

# 黄芪不同有效部位配伍对骨髓抑制模型小鼠粒系调控因子的影响

张红梅<sup>1</sup>, 范颖<sup>1\*</sup>, 林庶茹<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032;

2. 辽宁中医药大学中医分子生物学实验室, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:考察黄芪不同有效部位配伍对骨髓抑制模型小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、肿瘤坏死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ )的影响。方法:BALB/c 小鼠实验第 1,3,5 天 ip 环磷酰胺  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  复制骨髓抑制模型。分为正常组、模型组、黄芪饮片组、酮苷组、糖苷组、糖酮组、糖苷酮组。造模当日给药,正常组、模型组按  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  ig 蒸馏水;黄芪饮片组按  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ig 黄芪水煎液;各有效部位配伍组按黄芪生药量  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  分别 ig 相应治疗药物(酮苷组  $0.227 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,糖苷组  $0.610 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,糖酮组  $0.514 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,糖苷酮组  $0.678 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。连续 ig 15 d。ELISA 法检测小鼠骨髓细胞 GM-CSF, G-CSF, TNF- $\beta$  含量。结果:糖苷组、糖酮组 GM-CSF 含量明显增加( $P < 0.05$ );糖苷组、糖酮组 G-CSF 含量明显增加,且优于黄芪饮片组( $P < 0.05$ );黄芪不同有效部位配伍组 TNF- $\beta$  含量均明显减少,且糖苷组减少 TNF- $\beta$  含量优于酮苷组、糖酮组、糖苷酮组( $P < 0.05$ )。结论:黄芪有效部位可能通过调控细胞因子调控粒系造血;黄芪多糖与皂苷、黄酮配伍后促进粒系造血效果较优。

**[关键词]** 黄芪;有效部位;配伍;骨髓抑制;粒系造血;环磷酰胺

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0134-04

**[收稿日期]** 20110507(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873232);辽宁省优秀人才项目(2009R39)

**[第一作者]** 张红梅,讲师,博士,从事方剂配伍规律及效应机制研究

**[通讯作者]** \* 范颖,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及效应机制研究, Tel:024-31207104, E-mail: lnzyfy@126.com

制,而整个实验距离首次用药不足 2 h,乳香没药在此时间中对 P450 表达的影响可以忽略,可能是直接影响酶空间结构而导致其活性降低或者竞争性抑制戊巴比妥钠代谢。从乳香没药用 7 d 诱导 P450 活性增强来看,更可能是竞争性抑制,但这个推测尚需进一步研究证实。

根据文献<sup>[4-5]</sup>及可获得性选择非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砞分别作为 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 的探针药物。文献<sup>[5]</sup>指出氯唑沙宗的浓度较低时 CYP1A2 与 CYP2E1 对其有相同的催化能力,若实验中氯唑沙宗的代谢变化完全由 CYP1A2 引起,则乳香没药混合物、乳香、没药组中氯唑沙宗的代谢率与对照组代谢率的比值应该与非那西丁的相同,而实际上氯唑沙宗比值为 3.2,4.3,4.4,而非那西丁比值为 2.2,2.7,3.0,所以氯唑沙宗的代谢应存在 CYP2E1 的催化效果,乳香没药混合物、乳香、没药连续给药可以诱导 CYP2E1 活性增强,乳香对 CYP2E1 的诱导作用强于没药。

P450 活性的改变对于联合用药的有效性和安全性有明显影响,乳香没药连续使用诱导 CYP1A2 和 CYP2E1 活性增强,提示通过 CYP1A2 和 CYP2E1 代谢而产生毒性代谢产物的药物在与乳香没药合用时应当注意剂量的适当调整。

## [参考文献]

- [1] 周昆,代志,柳占彪,等. 壮骨关节丸中肝毒性药材的筛选研究[J]. 中国药物警戒,2009,6(11):641.
- [2] 周昆,谈英,柳占彪,等. 乳香没药对大鼠肝毒性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):221.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:511.
- [4] 胡道德,顾磊,姚慧娟,等. 反相高效液相色谱法同时检测 4 种细胞色素 P450 探针药物[J]. 中国药学杂志,2010,45(1):71.
- [5] 郭喻,汪晖. 人细胞色素 P450 同工酶探针底物特异性的研究进展[J]. 中国药理学通报,2007,23(7):851.

