

抑白升血糖浆对化疗小鼠造血功能和免疫功能的影响

唐 渊¹, 李晓辉^{1*}, 张海港¹, 熊德上², 蔡 铿², 周见至¹, 林 海¹, 王晓芹¹, 曾 健¹

(1. 第三军医大学 基础部, 重庆 400038; 2. 重庆将军血液病研究所, 重庆 400041)

摘要: 目的 观察抑白升血糖浆 (YBSX) 对环磷酰胺 (CTX) 处理的小鼠造血功能和免疫功能的影响并确定其最佳给药方式。方法 将 YBSX 按照单纯预防、单纯治疗和预防+治疗 3 种给药方式 ig 给药, 常规方法计数小鼠白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数, 测定脾脂数; 鸡红细胞吞噬实验测定巨噬细胞 ($M\Phi$) 吞噬率和吞噬指数; ELISA 法测定血清中肿瘤坏死因子 (TNF α) 含量。结果 YBSX 对白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数、脾指数、巨噬细胞吞噬指数和 TNF α 含量都有不同程度的改善。结论 YBSX 可改善受 CTX 抑制小鼠的造血功能和免疫功能, 且预防加治疗给药效果最佳。

关键词: 抑白升血糖浆; 癌症; 化疗; 造血功能; 免疫功能; 环磷酰胺

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)06-0654-04

Effects of YBSX Syrup on hematopoietic and immunologic functions in mice treated by chemotherapy

TANG Yuan¹, LI Xiao-hui¹, ZHANG Hai-gang¹, XIONG De-shang², CAI E², ZHOU Jian-zhi¹, LIN Hai¹, WANG Xiao-qin¹, ZENG Jian¹

(1. Basic Medical Faculty of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Chongqing Jiangjun Hematopathy Institute, Chongqing 400041, China)

Abstract **Object** To explore the effects of Yibaishengxue (YBSX) Syrup on hematopoietic and immunologic functions of mice pretreated by cyclophosphamide (CTX) and the most proper regime of the administration of YBSX Syrup. **Methods** YBSX Syrup was ig administered to the prevention group, the treatment group, and the group which combined the prevention and treatment together. The number of blood leucocyte, platelet and bone marrow cell were counted by conventional methods; spleen index was measured by weighing method. Phagocytic rate and index were evaluated by phagocytic effect of peritoneal macrophage ($M\Phi$) on chick erythrocyte, and the content of serum tumor necrosis factor alpha (TNF α) was assayed by ELISA. **Results** YBSX Syrup enhanced the count of leucocytes, platelets, and bone marrow cells, improved the level of spleen index and macrophage phagocytic index, and increased the content of TNF α in serum dose-dependent. **Conclusion** YBSX Syrup is able to ameliorate the disorders of hematopoietic and immunologic functions induced by CTX, and show the combination of prevention and treatment regime is the best one.

Key words Yibaishengxue (YBSX) Syrup; cancer; chemotherapy; hematogenetic function; immune function; CTX

抑白升血糖浆 (YBSX) 由补骨脂、蚤休、羊蹄等 6 位中药组成, 临床上用于治疗急性粒细胞白血病和淋巴细胞白血病, 疗效显著。多数患者使用 YBSX 治疗后, 白血病症状都有不同程度的缓解。YBSX 尤其能改善化疗药物所致的血象异常, 增强患者的免疫功能, 但其具体机制尚不清楚。为此, 本实验观察 YBSX 对环磷酰胺 (CTX) 化疗小鼠的造血和免疫功能的影响, 分别采用单纯预防、单纯治疗

和预防+治疗 3 种方式给予 YBSX, 探讨其最佳给药方式, 为临床合理用药提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物: 300 只昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 由第三军医大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 渝动字第 310203002 号。

1.2 药品: YBSX 由重庆市将军血液病研究所提供, 经水煎提取、浓缩至含生药 0.75 g/mL 药液, 各

* 收稿日期: 2003-10-15

基金项目: 重庆市卫生局重点科研课题 (01004)

作者简介: 唐 渊 (1974-), 男, 重庆人, 助教, 药理学硕士, 研究方向为抗炎免疫药理学。

Tel (023) 68753397 E-mail tangyuanty 99@sina.com.cn

* 通讯作者

主要成分含量为: 补骨脂素 $\geq 0.45\text{ g/L}$ 甾体皂苷 $\geq 2.0\text{ g/L}$ 大黄酚 $\geq 0.045\text{ g/L}$ 复方阿胶浆由山东东阿阿胶股份有限公司生产,批号 i010822-2 CTX 由上海华联制药有限公司生产,批号 010304 TNF- α 的 ELISA 试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供

