

## • 基础研究 •

## 旋转恒定磁场对化疗损伤小鼠造血功能保护作用的研究

宋国丽,季百苗,张小云

[摘要] 目的 研究旋转恒定磁场对 5-氟尿嘧啶(5-FU) 损伤小鼠造血功能的保护作用。方法 BalB/C 小鼠随机分为对照组和磁场组,各组小鼠分别腹腔注射致死剂量(180 mg/kg、210 mg/kg、250 mg/kg)及亚致死剂量(150 mg/kg) 5-FU,磁场组经磁场处理 30 d,每天 2 次,每次 1 h,磁场强度 0.6 T。观察注射致死剂量小鼠 30 d 的存活率和存活期;检测注射亚致死剂量小鼠注射后第 7、10、14、21、28 天的外周血细胞数;测定第 8、10、14 天骨髓单个核细胞数(BMNC)及粒/巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)数;观察股骨骨髓病理切片、计数血管数并检测骨形态发生蛋白(BMPs)的表达水平。结果 5-FU 180 mg/kg 组,对照组和磁场组 30 d 的平均存活率分别为 66.7%、100%,平均存活期分别为(23.3±0.9) d、(30±0) d;剂量 210 mg/kg 组,对照组和磁场组 30 d 的平均存活率分别为 40%、100%,平均存活期分别为(17±1.2) d、(30±0) d;剂量 250 mg/kg 组,对照组和磁场组 30 d 的平均存活率分别为 20%、70%,平均存活期分别为(11.5±1.6) d、(23.2±2.1) d ( $P<0.01$ );磁场组的外周血细胞数、BMNC 数、CFU-GM 数均比对照组增加( $P<0.05$ );骨髓病理切片显示,对照组和磁场组骨髓内的血管数分别为(2.69±0.56)和(9.13±2.65) ( $P<0.01$ ),磁场组的骨髓 BMPs 表达水平亦明显高于对照组。结论 旋转恒定磁场对 5-FU 损伤小鼠具有明显的保护作用,能促进化疗损伤后造血细胞和造血微环境的修复。

[关键词] 旋转恒定磁场;5-氟尿嘧啶;化学疗法损伤;造血保护;小鼠

Hemoprotective Effect of Rotating and Stationary Magnetic Field on Mice Receiving 5-Fluorouracil SONG Guo-li, JI Bai-miao, ZHANG Xiao-yun. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

[Abstract] **Objective** To study the hemoprotective effects of rotating and stationary magnetic field (RSMF) in mice treated with 5-Fluorouracil (5-FU). **Methods** The BalB/C mice were randomly divided into control group and RSMF-treated group. The mice were injected with 5-FU, the dose were 150, 180, 210, 250 mg/kg respectively. RSMF-treated group was exposed to RSMF for 1 h a time, twice a day during 30 consecutive days, and the magnetic intensity was 0.6 T. The survival rate and survival days during the 30 days were observed. 7, 10, 14, 21, 28 days after injection, the peripheral blood cells were counted. On day 8, 10 and 14, the number of bone marrow mononuclear cells (BMNC) and the forming ability of colony-forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM) were measured. The pathological section of femur and the expression level of bone morphogenetic proteins (BMPs) in bone marrow were evaluated. **Results** RSMF could increase the survival rate and survival days of mice treated with 5-FU, and induce an increase in hemoglobin concentration, white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC) and platelet number. Also, RSMF could increase the number of BMNC and improve the forming ability of CFU-GM on days 8~14. Furthermore, RSMF could improve the bone marrow angiogenesis and the expression level of BMPs. **Conclusion** RSMF have an obvious protective effect against chemotherapeutic injury, and it can accelerate the recovery of hematopoiesis and hematopoietic microenvironment in mouse bone marrow.

[Key words] rotating and stationary magnetic field; chemotherapeutic injury; 5-Fluorouracil; Hemoprotection; mouse

中图分类号:R733 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)03-0213-04

[本文著录格式] 宋国丽,季百苗,张小云.旋转恒定磁场对化疗损伤小鼠造血功能保护作用的研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(3):213-216.