[责任编辑 聂淑琴]

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1432.014 [网络出版时间] 2011-09-20 14:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1432.014.html>

## Effect of Compatibility of Astragali Radix Effective Parts on Granulocytopoiesis in Myelosuppression Mice

ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, FAN Ying<sup>1\*</sup>, LIN Shu-ru<sup>2</sup>

(1. Prescription Department, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Laboratory of Molecular Biology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of compatibility of Astragali Radix effective parts on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), tumor necrosis factor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) in myelosuppression mice. **Method:** BALB/c mice were given cyclophosphamide intraperitoneally at  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  on the first, third, fifth day of the experiment to built myelosuppression mice model. The mice were divided into uninfluenced group, model group, Astragali Radix group, ketoside group, glucoside group, saccharon group, glucoside and ketone group. At the same time mice in uninfluenced group and model group were given water ig with the dosage of  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Mice in Astragali Radix group were given the decoction ig with the dosage of  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Mice in groups of compatibility of Astragali Radix effective parts were given corresponding medicine (ig) with the dosage of Astragali Radix  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  for 15 days; ketoside group  $0.227 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , glucoside group  $0.610 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , saccharon group  $0.514 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , glucoside and ketone  $0.678 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Detected GM-CSF, G-CSF, TNF- $\beta$ , levels in bone marrow cells with ELISA. **Result:** GM-CSF in glucoside group, saccharon group increased significantly ( $P < 0.05$ ). G-CSF in glucoside group, saccharon group increased significantly and were higher than Astragali Radix group ( $P < 0.05$ ). TNF- $\beta$  in Groups of compatibility of Astragali Radix decreased significantly and glucoside group was lower than ketoside group, saccharon group, glucoside and ketone ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Compatibility of Astragali Radix effective parts may regulate granulocytopoiesis through the regulation of cell factors. Astragali Radix polysaccharides with Astragali Radix flavone or astragaloside accelerated granulocytopoiesis significantly.

[Key words] Astragali Radix; effective part; compatibility; myelosuppression; granulocytopoiesis; cyclophosphamide

黄芪是中医临床常用中药之一,有补气升阳、益卫固表、托毒生肌、利水消肿等多种功效<sup>[1]</sup>。《神农本草经》言其能“补虚”,《日华子本草》载其能“助气”、“补血”,至《本草纲目》黄芪被尊为“补药之长”,对各种虚弱性疾病有很好的治疗作用。研究表明,黄芪对环磷酰胺等化疗药所致的骨髓抑制也有很好的保护作用<sup>[2]</sup>。环磷酰胺为临床一线抗肿瘤药,主要剂量限制性毒性即为造血系统毒性,其中受影响最大的是白细胞,特别是中性粒细胞。本研究采用环磷酰胺复制骨髓抑制模型,通过考察黄芪不同有效部位配伍对粒系造血因子的影响,探讨黄芪

有效部位提升粒细胞的作用机制。

### 1 材料

**1.1 动物** SPF级BALB/c小鼠84只,体重( $20 \pm 2$ )g,6~8周龄,雌雄各半,一次性购于北京维通利华实验动物技术有限公司。动物许可证编号SCXK(京)2006~2009。

**1.2 药物** 生药黄芪 *Astragalus mongholicus* (Bge.) Hsiao,产地内蒙,一次性购于沈阳天益堂药店,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延军教授鉴定。黄芪多糖、黄芪皂苷、黄芪黄酮由辽宁中医药大学方剂分析与代谢实验室提取。黄芪多糖得率

4.45% ,采用紫外分光光度法以葡萄糖计含量为 53.23% ;黄芪总皂苷得率 1.16% ,采用紫外分光光度法以黄芪甲苷计含量为 47.32% ;黄芪黄酮得率 0.69% ,采用紫外分光光度法以芦丁计含量为 17.55% 。

**1.3 试剂** 注射用环磷酰胺 (CTX,山西普德药业有限公司,规格:0.2 g/支,批号 20090801)。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、肿瘤坏死因子-β (TNF-β) ELISA 酶联免疫试剂盒 (美国 ADL 公司,批号 200912)。

