

圣愈汤对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期和凋亡的影响

赵菊花¹, 祝彼得¹, 黄茜¹, 王培², 祁国海²

(1. 成都中医药大学, 成都 610072; 2. 四川省肿瘤医院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 观察圣愈汤对骨髓抑制小鼠外周血、骨髓细胞周期和凋亡的影响, 并探讨其造血调控的可能机制。方法: 将 60 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组、圣愈汤 32,16, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹ 3 个剂量组, 每组各 10 只, 除空白组外, 其他 5 组用⁶⁰Co γ 照射和 ip 注射环磷酰胺、氯霉素制备骨髓抑制小鼠模型。造模完成 24 h 后, 空白组和模型组小鼠 ig 生理盐水, 圣愈汤三剂量组分别按含生药 32,16, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig 给药, 给药体积 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹; 阳性组 ip rhG-CSF 125 μ g·kg⁻¹·d⁻¹, 各组均连续给药 7 d。用全自动血细胞分析仪、白细胞计数法、流式细胞术 (FCM) 分别检测圣愈汤对骨髓抑制小鼠外周血、骨髓有核细胞数、骨髓细胞周期和凋亡率的影响。结果: 圣愈汤 32,16 g·kg⁻¹·d⁻¹ 均能明显升高外周血白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (Hb)、血小板 (PLT) 和骨髓有核细胞 (BMC) 数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组、圣愈汤 32,16 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组 G₀/G₁ 期细胞比例分别为 (70.38 \pm 1.38)%, (62.43 \pm 2.03)%, (63.85 \pm 2.90)% ; S 期比例分别为 (22.52 \pm 1.27)%, (26.35 \pm 2.52)%, (24.80 \pm 1.48)% ; G₂/M 期细胞比例 (7.43 \pm 1.04)%, (11.37 \pm 2.18)%, (10.95 \pm 2.35)% ; PI 分别为 (29.85 \pm 1.06)%, (37.66 \pm 2.01)%, (35.88 \pm 3.13)% ; 凋亡率分别为 (26.88 \pm 3.58)%, (19.15 \pm 4.30)%, (21.65 \pm 4.34)%。圣愈汤 32,16 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组与模型组比, 上述指标有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 圣愈汤能改善骨髓抑制小鼠的造血机能, 其机制之一可能是通过促进骨髓造血细胞进入细胞增殖周期和抑制其凋亡。

[关键词] 圣愈汤; 骨髓抑制小鼠; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0199-04

Effects of Sheng-Yu Decoction on Bone Marrow, Cell Cycle and Apoptosis of Myelosuppressed Mice

ZHAO Ju-hua¹, ZHU Bi-de¹, HUANG Qian¹, WANG Pei², QI Guo-hai²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;

2. Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Sheng-Yu decoction on peripheral blood cells, bone marrow cell cycle and apoptosis in myelosuppressed mice and to explore its possible mechanism in hematopoietic regulation.

Method: The 60 BALB / c mice were randomly divided into blank group, model group, positive medicine group, Sheng-Yu decoction, three dose groups (32,16, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 mice in each group. Except the blank group. The other 5 groups were established the model of myelosuppression by irradiated⁶⁰Co γ and injection of cyclophosphamide and chloramphenicol. After 24 h of the completion of modeling, blank group and model group were ig normal saline, three doses of Sheng-Yu decoction groups were respectively ig corresponding crude drug 32, 16, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹, with drug volume 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹; and the positive control group were injected with rhG-CSF 125 μ g·kg⁻¹·d⁻¹. Each group was medicated for 7 days. The effect of Sheng-Yu decoction on peripheral blood cells, bone marrow nucleated cells (BMNCs) and bone marrow cell cycle and apoptosis in myelosuppressed mice was detected by automatic blood cell analyzer, white blood cell counting and flow cytometry (FCM) respectively.

