

昆布多糖对吸入性苯中毒的保护功能

刘秋英¹, 陈晓燕², 赖关朝¹, 陈念光¹

(1. 广东省职业病防治院, 广东 广州 510300; 2. 广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 探讨昆布多糖对吸入性苯中毒的保护功能, 研究开发昆布多糖的潜在医药价值。方法 选取50只6~8周龄健康昆明种小鼠, 随机等分为5组, 每组10只, 雌雄各半。正常对照组与苯中毒模型组给予生理盐水0.4 ml/d灌胃, 低、中、高剂量组分别给予昆布多糖50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg灌胃, 连续灌胃7 d后, 除正常对照组不作处理外, 其余4组均采用动式吸入式染毒, 染毒剂量为2 376.49 mg/m³, 每天1次, 连续染毒21 d。称重后分别进行全血细胞计数、骨髓有核细胞计数、骨髓DNA含量的测定、微核试验及多能干细胞测定。结果 预防性给予昆布多糖, 能有效减少苯对小鼠外周血的抑制作用, 防止苯中毒小鼠骨髓有核细胞数量和DNA含量的降低, 有助于降低吸入性苯中毒小鼠微核形成, 减少骨髓细胞DNA突变, 使骨髓无效造血维持在较低水平。结论 在该实验条件下, 昆布多糖对吸入性苯中毒有一定的保护作用, 但要把它作为一种新型低副作用的有效药物推广仍有待进一步探讨。

关键词: 昆布多糖; 苯中毒; 保护作用

中图分类号: R135.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)05-0333-04

Protective effect of laminarin on benzene poisoning by inhalation

LIU Qiu-ying^{*}, CHEN Xiao-yan, LAI Guan-chao, CHEN Nian-guang

(* : Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect of laminarin on benzene poisoning by inhalation for searching and developing the potential pharmaceutical value of laminarin. **Methods** Fifty healthy Kunming mice were divided randomly into five groups, 10 mice in each group (5 male and 5 female). Mice in control group and poisoning group were given 0.9% saline solution by gavage, while the mice in laminarin treated groups were respectively given 50 mg/kg, 100 mg/kg or 200 mg/kg laminarin by gavage. After 7 consecutive days of gavage administration, all mice except the control group were exposed to benzene (2 376.49 mg/m³) through inhalation for 21 days. Then the complete blood count, nucleated cells count, DNA content detection of bone marrow, micronucleus test of polychromatic erythrocytes (PCE) and multipotent stem cells count in bone marrow were performed at the 24th h after the last inhalation of benzene. **Results** Compared with mice of poisoning group, the counts of white blood cells and nucleated cells in laminarin treated groups increased significantly and dose-dependently; however, micronucleus rates in PCE of bone marrow in high and moderate doses laminarin treated groups were decreased significantly. **Conclusion** The results showed that supplementation of laminarin could promote levels of RBC, WBC and Hb in benzene poisoned mice, suggesting laminarin has a certain protective effect on hematopoietic injury by long-term inhalation of benzene.

Key words: laminarin; benzene poisoning; protective effect

昆布又名海带, 其主要含有多糖、天然蛋白质、纤维素、脂肪、矿物质及核酸等, 具有显著的临床药理作用, 而药理作用与其含有的多糖量紧密相关。目前认为海带多糖主要有3种类型: 褐藻酸盐 (alginate), 在海带中含量相对最丰富; 褐藻糖胶 (fucoidan) 或称岩藻糖胶; 褐藻淀粉 (laminarin), 又称昆布多糖、褐藻多糖、海藻硫酸多糖, 在海带中含量约为1%。以往研究表明, 昆布多糖具有增强人体

免疫功能, 抗肿瘤及调血脂等功效^[1-4]。本研究观察昆布多糖对小鼠吸入性苯中毒的保护功能, 从昆布多糖对苯染毒小鼠造血功能的作用观察多糖的中毒保护效应, 并初步探讨其可能机理, 为进一步开发新型治疗职业性苯中毒的药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康昆明种小鼠50只, 雌雄各半, 6~8周龄, 体重(20±2)g, 由广东医学动物中心提供(粤监证字2008A020号)。

1.2 主要试剂及仪器

昆布多糖, Sigma公司, 临用前用生理盐水配制所

收稿日期: 2011-06-21; 修回日期: 2011-07-19

基金项目: 广东省中医药局研究项目(2010246)

