

白芍在四物汤中的反佐作用

高 月, 刘永学, 马增春, 路晓钦, 陈 鹏, 谭洪玲, 肖成荣
(军事医学科学院放射医学研究所药理毒理研究室, 北京 100850)

摘要:目的: 观察白芍在四物汤中的反佐作用。方法: 3.5Gy 或 5.5Gy ⁶⁰Co γ 射线照射致小鼠血虚证模型, 观察四物汤及单药对 NFS-60 细胞增殖、诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞的调节、外周血白细胞及造血干祖细胞的影响。结果: 白芍在对 NFS-60 细胞增殖和诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞的调节方面, 制约君药和全方的主要功能; 对外周血白细胞的生长起抑制作用; 对小鼠骨髓中的 CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-mix、CFU-meg 均无明显影响。结论: 在所观察的指标中, 白芍属反佐之品。

关键词: 四物汤; 白芍; 反佐作用

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0026-04

Incompatible Effects of BAISHAO in SIWU Decoction

GAO Yue, LIU Yong-xue, MA Zheng-chun, LU Xiao-qin, CHENG Peng, TAN Hong-ling, XIAO Cheng-rong
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective: To investigate the incompatible effects of BAISHAO in SIWU decoction. Method: The changes of NFS-60 and NIH-3T3 cells, peripheral white blood cells and CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-mix、CFU-meg were systematically investigated in vitro and in vivo by using blood deficiency model induced by irradiation. Result: BAISHAO decreased the proliferation of NFS-60 cells and white blood cells and have no effect on CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-mix、CFU-meg while the SIWU and other three ingredients increased the numbers of progenitor cells sharply. Conclusion: BAISHAO is a incompatible drug in SIWU decoction.

Key words: SIWU decoction; BAISHAO; Incompatible effect

受国家自然科学基金“中医血虚证模型的分子基础研究(39770887)”和“四物汤组成原理的基础研究(30070913)”等项目资助, 我们利用 γ 射线和环磷酸腺苷制作了小鼠血虚证模型, 并对其发生发展机制进行了系统的研究^[1-2], 提出了放化损伤致血虚证动物与外周血各血液成份改变、骨髓造血干/祖细胞的动态变化、骨髓和脾细胞凋亡、CD34⁺ 细胞的改

变细胞周期和造血相关基因的表达等密切相关^[3-5]。通过 16 个不同配伍组方的拆方研究, 揭示了四物汤全方在拆方中的主导地位, 同时观察到佐药白芍在对 NFS-60 细胞增殖、诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞的影响、外周血白细胞及造血干祖细胞方面起反佐作用, 现分析报告如下:

1 实验材料

1.1 实验动物 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20 \pm 2g, 雌性; 由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI1640, Gibco BRL 公司;

收稿日期: 2003-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770887 30070913)

胎牛血清, 马血清, 北京军区兽医防治中心; G-CSF, 日本麒麟株氏会社; CO₂ 培养箱, Napco-5410; 酶标仪, WallacVicToR1420, 美国; 自动血球计数仪(日本 Sysmex-800); CO₂ 孵育箱; 倒置相差显微镜(AO 公司生产), γ 剂量辐射检测控制仪(军事医学科学院 QT-3 型优质 OCL)。

1.3 药物及制备 四物汤由熟地 *Radix rehmanniae*、当归 *Radix angelicae sinensis*、白芍 *Radix paeoniae alba*、川芎 *Rhizoma chuanxiong* 组成, 全部药物均购自北京同仁堂中药厂。按《太平惠民和剂局方》规定的剂量称取组成, 熟地 15g、当归 10g、白芍 10g、川芎 6g, 共计 41g, 经水煎、过滤、浓缩、配制成 100% 药液(即每 ml 药液含生药 1g); 其它拆方组均按相当于四物汤的量进行拆方分组, 按同样的方法制备成相当于四物汤浓度的药液, 置 4℃ 保存备用。细胞实验将过滤除菌的四物汤药液倍比稀释成不同浓度, 加入到细胞培养体系中。

