

## 消岩汤对环磷酰胺诱导 Lewis 肺癌小鼠骨髓抑制的造血微环境的改善研究

杨佩颖, 李小江, 刘宏根, 张蕴超, 张欣, 孔凡铭, 贾英杰\*

天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

**摘要:**目的 观察消岩汤对环磷酰胺诱导 Lewis 肺癌小鼠造血微环境的影响, 探究消岩汤对 Lewis 肺癌小鼠骨髓抑制的造血微环境的改善作用及其作用机制。方法 SPF 级 Lewis 肺癌小鼠随机分为对照组、模型组、重组人粒细胞刺激因子组和消岩汤组, 每组各 10 只。对照组和模型组 ig 0.02 mL/g 生理盐水。人粒细胞刺激因子组在造模后 sc 重组人粒细胞刺激因子注射液 15 ng/g, 1 次/d, 连续给药 7 d。消岩汤组在造模后 ig 2.9 g/mL 消岩汤, 2 次/d, 0.2 mL/次, 连续给药 7 d。采用流式细胞仪分析细胞周期, 通过细胞培养技术检测基质细胞分化能力, 采用 QRT-PCR 法检测骨髓细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 的基因表达。结果 与模型组比较, 消岩汤能促进骨髓细胞从 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S、G<sub>2</sub>/M 期转化 ( $P < 0.05$ ); 能一定程度上缓解化疗导致的成纤维细胞集落生成单位 (CFU-F) 形成减少 ( $P < 0.05$ ); 能上调抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ )。结论 消岩汤能够促进骨髓细胞向增殖周期转化, 上调 Bcl-2 mRNA 表达, 改善造血微环境, 从而缓解 Lewis 肺癌骨髓抑制对小鼠造血功能的影响。

**关键词:** 消岩汤; Lewis 肺癌; 骨髓抑制; 造血微环境; 基因表达

中图分类号: R285.5; R286.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)06-0747-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.06.004

## Improvement of Xiaoyan Decoction on hemopoietic microenvironment in Lewis lung cancer mice with myelosuppression induced by cyclophosphamide

YANG Pei-ying, LI Xiao-jiang, LIU Hong-gen, ZHANG Yun-chao, ZHANG Xin, KONG Fan-ming, JIA Ying-jie

First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300381, China

**Abstract: Objective** To observe the effects of Xiaoyan Decoction on hemopoietic microenvironment in Lewis lung cancer mice with myelosuppression induced by cyclophosphamide, and discuss the improvement on hemopoietic microenvironment in Lewis lung cancer mice with myelosuppression and to explore its mechanism. **Methods** SPF Lewis lung cancer mice were randomly divided into control, model, recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF), and Xiaoyan Decoction groups, and each group had 10 mice. Mice in the control and model groups were ig normal saline 0.02 mL/g. Mice in the rhG-CSF group were sc Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Injection 15 ng/g after be established myelosuppression models, once daily, and be treated for 7 d. Mice in the Xiaoyan Decoction group were ig Xiaoyan Decoction 2.9 g/mL after be established myelosuppression models, twice daily, 0.2 mL/time, and be treated for 7 d. The cell cycles were analyzed by flow cytometry, differentiation of stromal cell were determined by cell culture technique, and express levels on Bcl-2 mRNA and Bax mRNA of bone marrow cells were checked by qRT-PCR method. **Results** Compared with the model group, Xiaoyan decoction could promote the bone marrow cells from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase to S and G<sub>2</sub>/M phase transformation in the cell cycle ( $P < 0.05$ ), could inhibit the reduction of fibroblast colony forming unit (CFU-F) formation induced by chemotherapy to a certain extent ( $P < 0.05$ ), and could up-regulate the expression of anti apoptotic gene Bcl-2 mRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Xiaoyan Decoction can promote the transformation of bone marrow cells to proliferation cycles, up-regulate the expression of Bcl-2 mRNA gene, improve hemopoietic microenvironment, and relieve the effect of hematopoietic function in Lewis lung cancer mice with myelosuppression.

