

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

路晓钦, 高 月, 谭洪玲, 马增春

(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: 本研究用 γ 射线照射制备小鼠血虚证模型, 通过四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠造血系统的影响探讨了四物汤补血作用的配伍机制。实验结果表明: 四物汤全方治疗血虚证效果最好; 作用靶点不同, 四药的君、臣、佐、使含义各一。

关键词: 四物汤; 血虚; 补血; 配伍机制

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0035-04

Effects of Siwu Tang and the Three Ingredients of the Prescription on the Hematopoiesis in Mice with Blood Deficiency Induced by ^{60}Co γ Irradiation

LU Xiao-qin, GAO Yue, TAN Hong-ling, MA Zeng-chun

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract: In this experiment the compatibility mechanism of enriching blood of SiWu Tang was studied by observing the effects of SiWu Tang and its three ingredients of the prescription on the hematopoiesis in mice with blood deficiency induced by ^{60}Co γ irradiation. The results showed that SiWu Tang exerted the strongest action compared with the three ingredients, and each ingredient of SiWu Tang played different roles in several targets.

Key words: SiWu Tang; blood deficiency; enriching blood; compatibility mechanism

四物汤首见于宋代《太平惠民和剂局方》, 由熟地、当归、白芍、川芎组成。熟地为君, 滋阴养血, 填精补髓; 辅以当归, 补血养肝, 活血调经; 佐以白芍, 和营养肝; 使以川芎, 活血行滞。四物汤在临床广泛应用, 为补血、活血、调经之良方。但有关四物汤补血配伍机制研究的报道较少, 而且研究的综合性及深度均存在不足, 与中医理论有一定差距^[1-5]。我们已成功地利用 γ 射线诱导致成实验性血虚证小鼠模型^[6], 而且进一步的研究结果表明: 血虚证小鼠 CD34⁺ 细胞在骨髓有核细胞(BMNC)中的比例降低; 骨髓细胞周期紊乱; 骨髓中粒系(CFU-GM)、红系(BFU-E, CFU-E)、巨核系(CFU-meg)、混合系(CFU-mix)造血祖细胞的数量下降; 外周血细胞数量下降^[7]。本文以各组动物的外周血象、骨髓造血祖细胞集落的形成、胸腺指数和脾指数以及 CD34⁺ 细胞在骨髓有核细胞中的比例为指标进行综合分析, 进一步阐明了四物汤补血作用的配伍机制。

1 实验材料

1.1 主要试剂与仪器 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体及对照抗体(美国 Becton Dickinson 公司); 碘化丙啶: Phamingen 公司产品。流式细胞仪(美国 FACS Cabiur); 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)。

1.2 中药来源 四物汤由熟地、当归、白芍、川芎组成, 全部药物均购自北京同仁堂中药厂, 经本所马百平教授鉴定。

1.3 样本药物制备 按《太平惠民和剂局方》规定的剂量称取组成, 四物汤组: 30g 熟地黄+ 20g 当归+ 20g 白芍+ 12g 川芎

四物汤方剂三味药组方分为四组

A 组: 30g 熟地黄+ 20g 当归+ 20g 白芍

B 组: 30g 熟地黄+ 20g 当归+ 12g 川芎

C 组: 30g 熟地黄+ 20g 白芍+ 12g 川芎

D 组: 20g 当归+ 20g 白芍+ 12g 川芎

经水煎、过滤、浓缩, 配制成 100% 药液(即每 ml

收稿日期: 2000-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No: 30070913

药液含生药 1g), 置 4℃保存备用。

1.4 实验动物 C57BL/6J 小鼠 196 只, 6~ 8 周龄, 体重 20 ± 2g, 雌性; 由军事医学科学院实验动物中心提供(动物合格证号: B98004), 二级动物饲养室饲养。将小鼠按体重随机分为 7 组: 正常对照组、模型对照组、四物汤组 A 组、B 组、C 组、D 组。