骨髓造血系统是对化疗非常敏感的组织,在对造血系统恶性肿瘤的治疗过程中,常因骨髓造血抑制而限制化疗药物的剂量,直接影响对肿瘤的治疗效果。5-氟尿嘧啶(5-FU)为嘧啶类氟化物,属于抗代谢抗肿瘤药物,对增殖性细胞均有杀伤性作用,是主要的化疗药物之一<sup>[1]</sup>。但这种疗法缺乏选择性,在杀伤肿瘤细

胞的同时,对代谢旺盛的正常造血细胞也有杀伤作用,主要病理变化为骨髓抑制,对免疫功能和造血系统具有损伤破坏作用,引起白细胞和血小板低下,能诱发感染和出血等造血功能损伤症状。

已有研究表明,磁场可促进成骨细胞的增殖与分化,增加成骨细胞生长因子如骨碱性磷酸酶(BAP)等的合成与分泌,促进成骨细胞细胞外基质的合成与分泌<sup>[2-6]</sup>;而成骨细胞是骨髓造血微环境的重要组成部分,近期研究报告指出,成骨细胞是组成造血微环境的一个重要调节性组分<sup>[7-8]</sup>。这提示磁场可能通过作用于造血微环境对造血系统具有调节作用。本实验通过

基金项目:深圳大学科研启动基金项目(200524)。

作者单位:深圳大学生命科学学院,广东深圳市 518060。作者简介:宋国丽(1976-),女,山东莱阳市人,博士,讲师,主要从事磁生物学方面的研究。通讯作者:张小云。

旋转恒定磁场作用于 5-FU 损伤小鼠,研究旋转恒定磁场对化疗损伤小鼠的造血保护作用,并探讨其可能的机理。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 6~7 周清洁级 C57 BL6/J 小鼠,雄性,平均体重( $19 \pm 3$ ) g,由中国医学科学院、中国协和医科大学天津血液学研究所实验动物中心提供。实验小鼠随机分为正常组、对照组及磁场处理组。正常组不做任何处理,其余小鼠经 5-FU 注射后,磁场组接受磁疗装置处理。各组小鼠均在标准条件下喂养。

**1.2 化疗方法** 5-氟尿嘧啶(5-FU),购自中国医学科学院、中国协和医科大学天津血液病医院,一次性腹腔注射。剂量为 180、210、250 mg/kg,观察小鼠 30 d 的存活率和存活期;剂量 150 mg/kg 观察小鼠外周血象等各项指标。

**1.3 磁场装置及处理** 采用本实验室张小云教授研制的 HMF-6000 旋转磁场治疗装置(中国专利号:2L93118017.1,美国发明号:5,667,469)。磁场是由稀土磁钢制成的圆柱形磁体,磁场旋转频率 10 Hz,旋转时在磁体上方 20 cm 内形成一个直径 60 cm 的有效半球形旋转磁场,磁场强度 0.6 T。所有需接受磁场处理的小鼠每天置于该装置中 2 次,每次 1 h,连续处理 30 d。

## 1.4 观察指标

**1.4.1 存活率和存活期** 注射 5-FU 180、210、250 mg/kg 后,小鼠随机分为对照组和磁场处理组,每组各剂量下分别 10 只。磁场组接受磁疗装置处理。每天记录小鼠死亡情况,计算各组小鼠 30 d 的存活率和存活期。

**1.4.2 外周血细胞** 注射 150 mg/kg 5-FU 后小鼠随机分为对照组和磁场处理组,每组 12 只。各组小鼠照射后第 7、10、14、21、28 天尾静脉取血,送中国医学科学院天津血液病医院检验科检测。

**1.4.3 骨髓单个核细胞数(BMNC)及 CFU-GM 集落数** 注射 5-FU 150 mg/kg 后小鼠随机分为正常组、对照组和磁场处理组,每组 15 只。各组小鼠注射后第 7、10、14 天,从各组小鼠分别随机挑选 5 只,颈椎脱臼处死,取小鼠两侧股骨,用 IMDM 培养液(Gibco 公司)冲洗出骨髓细胞制成单细胞悬液,计数 BMNC。上述单细胞悬液按每孔  $1 \times 10^4$  的细胞量接种于 24 孔培养板中,每孔加入 MethoCult™ 3434 集落培养基(STEMCELL Technologies 公司)0.5 ml,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,第 7 天计数每孔的 CFU-GM 集落形成数。

