

藏药巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠红系造血功能的影响及机制

降央泽仁¹, 杨林², 黄茜¹, 黄晓芹^{1*}

(1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137;

2. 四川省阿坝州人民医院, 四川 马尔康 624000)

[摘要] **目的:**探讨藏药巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠红系造血功能的影响及可能机制。**方法:**采用外周血红细胞计数、造血祖细胞集落分析、实时荧光定量多聚酶链反应等方法,检测灌胃巴桑母酥油丸(0.75, 1.5, 3.0 g·kg⁻¹)后放射线-化学复合损伤小鼠外周血红细胞(RBC)数及血红蛋白(Hb)量、骨髓红系造血祖细胞集落产率、肾脏红细胞生成素(Epo)和脾脏红细胞生成素受体(EpoR)mRNA表达量。**结果:**灌胃14, 20 d后,巴桑母酥油丸中、高剂量组外周血RBC数显著高于空白组、模型组和低剂量组($P < 0.05$);灌胃20 d后,巴桑母酥油丸中剂量Hb含量显著高于空白组和模型组($P < 0.05$)。灌胃14 d后,巴桑母酥油丸中剂量组骨髓细胞的早期、晚期红系祖细胞(CFU-E, BFU-E)集落产率均显著高于空白组和模型组($P < 0.01$);中剂量组肾脏Epo mRNA相对表达量显著高于空白组和模型组($P < 0.05$)。**结论:**巴桑母酥油丸可以通过刺激肾脏Epo分泌、促进骨髓造血祖细胞增殖分化,进而促进放射线-化学复合损伤小鼠外周血RBC数及Hb含量的恢复。

[关键词] 藏药; 巴桑母酥油丸; 放-化疗; 红系造血

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0275-04

[doi] 10.11653/syfy2013170275

Effect of Traditional Tibetan Tonic Prescription Basangmu Suyou wan on Erythropoiesis Function and Underlying Mechanism in Mice with Joint Radiation and Chemical Injury

JIANG-Yang-ze-ren¹, YANG Lin², HUANG Qian¹, HUANG Xiao-qin^{1*}

(1. National Medical School, Chengdu Traditional Chinese Medicine University, Chengdu 611137, China;

2. A ba Prefecture People's Hospital, Maerkang 624000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of traditional Tibetan medicine tonic prescription Basangmu Suyou wan on erythropoiesis and elucidate the underlying mechanism in mice with joint radiation and chemical injury. **Method:** Using a blood cell counter, a colony forming assay and fluorescent real-time quantitative PCR, the changes in peripheral erythrocyte count, hemoglobin content, erythroid hematopoietic progenitors colony forming proportion of bone marrow cell, kidney erythropoietin (Epo), spleen Epo receptor (EpoR) mRNA were investigated after 0.75, 1.5, 3.0 g·kg⁻¹ Basangmu Suyou wan was gastrically given to the mice with joint radiation and chemical injury, and compared with those in the blank group as well as the control group given physical saline. **Result:** The erythrocyte count of blank, modle, low dose, middle dose, high dose group were (8.92 ± 0.30), (8.67 ± 0.38), (8.85 ± 0.49), (9.35 ± 0.77), (9.61 ± 0.30) × 10¹²/L respectively at 14 days. The counts of 14 days middle dose and high dose group were highen than those of the blank, the modle and

[收稿日期] 20121107(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072893)

[第一作者] 降央泽仁, 实验师, 从事基础医学实验工作, Tel: 028-61800219, E-mail: 1172053120@qq.com

[通讯作者] * 黄晓芹, 博士, 教授, 从事中西医结合基础研究工作, Tel: 028-61800219, E-mail: hxq196899@sina.com

