.11^{1)}$	$2.23 \pm 0.32^{2)}$

注:与单纯 X 射线照射模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.4 对外周血 T 淋巴细胞亚群、溶血素及巨噬细胞吞噬率的影响 受照后各组 CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ T 淋巴细胞、血清溶血素及巨噬细胞吞噬率均明显降

表 2 照射后第 50 天 ARPD 对 CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , HC_{50} 及巨噬细胞吞噬率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{CD3}^+ / 10^9 / \text{L}$	$\text{CD4}^+ / 10^9 / \text{L}$	$\text{CD8}^+ / 10^9 / \text{L}$	HC_{50}	吞噬率/%
正常对照	-	$3.67 \pm 0.51^{2)}$	$2.72 \pm 0.34^{2)}$	$0.83 \pm 0.13^{2)}$	$238.03 \pm 10.92^{2)}$	$89.25 \pm 8.06^{2)}$
X 射线照射模型	-	1.99 ± 0.20	1.47 ± 0.27	0.52 ± 0.08	132.78 ± 11.16	56.00 ± 9.31
地塞米松	1.5×10^{-3}	$1.46 \pm 0.13^{2)}$	$1.01 \pm 0.26^{1)}$	0.45 ± 0.11	111.45 ± 15.39	$36.75 \pm 5.12^{1)}$
ARPD	35	$2.90 \pm 0.24^{2)}$	$2.12 \pm 0.22^{2)}$	$0.76 \pm 0.08^{2)}$	$170.95 \pm 18.98^{1)}$	$76.00 \pm 8.16^{1)}$

低($P < 0.05$);治疗后随着时间的延长,各指标在 ARPD 治疗组均恢复上升,至照射后 50 d ARPD 治疗组均高于模型组及地塞米松治疗组($P < 0.05$),且地塞米松治疗组后期各指标值均更低(表 2,图 2)。

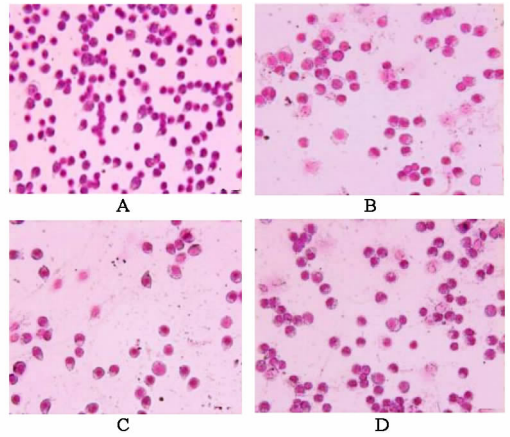


图 2 X 射线照射后第 50 天各组巨噬
细胞吞噬率变化(Giemsa 染色, $\times 40$)

4 讨论

肿瘤患者放疗后常出现阴虚火旺的症状,进而机体免疫功能下降。中医治疗注重整体调整,它在防治放射性肺损伤的同时可促进免疫功能恢复^[5]、改善造血功能并防治白细胞减少^[6-7]等。我们依据多年的临床实践经验,结合早期放射性肺损伤的特点,总结出疗效确切的抗放射性肺炎方(ARPD),该方含有多种活血化瘀、益气养阴药物^[8]。既往动物实验表明:在大鼠一般状况、肺病理形态、生化指标等方面,ARPD 治疗大鼠放射性肺损伤优于激素。

胸腺、脾脏作为参与免疫功能调节的重要器官受高辐射后可使机体免疫功能降低。本实验受照后大鼠胸腺、脾脏指数明显下降,而 ARPD 治疗后逐渐升高,镜下见脾小体结构完整,脾小梁致密,脾窦无充血,淋巴细胞集中。表明 ARPD 可提高脾脏代偿性增殖及自我修复能力,明显提高器官指数。此外,不同功能亚群的 T 细胞是细胞免疫功能的主要承担者,其中, CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ T 细胞是早期被识