Result: Peripheral white blood cells, red blood cells, hemoglobin, blood platelet and BMNCs were increased

[收稿日期] 20110110(011)

[第一作者] 赵菊花, 讲师/主治医师, 硕士, 博士, 从事中医药对血发生的调控研究, Tel:13408551478, E-mail:zhao.409@163.com

obviously by Sheng-Yu Granul, groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In model group, Sheng-Yu decoction ($32, 16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) dose groups, the proportion of G_0/G_1 phase cells were (70.38 ± 1.38)%, (62.43 ± 2.03)%, (63.85 ± 2.90)%; S phase fraction was (22.52 ± 1.27)%, (26.35 ± 2.52)%, (24.80 ± 1.48)%; G_2/M phase cells (7.43 ± 1.04)%, (11.37 ± 2.18)%, (10.95 ± 2.35)%; PI were (29.85 ± 1.06)%, (37.66 ± 2.01)%, (35.88 ± 3.13)%; apoptotic rates were (26.88 ± 3.58)%, (19.15 ± 4.30)%, (21.65 ± 4.34)% respectively. Compared with the model group, the above parameters of Sheng-Yu Granul, groups were significantly different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Sheng-Yu decoction could promote erythroid hematopoiesis by accelerating bone marrow cells of proliferation and differentiation, inhibiting the apoptosis of hemopoietic cells.

[**Key words**] Sheng-Yu decoction; myelosuppressed mice; bone marrow cell cycle; apoptosis

圣愈汤为补气益血之名方,源于清·吴谦《医宗金鉴·删补名医方论》,是在四物汤的基础上加补气药人参、黄芪,全方由熟地黄、白芍、当归、川芎、人参、黄芪组成,该方使用黄芪和人参,以补气固表;熟地黄、白芍滋阴补血;佐以当归、川芎补血活血,符合“气为血之帅,血为气之母”中医理论,全方共奏补益气血、活血止痛之效,且补而不滞,补而不滋,补血活血而不耗血,以达到“正气存内,邪不可干”的功效。有临床报道^[1]圣愈汤可降低化疗药物对病人造血功能的抑制作用,提高化疗完成率。本研究采用圣愈汤对放疗、化疗损伤引起骨髓抑制的小鼠模型进行干预,以观察圣愈汤的“补气生血”作用及其可能机制。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 纯系雄性小鼠 60 只,清洁级,8~12 周龄,体质量 18~22 g,四川大学华西实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(川)2009-09。

1.2 药物 圣愈汤生药饮片(熟地黄 20 g,白芍 15 g,当归 15 g,川芎 8 g,人参 20 g,生黄芪 18 g)购于杏林大药房,并由成都中医药大学药学院王光志副教授鉴定。煎剂由成都中医药大学制剂实验室熬制成浓度为含生药 $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浸膏,4℃ 保存备用。环磷酰胺(Cyclophosphamide):江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 10010621;氯霉素,美国 Sigma 公司;重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF):厦门特宝生物工程有限公司产品,批号 201002B04。

1.3 试剂 碘化丙啶(propidium iodide, PI):美国 Sigma 公司,广州展晨生物科技有限公司进口分装,批号 P4170。

1.4 仪器 全自动血球分析仪:HS-18 型全自动血细胞分析仪;流式细胞仪:ELITE ESP 型,美国

BECKMAN-COULTER 公司;GWGP80⁶⁰Co γ 机:由四川省肿瘤医院提供。

2 方法

2.1 动物模型的制备 骨髓抑制小鼠模型的制备按本实验室常规进行^[2]。具体方法如下:小鼠一次性全身 $2.0 \text{ Gy} \text{ }^{60}\text{Co} \gamma$ 射线照射后,第 4 日开始 ip 环磷酰胺 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和氯霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 3 d,完成模型制备。

2.2 动物分组及给药 将 60 只小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为空白组、模型组、阳性药组、圣愈汤低、中、高剂量组,每组各 10 只。除空白组外,其他 5 组参照 2.1 造模。造模完成 24 h 后开始给药,空白组和模型组小鼠 ig 生理盐水,体积 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;按中药药理学研究方法计算圣愈汤小鼠的等效剂量为含生药 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[3],圣愈汤高、中、低剂量组分别按含生药 32,16, 8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig 给药,给药体积 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;阳性组 ip rhG-CSF $125 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,各组均连续给药 7 d。