of low dose group ($P < 0.05$). The hemoglobin contents were (157.00 ± 6.78) , (145.75 ± 37.81) , (162.09 ± 8.57) , (166.17 ± 9.40) , (162.00 ± 6.07) $g \cdot L^{-1}$ respectively at 20 days after treatment, the content of middle dose group was higher than those of the blank and middle group ($P < 0.05$). The bone marrow cell colony forming unit erythrocyte (CFU-E) and burst-forming unit erythroid (BFU-E) proportion in the blank, middle and the middle dose group were (56.56 ± 6.64) , (55.18 ± 7.07) , $(64.31 \pm 9.15) / 5 \times 10^4$ bone marrow cell (BMC) and (31.68 ± 6.13) , (33.44 ± 6.5) , $(40.69 \pm 8.06) / 5 \times 10^4$ BMC respectively at 14 days, the proportion in the middle dose groups were more higher than those of the blank and middle groups ($P < 0.01$). The kidney *Epo* mRNA expression level of the blank, the middle and the middle dose group were (1.13 ± 0.53) , (0.92 ± 0.20) , $(2.48 \pm 1.56) 2^{-\Delta\Delta Ct}$ respectively, the level in middle dose group was higher than those of the blank and middle groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Basangmu Suyou wan promotes the kidney erythropoietin secretion, the erythroid hematopoietic progenitor proliferation and differentiation, and then induce the recovery of peripheral erythrocyte count and hemoglobin content in mice with joint radiation and chemical injury.

[**Key words**] traditional Tibetan medicine; Basangmu Suyou wan; radiation and chemotherapy; erythropoiesis

巴桑母酥油丸是藏医滋补根本方剂之一,藏医经典著作《四部医典》记载,“巴桑全身皆益”,即:由清热的 3 果(余甘子、诃子、毛诃子)药酥和治疗寒症的 5 根(天冬、黄精、西藏梭子芹、喜马拉雅紫茉莉、蒺藜)药酥合成的巴桑母酥油丸“对身体上下之各种疾病均有裨益”^[1]。放、化疗是现代医学治疗恶性肿瘤重要的手段,但放、化疗双重因素往往导致贫血、出血、白细胞减少、呕吐、脱发、虚弱、抵抗力下降、多器官损伤等“元气耗损、身体虚弱”的临床表现,符合藏医“滋补”的实用范围,其中造血系统功能抑制是放、化疗最严重、最根本的毒副作用,为此笔者以放射线-化学复合损伤小鼠模拟病人放化疗后状态^[2],研究巴桑母酥油丸对其造血功能的影响和可能机制,以填补巴桑母酥油丸作用机制现代研究空白,从而为缓解肿瘤患者放、化疗后毒副作用、提高病人生存质量和生存年限另辟蹊径。

1 材料

1.1 动物 SPF 级, 8 ~ 12 周龄雄性 C57BL6J 小鼠,购于四川大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(川)2009-09。

1.2 药品及试剂 巴桑母酥油丸(Basangmu Suyou wan,西藏藏医学院藏药有限公司,批号 101201,用生理盐水溶解至所需浓度,4 °C 贮存备用,用前加热混匀)。重组人红细胞生成素(沈阳三生制药股份有限公司,批号 20100601),PCR 所用引物为小鼠 *EpoR* (*M-EpoR*) 引物: *M-EpoRF*, 5'-CACCGCATCA TCCATATCAATG-3'; *M-EpoRR*, 5'-CAGGACCTC-CACCC TTTGTGT-3'; 探针: *M-EpoRTaqMan* probe, 5'-CACCACGTGGCTGCCCTCTTC-3'。产物长度为

198 bp。小鼠 *Epo* (*M-Epo*) 引物: *M-EpoF*, 5'-TCCC ACCCTGCTGCTTTTA-3'; *M-EpoR*, 5'-GCACAACCC ATCGTGACATTT-3'; 探针 *TaqMan* probe, 5'-CCTCT-GGGCCTCCCAGTCCT-3'。产物长度为 150 bp。内参 (β -actin) 引物: β -actin 5'-GAAGATCAAGATCATT-GCTCCT-3'; β -actin: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-CA-3'; 探针 β -actin *TaqMan*: 5'-TCACTGTCCACCT-TCCAGCAGA-3',产物长度 111 bp。引物合成及探针修饰(上海生物工程有限公司),逆转录试剂盒(Eu Fermentas 公司,批号 00098448),*Taq* DNA PCR 反应试剂盒(Takara 大连宝生,批号 ck3501AA),Trizol(美国 invitrogen,批号 50563209),dNTP(美国普洛麦格公司,批号 251230) DNA 分子量标准(DNA Marker: Marker I,显示条带 100, 200, 300, 400, 500, 600 bp,北京康为世纪公司,批号 16911K),琼脂糖(电泳级, Gene Tech 上海有限公司,批号 111760)。