1.3 分组及给药: YBSX 大、小剂量组分别含生药 2.0, 0.667 g/mL 按单纯预防、单纯治疗和预防+治疗 3 种给药方案。每种给药方案依据完全随机设计分为 5 组: 正常对照组 CTX 模型组 阿胶 (8 mL/kg) 对照组、YBSX (13, 40 g/kg) 组,每组 20 只。CTX 对照组 ig 等体积的生理盐水,同时每天 ip CTX 100 mg/kg,连续 3 d,间隔 2 d 后处死动物检测相关指标 单纯预防组先 ig YBSX 7 d,再每天 ip CTX 100 mg/kg,连续 3 d,间隔 2 d 后处死动物检测相关指标 单纯治疗组每天 ip CTX 100 mg/kg,给药 3 d,再 ig YBSX 7 d,末次 ig 3 h 后处死动物检测相关指标。预防+治疗组先 ig YBSX 3 d,接下来 3 d 每天 ip CTX 100 mg/kg,再每天 ig YBSX 7 d,末次给药 3 h 后处死动物检测相关指标。在 3 种给药方案中,阿胶对照组的给药次数和天数与同组中 YBSX 的给药方式相同 正常对照组仅 ig 等体积生理盐水。给药体积均为每只 0.4 mL

1.4 指标检测

1.4.1 白细胞和血小板计数: 参照常规方法剪尾取血进行白细胞和血小板计数。

1.4.2 巨噬细胞吞噬率和吞噬指数测定: 小鼠末次给药 30 min 后,每鼠 ip 0.5 mL 5% 鸡红细胞生理

盐水悬液。3 h 后,脱颈椎处死小鼠,ip 生理盐水 2 mL,轻揉小鼠腹部后,剖腹吸取腹腔液 0.5 mL 涂片,自然干燥后,Geimsa-wright 染色,油镜观察 200 个巨噬细胞,计算巨噬细胞吞噬率和吞噬指数^[1]。

1.4.3 骨髓有核细胞计数: 小鼠处死后取一侧股骨,剪去两端,用 3% 醋酸 10 mL 冲洗出骨髓细胞,进行骨髓有核细胞计数^[2]。

1.4.4 脾指数: 小鼠处死后,称体重,取脾脏称其质量,以脾脏质量/体重表示脾指数 (mg/10 g)^[3]。

1.4.5 TNF- α 含量测定: 按照试剂盒说明书用 ELISA 法测定小鼠血清 TNF- α 含量。

1.5 统计方法: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS8.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 单纯预防给药对造血功能的影响: 结果见表 1 与 CTX 模型组相比,YBSX 单纯预防大剂量组能显著升高白细胞数、血小板数和脾指数 ($P < 0.05$),对骨髓有核细胞数有所升高,但无统计学意义;小剂量组对白细胞数、血小板数和脾指数也有一定的升高作用,但无统计学意义。阿胶单纯预防组的作用与 YBSX 单纯预防大剂量组的作用相当。

2.2 单纯治疗给药对造血功能的影响: 见表 2 与 CTX 模型组相比,YBSX 单纯治疗大剂量组能十分显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数,小剂量组能显著地升高白细胞数 ($P < 0.05$),也能升高血小板数和脾指数,但无统计学意义。阿胶单纯治疗组的作用与 YBSX 单纯治疗大剂

表 1 YBSX 单纯预防 给药对造血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effects of YBSX Syrup by only preventive administration on hematopoietic function ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组 别	剂 量	白细胞数 / (个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	血小板数 / (10 ⁴ 个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	骨髓有核细胞数 / (10 ⁴ 个 $\cdot$ 股骨 ⁻¹)	脾指数 / (mg $\cdot$ 10 g ⁻¹)
正常对照	-	8 040 $\pm$ 1 169	36.4 $\pm$ 18.0	1 765 $\pm$ 457	5.45 $\pm$ 2.04
CTX 模型	100 mg $\cdot$ kg ⁻¹	1 850 $\pm$ 1 766 *	17.1 $\pm$ 1.60 *	554 $\pm$ 247 *	2.06 $\pm$ 0.88 *
阿胶对照	8 mL $\cdot$ kg ⁻¹	4 630 $\pm$ 1 819▲	34.4 $\pm$ 14.8▲	611 $\pm$ 210	3.26 $\pm$ 0.17▲
YBSX	40 g $\cdot$ kg ⁻¹	4 825 $\pm$ 3 031▲	27.1 $\pm$ 1.6▲	677 $\pm$ 280	4.45 $\pm$ 1.30▲
	13 g $\cdot$ kg ⁻¹	3 375 $\pm$ 1 198	20.0 $\pm$ 10.2	494 $\pm$ 200	2.50 $\pm$ 0.90

