

补肾解毒活血法与益气补血法 对骨髓抑制小鼠造血功能影响的比较研究

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:比较补肾解毒活血法与益气补血法对环磷酰胺(CTX)所致骨髓抑制小鼠造血功能的影响及其作用机制的不同特点。方法:昆明种小鼠 80 只,随机分为 4 组,正常对照组、模型组、补肾解毒活血组(20.55 g·kg⁻¹·d⁻¹)和益气补血组(17.47 g·kg⁻¹·d⁻¹)。采用 CTX 100 mg·kg⁻¹ ip,连续 3 d,制成骨髓抑制小鼠模型。各组于造模完成后次日开始 ig 连续 10 d。分别于造模前及造模后 1,3,5,7,10,14 d 动态检测外周血象;于末次给药次日后进行骨髓有核细胞计数(BMNC)及粒-单核系集落形成单位(CFU-GM)、红系集落形成单位(CFU-E)、和红系爆式集落形成单位(BFU-E)集落计数。结果:补肾解毒活血法和益气补血法均可明显升高模型小鼠的 WBC,PLT,BMNC,可促进造血祖细胞(HPC)增殖,CFU-GM,CFU-E,BFU-E 集落数均显著高于模型组($P < 0.01$);补肾解毒活血法对血小板的恢复优于益气补血法。结论:补肾解毒活血法和益气补血法均可促进骨髓造血祖细胞集落生成,具有减轻和改善化疗后骨髓抑制的效果,而前者尤可减轻血小板减少、促进其恢复;其作用机制可能在骨髓细胞分化过程或造血微环境等途径上有不同。

[关键词] 补肾解毒活血法;益气补血法;骨髓抑制;环磷酰胺;造血祖细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0192-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111107.1627.010 **[网络出版时间]** 2011-11-07 16:27

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111107.1627.010.html>

A Comparative Study of Bushen Jiedu Huoxue Recipe and Yiqi Buxue Recipe on the Impact of Hematopoiesis in Marrow-Depressed Mice

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 observe the hematopoietic effects and mechanisms of Bushen Jiedu Huoxue recipe and Yiqi Buxue recipe in the marrow-depressed mice. **Method:** Eighty Kunming mice were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, Bushen Jiedu Huoxue group(20.55 g·kg⁻¹·d⁻¹), Yiqi Buxue group(17.47 g·kg⁻¹·d⁻¹). The marrow-depressed model was established by ip cyclophosphamide (CTX) 100 mg·kg⁻¹ for 3 days. After model establishment, the mice were ig treated with different recipes for 10 days. Peripheral blood cells were counted by microcellcounter; bone marrow nucleated cell and the amount of colony forming unit-granulocyte-macrophage(CFU-GM), colony forming unit-erythrocyte(CFU-E) and burst forming unit-erythrocyte(BFU-E) were counted to study the effects of the proliferation of hematopoietic progenitor cell(HPC) 11 days after the successful model set. **Result:** The Bushen Jiedu Huoxue recipe and Yiqi Buxue recipe could increase the number of WBC, PLT, bone marrow nucleated cell(BMNC), promote the proliferation of hematopoietic progenitor cell(HPC). The quantities of CFU-GM, CFU-E, BFU-E were significantly higher than the model group ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2011-09-20

[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: 1369926655, E-mail: wangqian198708@yahoo.com.cn

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

Conclusion: Both of Bushen Jiedu Huoxue and Yiqi Buxue can promote the colony formation of bone marrow hematopoietic progenitor cells, and alleviate the effect of bone marrow suppression after chemotherapy, while the former one was more significant in improving thrombocytopenia, to promote their recovery. Its mechanism may be vary in the bone marrow hematopoietic cell differentiation process or in the micro-environment.