## 2 方法

**2.1 造模** 实验开始第 1,3,5 天按 100 mg·kg<sup>-1</sup> 体重剂量 ip CTX,共注射 3 次。造模 7 d 后测外周白细胞计数,外周血白细胞计数低于正常值的 20% 时,成功建立模型。

**2.2 分组及给药** 根据小鼠体重、外周血白细胞计数分层随机分组,共分为 7 组:正常组、模型组、黄芪饮片组、酮苷组 (黄芪黄酮 + 皂苷)、糖苷组 (黄芪多糖 + 皂苷)、糖酮组 (黄芪黄酮 + 多糖)、糖苷酮组 (黄芪多糖 + 皂苷 + 黄酮)。每组 12 只,雌雄各半。造模当日 ig 给药,按 60 kg 成人日服黄芪生药量 60 g 计算,根据体表面积换算成小鼠等效剂量为成人的 10 倍。正常组、模型组均按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体重剂量 ig 蒸馏水;黄芪饮片组按 10 g·kg<sup>-1</sup> ig 黄芪水煎液;各有效部位配伍组用制备好的溶液按黄芪生药量 10 g·kg<sup>-1</sup> 分别 ig 相应的治疗药物,即酮苷组 0.227 g·kg<sup>-1</sup>,糖苷组 0.610 g·kg<sup>-1</sup>,糖酮组 0.514 g·kg<sup>-1</sup>,糖苷酮组 0.678 g·kg<sup>-1</sup>。连续 ig 15 d。

**2.3 骨髓细胞悬液制备及 GM-CSF, G-CSF, TNF-β 含量检测** 颈椎脱臼处死小鼠,取出股骨,剔除股骨周围肌肉及结缔组织,剪开股骨两端,用 6 号针头抽取生理盐水反复冲洗髓腔,直至骨变白,收入 5 mL 离心管中,离心 (1 200 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),弃去上清,得骨髓细胞悬液。参照 ELISA 说明书,检测小鼠骨髓细胞 GM-CSF, G-CSF, TNF-β 含量。

**2.4 统计分析方法** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析。组间比较用方差齐性检验,方差分析用单因素方差分析。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对小鼠骨髓细胞 GM-CSF 含量的影响** 与正常组比较,模型组 GM-CSF 含量明显减少,有统计学

意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,黄芪饮片组、酮苷组、糖苷组、糖酮组 GM-CSF 含量均明显增加,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );各有效部位配伍组之间比较,糖酮组提高 GM-CSF 含量优于糖苷酮组、酮苷组,有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

表 1 对小鼠骨髓细胞 GM-CSF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GM-CSF/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	235.5 ± 36.9 <sup>1)</sup>
模型	-	51.1 ± 13.1
黄芪饮片	10.0	112.1 ± 43.5 <sup>1)</sup>
酮苷	0.227	84.7 ± 33.0 <sup>3)</sup>
糖苷	0.610	119.9 ± 35.6 <sup>1)</sup>
糖酮	0.514	146.8 ± 68.5 <sup>1,2)</sup>
糖苷酮	0.678	88.4 ± 36.7 <sup>3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与酮苷组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与糖酮组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 对小鼠骨髓细胞 G-CSF 含量的影响** 与正常组比较,模型组 G-CSF 含量明显减少,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,黄芪饮片组、糖苷组、糖酮组 G-CSF 含量均明显增加,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与黄芪饮片组比较,糖苷组、糖酮组 G-CSF 含量明显升高,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );各有效部位配伍组之间比较,酮苷组、糖苷组、糖酮组提高 G-CSF 含量明显优于糖苷酮组,有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 对小鼠骨髓细胞 G-CSF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	G-CSF/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	1 631.9 ± 349.7 <sup>1)</sup>
模型	-	196.7 ± 116.2
黄芪饮片	10.0	411.2 ± 191.8 <sup>1)</sup>
酮苷	0.227	562.2 ± 138.1 <sup>1,3)</sup>
糖苷	0.610	716.2 ± 246.6 <sup>1,2,3)</sup>
糖酮	0.514	654.4 ± 106.1 <sup>1,2,3)</sup>
糖苷酮	0.678	385.7 ± 130.7

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与黄芪饮片组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与糖苷酮组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.3 对小鼠骨髓细胞 TNF-β 含量的影响** 与正常组比较,模型组 TNF-β 含量明显增加,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,黄芪及其有效部位配伍各组 TNF-β 含量均明显减少,有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与黄芪饮片组比较,酮苷组 TNF-β 含量明显升高,糖苷组 TNF-β 含量明显下降;各有效部位配伍

组之间比较,糖苷组减少 TNF- $\beta$  含量明显优于酮苷组、糖酮组、糖苷酮组,均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 对小鼠骨髓细胞 TNF- $\beta$  含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	39.3 ± 8.4 <sup>1)</sup>
模型	-	354.1 ± 77.0
黄芪饮片	10.0	134.0 ± 35.2 <sup>1)</sup>
酮苷	0.227	245.5 ± 33.9 <sup>1,2,3)</sup>
糖苷	0.610	60.2 ± 23.9 <sup>1,2)</sup>
糖酮	0.514	137.4 ± 32.0 <sup>1,3)</sup>
糖苷酮	0.678	174.4 ± 72.8 <sup>1,3)</sup>