作者简介: 刘秋英(1973—), 女, 医学硕士, 副主任技师, 主要从事职业病临床检验, E-mail: qiuyingliu@yahoo.com.cn。

需浓度并过滤除菌; 优级胎牛血清, 天津市灏洋生物制品科技有限公司。LRD/0300B 型 300L 智能型动态染毒柜, 广州九方电子有限公司; KX-21 血常规自动分析仪, 日本东亚公司; BS2100 电子天平, Satorius 公司。

1.3 分组处理及用药

按随机法将小鼠随机等分为正常对照组 (A 组), 苯中毒模型组 (B 组) 和低、中、高 3 个不同浓度昆布多糖保护组 (C、D、E 组), 每组 10 只, 雌雄各半。依据前期预试验, 3 个不同浓度昆布多糖保护组用药剂量分别为 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg; 正常对照组和苯中毒模型组小鼠同时给予等容量生理盐水, 连续 7 d。除正常对照组外, 其余各组于第 8 天进行苯动态吸入式染毒, 染毒剂量为 2 376.49 mg/kg, 时间 2 h, 1 次/d, 连续 21 d。

1.4 观察指标

1.4.1 一般情况 记录分析整个实验过程中各组小鼠的体重变化并观察小鼠进食、饮水等一般情况。

1.4.2 全血细胞分析和白细胞分类计数 染毒结束 24 h 后, 断头处死小鼠, 取血 2 ml 于 EDTA-K₂ 抗凝管中混匀, 在全自动血球计数仪上测定白细胞数 (WBC)、红细胞数 (RBC)、血小板数 (PLT)、血红蛋白含量 (Hb) 等血常规指标。

1.4.3 骨髓有核细胞 (BMC) 计数 从小鼠大腿部取出股骨, 剪去两端, 用注射器吸取 10 ml 3% 冰醋酸冲出骨髓细胞, 在光镜下用记数板记数 4 个大方格内的有核细胞数, 所得细胞数 × 2.5 × 100 000, 即为一根股骨中骨髓有核细胞数。

1.4.4 骨髓 DNA 含量的测定 按参考文献 [5], 取小鼠一侧股骨, 用 5 mmol/L CaCl₂ 将全部骨髓冲入离心管中, 置 4 °C 中 30 min, 2 500 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 将沉淀加 5 ml HClO₄ 混合, 冷

却, 260 nm 处测定吸光度 A 值, 每根股骨所含 DNA (μg) = 40 × 50 × A。

1.4.5 骨髓嗜多染性红细胞 (PCE) 微核率测定 取小鼠胸骨剔干净肌肉等, 用纱布擦干净, 横向剪断, 用小止血钳挤出骨髓, 将骨髓液滴在载玻片上的胎牛血清中混匀, 推片晾干, 经甲醇固定 15 min。吉姆萨染液染色约 10 min, 立即冲洗染液, 在油镜下计数 1 000 个 PCE 细胞, 观察微核细胞数量, 计算出微核率 (%)。

1.4.6 多能干细胞的测定 采用内源性脾结节法。取脾脏, 经 Bouin 液固定 24 h 后计数脾脏表面结节数, 1 个脾结节表示 1 个 CFU-S 单位。

1.5 统计学分析

用 SPSS11.5 统计软件对数据进行统计分析, 多组独立样本比较采用单因素方差分析, 两组样本比较采用 t 检验方法分析。

2 结果

2.1 染毒后的中毒表现及体重变化

在整个实验期内, 各组小鼠未见有与受试物有关的明显异常表现, 动物进食、饮水和活动基本正常, 各组动物未出现死亡。苯吸入性染毒中后期可见个别动物活动增加, 易兴奋受惊, 嗜睡且有震颤表现。实验期间小鼠的体重变化与正常对照组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 体重不受影响。

2.2 对血常规指标的影响

吸入性苯染毒后, 小鼠外周血出现明显的抑制作用, 苯中毒模型组与正常对照组比较血常规各指标均显著下降, 尤其以 WBC、RBC、Hb 及 PLT 下降最为显著 (P < 0.01), 预防性给予低、中、高 3 个剂量的昆布多糖后, 能有效减少苯对小鼠外周血的抑制作用, 详见表 1。