**1.4.4 病理观察** 注射 150 mg/kg 5-FU 后第 8 天,从

各组小鼠分别随机挑选 3 只,颈椎脱臼处死,取小鼠两侧股骨后快速放入甲醛中固定 24 h 以上,用硝酸脱钙后进行脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片。苏木素-伊红(HE)染色后在光镜下观察骨髓造血组织情况并计数血管数。

**1.4.5 骨形态发生蛋白(BMPs)表达水平** 小鼠股骨石蜡切片常规脱蜡至水,微波修复抗原,山羊血清封闭,加适当比例稀释的一抗(BMPs 兔抗多克隆抗体,武汉博士德公司),4℃过夜,加生物素化二抗(北京中山公司 SP-9000 通用型免疫组化试剂盒),辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(S-A/HRP),DAB 染色,苏木素复染,脱水,中性树脂封片,光镜下观察 BMPs 的表达。

以上所有实验均重复 3 次以上。

**1.5 统计学方法** 实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  认为有显著性差异。数据采用 SPSS 和 Excel 软件分析、作图。

## 2 结果

**2.1 存活率及存活期** 小鼠注射 5-FU 180 mg/kg 后,对照组小鼠于第 7 天开始死亡,第 7~13 天为死亡高峰期;磁场组小鼠无死亡出现。注射 5-FU 后 30 d,对照组和磁场组小鼠平均存活率分别为 66.7%、100%,平均存活期分别为( $23.3 \pm 0.9$ ) d、( $30 \pm 0$ ) d,两组间有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。

小鼠注射 5-FU 210 mg/kg 后,对照组小鼠于第 7 天开始死亡,第 7~12 天为死亡高峰期;磁场组小鼠无死亡出现。注射 5-FU 后 30 d,对照组和磁场组小鼠平均存活率分别为 40%、100%,平均存活期分别为( $17 \pm 1.2$ ) d、( $30 \pm 0$ ) d,两组间有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。

小鼠注射 5-FU 250 mg/kg 后,对照组小鼠于第 6 天开始死亡,第 7~9 天为死亡高峰期;磁场组小鼠第 7 天开始死亡,第 8 天左右为死亡高峰。注射 5-FU 后 30 d,对照组和磁场组小鼠平均存活率分别为 20%、70%,平均存活期分别为( $11.5 \pm 1.6$ ) d、( $23.2 \pm 2.1$ ) d,两组间有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。

各组存活率的时间曲线见图 1 A~1 C。

**2.2 外周血象** 注射 5-FU 150 mg/kg 后,各组小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板数及血红蛋白含量均大幅度下降,第 7 天时降至最低,随后开始逐渐恢复,在 28 d 内磁场组小鼠血细胞的恢复均比对照组快。磁场可以提高不同时间段的血细胞数,特别是在照射后 7~21 d,磁场组外周血细胞数均高于对照组( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 BMNC 数及 CFU-GM 集落形成** 注射 5-FU 150 mg/kg 后第 8 天,对照组和磁场组单根股骨 BMNC 数分别为( $0.63 \pm 0.02$ )  $\times 10^7$ 、( $0.88 \pm 0.12$ )  $\times$

$10^7$ , CFU-GM 集落形成数分别为  $(31.5 \pm 3.32)$ ,  $(60.5 \pm 13.3)$ ; 注射 5-FU 后第 10 天, 对照组和磁场组 BMNC 数分别为  $(1.13 \pm 0.22) \times 10^7$ ,  $(1.43 \pm 0.18) \times 10^7$ , CFU-GM 集落形成数分别为  $(73.5 \pm 10.02)$ ,  $(173.75 \pm 18.4)$ ; 注射 5-FU 后第 14 天, 对照

组和磁场组 BMNC 数分别为  $(3.05 \pm 0.67) \times 10^7$ ,  $(3.92 \pm 1.12) \times 10^7$ , CFU-GM 集落形成数分别为  $(120.33 \pm 27.36)$ ,  $(165.00 \pm 14.35)$ 。磁场组均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