1.3 仪器 ⁶⁰Coy 源(四川省农业科学院生物技术核技术研究所辐照中心),VET 130004 型动物专用 3 分类全血细胞自动计数仪(奥地利 Abacus Junior),FTC2000 型实时荧光定量基因扩增仪(加拿大 Funglyn),Powerpac Basic™ 型水平电泳仪(美国 Bio-Rad),Gel Doc 1000 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 外周血红细胞(RBC)数及血红蛋白(Hb)检测 动物按本室常规制造放化疗复合损伤模型^[3],于造模完成后第 2 天开始分别灌胃 0.75(低剂量组),1.5(中剂量组),3.0(高剂量组) $g \cdot kg^{-1}$ 的巴桑母酥油丸乳液和造模后自然恢复组(模型组),另设空白

组(生理盐水),1次/d。于灌胃的3,7,14,20 d测各组小鼠外周RBC数和Hb含量。

2.2 骨髓红系祖细胞集落产率检测 造模后小鼠中剂量巴桑母酥油丸灌胃14 d后在无菌条件下分离骨髓细胞,进行祖细胞培养。晚期红系祖细胞(CFU-E)培养时间为3 d,第4天计数集落数,早期红系祖细胞(BFU-E)培养时间7 d,第8天计数集落数。CFU-E以8~32个细胞为1个集落,BFU-E以50个细胞以上为1个集落。

2.3 红细胞生成素及其受体 mRNA 水平检测 造模后小鼠灌胃中剂量巴桑母酥油丸14 d后取肾脏、脾脏,按常规方法提取总RNA,行琼脂糖凝胶电泳检验,确认总RNA提取完整无降解后按试剂盒要求进行逆转录。逆转录后进行常规PCR,确认引物合成正确后进行荧光定量PCR。 β -actin基因作为内参基因同时进行扩增。反应条件为94℃×2 min-94℃×20 s/55℃×30 s/60℃×40 S,45个循环。

记录每一样品目的基因和内参基因Ct值(Cycle_{threshold})将原始数据(Ct)换算为基因的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)后,分析比较初始基因表达量。

2.4 统计处理 采用SPSS 13.0统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对射线-化学复合损伤小鼠外周血 RBC 数量及 Hb 含量的影响 给药3,7 d,各组间RBC数无明显差异,给药14,20 d后中、高剂量巴桑母酥油丸外周RBC数显著高于空白组、模型组和低剂量组。见表1。

给药3,7 d,各组间Hb含量无明显差异,给药14 d时,模型、巴桑母酥油丸低剂量、高剂量组的Hb含量显著低于空白组,给药20 d时,模型组Hb显著低于空白组,巴桑母酥油丸各剂量组均高于模型组($P < 0.05$),其中中剂量组已超过空白组($P < 0.05$)。见表2。

表1 巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠外周血RBC数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

×10¹²/L

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	7 d	14 d	20 d
空白	-	8.35 ± 0.72	7.57 ± 0.39	8.92 ± 0.30	9.69 ± 0.63
模型	-	8.41 ± 0.45	7.71 ± 0.74	8.67 ± 0.38	9.44 ± 0.94
巴桑母酥油丸	0.75	8.70 ± 0.48	7.71 ± 0.66	8.85 ± 0.49	9.46 ± 1.11
	1.5	8.15 ± 0.55	7.96 ± 0.62	9.35 ± 0.77 ^{1,2,3)}	10.30 ± 0.49 ^{1,2,3)}
	3.0	8.26 ± 0.45	7.27 ± 1.01	9.61 ± 0.30 ^{1,2,3)}	10.12 ± 0.30 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;巴桑母酥油丸高、中剂量与低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2,4同)。

