

# 益髓生血颗粒对辐射损伤小鼠骨髓细胞周期的影响

王文娟<sup>1\*</sup>, 刘莉<sup>2</sup>, 邹阳<sup>2</sup>, 李俊丽<sup>2</sup>, 刘咏梅<sup>2</sup>, 方素萍<sup>2</sup>, 吴志奎<sup>2</sup>, 吕鑫霞<sup>2</sup>, 阚杰<sup>2</sup>

(1. 首都医科大学, 北京 100069; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的: 观察补肾生血药益髓生血颗粒对骨髓细胞周期的影响, 探讨其可能的造血调控机制。方法: 将78只雄性昆明种小鼠随机分为正常组(A组)、模型组(B组)、G-CSF组(C组)、益髓生血颗粒高剂量组(D组)、益髓生血颗粒中剂量组(E组)、益髓生血颗粒低剂量组(F组), 每组13只。采用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线全身一次性照射造成小鼠骨髓急性损伤模型。造模前, 先预防给药2 d, D-F组分别按12, 6, 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃益髓生血颗粒, A~C组给予等量蒸馏水。造模第2天, C组按30  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>皮下注射G-CSF注射液, 其余各组给药方法同预防给药, 连续14 d。收集各组小鼠骨髓有核细胞, 采用流式细胞仪检测骨髓细胞周期的分布情况。结果: 与正常组相比, 模型组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例为(67.6  $\pm$  7.1)%, 明显降低; S期细胞比例为(25.3  $\pm$  5.7)%, G<sub>2</sub>/M期细胞比例为(7.1  $\pm$  1.8)%, 均明显增加(均P < 0.001); 细胞增殖指数为(32.4  $\pm$  7.1)%, 明显升高(P < 0.001)。与模型组相比, 益髓生血颗粒高剂量组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例为(62.2  $\pm$  3.6)%, 明显降低(P < 0.05); 细胞增殖指数为(37.8  $\pm$  3.6)%, 明显升高(P < 0.05); 益髓生血颗粒各剂量组处于S期的细胞比例分别为(29.1  $\pm$  2.7)%, (29.2  $\pm$  4.8)%, (29.5  $\pm$  3.9)%, 均明显升高(均P < 0.05)。结论: 补肾生血药益髓生血颗粒可通过促进骨髓细胞由G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期进入S期而明显促进细胞增殖。

**[关键词]** 补肾生血药; 益髓生血颗粒; 辐射损伤; 骨髓有核细胞; 细胞周期

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0179-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0930.007.html>

**[网络出版时间]** 2013-01-24 9:30

## Influence of Yisui Shengxue Granule on the Cell Cycle of Bone Marrow Cells in Mice Irradiated by <sup>60</sup>Co- $\gamma$ Rays

WANG Wen-juan<sup>1\*</sup>, LIU Li<sup>2</sup>, ZOU Yang<sup>2</sup>, LI Jun-li<sup>2</sup>, LIU Yong-mei<sup>2</sup>,  
FANG Su-ping<sup>2</sup>, WU Zhi-kui<sup>2</sup>, LV Xin-xia<sup>2</sup>, KAN Jie<sup>2</sup>

(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the influence of Yisui Shengxue granule on the cell cycle of bone marrow cells (BMCs) in mice irradiated by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  rays, and to explore its mechanism in hematopoietic regulation. **Method:** Seventy-eight male Kunming mice were randomly divided into six groups, normal control group, model group, G-CSF group, low-dose, middle-dose and high-dose Yisui Shengxue granule group. Except normal control group, mice were established by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray in other five groups. 2 days before modeling, mice in low-dose, middle-dose and high-dose Yisui Shengxue granule group received 12, 6, 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Yisui Shengxue granule respectively, mice in other groups received the same volume distilled water. The 2nd day after modeling, mice in G-CSF group received 30  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> recombinant human granulocyte colony-stimulating factor by injection, mice in other groups received the same way as before modeling, the course lasted 14 days. Cell cycle distribution of BMCs was detected by flow cytometry (FCM) analysis. **Result:** The data showed that, compared with normal