表 1 昆布多糖对苯染毒后小鼠血常规指标影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | WBC (×10 ⁹ /L) | RBC (×10 ¹² /L) | Hb (g/L) | HCT (%) | MCV (fl) | PLT (×10 ⁹ /L) |
|-----|----|---------------------------|----------------------------|------------------|-------------|--------------|---------------------------|
| A 组 | 10 | 2.68 ± 0.82 | 9.54 ± 1.03 | 140.30 ± 14.58 | 0.48 ± 0.06 | 51.15 ± 1.27 | 629.30 ± 41.90 |
| B 组 | 10 | 1.04 ± 0.86** | 8.12 ± 0.75** | 119.40 ± 12.07** | 0.44 ± 0.04 | 52.91 ± 1.84 | 451.60 ± 28.98** |
| C 组 | 10 | 1.21 ± 0.90** | 8.24 ± 1.04** | 125.22 ± 15.65** | 0.43 ± 0.05 | 52.31 ± 0.95 | 464.56 ± 34.49** |
| D 组 | 10 | 1.85 ± 1.20*Δ | 8.89 ± 1.66ΔΔ | 142.20 ± 28.22ΔΔ | 0.47 ± 0.08 | 52.50 ± 1.21 | 516.30 ± 37.29*Δ |
| E 组 | 10 | 2.43 ± 0.97ΔΔ | 9.82 ± 1.07ΔΔ | 142.70 ± 25.70ΔΔ | 0.46 ± 0.06 | 52.54 ± 0.78 | 583.80 ± 33.56ΔΔ |

注: 与正常对照 A 组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与苯中毒模型 B 组相比, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01。

2.3 对骨髓有核细胞数 (BMC) 和 DNA 含量的影响

小鼠接受吸入性苯染毒后, 苯染毒模型组小鼠 BMC 数量、DNA 含量明显低于正常对照组 (P < 0.01)。中、高剂量的昆布多糖保护组 BMC 数量、

DNA 含量降低程度较苯染毒模型组小, 且差异均有统计学意义, 分别为 P < 0.05 和 P < 0.01。低剂量昆布多糖保护组的 BMC 数量、DNA 含量与苯染毒模型组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 见表 2。

表2 昆布多糖对苯染毒后小鼠 BMC 及 DNA 指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 昆布多糖 (mg/kg) | DNA (μg) | BMC ($\times 10^9/\text{L}$) |
|----|----|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| A组 | 10 | 0 | 2 462.00 \pm 134.66 | 496.80 \pm 92.37 |
| B组 | 10 | 0 | 965.56 \pm 197.26** | 251.80 \pm 90.96** |
| C组 | 10 | 50 | 1 034.67 \pm 111.08** | 266.89 \pm 68.69** |
| D组 | 10 | 100 | 1 411.56 \pm 181.43* Δ | 307.90 \pm 28.10* Δ |
| E组 | 10 | 200 | 1 891.60 \pm 151.47 $\Delta\Delta$ | 403.80 \pm 105.35 $\Delta\Delta$ |

注: 与正常对照 A 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与苯中毒模型 B 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.4 对骨髓 PCE 微核率的影响

苯中毒模型组与正常对照组相比, 微核率明显升高 ($P < 0.01$), 各昆布多糖保护组微核率升高程度较苯中毒模型组小, 苯中毒模型组与中、高剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

表3 昆布多糖对吸入性苯染毒小鼠骨髓 PCE 微核率的影响

| 组别 | 昆布多糖 (mg/kg) | PCE | 微核数 | 微核率 (%) |
|----|-----------------|--------|-----|---------------------------------|
| A组 | 0 | 10 000 | 42 | 4.20 \pm 1.32 |
| B组 | 0 | 10 000 | 103 | 10.30 \pm 1.06** |
| C组 | 50 | 10 000 | 86 | 9.56 \pm 0.88** |
| D组 | 100 | 10 000 | 72 | 7.20 \pm 0.92* $\Delta\Delta$ |
| E组 | 200 | 10 000 | 54 | 5.40 \pm 1.07 $\Delta\Delta$ |

注: 与正常对照 A 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与苯中毒模型 B 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.5 对内源性脾结节生成的影响

吸入性苯染毒后, 小鼠脾结节数目明显减少, 各组与正常对照组均有明显差异, 高剂量多糖能使染毒小鼠脾结节数目得到显著提高 ($P < 0.01$), 低剂量多糖对染毒小鼠脾结节数目亦有一定的提高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表4 昆布多糖对吸入性苯染毒小鼠脾结节生成的影响

| 组别 | 昆布多糖 (mg/kg) | 脾结节数 (CFU-S) |
|----|-----------------|----------------------------------|
| A组 | 0 | 11.60 \pm 2.01 |
| B组 | 0 | 3.10 \pm 1.73** |
| C组 | 50 | 4.44 \pm 1.74** Δ |
| D组 | 100 | 6.60 \pm 1.58** $\Delta\Delta$ |
| E组 | 200 | 7.40 \pm 1.84** $\Delta\Delta$ |