表2 巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠外周血Hb含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

g·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	7 d	14 d	20 d
空白	-	133.38 ± 11.96	120.43 ± 10.23	164.86 ± 4.26	157.00 ± 6.78
模型	-	137.38 ± 6.86	125.38 ± 12.37	158.75 ± 6.84 ¹⁾	145.75 ± 37.81 ¹⁾
巴桑母酥油	0.75	140.71 ± 7.00	125.86 ± 12.19	157.50 ± 5.86 ¹⁾	162.09 ± 8.57 ²⁾
	1.5	131.50 ± 9.45	126.58 ± 10.88	161.44 ± 6.95	166.17 ± 9.40 ^{1,2)}
	3.0	130.86 ± 9.08	117.28 ± 17.38	156.17 ± 4.58 ¹⁾	162.00 ± 6.07 ²⁾

3.2 对放射线-化学复合损伤小鼠骨髓红系祖细胞集落产率的影响 给药14 d后,巴桑母酥油丸中剂量小鼠骨髓中红系祖细胞集落产率显著高于空白组和模型组($P < 0.01$)。见表3。

表3 巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠骨髓红系祖细胞集落产率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)个/(5 × 10⁴ BMC)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	早期BFU-E	晚期CFU-E
空白	-	56.56 ± 6.64	31.68 ± 6.13
模型	-	55.18 ± 7.07	33.44 ± 6.5
巴桑母酥油	1.5	64.31 ± 9.15 ^{1,2)}	40.69 ± 8.06 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对放射线-化学复合损伤小鼠肾脏 Epo mRNA 及脾脏 EpoR mRNA 的影响 灌胃巴桑母酥油丸后,放射线-化学复合损伤小鼠肾脏Epo mRNA相对表达量显著高于空白组和模型组($P < 0.05$),而脾脏EpoR mRNA相对表达量略有升高,但与空白组和模型组相比没有显著差异。见表4。

表4 巴桑母酥油丸对放射线-化学复合损伤小鼠Epo mRNA及EpoR mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $2^{-\Delta\Delta Ct}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肾脏Epo mRNA	脾脏EpoR mRNA
空白	-	1.13 ± 0.53	4.03 ± 2.05
模型	-	0.92 ± 0.20	6.13 ± 1.36
巴桑母酥油	1.5	2.48 ± 1.56 ^{1,2)}	6.737 ± 3.72

4 讨论

传统藏医药理论认为:藏药吸收后要经过“三胃火”的复杂作用,产生药味、药性的变化,变成真正意义上的“药物”才最终入肝-血-肌肉-脂肪-骨-骨髓-精液,以达治病的目的,同时传统藏药疗程较长^[4]。为此,笔者采用较长时间体内用药、不同时间取材检测的方式,发现随着用药时间的延长,中、高剂量的巴桑母酥油丸可促进放射线-化学复合损伤小鼠外周血 RBC 数及 Hb 出现不同程度地恢复,且两剂量间没有差异。由于随着灌胃时间的延长,灌胃的各组小鼠均出现不同程度的体重下降(另文报道),提示太长时期灌胃对小鼠消化系统不可避免地造成损伤进而影响进食和实验结果,因此通过灌胃方式给药的药效、药理实验设计和结果分析,必须考虑到这一潜在的干预因素。为此,后续实验时,我们将药物浓度确定为中剂量、用药时间选择为外周血已明显恢复的 14 d。

