

地榆升白片对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的拮抗作用

贾亮亮^{1,2}, 奚炜^{1,2}, 金桂兰^{1,2*}

(1. 三峡大学人民医院, 湖北 宜昌 443000; 2. 宜昌市第一人民医院药剂科, 湖北 宜昌 443000)

[摘要] 目的:观察地榆升白片对环磷酰胺所致小鼠骨髓抑制的保护作用。方法: Balb/C 小鼠 24 只随机分为空白对照组、模型组、地榆升白片组。腹腔注射环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹建立骨髓抑制模型,地榆升白片组按 100 mg·kg⁻¹灌胃,给药 10 d。观察地榆升白片对模型小鼠外周血象、骨髓有核细胞数、骨髓中 DNA 含量的影响,流式细胞术检测骨髓中各时相细胞周期百分比。结果:模型组小鼠外周血白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数以及骨髓中 DNA 含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);骨髓细胞周期中 G₀/G₁ 期细胞百分比显著增高,G₂/M 期细胞百分比显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。地榆升白片可以显著增加模型小鼠外周血白细胞数、骨髓有核细胞数及骨髓中 DNA 含量,恢复骨髓中各期细胞百分比($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:地榆升白片对环磷酰胺致骨髓抑制有显著的改善和恢复作用。

[关键词] 地榆升白片; 环磷酰胺; 骨髓抑制; 细胞周期; 骨髓有核细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0251-04

Effect of Diyu Shengbai Tablets on Bone Marrow Depression Induced by Cyclophosphamide in Mice

JIA Liang-liang^{1,2}, XI Wei^{1,2}, JIN Gui-lan^{1,2*}

(1. The People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China;
2. Department of Pharmacy, First People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the poctect function of Diyu Shengbai tablettis on bone marrow depression induced by cyclophosphamide in mice. **Method:** Twenty-four Balb/C mice, half male and femal, were categorized into three groups. Mice in model group and Diyu Shengbai group were administered cyclophosphamide (Cy) (100 mg·kg⁻¹ once a day for 3 days by intraperitoneal injection) to induce marrow suppression. Diyu Shengbai group was received Diyu Shengbai table treatment (100 mg·kg⁻¹body weight orally once a day for 10 days). A vehicle treated control group was also arrangeded. The changes of peripheral hemogram, bone marrow nucleated cells (BMCs), DNA content and bone marrow cell cycle were detected. **Result:** Cy-treated mice showed a significant decrease in the number of white blood cells, thrombocyte, bone marrow nucleated cell proliferation and the content of DNA in bone (compared with control group, there were significant differences, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of G₀/G₁ phase was increased and the percentage G₂/M phase decreased (compared with control group, there were significant differences, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Diyu Shengbai tablets significantly increased the number of white blood cells, thrombocyte, bone marrow nucleated cell proliferation and markedly increased the percentage of G₂/M phase (compared with model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$)). **Conclusion:** Diyu Shengbai Tablets could improve the hemopoietic function for marrow suppression induced by Cy in mice.

[Key words] Diyu Shengbai tablets ; cyclophosphamide; bone marrow depression; cell cycle; bone marrow nucleated cells

[收稿日期] 20120315(012)
[第一作者] 贾亮亮, 硕士, 药师, 从事医院药学及中药药理学研究, Tel:0717-6238215, E-mail: jialiang822@163.com
[通讯作者] * 金桂兰, 主任药师, 主要从事医院药学及药物制剂研究, Tel:0717-6228045, E-mail: jin_gl@163.com

环磷酰胺是一种临床常见的抗肿瘤药物,广泛应用于各种血液系统和实体肿瘤的治疗,具有诱导肿瘤细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用^[1]。环磷酰胺在抑制肿瘤细胞增殖的同时,也会对人体骨髓造血干细胞的增殖与分化产生影响,从而产生骨髓抑制、免疫力降低等毒副作用,严重影响了化疗患者的生活质量。地榆生白片的成分为中药地榆,具有保护造血系统;升高外周血白细胞、中性粒细胞、血小板;改善骨髓微循环;调节和改善机体免疫功能等功能^[2],临床上常作为化疗期间的辅助用药。本实验通过探讨地榆升白片对抗环磷酰胺所致骨髓抑制的作用机制,为地榆升白片的临床应用与开发提供进一步的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Balb/C 种小鼠,8~9 周龄,体重 22~25 g,湖北省实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(鄂)2008-0005。分笼饲养,环境温度(20±2)℃,湿度 55%~65%,12 h 光照,啮齿类动物饲料喂养,自由饮水。