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CTX 模型组比较: ▲ $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs normal control group; ▲ $P < 0.05$ vs CTX model group

表 2 YBSX 单纯治疗 给药对造血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effects of YBSX Syrup by only treatment administration on hematopoietic function ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组 别	剂 量	白细胞数 / (个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	血小板数 / (10 ⁴ 个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	骨髓有核细胞数 / (10 ⁴ 个 $\cdot$ 股骨 ⁻¹)	脾指数 / (mg $\cdot$ 10 g ⁻¹)
正常对照	-	8 720 $\pm$ 2 327	36.7 $\pm$ 8.9	1 701 $\pm$ 426	5.15 $\pm$ 1.86
CTX 模型	100 mg $\cdot$ kg ⁻¹	2 075 $\pm$ 1 759 *	14.3 $\pm$ 2.3 *	566 $\pm$ 85 *	2.17 $\pm$ 1.04 *
阿胶对照	8 mL $\cdot$ kg ⁻¹	6 600 $\pm$ 1 202▲▲	42.0 $\pm$ 26.9▲▲	1 207 $\pm$ 321▲▲	6.50 $\pm$ 3.51▲▲
YBSX	40 g $\cdot$ kg ⁻¹	7 019 $\pm$ 1 718▲▲	43.7 $\pm$ 18.5▲▲	1 098 $\pm$ 220▲▲	6.44 $\pm$ 3.44▲▲
	13 g $\cdot$ kg ⁻¹	4 733 $\pm$ 1 208▲	24.2 $\pm$ 12.0	713 $\pm$ 78	2.43 $\pm$ 0.37

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CTX 模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs CTX model group

量组的作用相当。

2.3 预防+ 治疗给药对造血功能的影响: 见表 3 与 CTX 模型组相比, YBSX 预防+ 治疗大剂量组能十分显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数 ($P < 0.01$), 小剂量组也能显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数 ($P < 0.05$)。阿胶预防+ 治疗组的作用与 YBSX 预防+ 治疗大剂量组的作用相当。

表 3 YBSX 预防+ 治疗给药对造血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effects of YBSX Syrup by combined prevention and treatment administration on hematopoietic function ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组 别	剂 量	白细胞数 / (个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	血小板数 / (10 ⁹ 个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	骨髓有核细胞数 / (10 ⁶ 个 $\cdot \text{股骨}^{-1}$)	脾指数 / (mg $\cdot 10\text{g}^{-1}$)
正常对照	-	8 040 $\pm$ 1 168	35. $\pm$ 11. 2	1 68 $\pm$ 437	5. 56 $\pm$ 0. 70
CTX 模型	100 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$	2 08 $\pm$ 766 *	18. 9 $\pm$ 7. 1 *	592 $\pm$ 166 *	2. 00 $\pm$ 0. 76 *
阿胶对照	8 mL $\cdot \text{kg}^{-1}$	4 400 $\pm$ 1 413▲	43. 3 $\pm$ 19. 4▲▲	1 048 $\pm$ 168▲▲	4. 15 $\pm$ 1. 02▲
YBSX	40 g $\cdot \text{kg}^{-1}$	7 550 $\pm$ 1 587▲▲	41. $\pm$ 15. 4▲▲	94 $\pm$ 281▲▲	5. 29 $\pm$ 1. 08▲▲
	13 g $\cdot \text{kg}^{-1}$	4 733 $\pm$ 1 208▲	27. 8 $\pm$ 10. 6▲	862 $\pm$ 210▲	3. 30 $\pm$ 0. 65▲

