

四生汤对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤修复功能的影响*

凌昌全¹ 高虹² 陈喆¹ 黄雪强¹ 张红武¹

内容提要 目的:探索四生汤减轻放射反应的作用机制。方法:用羟基脲处理培养的小鼠脾淋巴细胞,阻断 S 期的 DNA 半保留复制,然后用紫外线照射,并加入³H-TdR,37℃培养 4h 后检测细胞³H-TdR 掺入量,以计算出的淋巴细胞非合成期掺入指数(LUI)为主要指标,观察四生汤对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤后修复功能的影响。结果:发现四生汤预处理 4h 在体外有升高小鼠脾淋巴细胞 LUI 值的作用,但加入四生汤之后立即照射紫外线的 LUI 与未加四生汤组无明显差异。结论:四生汤增强小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤修复功能的作用可能是通过与淋巴细胞共同孵育,引起 DNA 修复酶系统的某些变化而实现的。

关键词 四生汤 放射性损伤 脾淋巴细胞 修复功能 掺入指数

Effect of Sisheng Decoction on Repairing Function of DNA in Mice Splenic Lymphocytes Ling Changquan, Gao Hong, Chen Zhe, et al *Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Shanghai (200433)*

Objective: To explore the mechanism of alleviating the side effects of irradiation by Sisheng Decoction (SSD). **Methods:** The mice splenic lymphocytes were treated by hydroxylurea to stop the DNA replication in S stage, irradiated by ultraviolet ray (UV) and the ³H TdR was added into the cultural medium. After the lymphocytes were cultured in 37℃ for 4h, the capacity for ³H-TdR in the lymphocytes were tested. The effect of SSD in different content on the cut and patch repair (CPR) of DNA can be inferred by observing the lymphocyte uptake index (LUI) of ³H-TdR. **Results:** LUI of mice spleen lymphocytes could be increased by pretreating the lymphocytes with SSD for 4h and then irradiated by UV, but it could not be increased if the lymphocytes were treated by SSD and UV at the same time. **Conclusion:** SSD can alleviate the side effect of irradiation by enhancing the function of CPR-DNA, which need pretreating the lymphocytes with SSD.

Key words Sisheng Decoction, radiation injury, splenic lymphocytes, repair function, uptane index

四生汤减轻放疗、化疗毒副反应的临床疗效,我们已先后做了报道^[1,2]。为了进一步探索该方减轻放射损伤的作用机制,本研究以淋巴细胞非合成期掺入指数(LUI)为主要指标,观察四生汤对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤修复功能的影响。

材料与方

1 材料

1.1 实验动物 C₅₇/BL 小鼠,雄性,18~22g,由上海市实验动物中心提供,合格证号:沪动字 93018。

1.2 四生汤口服液 由生黄芪、生白术、生地黄、生薏苡仁组成,第二军医大学制药厂生产仁组成,第一

军医大学制药厂生产,每毫升含生药 3g,经第二军医大学药学院重新抽提过滤,调整 pH 后使用。羟基脲:济南制药厂生产。

1.3 69 型玻璃纤维滤膜 原上海红光造纸厂生产。紫外线照射源:上海金光灯具厂生产的 15W 紫外线灯管。³H-TdR:上海原子核研究所提供,比活性 37Ci/mmol。

2 方法

2.1 小鼠血清制备 以四生汤口服液灌喂小鼠,每日 2 次,每次 0.2ml,连续 10 天,停药次日上午 8:00 断头取血,分离血清,当天使用。

2.2 脾淋巴细胞制备 无菌取出小鼠脾脏,制成脾脏单细胞悬液,再用淋巴细胞分离液分离,吸取中间云雾状层细胞,用 Hank's 液洗涤 2 次以后,用含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素各 100μg/ml,2mmol/L 谷氨

* 国家自然科学基金资助课题(No.39370850)

1. 第二军医大学附属长海医院中医科(上海 200433);2. 上海龙华医院中医肿瘤科

酰胺, 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇和 20 mmol/L HEPES RPMI1640 的培养液配成 1×10^6 /ml 的细胞悬液使用。

2.3 细胞培养 第一批实验:取制备好的脾淋巴细胞悬液 1ml, 加入不同浓度的四生汤, 置于直径 35mm 的玻璃培养皿内, 培养 4h, 用不同能量的紫外线照射, 照射时轻轻地振动培养皿。照射后, 立即加入最终浓度为 3×10^{-3} mol/L 的羟基脲, 摇匀, 再加入最终浓度为 10 μ Ci/ml 的 3 H-TdR, 37℃ 培养 4h; 第二批实验:加入四生汤后, 立即用紫外线照射, 其余步骤与第一批实验相同; 第三批实验:除用喂饲四生汤的小鼠血清代替四生汤之外, 其余步骤与第一批实验完全相同。