1.2 试剂与仪器 地榆升白片,成都地奥集团天府药业股份有限公司,批号 110706;注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 08121021;RNA 酶,美国 Sigma 公司,批号 A108354;碘化丙啶(PI),美国 Sigma 公司,批号 P4172。其余药品均为分析纯。COULTZER EPICS XL2MCL 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司);CX3 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司);WFZ UV-2100 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司);JA2003 型电子分析天平(上海天平仪器厂);LD25-2 型低速自动平衡离心机(北京京立离心机有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 24 只 Balb/C 种小鼠,随机分为 3 组:对照组、模型组、地榆升白片组。对照组腹腔注射生理盐水,其余小鼠腹腔注射环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连续注射 3 d。于造模结束次日,对照组和模型组每天灌服生理盐水 0.2 mL,地榆升白片组给予地榆生白片 100 mg·kg⁻¹,各组小鼠连续灌胃 10 d。

2.2 外周血白细胞、红细胞、血小板的测定 末次给药 24 h 后,自小鼠眼眶静脉丛取血,稀释后用 CX3 型全自动生化分析仪进行血常规检测。指标为白细胞总数(WBC),红细胞(RBC),血小板(PLT)计数。

2.3 骨髓有核细胞悬液的制备及有核细胞计数

末次给药后 24 h,脱臼颈椎处死小鼠,取小鼠一侧完整股骨,除净软组织,用 PBS 缓冲液将全部骨髓冲洗至离心管,过 200 目尼龙网,用 PBS 缓冲液定容至 5 mL。按白细胞计数法进行骨髓有核细胞计数。并计算绝对数量。

2.4 骨髓有核细胞细胞周期测定 调整上述骨髓细胞悬液浓度为 3×10⁷/mL,70%乙醇 4℃固定 2 h,低速离心去除固定液,PBS 洗两次,加 40 μg·mL⁻¹的 RNA 酶 400 μL,于 37℃水浴 30 min,加入 100 μL PI 染液混匀,4℃避光染色 30 min,流式细胞仪检测,计算出不同时相骨髓细胞周期和凋亡细胞的百分比,并按以下公式计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)。

PI = (S + G₂/M)/(G₀/G₁ + S + G₂/M) × 100%

2.5 骨髓 DNA 含量测定 取小鼠另一侧完整股骨,除净软组织,用 0.005 mol·L⁻¹ CaCl₂ 10 mL 将全部骨髓冲入离心管中,置 4℃冰箱 30 min,2 500 r·min⁻¹离心 15 min,弃上清,将沉淀物加 0.2 mol·L⁻¹ HClO₄ 5 mL 充分混匀,90℃加热 15 min,冷却后离心,取上清于 260 nm 波长处测定紫外吸光度(A)值。

每根股骨所含 DNA(μg) = 40 × 50 × A_{260 nm}^[3]。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数之间比较进行单因素方差分析检验,P<0.05 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 对骨髓抑制小鼠外周血象的影响 与对照组比较,模型组小鼠外周血中白细胞(WBC),红细胞(RBC),血小板(PLT)数显著降低(P<0.05 或 P<0.01),地榆升白片可以显著恢复骨髓抑制小鼠外周血中的 WBC、PLT 的数量,与模型组比较有显著性差异(P<0.05 或 P<0.01)。结果见表 1。

表 1 地榆升白片对骨髓抑制小鼠外周血象的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	WBC /×10 ⁹ /L	RBC /×10 ¹² /L	PLT /×10 ⁹ /L
对照	-	5.74 ± 1.24	8.80 ± 2.16	926 ± 192
模型	-	1.76 ± 0.47 ²⁾	7.93 ± 1.32	516 ± 152 ²⁾
地榆升白片	100	3.86 ± 1.02 ⁴⁾	8.01 ± 2.39	675 ± 136 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ P<0.05,²⁾ P<0.01;与模型组比较³⁾ P<0.05,⁴⁾ P<0.01(表 2~3 同)。

3.2 对骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞数量及骨髓 DNA 含量的影响 模型组小鼠骨髓有核细胞数量、DNA 含量显著低于对照组(P<0.01)。地榆升白片

可以明显增加骨髓抑制小鼠的骨髓有核细胞数量和骨髓中 DNA 含量,与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期的影响 与对照组比较,模型组 G_0/G_1 期细胞百分比显著升高, G_2/M 期细胞百分比显著降低,细胞增殖指数明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。地榆升白片可以显著恢复各期细胞周期百分比,增加骨髓抑制小鼠骨髓