**Key words:** Xiaoyan Decoction; Lewis lung cancer; myelosuppression; hematopoietic microenvironment; gene expression

收稿日期: 2016-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273937); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (13JCQNJC10900); 天津市科技计划项目 (12ZCDZSY15800)

作者简介: 杨佩颖 (1982—), 女, 主治医师, 博士, 研究方向为中西医结合肿瘤学。Tel: 18602286127 E-mail: 64241781@qq.com

\*通信作者 贾英杰, 男, 主任医师, 博士, 研究方向为中西医结合肿瘤学。Tel: (022)27986556 E-mail: jiayingjie1616@sina.com

70%的非小细胞肺癌患者在最初接受一线化疗方案后病情缓解,提高了患者临床获益率。因此,化疗是非小细胞肺癌患者不可或缺的重要治疗手段。大多数化疗药物抑制肿瘤细胞的同时会影响骨髓细胞的增殖、分化,造成外周正常血细胞释放受到抑制,出现不同程度的白细胞、红细胞、血小板、中性粒细胞降低<sup>[1-3]</sup>。该类化疗药物由强到弱的排序依次为烷化剂、抗代谢抗肿瘤药、金属络合物抗肿瘤药物、植物抗微管药和抗肿瘤抗生素<sup>[4]</sup>。现代医学常采用集落刺激因子、输成分血、造血干细胞移植等手段治疗骨髓抑制,这些方法起效较快,但有一定的副作用,远期疗效不理想。越来越多的研究表明中医药在改善化疗后的骨髓抑制具有较好的优势<sup>[5-6]</sup>。本课题组前期研究认为,化疗后骨髓抑制病机复杂,大多为脏腑虚损,气虚血瘀导致血行不畅,外毒内毒加重正气亏虚,形成恶性循环的过程。以“益气扶正,解毒祛瘀”为治疗原则的消岩汤是本课题组根据十余年治疗肿瘤临床经验、中药功效以及现代药理研究拟定出的中药汤剂,具有益气养阴、祛瘀解毒的功效。前期临床研究显示消岩汤在减轻气虚毒瘀型非小细胞肺癌化疗毒副反应方面具有良好效果<sup>[7]</sup>;与单纯化疗比较,消岩汤配合化疗使用对改善骨髓抑制疗效显著<sup>[8-10]</sup>。在此基础上,本实验采用消岩汤先期干预治疗骨髓抑制的 Lewis 肺癌小鼠,分析消岩汤对骨髓微环境相关因素的影响,并探索其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级健康近交系 C57BL/6 小鼠,40 只,体质量 20~22 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(军)2012-0004,饲养于天津医科大学肿瘤医院实验动物中心,动物分笼饲养,自由摄食、饮水,室温(20±2)℃,湿度 20%~40%。

### 1.2 细胞株

小鼠 Lewis 肺癌细胞,天津医科大学肿瘤医院免疫室保存传代。

### 1.3 试剂、材料及仪器

DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海博谷生物科技有限公司),Cabiur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),CX-10 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),UNIQ-10 column Trizol 总 RNA 提

取试剂盒(Sangon 生物技术有限公司),Improm II Reverse Transcription System 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司),SYBR Green Jump Start Taq ReadyMix 实时定量 PCR 试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司),电泳仪、梯度 PCR 扩增仪、凝胶图像分析系统、Quantity one 图象分析系统,美国 Bio-Rad。

## 1.4 药物

消岩汤由天津中医药大学第一附属医院饮片剂室提供,组方为黄芪 30 g、太子参 15 g、郁金 10 g、姜黄 10 g、夏枯草 15 g、白花蛇舌草 15 g、生牡蛎各 30 g、蜂房 15 g,共 140 g 生药。中药饮片置于圆底烧瓶内,第一煎按料液比 1:10 加入蒸馏水,浸泡 45 min,煮沸 45 min。第二煎按料液比 1:8 加入蒸馏水煮沸 30 min,滤过,合并两次滤液,水浴中浓缩至 300 mL。浓缩液为棕黄色液体,相当于生药量 0.42 g/mL。

重组人粒细胞刺激因子注射液,规格 75 μg(0.3 mL:6×10<sup>6</sup> IU),杭州九源基因工程有限公司生产,产品批号 80030。注射用环磷酰胺,规格 0.2 g/支,江苏盛迪医药有限公司生产,产品批号 0857,溶于 10 mL 生理盐水中,稀释后质量浓度为 20 g/L。