**[收稿日期]** 20120902(007)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2010CB530406);首都医科大学科研基金(自然类)项目(2012ZR19)

**[通讯作者]** \*王文娟,医学博士,讲师,从事中西医结合基础研究, Tel:010-83911634, E-mail: ruyue999@sina.com

control group, the BMC population in model group and all the Yisui Shengxue granule groups obviously decreased in  $G_0/G_1$  phase (all  $P < 0.001$ ), significantly increased in S phase and  $G_2/M$  phase (all  $P < 0.001$ ), and their proliferation index (PI) were obviously elevated (all  $P < 0.001$ ). Compared with model group, the BMC population in high-dose Yisui Shengxue granule group obviously decreased in  $G_0/G_1$  phase ( $P < 0.05$ ), its PI was obviously elevated ( $P < 0.05$ ), and the BMC population in all the Yisui Shengxue granule groups obviously increased in S phase (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** These results suggest that Yisui Shengxue granule can promote the proliferation of BMCs in mice irradiated by  $^{60}\text{Co}-\gamma$  rays by activating the entry of  $G_0/G_1$  phase into S phase.

[Key words] reinforcing kidney and engendering blood drugs; yisui Shengxue granule; irradiated by  $^{60}\text{Co}-\gamma$  rays; bone marrow cell; cell cycle

“肾藏精,精血同源,肾主骨生髓,髓能养血”是肾藏象理论的重要内容,该理论显示肾之精髓均是化生血液的基本物质,提示我们临床治疗以血细胞减少为主的疾病可从肾入手<sup>[1]</sup>。补肾生血药益髓生血颗粒是在这一中医理论指导下,在长期临床实践基础上研制而成的一种中药复方制剂,具有滋肾养阴、益精生血的作用<sup>[2]</sup>。本课题组前期一直从事应用益髓生血颗粒治疗各类贫血(尤其是地中海贫血)的临床与实验研究,发现该药能促进骨髓造血,促进红系、粒系分化,升高外周血血红蛋白含量及白细胞数<sup>[3-6]</sup>。为进一步明确益髓生血颗粒促进骨髓造血的疗效作用机制,本实验采用辐射法造成小鼠骨髓急性损伤模型,应用益髓生血颗粒进行干预,通过流式细胞仪检测了该药对骨髓有核细胞周期的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠共 78 只,雄性,体重  $(20 \pm 2)\text{g}$ ,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号 SCXK(京)2009-0007。

**1.2 药物与试剂** 益髓生血颗粒(山茱萸、制何首乌、熟地黄、补骨脂、炙黄芪、党参、阿胶、当归、鸡血藤、鳖甲、砂仁),药物比例、制备工艺及质量标准均参照专利 No. CN200610078866. X,由中国中医科学院广安门医院大兴制药厂生产,为褐色颗粒状 12 g/袋,含生药量 23.6 g(批号 20110506);重组人粒细胞刺激因子(G-CSF)注射液,商品名特尔津,由厦门特宝生物工程股份有限公司生产,75  $\mu\text{g}/\text{瓶}$ (批号 201111B45);PI(碘化丙啶)染液、RNA 酶工作液( $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PBS( $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4)均购自南京凯基生物科技发展有限公司;无水乙醇购自北京试剂公司。

**1.3 仪器** 钴-60( $^{60}\text{Co}$ )远距离治疗机(中国核动力院设备制造厂生产),Coulter EPICS® XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司生产)。

## 2 方法

**2.1 造模及分组给药** 将 78 只小鼠随机分为 6 组,分别为正常组(A组)、模型组(B组)、G-CSF 组(C组)、益髓生血颗粒高剂量组(D组)、益髓生血颗粒中剂量组(E组)、益髓生血颗粒低剂量组(F组),每组 13 只。采用  $^{60}\text{Co}-\gamma$  射线全身一次性照射造成小鼠骨髓急性损伤模型,照射剂量为 3.5 Gy,剂量率为  $1.31\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ 。造模前,先预防给药 2 d,益髓生血颗粒高、中、低剂量组分别按  $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (药液质量浓度  $1.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,为临床成人日剂量的 20 倍)、 $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (药液质量浓度  $0.6\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,为临床成人日剂量的 10 倍)、 $3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (药液质量浓度  $0.3\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,为临床成人日剂量的 5 倍)灌胃,其余各组给予等量蒸馏水。造模第 2 天,G-CSF 组按  $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (注射容积  $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )皮下注射 G-CSF 注射液,其余各组给药方法同预防给药,连续 14 d。