2.3 指标检测

2.3.1 外周血细胞计数 最后 1 次给药后 24 h,摘除小鼠眼球取抗凝血 1 mL,用 HS-18 型全自动血细胞分析仪进行血常规检测。

2.3.2 骨髓有核细胞悬液的制备^[4] 最后 1 次给药后 24 h,颈椎脱臼处死各组小鼠,取出股骨,用 6 号针头以 1 mL PBS 缓冲液冲出骨髓细胞,4 号针头过滤制成单个骨髓细胞悬液。取 20 μL 骨髓细胞悬液加 180 μL 红细胞裂解液混匀后,在显微镜下按白细胞计数法进行骨髓有核细胞(BMC)计数。余下的单个骨髓细胞悬液用于流式细胞仪检测。

2.3.3 骨髓有核细胞细胞周期的测定^[4] 将 2.3.2 制备的各组小鼠单个骨髓细胞悬液离心($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),弃上清,PBS 洗涤 2 次,去上清液,滴

入 70% 冷乙醇固定细胞,立即混匀,用封口膜封口,放置 4 ℃ 冰箱冷藏备用。测试时,取上述制备好的细胞样品, PBS 洗涤 2 次,以去除残留乙醇,加 100 μL PBS 后混匀,加碘化丙锭染液[PI 染液配制方法(100 mL):PI 5 mg, RNase 2 mg, Triton X-100 1%, 生理盐水 65 mL, 柠檬酸钠 100 mg,加重蒸水至 100 mL,调 pH 7.2 ~ 7.6,放入 4 ℃ 冰箱避光备用]。4 ℃,避光 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期的变化。结果以细胞周期各时相细胞百分率表示,并按以下公式计算细胞增殖指数(proliferation index, PI)。

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

2.3.4 细胞凋亡率的测定 取上述制备好的骨髓单核细胞悬液离心(1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),弃上清液, PBS 洗涤后, PI 染色上流式细胞仪进行分析,计算凋亡细胞率。

2.4 统计学方法 所得数据用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析及组间两两比较用 LSD, DUNCAN 法比较组间差

异。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般状况 整个实验过程中各组动物均无死亡。空白组:精神佳,活动自如,毛色光滑。造模后,小鼠皮毛干枯,无光泽;少动、行动迟缓;团缩拱背,个别小鼠体重明显减轻。给予 rhG-CSF 和圣愈汤干预后,小鼠上述体征均有所改善。

3.2 圣愈汤对外周血、骨髓有核细胞影响的比较 从表 1 结果可见,与空白组比较,模型组 WBC, RBC, Hb, PLT, BMC 数量均明显减少($P < 0.01$),表明小鼠经辐射和化疗药物复合造模后,外周血三系血细胞数和骨髓有核细胞数均减少,出现骨髓抑制;与模型组比较,各实验用药组 WBC, RBC, Hb, PLT, BMC 数量均升高,其中 rhG-CSF125 $\times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、圣愈汤 32, 16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 效果明显,有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示圣愈汤对骨髓抑制小鼠造血的恢复作用需达到一定剂量才能表现出来,且达到一定剂量后呈剂量-效应饱和状态。