1.4 细胞系 NIH3T3 细胞为小鼠胚胎期成纤维细胞(本院放射医学研究所实验病理研究室惠赠), 用含 8% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液按贴壁常规培养; NFS-60 细胞为 G-CSF 依赖的小鼠源性粒系白血病细胞株(本院放射医学研究所放射病治疗研究室惠赠), 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 加入 G-CSF 至终浓度为 10ng/ml, 隔天换液一次。

2 实验方法

2.1 动物分组 将小鼠按体重随机分组: 对照组、四物汤组、熟地组、当归组、白芍组和川芎组。小鼠按常规饲养 3d 以适应环境后, 采用⁶⁰钴 γ 射线全身一次照射, 照射剂量为 3.5 Gy, 剂量率为 1.31 Gy·min⁻¹, 照射时间为 2min 40 sec。另一批小鼠照射剂量为 5.5 Gy, 剂量率为 1.31 Gy·min⁻¹, 照射时间为 4min 12 sec。照后给药组连续灌胃 7d, 每天一次, 0.2ml/次(相当于四物汤 10g/kg), 对照组则给予等体积的生理盐水。

2.2 外周血象检测 各组动物(按体重及外周血象随机分组, 每组 10 只)分别于在制模前、制模后 1、3、5、7、9、11、13、17、21d, 每只实验小鼠尾静脉取血 20 μ l, 用 Sysmex-800 自动血球计数仪检测外周血象。

2.3 造血祖细胞培养 照射后连续给药 7d。第 7d, 各批次活杀 3 只小鼠, 无菌条件下取股骨, 用 RPMI 1640 培养液冲出骨髓细胞, 过 4 号针头制成单细胞悬液, 计数有核细胞, 并计算出接种细胞悬液量, 使其于培养体系中的有核细胞浓度为 1 × 10⁵/ml。

参照刘秀珍^[4]介绍的方法并稍加改动, 检测粒系(CFU-GM)、红系(CFU-E, BFU-E)、巨核系(CFU-meg)等祖细胞集落。

2.4 NFS-60 细胞生长曲线的测定 将指数生长期的 NFS-60 细胞用 RPMI1640 培养液洗涤三次, 血球计数仪计数细胞, 然后用含 5% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整 NFS-60 细胞浓度为 8 × 10⁸/ml, 每孔 50 μ l 加入 96 孔板中; G-CSF 因子以上述培养基 3 倍递减稀释后, 每孔加 50 μ l, 每组做 6 个复孔, 在 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中培养 2d, 培养终止前 4h 加入 MTT(5mg/ml) 20 μ l, 在 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中继续培养 4h 后弃上清, 加入 200 μ l DMSO, 振荡助溶, 在酶标仪上置 490nm 波长处测 OD 值。以造血因子浓度为横坐标, 以 OD 值为纵坐标绘制生长曲线。

2.5 四物汤及其拆方条件培养液的制备及对 NFS-60 细胞增殖影响的测定 计数指数生长期 NIH3T3 细胞, 加入四物汤并用培养液调整细胞终浓度为 5 × 10⁴/ml、药物终浓度分别为 32、16、8、4、2、1、0.5、0mg/ml, 置培养瓶中; 在 37℃ 5% CO₂, 孵育箱中培养 3d, 取上清备用; 将指数生长期的 NFS-60 细胞用 RPMI1640 培养液洗涤三次, 计数并用含 5% 胎牛血清的 RPMI1640 调整其浓度为 1 × 10⁶/ml; 在 96 孔平底板上每孔加 50 μ l 诱生上清、50 μ l NFS-60 细胞悬液, 每组设 12 个复孔, 按上法在 490nm 波长处测 OD 值。各拆方组药物以相当于四物汤为 4mg/ml 的浓度测定对 NFS-60 细胞增殖影响。

2.6 统计学处理 各组实验数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的差异显著性分析用 *t* 检验。

3 结果

3.1 四物汤及单药对 NFS-60 细胞增殖的影响 当药物浓度低于 2mg/ml 时, 各药对 NFS-60 细胞增殖作用与对照组相似, 当大于 2mg/ml 时, 四物汤、当归、川芎、地黄能以剂量依赖方式刺激 NFS-60 细胞增殖, 当药物达到一定浓度后, 对 NFS-60 细胞的刺激增殖作用不再增加, 其活性类似于 G-CSF 样的作用。白芍则对 NFS-60 细胞的增殖有抑制作用。