**2.2 骨髓有核细胞周期检测** 造模第 16 天,经颈椎脱臼处死小鼠,置 75% 乙醇中浸泡片刻。取小鼠两侧股骨,剪开股骨两头,露出骨髓腔,用无菌注射器 4 号针头吸取 2 mL PBS 液( $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4)反复冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞。

吸取细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$  的骨髓有核细胞 1 mL,800  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 去上清。加入 1 mL PBS 重悬细胞,混匀成单细胞悬液。将 1 mL 单细胞悬液缓慢加到  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  预冷的无水乙醇 3 mL 中(使乙醇体积分数为 75%),将细胞吹成单细胞,4  $^\circ\text{C}$  固定。24 h 后,1 200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,去除固定剂。加入 1 mL PBS,1 200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 洗涤细胞 1 次。用 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,加入  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  RNA 酶工作液 12.5  $\mu\text{L}$ ,使其终质量浓度为  $0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,37  $^\circ\text{C}$  水浴 30 min。加入 5  $\mu\text{L}$  PI 染液,室温避光染色 30 min 后上流式细胞仪进行检测。

检测时激发光波长为 488 nm,FL3 通道收集荧

光,每份标本均检测 5 000 个细胞,获得 DNA 含量直方图。采用 DNA 分析软件 MODFit 进行拟合分析,结果以细胞周期各时相细胞百分率表示,并计算细胞增殖指数(PI)<sup>[7]</sup>。

$$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$$

**2.3 数据处理** 所有试验数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。计量资料符合正态分布者,采用  $\bar{x} \pm s$  进行统计描述,非正态分布者采用中位数  $\pm$  四分位间距( $M \pm Q$ )进行统计描述。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

**3 结果**

经流式细胞术检测分析的各组小鼠骨髓有核细胞周期分布情况见表 1 及图 1。

从表 1 显示,与正常组相比,模型组及益髓生血颗粒各剂量组小鼠骨髓有核细胞周期的分布情况大致相似,均表现为处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例明显下

降(均  $P < 0.001$ ),处于  $G_2/M$  期及 S 期的细胞比例明显增多(均  $P < 0.001$ ),细胞增殖指数明显升高(均  $P < 0.001$ );G-CSF 组处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例下降( $P < 0.05$ ),处于  $G_2/M$  期的细胞比例明显升高( $P < 0.001$ ),细胞增殖指数升高( $P < 0.05$ )。

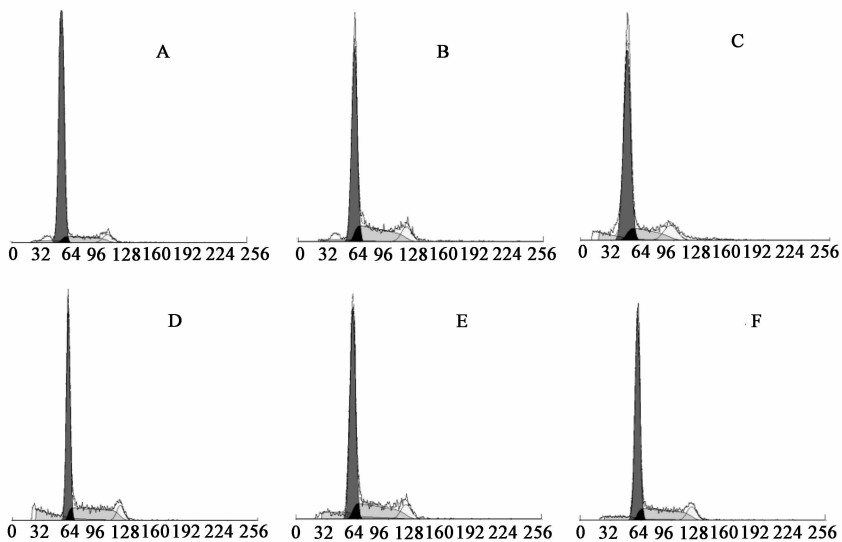
与模型组相比,益髓生血颗粒高剂量组处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例降低( $P < 0.05$ ),细胞增殖指数升高( $P < 0.05$ ),益髓生血颗粒各剂量组处于 S 期的细胞比例均升高(均  $P < 0.05$ );G-CSF 组处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例升高( $P < 0.01$ ),处于 S 期的细胞比例明显降低,接近正常组水平( $P < 0.001$ ),细胞增殖指数降低( $P < 0.01$ )。