2 实验方法

2.1 模型制作 根据国家卫生部颁布的《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》和《中药新药研究指南》中的有关防治贫血药新药研究血虚证模型制作方法, 并参考有关文献报导和我室评价同类新药所用模型的工作基础, 选⁶⁰Co γ 射线照射制作放射损伤性血虚证模型。小鼠常规饲养数天适应环境后, 于实验第 4d 进行⁶⁰Co γ 射线 3.5Gy 一次全身照射制成血虚证模型小鼠, 吸收剂量率为 1.27Gy·min⁻¹, 照射时间为 161sec, 照射距离为 4m^[7]。模型制作后, 连续灌胃 7d, 每天一次, 0.2ml/次(相当于四物汤 10g/kg), 正常对照组和模型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)分别于制模前, 模后 1、3、5、7、9、11、13、17、21d, 每只实验小鼠尾静脉取血 20μl, 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 按体重随机分组, 每组 6 只; 制模后第 7d, 按文献方法^[8]进行集落培养, 检测小鼠骨髓 CFU-GM、BFU-E、CFU-E、CFU-meg 及 CFU-mix 的生成能力。

2.4 CD34⁺ 细胞的检测 制模后第 7d, 处死小鼠,

立即用含 0.2% 牛血清白蛋白 PBS 缓冲液冲出小鼠股骨骨髓细胞, 取 1 × 10⁶ 个细胞加入 30μl 正常小鼠血清以封闭非特异结合位点, 加入 10μl FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体, 对照管加入 10μl 相应对照抗体, 4℃避光反应 30min。加入 2ml 红细胞裂解液, 作用 5min, 用 PBS 缓冲液洗细胞两次, 加入终浓度为 3μg/ml 的 PI 染液, 用流式细胞仪检测^[9]。

2.5 胸腺指数与脾指数的检测 各组动物均按体重随机分组, 每组 6 只; 制模后第 7d, 称量小鼠体重, 颈椎脱臼处死小鼠, 取胸腺、脾脏进行称重, 计算胸腺指数和脾指数。

2.6 统计学处理 各组实验数据以均值($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的差异显著性分析用 Microsoft excel 软件中的 t 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 四物汤对血虚小鼠外周血象的影响 模型对照组小鼠外周血中白细胞总数在照后 3d 下降到最低点, 然后短暂回升后又稍下降, 在照射后 11d 再次下降到最低点, 然后再恢复, 与文献一致^[7]。四物汤及三味药组方均能明显升高外周血白细胞数; 13 天以后除与正常组仍有显著性差异外, 其它各组间均无差异(结果见表 1)。四物汤全方与各三味药方比较, 全方效果最好, 去川芎组和去地黄组次之, 去当归组最差。四物汤全方在 7、13、17 天能显著升高血虚小鼠外周血中红细胞数, 与其它各组方相比, 去白芍组较好, 去地黄组最差(结果见表 2); 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠血红蛋白亦有类似作用(结果略)。

表 1 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠红细胞(10⁹/L)的影响($\bar{x} \pm s$; n = 10)