[**Key words**] Bushen Jiedu Huoxue recipe; Yiqi Buxue recipe; marrow depress; cyclophosphamide; hematopoietic progenitor cell

化疗是目前治疗恶性肿瘤最重要的手段之一,但大多数化疗药都有不同程度的骨髓抑制作用,导致外周血白细胞(WBC)、血小板(PLT)下降。这不仅常常影响化疗的顺利进行,而且严重的骨髓抑制会导致继发感染或出血,进而威胁患者的生命。中医学多将化疗后骨髓抑制归于脾肾两虚、气血不足,临床多以益气补血为主要治疗方法,但疗效还不尽理想;同时多年临床实践使我们发现在益气补血基础上配合补肾解毒活血效果会更好,但其机制不明,相关的实验研究也罕有报道。本实验拟通过比较,研究补肾解毒活血法与益气补血法对环磷酰胺致骨髓抑制模型小鼠造血功能的影响及其防治作用的不同特点,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药物及制备 补肾解毒活血方由熟地黄 10 g,何首乌 10 g,肉苁蓉 10 g,苦参 10 g,白花蛇舌草 10 g,川芎 15 g,丹参 10 g 组成;益气补血方由炙黄芪 20 g,当归 10 g,党参 15 g,白芍 15 g,鸡血藤 15 g 组成。以上药物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,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,批号 10A33026,规格 100 mL); MethoCult® 03334 培养基(加拿大 StemCell Technologies 公司,批号 09K32011,规格 90 mL)。自动血细胞计数仪(日本 Sysmex-820),显微镜(日本 Olympus),Napco-5410 CO_2 培养箱(美国 Shelden 公司)。

1.3 动物 清洁级昆明小鼠,雌雄各半,80 只,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,动物合格证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法

2.1 模型的制作 参照文献方法[1],CTX 溶液 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,ip 1 次/d,连续 3 d。

2.2 动物分组及给药 动物随机分为 4 组:正常对

照组、模型组、补肾解毒活血组、益气补血组,每组 20 只。参照文献[2],计算小鼠的等效剂量,补肾解毒活血组和益气补血组分别为 $20.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $17.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,各组于造模完成后次日开始 ig,连续 10 d;正常对照组和模型组予等体积的生理盐水。

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、造模开始后 1,3,5,7,10,14 d 尾静脉采血,检测外周血象。

2.3.2 骨髓有核细胞计数(bone marrow nucleated cell, BMNC) 每组所余 10 只,于末次药后次日颈椎脱臼处死小鼠,置 75% 乙醇中消毒,取股骨,用 6 号针头以 PBS 冲出骨髓细胞,再用 4 号针头过滤制成单个骨髓细胞悬液,在显微镜下按白细胞计数法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 粒细胞-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)、红细胞集落形成单位(BFU-E)和红系集落形成单位(CFU-E)的检测参照文献[3-4]方法进行。取小鼠股骨,用 PBS 冲出骨髓细胞,过 4 号针头制成单细胞悬液,计数细胞并调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,分别用 03534 培养基和 03334 培养基培养 CFU-GM 体系和 CFU-E、BFU-E 体系。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 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,饱和湿度,5% CO_2 培养箱中连续培养。第 3 天观察计数 CFU-E, >8 个细胞为 1 个集落;第 6 天观察计数 CFU-GM, >50 个细胞为 1 个集落;第 7 天观察计数 BFU-E, >50 个细胞为 1 个集落。

2.4 统计学方法 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)。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对骨髓抑制小鼠外周血象影响的比较 各组白细胞均在造模后次日为最低,并显著低于正常组($P < 0.01$),然后逐渐回升,至 5 d 时基本恢复至正

常;在 7 d 时,模型组白细胞出现明显高于正常组的“反跳”现象($P < 0.05$),在 10 d 时恢复正常。在给药 3 d 时,补肾解毒活血方、益气补血方组白细胞虽

低于正常组,但均高于模型组($P < 0.05$),两组之间无显著性差异。见表 1。

表 1 补肾解毒活血方及益气补血方对骨髓抑制小鼠外周血白细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\times 10^9/L$

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
正常	-	6.69 ± 1.54	10.16 ± 2.78	7.94 ± 1.30	12.29 ± 2.29	8.69 ± 1.94	10.67 ± 3.29	9.26 ± 1.59
模型	-	5.5 ± 1.66	1.2 ± 0.51 ²⁾	1.75 ± 1.02 ²⁾	12.84 ± 7.42	16.43 ± 10.63 ¹⁾	12.20 ± 4.88	11.91 ± 3.34
补肾解毒活血	20.55	4.91 ± 0.84 ⁵⁾	1.03 ± 0.44 ²⁾	3.79 ± 1.76 ^{2,4)}	13.04 ± 6.37	13.38 ± 6.08	14.93 ± 8.17	9.02 ± 12.33
益气补血	17.47	6.38 ± 1.51	1.25 ± 0.47 ²⁾	3.59 ± 2.08 ^{2,3)}	12.67 ± 4.31	14.35 ± 6.13	9.63 ± 3.50	11.83 ± 4.16