2.4 放射性测定 细胞经培养 4h 后, 立即加入等体积的 4℃ 生理盐水, 再把细胞收集在微孔滤膜上,

依次用生理盐水、10% 三氯醋酸、无水乙醇洗脱、固定和脱水。干燥后用 β -计数器检测细胞的 3 H-TdR 掺入量(以每分钟脉冲数表示)。每批实验重复 7 次。

$$LUI = \frac{D_x - D_0}{D_0}$$
 (D_0 表示未照紫外线样品的计数率(cpm), D_x 表示照射紫外线样品的计数率(cpm))。

统计学处理:组间比较采用 t 检验。

结 果

第一批实验结果表明, 加入不同浓度的四生汤预培养 4h 对小鼠脾淋巴细胞经紫外线照射后的 LUI 有一定的影响, 以 5% 浓度组的影响最为显著, 与空白对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见附表。

附表 不同浓度的四生汤预处理对小鼠脾淋巴细胞 LUI 的影响 (cpm, $\bar{x} \pm s$)

组 别	紫外线照射剂量(erg/mm ²)				
	100	200	400	800	1600
空白对照	2.01 $\pm$ 0.24	2.76 $\pm$ 0.44	4.62 $\pm$ 0.59	5.06 $\pm$ 0.55	5.12 $\pm$ 1.02
四生汤 1%	2.23 $\pm$ 0.21	2.48 $\pm$ 0.19	3.92 $\pm$ 0.97	5.26 $\pm$ 0.46	5.03 $\pm$ 1.27
四生汤 5%	1.95 $\pm$ 0.25	2.52 $\pm$ 0.27	5.95 $\pm$ 0.62*	7.76 $\pm$ 0.79**	6.23 $\pm$ 1.42*
四生汤 10%	2.29 $\pm$ 0.51	3.04 $\pm$ 0.67	4.79 $\pm$ 0.72	6.34 $\pm$ 0.54*	5.08 $\pm$ 0.99

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

根据第一批实验结果, 我们选择 5% 浓度的四生汤进行了第二批实验, 结果表明加入四生汤后未经预培养而直接照射紫外线, 对脾淋巴细胞的 LUI 无明显影响。

在前两批实验的基础上, 我们利用喂饲四生汤 10 天以后的小鼠血清为材料, 按照第一批实验的步骤, 观察了不同浓度血清对正常小鼠脾淋巴细胞经 800erg/mm² 紫外线照射后 LUI 的影响, 未发现有明显作用, 但喂饲四生汤小鼠自身的脾淋巴细胞经 800erg/mm² 紫外线照射后的 LUI 值[(6.85 $\pm$ 0.86)cpm]明显高于正常小鼠[(5.34 $\pm$ 0.45)cpm] ($P < 0.01$)。

讨 论

损伤修复是人类 DNA 损伤后的主要修复方式, 它在特异的核酸酶参与下, 可将损伤 DNA 分子中的胸腺嘧啶二聚体切除, 再利用新的单核苷酸, 按碱基互补规律, 把损伤的部位修复原状。在这个过程中, 由于细胞需要利用单核苷酸作为修复的原料, 如果把 3 H-TdR 加在细胞的外环境中, 当修复合成发生时, 就有 3 H-TdR 掺入到修复的 DNA 分子中, 所以非合成期的 3 H-TdR 掺入量的多少, 就反映了损伤修复功能的高低。淋巴细胞非合成期的掺入指数, 是指淋巴细胞经羟基脲处理后, 阻断 S 期的 DNA 半保留复制的条件, 用紫外线

照射样品的计数率减去未照射样品的计数率, 所得紫外线照射样品的实际紫外线诱发计数率, 再与未照射样品的计数率相比的值(即 LUI)。LUI 的大小代表了紫外线诱发 3 H-TdR 掺入量的多少, 间接反映了损伤修复功能的高低⁽³⁾。

本研究发现四生汤在体外有升高小鼠脾淋巴细胞 LUI 值的作用, 说明增强淋巴细胞 DNA 的损伤修复功能是四生汤在临床能有效地减轻放射反应的重要作用机制之一。加入四生汤之后立即照射紫外线的 LUI 与未加四生汤组无明显差异, 提示四生汤增强淋巴细胞 DNA 损伤修复功能的作用可能是通过与淋巴细胞共同孵育, 引起 DNA 修复酶系统的某些变化而实现的。这也从一个侧面为临床上常在放射治疗前 1 周开始服用四生汤的经验提供了部分实验依据。

研究中用喂饲四生汤的小鼠血清(不同浓度的)与正常小鼠脾淋巴细胞混合培养后照射 800erg/mm² 的紫外线, 发现非合成期的 3 H-TdR 掺入量并无明显升高, 提示四生汤中能增强淋巴细胞 DNA 损伤修复功能的有效成分不是固定不变地存在于血清之中。四生汤口服之后多少时间才能发挥这一作用以及这一作用能维持多久等有待进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 凌昌全, 陈连志, 陈 皓, 等. 四生汤抗放射反应的临床与实

验研究. 中医杂志 1993; 34(12):733—735.
2. 陈 喆, 凌昌全, 黄雪强, 等. 四生汤减轻肝动脉化疗栓塞毒副反应. 第二军医大学学报 1997; 18(3):272—274.