与 G-CSF 组相比,益髓生血颗粒各剂量组处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例均明显降低(均  $P < 0.001$ ),处于 S 期的细胞比例均明显升高(均  $P < 0.001$ ),细胞增殖指数均明显升高(均  $P < 0.001$ )。

表 1 益髓生血颗粒对辐射提供小鼠骨髓有核细胞周期分布情况( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	$G_0/G_1$ 期细胞	S 期细胞	$G_2/M$ 期细胞	PI
正常	-	12	82.9 $\pm$ 3.3 <sup>3,8)</sup>	14.6 $\pm$ 3.1 <sup>3)</sup>	2.5 $\pm$ 1.3 <sup>3,6)</sup>	17.1 $\pm$ 3.4 <sup>3,8)</sup>
模型	-	12	67.6 $\pm$ 7.1 <sup>1,7)</sup>	25.3 $\pm$ 5.7 <sup>1,6)</sup>	7.1 $\pm$ 1.8 <sup>1)</sup>	32.4 $\pm$ 7.1 <sup>1,7)</sup>
G-CSF	$3 \times 10^{-2}$	10	77.1 $\pm$ 8.7 <sup>2,4)</sup>	15.4 $\pm$ 5.6 <sup>3)</sup>	7.5 $\pm$ 3.9 <sup>1)</sup>	22.9 $\pm$ 8.7 <sup>2,4)</sup>
益髓生血颗粒	12	12	62.2 $\pm$ 3.6 <sup>1,5,6)</sup>	29.1 $\pm$ 2.7 <sup>1,5,6)</sup>	8.8 $\pm$ 1.3 <sup>1)</sup>	37.8 $\pm$ 3.6 <sup>1,5,6)</sup>
	6	9	63.5 $\pm$ 7.0 <sup>1,6)</sup>	29.2 $\pm$ 4.8 <sup>1,5,6)</sup>	7.3 $\pm$ 3.0 <sup>1)</sup>	36.5 $\pm$ 7.0 <sup>1,6)</sup>
	3	10	63.1 $\pm$ 5.7 <sup>1,6)</sup>	29.5 $\pm$ 3.9 <sup>1,5,6)</sup>	7.4 $\pm$ 2.5 <sup>1)</sup>	36.9 $\pm$ 5.7 <sup>1,6)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.001$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.001$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ;与 G-CSF 组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.001$ ,<sup>7)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>8)</sup>  $P < 0.05$ 。



A. 正常组( $n = 12$ ); B. 模型组( $n = 12$ ); C. G-CSF 组( $30 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ,  $n = 10$ ); D. 益髓生血颗粒( $12 g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ,  $n = 12$ )组;  
E. 益髓生血颗粒( $6 g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ,  $n = 9$ )组; F. 益髓生血颗粒( $3 g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ,  $n = 10$ )组

图 1 益髓生血颗粒对辐射损伤小鼠骨髓有核细胞周期分布

#### 4 讨论

细胞周期是细胞从前一次有丝分裂结束开始到这一次有丝分裂结束为止所经历的全过程,其中  $G_0$  期为静止期,  $G_1$  期为脱氧核糖核酸(DNA)合成前期, S 期为 DNA 合成期,  $G_2$  期为 DNA 合成后期, M 期为分裂期。细胞周期的调控极其复杂,涉及基因和蛋白质两个层次多种因子的作用<sup>[8]</sup>。在细胞周期调控中,有 2 个重要的监测点,分别位于  $G_1$  与 S 期和  $G_2$  与 M 期之间<sup>[9]</sup>。如果细胞内外因素能够调控这些控制点,就能影响细胞周期。