## 2 方法

### 2.1 小鼠 Lewis 肺癌模型的建立

将 Lewis 肺癌细胞 1×10<sup>6</sup>/mL 与 Matrigel 胶混合(与 PBS 比例为 1:1),并取 0.2 mL 混悬液接种于 C57BL/6 小鼠右侧前肢腋部皮下。接种 4 d 后,以小鼠右腋下皮下可触及肿瘤块标志造模成功。

### 2.2 动物分组

待肿瘤可见时,将 40 只 Lewis 肺癌小鼠随机分为对照组、模型组、重组人粒细胞刺激因子组和消岩汤组,每组各 10 只。

### 2.3 骨髓抑制模型的建立

依据《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》<sup>[11]</sup>的造模方法。除对照组外,采用环磷酰胺建立小鼠骨髓抑制模型。ip 注射用环磷酰胺 100 mg/kg(按照小鼠体质量 0.02 mL/g 剂量,ip 5 mg/mL 注射用环磷酰胺溶液),1 次/d,连续给药 3 d。

### 2.4 给药

根据《药理实验方法学》<sup>[12]</sup>“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表” $R_{ab}=12.33$ ,计算消岩汤的小鼠临床等效剂量,小鼠每天的给药剂量= $D_b \times R_{ab}=2.33 \text{ g/kg} \times 12.33=28.7 \text{ mg/g}$ ,即 2.9 g/mL 消岩汤。根据《药理实验方法学》<sup>[10]</sup>“人和动物体表面

积折算的等效剂量比率表”计算重组人粒细胞刺激因子的小鼠临床等效剂量，即重组人粒细胞刺激因子注射液 15 ng/g。

对照组和模型组 ig 0.02 mL/g 生理盐水。人粒细胞刺激因子组在造模后 sc 重组人粒细胞刺激因子注射液 15 ng/g, 1 次/d, 连续给药 7 d。消岩汤组在造模后 ig 2.9 g/mL 消岩汤, 2 次/d, 0.2 mL/次, 连续给药 7 d。

### 2.5 骨髓基质细胞悬液的制备

各组小鼠最后一次给药 1 h 后脱颈处死，无菌取出股骨。用注射器吸取少量培养液，从股骨的一端将骨髓冲到培养皿中，制备单细胞悬液，并调节细胞浓度至  $2 \times 10^5$ /mL。将细胞接种到细胞培养瓶中，培养体系 IMDM 培养基含 12.5% 马血清、12.5% 胎牛血清、5  $\mu$ mol/L 氢化可的松、 $5 \times 10^{-4}$  mol 2-巯基乙醇、青霉素 0.1 mL、链霉素 0.1 mL，在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。培养液更换：细胞培养至第 7 天时，全量换液，以后每 3 天全量换液 1 次。培养至 14~20 d。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，然后再进行传代培养。在倒置显微镜下观察，见细胞稍圆时，立即去胰蛋白酶，加入 PBS 液 3 mL，用吸管反复吹打细胞，使成为单细胞悬液，移入离心管中，1 500 r/min 离心 5 min，去上清，用振荡器使细胞分散，开始进行检测。

### 2.6 增殖特性检测

将骨髓基质细胞调整至  $2 \times 10^5$ /mL，加入预冷 70% 乙醇，于 4  $^{\circ}$ C 固定过夜。离心收集细胞，以 1 mL PBS 洗细胞 1 次，加入 500  $\mu$ L PBS 含 50  $\mu$ g/mL 碘化丙啶 (PI)，100  $\mu$ g/mL RNase A，0.2% Triton X-100，4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤后上流式细胞仪分析细胞周期。

### 2.7 分化特性检测

将细胞悬液体系 1 mL 接种于 24 孔培养板中，

置 37  $^{\circ}$ C 含 7% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内孵育，每周半量换液 1 次，第 14 天于倒置显微镜下计数，由 40 个以上成纤维细胞组成的集落为 1 个成纤维细胞集落生成单位 (CFU-F)。