| 照射后时间 (天) | 组别 | | | | | | |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 正常组 | 模型组 | SWT 组 | A 组 | B 组 | C 组 | D 组 |
| 0 | 13.98 ± 3.2 | 14.06 ± 5.2 | 11.94 ± 5.4 | 12.75 ± 1.6 | 12.58 ± 3.6 | 14.78 ± 2.9 | 14.75 ± 4.2 |
| 1 | 9.10 ± 2.4 ^{**} △△ | 2.41 ± 0.7 | 2.13 ± 0.4 | 2.00 ± 0.3 | 2.04 ± 0.5 | 2.15 ± 0.4 | 2.11 ± 0.4 |
| 3 | 6.33 ± 1.1 ^{**} △△ | 1.51 ± 0.2 | 1.78 ± 0.4 | 1.61 ± 0.3 | 1.51 ± 0.2 | 1.67 ± 0.2 | 1.77 ± 0.5 |
| 5 | 8.61 ± 2.8 ^{**} △△ | 2.44 ± 0.4 ^{△△} | 3.18 ± 0.4 ^{**} | 2.70 ± 0.4 [△] | 2.99 ± 0.6 [*] | 2.96 ± 0.6 [*] | 2.83 ± 0.7 |
| 7 | 13.98 ± 2.2 ^{**} △△ | 2.65 ± 0.6 ^{△△} | 4.87 ± 1.6 ^{**} | 3.75 ± 1.1 [*] | 3.64 ± 1.0 [*] | 4.74 ± 1.4 ^{**} | 4.97 ± 1.9 ^{**} |
| 9 | 15.71 ± 1.9 ^{**} △△ | 3.75 ± 1.3 [△] | 5.19 ± 1.0 [*] | 5.10 ± 1.0 [*] | 3.69 ± 0.7 ^{△△} | 4.18 ± 0.7 [△] | 4.39 ± 0.9 |
| 11 | 12.02 ± 2.8 ^{**} △△ | 2.97 ± 0.8 ^{**} △△ | 4.70 ± 0.4 ^{**} | 4.11 ± 1.4 | 3.29 ± 0.6 ^{△△} | 2.65 ± 0.5 ^{△△} | 3.00 ± 0.4 ^{△△} |
| 13 | 12.71 ± 1.9 ^{**} △△ | 3.30 ± 0.8 | 3.66 ± 1.2 | 3.28 ± 0.7 | 3.27 ± 1.2 | 2.75 ± 0.8 [△] | 3.77 ± 0.2 |

注: 与模型组比较^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001; 与四物汤组比较[△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01。以下同。

表2 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠白细胞($10^{12}/L$)的影响($\bar{x} \pm s; n = 10$)

| 照射后时间 (天) | 组别 | | | | | | |
|--------------|---------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------|
| | 正常组 | 模型组 | SWT组 | A组 | B组 | C组 | D组 |
| 0 | 9.14 ± 0.9 | 9.23 ± 0.7 | 9.30 ± 0.7 | 9.46 ± 0.7 | 9.61 ± 0.8 | 9.39 ± 0.5 | 9.36 ± 0.7 |
| 1 | 9.50 ± 0.8 | 8.79 ± 0.8 | 8.64 ± 1.1 | 8.51 ± 0.8 | 9.26 ± 0.6 | 9.03 ± 0.3 | 9.26 ± 0.6 |
| 3 | 8.97 ± 0.3* | 7.87 ± 1.3 | 8.42 ± 0.8 | 8.23 ± 0.3 | 8.81 ± 0.5* | 8.61 ± 1.1 | 8.16 ± 0.7 |
| 5 | 7.77 ± 1.0 | 7.46 ± 0.7 | 7.59 ± 0.5 | 7.42 ± 0.4 | 7.21 ± 0.8 | 7.30 ± 0.7 | 8.15 ± 0.8 |
| 7 | 8.79 ± 0.7* ^{△△} | 6.83 ± 0.6 [△] | 7.56 ± 0.8* | 6.67 ± 0.8 [△] | 7.52 ± 0.5** | 6.76 ± 0.7 [△] | 6.32 ± 0.9 ^{△△} |
| 9 | 8.08 ± 1.3* | 6.82 ± 0.9 | 7.29 ± 1.0 | 7.72 ± 0.6* | 7.39 ± 0.7 | 7.78 ± 0.5** | 8.13 ± 1.4 |
| 11 | 8.66 ± 0.6* ^{△△} | 6.92 ± 1.0 | 7.07 ± 0.7 | 7.02 ± 0.5 | 7.10 ± 0.5 | 7.01 ± 0.7 | 6.97 ± 0.8 |
| 13 | 8.51 ± 0.7* | 6.94 ± 0.7 ^{△△} | 8.04 ± 0.2** | 7.43 ± 0.5 [△] | 8.10 ± 0.4** | 7.92 ± 0.5** | 7.95 ± 0.5** |
| 17 | 8.33 ± 1.0 | 8.11 ± 0.5 ^{△△} | 9.12 ± 0.5** | 7.96 ± 0.4 ^{△△} | 9.10 ± 0.5** | 8.73 ± 0.5* | 8.22 ± 0.3 ^{△△} |