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 2~4 同)。

各组血小板下降时间及恢复时间比白细胞晚,各组均在造模后 3 d 出现下降,至 5 d 时降至最低,至 10 d 才基本恢复正常,其中模型组在 10 d 略高于正常组($P < 0.05$),出现“反跳”现象;补肾解毒活血组在 5 d 时已经有所恢复,至 7 d 已恢复正常;而益

气补血组,在 5 d 时血小板降至最低,在 7 d 时出现恢复,至 10 d 才基本恢复正常,与模型组相比较无显著性差异,见表 2。益气补血方在造模后 7 d 红细胞与模型组比较有回升,其余各组时点未出现明显的变化,见表 3。

表 2 补肾解毒活血方及益气补血方对骨髓抑制小鼠外周血血小板的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\times 10^9/L$

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
正常	-	107.28 ± 10.26	105.69 ± 19.51	95.66 ± 14.78	110.36 ± 18.77	107.27 ± 15.73	105.49 ± 9.06	127.80 ± 30.88
模型	-	99.09 ± 10.08	94.07 ± 22.83	62.92 ± 11.17 ²⁾	37.31 ± 14.02 ²⁾	74.09 ± 44.87 ²⁾	135.52 ± 34.11 ¹⁾	105.40 ± 29.57
补肾解毒活血	20.55	96.15 ± 8.27 ^{1,6)}	98.48 ± 20.42	60.96 ± 19.36 ²⁾	66.87 ± 20.81 ^{2,4,5)}	116.69 ± 35.31 ^{4,5)}	94.75 ± 35.07 ⁴⁾	101.56 ± 31.93
益气补血	37.47	110.75 ± 10.42 ³⁾	88.00 ± 11.15	67.45 ± 14.53 ²⁾	50.36 ± 17.87 ²⁾	79.46 ± 30.77	95.19 ± 15.75 ⁴⁾	123.91 ± 28.41

表 3 补肾解毒活血方及益气补血方对骨髓抑制小鼠外周血红细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\times 10^{12}/L$

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
正常	-	11.03 ± 0.85	9.44 ± 0.95	8.94 ± 1.46	10.17 ± 1.44	9.83 ± 0.70	10.43 ± 0.94	11.02 ± 1.31
模型	-	9.65 ± 1.14	9.02 ± 0.93	7.96 ± 0.32	8.55 ± 1.55 ²⁾	8.46 ± 0.66 ¹⁾	8.36 ± 1.11 ¹⁾	9.95 ± 0.76
补肾解毒活血	20.55	8.87 ± 0.62	8.68 ± 0.90	8.86 ± 1.38	9.87 ± 1.63	9.21 ± 1.67	7.85 ± 1.28 ¹⁾	10.78 ± 1.94
益气补血	17.47	11.08 ± 1.59	8.68 ± 0.60	9.76 ± 1.04 ⁴⁾	9.33 ± 1.23	9.71 ± 1.13 ³⁾	8.68 ± 0.89 ¹⁾	10.08 ± 1.20

3.2 对骨髓抑制小鼠骨髓造血祖细胞集落形成及骨髓有核细胞计数影响的比较 小鼠药后 11 d,模型组骨髓有核细胞数及造血祖细胞集落数显著下降($P < 0.01$),而补肾解毒活血方和益气补血方均可

显著升高粒细胞巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)、红系爆式集落形成单位(BFU-E)和红系集落形成单位(CFU-E)集落产率($P < 0.01$),但两组之间无显著性差异。见表 4。

表 4 补肾解毒活血方及益气补血方对骨髓有核细胞计数及造血祖细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

个

分组	剂量/g·kg ⁻¹	有核细胞计数	CFU-GM	CFU-E	BFU-E
正常	-	11.20 ± 1.8	95.00 ± 5.83	70.33 ± 2.42	44.00 ± 2.76
模型	-	4.13 ± 1.22 ²⁾	58.17 ± 6.49 ²⁾	30.00 ± 3.35 ²⁾	10.17 ± 1.72 ²⁾
补肾解毒活血	20.55	8.60 ± 1.87 ^{1,4)}	86.50 ± 3.78 ^{2,4)}	61.00 ± 4.10 ^{2,4)}	18.00 ± 1.79 ^{2,4)}
益气补血	17.47	8.73 ± 1.35 ^{1,4)}	86.50 ± 7.71 ^{2,4)}	59.67 ± 4.93 ^{2,4)}	18.50 ± 2.67 ^{2,4)}

