

复方雷公藤颗粒对再障小鼠骨髓 T 细胞亚群的影响

邢海燕*, 胡春萍, 蔡雪婷, 胡灿红, 霍介格, 曹鹏, 王志刚
(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] 目的: 观察复方雷公藤颗粒对再生障碍性贫血(简称再障)小鼠的疗效及对骨髓 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞表达的影响。方法: 建立再障小鼠模型, 分为 5 组, 正常组及模型组小鼠(给予同体积的生理盐水 ig), 复方雷公藤低、高剂量组(分别为生药 10.63, 13.29 g·kg⁻¹, ig)、十一酸睾酮(22 mg·kg⁻¹, ig), 连续给药 35 d, 取骨髓单个核细胞培养 24 h 后, 流式细胞术检测 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞的表达水平。结果: 模型组 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 各指标均较正常组下降, 其中 CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞明显低于正常组($P < 0.05$); 十一酸睾酮组与模型组相比, CD4⁺, CD8⁺ 均有所下降, 但 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞较之上升, 但统计学均无明显差异, 复方雷公藤颗粒低、高剂量组与模型组相比, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 均升高, 其中 CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 升高有统计学意义($P < 0.05$), 与十一酸睾酮组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 复方雷公藤颗粒能调节骨髓 T 细胞的异常状态, 恢复 T 细胞及其亚群之间的平衡, 促进骨髓造血功能的恢复。

[关键词] 再生障碍性贫血; 复方雷公藤颗粒; 十一酸睾酮; T 细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0162-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1038.004.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 10:38

Effect of Compound Tripterygium Granule on Bone Marrow T Cell Subsets in Mice Aplastic Anemia Model

XING Hai-yan*, HU Chun-ping, CAI Xue-ting, HU Can-hong, HUO Jie-ge, CAO Peng, WANG Zhi-gang
(Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Tripterygium granule on expression of bone marrow CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes in mice aplastic anemia model. **Method:** A mouse model of aplastic anemia was established and divided into five groups, normal group and model group (fed with normal saline), compound Tripterygium granule group (10.63, 13.29 g·kg⁻¹, ig), testosterone undecanoate group (22 mg·kg⁻¹, ig). After continuous administration of 35 d, bone marrow mononuclear cells were separated and cultured for 24 h. Expression levels of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T cells were analyzed by flow cytometry. **Result:** Compared with the normal group, amount of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T cells was decreased in model group, which of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ T cells were significantly lower than the normal group ($P < 0.05$), CD4⁺ and CD8⁺ were decreased, while CD4⁺/CD8⁺ was increased in testosterone undecanoate group, but there was no significant difference compared with model group. Compared with the model group, amount of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ in high and low dose group of compound Tripterygium granule was increased, which of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ T cells was significantly different from model group and testosterone undecanoate group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compound Tripterygium granule can regulate the abnormal state of bone marrow T cells, restore balance between T cells and T cell subsets, and promote the recovery of bone marrow function.

[Key words] aplastic anemia; compound Tripterygium granule; testosterone undecanoate; T cell subsets

[收稿日期] 20120323(001)

[基金项目] 江苏省中医药科技项目立项计划(LB09060)

[通讯作者] *邢海燕, 硕士研究生, 副主任医师, 从事中西医结合治疗肿瘤、血液病, Tel: 025-85637121, 13701455246, E-mail: xing.haiyan@live.cn

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA 再障),系多种病因引起的造血障碍,导致红骨髓总容量减少,造血衰竭,全血细胞减少为主要表现的一组综合征。其发病机制除与造血干细胞本身缺陷、造血微环境损伤有关外,免疫异常是再障重要的发病原因。第46届美国血液学年会已经明确提出 AA 是自身免疫性疾病。