表注同表 2

Notes are same to Table 2

表 4 YBSX 预防+ 治疗给药对免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effects of YBSX Syrup by combined prevention and treatment administration on immunologic function ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组 别	剂 量	MΦ 吞噬率 / %	MΦ 吞噬指数 / %	TN F-α / (pg $\cdot \text{mL}^{-1}$)
正常对照	-	29. 82 $\pm$ 2. 04	0. 366 $\pm$ 0. 074	1 197 $\pm$ 155
CTX 模型	100 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$	22. 76 $\pm$ 7. 24	0. 207 $\pm$ 0. 093*	353 $\pm$ 106 *
阿胶对照	8 mL $\cdot \text{kg}^{-1}$	26. 8 $\pm$ 4. 67	0. 335 $\pm$ 0. 048▲	1 12 $\pm$ 268▲▲
YBSX	40 g $\cdot \text{kg}^{-1}$	27. 95 $\pm$ 6. 74	0. 327 $\pm$ 0. 075▲	558 $\pm$ 166▲
	13 g $\cdot \text{kg}^{-1}$	22. 16 $\pm$ 2. 89	0. 23 $\pm$ 0. 039	492 $\pm$ 150

表注同表 2

Notes are same to Table 2

YBSX 是一个在临床应用中取得了明显疗效的方剂。其中, 补骨脂具有补肾助阳, 升达脾胃之功效^[4]; 蚕休具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之作用^[5]; 羊蹄具有清热解毒、止血凉血之功效^[6]。

在本实验中, CTX 模型组与正常对照组相比, 白细胞数、脾指数、骨髓有核细胞数和血小板数显著降低, 说明常用的化疗药物 CTX 能使小鼠免疫功能处于明显的抑制状态, 且造血功能低下^[7]。与 CTX 模型组相比, YBSX 单纯预防的大剂量组能显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数, 升高率分别达 161%、58%、22%、116%; YBSX 单纯治疗的大剂量组能显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数, 升高率分别达 238%、206%、94%、197%, 单纯治疗小剂量组也能显著地升高白细胞数, 升高率达 128%, 说明单

2.4 预防+ 治疗给药对免疫功能的影响: 见表 4 与 CTX 模型组相比, YBSX 预防+ 治疗大剂量组可显著地升高巨噬细胞吞噬指数和 TN F-α 含量 ($P < 0.05$), 小剂量组也可升高巨噬细胞吞噬指数和 TN F-α 含量, 但无统计学意义。阿胶预防+ 治疗组的作用与 YBSX 预防+ 治疗大剂量组的作用相当, 且升高 TN F-α 的作用十分显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

单纯治疗组效果要好于单纯预防组。而 YBSX 预防+ 治疗的大剂量组十分显著地升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数, 升高率分别达 263%、117%、59%、165%; 其小剂量组也显著升高白细胞数、血小板数、骨髓有核细胞数和脾指数, 升高率分别达 127%、47%、46%、63%。说明在 3 组中, 预防+ 治疗组对于被 CTX 抑制的造血系统的疗效最佳, 这对于减轻化疗的损害, 提高近期疗效有益^[8]。为了评价 YBSX 对 CTX 所致免疫功能的抑制是否有预防作用, 在预防+ 治疗组中又观察了两个重要的免疫学指标, 发现大剂量组的巨噬细胞吞噬指数和 TN F-α 含量显著升高。巨噬细胞具有杀菌、吞噬肿瘤细胞、突变细胞, 提呈抗原诱发特异性免疫应答, 并参与免疫调节等多种免疫作用; TN F-α 主要是由被激活的巨噬细胞所产生的, 参与机体炎症与免疫应答调节, 导致肿瘤细胞凋亡, 具有抗肿瘤作用^[9], 因而巨噬细胞功能的改善和 TN F-α 含量的升高对肿瘤的治疗有利。以上结果说明, YBSX 对 CTX 化疗所致造血系统和免疫系统的抑制有明显的改善作用; 3 种给药方法中, 预防+ 治疗的疗效最好。本研究为临床合理使用 YBSX 治疗急性粒细胞白血病和淋巴细胞白血病提供了实验依据。

References

[1] Chen S M, Nie X T. The effect of the alcohol extract of pi-louse antler on the phagocytic phagocytosis of the mice model of the amounts of white blood cell decreasing [J]. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med* (山西中医学院学报), 2000, 1(1): 4-5.
[2] Li S G, Yang X F, Yu D Z, et al. Effects of Piyunan on gastrointestinal and immunologic function in normal and defi-