在适宜的条件下,造血祖细胞可以增殖分化为多个(多向造血祖细胞,较早期)或者单个(定向造血祖细胞,较晚期)系列的血细胞,它的存在和增殖能力主要依靠在体外培养中所形成的祖细胞集落数来显示^[5]。笔者的研究显示,巴桑母酥油丸可以促进放射线-化学复合损伤小鼠骨髓红系定向祖细胞 CFU-E, BFU-E 增殖,进而导致 RBC 数及 Hb 的恢复。这一研究结果与其他作者报道的“补肾解毒活血方和益气补血方均可促进化学损伤至骨髓抑制小鼠造血祖细胞集落形成进而促进造血功能恢复”^[6-7]的结果场合,提示祖国传统医学中的“补益”方,对改善放、化疗后骨髓造血功能抑制具有进一步的研究运用前景^[8]。

造血细胞、造血诱导微环境、造血调节因子是影响血液发生的 3 个重要因素。Epo 是维持红系造血功能正常进行不可或缺的造血调节因子之一, Epo 同时对巨核系和粒-巨噬系的血发生也具有一定的调节作用^[9-10]。肾脏是成年动物 Epo 产生的主要器官。笔者的实验显示灌胃巴桑母酥油丸后,放射-化学复合损伤小鼠肾脏 Epo mRNA 相对表达量显著上升,表明巴桑母酥油丸可能具有促进肾脏分泌 Epo 的作用,这可能是其促进红细造血功能恢复的机制之一。Epo 敏感细胞或 Epo 反应细胞表面具有 Epo 受体, Epo 与 EpoR 结合后激活 JAK2-STATS 信号转导通路进而产生相应的生物学效应。出生后哺乳动物的造血主要有骨髓完成,但在小鼠,脾脏仍然保留着重要的造血功能,是小鼠最重要的造血器官之一,

在受到某些刺激因子作用后,小鼠的脾脏在红系造血中具有比骨髓更为活跃的功能^[11-12]。笔者的研究显示,灌胃巴桑母酥油丸后,放化复合损伤小鼠脾脏的 EpoR mRNA 表达量与生理盐水和空白组相比没有差异,结合实验中发现灌胃巴桑母酥油丸后,小鼠脾脏指数没有改变(另文报道)的情况,可以推测,巴桑母酥油丸可能主要通过改变骨髓而不是脾脏的造血机能促进放射线-化学复合损伤小鼠红系造血功能恢复。

[参考文献]

- [1] 第司·桑吉嘉措. 蓝琉璃[M]. 毛继祖, 卡洛, 毛韶玲译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 617.
- [2] 徐启华, 胡明华, 马方励, 等. 虚证动物模型的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 307.
- [3] 黄晓芹, 降央泽仁, 祝彼得. 放化复合损伤至血虚证小鼠肾脏 EPO、脾脏 EPO-R、骨髓 GM-CSF mRNA 表达改变[J]. 成都中医药大学学报, 2009, 32(3): 56.
- [4] 兰科加. 浅述藏药治疗疾病的机理[J]. 中国民族医药杂志, 2005, 11(3): 15.
- [5] 王亚平. 干细胞衰老与疾病[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 93.
- [6] 马增春, 高月, 刘永学, 等. 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 10(7): 13.
- [7] 王茜, 杨旭辉, 高月, 等. 补肾解毒活血法与益气补血法对骨髓抑制小鼠造血功能影响的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 192.
- [8] 钱瑞琴, 孟勇. 补益中药调整应激模型动物免疫细胞受抑及其可能机制[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(3): 169.
- [9] Del Vecchio L, Pozzoni P, Andrulli S, et al. Inflammation and resistance to treatment with recombinant human erythropoietin [J]. J Ren Nutr, 2005, 15(1): 137.
- [10] Neumann U, Kunert C, Sperschneider H. The effect of erythropoietin (rh-Epo) on *in vitro* proliferation of granulocyte/monocyte-determined stem cells in bone marrow and peripheral blood [J]. Med Klin (Munich), 1999, 94(3): 152.
- [11] Barrios L, Agustini M I, Poletti O H, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine bone marrow and spleen erythropoiesis [J]. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 1998, 48(1): 18.
- [12] 何瑶, 傅超美, 毛茜, 等. 四物汤不同提取工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 198.

[责任编辑 李玉洁]