

六味地黄汤、补中益气汤、复方丹参饮 对骨髓抑制小鼠保护的作用机制

李恩庆¹, 赵安斌¹, 曹克俭^{2*}, 陈孝银¹, 戴汉源¹, 吴先林¹

(1. 暨南大学医学院, 广州 510632; 2. 香港大学中医药学院, 香港 999077)

[摘要] 目的: 进一步研究补肾阴、补气、活血中药方对骨髓抑制小鼠保护的作用机制。方法: 使用实时荧光定量 RT-PCR 检测小鼠脾脏促血小板生成素(thrombopoietin, TPO) mRNA、促血小板生成素受体(c-Mpl) mRNA 及转录因子 GATA-1 mRNA 表达水平。结果: 六味地黄汤、补中益气汤均能明显升高骨髓抑制小鼠 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 的表达。复方丹参饮对小鼠脾脏 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 表达影响不明显。结论: 六味地黄汤、补中益气汤均能通过升高骨髓抑制小鼠 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 的表达水平从而促进骨髓抑制小鼠的外周血恢复。

[关键词] 六味地黄汤; 补中益气汤; 复方丹参饮; 骨髓抑制; 促血小板生成素 mRNA; 促血小板生成素受体 mRNA; 转录因子 GATA-1 mRNA

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0153-04

Effects of Liuwei Dihuang Decoction, Buzhong Yiqi Decoction and Compound Danshen Decoction on the Marrow-suppressed Mice

LI En-qing¹, ZHAO An-bin¹, CAO Ke-jian^{2*}, CHEN Xiao-yin¹, DAI Han-yuan¹, WU Xian-lin¹

(1. Medical school of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. The University of HONG KONG, School of Chinese Medicine, Hong Kong 999077, China)

[Abstract] **Aim:** To study the protective therapeutic actions and mechanism of Liuwei Dihuang Decoction, Buzhong Yiqi Decoction and Compound Danshen Decoction on the marrow-suppressed mice. **Method:** The expression of thrombopoietin (TPO) mRNA, thrombopoietin receptor (c-Mpl) mRNA and GATA-1 mRNA was detected by RT-PCR technique. **Result:** Liuwei Dihuang Decoction and Buzhong Yiqi Decoction were shown to promote the expression of TPO mRNA, c-Mpl mRNA and GATA-1 mRNA in spleen of mice. The result indicates the decoctions could accelerate the marrow cells of the marrow-suppressed mice. Although Compound Danshen Decoction did not show significant promotion for the expression of TPO mRNA, c-Mpl mRNA and GATA-1 mRNA in spleen of mice, but it also could accelerate peripheral blood cells of the marrow-suppressed mice. **Conclusion:** Peripheral blood cells of marrow-suppressed mice were increased significantly by Liuwei Dihuang Decoction, Buzhong Yiqi Decoction and Compound Danshen Decoction.

[Key words] Liuwei Dihuang Decoction; Buzhong Yiqi Decoction; Compound Danshen Decoction; marrow suppress; TPO mRNA; c-Mpl mRNA; GATA-1 mRNA

目前, 对于全身性癌症(如白血病、骨髓瘤、淋巴

瘤等)和临床及亚临床转移性癌症或局部晚期癌症, 化学治疗常常是唯一可选择的有效治疗手段。但由于化疗药物对正常组织细胞与肿瘤细胞的破坏性, 故而化疗会导致机体一系列毒副反应, 从而影响化疗如期进行和足够化疗的使用。其中, 以骨髓抑

[收稿日期] 2010-01-18(001)

[基金项目] 庞鼎元中西医学教研基金资助

[通讯作者] * 曹克俭, Tel: (852) 31693170, Fax: (852) 3152 2139, E-mail: kejiancao@hku.com

制较为常见,故骨髓抑制往往是化疗被动减量或停药的最常见原因,是肿瘤治疗中的较大障碍。因此,如何预防和减轻化疗对骨髓抑制,促进骨髓造血功能恢复,已成为保证化疗顺利完成,提高临床疗效的关键问题。