复方雷公藤颗粒是我科临床治疗慢性再障的经验方,临床疗效确切,无明显不良反应。笔者在再生障碍性贫血小鼠模型上应用复方雷公藤颗粒进行干预,观察复方雷公藤颗粒对再生障碍性贫血小鼠的疗效及对骨髓 CD4⁺, CD8⁺, D4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞表达的影响,进一步探讨复方雷公藤颗粒治疗 AA 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠 50 只,全雄,体重(18 ± 2) g,由上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物 复方雷公藤颗粒含生药 2.053 g · mL⁻¹,由江苏省中医药研究院制剂室提供。

1.3 试剂 环磷酰胺溶液(批号 11061421,江苏恒瑞医药股份有限公司),十一酸睾酮胶丸(批号 2009.05.24,荷兰欧加农公司进口,由南京欧加农制药有限公司在荷兰欧加农公司的监督和独家授权下包装)。苯(批号 0101211067,分析纯,南京化学试剂有限公司)。抗体:抗体 FITC anti-mouse CD4, FITC anti-mouse CD8, fluorescein isothiocyanat (FITC) Rat IgG1, phycoerythrin (PE) hamster IgG1 (购自 eBioscience 公司)。

1.4 仪器 流式细胞仪 FACSCalibur(美国 Becton Dickinson 公司),L-600 低速自动离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司产品)。

2 方法

2.1 再障模型的建立 将 50 只小鼠随机分正常对照组 10 只和造模组 40 只。造模组 40 只:用苯 + 玉米油(1:1 配制),按 2 mL · kg⁻¹,背部皮下注射,1 周 3 次(周 1,3,5),总共注射 15 次。同时 ip 环磷酰胺溶液(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),连续 7 d。

2.2 分组与处理 将造模的小鼠分 4 组,分别为模型对照组,复方雷公藤颗粒高、低剂量组,阳性药组,每组 10 只。阳性药(十一酸睾酮胶丸)组以 22 mg · kg⁻¹, ig,复方雷公藤颗粒低、高剂量组按生药量计为 10.63, 13.29 g · kg⁻¹, ig,给药量 20 mL · kg⁻¹,正

常组及模型组小鼠均 ig 给予同体积的生理盐水,连续给药 35 d 后定为取材时间。

2.3 流式细胞技术测定 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞 小鼠喂养 35 d 后,颈部脱臼处死,无菌条件下取同侧股骨,用完全培养基(DMEM + 10% 小牛血清)冲取骨髓,用注射器反复吹打,制成骨髓单个核细胞悬液, PBS 洗涤后,调细胞密度至 1 × 10⁶/mL。取调制好的单细胞悬液 50 μL,分别加入免疫荧光抗体 FITC anti-mouse CD4 1 μL, FITC anti-mouse CD8 1 μL。4 ℃,避光孵育 30 min, PBS (7.2 ~ 7.4)缓冲液洗涤 2 次,离心 5 min,弃上清液,去除游离的单抗。补足 0.5 mL PBS,上流式细胞仪检测、分析,设立阴性对照。

2.4 统计方法 采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组外周血血象比较 白细胞、血红蛋白模型组均低于正常组,有统计学差异($P < 0.05$);复方雷公藤颗粒组,阳性药组的白细胞与模型组相比明显升高,有统计学意义($P < 0.05$);血红蛋白与模型组相比复方雷公藤颗粒低、高剂量组升高均有统计学差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 各组小鼠骨髓 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 检测 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 表达模型组均低于正常组, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 有统计学差异($P < 0.05$);阳性药组与模型组相比均无统计学意义;复方雷公藤颗粒低、高剂量组与模型组、阳性药组相比, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

许多实验证明再生障碍性贫血(AA)是一种以骨髓为靶器官的自身免疫性疾病, T 细胞异常活化和增殖是其发病的生物学基础^[1-2]。再障患者 T4 细胞数下降, T8 细胞活性增加, T4/T8 比例倒置^[3]。研究发现,再障患者的造血微环境中确实存在异常活化的具有抑制和杀伤造血干细胞的 T 细胞,而且一系列参与 T 细胞功能调节的免疫分子水平也明显异常^[4],外周血及骨髓 T 细胞克隆性增生或淋巴细胞亚群功能异常,多种与造血有关的正负调控因子分泌异常以及由激活诱导的细胞凋亡在 AA 的发生、发展及临床转归中起重要作用^[5-8]。