3.2 四物汤及其三味药组方诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞增殖的影响 成纤维细胞是造血诱导微环境(HIM)中重要的细胞成分, 与其他基质细胞一起协调造血, 构成造血细胞赖以生长、发育的内环境。成纤维细胞所产生的调控造血的细胞因子有 GM-CSF、G-CSF、EPO 等, 对造血干、祖细胞的分化发育起重要的调控作用, 其中 G-CSF 是一种重要的造

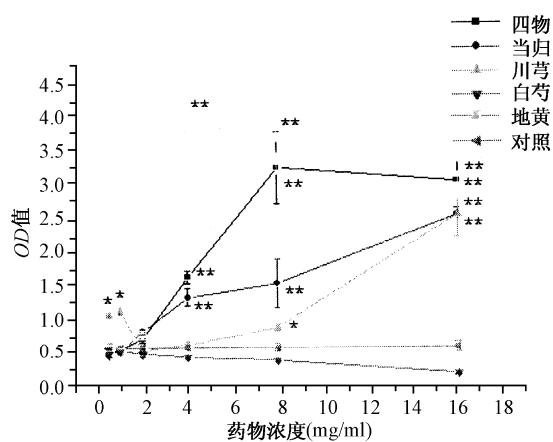


图 1 受试药物对 NFS-60 细胞增殖作用的曲线图
($\bar{x} \pm s$; $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$)

血生长因子。从图中结果表明,白芍在这种造血诱导微环境中又通过促进类 G-CSF 样因子的生成,达到对 NFS-60 细胞的调节作用。这从另一个角度说明白芍对全方和君药的反佐作用。

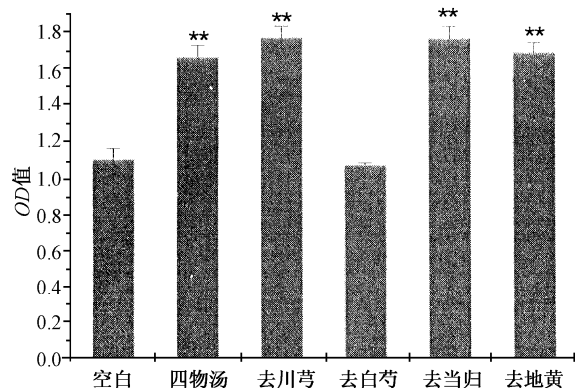


图 2 四物汤及其三味药组方诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s$; $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3.3 四物汤及其各单药对血虚证小鼠外周血象的影响 结果表明:四物汤、地黄、当归能升高 3.5Gy 受照小鼠外周血中的白细胞,白芍则有降低作用,四物汤及各单药对外周血中的红细胞、血红蛋白、血小板均无明显作用,四物汤、地黄、当归也能升高 5.5Gy 受照小鼠外周血中的白细胞,白芍则有降低作用,但作用不显著。四物汤及各单药对外周血中的红细胞、血红蛋白、血小板均无明显作用。

3.4 四物汤及各单药治疗给药对血虚证小鼠骨髓造血祖细胞集落的影响 结果表明:5.5Gy 照射给予四物汤及各单药治疗后,四物汤、地黄和川芎可增加小鼠骨髓中的 CFU-GM、BFU-E、CFU-E、CFU-mix、CFU-meg 的数量,当归亦可刺激小鼠骨髓中 CFU-GM、CFU-E 和 CFU-mix 的增殖,唯有白芍除对 CFU-E

有一定程度的刺激增生作用外,对小鼠骨髓中的 CFU-GM、BFU-E、CFU-miX、CFU-meg 均无明显影响。

表 1 四物汤及单药对 5.5 Gy 照射小鼠外周血白细胞数 ($\times 10^9/L$) 的影响($\bar{x} \pm s$; $s = 10$)