3.2 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠骨髓造血祖细胞集落的影响 结果表明:模型对照组小鼠骨髓中的CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-meg、CFU-mix集落较正常对照组显著减少;去当归组对CFU-E、CFU-mix的增殖似无作用,对BFU-E、CFU-meg、CFU-GM具有一定促增殖作用,去川芎组、去白芍组、去地黄组对以上各集落均具有促增殖作用,但去白芍组效果最好;四物汤对CFU-E、BFU-E、CFU-GM、CFU-

mix、CFU-meg均具有促进增殖作用,且优于各三味药组方(结果见表3)。

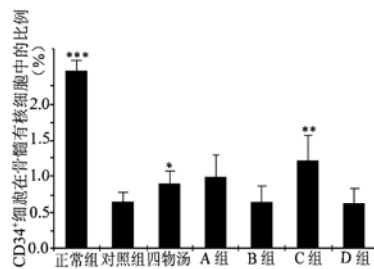
3.3 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠脾指数、胸腺指数的影响 结果表明,与正常组相比,血虚证小鼠的脾指数和胸腺指数均呈极显著降低;四物汤能明显提高血虚证小鼠的脾指数和胸腺指数,而其它各组除C组外亦均能不同程度提高脾指数,但各组对胸腺指数均无明显影响(结果见表4)。

表3 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠造血祖细胞集落的影响($\bar{x} \pm s; n = 6$)

| 组别 | CFU-E | BFU-E | CFU-meg | CFU-mix | CFU-GM |
|------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 正常组 | 262.00 ± 6.48* ^{△△} | 108.00 ± 10.74* ^{△△} | 15.50 ± 3.42* ^{△△} | 23.50 ± 5.20* ^{△△} | 629.80 ± 14.24* ^{△△} |
| 模型组 | 50.75 ± 6.50 ^{△△} | 3.25 ± 1.26 ^{△△} | 1.25 ± 0.50 ^{△△} | 3.75 ± 1.26 ^{△△} | 62.80 ± 7.40 ^{△△} |
| 四物汤组 | 131.00 ± 7.26** | 47.75 ± 4.57** | 9.00 ± 2.58** | 19.50 ± 2.98** | 177.60 ± 10.55** |
| A组 | 113.50 ± 7.33* ^{△△} | 20.25 ± 3.77* ^{△△} | 5.00 ± 2.16* [△] | 9.50 ± 1.29* ^{△△} | 162.40 ± 4.34* [△] |
| B组 | 62.75 ± 4.65* ^{△△} | 40.50 ± 3.87* [△] | 10.50 ± 1.29** | 10.25 ± 3.30* ^{△△} | 150.40 ± 17.27* [△] |
| C组 | 51.75 ± 5.56 ^{△△} | 11.75 ± 1.71* ^{△△} | 3.50 ± 1.29* ^{△△} | 4.75 ± 2.22 ^{△△} | 131.20 ± 17.58* ^{△△} |
| D组 | 113.50 ± 8.43* ^{△△} | 33.75 ± 11.03* [△] | 6.50 ± 1.29* ^{△△} | 6.00 ± 0.82* ^{△△} | 142.60 ± 10.09* ^{△△} |

表4 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠脾指数、胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s; n = 6$)

| 组别 | 正常组 | 模型组 | SWT组 | A组 | B组 | C组 | D组 |
|---------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 脾指数(%) | 4.67 ± 0.52** | 1.83 ± 0.41 | 2.67 ± 0.82* | 2.67 ± 0.82* | 3.00 ± 0.89* | 2.33 ± 0.52 | 2.50 ± 0.55* |
| 胸腺指数(%) | 3.00 ± 0.63** | 2.00 ± 0.00 | 2.50 ± 0.55* | 1.67 ± 0.52 | 1.83 ± 0.41 | 1.67 ± 0.52 | 1.67 ± 0.52 |



