

- 2 李仪奎,等. 中药药理实验方法学. 上海:上海科学技术出版社,1991. 398,399
- 3 陈 奇,等. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社,1993. 520
- 4 katzAAM,*et al.* Cir Res,1981,48:1
- 5 周金黄,等主编. 中药药理与临床研究进展. 第1册. 北京:中国科学技术出版社,1992. 20
- 6 孟振行,等. 心肺血管病杂志,1995,14(2):101
- 7 王 朋,等. 心肺血管病杂志,1996,15(1):52
- 8 陈红宾,等. 中国中药杂志,1994,19(8):454
- 9 孙晓飞,等. 山西中药,1988,4(4):49
- 10 褚衍芳,等. 中草药,1988,19(1):25
- 11 姜传仓,等. 南京医科大学学报,1994,14(4):522
- 12 孙锡铭,等. 中草药,1991,22(1):22
- 13 王树立,等. 中西医结合杂志,1987,7(8):483

(1997-07-31 收稿)

Studies on the Hypolipidemic Effect of Xiaoyu Tablets in Hyperlipidemic Rabbits and Rats

Xie Meilin, Gu Zhenlun, Chen Keji, *et al* (Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007)

Abstract Hypolipidemic effects of Xiaoyu tablets were examined in experimental hyperlipidemic rabbits and rats induced by feeding high fat diet. Results showed that levels of serum TC and LDL-C in rabbits treated with Xiaoyu tablet were significantly lower than those of hyperlipidemic model group. In hyperlipidemic rats, the drug obviously lowered serum TC, TG, LDL-C and apoB levels, with simultaneous reduction of hepatic fatty degeneration and coefficient of hepatic weight.

Key words Xiaoyu Tablet Hypolipidemic Action

补益中药复方对环磷酰胺处理小鼠粒系造血的影响

湖南医科大学血液生理研究室(长沙 410078) 罗志勇* 谭孟群 王绮如 蒋德昭

摘 要 为了从传统中药中寻找防治化疗和放疗所致骨髓粒系造血抑制的药物,通过建立实验性环磷酰胺(Cy: 0.08 g/kg)低白细胞血症小鼠模型,观察了参芪补苦复方(GAFS: 13.9 g/kg·d ip 6 d)对粒系造血的影响。结果表明:GAFS对Cy所致外周血白细胞和中性粒细胞数下降具有对抗和促恢复作用($P < 0.01$),能防治骨髓有核细胞数、粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)数的减少($P < 0.01$),促进CFU-GM增殖并诱导其向粒系、巨噬系分化,且其促粒系造血作用优于鲨肝醇。

关键词 环磷酰胺 低白细胞血症小鼠模型 参芪补苦复方 粒系造血程序性细胞死亡

许多接受化疗、放疗的肿瘤患者,由于治疗的毒副作用,存在免疫及造血的双重抑制。目前临床上大多应用细胞因子 rhGM-CSF、rhGCSF 以对抗放、化疗药物所造成的造血干、祖细胞减少及外周血粒细胞下降,并显示出较好的疗效。然而,最近研究表明,外源性或内源性生长因子存在可抑制细胞毒剂引起的程序性细胞死亡(PCD)导致肿瘤细胞的持

续存活及对化疗药物的抗性^[1]。因此,寻找安全、高效、低毒既能调节机体免疫功能又能促进粒系造血的中药可能具有直接的应用前景。本研究运用中医“辨证论治”的理论并结合中草药升白作用的现代药理研究成果,选用补肾壮阳药补骨脂,益气养血药人参、黄芪,清热燥湿药苦参,并观察了参芪补苦(GAFS)对Cy处理小鼠外周血白细胞、中性

* Address: Luo Zhiyong, Research Center of Molecular Biology, Hunan Medical University, Changsha

罗志勇 男,1990年毕业于湖南医科大学医疗系,获生理学专业硕士学位。现在本校分子生物学研究中心从事教学、科研工作。研究方向:白血病分子生物学及中西医结合治疗机理。参加国家自然科学基金项目1项,共发表论文6篇。

粒细胞数、骨髓有核细胞数和 CFU-GM 增殖、分化的影响。

1 材料

1.1 主要药物及试剂:白参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 吉林长白山产,黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. 内蒙古产,补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 苦参 *Sophora flavescens* Ait. 均由湖南省长沙市制药二厂传统技术开发药号提供,其提取液制备见方法 2.1;鲨肝醇(batiolum, BA, mp 68℃~72℃)江苏宜兴市制药厂,批号:950324;环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy, mp 49℃~53℃)上海第十二制药厂;羟基脲(hydroxyurea)瑞士 Fluka 公司,使用时均以无菌生理盐水配制。

