

药理 ·

# 近距离放射损伤对大鼠脊髓神经细胞降钙素基因相关肽的影响及金匱肾气丸的干预作用

沈进稳<sup>1\*</sup>, 郭建友<sup>2</sup>, 肖鲁伟<sup>1</sup>, 吴承亮<sup>1</sup>

(1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006; 2. 中国科学院 心理研究所, 北京 100101)

**[摘要]** 目的: 观察<sup>192</sup>Ir近距离放射后对大鼠脊髓神经细胞降钙素基因相关肽(CGRP)的影响及金匱肾气丸的干预作用。方法: 将120只SD大鼠随机分为模型组、金匱肾气丸组、强的松组和正常对照组, 各组每日给予相应的药物, 连续给药14d后, 除正常对照组外, 其它各组均采用后装技术在大鼠脊髓进行<sup>192</sup>Ir近距离照射, 照射剂量均为22Gy, 试验大鼠分别在照射后8h, 24h, 4周时取损伤节段脊髓, 应用免疫组化方法检测CGRP的变化。结果: 与正常组比较, 近距离照射后大鼠脊髓组织CGRP阳性细胞数明显增多、强度明显增加( $P < 0.01$ ); 金匱肾气丸和强的松组照射后8h, 24h时阳性细胞数较模型组明显减少、强度明显变浅( $P < 0.01$ ); 而照射后4周时阳性细胞数及强度与模型组照射后4周比无显著差异。结论: CGRP参与了大鼠脊髓损伤的发生、发展和愈合的过程, 起到调控作用; 金匱肾气丸对大鼠近距离放射性损伤具有保护作用。

**[关键词]** 近距离放疗; 金匱肾气丸; 降钙素基因相关肽

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)06-0027-04

## Effect of Jingui Shenqi Wan on CGRP after Radiation Damage to Spinal Cord Induced by Brachytherapy in Rat

SHEN Jin-wen<sup>1\*</sup>, GUO Jian-you<sup>2</sup>, XIAO Lu-wei<sup>1</sup>, WU Cheng-liang<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Hospital of TCM, Zhejiang Hangzhou 310006, China;

2. Institute of Psychology China Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the change of CGRP after radiation by <sup>192</sup>Ir irradiation on spinal cord and to detect the protective action of Jingui Shenqi Wan for spinal cord damification. **Method:** 120 SD rats were randomly divided into four groups: model group, Jingui Shenqi Wan treatment group, prednisone positive group, and normal control group. Rats were given correspondence drug once a day for 14 days (normal control group and model group were given normal saline). Then Animal models of radiation damage in spinal cord was induced in rats by <sup>192</sup>Ir interstitial irradiation, which was successfully created through the tube inserted in T<sub>11</sub> horizontal place in rat spinal cord by back-fixing technology. The dosage of model group, Jingui Shenqi Wan treatment group and prednisone positive group was 22 Gy, the normal control group was free of irradiation. CGRP was tested by immunohistochemistry. **Result:** From the result of immunohistochemistry, we found the number and the brown substance in cells of spinal cord were significantly increased after irradiation. After treated with Jingui Shenqi Wan and prednisone, they were significantly decreased and weakened 8 h, 24 h after brachytherapy ( $P < 0.01$ ). However, there were no significantly difference compared with the model group 4

**[收稿日期]** 2007-10-18

**[基金项目]** 浙江省自然科学基金项目资助(302606)

**[通讯作者]** \* 沈进稳, Tel: (0571) 86613601; E-mail: shenjw100@163.com

week after irradiation. **Conclusion:** It was found that CGRP regulated and controlled the process of rat spinal damnification. Jingui Shenqi Wan could relieve the damnification spinal cord after brachytherapy in rats.

[ **Key words** ] brachytherapy; Jingui Shenqi Wan; CGRP

降钙素基因相关肽 (Calcitonin Gene-related Peptide, CGRP) 是由 37 个氨基酸残基组成的神经多肽,起着递质或细胞外调节物样作用,主要分布在神经系统及心血管系统中,是强烈的血管舒张因子,在神经再生过程中起一定作用。CGRP 的增多可增加损伤运动神经元和轴突的血液供应,有利于神经的再生。CGRP 可在神经与免疫两个系统内分别合成和释放,被认为是神经-免疫系统相互调节的介导物质之一<sup>[1]</sup>。目前在放射引起的脊髓损伤中 CGRP 是否参与了介导尚不清楚。本研究通过免疫组织化学法检测近距离放射损伤后大鼠脊髓的 CGRP 的变化,探讨脊髓放射损伤与 CGRP 表达的相关性,同时观察金匱肾气丸对近距离放射性损伤脊髓组织细胞损伤的干预作用,为临床治疗和金匱肾气丸的应用研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠,体重 (270 ~ 300) g,由中国科学院上海实验动物中心提供,动物许可证号:医动字第 220010004 号。