别的 T 淋巴细胞分化抗原,各亚群数量和比例的稳定和平衡是维持机体正常免疫功能的前提和基础。许多中药对紊乱的免疫功能有恢复作用,增强辅助性 T 淋巴细胞的增殖能力和活性,促进淋巴细胞因子的产生^[5,9]。本实验发现,ARPD 治疗组大鼠后期,CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ T 淋巴细胞有所升高,高于单纯 X 射线照射模型组及地塞米松治疗组,使各亚群比例逐渐向平衡状态发展。灌服 ARPD 中药后期能有效阻止辐射引起的动物血清溶血素抗体滴度水平下降,改善 X 射线辐射引起的体液免疫能力降低。吴瑕等^[10]报道,黄芪多糖在增强黏膜免疫方面具有独特作用,可上调肠道及呼吸道分泌型免疫球蛋白(SIgA)分泌,特别是大分子黄芪多糖作用更明显。ARPD 对放射损伤大鼠体液免疫功能的保护作用,可能亦与黄芪使用有关。巨噬细胞吞噬率测定可反应机体非特异性免疫功能状态。ARPD 可提高受照大鼠非特异性免疫功能,其治疗组大鼠后期吞噬率较单纯 X 射线照射模型组及地塞米松治疗组明显升高。有学者报道受照大鼠巨噬细胞吞噬率的降低可能与 NO 等细胞因子有关^[11],其具体机制有待进一步研究。

国内外治疗放射性肺损伤,主要应用肾上腺皮质激素,辅以抗感染、吸氧、止咳平喘等对症治疗。故肾上腺皮质激素常作为其他抗放射性肺损伤药物研究的对照药物^[12],虽然早期抗炎效果明显,但长期使用可引起免疫抑制、诱发二重感染、促使肿瘤转移等副反应^[8]。肾上腺皮质激素主要通过抑制巨噬细胞对抗原的吞噬和处理,破坏淋巴细胞,抑制体液免疫和细胞免疫^[13-14]。本实验发现在大鼠照射后期地塞米松对部分免疫指标有抑制作用,这与临床上肿瘤伴放射性肺损伤患者使用地塞米松结果一致。实验结果给临床以提示:ARPD 疗效优于地塞米松,除抗炎、抗纤维化、活血化癥作用外,重要的是对免疫功能有保护作用。因此,地塞米松用于防治肿瘤患者的辐射损伤,易导致免疫低下、肿瘤复发转移和感染,应谨慎,早期、短期使用。而 ARPD 值得临床推广使用。

[参考文献]

[1] Schroeder P, Lindemann C, Dettmar K, et al. Trifunctional antibodies induce efficient antitumour

activity with immune cells from head and neck squamous cell carcinoma patients after radio-chemotherapy treatment [J]. Clin Transl Oncol, 2011,13(12):889.

[2] Seo N, Ito T, Wang N, et al. Anti-allergic Psidium guajava extracts exert an antitumor effect by inhibition of T regulatory cells and resultant augmentation of Th1 cells [J]. Anticancer Res, 2005,25(6A):3763.

[3] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1987,417.

[4] 杨丽, 巩法强, 刘海霞, 等. 蟾砂胶囊的抗肿瘤作用及对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(1):185.

[5] 翁欣然, 吴剑, 卢晓红. 参芪扶正注射液对肿瘤放疗患者细胞免疫功能的影响[J]. 江西中医药, 2010,41(3):41.

[6] 童德臣, 梁继荣, 王英明, 等. 参芪杞胶合剂治疗放疗后白细胞减少的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004,10(3):59.

[7] 季屹红, 倪美鑫, 蔡晶, 等. 补康灵对辐射损伤小鼠造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(7):184.

[8] 陈不尤. 活血化癥抗纤维化治疗放射性肺炎的临床研究[J]. 中国肿瘤临床与康复杂志, 2001,8(5):30.

[9] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(6):272.

[10] 吴瑕, 杨薇, 张磊, 等. 不同分子量段黄芪多糖对整体及黏膜免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(18):169.

[11] 张盈华, 殷纛, 侯军峰, 等. 养阴抗毒散对 X 射线损伤小鼠巨噬细胞免疫活性的防护作用[J]. 中华放射医学与防护, 2003,23(1):41.

[12] 殷宗宝, 王洪武, 邓超, 等. 甘利欣对肺纤维化大鼠的 TGF- β_1 , IFN- γ , IL-4 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(8):182.

[13] 刘静, 高毅, 李冉冉, 等. 地塞米松对大鼠肝脾细胞凋亡的影响[J]. 广东医学, 2005,26(12):1638.

[14] Zheng Y, Xiong S, Jiang P, et al. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by down regulating microRNA-155: a novel anti-inflammation mechanism [J]. Free Radic Biol Med, 2012,52(8):1307.

[责任编辑 聂淑琴]