细胞的增殖指数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 地榆升白片对骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞数量及骨髓 DNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	骨髓细胞计数 / × 10 ⁷	DNA /μg
对照	-	9.47 ± 1.32	354 ± 31
模型	-	5.31 ± 1.57 ²⁾	148 ± 19 ²⁾
地榆升白片	100	8.33 ± 1.26 ⁴⁾	261 ± 23 ⁴⁾

表 3 地榆升白片对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
对照	-	63.87 ± 1.23	17.01 ± 1.11	15.23 ± 1.60	34.46 ± 1.19
模型	-	72.80 ± 1.81 ¹⁾	19.37 ± 0.78	5.83 ± 0.94 ²⁾	25.37 ± 2.86 ¹⁾
地榆升白片	100	65.70 ± 2.42 ³⁾	20.11 ± 1.43	13.33 ± 3.80 ⁴⁾	32.78 ± 5.29 ³⁾

4 讨论

环磷酰胺是临床上常用的抗肿瘤药物,主要用于血液系统及各种实体肿瘤的治疗^[4]。但是由于环磷酰胺是一种细胞周期非特异性细胞毒药物^[5],在抑制肿瘤细胞增殖的过程中也会影响正常细胞的增殖与分化,从而引起骨髓抑制等诸多不良反应。

地榆生白片的成分为中药地榆,主要含有皂苷、鞣质和黄酮等化学成分,具有止血、抗菌消炎、促进伤口愈合、镇吐以及补益作用。研究表明地榆可参加骨髓造血,改善并促进骨髓造血干细胞增殖及分化,保护造血细胞 DNA,改善骨髓微循环的造血环境,促进骨髓造血功能并将成熟血细胞释放到外周血中^[6]。

骨髓是人体重要的造血器官,骨髓产生的造血干细胞经过分化生成红细胞、白细胞、血小板、淋巴细胞等各种血细胞而发挥生理功能。骨髓对化疗药物及放射物质的高度敏感,当骨髓暴露在化疗药物及射线下时,骨髓会在细胞、分子水平上发生形态、数量以及生化等多方面的病理改变,从而造成各种骨髓有核细胞及外周血细胞数量减少、DNA 断裂、染色体畸变、造血细胞功能障碍甚至细胞坏死,具体表现为骨髓有核细胞数量、DNA 含量、白细胞数量下降及微核细胞率增加等改变^[7]。本实验中小鼠腹腔注射环磷酰胺后骨髓有核细胞数量和 DNA 含量明显降低,说明环磷酰胺已对骨髓造成了急性损伤。地榆升白片可以显著增加模型小鼠骨髓有核细胞数量和骨髓中 DNA 含量,表明地榆升白片对环磷酰胺引起的骨髓损伤有一定的保护作用。

各种血细胞对化疗药物的敏感性取决于它们的

半衰期长短^[8]。白细胞半衰期最短 6 h,故最易受到抑制,引起白细胞减少;血小板半衰期为 57 d,亦较易引起减少,而红细胞半衰期长达 120 d,因此红系祖细胞数目减少常不易从外周血红细胞中表现出来。在本实验中,环磷酰胺显著降低了模型小鼠外周血白细胞和血小板数量,对红细胞数量没有明显的影响。地榆升白片显著升高了模型小鼠白细胞和血小板的数量,表明地榆升白片对促进造血干细胞的增殖分化有一定的作用。

骨髓细胞周期是评判其造血系统造血功能好坏的重要指标之一,细胞周期各个时相的分布情况可以反映骨髓细胞受损和恢复的程度^[9]。在细胞周期调控中有两个重要的监测点,分别位于 G_1 与 S 期和 G_2 与 M 期之间^[10]。研究表明,细胞周期中, G_2/M 期对化疗的敏感性最强,其次是 G_0/G_1 期,S 期对化疗药物敏感性最低。化疗造成造血细胞 DNA 损伤后,激活细胞周期监测点机制,将细胞周期阻滞于 G_1 期修复损伤 DNA,对不能修复者启动凋亡程序消除受损细胞^[11]。本实验中,腹腔注射环磷酰胺后模型组 G_0/G_1 细胞百分比显著高于空白对照组, G_2/M 期细胞百分比和增殖指数显著低于空白对照组,表明环磷酰胺可以引起 G_1 期阻滞,进而造成 S 期阻滞,并通过促进细胞凋亡而导致骨髓抑制。与模型组比较,地榆升白片组 G_0/G_1 期细胞百分比显著下降, G_2/M 期细胞百分比显著增加,增殖指数提高,表明地榆升白片可能通过修复损伤的 DNA,解除细胞周期阻滞,使受阻滞的各期细胞加速通过 G_1/S 和 S 期监测点。