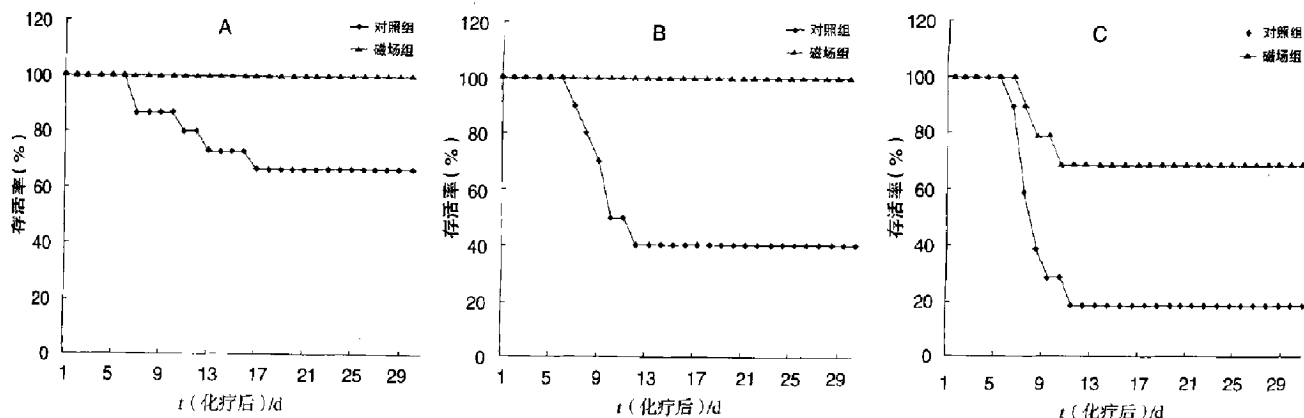
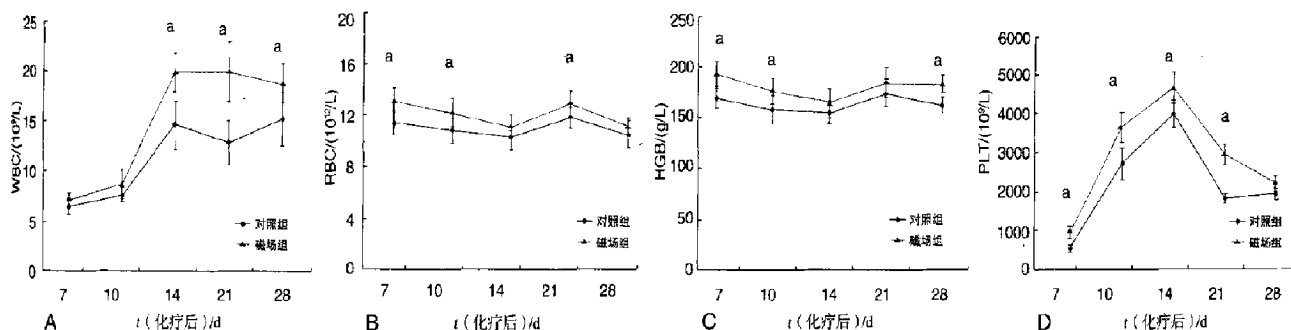


图 1 5-FU 损伤后各组小鼠 30 d 存活率

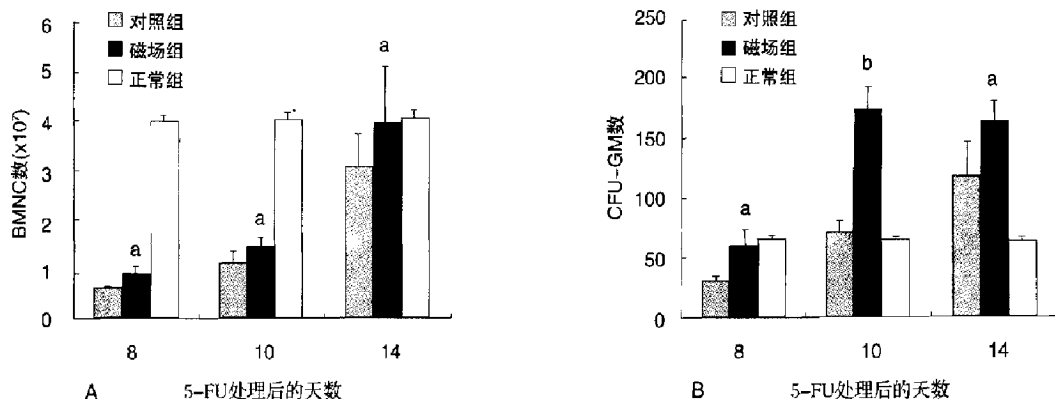
A: 注射 5-FU 180 mg/kg; B: 注射 5-FU 210 mg/kg; C: 注射 5-FU 250 mg/kg。