注: 与正常对照 A 组相比, ** $P < 0.01$; 与苯中毒模型 B 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

苯中毒的损害首先表现在骨髓异常, 具体表现为骨髓细胞数量减少, 造血功能抑制, 微核细胞率增加等改变。众多研究学者展开了对慢性苯中毒治疗的探究, 致力于开发新型低副作用的有效廉价药物。本研究从多方面观察昆布多糖对小鼠吸入性苯中毒的保护功能, 并初步探讨其可能机制, 为进一步开发新型治疗职业性苯中毒的药物提供方向和依据。

通过对给予昆布多糖灌胃小鼠的苯亚急性动态吸入性染毒实验, 结果显示各组间的小鼠体重未受到实验因素的影响而发生明显变化。有关研究资料表明^[6-8], 急性苯中毒主要为中枢神经系统抑制症状, 除出现中枢神经症状外, 还可以引起暂时性的血象变化, 白细胞总数可轻度升高, 过一段时间后恢复正常; 长时间的苯接触对造血系统中的白细胞、红细胞、血小板均有影响, 三系细胞计数下降, 且随着中毒程度的增加, 周围血细胞减少更为明显, 但三系细胞的敏感性不同, 以白细胞减少最为明显。因此认为可能与白细胞较红细胞和血小板更为敏感有关, 从而导致白细胞计数的减少, 对于白细胞计数能否恢复正常有待于进一步研究。结合本研究微核实验结果认为可能与染毒剂量、苯代谢产物在骨髓的生成蓄积量有关。进入体内的苯或酚类等代谢物能在骨髓组织中蓄积, 可发现苯中毒对骨髓遗传物质所造成的影响, 苯中毒模型组与正常对照组相比, 微核率明显升高 ($P < 0.01$); 各多糖保护组微核率升高程度较苯中毒模型组小, 苯中毒模型组与中高剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示苯中毒危害作用于骨髓遗传物质先于外周血, 而昆布多糖有助于降低苯中毒小鼠微核形成。接受吸入性苯染毒后, 苯染毒模型组小鼠 BMC 数量、DNA 含量明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。中、高剂量的昆布多糖保护组 BMC 数量、DNA 含量降低程度较苯染毒模型组小, 且差异均有统计学意义。吸入性苯染毒后, 小鼠脾结节数目明显减少, 各组与正常对照组相比差异均有统计学意义, 高剂量多糖组能使染毒小鼠脾结节数目得到显著提高 ($P < 0.01$), 说明本实验染苯浓度和染苯时间可引起脾脏功能的异常变化, 可能造成脾脏的损害。本实验研究昆布多糖对小鼠损伤内源性脾结节数的减少有明显的抑制作用, 提示昆布多糖对苯中毒小鼠多能干细胞数量的减少有一定的保护作用。

综上所述, 昆布多糖对苯中毒引起的小鼠骨髓抑制有一定的拮抗保护作用, 其作用机制可能与其对机体的免疫调节和抗突变、抗氧化等功能有关。昆布多糖作为药物的研究和开发尚处于起步阶段, 有待进一步更全面的探讨。

参考文献:

- [1] 魏文青, 丛建波, 先宏, 等. 海藻硫酸多糖对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10 (9): 671-675.
- [2] Itoh H, Noda H, Amano H, et al. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoxanthin, prepared from *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae [J]. Anticancer Res, 1993, 13: 2045. (下转第 363 页)

1.2.1 层粘连蛋白 (LN)、IV 胶原 (C-IV)、透明质酸酶 (HA) 测定 取水泥粉尘致肺纤维化患者及肺纤维化模型大鼠静脉血, 分离血清。3 000r/min, 离心 10 min, 分离血清, -20 °C 保存。用放射免疫试剂盒 (上海海研生物技术有限公司, 批号: 20101208) 直接测定法同步测定层粘连蛋白 (LN)、IV 胶原 (C-IV)、透明质酸酶 (HA), 以 ng/ml 表示。

1.2.2 病理观察 实验结束时称重处死大鼠, 断颈取血, 分离血清。取肺组织经过 10% 福尔马林液固定, 脱水, 石蜡包埋, 制片, HE 染色, 由专业病理人员在光学显微镜下阅片, 判断肺纤维化病变轻重程度。

1.2.3 质量控制和统计学处理 为消除批间误差, 采取统一

药盒, 同一批检测全部人和大鼠血清中的 LN、C-IV、HA 含量。所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 分别进行两样本均数 *t* 检验。