1.2 动物: BALB/c 近交系小鼠,雌雄各半,日龄 60~80 d,体重 18~22 g,由本校实验动物中心提供。

2 方法

2.1 中药提取:人参^[2]:白参粗粉以 95%乙醇回流提取,提取液经水浴去醇,加注射用水,以 20% NaOH 调 pH 7.0, G₅ 过滤除菌,制成生药浓度为 0.2 g/mL;黄芪^[2]:内蒙古黄芪饮片,先用蒸馏水浸泡 30 min,后以 100℃水浴提取,提取液以 95%乙醇分别调含醇量至 65%、85%,冷藏过滤,水浴除醇,加注射用水至 1:1,以 20% NaOH 调 pH 8.0, G₅ 过滤除菌,制成生药浓度为 1 g/mL;苦参^[3]:取苦参粗粉,100℃水浴提取,滤液浓缩至比重达 1.1~1.2 时,加 95%的乙醇 2.5 倍量沉淀杂质,水浴除醇,加适量注射用水,并以 10%的盐酸调 pH 5.6, G₅ 过滤除菌,制成生药浓度 0.5 g/mL;补骨脂^[3]:取压碎的补骨脂,以 75%乙醇回流提取,提取液 4℃冷藏过夜,过滤,水浴除醇,加适量注射用水, G₅ 过滤除菌,制成生药浓度 0.5 g/mL。

2.2 给药剂量:人参、黄芪、苦参 ip LD₅₀ 分别为 5、40、14.5 g/kg^[4],剂量参考值拟参照 LD₅₀ 取 1/5、1/10,即高、中两个剂量;补骨脂依据 1995 年中华人民共和国药典(一部)人的用药量(9 g)按动物体型系数换算成小鼠

的用药量 1.15 g/kg。以外周血白细胞升高的百分率为指标,从 L₃(2⁷)正交试验^[5]方差分析结果确定 GAFS 最佳组方为 13.9(1:16:5:5.8)g/kg。鲨肝醇给药剂量由人和小鼠体表面积换算得出。

2.3 低白细胞血症小鼠模型:以环磷酰胺(Cy)0.08 g/kg ip,第 3 天可造成实验性 Cy 白细胞减少模型,第 5 天外周血白细胞下降至最低点。

2.4 外周血白细胞和中性粒细胞总数测定:从小鼠尾静脉采血,用白细胞稀释液稀释,在血细胞计数板上计数;尾静脉采血涂片,待凉干后,经 Giemsa-Wright's 染色,在油镜下进行白细胞分类计数,中性粒细胞总数由白细胞总数及中性粒细胞所占百分比得出。

2.5 骨髓粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)集落数及 CFU-GM 分化的测定:按常规方法制成骨髓单细胞悬液。GFU-GM 培养体系内含有核细胞 1×10⁵/mL,24%的马血清,10%小鼠肺条件液,0.3%琼脂。吸取该体系 1 mL,种入 35 mm 玻璃培养皿内,每组 3 皿,置室温 10 min 后,移入 37℃ 5%CO₂ 饱和湿度培养箱培养 7 d,原位集落染色,于低倍镜下计数含 50 个细胞以上的集落总数及各型集落数(CFU-G、CFU-M、CFU-GM)。

2.6 CFU-GM 自杀率的测定^[6]:计算 CFU-GM 自杀率以此代表 CFU-GM 处于 DNA 合成期(S 期)的比例:

$$S \text{ 期的比例} = \frac{\text{对照组集落数} - \text{羟基脲组集落数}}{\text{对照组集落数}} \times 100\%$$

2.7 统计处理:统计分析用 SPSS for MS WINDOWS 软件包进行数据处理,正交设计、完全随机设计,统计方法均采用 *F* 检验。

3 结果

3.1 参芪补苦复方(GAFS)对 Cy 处理小鼠外周血白细胞数(PWBC)及中性粒细胞数(NC)影响的动态观察:取健康小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为对照组、阳性对照药鲨肝醇组、GAFS 组,各组于 Cy 处理前 1 d(-1d)测 PWBC,第 1 天各组均 ip Cy 0.08 g/kg。

同时 GAFS、阳性对照药鲨肝醇(BA)组分别以 13.9、0.04 g/kg ip 给药,连续 6 d,对照组给予等量的生理盐水,并于第 3、5、7、9、15 天从小鼠尾静脉取血测定 PWBC、NC。结果(见表 1)显示:a)对照组第 3、5 天 PWBC、NC 明显降低($P<0.01$),第 5 天降至最低点,说明 Cy 能造成白细胞和粒细胞减少实验模型;b) GAFS 对 PWBC 和 NC 的影响的动态变化