表 1 复方雷公藤对再障小鼠外周血细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白细胞/×10 ⁹ /L	血红蛋白/g·L ⁻¹	血小板/×10 ⁹ /L
正常	-	8.31 ± 1.53	142.12 ± 3.52	777.8 ± 25.6
模型	-	3.42 ± 1.28 ¹⁾	125.34 ± 5.28 ¹⁾	1054 ± 83.1
十一酸睾酮胶丸	22 × 10 ⁻³	4.85 ± 1.02 ²⁾	124.39 ± 9.12	1233 ± 76.9
复方雷公藤	10.63	4.95 ± 0.95 ²⁾	131.56 ± 6.36 ²⁾	1159 ± 102.5
	13.29	4.85 ± 1.15 ²⁾	129.42 ± 5.24 ²⁾	1049 ± 86.4

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05,表 2 同。

表 2 复方雷公藤对再障小鼠骨髓 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	1.61 ± 0.28	1.02 ± 0.15	1.60 ± 0.25
模型	-	1.04 ± 0.35 ¹⁾	0.89 ± 0.22	1.17 ± 0.24 ¹⁾
十一酸睾酮胶丸	22 × 10 ⁻³	0.91 ± 0.23	0.82 ± 0.25	1.21 ± 0.29
复方雷公藤	10.63	1.34 ± 0.39 ^{2,3)}	1.01 ± 0.18	1.34 ± 0.30 ^{2,3)}
	13.29	1.33 ± 0.30 ^{2,3)}	0.94 ± 0.23	1.48 ± 0.45 ^{2,3)}

注:与十一酸睾酮胶丸组比较³⁾P < 0.05。

再生障碍性贫血属祖国医学的“血虚”、“血枯”、“血证”、“虚劳”、“虚损”等范畴,历代医家对本病论述颇多,如《黄帝内经》记载:“精气内夺则积虚成损,积损成劳”。又如《类证治裁》记载:“凡虚损起于脾胃,劳瘵多起于肾经”。分析文献并结合临床,我们认为此病多由六淫、七情、饮食、劳倦等因素伤及气血、脏腑,尤其与脾肾两脏损伤关系最为密切,同时也与血瘀、热毒等因素密切关系。故我们以雷公藤、黄芪、川芎、三七、仙灵脾、白芍等中药组成的复方雷公藤颗粒,以清热解毒、补肾健脾、活血化瘀,临床应用于慢性再障患者,对恢复患者的造血功能,改善临床症状有较好的疗效。

本实验研究目的是观察复方雷公藤颗粒对再生障碍性贫血(简称再障)小鼠的疗效及对骨髓 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞表达的影响,以探讨其免疫作用机制。结果显示再障模型组 CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 明显下降;复方雷公藤颗粒低、高剂量组治疗后 CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 均有明显升高。说明复方雷公藤颗粒能调节提高再障小鼠骨髓 CD4⁺ 的表达,促进 CD4⁺/CD8⁺ 比值的恢复,从而调节骨髓 T 细胞的异常表达,促进骨髓造血功能的恢复。

另外,笔者认为,再障分为急性再障、慢性再障,预后有明显差异,其发病机制也有所不同。再障小鼠的造模方法有很多种,总体可分为免疫介导、混合方法及化学方法 3 种^[9]。免疫介导和混合方法形成的 AA 模型,造模速度快,外周血象及骨髓组织中造

血细胞减少明显,肝、脾的损伤、组织坏死明显,与临床上急性再障比较接近;而单纯的化学方法造模,造模周期较长,骨髓抑制情况较轻,肝、脾的变化以体积和质量的减少为主,组织坏死不明显^[10],造模小鼠存活时间长,且模型维持时间长,与慢性再障情况比较符合。本实验采用的单纯化学药物诱导的再障小鼠模型,外周血提示血小板较正常组升高,流式细胞检测的 CD8⁺ T 细胞较正常组下降,同文献报道的结果不一致,考虑可能与造模方法不同、再障小鼠的肝、脾损伤不明显有关。