**1.2 药物** 金匱肾气丸购自杭州胡庆余堂,批号 030305,加蒸馏水制成  $15.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液;强的松片购自浙江仙居制药股份有限公司,批号 0304010,加蒸馏水制成  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液。

## 2 方法

**2.1 动物分组和处理** 120 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、金匱肾气丸组和强的松组,每组 30 只,每组根据实验要求在 8 h, 24 h 及 4 周时间点又分 3 小组。正常对照组和模型组每日经口灌胃蒸馏水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重。金匱肾气丸的剂量按临床标准体重用量来确立,因临床金匱肾气丸 1 日用量约为 7.75 g,用 50 公斤体重人折算,即为  $0.155 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,将此剂量作为给药剂量,因此金匱肾气丸组每日灌胃给予  $15.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重,强的松组每日灌胃给予  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重。各组大鼠连续 14 d 给予相应的药物预处理。

**2.2 模型建立** 大鼠于给药后第 15 天,除正常对照组外,其它各组均采用后装技术在大鼠脊髓  $T_{11}$  水平部位进行<sup>192</sup>Ir 近距离照射损伤。具体方法参见作

者已报道的文献[2]。

**2.3 组织包埋及 HE 染色** 大鼠分别在照射后按 8 h, 24 h 及 4 周时间点麻醉,采用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液灌注固定 30 min,而后自背部打开椎管,显露脊髓,切取范围在  $T_{11}$  水平节段长约 0.5 cm 脊髓,取下的脊髓标本放置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液里常规固定、脱水、透明、浸蜡和包埋,组织切片  $4 \mu\text{m}$  厚。HE 染色观察。

**2.4 CGRP 石蜡切片的免疫组化方法** 石蜡切片二甲苯脱蜡梯度乙醇至水化后;蒸馏水洗;抗原修复:采用高温高压修复 ( $0.01 \text{ mol/L}$  柠檬酸缓冲液, pH6.0);蒸馏水洗, PBS 冲洗, 5 min  $\times 3$  次; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶 10 min; PBS 洗, 5 min  $\times 3$  次; (5 ~ 10) % 正常山羊血清封闭, 室温孵育 10 min, 倾去血清, 勿洗, 滴加稀释的一抗, 4 过夜。(小鼠抗大鼠 CGRP 为 NeoMarkers 公司产品, 工作浓度为 1:100); PBS 冲洗, 5 min  $\times 3$  次; 滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37 孵育 30 min; PBS 冲洗, 5 min  $\times 3$  次; DAB 显色 (3 ~ 5) min; 蒸馏水终止反应, 苏木素复染细胞核、脱水、透明、中性树脂封片。空白对照: 第一抗体用 PBS 代替。定量测定: 计数每张切片 CGRP 阳性细胞以及测定其阳性强度, 用显微图像分析系统 (HPIAS-1000 病理图文分析系统, 武汉同济千屏影像工程公司) 测定每张切片 CGRP 阳性细胞的平均积分光密度。

**2.5 统计学方法** 利用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学处理。采用方差分析检验, 继以 LSD 两两比较或 *t* 检验。

## 3 结果

**3.1 HE 染色结果** HE 染色结果显示, 正常对照组大鼠脊髓  $T_{11}$  水平脊髓节段结构、细胞、轴突、血管完整清楚、白质区组织紧凑; 模型组、金匱肾气丸组和强的松组照射放射后 8 h, 24 h 时与正常对照组比较, 大鼠脊髓无明显组织结构上的改变; 但在放射后 4 周时, 大鼠脊髓白质区出现明显的疏松, 部分可见出血灶, 而灰质区均未见病理性改变; 金匱肾气丸组和强的松组与模型组比较均无明显差异。

**3.2 免疫组化检测结果** 免疫组化检测结果显示, 正常大鼠  $T_{11}$  水平脊髓节段中偶见内含棕色物质的

前角运动神经元,棕色物质为 CGRP 表达的阳性物质,脊髓的每一切面可见有 1~2 个 CGRP 阳性反应的细胞,染色较浅,而纤维未见阳性物质,阳性反应细胞多为大细胞,呈圆形或多角形,树突较短,阳性物质主要集中在胞浆,胞核为阴性。与正常对照组比较,模型组照射放射后 8 h,24 h 和 4 周时大鼠 T<sub>11</sub> 水平脊髓节段 CGRP 阳性反应的前角运动神经元明显增多,阳性物质的颜色明显变深,而给予金匱肾气丸和强的松组,与模型组比较,在早期(照射后 8 h,24 h)CGRP 阳性反应的前角运动神经元数量明显减少,阳性物质的颜色明显变浅,而在后期(照射后 4 周)CGRP 阳性反应的前角运动神经元明显增多,染色强度明显变深与模型组照射后 4 周比差异无统计学显著性。各组 CGRP 阳性细胞光密度统计结果见表 1。