表 1 GAFS 对 Cy 处理小鼠 PWBC 和 NC 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	PWBC($\times 10^9/L$)					
	-1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	15 d
对照组	13.28 $\pm$ 3.61	5.68 $\pm$ 1.86**	4.60 $\pm$ 1.59**	8.56 $\pm$ 2.54*	12.93 $\pm$ 4.00	11.28 $\pm$ 0.64
鲨肝醇组	11.96 $\pm$ 3.83	6.00 $\pm$ 1.47**	4.68 $\pm$ 1.08**	13.91 $\pm$ 3.67▲▲	12.95 $\pm$ 3.72	11.49 $\pm$ 0.71
GAFS 组	10.98 $\pm$ 3.24	7.86 $\pm$ 4.32	6.64 $\pm$ 2.15*▲△	14.29 $\pm$ 3.3▲▲	16.43 $\pm$ 10.8	11.32 $\pm$ 3.80

组别	NC($\times 10^9/L$)					
	-1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	15 d
对照组	4.33 $\pm$ 0.97	1.63 $\pm$ 0.56**	0.34 $\pm$ 0.19**	1.49 $\pm$ 0.47**	3.05 $\pm$ 0.73*	3.51 $\pm$ 1.17
鲨肝醇组	3.74 $\pm$ 1.53	1.36 $\pm$ 0.52**	1.06 $\pm$ 0.44	3.14 $\pm$ 0.52▲▲	4.43 $\pm$ 0.69	3.56 $\pm$ 1.72
GAFS 组	3.79 $\pm$ 1.74	1.88 $\pm$ 0.61	1.42 $\pm$ 0.23*▲△	3.41 $\pm$ 0.45▲▲	3.64 $\pm$ 1.88	3.44 $\pm$ 1.23

与对照组比较▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$; 与-1 d 比较* $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与鲨肝醇组比较△ $P<0.05$

(BMNC)、CFU-GM 数的影响:从上述 3 组中随机取部分小鼠,于第 7 天处死,无菌取股骨,计数每根股骨的 BMNC,检测 CFU-GM。结果(见表 2)显示,GAFS 可显著增加股骨 BMNC 和 CFU-GM 数($P<0.01$)。

表 2 GAFS 对 Cy 处理小鼠 BMNC 和 CFU-GM 数的影响

组别	剂量(g/kg)	BMNC($\times 10^5$ /根股骨) ($\bar{x}\pm s, n=7$)	CFU-GM/(10^5 细胞) ($\bar{x}\pm s, n=5$)
对照组	NS	9.22 $\pm$ 1.28	70 $\pm$ 17
鲨肝醇组	0.04	13.83 $\pm$ 1.32▲▲	145 $\pm$ 39▲▲
GAFS 组	13.9	14.17 $\pm$ 0.69▲▲	178 $\pm$ 37▲▲

与对照组比较▲▲ $P<0.01$

3.3 GAFS 对 Cy 处理小鼠骨髓 CFU-GM 增殖状态及分化的影响:结果显示,对照组、GAFS 组小鼠骨髓 CFU-GM 处于 S 期比例分别为 27.78%、42.6%,提示 GAFS 对促进 CFU-GM 进入 S 期有一定作用;CFU-GM 集落经原位染色鉴定并分型,结果(见表 3)显示,各组均以 CFU-GM 集落为主。鲨肝醇能促进 CFU-GM 向粒系分化,GAFS 可促进 CFU-GM 向粒、巨噬分化。

3.4 GAFS 对 Cy 处理小鼠骨髓有核细胞 PCD 的影响:取雄性小鼠 12 只,随机分为正常组(N),Cy 处理后 3、5、7 d 组,Cy+GAFS

过程分别类似于鲨肝醇,能在第 3 天至 5 天对抗 Cy 所致 PWBC 和 NC 减少,并于第 5 天至 7 天可促进其恢复,与对照组相比在第 7 天能显著升高 PWBC 和 NC($P<0.01$)并使之恢复正常,且在第 5 天的升白/粒效优于鲨肝醇。

3.2 GAFS 对 Cy 处理小鼠骨髓有核细胞数

组。各组处理方法同上,GAFS 组小鼠于第 7 天处死,取股骨制备骨髓细胞悬液,经 Ficoll-Hypaque(1.07 g/cm^3)密度梯度离心分离出骨髓有核细胞,参照文献^[7]进行 DNA 抽提及琼脂糖凝胶电泳,以检测凋亡的发生。结果显示:抽提骨髓有核细胞 DNA 并进行琼脂糖凝胶电泳,各组均未见 180~200 碱基对及其整数倍 DNA 特征性的梯状图谱。

