

· 药理 ·

归脾汤含药血清对雷公藤醇提物致骨髓细胞凋亡的保护作用

高丽, 聂中标, 闫润红, 王永辉, 周然*

(山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] **目的:** 观察归脾汤含药血清对雷公藤醇提物致大鼠骨髓细胞凋亡的保护作用。**方法:** 体外培养大鼠股骨骨髓细胞, 经 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤醇提物作用后, 加入 5%, 10%, 15%, 20% 的归脾汤含药血清, 采用 MTT 比色法检测对骨髓细胞增殖的影响; 采用流式细胞仪 PI 单标法检测对骨髓细胞周期的影响; 采用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双标法检测对骨髓细胞凋亡率的影响。**结果:** 与同等浓度的雷公藤醇提物组比较, 15%, 20% 的归脾汤含药血清能显著升高骨髓细胞的存活率和增殖指数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 10%, 15%, 20% 的归脾汤含药血清显著降低骨髓细胞凋亡指数 ($P < 0.05$)。**结论:** 归脾汤含药血清能显著增加雷公藤醇提物作用后骨髓细胞的存活率, 诱导骨髓细胞由相对静止期进入增殖活跃期, 并减少细胞凋亡。

[关键词] 雷公藤; 骨髓细胞; 凋亡; 归脾汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0156-04

Protective Effect of Serum Containing Guipi Decoction on Bone Marrow Cells Co-cultured with Ethanol Extraction of *Tripterygium wilfordii*

GAO Li, NIE Zhong-biao, YAN Run-hong, WANG Yong-hui, ZHOU Ran*

(Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study protective effects and mechanism of serum containing Guipi decoction on bone marrow cells (BMCs) co-cultured with ethanol extraction of *Tripterygium wilfordii* *in vitro*. **Method:** BMCs were co-cultured *in vitro* with different concentrations of serum containing Guipi decoction and ethanol extraction of *T. wilfordii*. MTT assay was used to evaluate the growth proliferation of BMCs. The cell cycle and apoptosis rate were determined by flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) staining and Annexin V/PI staining. **Result:** After treated with different concentrations of serum containing Guipi decoction, viability of BMCs was significantly increased. Cell cycle flow cytometry demonstrated that BMCs treated with different concentrations of serum containing Guipi decoction resulted in a decreased G_0/G_1 phase of BMCs and an increased S and G_2/M phase and apoptosis rate was decreased. **Conclusion:** The different concentrations of serum containing Guipi decoction can significantly increase viability of BMCs, and significantly promote BMCs of G_0/G_1 phase entering proliferation cycle.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; bone marrow cells; apoptosis; Guipi decoction

雷公藤系卫矛科雷公藤属一年生藤本植物, 具有祛风除湿、活血化瘀、清热解毒、消肿散结、杀虫止

血等功效。但雷公藤有大毒, 对消化、生殖、泌尿、心血管、骨髓及血液等系统有较明确的损害^[1]。本课题组前期实验结果表明, 雷公藤醇提物可明显抑制骨髓细胞增殖, 诱导骨髓细胞凋亡^[2], 且归脾汤含药血清对正常大鼠骨髓细胞有很好的促增殖作用^[3]。本实验旨在观察归脾汤含药血清对雷公藤醇提物所致的骨髓细胞凋亡有无保护作用。

1 材料

1.1 药材与试剂 雷公藤药材采自江西九江, 经山

[收稿日期] 20110920(001)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30873433)

[第一作者] 高丽, 讲师, 博士, 从事方剂用及其物质基础研究, E-mail: gaoli716@sina.com

[通讯作者] *周然, 教授, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究, E-mail: zhouran58@sohu.com

西省药品检验所高天爱研究员鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根。取雷公藤细粉 1 600 g,用 10 倍体积的 95% 乙醇浸泡过夜,超声处理 45 min,冷却至室温,补足质量,以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,合并上清液,用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味,置真空干燥箱中干燥,称重,得药物粉末 150.49 g。经高效液相法测得雷公藤醇提物中雷公藤甲素的含量为 0.054 8%。称取雷公藤醇提物 10 mg,以少量二甲基亚砜(DMSO)助溶后,用完全培养基定容至 10 mL,配制成 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,分装, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。DMSO 终浓度小于 0.1%。

