

补肾解毒活血方与益气补血方预防 化疗后骨髓抑制的比较研究

王茜¹, 杨旭辉¹, 高月², 赵静梅¹, 谭洪玲², 窦永起^{1*}

(1. 解放军总医院全军中医研究所, 北京 100853; 2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:**比较补肾解毒活血方与益气补血方预防环磷酰胺(CTX)引起骨髓抑制小鼠造血功能的效果及作用机制,为临床合理配伍提供依据。**方法:**清洁级昆明种小鼠 80 只,随机分为正常对照组、模型组、补肾解毒活血组和益气补血组,中药组分别给予 25.55, 17.47 g·kg⁻¹·d⁻¹ 中药灌胃,正常对照组和模型组给予等体积的生理盐水,每日灌胃 1 次,连续给药 10 d,第 8 天时采用腹腔注入环磷酰胺(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续造模 3 d。各组随机抽取 10 只,在第 7 天(造模前 1 d)及造模完成后的第 1, 3, 5, 7, 10 天做外周血象检测,剩余 10 只于造模后第 1 天进行骨髓有核细胞计数(BMNC)、粒系、红系造血祖细胞(CFU-GM, CFU-E 和 BFU-E)集落形成单位、细胞凋亡检测及血清粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及促红细胞生成素(EPO)检测。**结果:**各组小鼠白细胞和血小板数分别于造模后第 1 天和第 5 天降至最低,并分别于第 5 天和第 10 天基本恢复至正常,但益气补血组下降程度较模型组轻($P < 0.01$),而补肾解毒活血组恢复明显早于模型组和益气补血组($P < 0.05$);造模后模型组 BMNC, CFU-GM 及 BFU-E 显著下降($P < 0.01$),且两中药组均明显高于模型组($P < 0.01$),其中 BFU-E 以补肾解毒活血组为优($P < 0.05$);造模后小鼠骨髓细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$),约是正常组的 14.7 倍,两中药组骨髓细胞凋亡率均明显低于模型组($P < 0.01$);造模后 GM-CSF 较正常组显著降低($P < 0.01$),但两中药组 GM-CSF 明显高于模型组($P < 0.05$)。各组血清 EPO 水平较正常组没有明显差异。**结论:**预防给予益气补血药或补肾活血解毒药均可以加快化疗后骨髓抑制白细胞的恢复,尤以益气补血方为优;益气补血方减轻血小板下降程度更好,补肾活血解毒方促使血小板恢复更佳。预防给予两组中药均可减轻小鼠环磷酰胺造成的 BMNC 和 CFU-GM 下降程度,从而有利于白细胞的恢复;两组中药不是通过提高血清促红细胞生成素的水平,而是通过减轻环磷酰胺造成的 BFU-E 的减少,达到保护红系造血的效果,以补肾解毒活血方为优。预防应用补肾解毒活血药与益气补血药可以明显降低环磷酰胺引起的骨髓细胞凋亡,似以益气补血组为佳。

[关键词] 补肾解毒活血方; 益气补血方; 环磷酰胺; 骨髓抑制

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0242-04

A Comparative Study of Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe on the Prevention of Bone Marrow Suppression Induced by Cyclophosphamide

WANG Qian¹, YANG Xu-hui¹, GAO Yue², ZHAO Jing-mei¹, TAN Hong-ling², DOU Yong-qi^{1*}

(1. Chinese Medicine Institute of PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe on preventing bone marrow suppression induced by cyclophosphamide (CTX) in mice, and provide the basis for clinical compatibility. **Method:** Eighty Clean grade Kunming mice were used and randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, Bushen Jiedu Huoxue group, Yiqi Buxue group. The mice were administrated normal saline, Bushen Jiedu Huoxue Recipe or Yiqi Buxue Recipe once a day continually for 10 days through gastric tube. Establish the experimental model of bone marrow suppression at day 8

[收稿日期] 2011-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973824)