附图 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠骨髓CD34⁺细胞的影响

3.4 四物汤及其三味药组方对血虚证小鼠骨髓细胞CD34⁺抗原表达及细胞周期的影响 血虚证模型对照组小鼠骨髓中的CD34⁺细胞的比例较正常对照组明显减少,经四物汤治疗后,小鼠骨髓中CD34⁺细胞的比例较模型对照组明显升高。说明在3.5Gy γ 射线造模后小鼠骨髓中的干祖细胞数量降低,四物汤对骨髓中造血干祖细胞数量的回升有明显促进作用。去当归组骨髓CD34⁺细胞的比例明显高于模型对照组,而去白芍组、去地黄组效果较差(结果见附

图)。四物汤组及其三味药组方组血虚小鼠骨髓细胞周期与对照组及正常组均无明显差异(结果未给出),这可能与3.5Gy剂量辐射所致血虚小鼠骨髓细胞周期紊乱在第7天时恢复正常有关。

4 讨论

血虚证是中医临床常见证候,多由生血乏源、失血过多、肾精亏损、大病等引起。血虚证的病理研究主要集中在临床体征、血液流变学、微循环、红细胞功能、免疫功能、骨髓造血功能、及体液分子的改变等有关方面^[10]。四物汤是治疗中医血虚证的首选药,但其作用机理及配伍机制尚未阐明。

本实验结果提示四物汤治疗血虚证可能是通过促进骨髓造血干祖细胞的增殖,从而促进骨髓造血干祖细胞数量的恢复和增强血虚小鼠的免疫功能来实现的。通过撤药法及多项指标综合分析,结果表明,四物汤全方作用最好,可见四物汤配伍组方的科学性。另外,指标不同反映的地黄、当归、白芍、川芎之间君、臣、佐、使的地位不同,但总的结果表明:地黄、当归在方剂中起主要作用,地黄主要促进红细胞的恢复,当归主要促进免疫系统的恢复;白芍为反佐之品,取其“因主药之偏而为监制之用”之意;川芎为使药,与其他各药具有协同作用。本实验结果与以往的实验研究报告有异同之处^[1-5],分析可能与所选用模型不同、方剂剂量比不同有关。

四物汤作为中药复方,突出的特点是活性多组份、作用多靶点、多途径;对疾病的治疗,突出的是多层次、多脏器、多水平的调理过程。要真正研究清楚其作用机制及组方规律,必须加强“血虚证”的客观

性研究,从药效、作用机理及药效物质基础的运动变化等多学科、多方面、多层次进行综合研究,才能真正揭示四物汤君臣佐使的科学内涵。

参考文献:

- [1] 袁久荣,卢究伟,容蓉,等.计算机辅助分析四物汤补血作用配伍机理的研究[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(1):36.
- [2] 卢究伟,袁久荣,孙兆贵,等.四物汤及各单味药的含药血清对粒系-巨系造血祖细胞集落(CFU-GM)的影响[J].山东中医药大学学报,2000,24(5):385.
- [3] 陈国志.日本研究中药防治放射损伤的现状[J].中华放射医学与防护杂志,1994,14(6):417.
- [4] 贺玉琢译.汉方药补益作用的研究(2)[J].国外医学中医中药分册,1997,19(5):17.
- [5] 郑钦岳,管孝鞠,李书桐.四物汤及其各组份对小鼠血清溶血素水平的影响[J].第二军医大学学报,1995,16(4):326.
- [6] 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,2000,10:14.
- [7] 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):60.
- [8] 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.
- [9] Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, et al. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen[J]. Blood, 1996, 88: 3374.
- [10] 马增春,高月.血虚证的病理研究概况[J].新中医,2000,9:60.