表 1 金匱肾气丸对大鼠脊髓放射损伤 CGRP 阳性细胞光密度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 mg·kg <sup>-1</sup>	CGRP 阳性细胞光密度		
		8 h	24 h	4 周
正常	—	0.017 9 ± 0.005 2 <sup>3)</sup>	0.018 2 ± 0.004 8 <sup>3)</sup>	0.018 0 ± 0.003 1 <sup>3)</sup>
模型	—	0.060 8 ± 0.005 3 <sup>1)</sup>	0.083 0 ± 0.006 9 <sup>1,2)</sup>	0.081 9 ± 0.004 4 <sup>1,2)</sup>
金匱肾气丸	155	0.042 1 ± 0.005 0 <sup>1,3)</sup>	0.045 1 ± 0.003 3 <sup>1,3)</sup>	0.080 6 ± 0.007 1 <sup>1,2)</sup>
强的松	5	0.038 1 ± 0.003 6 <sup>1,3)</sup>	0.041 2 ± 0.003 5 <sup>1,3)</sup>	0.081 4 ± 0.004 3 <sup>1,2)</sup>

注:与正常对照组比较:<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;同组内与 8 h 比较:<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较:<sup>3)</sup>  $P < 0.01$

#### 4 讨论

CGRP 是 Rosenfeld 等于 1983 年研究降钙素基因时发现的<sup>[3]</sup>。目前研究表明 CGRP 广泛分布于神经系统、多种免疫器官以及其他组织,不同条件的刺激下,CGRP 可在神经与免疫两个系统内分别合成和释放<sup>[4]</sup>。CGRP 具有多方面作用,可能有激素样广泛调节机体的功能,更可能以自分泌或旁分泌方式调节本身和邻近细胞的功能,包括免疫功能<sup>[5]</sup>。本实验结果发现大鼠脊髓近距离照射后 8 h、24 h、4 周的 CGRP 阳性神经元细胞数显著增多、阳性强度明显增加,阳性主要集中于胞浆,说明大鼠脊髓近距离照射后 CGRP 均有较高水平的表达,还发现 CGRP 阳性细胞数和阳性强度出现进行性增加,表明了脊髓对放射既有应答又有反应,神经损伤早期,损伤本身的刺激在 CGRP 表达中占主导作用,随着时间延长机体可有整体效应,CGRP 的增多可增加损伤运动神经元和轴突的血液供应,亦有利于神经的再生。因此,它可以作为脊髓近距离放射损伤的一个重要的相关指标。

随着时代的发展,电离辐射包括放射治疗等特

因环境对机体影响越来越受到重视。临床上在脊柱肿瘤放射治疗中常用糖皮质激素配合治疗,糖皮质激素除可以减轻脊髓损伤后继发性水肿外,尚有改善微循环,抑制脂质过氧化反应,减轻钙内流和维持神经元兴奋性等作用。并有实验证明在大鼠脊神经节细胞培养液中加入糖皮质激素,可抑制 CGRP 的合成和释放<sup>[6]</sup>,但是糖皮质激素保护放射性脊髓损伤的临床效果并不太理想,并伴有较高的副反应。近年来对中药的大量研究,已揭示了某些药物对细胞保护作用的单向或双向调节机理,提示开展中药干预脊髓放射损伤病理变化机制的研究,有助于发挥中药的优势。

放射性脊髓损伤的临床表现为进行性发展的损伤平面以下感觉或运动觉功能的损害,中医辨证属于督脉受损。督脉贯脊,络肾,入络于脑而督诸阳,故督脉受损必致伤肾。金匱肾气丸是《金匱要略》方,为《太平惠民和剂局方》收载经方,为历代医家用于温补肾阳的代表方。现代药理研究亦表明金匱肾气丸具有清除自由基,抑制细胞凋亡和保护骨髓细胞放射损伤的作用<sup>[7~8]</sup>。金匱肾气丸在具有肾上腺皮质激素样正作用的同时,避免了激素类药物的副反应,且能拮抗外源性激素的反馈性抑制,防止肾上腺皮质的萎缩<sup>[9]</sup>。本实验发现,金匱肾气丸和强的松组放射后早期 CGRP 阳性细胞数和平均光密度积分明显减少,这与 Wang X,唐华美等肾上腺皮质激素可抑制 CGRP 合成和释放的研究结果相一致<sup>[10~11]</sup>。而在照射后期(4 周)CGRP 阳性细胞数较损伤后 8 h 明显增加,与同期模型组比较已无显著差异,反映了金匱肾气丸可调节脊髓神经细胞 CGRP 的合成和释放,对脊髓细胞损伤和修复起到调节作用,进一步表明了金匱肾气丸对放射性脊髓损伤的保护作用。实验还观察到脊髓近距离放射损伤后,给予金匱肾气丸和强的松组放射后大鼠脊髓细胞的凋亡指数显著下降,表明金匱肾气丸可抑制放射性脊髓损伤中胶质细胞的凋亡,起到保护作用,具有类似强的松的作用<sup>[12]</sup>。