表 1 圣愈汤对骨髓抑制小鼠外周血及骨髓有核细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	WBC $/\times 10^9/\text{L}$	RBC $/\times 10^{12}/\text{L}$	Hb $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PLT $/\times 10^9/\text{L}$	BMC $/\times 10^6/\text{L}$
空白	-	4.99 \pm 0.48 ²⁾	8.21 \pm 0.68 ²⁾	164.93 \pm 5.27 ²⁾	618.43 \pm 56.88 ²⁾	13.79 \pm 2.27 ²⁾
模型	-	3.00 \pm 0.88	5.04 \pm 0.73	141.73 \pm 5.21	412.13 \pm 53.14	5.01 \pm 3.29
rhG-CSF	125 $\times 10^{-6}$	4.7 \pm 0.47 ²⁾	6.88 \pm 0.51 ²⁾	154.90 \pm 4.48 ¹⁾	506.25 \pm 51.24 ¹⁾	12.41 \pm 2.72 ²⁾
圣愈汤	32	4.59 \pm 0.68 ²⁾	8.26 \pm 0.41 ²⁾	160.30 \pm 5.53 ²⁾	537.65 \pm 65.98 ²⁾	12.73 \pm 3.11 ²⁾
	16	4.24 \pm 0.64 ¹⁾	6.98 \pm 0.84 ²⁾	158.13 \pm 7.36 ²⁾	498.78 \pm 68.19 ¹⁾	11.16 \pm 2.64 ²⁾
	8	4.03 \pm 0.72	6.13 \pm 0.92	150.46 \pm 6.44	479.98 \pm 60.13	8.37 \pm 2.35

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 圣愈汤对骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞周期和凋亡率的影响 由表 2 结果可见,各组骨髓细胞以 G_0/G_1 期细胞为主,与空白组比较,模型组 G_0/G_1 , S 期细胞比例,凋亡率增加, G_2/M 期细胞比例和 PI 指数下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,各给

药组 G_0/G_1 细胞比例和凋亡率均下降, S 期细胞, G_2/M 期细胞比例和 PI 指数均增高,其中 rhG-CSF125 $\times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,圣愈汤 32, 16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组效果明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 圣愈汤对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$G_0/G_1/\%$	S/ $\%$	$G_2/M/\%$	PI	凋亡率/ $\%$
空白	-	65.86 \pm 2.60 ¹⁾	21.28 \pm 2.09	14.10 \pm 1.51 ²⁾	35.29 \pm 2.72 ²⁾	2.58 \pm 1.59
模型	-	70.38 \pm 1.38,	22.52 \pm 1.27	7.43 \pm 1.04,	29.85 \pm 1.06,	26.88 \pm 3.58
rhG-CSF	125 $\times 10^{-6}$	60.58 \pm 3.71 ²⁾	27.60 \pm 1.46 ²⁾	13.48 \pm 1.46 ²⁾	40.44 \pm 1.62 ²⁾	20.87 \pm 2.60 ²⁾
圣愈汤	32	62.43 \pm 2.03 ¹⁾	26.35 \pm 2.52 ²⁾	11.37 \pm 2.18 ¹⁾	37.66 \pm 2.01 ²⁾	19.15 \pm 4.30 ²⁾
	16	63.85 \pm 2.90 ¹⁾	24.80 \pm 1.48 ¹⁾	10.95 \pm 2.35 ¹⁾	35.88 \pm 3.13 ¹⁾	21.65 \pm 4.34 ¹⁾
	8	67.31 \pm 2.39	23.12 \pm 1.04	9.68 \pm 1.52 ¹⁾	32.68 \pm 2.24	24.13 \pm 4.04

4 讨论

目前,恶性肿瘤的治疗常采用放、化疗,在放化疗后出现的骨髓抑制而所引起的血细胞减少症,临床多用重组粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、促红细胞生成素(EPO)治疗,虽然疗效确切,但作用时间短且价格昂贵,亦有发热、骨痛等副反应^[4]。故在丰富的中医药宝库中寻找有效、价廉和安全的替代和/或补充药物显得尤为重要。祖国传统医学认为“损者益之,虚者补之”,故放、化疗所致骨髓抑制的基本治疗原则是以“扶正”为主^[5]。而圣愈汤为补气益血之名方,全方共奏补益气血的功效,在临床各科中广泛用于治疗各种气血亏虚证和肿瘤病人化疗后的骨髓抑制,有降低化疗药物对病人造血功能的抑制作用,提高化疗完成率,有利于化学药物效能的发挥^[1]。现代药理研究证实,圣愈汤可提高巨噬细胞吞噬功能、增强小鼠免疫功能与抗氧化能力的作用^[6-7]。圣愈汤及各拆方组都能明显提高血虚小鼠血中 IL-6 水平和 GM-CSF,从而发挥“生血补血”作用^[8]。