骨髓造血系统对电离辐射非常敏感,有研究表明 0.5 Gy 以上剂量 X 射线全身照射可诱导小鼠骨髓细胞  $G_1$  和  $G_2$  期阻滞,使细胞增殖明显受抑制<sup>[10]</sup>。可能是辐射造成造血细胞 DNA 损伤后,激活细胞周期监测点,将细胞周期阻滞于  $G_1$  期以提供充足的时间来修复受损的 DNA,对不能修复者则启动凋亡程序来清除受损细胞<sup>[11]</sup>。本实验表明,辐射造成小鼠骨髓急性损伤后,经 14 d 的恢复或药物干预,各组小鼠骨髓细胞 DNA 损伤基本得到修复,开始呈现出不同程度的增殖活跃状态,具体表现为与正常组相比,处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例明显下降,处于 S 期及  $G_2/M$  期的细胞比例明显增多,细胞增殖指数均升高。

中医认为肾之精髓与血的生成密切相关。当骨髓受到辐射损伤后,主要表现为造血机能抑制,外周血细胞数明显减少,与中医肾虚髓亏证类似。此时如采用具有补肾填精、养血生血作用的药物进行干预,就能明显改善肾虚髓亏状态。益髓生血颗粒是在“肾生髓,髓生血”理论指导下,在长期临床实践基础上研制的一种中药复方制剂,由山茱萸、何首乌、熟地、补骨脂、鳖甲等 11 味中药组成,具有滋肾养阴、益精生血的作用。本实验表明,与模型组相比,益髓生血颗粒各剂量组,尤其是高剂量组能明显减低处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例,同时明显升高处于 S 期的细胞比例,使细胞增殖指数上升。可见益髓生血颗粒能通过促进骨髓细胞由  $G_0/G_1$  期进入 S 期而明显促进细胞增殖。推测其作用机理可能与该药能加速骨髓细胞修复受损的 DNA,促进细胞通过  $G_1/S$  期控制点有关。

目前已知,能够调控  $G_1/S$  期的周期蛋白主要

为细胞周期蛋白 D(Cyclin D),当其与细胞周期素依赖激酶(CDKS)结合而构成全酶,可使 Rb 蛋白磷酸化,从而启动细胞周期,使细胞从  $G_1$  期进入 S 期。有文献报道,受电离辐射等 DNA 损伤因子作用后, p53 基因可被激活, p53 蛋白可作为转录因子调节其下游基因的转录,进而抑制细胞周期蛋白 D-细胞周期素依赖激酶 4(Cyclin D-CDK4)复合物的活性,从而抑制 Rb 蛋白磷酸化,使细胞发生  $G_1$  期阻滞<sup>[12]</sup>。至于益髓生血颗粒促进骨髓细胞增殖的机制是否与调控上述因素有关,还需进一步实验来证实。

#### [参考文献]

- [1] 陈晓燕,陈宇. 滋髓生血治疗血液病[J]. 河南中医药学刊,1998(13):6.
- [2] 吴志奎. 肾生髓、髓生血理论与治疗地中海贫血的临床实践[J]. 中医杂志,2008,49(2):170.
- [3] 张新华,吴志奎,黄有文,等. 益髓生血灵对小鼠骨髓造血干-祖细胞的影响[J]. 浙江中医杂志,2003,37(10):448.
- [4] 吴志奎,崔京华,姜葆华,等. 肾生髓理论的现代研究[J]. 中医杂志,1999,40(10):626.
- [5] 黄有文,张新华,王荣新,等. 补肾生血治疗  $\beta$  珠蛋白生成障碍性贫血进一步临床研究和免疫功能测定[J]. 临床血液学杂志,2000(2):54.
- [6] 易杰,吴志奎,黄启福. 益髓生血灵及其不同组分对溶血性贫血小鼠的影响[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(3):227.
- [7] 徐从高,张锦. 流式细胞术在临床血液病学中的应用[J]. 国外医学:肿瘤学分册,1997,24(6):368.
- [8] 王培林,杨康鹏. 医学细胞生物学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2010:202.
- [9] Israels E D, Israels L G. The cell cycle[J]. Stem Cells, 2001,19(1):88.
- [10] 鞠桂芝,马淑梅,傅士波,等. X 射线全身照射对小鼠骨髓细胞周期的影响[J]. 中国预防医学杂志,2002,3(2):87.
- [11] 鞠桂芝,马淑梅,傅士波. 辐射对小鼠骨髓细胞周期的影响及其分子机理[J]. 中华放射医学与防护杂志,2002,22(5):342.
- [12] Sherr C J. Cancer cell cycles [J]. Science, 1996, 274:1672.

[责任编辑 聂淑琴]