#### 4 讨论

黄芪是临床防治化疗后骨髓抑制的常用中药,对骨髓抑制引起的三系血细胞减少均有一定防治作用。研究表明,黄芪多糖类、多种皂苷类和黄酮类化合物是黄芪的主要化学成分<sup>[3]</sup>。其中黄芪多糖、黄芪甲苷对放化疗后骨髓抑制有一定的改善作用<sup>[4,5]</sup>。

GM-CSF 与 G-CSF 均为造血的正调控因子。GM-CSF 作用于造血中期<sup>[6]</sup>,主要促进中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞祖细胞集落的形成,也能刺激红系和巨核系祖细胞等的分化。G-CSF 作用于造血晚期,能特异地刺激粒系祖细胞的增殖和分化,增加外周血中性粒细胞数;同时也活化成熟中性粒细胞的功能,并延长中性粒细胞生存周期。实验结果表明,模型小鼠 GM-CSF, G-CSF 含量明显减少,提示环磷酰胺可以作用于造血中、晚期,通过抑制骨髓细胞 GM-CSF, G-CSF 发挥抑制造血作用。其中糖苷、糖酮配伍均能显著提高 GM-CSF 含量,并以糖苷作用最为显著;酮苷、糖苷、糖酮配伍均能显著增加小鼠 G-CSF 含量,并以糖苷、糖酮配伍作用最为显著。说明黄芪有效部位配伍主要作用于造血的晚期,能够特异性促进粒系造血。由于糖苷配伍、糖酮配伍增加 GM-CSF, G-CSF 含量的作用均较为突出,推测在改善粒系造血方面,黄芪糖苷、黄芪糖酮为最佳活性部位。

肿瘤坏死因子为造血负性调控因子。研究表明, TNF- $\alpha$  主要调控红系和巨核系造血<sup>[7-8]</sup>。TNF- $\beta$  的靶细胞为肿瘤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞<sup>[9]</sup>,能

增加细胞的吞噬活性,可能对粒系造血有一定作用。本实验结果表明,化疗贫血模型小鼠 TNF- $\beta$  含量明显增加,提示环磷酰胺引起造血细胞 DNA 损伤后,促使 TNF- $\beta$  的含量增加。给予黄芪不同有效部位配伍干预后,各组小鼠 TNF- $\beta$  含量均明显减少,说明 TNF- $\beta$  为造血负调控因子。从黄芪不同有效部位配伍组对 G-CSF 与 TNF- $\beta$  含量的影响看,两者作用趋势相反。已经明确 G-CSF 为粒系造血正调控因子,可以推测 TNF- $\beta$  为粒系造血负调控因子。

综上所述,本研究发现,黄芪不同有效部位配伍通过调控 GM-CSF, G-CSF, TNF- $\beta$  等造血正、负调控因子促进骨髓抑制模型小鼠粒系的造血机能。其中黄芪多糖与皂苷、黄酮配伍促进粒系造血效果较优。其进一步的作用机制还有待于下一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 凌一揆. 中药学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1984:212.
- [2] 许小娟. 黄芪联合利血生治疗恶性肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效观察[J]. 吉林中医药, 2003, 23(5):38.
- [3] 陈国辉, 黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17):1482.
- [4] 赵美蓉, 周洁. 黄芪多糖对恶性肿瘤化疗后骨髓抑制的影响[J]. 天津中医药, 2007, 24(2):114.
- [5] 蒋永培, 王胜春, 赵慧萍, 等. 黄芪甲苷对<sup>60</sup>Co 辐射小鼠外周血细胞和骨髓三系细胞的影响[J]. 解放军药理学学报, 1999, 15(3):536.
- [6] Kimura T, Sakabe H, Tanimukai S H, et al. Simultaneous activation of signals through gp130, c-kit, and interleukin-3 receptor promotes a trilineage blood cell production in the absence of terminally acting lineage-specific factors[J]. Blood, 1997, 90(12):4767.
- [7] 侯平, 张洪峰, 肖卫国. TNF- $\alpha$  对树突状细胞的诱导作用及其对红系造血的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(10):747.
- [8] 韩京, 冉新泽, 粟永萍, 等. 辐射损伤对巨核细胞造血调控因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8):1817.
- [9] 来茂德. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999:151

[责任编辑 聂淑琴]