1 材料

1.1 动物 NH 雄性小鼠,体重 20 ~25 g,由广东省实验动物中心提供。实验动物生产许可证号 SCXK(粤)2008-0145,实验动物质量合格证号码 0037530。

1.2 药物 六味地黄汤组:熟地黄,山萸肉,山药,泽泻,茯苓,丹皮以 8 4 4 3 3 3 的比例称取药材(中华人民共和国药典 2005 版)。

补中益气汤组:炙黄芪,炙甘草,党参,白术,当归,升麻,柴胡,陈皮以 10 5 3 3 3 3 3 3 的比例称取药材。

复方丹参饮:丹参,檀香,砂仁,红花以 10 3 3 3 按比例称取药材。以上方剂分别以 10 倍量水,煎煮 1.5 h,滤出药液后以 6 倍量水煎煮 1 h,合并两次药液,过滤,浓缩,六味地黄丸浓缩到 0.54 g · mL⁻¹,补中益气汤浓缩至 0.48 g · mL⁻¹,复方丹参饮浓缩至 0.36 g · mL⁻¹,4 ℃ 冰箱保存。

1.3 试剂与仪器 流式细胞仪, FACScan 型,美国 Becton DICKINSON 公司制造。Sysmex 全自动血液分析仪,日本东亚公司。CD34 FITC,为异氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠 CD34 单克隆抗体,美国 Biologend 公司产品。IgG1 FITC: CD34 FITC 的同型对照。CD45 PE:为藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 CD45 单克隆抗体,美国 Biologend 公司产品。PI:碘化丙锭,美国 Sigma 公司产品。溶血素:日本希森美康公司产品。血球稀释液:日本希森美康公司产品。环磷酰胺(Cyclophosphamide, CY),由江苏恒瑞制药公司生产,生产批号 08062621。Trizol 购自 invitrogen 生物技术科技公司, RNA 逆转录试剂盒购自上海贝博生物技术公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 genecopoeia 生物技术公司。

2 方法

2.1 分组及给药方法 将 125 只小鼠完全随机分为 5 组,分别是正常对照组,模型对照组,六味地黄汤组,补中益气汤组,复方丹参饮组,每组各 25 只(为防止各组小鼠死亡样本缺失,每组 25 只)。按人与小鼠之剂量换算后^[1],以 0.2 mL · 10 g⁻¹的剂量给实验组小鼠 ig,模型对照组 ig 等量蒸馏水,ig 由实

验第 1 天开始至第 28 d 结束。

2.2 骨髓抑制模型造模方法 除正常组外,其余实验各组于第 9, 11, 13 d 经腹腔注射环磷酰胺按 100 mg · kg⁻¹剂量给药。

2.3 脾脏总 RNA 的提取 脱颈椎处死小鼠后取脾脏,采用 Trizol 按试剂盒说明提取 RNA,经紫外分光光度计检测 RNA 纯度和浓度,经电泳法检测其完整性。

2.4 逆转录 逆转录反应体系 取总 RNA 5 μL, Oligo(dT) 1 μL 在 70 ℃ 变性 5 min 后,依次加入逆转录缓冲液 8 μL, 25 Mm dNTPs 0.4 μL, 40 U/μL RNA 酶抑制剂 0.3 μL, 200 U/μL MMLV 逆转录酶 0.5 μL, DEPC 水 24.8 μL, 总反应体系 40 μL。反应条件: 40 ℃ 60 min, 95 ℃ 3 min。

1.2.5 聚合酶链反应引物序列:引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

目的基因	引物序列 (5'-3')	产物长度
TPO	F: CCAGACGGAACAGAGCAAG R: CTGTCCTCGTGCTGCCAT	82 bp
c-Mpl	F: CCTGCACTGGAGGGAGGTCT R: GGCTCCAGCACCTTCCAGTC	135 bp
GATA-1	F: GGAGGGACAGGACAGGTCCT R: GTTTGCTGACAATCATTCGCTT	110 bp
-actin	F: CCAGCCTTCCTTCTTGGGAT R: CATAGAGGTCTTTACGGATGTCAAC	97 bp