a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

图 2 5-FU 损伤后各组小鼠外周血象的变化

A: 白细胞; B: 红细胞; C: 血红蛋白; D: 血小板。



a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ 。

图 3 5-FU 损伤后小鼠 BMNC 和 CFU-GM 的变化

A: BMNC; B: CFU-GM。

2.4 病理观察 骨髓病理切片显示,对照组出现大片空白区,造血细胞稀少,而磁场组造血组织结构较完整,造血细胞量较丰富,骨髓腔边沿都有血管。见封三彩图 4.1 ~ 4.2。对照组血管数平均为( $2.69 \pm 0.56$ )根,磁场组血管数平均为( $9.13 \pm 2.65$ )根,磁场组小鼠的血管数明显高于对照组( $P < 0.01$ )。

2.5 BMPs 的表达 BMPs 在对照组和磁场组小鼠股骨中都有表达,免疫组化切片显示,磁场组 BMPs 的表达水平明显高于对照组。见封三彩图 4.3 ~ 4.5。

### 3 结论

骨髓由骨髓实质和骨髓造血微环境组成,前者包括造血干细胞、各系祖细胞和血细胞,后者包括基质细胞、细胞因子及细胞外基质。造血形成是造血干细胞增殖、分化、成熟及释放的过程,由骨髓微环境中的造血细胞和基质细胞间复杂的相互作用调节<sup>[9]</sup>。当各种致病因素抑制骨髓时,骨髓的增生程度会减低,表现为有核细胞的比例减少,严重者支架结构也遭到破坏,同时体外半固体培养时形成的各系祖细胞集落形成单位数减少。本实验结果表明,旋转恒定磁场作用不仅能明显提高化疗损伤小鼠的存活率和存活期,还能增加化疗损伤小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板数及血红蛋白含量,增加骨髓单个核细胞数,提高 CFU-GM 的集落形成能力,促进骨髓的造血细胞及造血组织结构的恢复。

化疗可直接损伤骨髓造血微环境,从而影响到化疗极为敏感的造血干细胞的修复,最终导致造血障碍。造血微环境能调节造血细胞的增殖、分化以及保留干细胞的多潜能性,因此造血微环境在化疗后造血功能的恢复中起非常重要的作用。微血管系统是造血微环境的重要组成部分,骨髓腔中的静脉血窦系统是微环境的结构基础;化疗损伤后,骨髓造血功能的恢复必须先有血管系统,特别是静脉窦的修复和血流的重建,以保证细胞生长所需要的营养物质和体液因子,促进造血细胞、基质细胞的生长发育及其功能。我们的实验结果表明,旋转恒定磁场能明显促进化疗损伤小鼠股骨骨髓内的血管生成,从而促进骨髓造血微环境的修复。

BMPs 是由成骨细胞分泌产生的,是造血微环境的一个重要组成成分,能诱导干细胞分化为成骨细胞,调节成骨细胞的生长与分化,成骨细胞的数量与 BMPs 的浓度成正比。Zhang 等的研究表明,BMPs 可通过调节造血微环境而调控造血干细胞的数量<sup>[7,10]</sup>。本实验结果表明,旋转恒定磁场可以提高化疗损伤小鼠骨髓 BMPs 的表达水平,促进造血微环境中成骨细胞的发生与分裂。

由此,我们认为,旋转恒定磁场对化疗损伤小鼠具有明显的保护作用,能促进化疗损伤小鼠的造血修复,其作用可能是通过对造血干细胞和造血微环境两方面的调控而达到的。

### [参考文献]

- [1] Kojima S, Takaba K, Kimoto N, et al. Protective effects of glutathione on 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice[J]. Arch Toxicol, 2003, 77(5): 285 - 290.
- [2] Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, et al. Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures[J]. J Dent Res, 2003, 82(12): 962 - 966.
- [3] Kotani H, Kawaguchi H, Shimoaka T, et al. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo[J]. J Bone Mineral Res, 2002, 17: 1814 - 1821.
- [4] Zhang Yu, Zhang Xiaoyun. Effect of rotating magnetic field on bone calcium metabolism in rat[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9: 193 - 196.
- [5] Yuge L, Okubo A, Miyashita T, et al. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(1): 32 - 38.
- [6] 宋晋刚, 许建中, 周强, 等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 134 - 137.
- [7] Zhang Jiawang, Niu Chao, Ye Ling, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size[J]. Nature, 2003, 425: 836 - 841.
- [8] Calvi LM, Adams GB, Weinbrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche[J]. Nature, 2003, 425: 841 - 846.
- [9] Herodin F, Bourin P, Mayol JF, et al. Short-term injection of anti-apoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma-irradiation promotes survival[J]. Blood, 2003, 101: 2609 - 2616.
- [10] Zhang Jiawang, Li Linheng. BMP signaling and stem cell regulation[J]. Dev Biol, 2005, 284: 1 - 11.