照后时间 (d)	模型组	四物汤组	地黄组	当归组	白芍组	川芎组
0	8.8 ± 1.5	8.9 ± 1.0	7.3 ± 1.6	9.2 ± 2.2	7.7 ± 1.1	7.5 ± 1.8
1	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.4 ± 0.1	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.3
3	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3
5	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.3
7	2.4 ± 0.8	1.9 ± 0.3	2.3 ± 0.8	2.7 ± 0.9	2.8 ± 1.7	2.6 ± 0.7
9	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.9	1.9 ± 0.7	2.2 ± 0.4
11	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.6	2.0 ± 0.1	2.7 ± 0.7	2.5 ± 0.9	3.3 ± 1.2
14	2.9 ± 0.9	2.4 ± 0.5	3.5 ± 1.0	2.9 ± 1.0	3.1 ± 0.8	3.7 ± 1.1
18	3.8 ± 1.3	3.9 ± 0.5	4.2 ± 2.1	4.2 ± 2.0	3.5 ± 1.3	3.8 ± 0.9
22	6.0 ± 1.4	8.9 ± 3.6	7.0 ± 1.2	6.8 ± 1.6	5.8 ± 0.9	6.2 ± 2.1
27	6.8 ± 1.9	10.4 ± 3.5	8.2 ± 1.6	7.4 ± 1.2	6.1 ± 1.4	7.7 ± 1.9

表 2 四物汤及单药对 3.5 Gy 照射小鼠外周血白细胞数 ($\times 10^9/L$) 的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

照后时间 (d)	模型组	四物组	地黄组	当归组	白芍组	川芎组
0	13.1 ± 2.2	12.1 ± 2.4	11.1 ± 2.3	11.3 ± 2.1	11.2 ± 2.9	11.3 ± 1.5
1	2.8 ± 1.5	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.5	2.6 ± 0.7	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.6
3	2.4 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.7	3.0 ± 0.8	2.6 ± 0.8	2.3 ± 0.3
5	3.9 ± 0.8	4.7 ± 1.7	3.5 ± 0.6	3.5 ± 0.9	2.7 ± 1.0*	3.1 ± 1.1
7	3.9 ± 1.0	5.7 ± 1.2*	5.1 ± 1.4*	4.9 ± 1.7	3.4 ± 1.0	3.7 ± 1.3
9	3.9 ± 1.9	3.6 ± 0.9	3.8 ± 1.2	4.2 ± 1.5	4.6 ± 0.9	3.8 ± 0.7
11	4.7 ± 0.7	4.1 ± 0.9	3.6 ± 0.8	5.8 ± 0.9	5.0 ± 1.7	3.7 ± 0.7
13	4.3 ± 1.1	4.7 ± 1.2	3.2 ± 0.7	4.0 ± 1.4	4.2 ± 0.8	3.7 ± 1.0
15	5.0 ± 0.7	5.8 ± 1.5	4.9 ± 1.5	6.3 ± 1.4*	4.5 ± 1.3	4.4 ± 1.0

注:与模型组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4 讨论

佐药通常有三种意义:一是治疗兼证或次要证候的药物;一是用于因主药有毒,或药性峻烈须加以制约者,即“因主药之偏而为监制之用”;一是用于因病势拒药须加以从治者,即“因病气之盛而为从治之用”,如于温热剂中加入少量寒凉药等。近年来,我们系统观察了四物汤及其折方对外周血各血液成份改变、骨髓造血干/祖细胞的动态变化、骨髓和脾细胞凋亡、CD34⁺ 细胞的改变、细胞周期和造血相关基因的表达等的影响,发现四物汤中各司其职的君、臣、佐、使四药在不同的指标中扮演不同的角色,其中佐药最为突出^[6]。在对 NFS-60 细胞增殖、诱导