归脾汤按《方剂学》^[4] 药物组成,药材购自山西省药材公司,经山西中医学院中药鉴定室鉴定,均为正品,常规煎煮后浓缩至含生药 $1\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。高压灭菌, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

IMDM 培养基(美国 GIBCO)、胎牛血清(杭州四季青)、L-谷氨酰胺(美国 Ameresco)、MTT(美国 Sigma)、台盼蓝(美国 Sigma)、DMSO(美国 Ameresco)、细胞周期检测试剂盒(南京凯基,批号 100602)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD)。

1.2 仪器 INC246 型 CO_2 培养箱(德国 Memmert),BBS-DSC 型超净工作台(上海巴艾贝斯),3k30 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma),SpectraMax 190 型酶标仪(美国 MD),TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon),FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD)。

1.3 动物 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,雄性,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物许可证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法

2.1 归脾汤含药血清的制备^[5] SD 大鼠,10 只,随机分为 2 组,每组 5 只,即归脾汤组和正常对照组,归脾汤组以 $8.8\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{ig}$,正常对照组给予蒸馏水。连续 ig 7 d,于第 7 天最后 1 次 ig 给药(末次 ig 前禁食不禁水 12 h)1 h 后,以乙醚麻醉动物,腹主动脉采血,以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清,并经 $56\ ^\circ\text{C}$,30 min 灭活处理,用一次性 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。将含药血清和正常对照组血清用不含小牛血清的 IMDM 按不同梯度稀释,使其终质量分数分别为 5%,10%,15%,20%。

2.2 大鼠股骨骨髓细胞的制备 SD 大鼠,颈椎脱臼法处死,置 75% 的乙醇中浸泡 3 min,无菌取出双

侧股骨,去除附着组织,剪去骨两端,用 5 mL 无菌注射器吸取培养液反复冲洗骨髓腔,直至股骨变成白色。冲洗出的细胞悬液经 200 目筛网过筛,移入离心管中,加红细胞裂解液裂解红细胞。用不完全培养基洗细胞 2 次(第 2 次洗涤时加入定量的不完全培养基进行细胞计数),收集沉淀的骨髓细胞,用完全培养基(含 10% 灭活的胎牛血清、 $10^5\ \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素)重悬,调骨髓细胞密度为 $1\times 10^9/\text{L}$ 。上述过程中均以台盼蓝染色检查细胞活性,活细胞大于 95% 以上方可用于实验。

2.3 分组 ①阴性对照组,加入 10% 完全培养基;②正常对照组,又分为 5%,10%,15%,20% 组,各组加入相应浓度的正常对照组大鼠血清;③雷公藤醇提物组,又分为 5%,10%,15%,20% 组,各组加入相应浓度的正常对照组大鼠血清,同时加入终质量浓度为 $8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤醇提物;④雷公藤醇提物 + 归脾汤组,又分为 5%,10%,15%,20% 组,各组加入相应浓度的归脾汤含药血清,同时加入终质量浓度为 $8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雷公藤醇提物。

2.4 骨髓细胞存活率的测定 将上述骨髓细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,置 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。24 h 后,分别加入雷公藤醇提物和中药复方含药血清,每孔 100 μL ,每组各设 5 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL 。 $37\ ^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 后,终止培养,以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清,每孔加入 100 μL DMSO,轻轻震荡 10 min,用酶标仪在 570 nm 处测吸光度(A),结果用 5 孔均值表示,按下列公式计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = \frac{\text{实验组 } A - \text{调零组 } A}{\text{阴性对照组 } A - \text{调零组 } A} \times 100\%$$

2.5 骨髓细胞周期的检测 将上述骨髓细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,置 $37\ ^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。24 h 后,小心吸弃上清 1 mL,分别加入雷公藤醇提物和归脾汤含药血清,每孔 1 mL,每组各设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,收集细胞,用 PBS 洗 2 次,弃上清,加入预冷的 70% 乙醇 $-20\ ^\circ\text{C}$ 固定过夜,离心去除乙醇,用 PBS 洗 1 次,加 100 μL RNase A 酶, $37\ ^\circ\text{C}$ 反应 30 min,再加入 400 μL 碘化丙锭(PI)染液,混匀, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期的测定。结果以细胞周期各时相细胞百分率表示,并按下列公式计算细胞增殖指数(proliferation index, PI)。