反应体系: 2 × Allinone™ Q-PCR MIX 10 μL, ddH₂O 1 μL, Forward Primer(4 μmol · L⁻¹) 2 μL, Reverse Primer(4 μmol · L⁻¹) 2 μL, Template cDNA 5 μL。Total: 20 μL。

反应条件: 预变性: 94 ℃, 5 min; 变性: 94 ℃, 15 s; 退火: 60 ℃, 30 s; 延伸: 72 ℃, 30 s。共 40 个循环。

2.5 统计学处理 所有数据用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间参数的比较采用完全随机设计的单因素方差分析的统计学方法进行统计。

3 结果

3.1 对小鼠外周血的影响 实验第 14 d 和第 28 d 各组小鼠外周血细胞计数见表 1 和表 2。与正常组相比,模型对照组 RBC, WBC, PLT, HGB 均明显降低,差异有统计学意义,表明骨髓抑制模型造模成功。实验第 14 天补中益气组、六味地黄组、复方丹

参组与模型对照组相比, 白细胞与血小板显著升高, 差异有统计学意义, 红细胞及血红蛋白无显著差别。实验第 28 天补中益气组、六味地黄组、复方丹参组

与模型对照组相比, 白细胞, 血小板, 血红蛋白等较模型对照组显著升高, 差异显著。

表 1 中药汤剂对实验第 14 天各组小鼠外周血的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	WBC $/10^9 \cdot L^{-1}$	RBC $/10^{12} \cdot L^{-1}$	HGB $/g \cdot L^{-1}$	PLT $/10^9 \cdot L^{-1}$
正常对照	—	9	1.74 ± 1.34	8.75 ± 0.90	140.44 ± 9.84	1 135.90 ± 222.04
模型对照	—	10	0.53 ± 0.67 ²⁾	7.73 ± 0.92 ¹⁾	126.80 ± 12.80 ¹⁾	881.60 ± 255.62 ¹⁾
补中益气	10.8	10	1.20 ± 1.74 ⁴⁾	7.83 ± 0.71 ¹⁾	129.80 ± 10.24 ¹⁾	985.90 ± 226.31 ³⁾
六味地黄	9.6	10	1.14 ± 1.55 ⁴⁾	7.85 ± 0.79	129.20 ± 9.84 ¹⁾	959.50 ± 215.30 ³⁾
复方丹参	7.2	10	0.90 ± 1.20 ³⁾	8.02 ± 0.82	132.20 ± 10.29 ¹⁾	1 128.11 ± 234.06 ⁴⁾

注: 与正常对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 中药汤剂对实验第 28 天各组小鼠外周血的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	WBC $/10^9 \cdot L^{-1}$	RBC $/10^{12} \cdot L^{-1}$	HGB $/g \cdot L^{-1}$	PLT $/10^9 \cdot L^{-1}$
正常对照	—	2.49 ± 0.52	10.20 ± 0.62	159.10 ± 7.81	1 121.50 ± 205.86
模型对照	—	1.78 ± 0.44 ¹⁾	8.79 ± 0.96 ²⁾	140.90 ± 13.73 ²⁾	859.22 ± 187.38 ²⁾
补中益气	10.8	4.01 ± 2.11 ³⁾	9.49 ± 0.58 ³⁾	151.40 ± 8.44 ³⁾	1 174.60 ± 238.12 ³⁾
六味地黄	9.6	4.83 ± 2.72 ⁴⁾	9.47 ± 2.06 ³⁾	153.78 ± 12.00 ³⁾	1 278.10 ± 362.40 ³⁾
复方丹参	7.2	6.24 ± 2.76 ⁴⁾	9.95 ± 0.43 ³⁾	156.30 ± 7.35 ⁴⁾	1 106.78 ± 155.06 ³⁾

3.2 对骨髓抑制小鼠脾脏 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 表达水平的影响 实验第 14 d 与正常对照组相比, 模型组 TPO mRNA 与 GATA-1 mRNA 的表达水平差异显著, 模型组 c-Mpl mRNA 与正常组相比无明显差别。与模型对照组相比, 六味地黄汤和补中益气汤 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 表达水平