4 讨论

各类血细胞的产生均起源于造血干细胞,且需

要造血微环境的支持^[5]。骨髓有核细胞在一定程度上反映骨髓造血细胞的增生情况,造血干细胞分

化产生造血祖细胞,并在多种造血因子的调控下进一步增殖分化为下级细胞,其中 CFU-GM 产生粒系,BFU-E 经进一步分化为 CFU-E 而产生红系。我们发现在造模后 10 d,外周血白细胞和血小板已基本恢复正常,而在药后 11 d 时,骨髓有核细胞及各系造血祖细胞集落仍低于正常值,这说明小鼠造血功能并未完全恢复。

研究结果显示:两组中药均可达到促进环磷酰胺致骨髓抑制小鼠外周血白细胞和血小板恢复的效果;两组中药方均可明显增加小鼠骨髓有核细胞数,促进 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 生成能力的恢复,这是两种方药共同的作用环节,而补肾解毒活血方尤可减轻血小板减少的程度、加快血小板的回升,也提示两种方药在骨髓细胞分化过程中或在造血微环境方面,必然有其各自不同的作用途径或靶点,值得进一步深入研究。

化疗药物 CTX 属于细胞周期非特异性药物,除对 G₀ 期细胞作用较弱外,对增殖周期中各期细胞均有破坏作用,它可能导致大量处于旺盛分裂期的骨髓细胞死亡。由于红细胞在血液中的生存时间较长,短时间内不会出现明显变化,故在本实验中各组红细胞的变化不明显,但在药后 11 d 时,模型组骨髓 BFU-E、CFU-E 集落数均显著下降,表明本造模方法可导致红系造血功能抑制,而补肾解毒活血方和益气补血方均可显著升高 BFU-E 和 CFU-E 集落数,表明两组中药方均可促进红系造血能力的恢复。对于益气补血中药对外周血红细胞的恢复机制研究较多,而补肾解毒活血中药促进红系造血的机制是怎样的,也需要进一步探讨。

在实验中我们还观察到,白细胞和血小板分别在 7 d 和 10 d 出现“反跳”现象,与文献[6]报道的结果相似。CTX 导致大量处于旺盛分裂期的骨髓细胞死亡,刺激处于静止期的骨髓干祖细胞进入增殖周期,使骨髓中干祖细胞数量增多^[6],并不断的

分化为成熟的血细胞;化疗药物还可能造成骨髓血管内皮细胞受损,导致造血细胞与内皮细胞黏附性增强,大量血细胞堆积在骨髓内不能进入到外周血^[7],导致外周血中血细胞数量减少。在 7 d 出现“反跳”现象,可能是由于大量分化成熟的白细胞同时释放入血引起。而这种现象在两中药组并未观察到,其理论与临床意义如何,以及其机制是否与中药对骨髓细胞周期的调控、或者与其对骨髓血管内皮细胞的修复作用有关,都是值得深入研究的问题。

总之,实验表明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生成能力,促进造血细胞的生成,达到减轻和改善化疗后骨髓抑制的效果,而补肾解毒活血方组尤可改善血小板减少、促进其恢复;两种方药在骨髓细胞分化过程中或造血微环境方面可能有其各自不同的作用途径。

[参考文献]

- [1] 徐振晔,鞠艳芳. 双黄升白方防治化疗骨髓抑制实验研究[J]. 上海中医药大学学报,1999,13(2):43.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1103.
- [3] 马增春,高月,刘永学,等. 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2001,10(7):13.
- [4] 刘秀珍. 造血祖细胞培养技术实验手册[M]. 北京:北京出版社,1993:25.
- [5] 姚泰. 生理学[M]. 北京:人民军医出版社,2006:49.
- [6] 马增春,高月,刘学永,等. 环磷酰胺所致血虚证小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的变化[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(7):522.
- [7] 王柳春,孙慧,李凯. 黄芪多糖与粒细胞集落刺激因子对化疗后骨髓功能的影响[J]. 中国肿瘤临床,2008,35(23):1373.

[责任编辑 何伟]