[参考文献]

- [1] Wlodarski M W, Gondek L P, Nearman Z P, et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome [J]. Blood, 2006, 108(8):2632.
- [2] Young N S, Calado R T, Scheimberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 108(8):2509.
- [3] 郑雨薇,魏志英,胡海莹.再生障碍性贫血的发病机制及其治疗研究进展[J].四川解剖学杂志,2011,19(1):48.
- [4] 张慧敏,潘峻,刘清池.再生障碍性贫血免疫机制异常研究进展[J].临床内科杂志,2010,27(7):502.
- [5] 孙伟正,罗梅宏,蒋宁,等.补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者血清 Fas, Bcl-2 表达作用[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(4):54.

藿香正气液对湿阻证大鼠结肠黏膜水通道蛋白4表达的影响

薛晓倩¹, 黄学宽^{1*}, 高宁², 刘鄂湖², 任凌燕³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学生药学教研室, 重庆 400038;
3. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 研究藿香正气液对湿阻证大鼠结肠黏膜水通道蛋白4(AQP4)表达的影响。方法: 将24只SD大鼠随机分为正常组、模型组、藿香正气液组, 每组8只。正常组常规喂养, 其余各组采用改进的环境加疲劳法制造湿阻证模型, 连续造模6d。造模成功后, 正常组和模型组予生理盐水 ig(20 mL·kg⁻¹), 治疗组予藿香正气液 ig(20 mL·kg⁻¹), 1次/d, 连续8d。分别采用免疫组化和 Real-Time PCR 的方法观察结肠黏膜 AQP4 的表达情况。结果: 与正常组相比, 模型组大鼠脾虚症状明显, 胃黏膜有明显充血水肿, 并有出血点及血块, 大鼠结肠黏膜 AQP4 表达明显减少($P < 0.05$); 而经藿香正气液治疗后, 与模型组比较, AQP4 表达量有所增加($P < 0.05$)。结论: 藿香正气液可明显改善湿阻证大鼠脾虚腹泻等症状, 其机制可能与提高结肠黏膜 AQP4 的表达量有关。

[关键词] 藿香正气液; 湿阻证; 结肠黏膜; 水通道蛋白4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0165-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1039.005.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 10:39

Effects of Huoxiang Zhengqi Liquid on the Expression of AQP4 in Colon Mucosa in Rats with Dampness Retention Syndrome

XUE Xiao-qian¹, HUANG Xue-kuan^{1*}, GAO Ning², LIU E-hu², REN Ling-yan³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China;
2. Department of Pharmacognosy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

[收稿日期] 20120309(015)

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-2-114)

[第一作者] 薛晓倩, 在读硕士, 主要从事中西医结合基础研究, Tel: 15523836932, E-mail: hrx200808@163.com

[通讯作者] * 黄学宽, 副教授, 硕士生导师, 主要从事心脑血管脾肾疾病及肿瘤的基础研究与临床, Tel: 13452382058, E-mail: xkhuang2002@163.com

[6] Vial M, Merli A, Bacigalupo A. Analysis at the clonal level of T-cell phenotype and functions in severe aplastic anemia patients[J]. Blood, 1991, 78:1268.

[7] Melenhorst J J, van Krieken M, Dreef E, et al. T cells selectively infiltrate bone marrow areas with residual haemopoiesis of patients with acquired aplastic anaemia[J]. Br J Haematol, 1997, 99:517.

[8] 罗梅宏, 周永明, 胡明辉, 等. 生血合剂干预下免疫介导再障小鼠骨髓核因子 κ B 表达变化[J]. 中国实

验方剂学杂志, 2008, 14(10):50.

[9] 张恒, 王月英, 吴红英, 等. 再生障碍性贫血小鼠模型的免疫学评价[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9):1421.

[10] Rodolfo Velasco Lezama. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice[J]. Toxicology, 2001, 162(3):179.

[责任编辑 聂淑琴]