均有明显升高, 差异显著。实验第 28 d, 与模型对照组相比, 六味地黄汤组与补中益气汤组 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 表达水平均升高, 差异显著; 复方丹参饮组 TPO, c-Mpl 及 GATA-1 mRNA 表达水平与模型组相比差异不显著。

表 3 中药汤剂对实验第 14 d 各组小鼠 TPO, c-Mpl, GATA-1 mRNA 表达水平的影响($n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	TPO mRNA	c-Mpl mRNA	GATA-1 mRNA
正常对照	—	1.899 ± 0.505	0.900 ± 0.312	1.628 ± 0.361
模型对照	—	0.465 ± 0.383 ²⁾	0.842 ± 0.363	0.499 ± 0.480 ¹⁾
补中益气	10.8	2.583 ± 1.028 ⁴⁾	3.192 ± 1.328 ^{1, 3)}	3.684 ± 2.000 ^{1, 4)}
六味地黄	9.6	3.869 ± 1.552 ⁴⁾	1.952 ± 0.499 ^{2, 4)}	2.340 ± 0.979 ³⁾
复方丹参	7.2	1.259 ± 1.081	1.207 ± 0.891	1.532 ± 1.410

表 4 中药汤剂对实验第 28 天各组小鼠 TPO, c-Mpl, GATA-1 mRNA 表达水平的影响($n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	TPO mRNA	c-Mpl mRNA	GATA-1 mRNA
正常对照	—	2.089 ± 0.914	0.671 ± 0.277	1.340 ± 0.556
模型对照	—	0.454 ± 0.237 ¹⁾	0.465 ± 0.366	0.285 ± 0.158 ¹⁾
补中益气	10.8	3.146 ± 1.852 ³⁾	4.397 ± 1.488 ^{2, 4)}	5.141 ± 1.577 ^{2, 4)}
六味地黄	9.6	7.056 ± 1.611 ^{2, 4)}	2.645 ± 1.393 ^{1, 3)}	2.842 ± 1.617 ³⁾
复方丹参	7.2	0.842 ± 0.324	1.010 ± 0.490	1.034 ± 0.526

4 讨论

临床过程中, 化疗后骨髓抑制多表现为神疲乏力, 少气懒言, 自汗或盗汗, 面色少华, 头晕目眩, 腰

膝酸软, 双足痿弱等症状, 多数医家都将它归属“虚劳”、“血虚”、“内伤发热”等范畴。中医认为, 化疗药物多属热毒之邪, 可耗气伤阴, 损伤机体津液, 同

时还损害脾胃运化之功及肝肾的功能,尤以肾精受损、脾胃功能失调最为严重,而且化疗过程中还往往存在血瘀的病理状态。肾虚则精髓不足,精不足则血衰;气虚则血无以生;血液运行不畅,以致脉络瘀阻,新血不生,而补肾,活血,化瘀中药对肾精不足、血液生化乏源,瘀血阻滞新血不生引起血虚的恢复促进作用为长期的临床实践所证明。本实验的前期试验已经证明,六味地黄汤、补中益气汤以及复方丹参饮能明显升高化疗后骨髓抑制小鼠外周血数目,六味地黄汤、补中益气汤能显著促进骨髓造血干细胞的增殖并能促进造血干细胞由 G0/G1 期细胞向 S 期细胞转化并能显著促进促红细胞生成素 mRNA (Epo mRNA)、促红细胞生成素受体 mRNA (Epor mRNA) 与抗凋亡蛋白 mRNA (Bcl-x(L) mRNA) 的表达水平,本实验进一步研究六味地黄汤、补中益气汤以及复方丹参饮能够保护骨髓抑制小鼠的机制。