- ciency of spleen's mice [J]. *Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(3): 27-29.
- [3] Li Z B, Qiu H M, Liu G P, *et al.* Effect of Qing-Du-Yin and Yang-Zheng-Han on granulocytopoiesis in mouse with cyclophosphamide induced [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 1999, 16(1): 34-37.
- [4] Liu S Q, Ma W X, Tang X Z, *et al.* Determination of the content of psoralen and isopsoralen in Chinese herbs by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(7): 355-358.
- [5] Wang H T. Zaixiu used alone in clinical practice [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 30(3): 53.
- [6] Liu L L, Yuan Y, Chen W S, *et al.* Identification of Yangti (crispatehubarb) by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(11): 1024-1026.
- [7] Luo B, Zhong R, Song S S. Study on the protective effects of bone marrow lesion induced by chemical drugs *in vivo* using Xue-bao [J]. *J Clin Hematology* (临床血液学杂志), 2002, 15(1): 20-22.
- [8] Li J S, Fu J D, Tang J. Clinical study on *Astragalus* injection combined with radiotherapy and chemotherapy in treating malignant tumor [J]. *Pract Clin Med* (实用临床医学), 2002, 3(40): 67-71.
- [9] Matthew E B, Christopher B W, Yan T, *et al.* Oestrogen-mediated suppression of tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis in MCF-7 cells: subversion of Bcl-2 by anti-oestrogens [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 78(5): 409-418.

西红花酸对羟自由基损伤的原代心肌细胞的保护作用

沈祥春, 钱之玉*

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 研究西红花酸 (crocin) 对羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 损伤的原代培养心肌细胞的保护作用。方法 培养的原代心肌细胞加入不同浓度的西红花酸后, 用 $0.5 \text{ mmol/L OH}^\cdot$ 损伤原代培养的心肌细胞, 检测细胞培养上清液中的乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌细胞线粒体琥珀酸脱氢酶 (MSD) 的活性, 心肌细胞线粒体膜电位 (MMP) 的变化, 并用流式细胞仪及 DNA 梯度电泳检测细胞凋亡。结果 $0.5 \text{ mmol/L OH}^\cdot$ 使细胞培养上清液中 LDH 活性增加, MSD 的活性降低, MMP 降低, 心肌细胞凋亡率增加。西红花酸 $1.0, 0.1 \mu\text{mol/L}$ 明显降低培养上清液中 LDH 活性, 提高 MSD 的活性及 MMP, 降低心肌细胞凋亡率, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结论 西红花酸对 $\text{OH}^\cdot$ 所致的心肌细胞损伤 (凋亡) 具有保护作用。

关键词: 西红花酸; 羟自由基; 心肌细胞

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0657-04

Protection of crocin on primary culture cardiac myocyte injured by hydroxyl free radicals

SHEN Xiang-chun, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009 China)

Abstract **Object** To study the cardio-protective effect of crocin on primary culture cardiac myocyte injured by hydroxyl free radicals. **Methods** After adding crocin, primary culture cardiac myocyte was injured by 0.5 mmol/L hydroxyl free radicals which were generated by Fenton systems. The activity of lactic dehydrogenase (LDH) and mitochondrion succinic dehydrogenase (MSD) was observed. Mitochondrion membrane potential (MMP) was detected by Rh123. The ratio of cardiac myocyte apoptosis was investigated by flow cytometry and DNA ladder electrophoresis. **Results** Compared with the model group, crocin significantly decreased the activity of LDH in culture supernatant and the ratio of cardiac myocyte apoptosis, markedly increased the activity of MSD and MMP. **Conclusion** Crocin has the protective effect on the apoptosis of cardiac myocyte injured by hydroxyl free radical.

Key words crocin; hydroxyl free radicals; cardiac myocyte

近期的研究结果表明心肌受损的主要途径之一是氧自由基及其引起的脂质过氧化反应而导致的心肌细胞凋亡^[1,2]。羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 是人体内反应性最强的氧自由基, 尽管它的半衰期短, 扩散范围小, 但极其活泼, 易溶于脂质, 因此 $\text{OH}^\cdot$ 的危害性更

大, 它及其介导的脂质过氧化反应与体内许多重要生理和病理过程密切相关^[3]。西红花苷及其苷元西红花酸是西红花的主要有效成分^[4], 具有不饱和共轭烯酸结构, 属类胡萝卜素类, 具有极强的抗氧化作用^[5]。国外研究资料提示西红花酸可抑制蛋白激酶

* 收稿日期: 2003-11-13

作者简介: 沈祥春, 男, 山东郯城人, 中国药科大学博士研究生, 主要研究方向为生化药理学和心血管药理学。

* 通讯作者 Tel (025) 83271322