表 3 GAFS 对 Cy 处理小鼠骨髓 CFU-GM 分化的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量(g/kg)	CFU-G/皿	CFU-M/皿	CFU-GM/皿
对照组	NS	12 $\pm$ 5	15 $\pm$ 6	43 $\pm$ 14
鲨肝醇组	0.04	36 $\pm$ 11▲▲	19 $\pm$ 8	90 $\pm$ 25
GAFS 组	13.9	26 $\pm$ 13▲	44 $\pm$ 15▲▲△	108 $\pm$ 37▲

与对照组比较▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$

与鲨肝醇组比较△ $P<0.05$

4 讨论

目前,中药治疗化、放疗所致的白细胞/粒细胞减少症多着眼于脾、肾,采用补益之法。近年来研究发现,人参皂甙^[8]、黄芪^[9]、补骨脂^[10]均能对抗 Cy 所致小鼠 PWBC 降低作用,同时增加 PWBC 数;苦参的有效成分之一氧化苦参碱(OMT)与 Cy 合用有协同抗癌作用,使 Cy 引起的白细胞降低的毒性作用明

显减轻^[11]。

本研究结果表明:GAFS 对 Cy 致 PWBC 和 NC 下降具有对抗和促恢复作用,能使 PWBC 和 NC 升高时间提前至第 5 天,第 7 天达峰值,恢复时相缩短近 2 d,并能防治骨髓有核细胞数、粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)数的减少,促进 CFU-GM 的增殖并诱导其向粒系、巨噬系分化,其促粒系造血作用优于西药鲨肝醇。提示参芪补苦复方用于对抗化、放疗所致粒系造血抑制有较好的疗效;与化疗药物合用,有助于提高化疗药物的用量,提高缓解率,延长生存期。

正常造血调控中的一个重要环节就是造血生长因子通过阻抑和诱发程序性细胞死亡(PCD)调节血细胞的生成^[12]。PCD 最典型的生化特征是 DNA 断裂成不同倍数的 180~200 碱基对的片断^[13],DNA 琼脂糖凝胶电泳可见特征性的梯形样图谱。我们的观察结果未见特征性的梯形图谱。而参芪补苦复方对抗 Cy 导致粒系造血抑制是否可能与 PCD 有关尚无报道,值得进一步探讨。

综上所述,GAFS 防治 Cy 所致的白细胞/粒细胞减少症,其机理可能是通过促进骨髓

中白细胞/中性粒细胞的释放及刺激 CFU-GM 的增殖、分化达到升白/粒细胞作用。本文为 GAFS 与化疗药物合用对抗化疗的毒副作用,提供了实验依据。

致谢:本研究得到湖南医科大学生理室贺石林教授及卫生统计学室罗建清讲师热情指导。

参考文献

- 1 Lotem J, *et al.* Cell Growth Differ, 1993, 4: 41
- 2 任天池. 中草药, 1984, 15(4): 5
- 3 曹春林. 中草药制剂汇编. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 19
- 4 阴 健, 等. 中药现代研究与临床应用. 北京: 学苑出版社, 1994. 19, 385, 429, 599
- 5 金丕焕. 医用统计方法. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 85
- 6 Byron J W, *et al.* Blood, 1972, 40: 198
- 7 Herrmann M, *et al.* Nucleic Acids Res, 1994, 22(24): 5506
- 8 贾廷珍. 中药药理与临床, 1989, 5(3): 35
- 9 全宏勋, 等. 中草药, 1993, 24(8): 423
- 10 孙 燕. 中华医学杂志, 1981, 61(2): 97
- 11 吕式琪, 等. 药学报, 1987, 22(4): 248
- 12 Williams G T, *et al.* Trends Cell Biol, 1992, 2: 263
- 13 Cohen J J. Immunol Today, 1993, 14: 126

(1996-12-30 收稿)

《中草药》杂志 1997 年第 28 卷增刊(总第 297 期)征订启事

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家科委(国科发信字[1997]281 号文)批准,我们编辑出版了《中草药》杂志 1997 年第 28 卷增刊(总第 297 期)。本增刊共收入论文 92 篇,其中紫杉醇研究方面的论文 12 篇,包括紫杉醇的化学成分、提取工艺、组织培养等方面科研论文,并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家和中青年学科带头人撰写综述文章,充分反映了我国从事紫杉醇研究方面的新成果,新进展和新动态。另外,还有反映国内中药植化、药理、分析、制剂、药材、临床等方面的新理论,新方法,新成就的科研论文和有关综述性文章 80 篇。本增刊选题广泛,内容丰富,学术水平较高,科学性较强,集中反映了我国中草药研究领域近 1~2 年的新进展。

增刊为 16 开本,采用激光照排,胶版印刷,144 页(约 30 万字左右),天津市报刊增刊特字准印证(97)第 061 号,本部发行,定价 40 元,另加包装费、邮局附加费 5 元。凡订阅者请向我部索取订单:300193 天津市鞍山山西道 308 号《中草药》杂志编辑部。