[第一作者] 王茜, 硕士研究生, Tel:13699266955, E-mail:wangqian198708@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 窦永起, 硕士, 主任医师, 教授, 从事中西医结合临床肿瘤及内科工作, Tel:010-66939456, E-mail:dyqi_301@yeah.net

by ip CTX $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 days continuously. Peripheral blood cells were counted at day7 (the day before the CTX injection) and 1, 3, 5, 7, 10 days after the successful model set.; bone marrow nucleated cell (BMNC)、colony-forming unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM)、colony-forming unit-erythrocyte (CFU-E) and burst-forming unit-erythrocyte (BFU-E) were counted 1 day after the successful model set. **Result:** White blood cell and platelet counts were down to the minimum at day 1 and day 5 after modeling, respectively, and recovered to normal at day 5 and day 10. The number of BMNC, CFU-GM and BFU-E in Yiqi Buxue group and Bushen Jiedu Huoxue group were lower than the normal group, but much higher than that of model group ($P < 0.01$). The ratio of Apoptosis of model group was significantly increased ($P < 0.01$), which is about 14.7 times of normal control group. The other two groups were decreased obviously than model group ($P < 0.01$). GM-CSF was significantly decreased ($P < 0.01$) after modeling, however Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe could greatly increase it ($P < 0.05$). The serum EPO levels didn't show much difference. **Conclusion:** Preventively use of Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe could accelerate the recovery of white blood cell and platelet, and Bushen Jiedu Huoxue Recipe was better on promoting platelet to recovery. Both of Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe can reduce the decrease of BMNC, CFU-GM and BFU-E, which was better in Bushen Jiedu Huoxue group; and can less the ratio of apoptosis of bone marrow cells, which was better in Yiqi Buxue group.

[**Key words**] Bushen Jiedu Huoxue Recipe; Yiqi Buxue Recipe; cyclophosphamide; bone marrow suppression

化疗是治疗肿瘤最重要手段之一,骨髓抑制是其主要副作用。前期实验已表明,化疗药物环磷酰胺可以损伤小鼠造血功能,补肾解毒活血方和益气补血方均可通过促进骨髓造血祖细胞集落的生成能力,提高骨髓有核细胞数,从而稳定升高外周白细胞和血小板数,并促进红系造血。本着“预防为主、防治结合”的精神,本实验通过预防应用补肾解毒活血方与益气补血方,比较研究两组药物对环磷酰胺引起骨髓抑制的预防效果及其作用机制,从而为临床合理配伍应用提供依据。

1 材料

1.1 药品及制备 补肾解毒活血方由熟地黄、苦参、川芎、丹参等组成;益气补血方由炙黄芪、当归、鸡血藤等组成。药材均由解放军总医院中药房提供,药物经煎煮2次、过滤、旋转蒸发、浓缩、配制成含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存备用。注射用环磷酰胺(CTX)(江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号10012621),规格0.2 g。

1.2 试剂与仪器 MethoCult® 03534 培养基(加拿大 StemCell Technologies 公司), MethoCult® 03334 培养基(加拿大 StemCell Technologies 公司), Mouse 红细胞生成素(EPO) ELISA 试剂盒(美国 RB 公司), Mouse 粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) ELISA 试剂盒(美国 RB 公司), Annexin-V 凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司), MULTISKAN

MK3 全自动多功能酶标仪(美国 Thermo 公司), FACS Cabiur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3 动物 清洁级昆明种小鼠,80只,雌雄各半(6~8)周龄,体重(20 ± 2)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法

2.1 模型的制作 参照文献方法^[1],腹腔注入环磷酰胺溶液 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续3 d。

2.2 动物分组及给药 小鼠常规饲养3 d,观察无异常者入组。将小鼠按体重随机分为空白对照组、模型组、补肾解毒活血组、益气补血组,每组各20只。参照文献[2]方法,补肾解毒活血组和益气补血组小鼠分别以 $20.55, 17.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续灌胃给药10 d;空白对照组和模型组分别给予等体积的生理盐水。给药第8天,除空白对照组外,其余3组小鼠均给予腹腔注射环磷酰胺溶液($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续3 d。