(收稿日期: 2006-01-18)



图 2.3 制动 7d 梗死侧 DG 区 NGF 的表达 (ABC, 400 ×)

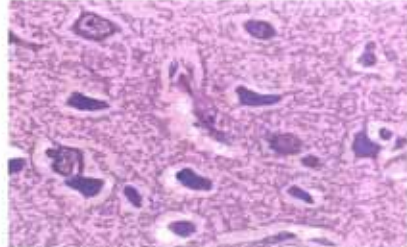


图 3.1 MCA 阻塞后 2 h 右侧额叶皮层 (HE 染色)

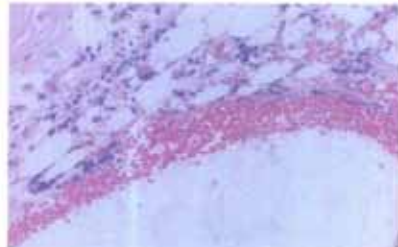


图 4.1 对照组小鼠股骨血管增生 (400 ×)

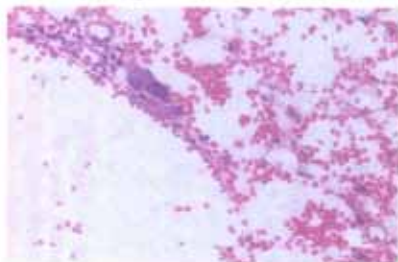


图 4.2 磁场组小鼠股骨血管增生 (400 ×)

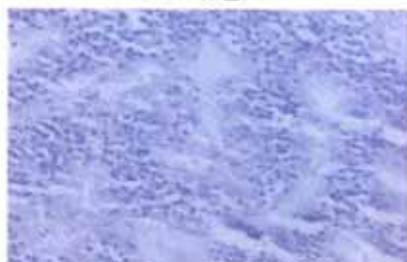


图 4.3 正常组小鼠股骨 BMPs 表达 (400 ×)

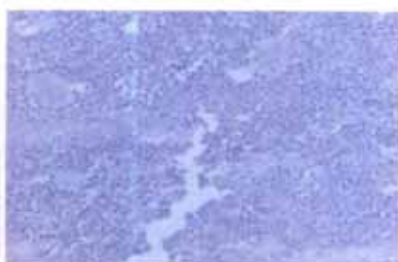


图 4.4 对照组小鼠股骨 BMPs 表达 (400 ×)

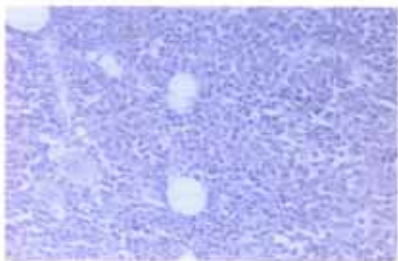


图 4.5 磁场组小鼠股骨 BMPs 表达 (400 ×)

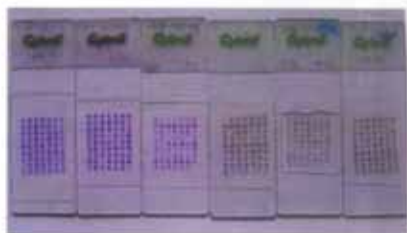


图 5.1 组织芯片

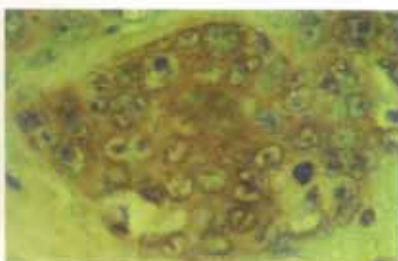


图 5.2 食道癌中 BAG-1 阳性 (DAKO Envision, 400 ×)