### 2.8 骨髓细胞凋亡相关基因表达的测定

采用 QRT-PCR 法检测骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的基因表达。总 RNA 提取试剂盒和 DNA 第一链合成试剂盒均购自北京通瑞生物有限公司。RNA 完整性采用琼脂糖凝胶电泳检测，其透过率、纯度采用紫外分光光度计检测。以 Oligo-dT15 为引物，参照 20  $\mu$ L 反应体系合成 cDNA 第一链。引物序列由北京通瑞生物有限公司合成并提供。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 s、95  $^{\circ}$ C 5s、64  $^{\circ}$ C 34s，40 个循环。每对引物设 3 个复孔。结果用 ABI PRISM 7500 分析，融解曲线特异。无引物二聚体和非特异性扩增。ABI PRISM 7500 自动生成 C<sub>T</sub> 值。

引物：Bcl-2 mRNA

(sense): 5'-GACAGAAGATCATGCCGTCC-3',

(antisense): 5'-GGTACCAATGGCACTTCAAG-3'

Bax mRNA

(sense): 5'-CTGAGCTGACCTTGGAGC-3'

(antisense): 5'-GACTCCAGCCACAAAGATG-3'

### 2.9 统计学分析

采用 SPSS 22 统计软件处理，实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析。

## 3 结果

### 3.1 对骨髓细胞周期的影响

与对照组比较，模型组骨髓细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，消岩汤能够促进骨髓细胞从 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S、G<sub>2</sub>/M 期转化 ( $P < 0.05$ )，从而促进细胞增殖，缓解化疗导致的骨髓的抑制程度，见表 1。

表 1 消岩汤对骨髓细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of Xiaoyan Decoction on bone marrow cell cycles ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> /%	S/%	G <sub>2</sub> /M/%
对照	—	64.88 ± 2.10	17.10 ± 0.19	18.74 ± 0.45
模型	—	75.17 ± 0.50*	11.23 ± 0.49*	13.62 ± 0.42*
重组人粒细胞刺激因子	15 ng·g <sup>-1</sup>	52.81 ± 1.96 <sup>#</sup>	23.38 ± 0.94 <sup>#</sup>	24.71 ± 0.59 <sup>#</sup>
消岩汤	2.9 g·mL <sup>-1</sup>	68.73 ± 1.25 <sup>#</sup>	16.49 ± 0.56 <sup>#</sup>	17.25 ± 0.36 <sup>#</sup>

与对照组比较：\* $P < 0.05$ ；与模型组比较：<sup>#</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group

### 3.2 对 CFU-F 的影响

与对照组比较, 模型组能明显抑制骨髓基质细胞 CFU-F 的形成 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 消岩汤能一定程度上缓解化疗导致的 CFU-F 形成减少 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 消岩汤对 CFU-F 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 2 Effect of Xiaoyan Decoction on CFU-F ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	CFU-F
对照	—	55.30 ± 2.98
模型	—	42.50 ± 3.03*
重组人粒细胞刺激因子	15 ng·g <sup>-1</sup>	49.30 ± 2.75 <sup>#</sup>
消岩汤	2.9 g·mL <sup>-1</sup>	54.20 ± 4.64 <sup>#</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$   
\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group

### 3.3 对骨髓细胞凋亡基因 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达较少; 与模型组比较, 消岩汤能上调抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 减少骨髓抑制小鼠骨髓细胞的凋亡, 见表 3。

表 3 消岩汤对骨髓细胞凋亡基因 mRNA 相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Xiaoyan Decoction on express level on apoptosis gene mRNA of bone marrow cells ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	mRNA 表达水平	
		Bcl-2	Bax
对照	—	0.99 ± 0.14	1.10 ± 0.30
模型	—	0.81 ± 0.10*	1.12 ± 0.32
重组人粒细胞刺激因子	15 ng·g <sup>-1</sup>	1.14 ± 0.15 <sup>#</sup>	0.82 ± 0.13 <sup>#</sup>
消岩汤	2.9 g·mL <sup>-1</sup>	1.48 ± 0.34 <sup>#</sup>	0.97 ± 0.22

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$   
\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group