2 结果

2.1 HA、LN、C-IV 含量测定结果

水泥尘肺纤维化患者组与对照组 HA、LN、C-IV 含量测定结果比较, 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。水泥尘肺纤维化患者组中贰、叁期与壹期病例 HA、LN、C-IV 含量测定结果比较, HA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LN、C-IV 显著高于壹期 ($P < 0.01$)。详见表 1。

肺纤维化模型大鼠血清模型组 HA、LN、C-IV 含量测定结果显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 水泥尘肺纤维化患者组、肺纤维化模型大鼠血清 HA、LN、C-IV 含量测定

ng/ml

| 组别 | 例数 | HA | LN | C-IV |
|---------|----|-----------------|----------------|---------------|
| 观察组 | 30 | 88.9 ± 39.01* | 100.0 ± 44.2* | 162.2 ± 16.4* |
| 贰、叁期患者组 | 14 | 39.9 ± 16.6 | 130.6 ± 38.1** | 69.3 ± 16.8** |
| 壹期患者组 | 16 | 35.8 ± 8.8 | 66.9 ± 24.8 | 58.4 ± 15.7 |
| 对照组 | 30 | 37.1 ± 20.9 | 60.7 ± 22.8 | 68.5 ± 18.3 |
| 大鼠模型组 | 10 | 213.5 ± 96.9*** | 32.9 ± 9.1*** | 24.5 ± 4.1*** |
| 大鼠假手术组 | 10 | 54.5 ± 15.6 | 12.7 ± 2.7 | 7.5 ± 3.4 |

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与壹期组比较, ** $P < 0.01$; 与大鼠假手术组比较, *** $P < 0.01$ 。

2.2 博莱霉素所致大鼠肺纤维化模型组与假手术组病理学检查结果

大鼠肺纤维化模型组病变处肺泡壁增厚, 肺泡间隔增宽; 在气管和血管周围及近胸膜处肺组织可见以单核细胞和淋巴细胞为主的炎性细胞浸润; 胸膜增厚, 并可见较明显的成纤维细胞和胶原纤维的增生和集聚。假手术组病理无上述病理学变化。

大鼠病理学检查显示肺纤维化模型大鼠肺部组织呈明显的纤维化, 血清纤维化 LN、C-IV、HA 含量也明显高于对照组。也有文献^[4]报道博莱霉素所致大鼠肺纤维化模型组肺组织匀浆液中 LN、I ~ III 胶原显著增加。提示 C-IV、HA、LN 与肺纤维化相关, 但运用于疾病诊断仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 朱愉, 多秀赢. 实验动物的疾病模型 [M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 1996: 24-25.

[2] 固春晖, 刘移明. 粉尘致肺纤维化机制研究现状 [J]. 热带医学杂志, 2009, 9 (5): 584.

[3] 牛建昭, 袁长恩. 器官纤维化基础及中医药防治 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 97-98.

[4] 张晓梅, 姜良锋, 张伟, 等. 肺纤方对博莱霉素大鼠肺纤维化层粘连蛋白及 I、III 胶原的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30 (9): 610.

3 讨论

粉尘进入机体后引发巨噬细胞的自由基和脂质过氧化反应, 受刺激的巨噬细胞还能释放大量的细胞因子, 引起肺成纤维细胞大量增生、胶原代谢紊乱、细胞外基质沉积, 最终导致肺纤维化^[2]。成纤维以 C-IV、HA、LN 等物质为组织纤维化典型标志物^[3]。本实验结果显示, 水泥粉尘致肺纤维化患者血清中 LN、C-IV、HA 含量明显高于健康对照组, 且随病情的加重血清中 LN、C-IV 含量也明显增高。肺纤维化模型

2000: 224-230.

(上接第 335 页)

[3] Hatanaka K, Yoshida T, Miyahara S, et al. Synthesis of New Heparinoids with high anticoagulant activity [J]. Med Chem, 1987, 30: 810.

[4] Baba M. Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-induced syncytium formation: a new strategy towards AIDS chemotherapy [J]. Acquir Immune Defic Syndr, 1990, 3: 493.

[5] 苏燎原. 淋巴细胞及其辐射效应 [M]. 北京: 原子能出版社,

[6] 张印德, 杨树媛, 傅鸣远. 铅苯汞中毒 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985: 78-79.

[7] Aksoy M, Ozeris S, Sahuncu H, et al. Exposure to benzene in Turkey between 1983 and 1985: a haematological study on 231 workers [J]. Br J Ind Med, 1987, 44: 785.

[8] 张峻. 苯中毒致造血功能障碍 19 例临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18 (1): 28-29.