骨髓细胞周期是反映造血系统造血功能的重要指标之一,其细胞周期各个时相的分布情况和凋亡细胞的比例反映骨髓细胞受损和恢复的程度。目前认为,机体受到辐射等外界刺激后,会发生保护性反应,出现 G₁ 期阻滞、G₂ 期阻滞或 S 期的延迟,使受损 DNA 有充足时间来进行修复,损伤严重者通过 G₁ 期的永久性阻滞或发生凋亡而清除有损伤 DNA 的细胞,从而降低基因组的不稳定性^[9]。因此,解除骨髓细胞 G₁ 期阻滞,使 G₁ 期细胞进入 S 期, S 期细胞向 G₂/M 期细胞转化是拮抗放、化疗药物造成骨髓抑制的一个重要机制^[10-11]。

本实验结果显示模型组与空白组比较,外周血和骨髓有核细胞数均明显降低,说明造模成功;其骨髓有核细胞 G₀/G₁ 期、S 期细胞比例升高, G₂/M 期细胞比例下降,细胞凋亡率亦显著升高,提示放化疗不仅引起骨髓有核细胞 G₁ 期阻滞,还造成 S 期阻滞,并可通过促进细胞凋亡而导致骨髓抑制。给予圣愈汤不同剂量后,各用药组与模型组比较,圣愈汤各剂量组对外周血白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板和骨髓有核细胞数均有不同程度地升高,其骨髓

有核细胞 G₀/G₁ 期细胞比例降低, S 期、G₂/M 期细胞比例升高,细胞增殖指数升高,凋亡率下降,以圣愈汤 32, 16 g·kg⁻¹ 剂量组作用显著。实验结果提示,一定剂量的圣愈汤具有促使骨髓抑制小鼠骨髓细胞解除 G₀/G₁ 期阻滞、加速 G₀/G₁ 期细胞向 S 期细胞以及 S 期细胞向 G₂/M 期细胞转化,从而促进骨髓细胞增殖的作用,使受抑制的骨髓得到修复,同时抑制细胞凋亡,恢复其造血功能,使外周血中各系血细胞和骨髓有核细胞数增多。我们推测圣愈汤可能通过解除骨髓有核细胞周期的阻滞和抑制其凋亡而使受到抑制的骨髓造血功能得以恢复。

[参考文献]

- [1] 章凤杰. 圣愈汤治疗中晚期胃癌化疗毒副反应的临床观察[J]. 长春中医学院学报, 1997, 13(61): 18.
- [2] 陈志伟, 祝彼得, 严苏纯, 等. 骨髓抑制小鼠模型的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5): 260.
- [3] 吕艳, 冯雪梅, 黄芪注射液对贫血小鼠骨髓有核细胞表达抗凋亡蛋白的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(5): 30.
- [4] 郑轶峰, 姜建青, 张力华, 等. 右归丸对骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期和凋亡的影响[J]. 西南军医, 2009, 11(3): 395.
- [5] 石娅萍, 祝彼得, 黄茜, 等. 十全大补汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠外周血及促红细胞生成素的影响[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(15): 1221.
- [6] 马湘云, 刘方洲, 郭岳峰, 等. 免疫指标的影响[J]. 中医研究, 1992, 5(1): 24.
- [7] 方玉珍, 谢达莎, 隋艳华, 等. 圣愈汤免疫与抗氧化作用研究[J]. 中成药, 2002, 24(12): 950.
- [8] 王均宁. 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): 477.
- [9] 马淑梅, 付士波, 鞠桂芝. 电离辐射对小鼠骨髓造血细胞周期进程的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, 18(2): 104.
- [10] Sherr C J. Cancer cell cycles[J]. Science, 1996, 274(5293): 1672.
- [11] Sherr C J. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited[J]. Cancer Res, 2001, 60(14): 3689.

[责任编辑 聂淑琴]