2.3 指标检测

2.3.1 外周血象检测 每组随机抽取10只,于造模前1 d、造模后第1,3,5,7,10 d,小鼠尾静脉采血,每只采血0.2 mL,检测外周血象。

2.3.2 骨髓有核细胞计数(bone marrow nucleated cell, BMNC) 各组取所余10只小鼠在造模后第1天颈椎脱臼处死,将小鼠置75%乙醇中消毒片刻,

取股骨,以 PBS 冲出骨髓细胞过滤制成单个骨髓细胞悬液,进行骨髓有核细胞计数。

2.3.3 造血祖细胞集落生成能力检测 采用甲基纤维素培养 MethoCult[®], 分别用 03534 培养基和 03334 培养基培养骨髓有核细胞(CFU-GM)体系和红系集落形成单位(CFU-E)、爆式红系集落形成单位(BFU-E)培养体系,参照文献[3-4]和试剂盒说明书,将骨髓细胞悬液和培养基以相应比例分别加入到 24 孔板,每孔 0.5 mL,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中连续培养。第 3 天观察并计数 CFU-E 大于 8 个细胞为一个集落;第 6 天观察计数 CFU-GM,多于 50 个细胞为一个集落;第 7 天观察计数 BFU-E,大于 50 个细胞为一个集落。

2.3.4 血清 EPO 和 GM-CSF 检测 采用 ELISA 法测定,按试剂盒说明进行操作。

2.3.5 骨髓细胞凋亡检测 采用 AnnexinV-FITC 抗体检测方法检测,具体按试剂盒说明进行操作。

2.3.5 统计学方法 采用 CHISS 软件,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数检验采用方差分析方

法,方差分析差异有显著性后,再进行样本的两两比较(*Q* 检验),*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾解毒活血法与益气补血法对骨髓抑制小鼠外周血象影响的比较 如表 1,造模后第 1 天,模型组及两中药组的白细胞数均降至最低,与空白组有显著差异(*P* < 0.01),造模后第 5 天各组白细胞基本恢复正常。造模后第 3 天,模型组与两中药组白细胞数均开始回升,但两中药组白细胞数均明显高于模型组,尤以益气补血组明显,与模型组有显著差异(*P* < 0.01)。如表 2,造模后第 1 天血小板开始下降,至第 5 天降至最低,第 7 天开始恢复,第 10 天均已基本恢复正常,两中药组血小板最低值均高于模型组,但统计学差异不显著。进一步比较,益气补血组下降较模型组缓慢,在造模后第 3 天明显高于模型组(*P* < 0.01),而补肾解毒活血组恢复则明显优于模型组和益气补血组,在造模后第 7 天即明显高于模型组和益气补血组(*P* < 0.05)。

表 1 造模后不同时间点各组小鼠白细胞数的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

10⁹/L

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模后时间/d					
		0	1	3	5	7	10
空白对照	-	6.09 ± 0.78	8.19 ± 2.08	8.89 ± 2.09	10.69 ± 10.69	10.43 ± 3.14	9.23 ± 2.23
模型	-	6.54 ± 1.28	1.19 ± 0.55 ²⁾	3.17 ± 1.20 ²⁾	9.13 ± 3.62	12.23 ± 3.80	9.99 ± 5.06
补肾解毒活血	20.55	7.2 ± 1.68	1.89 ± 0.96 ²⁾	5.50 ± 2.61 ¹⁾	8.89 ± 3.01	11.54 ± 4.89	8.78 ± 3.79
益气补血	17.47	7.51 ± 2.25	2.05 ± 1.13 ²⁾	7.99 ± 5.70 ⁴⁾	10.22 ± 1.74	12.14 ± 4.43	11.28 ± 2.51

注:与正常组比较¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01;与模型组比较³⁾*P* < 0.05, ⁴⁾*P* < 0.01;与益气补血组比较⁵⁾*P* < 0.05, ⁶⁾*P* < 0.01(表 2~5 同)