## 4 讨论

微环境提供造血细胞形成生长的场地, 发挥造血细胞增殖、分化、成熟和释放的作用。大量研究发现造血微环境障碍直接影响造血细胞的功能和结构。因此重建损伤的造血微环境对于恢复造血功能的紊乱十分重要。研究发现重组人类粒细胞集落刺激因子明显改善化疗导致的中性粒细胞缺乏症<sup>[13]</sup>, 但有一定的不良反应。近年来关于中药改善化疗所

致的骨髓抑制临床研究及实验研究有一定的成效。放化疗可使骨髓细胞停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 诱导骨髓细胞向增殖细胞转化, 可促进受损的骨髓细胞增殖分化。郑轶峰等<sup>[14]</sup>研究表明, 左归丸可能通过促进造血细胞由 G<sub>0</sub> 期转化至细胞周期, 恢复因放化疗受损的骨髓造血细胞各个周期受损的 DNA, 加速增殖和分化, 从而促进骨髓造血功能的重建。Bcl-2 和 Bax 基因是凋亡家族中重要的凋亡调节基因。在正常骨髓细胞, 未成熟的增殖的造血祖细胞和未分化的造血前体细胞均有 Bcl-2 表达, Bax 基因增加细胞凋亡的敏感性, 加速骨髓细胞凋亡<sup>[15]</sup>。研究表明, 黄芪注射液抑制凋亡蛋白 Bcl-XL 表达, 减少骨髓细胞凋亡以促进造血干、祖细胞的增殖分化<sup>[16]</sup>。本研究发现骨髓抑制小鼠模型组 Bcl-2 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ )。

本实验研究结果显示, 骨髓抑制模型组使骨髓抑制小鼠骨髓细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞, 消岩汤提前给药后 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞减少, S、G<sub>2</sub>/M 期细胞增加。提示消岩汤通过调节细胞凋亡相关因素的表达, 共同调控细胞周期进入下一个周期, 促进细胞向增殖周期转化。消岩汤预防给药上调 Bcl-2 mRNA 表达, 从而减少骨髓抑制小鼠骨髓细胞的凋亡, 从而促进骨髓细胞的增殖分裂, 达到恢复骨髓造血功能的目的。

### 参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [3] Brenet F, Kermani P, Spektor R, et al. TGF- $\beta$  restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(3): 623-639.
- [4] 王大志, 刘炳麟, 张书瑜, 等. 抗肿瘤药与化疗患者骨髓抑制多元岭回归分析 [J]. *药物流行病学杂志*, 2009, 18(3): 155-157.
- [5] 李方方. 怀山药提取物对骨髓抑制贫血小鼠造血功能影响的研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- [6] 冯晓燕, 顾 鸿, 杨长福, 等. 加味四物汤对血小板减少性紫癜小鼠影响的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(15): 1886-1888.
- [7] 张 欣, 张 莹, 杨佩颖, 等. 基于 RNA 干扰技术探讨消岩汤对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(3): 288-291.

- [8] 贾英杰, 李小江, 杨佩颖, 等. 消岩汤对减轻气虚毒瘀型非小细胞肺癌化疗毒副反应时效关系的临床研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(4): 183-185.
- [9] 程晓玉, 贾英杰, 李小江, 等. 扶正解毒祛瘀方联合化疗治疗非小细胞肺癌 30 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(9): 3-5.
- [10] 杨佩颖, 李小江, 孔凡铭, 等. 消岩汤对 Lewis 肺癌小鼠化疗后骨髓抑制的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1567-1571.
- [11] 中华人民共和国卫生部药政司. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编 (药理学毒理学) [M]. 1993: 103.
- [12] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010:1698.
- [13] 李 波, 曹 原, 司继刚. 重组人粒细胞集落刺激因子对化疗后中性粒细胞缺乏的有效性和安全性研究 [J]. 药学与临床研究, 2014, 22(6): 545-547.
- [14] 郑轶峰, 张力华, 周 毅. 左归丸对骨髓抑制小鼠造血调控的影响 [J]. 河北中医, 2009, 31(5): 759-762.
- [15] Delia D, Aiello A, Soligo D, *et al.* Bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells [J]. *Blood*, 1992, 79(5): 1291-1298
- [16] 吕 艳, 冯雪梅, 祝彼得. 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):30-32.