本实验初步研究了地榆升白片对骨髓抑制小鼠

17-羟-岩大戟内酯 B 对 U251 细胞增殖及凋亡作用的影响

王晓丽¹,岳丽玲²,周丽²,刘吉成^{1*}

- (1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所,黑龙江 齐齐哈尔 161006;
2. 齐齐哈尔医学院中心实验室,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:探讨 17-羟-岩大戟内酯 B(HJB)对人脑胶质瘤细胞 U251 增殖及凋亡的影响。方法:将 U251 细胞分为空白对照组,5-氟尿嘧啶组($80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),HJB 组(6.25,12.5,25,50,100,200,400,800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。用不同浓度的药物作用 24 h 及药物半数抑制浓度(IC_{50})浓度作用不同时间(12,24,48,72 h),四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性,流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡率,分光光度法检测半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)的相对活性。结果:与空白对照组相比,HJB 对 U251 细胞的增殖有显著抑制作用,并呈浓度依赖及时间依赖性($P<0.05$),作用 24 h 后 IC_{50} 为 $62.236\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。HJB 可诱导 U251 细胞凋亡,浓度 30,60,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别处理细胞 24 h 后,早期凋亡率明显升高($P<0.05$),且呈浓度依赖关系;Caspase-3 及 Caspase-9 的相对活性均升高($P<0.05$),并呈浓度依赖关系。结论:HJB 明显抑制体外 U251 细胞生长并诱导其凋亡,线粒体途径可能是诱导其凋亡的机制之一。

[关键词] 17-羟-岩大戟内酯 B;U251;细胞凋亡;Caspase-3;Caspase-9

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0254-04

Effect of 17-hydroxy-jolkinolide B on Proliferation and Apoptosis of U251 Cells

WANG Xiao-li¹, YUE Li-ling², ZHOU Li², LIU Ji-cheng^{1*}

- (1. Institute of Medicine, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China;

[收稿日期] 20120329(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973902)

[第一作者] 王晓丽,硕士,实习研究员,从事肿瘤药理学研究,Tel:15204523306,E-mail:wangxiaoli.01@163.com

[通讯作者] *刘吉成,博士,教授,主任药师,从事肿瘤药理学研究,Tel:0452-2663103,E-mail:qyybliu@126.com

外周血象、骨髓有核细胞数量、骨髓中 DNA 含量以及骨髓细胞各个细胞周期时相的影响,结果提示地榆升白片对骨髓抑制小鼠骨髓造血系统具有较显著的恢复作用,其分子机制有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 邓震亭.环磷酰胺药理与毒理研究现状[J].天津药
学,2009,21(4):42.

[2] 金美花.地榆药理作用与临床应用[J].现代医药卫
生,2009,25(16):2479.

[3] 苏燎原.淋巴细胞及其辐射效应[M].北京:原子能
出版社,2000:222.

[4] 任非非,刘敬霞,俞维,等.枸杞不同制剂对环磷酰胺
致血虚大鼠全血细胞及骨髓造血功能的影响[J].中
国实验方剂学杂志,2012,18(3):188.

[5] 古丽努尔·买买提,彭安,郑艳波.环磷酰胺化疗所致
骨髓抑制的中药(寿胎丸)干预研究[J].北京师范大

学学报,2010,46(4):480.

[6] 申文江,夏廷毅,李宝生.地榆升白片在肿瘤放化疗
中的临床应用[J].中国实用内科杂志,2009,29
(6):1.

[7] 刘志辉,孟庆勇.海藻多糖对小鼠骨髓放射性急性损
伤的 保护作用[J].广东医学院学报,2002,20
(6):420.

[8] 刘新春,程玉峰,李德爱.实用抗肿瘤药物治疗学
[M].北京:人民卫生出版社,2002:1078.

[9] 赵菊花,祝彼得,黄茜,等.圣愈汤对骨髓抑制小鼠骨
髓细胞周期和凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂
志,2011,16(8):202.

[10] Israels E D, Israels L G. The cell cycle. Stem cell
[J].2001,19(1):88.

[11] 詹启敏.分子肿瘤学[M].北京:人民卫生出版社,
2005:322.

[责任编辑 何伟]