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

2.6 骨髓细胞凋亡的检测 将上述骨髓细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,置 37 ℃,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,小心吸弃上清 1 mL,分别加入雷公藤醇提物和归脾汤含药血清,每孔 1 mL,每组各设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,收集细胞,用 PBS 洗 2 次,弃上清,用 1 × Annexin-binding Buffer 重悬细胞,调细胞密度为 5 × 10⁵/mL。取细胞 100 μL,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI (50 mg · L⁻¹),混匀,避光,室温下孵育 15 min,加入 400 μL 1 × Annexin-binding Buffer,用流式细胞仪收集 10 000 个细胞,用 Cellquest 软件进行分析,检测结果以凋亡指数 (apoptosis index, AI) 表示。AI 为早期凋亡细胞占检测细胞总数的百分比。

2.7 统计学分析 采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对骨髓细胞存活率的影响 与同等血清的正常对照组比较,雷公藤醇提物各浓度组的细胞存活

率显著降低 (P < 0.01);当归脾汤含药血清浓度为 15%,20% 时,与同等血清浓度的雷公藤醇提物组比较,归脾汤含药血清能显著升高骨髓细胞的存活率 (P < 0.05 或 P < 0.01)。见表 1。

3.2 对骨髓细胞周期的影响 与同等血清浓度的正常对照组比较,雷公藤醇提物各浓度组的增殖指数显著降低 (P < 0.01);当归脾汤含药血清浓度为 15%,20% 时,与同等浓度的雷公藤醇提物组比较,归脾汤含药血清能显著升高骨髓细胞增殖指数 (P < 0.05 或 P < 0.01),说明一定浓度的归脾汤含药血清可促使骨髓细胞解除 G₀/G₁ 期阻滞,由 G₀/G₁ 期进入 S 期以及由 S 期向 G₂/M 期转化,从而有利于骨髓细胞的增殖。见表 2。

3.3 对骨髓细胞凋亡的影响 与同等血清浓度的正常对照组比较,雷公藤醇提物各浓度组的凋亡指数显著升高 (P < 0.01);当血清为 10%,15%,20% 时,与同等浓度的雷公藤醇提物组比较,归脾汤组凋亡指数显著降低 (P < 0.05),说明归脾汤含药血清对雷公藤醇提物所致的骨髓细胞凋亡有保护作用。见表 3。

表 1 归脾汤含药血清对骨髓细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	存活率/%			
		5%	10%	15%	20%
阴性对照	-	-	100.00 ± 12.51	-	-
正常对照	-	94.37 ± 5.39	104.21 ± 7.41	108.71 ± 8.52	121.44 ± 7.31
雷公藤醇提物 ⁴⁾	-	62.21 ± 7.62 ¹⁾	74.37 ± 5.22 ¹⁾	80.16 ± 7.65 ¹⁾	89.29 ± 6.19 ¹⁾
雷公藤醇提物 ⁴⁾ + 归脾汤	8.8	64.28 ± 3.56	79.69 ± 8.17	89.87 ± 7.38 ²⁾	103.83 ± 10.05 ³⁾

注:与同等血清浓度的正常对照组比较¹⁾P < 0.01;与同等血清浓度的雷公藤醇提物组比较²⁾P < 0.01,³⁾P < 0.05;⁴⁾雷公藤醇提物 8 mg · L⁻¹(表 2~3 同)。

表 2 归脾汤含药血清对骨髓细胞增殖指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	PI/%			
		5%	10%	15%	20%
阴性对照	-	-	30.06 ± 1.10	-	-
正常对照	-	25.24 ± 1.39	31.58 ± 1.23	32.78 ± 2.17	34.19 ± 1.52
雷公藤醇提物 ⁴⁾	-	10.84 ± 0.69 ¹⁾	14.55 ± 1.18 ¹⁾	16.61 ± 1.49 ¹⁾	19.52 ± 1.49 ¹⁾
雷公藤醇提物 ⁴⁾ + 归脾汤	8.8	12.72 ± 0.78	15.82 ± 1.27	19.06 ± 1.76 ²⁾	23.56 ± 1.12 ³⁾