表 2 造模后不同时间点各组小鼠血小板的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

10⁹/L

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模后时间/d					
		0	1	3	5	7	10
空白对照	-	930.50 ± 129.61	1154.20 ± 319.93	1141.90 ± 247.09	1170.40 ± 248.07	1051.90 ± 221.82	1 064.50 ± 182.14
模型	-	999.40 ± 105.38	847.301 ± 15.30 ²⁾	406.60 ± 137.51 ²⁾	290.10 ± 104.58 ²⁾	522.80 ± 194.77 ²⁾	1 022.00 ± 181.72
补肾解毒活血	20.55	930.40 ± 164.55	912.30 ± 237.98 ¹⁾	489.00 ± 155.08 ²⁾	400.90 ± 162.18 ²⁾	755.80 ± 177.96 ^{2,4,5)}	1 092.60 ± 244.17
益气补血	17.47	904.0 ± 126.45	821.2 ± 170.22 ²⁾	644.2 ± 159.75 ^{2,4)}	355.3 ± 72.06 ²⁾	536.9 ± 126.65 ²⁾	1 154.0 ± 323.84

3.2 补肾解毒活血法与益气补血法对骨髓抑制小鼠造血祖细胞集落形成的影响 如表 3,造模后第 1 天,模型组 CFU-GM 以及 BFU-E 显著下降(*P* < 0.01),红系集落形成单位(colony-forming unit-erythrocyte, CFU-E)没有明显变化。两中药组 BMNC, CFU-GM 以及 BFU-E 均明显高于模型组(*P* < 0.01),且补肾解毒活血组的 BFU-E 明显高于益气补血组(*P* < 0.05)。

3.3 补肾解毒活血法与益气补血法对骨髓抑制小鼠骨髓细胞凋亡的影响 如表 4,造模后第 1 天小鼠骨髓细胞凋亡率明显增加(*P* < 0.01),约是空白组的 14.7 倍,其中早期凋亡率和晚期凋亡率分别是空白组的 13.9 倍和 15.8 倍;两中药组骨髓细胞早期及晚期凋亡率均明显低于模型组(*P* < 0.01),与空白对照组相当,但两中药组之间无显著性差异。

3.4 补肾解毒活血法与益气补血法对骨髓抑制小

表3 各组药物对小鼠 BMNC 和造血祖细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BMNC/ $\times 10^6$	CFU-GM/个/ 10^5	CFU-E/个/ 10^5	BFU-E/个/ 10^5
空白对照	-	11.86 \pm 1.46	90.50 \pm 3.62	60.67 \pm 5.57	41.67 \pm 6.02
模型	-	4.14 \pm 0.88 ²⁾	53.67 \pm 5.79 ²⁾	58.17 \pm 8.80	32.00 \pm 9.12 ¹⁾
补肾解毒活血	20.05	8.29 \pm 1.08 ^{2,4)}	73.67 \pm 6.15 ^{2,4)}	61.67 \pm 9.20	34.67 \pm 8.89 ⁵⁾
益气补血	17.47	7.97 \pm 1.71 ^{2,4)}	75.17 \pm 7.70 ^{2,4)}	60.00 \pm 9.19	23.17 \pm 3.76 ^{2,3)}

表4 各组药物对小鼠骨髓细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	凋亡率/%
空白对照	-	0.58 \pm 0.21	0.33 \pm 0.22	0.91 \pm 0.43
模型	-	8.11 \pm 1.67 ²⁾	5.23 \pm 1.51 ²⁾	13.34 \pm 2.74 ²⁾
补肾解毒活血	20.25	1.12 \pm 1.13 ⁴⁾	0.59 \pm 0.34 ⁴⁾	1.70 \pm 1.44 ⁴⁾
益气补血	17.47	0.58 \pm 0.43 ⁴⁾	0.39 \pm 0.40 ⁴⁾	0.96 \pm 0.81 ⁴⁾

鼠血清 GM-CSF 和 EPO 的影响 如表 5,造模后第 1 天,模型组 GM-CSF 较正常组显著降低($P < 0.01$),两中药组明显高于模型组($P < 0.05$),两组之间无明显统计学差异。各组血清 EPO 水平较正常组没有明显差异。