前已述及,金匱肾气丸具有肾上腺皮质激素样的作用;本实验结果说明,金匱肾气丸无论是调控脊髓细胞 CGRP 的变化还是抑制脊髓近距离放射损伤的细胞凋亡,均具有肾上腺皮质激素样的作用。金匱肾气丸通过补肾填精,温肾助阳,对保护大鼠脊髓近距离放射损伤有重要作用。而金匱肾气丸是通过

# 益气逐瘀颗粒的主要药效学研究

崔刚<sup>1\*</sup>, 魏凤玲<sup>1</sup>, 周建平<sup>2</sup>

(1. 中日友好医院药学部, 北京 100029; 2. 北京市药品检验所, 北京 100035)

**[摘要]** 目的: 验证益气逐瘀颗粒的主要药理作用。方法: 以注射肾上腺素及冰水游泳建立大鼠急性血瘀证模型, 观察益气逐瘀颗粒对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标的影响; 以舌下静脉注射垂体后叶素建立大鼠心肌缺血模型, 观察该制剂对心肌缺血模型动物 ST-T 段位移变化和对肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)含量的影响; 以二磷酸腺苷(ADP)为诱导剂, 进行血小板聚集活性测定。结果: 益气逐瘀颗粒对血瘀证有一定的改善作用, 能降低全血黏度, 对血浆黏度未见明显影响; 能够缓解垂体后叶素引起的大鼠急性心肌缺血, 减轻 S-T 段抬高程度; 降低 LDH 的活性, 可明显抑制 ADP 诱导的大鼠血小板聚集。结论: 益气逐瘀颗粒对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标有一定的改善作用, 抑制血小板聚集, 对大鼠实验性急性心肌缺血有一定的保护作用。

**[关键词]** 益气逐瘀颗粒; 药效学; 血瘀证; 血液流变性; 心肌缺血

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)06-0030-04

**[收稿日期]** 2007-11-05

**[通讯作者]** \*崔刚, Tel: (010) 84206086; E-mail: cui gang929@tom.com

何种机制影响脊髓近距离放射损伤的细胞凋亡及调控脊髓细胞 CGRP 的变化的, 目前尚不清楚, 需进一步进行探讨。

## [参考文献]

- [1] Xing L, Hou L, Wang X. Comparison of calcitonin gene-related peptide release from rat lymphocytes and dorsal root ganglia neurons[J]. Brain Behav Immun, 2002, 16(1): 17-32.
- [2] 肖鲁伟, 沈进稳, 吴承亮, 等. 金匱肾气丸对大鼠脊髓近距离放射损伤细胞凋亡形态学的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(7): 633-635.
- [3] Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing[J]. Nature, 1983, 304: 129-135.
- [4] Wang X, Fiscus RR, Tang Z. CGRP in the serum of endotoxin-treated rats suppresses lymphoproliferation [J]. Brain Behav Immun, 1994, 8(4): 282-292.
- [5] Xing L, Hou L, Wang X. Comparison of calcitonin gene-related peptide release from rat lymphocytes and dorsal root

- ganglia neurons [J]. Brain Behav Immun. 2002, 16(1): 17-32.
- [6] Supowit C, Christensen K, Westlund D, et al. Dexamethasone and activators of the protein kinase A and C signal transduction pathways regulate neuronal calcitonin gene-related peptide expression and release [J]. Brain Res, 1995, 686: 77-86.
- [7] 王新玲, 李月彩, 侯颖春. 金匱肾气丸抗自由基和细胞凋亡的作用 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(10): 1209-1211.
- [8] 郑小伟, 刘明哲, 程志清, 等. 金匱肾气丸对 SD 大鼠慢性电离辐射损伤的防护作用 [J]. 中国中医药科技, 1999, 6(6): 382.
- [9] 周超凡, 张静楷. 中药复方药理学研究探讨 [J]. 中成药研究, 1980, 2(3): 4-7.
- [10] Wang X, Han C, Jones SB. Citonin gene-related peptide release in endotoxemia may be mediated by prostaglandins [J]. Shock, 1995, 3(1): 34-39.
- [11] 唐华美, 朱长庚. 肾上腺皮质激素对大鼠 CGRP 免疫反应神经元的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 1998, 14(4): 350.