表 3 归脾汤含药血清对骨髓细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	AI/%			
		5%	10%	15%	20%
阴性对照	-	-	10.66 ± 0.83	-	-
正常对照	-	12.48 ± 1.93	10.11 ± 1.46	9.22 ± 1.53	8.57 ± 1.39
雷公藤醇提物 ⁴⁾	-	26.90 ± 1.89 ¹⁾	24.65 ± 1.33 ¹⁾	22.06 ± 1.26 ¹⁾	20.26 ± 1.17 ¹⁾
雷公藤醇提物 ⁴⁾ + 归脾汤	8.8	26.37 ± 1.12	22.27 ± 1.28 ²⁾	19.61 ± 1.05 ²⁾	17.42 ± 0.96 ²⁾

4 讨论

MTT 比色法是检测细胞增殖活力的一种简便、准确的方法,常用来分析细胞的增殖程度以及药物对细胞的作用。本实验结果显示,与雷公藤醇提取物组比较,15%,20%的归脾汤含药血清能显著升高骨髓细胞的存活率,且细胞的存活率随血清浓度的增加而升高。

骨髓细胞周期是反映造血系统造血功能的重要指标之一。采用流式细胞技术,通过检测 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期各时相细胞的比例,计算增殖指数,可以对骨髓细胞的增殖状态进行判断。本实验用流式细胞术对骨髓细胞周期进行分析,结果显示,与雷公藤醇提取物组比较,15%,20%的归脾汤含药血清能显著升高骨髓细胞增殖指数,促使骨髓细胞解除 G_0/G_1 期阻滞,由 G_0/G_1 期进入 S 期以及由 S 期向 G_2/M 期转化,从而有利于骨髓细胞的增殖。

细胞凋亡和细胞周期的关系密切,当细胞生长受到抑制时,细胞增殖减少,凋亡细胞增加。本实验结果显示,雷公藤醇提取物可引起骨髓细胞凋亡,而一定浓度的归脾汤含药血清对凋亡有保护作用,可减少骨髓细胞的早期凋亡。

归脾汤由白术、茯苓、黄芪、龙眼肉、炒酸枣仁、人参、木香、制甘草等 8 味药组成,具有益气补血,健脾养心等作用。临床研究证明,归脾汤对于放、化疗后常出现的白细胞减少、骨髓抑制等症状均有明显的治疗或改善作用^[6-8]。本课题组前期实验表明,雷公藤醇提取物可明显抑制骨髓细胞增殖,诱导骨髓细胞凋亡^[2]。本实验结果显示,归脾汤含药血清能显著升高雷公藤醇提取物作用的骨髓细胞的存活率,这可能与归脾汤治疗血虚证有关。中医理论认为,脾胃是气血化生之源,生成血液的基本物质主要来源于脾胃所化生的水谷精微。《灵枢·决气》说:“中焦受气取汁,变化而赤,是谓血。”脾胃为血液的生

成提供物质原料,是血液不断得到补充的前提条件,是血液能否充足的关键。归脾汤方中以参、芪、术、草甘温之品补脾益气而生血,使气旺而血生;当归、龙眼肉甘温补血养心;酸枣仁、茯苓、远志宁心安神;木香辛香而散,理气醒脾,与大量益气健脾药配伍,复中焦运化之功,使补而不滞,滋而不腻。诸药合用,心脾兼顾,气血双补。

总之,归脾汤含药血清能显著增加雷公藤醇提取物作用后骨髓细胞的存活率,能诱导骨髓细胞由相对静止期进入增殖活跃期,并减少细胞凋亡,其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李春庆,孙伟,邵家德,等.雷公藤减毒研究述评[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):263.
- [2] 高丽,聂中标,柴智,等.雷公藤醇提取物对骨髓细胞增殖和凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):146.
- [3] 高丽,聂中标,柴智,等.归脾汤含药血清对骨髓细胞增殖的影响[J].光明中医,2011,26(5):913.
- [4] 邓中甲.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2003:164.
- [5] 杨长福,冯泳,何前松.小半夏加茯苓方含药血清抑制 HepG₂ 细胞增殖及促进凋亡[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):168.
- [6] 姜民,王约青,赵坚,等.归脾汤加足三里穴位注射防治化疗所致白细胞减少症的临床体会[J].中华实用中西医杂志,2008,5(21):392.
- [7] 黄爱萍.归脾汤加味治疗白细胞减少症 30 例临床观察[J].光明中医,2007,22(10):52.
- [8] 黄广培.中医药治疗乳腺癌化疗后骨髓抑制 30 例体会[J].时珍国医国药,2007,18(9):2256.

[责任编辑 聂淑琴]