近年来研究发现,促血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 作为血小板生成最主要的调节因子,也是造血干细胞 (HSC)、单核细胞、粒细胞、肥大细胞和树突细胞等发育所需的一个重要的细胞因子^[2,3],它的生物学效应由其受体 (c-Mpl) 介导。CD34 + 早期造血祖细胞表达 c-Mpl 受体, TPO 或 c-Mpl 基因敲除动物模型的 HSC 数量明显减少。体内和体外研究均表明, TPO 可以广泛扩增干细胞数量,加速干细胞进入细胞周期,刺激造血干细胞的存活和增殖。本实验研究发现,六味地黄汤、补中益气汤可以显著提升化疗后骨髓抑制小鼠的 TPO mRNA 与 c-Mpl mRNA 的表达水平,进一步推测六味地黄汤与补中益气汤能够提高化疗后骨髓抑制小鼠的外周血细胞数目可能与此相关。

GATA-1 是造血系统特有的转录因子,为正常红细胞发育和成熟所必需的转录因子。现已知 GATA-1 的表达严格限制于造血细胞系,包括红系祖细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜曙红细胞等^[4]。在定向红系造血过程中, Epo 可以诱导转录因子 GATA-1 和 EpoR 表达^[5]。本实验研究发现,六味地黄汤、补中益气汤可以显著提升化疗后骨髓抑制小鼠的 GATA-1 mRNA 的表达水平。

GATA-1、EpoR 和 Bcl-x(L) 具有极强的相关性,三者能够相互协同,共同促进化疗后骨髓抑制小鼠的造血功能的恢复。Kapur R 等^[6]的研究发现,在缺乏 GATA-1 的情况下, c-kit 可通过调节 Bcl-2 的

表达维持红系祖细胞的存活与增殖;同时,他们还发现干细胞因子 (SCF) 与配体 c-kit 的结合,使 EpoR 和 STAT-5 的表达上调,而后者使 Bcl-x(L) 的表达增强,并促进红系祖细胞在 Epo 刺激下的存活。在只有 Epo 存在的情况下, GATA-1 功能的恢复可上调 EpoR 和 Bcl-x(L) 的表达,能增强红系祖细胞的存活并促进终末分化。其机制可能为: Epo 首先诱导 GATA-1 和 EpoR 的表达^[7], GATA-1 进一步上调 EpoR 和 GATA-1 基因自身的表达^[6,8],然后通过 EpoR-STAT5-Bcl-x(L) 途径使抗凋亡蛋白 Bcl-x(L) 的表达增强^[5],从而使红系祖细胞获得最佳的存活、增殖和分化。另外有研究表明, TPO 也可通过 JAK/STAT5、P132K 等信号途径诱导抗凋亡蛋白 Bcl-x(L) 的表达支持造血细胞的存活^[9],但是否与诱导 GATA-1 的表达有关,或是与 TPO 受体有关尚无明确的实验证据。本实验的前期试验也研究表明,六味地黄汤与补中益气汤能够显著提升化疗后骨髓抑制小鼠的 Epo、EpoR 和 Bcl-x(L) 的表达水平。

综上所述,六味地黄汤与补中益气汤能够促进骨髓抑制后小鼠外周血恢复的机制可能是六味地黄汤与补中益气汤通过促进 EPO 与 TPO 的表达,从而使 GATA-1 和 EpoR 的表达上调, GATA-1 进一步上调 EpoR 和 GATA-1 基因自身的表达,同时促进抗凋亡蛋白 Bcl-x(L) 的表达增强,从而使外周血各系细胞获得最佳的存活、增殖和分化。活血化瘀药物复方丹参饮能够促进化疗后骨髓抑制小鼠的外周血恢复的机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬等. 药理试验中动物间和动物与人体键的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004;9(9):1069.
- [2] Kirshenbaum AS, Akin C, Goff JP, et al. Thrombopoietin alone or in the presence of stem cell factor supports the growth of KIT (CD117) (low) /MPL (CD110) (+) human mast cells from hematopoietic progenitor cells[J]. Exp Hematol, 2005; 33 (4): 413.
- [3] Chen W, Antonenko S, Sederstrom J M, et al. Thrombopoietin cooperates with FLT3-1 ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors[J]. Blood, 2004; 103 (7): 2547.