表5 预防实验造模后各组小鼠血清 GM-CSF 和 EPO 的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GM-CSF/ $g \cdot L^{-1}$	EPO/ $g \cdot L^{-1}$
正常	-	33.92 \pm 9.25	10.21 \pm 4.17
模型	-	30.38 \pm 16.80	5.94 \pm 1.33 ²⁾
补肾解毒活血	20.55	36.22 \pm 10.92	7.42 \pm 1.21 ³⁾
益气补血	17.47	32.56 \pm 10.20	7.54 \pm 0.92 ³⁾

4 讨论

环磷酰胺是临床上常用的抗肿瘤药物,在体内能转化成烷基化物而引起骨髓抑制等毒副反应^[5],可能通过破坏细胞分子网络的信号转导,抑制骨髓造血干/祖细胞的迁移,影响其增殖、分化,以及促进细胞凋亡等途径抑制骨髓造血^[6]。

“预防为主”是中医学重要思想。实验结果表明,预防给予益气补血药或补肾活血解毒药均可以加快白细胞的恢复,尤以益气补血方为优;均可减轻血小板的减少,益气补血方减轻血小板下降程度更好,而补肾活血解毒方促使血小板恢复更佳。

在作用机制方面,实验结果表明预防给予两组中药均可减轻小鼠环磷酰胺造成的 BMNC 和 CFU-GM 下降程度,从而有利于白细胞的恢复;且两组中药不是通过提高血清促红细胞生成素的水平,而是通过减轻环磷酰胺造成的 BFU-E 的减少,达到保护红系造血的效果,以补肾解毒活血方为优。

另一方面,环磷酰胺可诱导骨髓细胞凋亡从而抑制骨髓造血^[6],而预防应用补肾解毒活血药与益气补血药可以明显降低环磷酰胺引起的骨髓细胞凋

亡,这可能是其减轻化疗后骨髓抑制的作用机制之一。两中药组比较似以益气补血组为佳,但差异无统计学意义。两组减少骨髓细胞凋亡的作用途径有无差别,需要进一步研究。

GM-CSF 是由活化的 T 细胞、单核/巨噬细胞分泌的,可以刺激骨髓髓样祖细胞形成粒细胞、巨噬细胞集落。实验中造模后第 1 天,模型组血清 GM-CSF 较正常组显著降低,这与 CFU-GM 的下降相一致,也反映了骨髓细胞造血能力受损。二中药组 GM-CFU 明显高于模型组,说明二组中药均可能通过减轻血清中 GM-CFU 的下降,达到较快恢复骨髓造血功能的效果。

综上所述,预防应用补肾解毒活血中药和益气补血中药均可减轻化疗后骨髓抑制,可以减轻白细胞和血小板减少的程度,使其恢复较快。推测其可能的作用机制有以下几点①通过保护骨髓造血干祖细胞的增殖能力,减轻环磷酰胺对骨髓的损伤;②抑制环磷酰胺诱导骨髓细胞凋亡通路的激活,减少骨髓细胞的凋亡,从而保护骨髓造血功能;③促进血清中与造血相关细胞因子的生成,刺激骨髓细胞的增殖与分化,促进骨髓造血的恢复。研究发现两组中药作用有所不同,推测其作用途径或作用环节有异,有必要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 聂红,李孔燕,张晓琦,等. 环磷酰胺诱导小鼠血小板减少症模型的建立[J]. 动物学研究,2009(6):645.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[J]. 北京:人民卫生出版社,2006:1167.
- [3] 陈永峰,祝彼得,张莉维. 肝力对骨髓抑制小鼠骨髓及血清 FL 分泌水平的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(13):1587.
- [4] 王均宇. 圣愈汤及其拆方对血虚模型小鼠造血生长因子 IL-6 和 GM-CSF 的影响[J]. 山东中医杂志,2006,25(7):478.
- [5] 邓震亭. 环磷酰胺药理与毒理研究现状[J]. 天津药学,2009,21(4):43.
- [6] 马增春,谭洪玲,肖成荣,等. 环磷酰胺损伤小鼠骨髓造血的机制[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):332.

[责任编辑 古云侠]