表 3 四物汤及单药对 5.5Gy 照射小鼠造血祖细胞集落的影响

	正常组	模型组	四物汤	地黄组	当归组	白芍组	川芎组
CFU-GM	150.3 ± 4.8 ^{* **}	3.8 ± 1.3	9.5 ± 4.1 [*]	7.3 ± 2.1 [*]	6.8 ± 1.0 ^{* *}	4.0 ± 1.6	6.5 ± 0.6 ^{* *}
CFU-E	151.8 ± 12.1 ^{* **}	2.0 ± 0.8	8.0 ± 1.4 ^{* **}	6.3 ± 1.3 ^{* **}	4.8 ± 1.0 [*]	7.3 ± 1.5 [*]	7.3 ± 3.2 [*]
BFU-E	62.5 ± 12.6 ^{* **}	0.5 ± 0.6	2.5 ± 1.3 [*]	2.0 ± 0.8 [*]	1.8 ± 1.0	1.0 ± 0.8	5.5 ± 1.3 ^{* **}
CFU-meg	8.5 ± 1.3 ^{* **}	0.3 ± 0.5	2.5 ± 0.6 ^{* *}	2.3 ± 0.5 ^{* **}	1.0 ± 1.4	0.5 ± 0.4	5.5 ± 1.3 ^{* **}
CFU-mix	19.1 ± 7.1 ^{* **}	0.3 ± 0.5	4.0 ± 0.8 ^{* **}	6.5 ± 2.4 ^{* **}	3.8 ± 1.5 ^{* *}	0.3 ± 0.4	7.8 ± 2.1 ^{* **}

NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞的影响、外周血白细胞及造血干祖细胞方面有反佐意义,主要偏向于上述第二种含义。

无论是四物汤及各单药直接对 NFS-60 细胞增殖的影响还是诱导 NIH3T3 细胞上清对 NFS-60 细胞增殖的间接作用,或有时尽管作用的环境不一致,结果不统一,白芍在四物汤中都是制约君药和全方的主要功能,发挥反佐的作用。

在对外周血白细胞和造血干祖细胞的影响方面,四物汤及地黄、当归和川芎均有刺激其升高或增殖的作用,各药的作用机理各异^[7-8]。其中四物汤、地黄、当归、白芍与模型组相比虽然只有一个时间点有显著性差异,但其它时间点与模型组相比也有变化。这可能与给药剂量较低有关系。但可以认为:四物汤及君、臣、使药具有类 G-CSF 样作用,促进 CFU-GM、CFU-mix 细胞的增殖分化,而使外周血白细胞数在一定时间点上与对照组相比有显著差异。但白芍除外,从这两个指标来看,白芍不具类 G-CSF 样作用,甚至拮抗 G-CSF 作用,因而对 CFU-GM 和 CFU-mix 等指标无刺激增生作用,在外周血中表现为降低白细胞数,也就是说,在需要 G-CSF 的环节中它充当了拮抗者的角色,与其他药相背,在体外依赖 G-CSF 的 NFS-60 细胞培养实验中,对细胞增殖呈抑制作用,亦与其他药相背。至于地黄、当归和川芎的君、臣、使药角色有待进一步分析讨论。

参考文献:

- [1] 刘永学,高月,陶来宝,等.造血细胞凋亡在射线诱发小鼠血虚证中的作用[J].深圳中西医结合杂志,2000,10(1):14.
- [2] 高月,马增春,陈鹏,等.四物汤及单药对辐射小鼠骨髓造血的调节作用[J].中药新药与临床药理,2001,12(9):336-339.
- [3] 路晓钦,高月,谭洪玲,等.四物汤及其三味药组方对 γ 射线照射致血虚证小鼠造血系统的影响[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(6):35-38.
- [4] 谭洪玲,高月,马增春,等.四物汤刺激 Peyer's Patch 促进骨髓造血的研究[J].中药药理与临床,2001,17(2):1-3.
- [5] 马增春,高月,刘永学,等.辐射小鼠骨髓中 CD34⁺ 细胞的变化及其意义[J].中华放射医学与防护杂志,2001,21(1):12-15.
- [6] 马增春,高月,刘永学,等.四物汤对 γ 射线照射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,2001,7(3):41-44.
- [7] 马增春,高月,刘永学,等.环磷酸胺所致血虚证小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的变化[J].中国基础医学杂志,2001,7:42-44.
- [8] 马增春,高月,刘永学,等.四物汤对环磷酸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,2001,13-15.