3. 蒋左庶, 胡以平. DNA 修复酶系统的研究. 遗传学报 1981; 8(4):310—313.

(收稿:1997-04-04 修回:1997-09-05)

口炎净液治疗牙周炎 38 例

侯逢春¹ 张静萍¹ 张云之² 刘晓明²

1996 年 6~12 月, 我们应用自制中药口炎净液治疗牙周炎 38 例, 疗效满意, 现报告如下。

临床资料 参照《口腔内科学》(岳松龄主编。北京:人民卫生出版社, 1980:296—299)的诊断, 选择无全身系统性疾病牙周炎患者 61 例, 随机分为两组。治疗组 38 例, 男 20 例, 女 18 例; 年龄 30~69 岁, 平均 50.9 岁; 病程 3 个月~11 年, 平均 2.4 年; X 线摄片显示牙槽骨不同程度吸收 38 例; 牙齿不同程度松动 29 例; 伴牙周袋溢脓 26 例; 伴牙龈退缩 19 例。对照组 23 例, 男 13 例, 女 10 例; 年龄 24~71 岁, 平均 53.3 岁; 病程 3 个月~10 年, 平均 2.2 年; X 线摄片显示牙槽骨不同程度吸收 23 例; 牙齿不同程度松动 18 例; 伴牙周袋溢脓 15 例; 伴牙龈退缩 11 例。

治疗方法 (1)口炎净液的配制:取明矾、五倍子分别研碎成粉末, 按 4:6 的比例混合, 添加 3 倍于药量的蒸馏水和 1 倍于药量的无水酒精, 浸泡 15 天后过滤取其上清液备用。(2)用药方法:两组均患部先用生理盐水冲洗, 然后蘸干; 治疗组用牙科镊子将口炎净液滴入牙周袋内; 对照组用牙科镊子将 2% 碘甘油滴入牙周袋内, 均每周袋内上药 2 次, 观察 2 周。两组治疗过程中均不配合其他局部及全身治疗。(3)观察指标:参照文献[中华口腔科杂志 1983; 18(4):199]的方法测定, 记录治疗前后牙龈指数(GI)和平均牙周袋深度(PD)的变化及自觉症状。GI 分度标准为:0 度为正常龈; 1 度为牙龈轻度发炎, 范围局限于缘龈, 探触不出血; 2 度为中度发炎, 炎症范围较弥散, 波及附着龈, 探触出血; 3 度为重度发炎, 牙龈明显红肿或溃烂, 炎症弥散到附着龈, 自发性出血, 量多。GI = 各牙龈炎度数之和/总牙数。PD = 各牙牙周袋深度(用牙周探针测量患牙 1 个面的最深袋, 袋深以龈缘为起点)之和/总牙数。

结 果

1 疗效标准 显效:自觉疼痛完全或基本消失,

牙龈指数减小 1.0 以上, 牙周袋深度减小 1mm 以上。有效:自觉疼痛减轻, 牙龈指数及牙周袋深度有所改善。无效:症状、体征治疗前后均无变化或加重。

2 疗效 治疗组 38 例, 显效 20 例(52.6%), 有效 17 例(44.7%), 无效 1 例(2.6%), 总有效率为 97.4%。对照组 23 例, 显效 6 例(26.1%), 有效 15 例(65.2%), 无效 2 例(8.7%), 总有效率为 91.3%。两组显效率有显著性差异($\chi^2 = 4.13, P < 0.05$)。

3 两组患者治疗前后 GI 和 PD 的变化 见附表。两种药物均能控制牙龈炎症, 但治疗组优于对照组($P < 0.05$)。两种药物均能使牙周袋变浅, 但两组间比较无统计学意义。

附表 两组治疗前后 GI 和 PD 的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数		GI	PD(mm)
治疗	38	疗前	2.730 ± 0.096	5.45 ± 0.15
		疗后	1.930 ± 0.059 [*] △	4.44 ± 0.15 [△]
对照	23	疗前	2.770 ± 0.035	5.41 ± 0.16
		疗后	2.150 ± 0.078 [△]	4.85 ± 0.16 [△]

注:与对照组疗后比较, $^* P < 0.05$; 与本组疗前比较, $^{\Delta} P < 0.01$

讨 论 中医学认为本病属于“牙疳”、“齿衄”、“牙宣”的范畴。我们认为本病是由于湿热蕴结、热盛肉腐所致, 故选择清热除湿、解毒消肿并具有抗菌作用的中药制成口炎净液。现代研究证实, 明矾有明显抗滴虫作用, 对口腔需氧菌和厌氧菌均高度敏感。五倍子能明显抑制和杀灭金黄色葡萄球菌、链球菌等多种细菌。此外, 五倍子含大量五倍子鞣酸, 明矾为碱性硫酸铝钾, 二者均具有较强的收敛作用, 能使蛋白质凝固、小血管收缩、血凝而止血。除本病外, 我们还观察到该药对其他以厌氧菌为主的混合感染性口腔疾病如冠周炎、根尖周炎等亦有较好疗效, 而且无任何毒副作用, 是一种较好的局部用药。